

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202292248 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.12.07

(22) Дата подачи заявки
2021.03.02

(51) Int. Cl. A61K 38/12 (2006.01)
A61K 31/56 (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01)
A61K 38/15 (2006.01)
A61P 37/06 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)

(54) СОЕДИНЕНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ ПРИ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ СОСТОЯНИЯХ

(31) 20382152.5; 20382192.1; 20382266.3;
20382339.8; 20382816.5; 20382815.7;
21382059.0

(32) 2020.03.02; 2020.03.13; 2020.04.02;
2020.04.27; 2020.09.16; 2020.09.16;
2021.01.25

(33) EP

(86) PCT/EP2021/055187

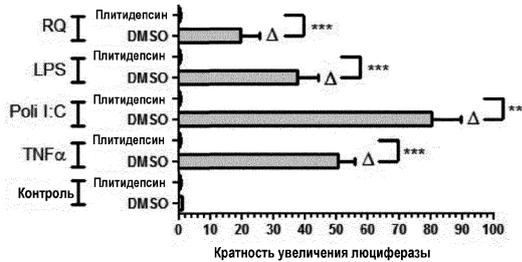
(87) WO 2021/175857 2021.09.10

(71) Заявитель:
ФАРМА МАР, С.А. (ES)

(72) Изобретатель:
Авилес Марин Пабло, Лосада
Гонсалес Алехандро, Фернандес
Соуса-Фаро Хосе Мария, Фудио
Муньос Сальвадор (ES)

(74) Представитель:
Поликарпов А.В., Соколова М.В.,
Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатьев
А.В., Билык А.В., Дмитриев А.В.,
Бучака С.М., Бельтюкова М.В. (RU)

(57) Изобретение относится к применению соединений в лечении воспаления, предпочтительно воспаления, связанного с активацией Toll-подобных рецепторов. Изобретение также относится к применению соединений для лечения воспаления, вызванного патогенами.



A1

202292248

202292248

A1

РСТ/ЕР2021/055187

A61K 38/12 (2006.01) *A61K 38/15* (2006.01)
A61K 31/56 (2006.01) *A61P 37/06* (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01) *A61P 29/00* (2006.01)

СОЕДИНЕНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ ПРИ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ СОСТОЯНИЯХ

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к лечению воспаления и, в частности, воспаления, связанного с активацией Toll-подобных рецепторов или являющегося ее результатом. Изобретение также относится к лечению воспаления, вызванного патогенами.

ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Воспаление является одним из основных ответов иммунной системы на повреждение тканей и инфекцию и затрагивает основные иммунные клетки и внеклеточные медиаторы и регуляторы, такие как цитокины.

В случае инфекции воспаление запускается при активации врожденной иммунной системы. Клетки врожденного иммунитета, такие как макрофаги, дендритные клетки и нейтрофилы, являются важными участниками врожденного иммунитета и инфекции. Эти клетки экспрессируют PRR (паттерн-распознающие рецепторы), которые обнаруживают микробные компоненты, так называемые патоген-ассоциированные молекулярные паттерны (PAMP). Одним из классов PRR являются Toll-подобные рецепторы (TLR, которых существует 10 подтипов, TLR1-10), которые могут обнаруживать различные патогены среди вирусов, бактерий, простейших и грибов. Например, TLR могут обнаруживать бактериальный липополисахарид, липопроотеины, флагеллин, бактериальную CpG-ДНК и вирусную одно- и двухцепочечную РНК. После распознавания PAMPs PRR активируются и запускают внутриклеточный сигнальный каскад, что в конечном итоге приводит к экспрессии молекул провоспалительных цитокинов. Один сигнальный каскад приводит к активации канонического пути NF-κB, который является основным регулятором воспаления и центральным медиатором индукции провоспалительных генов. Активация трансдукции NF-κB отвечает за индукцию транскрипции провоспалительных цитокинов, хемокинов и дополнительных медиаторов воспаления в различных типах иммунных клеток. Эти медиаторы воспаления могут как непосредственно участвовать в индукции воспаления, так и действовать опосредованно, способствуя дифференцировке воспалительных Т-клеток.

Однако, несмотря на то, что формирование сильного иммунного ответа является важной частью ответа хозяина на патогенную инфекцию, чрезмерное или неадекватное воспаление, например гипервоспаление, может быть вредным. Действительно, чрезмерное воспаление играет важную роль в патогенезе многих инфекционных заболеваний. В одном примере чрезмерное воспаление после инфицирования патогеном приводит к гиперцитокинемии, широко известной как цитокиновый шторм. Цитокиновый шторм возникает в результате неконтролируемого и чрезмерного выброса провоспалительных цитокинов. Этот внезапный и чрезмерный выброс цитокинов особенно вреден для хозяина и может привести к полиорганной недостаточности и смерти. В частности, острое повреждение легких (ОПЛ) является частым следствием цитокинового шторма в легочной альвеолярной среде и системном кровообращении. Повреждение легких, вызванное патогенами, может прогрессировать в ОПЛ или более тяжелую форму, называемую острым респираторным дистресс-синдромом (ОРДС), который наблюдается при инфекциях SAR-CoV-2. Гиперцитокинемия также может быть обусловлена рядом инфекционных агентов, а также неинфицированных хозяев.

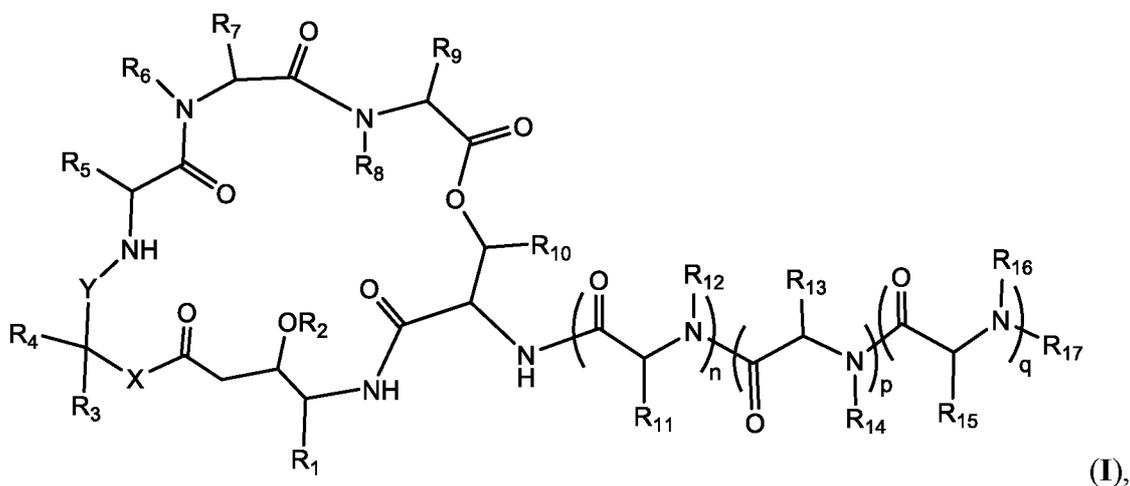
Кроме того, инфицирование патогенами также приводит к активации макрофагов. Активированные макрофаги в два раза больше покоящихся макрофагов и более «агрессивны», имея повышенный уровень лизосомальных белков и более высокую способность к фагоцитозу. Классически активированные макрофаги также выделяют протеазы, факторы хемотаксиса нейтрофилов, активные формы кислорода и провоспалительные цитокины (такие как IL (интерлейкин)-1 бета/IL-1F2, IL-6 и TNF (фактор некроза опухоли)-альфа/TNFSF1A), что приводит к воспалению и разрушению тканей. Таким образом, эффекторная функция макрофагов значительно влияет на качество, продолжительность и величину воспалительного ответа, и хотя этот ответ важен для защиты хозяина, при неконтролируемом активировании макрофаги могут вызывать значительное повреждение тканей. Таким образом, сверхактивация макрофагов является ключевым фактором нарушений, характеризующихся чрезмерным воспалением. В частности, в Wang et al., 2020 был сделан вывод, что активированные альвеолярные макрофаги играют центральную роль в цитокиновом шторме, вызванном инфекцией SARS-CoV-2. Только по этой причине методы снижения уровней активации и/или рекрутирования макрофагов также являются ключевыми для предупреждения и лечения воспаления, возникающего в результате инфицирования патогенами, и, в частности, гиперцитокинемии.

Таким образом, воспаление и цитокиновый шторм являются общим клиническим признаком тяжелых и смертельных инфекций, вызванных рядом вирусных инфекций. К ним относятся респираторные вирусы, такие как *Orthomyxoviridae*. Они также включают инфекции, вызванные одноцепочечными (+) РНК-вирусами, включая членов семейств *Flaviviridae*, *Picornaviridae*, *Togaviridae*, *Caliciviridae*, *Roniviridae*, *Retroviridae* и *Coronaviridae*. В большинстве смертельных инфекций агентом, ответственным за летальность, является не цитолитическая активность вируса, а иммунопатологический ответ хозяина. Среди оц(+) РНК-вирусов, вызывающих тяжелые заболевания у человека и животных, имеющих экономическое значение: *Flaviviridae*, *Picornaviridae*, *Togaviridae*, *Caliciviridae*, *Retroviridae*, *Coronaviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Phlebovirus*, *Arenaviridae* и *Herpesviridae*, особенно связаны с воспалением и цитокиновым штормом.

Таким образом, существует потребность в новых методах лечения воспаления и, в частности, чрезмерного воспаления или гипервоспаления, такого, которое возникает в результате инфицирования патогенами. Настоящее изобретение направлено на удовлетворение этой потребности.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В одном аспекте настоящее изобретение относится к соединению общей формулы I или его фармацевтически приемлемой соли или стереоизомеру,



где X выбран из O и NH;

Y выбран из CO и $-\text{COCH}(\text{CH}_3)\text{CO}-$;

каждый n и p независимо выбран из 0 и 1, и q выбран из 0, 1 и 2;

каждый R_1 , R_3 , R_5 , R_9 , R_{11} и R_{15} независимо выбран из водорода, замещенного или незамещенного C_1 - C_6 алкила, замещенного или незамещенного C_2 - C_6 алкенила и замещенного или незамещенного C_2 - C_6 алкинила;

R_2 выбран из водорода, CORa, COORa, замещенного или незамещенного C_1 - C_6 алкила, замещенного или незамещенного C_2 - C_6 алкенила и замещенного или незамещенного C_2 - C_6 алкинила;

каждый R_4 , R_8 , R_{10} , R_{12} и R_{16} независимо выбран из водорода и замещенного или незамещенного C_1 - C_6 алкила;

каждый R_7 и R_{13} независимо выбран из водорода, замещенного или незамещенного C_1 - C_6 алкила, замещенного или незамещенного C_2 - C_6 алкенила и замещенного или незамещенного C_2 - C_6 алкинила; каждый R_6 и R_{14} независимо выбран из водорода и замещенного или незамещенного C_1 - C_6 алкила; или R_6 и R_7 и/или R_{13} и R_{14} вместе с соответствующим атомом N и атомом C, к которым они присоединены, могут образовывать замещенную или незамещенную гетероциклическую группу;

R_{17} выбран из водорода, CORa, COORa, CONHRb, COSRc, (C=NRb)ORa, (C=NRb)NHRb, (C=NRb)SRc, (C=S)ORa, (C=S)NHRb, (C=S)SRc, SO₂Rc, SO₃Rc, замещенного или незамещенного C_1 - C_{12} алкила, замещенного или незамещенного C_2 - C_{12} алкенила, замещенного или незамещенного C_2 - C_{12} алкинила, замещенного или незамещенного арила и замещенной или незамещенной гетероциклической группы, при условии что, когда n, p и q равны 0, тогда R_{17} не является водородом; и

каждый Ra, Rb и Rc независимо выбран из водорода, замещенного или незамещенного C_1 - C_{12} алкила, замещенного или незамещенного C_2 - C_{12} алкенила, замещенного или незамещенного C_2 - C_{12} алкинила, замещенного или незамещенного арила и замещенной или незамещенной гетероциклической группы;

для применения в лечении воспаления.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к соединению, как определено выше (и в настоящем документе), для применения в лечении воспаления, связанного с активацией Toll-подобных рецепторов.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к соединению, как определено выше (и в настоящем документе), для применения в лечении расстройства, выбранного из острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС), пневмонии и иммунопатологии, и, в частности, гиперцитокинемии (синдром цитокинового шторма), сепсиса и болезни «трансплантат против хозяина».

В одном аспекте настоящее изобретение относится к соединению, как определено выше (и в настоящем документе), для применения в лечении воспаления, вызванного патогенами. В одном воплощении патоген представляет собой бактерию или вирус.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к соединению, как определено выше (и в настоящем документе), для применения в комбинированном лечении воспаления, связанного с активацией Toll-подобных рецепторов, или воспаления, связанного с воспалением, вызванным патогенами, и в лечении вирусной инфекции.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к соединению, как определено выше (и в данном документе), для применения в качестве противовоспалительного и противовирусного средства.

В одном конкретном аспекте соединение общей формулы I представляет собой PLD (плитидепсин) или его фармацевтически приемлемую соль или стереоизомер.

В одном конкретном аспекте соединение общей формулы I представляет собой дидемнин B или его фармацевтически приемлемую соль или стереоизомер.

В другом аспекте настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции, содержащей соединение, как определено здесь, и фармацевтически приемлемый носитель, для применения согласно настоящему изобретению.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к применению соединения, как определено здесь, в изготовлении лекарственного средства для лечения воспаления.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к применению соединения, как определено здесь, в изготовлении лекарственного средства для лечения воспаления, связанного с активацией Toll-подобных рецепторов.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к применению соединения, как определено здесь, в изготовлении лекарственного средства для лечения расстройства, выбранного из пневмонии, острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС), гиперцитокинемии (синдром цитокинового шторма), сепсиса и болезни «трансплантат против хозяина».

В другом аспекте настоящее изобретение относится к применению соединения, как определено здесь, в изготовлении лекарственного средства для лечения воспаления, вызванного патогенами.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к применению соединения, как определено здесь, в изготовлении лекарственного средства для комбинированного лечения воспаления, связанного с активацией Toll-подобных рецепторов, или воспаления, связанного с воспалением, вызванным патогенами, и для лечения вирусной инфекции.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к применению соединения, как определено здесь, в изготовлении лекарственного средства для применения в качестве противовоспалительного и противовирусного средства.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения воспаления у любого млекопитающего, предпочтительно человека, где способ включает введение нуждающемуся в этом индивидууму терапевтически эффективного количества соединения, как определено здесь.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения у любого млекопитающего, предпочтительно человека, воспаления, связанного с активацией Toll-подобных рецепторов, где способ включает введение нуждающемуся в этом индивидууму терапевтически эффективного количества соединения, как определено здесь.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения у любого млекопитающего, предпочтительно человека, заболевания, выбранного из пневмонии, острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС), гиперцитокинемии (синдром цитокинового шторма), сепсиса и болезни «трансплантат против хозяина», где способ включает введение нуждающемуся в этом индивидууму терапевтически эффективного количества соединения, как определено здесь.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения у любого млекопитающего, предпочтительно человека, воспаления, вызванного патогенами, где способ включает введение нуждающемуся в этом индивидууму терапевтически эффективного количества соединения, как определено здесь.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу комбинированного лечения у любого млекопитающего, предпочтительно человека, воспаления, связанного с активацией Toll-подобных рецепторов, или воспаления, связанного с вызванным патогенами воспалением и вирусной инфекцией, где способ включает введение нуждающемуся в этом индивидууму терапевтически эффективного количества соединения, как определено здесь.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу противовоспалительного и противовирусного лечения, где способ включает введение нуждающемуся в этом индивидууму терапевтически эффективного количества соединения, как определено здесь.

В другом аспекте изобретения предложен набор, содержащий соединение, как определено здесь, вместе с инструкциями по лечению воспаления; по лечению воспаления, связанного с активацией Toll-подобных рецепторов; по лечению расстройства, выбранного из пневмонии, гиперцитокинемии (синдром цитокинового шторма), сепсиса и болезни «трансплантат против хозяина»; по лечению воспаления, вызванного патогенами; по комбинированному лечению воспаления, связанного с активацией Toll-подобных рецепторов, или воспаления, связанного с вызванным патогенами воспалением, и при лечении вирусной инфекции; или для применения в качестве противовоспалительного и противовирусного средства. В другом воплощении набор может также содержать инструкции по лечению вирусной инфекции, предпочтительно инфекции SARS-CoV или SARS-CoV-2.

Следующие воплощения применимы ко всем аспектам настоящего изобретения.

Патоген может представлять собой вирус. Toll-подобные рецепторы могут быть активированы вирусом. Предпочтительно, вирус представляет собой РНК-содержащий вирус. Более предпочтительно, вирус выбран из *Flaviviridae*, *Picornaviridae*, *Togaviridae*, *Caliciviridae*, *Retroviridae*, *Coronaviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Phlebovirus* и *Arenaviridae*. Альтернативно, вирус представляет собой дц(двухцепочечная) ДНК-вирус, предпочтительно выбранный из *Herpesviridae*.

Альтернативно или дополнительно, вирус представляет собой респираторный вирус.

R₃ и R₄ могут быть независимо выбраны из водорода и замещенного или незамещенного C₁-C₆алкила. R₃ может представлять собой изопропил, а R₄ может представлять собой водород. R₃ и R₄ могут представлять собой метил (это соединение также называют соединением общей формулы II).

R₁₁ может быть выбран из водорода и замещенного или незамещенного C₁-C₆алкила. R₁₁ может представлять собой метил или изобутил. R₁₁ может представлять собой метил, а n равен 1 (это соединение также называют соединением общей формулы III).

R₁, R₅, R₉ и R₁₅ могут быть независимо выбраны из водорода и замещенного или незамещенного C₁-C₆алкила. R₁ может быть выбран из *втор*-бутила и изопропила, R₅ может представлять собой изобутил, R₉ может представлять собой *пара*-метоксибензил, а R₁₅ может быть выбран из метила и бензила.

R_8 , R_{10} , R_{12} и R_{16} могут быть независимо выбраны из водорода и замещенного или незамещенного C_1 - C_6 алкила. R_8 , R_{10} и R_{12} могут представлять собой метил, а R_{16} может представлять собой водород.

R_6 и R_{14} могут быть независимо выбраны из водорода и замещенного или незамещенного C_1 - C_6 алкила. R_6 может быть выбран из водорода и метила, а R_{14} может представлять собой водород.

R_7 и R_{13} могут быть независимо выбраны из водорода и замещенного или незамещенного C_1 - C_6 алкила. R_7 может представлять собой метил, а R_{13} может быть выбран из водорода, метила, изопропила, изобутила и 3-амино-3-оксопропила.

R_6 и R_7 и/или R_{13} и R_{14} вместе с соответствующим атомом N и атомом C, к которым они присоединены, могут образовывать замещенную или незамещенную пирролидиновую группу.

R_2 может быть выбран из водорода, замещенного или незамещенного C_1 - C_6 алкила и COR_a , где R_a может представлять собой замещенный или незамещенный C_1 - C_6 алкил. R_2 может представлять собой водород.

R_{17} может быть выбран из водорода, COR_a , $COOR_a$, $CONHR_b$, $(C=S)NHR_b$ и SO_2R_c , где каждый R_a , R_b и R_c может быть независимо выбран из замещенного или незамещенного C_1 - C_6 алкила, замещенного или незамещенного C_2 - C_6 алкенила, замещенного или незамещенного C_2 - C_6 алкинила, замещенного или незамещенного арила и замещенной или незамещенной гетероциклической группы. R_{17} может быть выбран из водорода, COОбензила, COбензо[b]тиофен-2-ила, группы SO_2 (*para*-метилфенил), $COCOCH_3$ и $COOC(CH_3)_3$.

X может представлять собой NH. X может представлять собой O. Y может представлять собой CO. Y может представлять собой $-COCH(CH_3)CO-$.

Соединение может представлять собой PLD или его фармацевтически приемлемые соли или стереоизомеры. Соединение может представлять собой PLD.

Соединение может представлять собой дидемнин В или его фармацевтически приемлемые соли или стереоизомеры. Соединение может представлять собой дидемнин В.

Воспаление может быть вызвано COVID-19.

Коронавирусная инфекция может представлять собой легкую инфекцию; и/или умеренную инфекцию; и/или тяжелую инфекцию.

Коронавирусная инфекция может представлять собой острую коронавирусную инфекцию, предпочтительно где коронавирусная инфекция представляет собой острую инфекцию COVID-19; и/или может представлять собой продолжающуюся симптоматическую коронавирусную инфекцию, предпочтительно где коронавирусная инфекция представляет собой продолжающуюся симптоматическую инфекцию COVID-19; и/или может представлять собой постковидный синдром, персистирующий ковид или долгий ковид; предпочтительно, когда коронавирусная инфекция представляет собой пост-COVID-19-синдром, персистирующий COVID-19 или долгий COVID-19. Постковидный синдром, персистирующий ковид или долгий ковид может включать один или более чем один симптом, возникающий со стороны сердечно-сосудистой, респираторной, пищеварительной, нервной, костно-мышечной, метаболической, почечной, дерматологической, отоларингологической, кроветворной и вегетативной систем; психические проблемы, генерализованную боль, утомляемость и/или постоянную лихорадку.

Применение может включать применение для лечения пациента с признаками и симптомами коронавирусной инфекции (предпочтительно COVID-19) в течение вплоть до 4 недель; и/или от 4 недель до 12 недель; и/или более 12 недель.

Применение может включать применение для профилактики, купирования или лечения персистирующего COVID, долгого COVID или пост-COVID-синдрома; предпочтительно, когда профилактика, купирование или лечение сводят к минимуму вероятность того, что пациент будет страдать от симптомов персистирующего COVID, долгого COVID или пост-COVID-синдрома; и/или уменьшают тяжесть таких симптомов; более предпочтительно, когда лечение сводит к минимуму симптомы коронавирусной инфекции.

Применение может снижать инфекционность пациентов с короновирусной инфекцией; в том числе, когда пациент бессимптомен или еще малосимптомен, но имеет высокую вирусную нагрузку. Применение может уменьшать возникновение суперконтагаторов (бессимптомные или малосимптомные пациенты с высокой вирусной нагрузкой (например TC менее 25)).

Применение может уменьшать осложнения, связанные с возбудителем инфекции, включая госпитализацию, попадание в реанимационное отделение и смерть. Патоген предпочтительно представляет собой коронавирусную инфекцию.

Применение может заключаться в профилактике, купировании или лечении персистирующего COVID (также известного как долгий COVID или пост-COVID-синдром).

Соединение может быть введено в комбинации с кортикостероидом, предпочтительно дексаметазоном. Соединение и кортикостероид могут быть введены одновременно, раздельно или последовательно.

Соединение может быть введено согласно схеме одна доза в сутки в течение 10 суток, 9 суток, 8 суток, 7 суток, 6 суток, 5 суток, 4 суток, 3 суток, 2 суток или 1 суток; предпочтительно 2-5 суток, 3-5 суток или 3, 4 или 5 суток; наиболее предпочтительно 3 суток или 5 суток; наиболее предпочтительно 3 суток.

Соединение может быть введено в дозе 5 мг в сутки или менее; 4,5 мг в сутки или менее; 4 мг в сутки или менее; 3,5 мг в сутки или менее; 3 мг в сутки или менее; 2,5 мг в сутки или менее или 2 мг в сутки или менее; 0,5 мг/сутки, 1 мг/сутки, 1,5 мг/сутки, 2 мг/сутки, 2,5 мг/сутки, 3 мг/сутки, 3,5 мг/сутки, 4 мг/сутки, 4,5 мг/сутки или 5 мг/сутки; предпочтительно 1 мг/сутки, 1,5 мг/сутки, 2 мг/сутки или 2,5 мг/сутки; предпочтительно 1,5-2,5 мг/сутки; более предпочтительно 1,5 мг/сутки, 2 мг/сутки или 2,5 мг/сутки.

Соединение может быть введено в общей дозе 1-50 мг, 1-40 мг, 1-30 мг, 1-20 мг, 1-15 мг, 3-15 мг, 3-12 мг, 4-12 мг, 4-10 мг или 4,5-10 мг; 4 мг, 4,5 мг, 5 мг, 5,5 мг, 6 мг, 6,5 мг, 7 мг, 7,5 мг, 8 мг, 8,5 мг, 9 мг, 9,5 мг или 10 мг; предпочтительно 4,5 мг, 5 мг, 6 мг, 7,5 мг, 8 мг, 9 мг или 10 мг; более предпочтительно 4,5-7,5 мг/сутки. Общая доза может быть разделена на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 суток, предпочтительно на 3 или 5 суток; наиболее предпочтительно на 3 суток.

Соединение может быть введено один раз в сутки в течение 3 суток в дозе 1,5-2,5 мг/сутки. Доза может составлять 1,5 мг/сутки. Доза может составлять 2,5 мг/сутки.

Соединение может представлять собой PLD, вводимый в виде 1,5-часовой инфузии один раз в сутки в течение 3 суток подряд. 1,5 мг PLD можно вводить в виде 1,5-часовой инфузии один раз в сутки в течение 3 суток подряд. 2 мг PLD можно вводить в виде 1,5-часовой инфузии один раз в сутки в течение 3 суток подряд. 2,5 мг PLD можно вводить в виде 1,5-часовой инфузии один раз в сутки в течение 3 суток подряд. 1 мг PLD можно вводить в виде 1,5-часовой инфузии один раз в сутки в течение 5 суток подряд. 2 мг PLD можно вводить в виде 1,5-часовой инфузии один раз в сутки в течение 5 суток подряд.

Схема приема может представлять собой однократную дозу (1 сутки). Соединение может быть введено в виде однократной дозы 1-10 мг, 4-10 мг, 4,5-10 мг; 4 мг, 4,5 мг, 5 мг, 5,5 мг, 6 мг, 6,5 мг, 7 мг, 7,5 мг, 8 мг, 8,5 мг, 9 мг, 9,5 мг или 10 мг; предпочтительно 4,5 мг, 5 мг, 6 мг, 7,5 мг, 8 мг, 9 мг или 10 мг; более предпочтительно 5-9 мг, 6,5-8,5 мг, 7-8 мг или 7,5 мг. Соединение может представлять собой PLD, вводимый в виде однократной 1,5-часовой инфузии.

Схема однократного дозирования может быть использована со всеми видами терапии, указанными в настоящем изобретении. Комбинированное применение с кортикостероидами (включая последующее введение кортикостероидов) может быть использовано в воплощениях по схеме однократного дозирования. Многодневная схема приема может быть использована со всеми видами терапии, указанными в настоящем изобретении.

Кортикостероид можно вводить ежедневно в те же сутки, что и введение соединения по настоящему изобретению. Кортикостероид можно вводить в одни или более последующих суток. Кортикостероид можно вводить на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или последующие сутки. Кортикостероид можно вводить в более высокой дозе при введении в те же сутки, что и соединение по настоящему изобретению, и в более низкой дозе в последующие сутки. Кортикостероид может представлять собой дексаметазон.

Соединение по настоящему изобретению можно вводить в дозе по настоящему изобретению на 1-3 сутки схемы приема. Кортикостероид можно вводить внутривенно на 1-3 сутки схемы приема. После этого кортикостероид можно вводить перорально или внутривенно с 4-х по 10-е сутки (согласно заключению врача в соответствии с клиническим состоянием пациента и дальнейшим развитием клинической картины). Кортикостероид может представлять собой дексаметазон. Доза может составлять 6,6 мг/сутки внутривенно с 1 по 3 сутки (например 8 мг дексаметазона фосфата) с последующим введением 6 мг/сутки дексаметазона (например 7,2 мг дексаметазона фосфата или 6 мг дексаметазона основания) перорально или внутривенно с 4-х суток по 10-е сутки.

В воплощениях изобретения дексаметазон представляет собой дексаметазона фосфат, и его вводят в дозе 8 мг/сутки внутривенно с 1 по 3 сутки с последующим пероральным или внутривенным введением дексаметазона в дозе 7,2 мг/сутки с 4-х суток по 10-е сутки.

Соединение по настоящему изобретению может быть введено в виде инфузии, предпочтительно 1-часовой инфузии, 1,5-часовой инфузии, 2-часовой инфузии, 3-часовой инфузии или дольше; особенно предпочтительно 1,5-часовой инфузии.

Схема приема может представлять собой введение 1,5 мг плитидепсина в виде 1,5-часовой инфузии один раз в сутки в течение 3 суток подряд; или введение 2 мг плитидепсина в виде 1,5-часовой инфузии один раз в сутки в течение 3 суток подряд; или введение 2,5 мг плитидепсина в виде 1,5-часовой инфузии один раз в сутки в течение 3 суток подряд; или введение 1 мг плитидепсина в виде 1,5-часовой инфузии один раз в сутки в течение 5 суток подряд; или введение 2 мг плитидепсина в виде 1,5-часовой инфузии один раз в сутки в течение 5 суток подряд.

Схема приема может представлять собой введение 7,5 мг плитидепсина в виде однократной 1,5-часовой инфузии на 1-е сутки.

Соединение по настоящему изобретению может быть введено с использованием нагрузочной дозы и поддерживающей дозы.

Схема приема согласно настоящему изобретению может представлять собой:

нагрузочную дозу 2,5 мг на 1-е сутки с последующим введением поддерживающей дозы 2 мг/сутки в течение всех последующих суток;

нагрузочную дозу 2,5 мг на 1-е сутки с последующим введением поддерживающей дозы 1,5 мг/сутки в течение всех последующих суток;

нагрузочную дозу 2,5 мг на 1-е сутки с последующим введением поддерживающей дозы 1 мг/сутки в течение всех последующих суток;

нагрузочную дозу 2,5 мг на 1-е сутки с последующим введением поддерживающей дозы 0,5 мг/сутки в течение всех последующих суток;

нагрузочную дозу 2 мг на 1-е сутки с последующим введением поддерживающей дозы 1,5 мг/сутки в течение всех последующих суток;

нагрузочную дозу 2 мг на 1-е сутки с последующим введением поддерживающей дозы 1 мг/сутки в течение всех последующих суток;

нагрузочную дозу 2 мг на 1-е сутки с последующим введением поддерживающей дозы 0,5 мг/сутки в течение всех последующих суток;

нагрузочную дозу 1,5 мг на 1-е сутки с последующим введением поддерживающей дозы 1 мг/сутки в течение всех последующих суток;

нагрузочную дозу 1,5 мг на 1-е сутки с последующим введением поддерживающей дозы 0,5 мг/сутки в течение всех последующих суток; или

нагрузочную дозу 1 мг на 1-е сутки с последующим введением поддерживающей дозы 0,5 мг/сутки в течение всех последующих суток.

Соединение по настоящему изобретению может быть введено в комбинации с кортикостероидом. Кортикостероид может быть введен в те же сутки, что и введение соединения.

Кортикостероид также может быть введен в одни или более чем одни последующие сутки. Например, кортикостероид вводят вместе с соединением на 1-3 сутки, а затем кортикостероид вводят в одни или более чем одни сутки с 4-10.

Кортикостероид может быть введен внутривенно в те сутки, когда вводят соединение, но в последующие сутки введен перорально или внутривенно.

Кортикостероид может представлять собой дексаметазон. Дексаметазон может быть введен в дозе 6,6 мг/сутки внутривенно в те сутки, когда вводят соединение.

Дексаметазон может быть введен в дозе 6 мг/сутки перорально или внутривенно в последующие сутки, предпочтительно в одни или более чем одни из суток 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10.

Доза дексаметазона, как определено здесь, относится к массе основного вещества. Поэтому доза может быть скорректирована, если он используется в форме соли. Например, дексаметазон может представлять собой дексаметазона фосфат, так что 8 мг/сутки эквивалентны 6,6 мг дексаметазона основания, а 7,2 мг/сутки эквивалентны 6 мг дексаметазона основания.

Соединение по настоящему изобретению, в частности PLD, может быть введено в дозе 1,5 мг/сутки внутривенно (в/в) в комбинации с 6,6 мг/сутки дексаметазона в/в на 1-3 сутки с последующим введением 6 мг/сутки дексаметазона перорально (п/о)/в/в с 4-х по 10-е сутки (согласно заключению врача в соответствии с клиническим состоянием пациента и дальнейшим развитием клинической картины).

Соединение по настоящему изобретению, в частности PLD, может быть введено в дозе 2,0 мг/сутки внутривенно (в/в) в комбинации с 6,6 мг/сутки дексаметазона в/в на 1-3 сутки с последующим введением 6 мг/сутки дексаметазона перорально (п/о)/в/в с 4-х по 10-е сутки (согласно заключению врача в соответствии с клиническим состоянием пациента и дальнейшим развитием клинической картины).

Соединение по настоящему изобретению, в частности PLD, может быть введено в дозе 2,5 мг/сутки внутривенно (в/в) в комбинации с 6,6 мг/сутки дексаметазона в/в на 1-3 сутки с последующим введением 6 мг/сутки дексаметазона перорально (п/о)/в/в с

4-х по 10-е сутки (согласно заключению врача в соответствии с клиническим состоянием пациента и дальнейшим развитием клинической картины).

Кортикостероид может быть введен за 20-30 минут до начала лечения соединением, как определено здесь.

В схемах приема согласно настоящему изобретению пациент может дополнительно получать следующие лекарственные препараты, предпочтительно за 20-30 минут до начала лечения соединением по настоящему изобретению:

- ондансетрон 8 мг внутривенно (или эквивалент);
- дифенгидрамина гидрохлорид 25 мг в/в (или эквивалент); и
- ранитидин 50 мг в/в (или эквивалент).

В схемах приема согласно настоящему изобретению на 4 и 5 сутки пациенты могут получать ондансетрон (или эквивалент) по 4 мг дважды в сутки п/о.

При однократном введении за 20-30 минут до инфузии плитидепсина пациенты могут получить следующие профилактические препараты:

- дифенгидрамина гидрохлорид 25 мг в/в;
- ранитидин 50 мг в/в;
- дексаметазон 6,6 мг внутривенно;
- ондансетрон 8 мг в/в в виде медленной 15-минутной инфузии.

4 мг ондансетрона перорально можно назначать каждые 12 часов в течение 3 суток после введения плитидепсина для облегчения тошноты и рвоты, вызванных лекарственными препаратами. Если плитидепсин вводят утром, пациент может получить первую дозу ондансетрона во второй половине дня.

ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Изобретение дополнительно описано в следующих неограничивающих графических материалах.

На **Фиг. 1** показано, что трансактивация NF-κB в ответ на активацию Toll-подобных рецепторов ингибируется PLD. Моноцитарные клетки человека (THP-1) стабильно трансфицировали плазмидой NF-κB-Luc, и (A) уровни трансактивации NF-κB измеряли в присутствии и в отсутствие PLD. (B) Цитотоксичность, индуцированную соединением, тестировали с помощью МТТ-анализа (метилтетразолиевый тест) пролиферации клеток. Культуры подвергали воздействию PLD в концентрации 100 нМ в течение 6 часов. RQ означает резиквимод в концентрации 10 мкг/мл. LPS-B5 означает липополисахарид *Escherichia coli* 055:B5 (LPS-B5) в

концентрации 10 мкг/мл. Poly I:C означает полиинозиново-полицитидиловая кислота в концентрации 500 мкг/мл. TNF- α использовали в качестве положительного контроля. *** р менее 0,001; ** р менее 0,01.

На **Фиг. 2** показано, что плитидепсин отрицательно регулирует секрецию цитокинов, запускаемую TLR. Трансактивация NF- κ B в ответ на активацию Toll-подобных рецепторов приводит к усилению секреции провоспалительных цитокинов: IL-1 (a), IL-6 (b), IL-8 (c) и TNF- α (d). Культуры подвергали воздействию PLD в концентрации 100 нМ или DMSO (диметилсульфоксид) в течение 6 часов. Через 6 часов после обработки секретируемые цитокины анализировали с помощью твердофазного ИФА (иммуоферментный анализ). TNF- α использовали в качестве положительного контроля. *** р менее 0,001; ** р менее 0,01.

На **Фиг. 3** показано *ex-vivo* подавление цитокинов IL-6, IL-10 и TNF- α с помощью PLD.

На **Фиг. 4** показано снижение количества классически активированных макрофагов у сенсibilизированных LPS (липополисахаридом) мышей.

На **Фиг. 5** показано влияние плитидепсина на рекрутирование альвеолярных макрофагов у мышей, получавших LPS. Кривые концентрация-время (среднее \pm SD (стандартное отклонение)) плитидепсина в плазме и легких мышей (a), крыс (b) и хомяков (c) после однократного внутривенного введения дозы 1,0, 0,2 и 0,2 мг/кг соответственно.

Фиг. 6 - Графическое представление противовирусной активности (- \blacklozenge - RLU (относительные световые единицы)) и токсичности (- \bullet - жизнеспособность) нескольких концентраций (мкМ) соединения 3 в клетках MT-2 (**Фиг. 6A**) и в предварительно активированных РВМС (моноклеарные клетки периферической крови) (**Фиг. 6B**), причем и те, и другие инфицированы рекомбинантным вирусом (NL4.3 Luc). Графические представления являются по меньшей мере средним значением двух независимых экспериментов для клеток MT-2 и четырех для РВМС.

Фиг. 7 - Графическое представление противовирусной активности (- \blacklozenge - RLU) и токсичности (- \bullet - жизнеспособность) нескольких концентраций (мкМ) соединения 8 в клетках MT-2 (**Фиг. 7A**) и в предварительно активированных РВМС (**Фиг. 7B**), причем и те, и другие инфицированы рекомбинантным вирусом (NL4.3 Luc). Графические представления являются по меньшей мере средним значением двух независимых экспериментов для клеток MT-2 и четырех для РВМС.

Фиг. 8 - Графическое представление противовирусной активности (-◆- RLU) и токсичности (-■- жизнеспособность) нескольких концентраций (мкМ) соединения 9 в клетках МТ-2 (**Фиг. 8А**) и в предварительно активированных РВМС (**Фиг. 8В**), причем и те, и другие инфицированы рекомбинантным вирусом (NL4.3 Luc). Графические представления являются по меньшей мере средним значением двух независимых экспериментов для клеток МТ-2 и четырех для РВМС.

Фиг. 9 - Графическое представление противовирусной активности (-◆- RLU) и токсичности (-■- жизнеспособность) нескольких концентраций (мкМ) соединения 10 в клетках МТ-2 (**Фиг. 9А**) и в предварительно активированных РВМС (**Фиг. 9В**), причем и те, и другие инфицированы рекомбинантным вирусом (NL4.3 Luc). Графические представления являются по меньшей мере средним значением двух независимых экспериментов для клеток МТ-2 и четырех для РВМС.

Фиг. 10 - Графическое представление противовирусной активности (-◆- RLU) и токсичности (-■- жизнеспособность) нескольких концентраций (мкМ) соединения 11 в клетках МТ-2 (**Фиг. 10А**) и в предварительно активированных РВМС (**Фиг. 10В**), причем и те, и другие инфицированы рекомбинантным вирусом (NL4.3 Luc). Графические представления являются по меньшей мере средним значением двух независимых экспериментов для клеток МТ-2 и четырех для РВМС.

На **Фиг. 11-15** показаны флуоресцентные изображения, показывающие а) рост клеток и б) противовирусную активность DMSO через 24 часа после инфицирования в отношении инфицированных HCoV-229E клеток Huh-7 (А1, А2, А3, А4, А5 из Таблицы 2). Можно видеть, что клетки остаются жизнеспособными, но противовирусного эффекта не наблюдается.

На **Фиг. 16-19** показаны флуоресцентные изображения, показывающие а) рост клеток и б) противовирусную активность Соединения 240 (дидемнин В) через 24 часа после инфицирования в отношении инфицированных HCoV-229E клеток Huh-7 при концентрациях 50 нМ, 5 нМ и 0,5 нМ (В1, В2, В3, В4 из Таблицы 2, соответственно). Можно видеть, что клетки остаются жизнеспособными при всех концентрациях, включая высокие концентрации, и что заметные противовирусные свойства проявляются при всех концентрациях, даже при субнанолярных концентрациях.

На **Фиг. 20-23** показаны флуоресцентные изображения, показывающие а) рост клеток и б) противовирусную активность PLD через 24 часа после инфицирования в отношении инфицированных HCoV-229E клеток Huh-7 при концентрациях 50 нМ,

5 нМ и 0,5 нМ (С1, С2, С3, С4 из Таблицы 2, соответственно). Снова можно видеть, что клетки остаются жизнеспособными при всех концентрациях, включая высокие концентрации, и что заметные противовирусные свойства проявляются при всех концентрациях, даже при субнанолярных концентрациях.

На **Фиг. 24-26** показаны флуоресцентные изображения, показывающие а) рост клеток и б) противовирусную активность Соединения 9 через 24 часа после инфицирования в отношении инфицированных HCoV-229E клеток Huh-7 при концентрациях 50 нМ, 5 нМ и 0,5 нМ (D1, D2, D3 из Таблицы 2, соответственно). Снова можно видеть, что клетки остаются жизнеспособными при всех концентрациях, включая высокие концентрации, и что заметные противовирусные свойства проявляются при всех концентрациях, даже при субнанолярных концентрациях.

На **Фиг. 27-29** показаны флуоресцентные изображения, показывающие а) рост клеток и б) противовирусную активность Соединения 10 через 24 часа после инфицирования в отношении инфицированных HCoV-229E клеток Huh-7 при концентрациях 50 нМ, 5 нМ и 0,5 нМ (E1, E2, E3 из Таблицы 2, соответственно). Снова можно видеть, что клетки остаются жизнеспособными при всех концентрациях, включая высокие концентрации, и что заметные противовирусные свойства проявляются при всех концентрациях, даже при субнанолярных концентрациях.

На **Фиг. 30-33** показаны флуоресцентные изображения, показывающие а) рост клеток и б) противовирусную активность PLD (вторая серия) через 24 часа после инфицирования в отношении инфицированных HCoV-229E клеток Huh-7 при концентрациях 50 нМ, 5 нМ и 0,5 нМ (F1, F2, F3, F4 из Таблицы 2, соответственно). Снова можно видеть, что клетки остаются жизнеспособными при всех концентрациях, включая высокие концентрации, и что заметные противовирусные свойства проявляются при всех концентрациях, даже при субнанолярных концентрациях.

На **Фиг. 34 и 35** показаны профили общей концентрации в плазме в зависимости от времени, предсказанные для режимов дозирования и введения согласно настоящему изобретению.

На **Фиг. 36** показаны профили общей концентрации в плазме в зависимости от времени, предсказанные для дополнительных режимов дозирования и введения согласно настоящему изобретению.

На **Фиг. 37** показаны кривые зависимости доза-эффект, показывающие противовирусный эффект PLD в отношении SARS-CoV-2 в клетках Vero.

На **Фиг. 38** показаны кривые зависимости доза-эффект, показывающие противовирусный эффект PLD в отношении SARS-CoV-2 в клетках Vero.

На **Фиг. 39** показаны рентгеновские снимки, показывающие влияние введения PLD на пациента с двусторонней пневмонией.

На **Фиг. 40** показаны рентгеновские снимки, показывающие влияние введения PLD на пациента с односторонней пневмонией.

На **Фиг. 41** показаны тесты на С-реактивный белок у пациентов, получавших PLD.

На **Фиг. 42** показаны log (логарифмы) вирусной нагрузки Пациента 4 (Фиг. 42a), Пациента 5 (Фиг. 42b), Пациента 6 (Фиг. 42c) и Пациента 7 (Фиг. 42d). Пациентам вводили PLD в виде 90-минутной внутривенной инфузии ежедневно в течение 3 суток подряд (1-3 сутки) с определением вирусной нагрузки с помощью ПЦР (полимеразная цепная реакция) на исходном уровне, на 4-е, 7-е, 15-е и 31-е сутки.

На **Фиг. 43** показан воспалительный профиль в ЖБАЛ (жидкость бронхоальвеолярного лаважа) мышей, инфицированных вирусом гриппа, при лечении (PR8) PLD или без него (PC).

На **Фиг. 44** показан титр вируса гриппа в легких мышей при лечении PLD или без него. Противовирусную активность PLD подсчитывали с помощью количественной ПЦР, измеряя уровень мРНК вирусного NP (нуклеопротеина) (NP-PR8).

На **Фиг. 45** показано количественное измерение уровня инфильтрации иммунных клеток, в частности АМ (альвеолярных макрофагов), в ЖБАЛ мышей, инфицированных гриппом, получавших (PR8) PLD или без него (PC).

На **Фиг. 46** показана эффективность инфицирования WNV-GFP (вирус Западного Нила-зеленый флуоресцентный белок) клеток VeroE6. Кривые зависимости доза-эффект плитидепсина для эффективности инфицирования (GFP; зеленая линия) и биомассы клеток (DAPI; синяя линия). Данные представлены в виде среднего значения и SEM (стандартная ошибка среднего) двух независимых экспериментов, проведенных с четырьмя биологическими повторами (n=8).

На **Фиг. 47** показана эффективность инфицирования WNV-GFP клеток Huh-7. Кривые зависимости доза-эффект плитидепсина для эффективности инфицирования (GFP; зеленая линия) и биомассы клеток (DAPI; синяя линия). Данные представлены в виде среднего значения и SEM двух независимых экспериментов, проведенных с четырьмя биологическими повторами (n=8).

На **Фиг. 48** показано влияние плитидепсина на внеклеточные инфекционные титры WNV. Клетки Vero-E6 (a) или Huh-7 (b) инокулировали WNV/NY99 при MOI (множественность заражения) 0,01. Через сорок восемь часов супернатанты клеток собирали для определения внеклеточных инфекционных титров с помощью конечного разведения и иммуофлуоресцентной микроскопии. Данные выражены в инфекционных единицах на объем супернатанта (бляшкообразующие единицы (БОЕ)/мл) в логарифмической шкале и представлены в виде среднего значения и SEM (N=4). Статистическую значимость тестировали с использованием однофакторного дисперсионного анализа ANOVA и апостериорного критерия Даннета (*p менее 0,05).

На **Фиг. 49** показано влияние плитидепсина на внутриклеточные уровни РНК WNV. Клетки Vero-E6 (a) или Huh-7 (b) инокулировали WNV/NY99 при MOI 0,01. Через сорок восемь часов суммарную клеточную РНК подвергали количественной ПЦР с обратной транскриптазой. Данные выражены в виде количества копий генома/60 нг суммарной РНК, нормализованное в логарифмической шкале с использованием 28S РНК в качестве конститутивного гена, и представлены в виде среднего значения и SEM (N=4). Статистическую значимость тестировали с использованием однофакторного ANOVA и апостериорного критерия Даннета (*p менее 0,05). n.d. означает не обнаружено (менее 1000 копий/реакция).

На **Фиг. 50** показано влияние предварительной обработки плитидепсином (APL) в концентрации 1 нМ, 10 нМ и 50 нМ на секрецию провоспалительных цитокинов IL6 (a), IL8 (b), IL1 β (c) и TNF- α (d). (e) показано влияние обработки PLD в концентрации 1 нМ, 10 нМ и 50 нМ на жизнеспособность клеток (в виде процента от контроля). В момент времени 0 клетки THP-1 обрабатывали 1 нМ, 10 нМ или 50 нМ APL или DMSO (0,2%), а затем стимулировали резиквимодом в концентрации 2,5 или 5 мкг/мл через 8 часов. Через 24 часа измеряли цитокины или жизнеспособность клеток.

На **Фиг. 51** показано влияние обработки плитидепсином на продукцию провоспалительных цитокинов, IL-6 (c), IL-10 (d) and TNF- α (e), опосредованную LPS-B5, в клетках CD45+, выделенных из жидкости бронхоальвеолярного лаважа (ЖБАЛ). (a) показан процент живых клеток CD45+ в контроле, клеток, обработанных LPS-B5, и клеток, обработанных LPS-B5 и PLD. (b) показана выживаемость клеток в виде процента от контроля в клетках, обработанных LPS-B5, и клетках, обработанных LPS-B5 и PLD.

На **Фиг. 52** показано влияние обработки плитидепсином на продукцию провоспалительных цитокинов TNF- α , опосредованную резиквимодом.

На **Фиг. 53** показаны профили общей концентрации против концентрации в плазме для однократной дозы плитидепсина 7,5 мг и 1,5, 2,0 и 2,5 мг на 1-3 сутки с использованием 1,5-часовой инфузии.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Следующие воплощения применимы ко всем аспектам настоящего изобретения.

Далее настоящее изобретение будет описано дополнительно. В следующих частях различные аспекты изобретения определены более подробно. Каждый аспект, определенный таким образом, может быть объединен с любым другим аспектом или аспектами или воплощением или воплощениями, если явно не указано иное. В частности, любой признак, указанный как предпочтительный или полезный, может быть объединен с любым другим признаком или признаками, указанными как предпочтительные или полезные.

В настоящей заявке используется ряд общих терминов и фраз, которые следует интерпретировать следующим образом.

«Лечить», «лечение» и «излечение» в контексте вирусной инфекции могут относиться к одному или более чем одному из следующего: 1) уменьшение числа инфицированных клеток; 2) снижение количества вирионов, присутствующих в сыворотке, включая снижение вирусного титра (который можно измерить с помощью количественной ПЦР); 3) ингибирование (то есть до некоторой степени замедление, предпочтительно прекращение) скорости репликации вируса; 4) снижение нагрузки вирусной РНК; 5) снижение титра инфекционности вируса (количества вирусных частиц, способных внедриться в клетку-хозяина); и 6) облегчение или уменьшение до некоторой степени одного или более симптомов, связанных с вирусной инфекцией. Это может включать воспаление, связанное с вирусной инфекцией.

«Пациент» включает людей, не относящихся к человеку млекопитающих (например собак, кошек, кроликов, крупного рогатого скота, лошадей, овец, коз, свиней, оленей и тому подобных) и не млекопитающих (например птиц и тому подобных). Пациенту может потребоваться госпитализация для лечения воспаления и/или инфекции.

Плитидепсин (PLD) представляет собой циклический депсипептид, первоначально выделенный из морских оболочников *Aplidium albicans*. PLD также известен как аплидин (Aplidin, или Aplidine). Такие термины используют здесь взаимозаменяемо. Аналогами PLD являются те аналоги, которые определены здесь как

соединения формулы I, II или III. В предпочтительном воплощении настоящее изобретение относится к применению PLD.

Авторы обнаружили, что PLD

(1) ингибирует трансактивацию NF-κB, в частности когда она индуцируется посредством активации Toll-подобных рецепторов;

(2) ингибирует секрецию провоспалительных цитокинов, таких как IL-1, IL-6, IL-8 и TNF-α, но не ограничиваясь ими, как *in vivo*, так и *ex vivo*; и

(3) ингибирует активацию и/или рекрутирование макрофагов.

Эти свойства означают, что PLD обладает особой эффективностью в лечении воспаления. В частности, авторы обнаружили, что PLD обладает особой эффективностью в лечении воспаления в результате инфицирования патогенами. Как показано в Примерах, авторы обнаружили, что PLD может ингибировать секрецию ряда ключевых провоспалительных цитокинов. В частности, авторы обнаружили, что PLD может ингибировать трансактивацию NF-κB через Toll-подобные рецепторы (TLR) и последующую секрецию провоспалительных цитокинов. Как поясняется здесь, Toll-подобные рецепторы активируются в ответ на ряд инфекционных стимулов. Связывание лиганда TLR (то есть стимул) с Toll-подобным рецептором (TLR) запускает нисходящий сигнальный каскад, который в конечном итоге приводит к активации ядерного фактора транскрипции каппа-B (NF-κB), который контролирует индукцию провоспалительных цитокинов и хемокинов. Авторы обнаружили, что PLD значительно блокирует этот каскад, приводя в результате к снижению высвобождения или секреции провоспалительных цитокинов. В результате, в одном примере, PLD может быть использован для предотвращения воспаления после активации Toll-подобных рецепторов. В другом примере PLD может быть использован для ингибирования трансактивации NF-κB или индуцированной NF-κB экспрессии или секреции провоспалительных цитокинов. В другом примере PLD может быть использован для ингибирования экспрессии и/или секреции провоспалительных цитокинов.

Авторы также обнаружили, что PLD значительно снижает уровни активации и/или рекрутирования макрофагов, в частности в ответ на патогенный стимул. Активированные макрофаги являются ключевым медиатором воспаления, и ингибирование активации играет центральную роль в лечении воспаления. Соответственно, в другом примере PLD также может быть использован для лечения

воспаления, вызванного патогенами, в частности, посредством снижения активации и/или рекрутирования макрофагов.

Также было показано, что PLD связывается с человеческим фактором элонгации трансляции eEF1A (эукариотический фактор элонгации трансляции 1 альфа 1) с высоким сродством и низкой скоростью диссоциации. Эксперименты FLIM-phasor FRET (микроскопия визуализации времени жизни флуоресценции при резонансном переносе энергии флуоресценции) на опухолевых клетках демонстрируют, что PLD локализуется в опухолевых клетках достаточно близко к eEF1A, чтобы предположить образование комплекса лекарство-белок в живых клетках. Клеточные линии, устойчивые к PLD, также демонстрируют пониженные уровни белка eEF1A, а эктопическая экспрессия eEF1A в этих устойчивых клетках восстанавливает чувствительность к PLD, демонстрируя, что eEF1A непосредственно участвует в механизме действия PLD.

Белок N ряда вирусов, таких как SARS-CoV и SARS-CoV-2, также связывается с eEF1A, и это связывание необходимо для репликации вируса. Однако введение и последующее связывание PLD с eEF1A делает невозможным или снижает связывание вирусного N-белка с eEF1A. Это, в свою очередь, предотвращает репликацию вируса. Таким образом, взаимодействие между PLD и EF1A может снижать эффективность синтеза вирусного капсида *de novo* и, следовательно, вызывать снижение вирусной нагрузки.

В дополнение к вышесказанному, связывание PLD с eEF1A предотвращает взаимодействие eEF1A с его обычными партнерами по связыванию. Одним из таких партнеров по связыванию является протеинкиназа, активируемая дцРНК (PKR или eIF2AK2). Связывание PLD с eEF1A высвобождает PKR из комплекса с eEF1A, что приводит к активации PKR. PKR играет ключевую роль в противовирусном иммунном ответе. Конкретно,

(1) активированный PKR фосфорилирует альфа-субъединицу фактора инициации eIF2, что приводит к образованию неактивного комплекса eIF2;

(2) активация PKR индуцирует апоптоз посредством механизма, включающего кластеризацию рецептора Fas и транслокацию NF-κB, что приводит к элиминации инфицированных клеток.

Следует отметить, что белок 4a вирусов, таких как CoV, сильно подавляет активацию PKR посредством секвестрации дцРНК. PLD обходит этот вирусный ответ,

что приводит к активации PKR за счет высвобождения PKR из комплекса eEF1A, как можно видеть из активации PKR в отсутствие вирусной инфекции.

Наконец, в дополнение к вышесказанному, связывание PLD с eEF1A также активирует индуцированный ER-стрессом (стрессом эндоплазматического ретикулума) развернутый белковый ответ (UPR), который, в свою очередь, приводит к ряду противовирусных ответов, включая снова фосфорилирование eIF2 α .

За счет комбинации этих механизмов - (1) ингибирование или уменьшение взаимодействия N-белок/eEF1A; (2) активация PKR и (3) активация UPR - PLD предотвращает репликацию вируса и вызывает активацию ответов хозяина, что приводит к элиминации вируса. И то, и другое способствует эффективной терапии вирусных инфекций. Дополнительным преимуществом нацеливания на eEF1A является то, что он является человеческой мишенью и, как таковой, не будет мутировать, чтобы уклониться от PLD, как это делают вирусные белки.

Соответственно, соединения по настоящему изобретению (включая PLD) могут быть использованы для лечения как вирусной инфекции, так и любого воспаления, возникающего в результате вирусной инфекции. Другими словами, соединения по настоящему изобретению (включая PLD) в качестве единственной терапии могут быть использованы для лечения двух показаний, возникающих в результате вирусной инфекции: самой инфекции (ингибирование синтеза вируса и элиминация вируса) и любого (впоследствии) избыточного воспалительного ответа хозяина, то есть гиперцитокинемии.

Соответственно, соединения по настоящему изобретению (включая PLD и дидемнин B), особенно PLD, могут быть использованы для лечения воспаления и, в частности, воспаления, связанного или с активацией Toll-подобных рецепторов, и/или с воспалением в результате инфицирования патогенами.

Настоящее изобретение может быть полезно в отношении следующих вирусов.

Семейство флавивирусов

Вирусы *Flaviviridae* ответственны за многие важные заболевания, которые негативно влияют на здравоохранение во всем мире. Вирусы *Flaviviridae* включают вирус желтой лихорадки (YFV), вирус Зика (ZIKV), вирус японского энцефалита (JEV), вирус Западного Нила (WNV), вирус гепатита С (HCV) и вирус денге (DENV). Патогены *Flaviviridae* узурпируют клеточные пути в инфицированных клетках, создавая среду, благоприятную для репликации вируса. Благодаря взаимодействию с 3'(+)-петлей

шпильки вирусной РНК и с несколькими белками комплекса репликации eEF1A играет важную роль в синтезе минус-цепи РНК и репликации вируса. Фактор элонгации eEF1A взаимодействует с 3'-концевой петлей шпильки РНК нескольких дивергентных флавивирусов, в том числе переносимого клещами флавивируса, и колокализуется с репликационными комплексами вируса денге в инфицированных клетках. Эти результаты позволяют предположить, что eEF1A играет одинаковую роль в репликации РНК для всех флавивирусов. Также для всех заболеваний, вызванных флавивирусами, характерно то, что часть пациентов страдает от усиления воспалительной реакции на вирусную инфекцию (цитокиновый шторм), что в конечном итоге приводит к повреждению тканей и усугублению патологического процесса, вызванного вирусом.

1. Вирус денге

Денге вызывается любым из четырех вирусов денге (DENV-1-4), принадлежащих к семейству *Flaviviridae*. DENV представляют собой небольшие оболочечные вирусы, содержащие одноцепочечную (+) РНК длиной приблизительно 10 тысяч оснований, которая кодирует один полипротеин, который расщепляется с образованием 10 вирусных белков. Инфекция DENV представляет собой серьезную проблему для здоровья в тропических и субтропических регионах мира. Первичная инфекция DENV может протекать бессимптомно или вызывать лихорадку денге (ЛД), острое лихорадочное заболевание, сопровождающееся головной болью, артралгией и сыпью, от которой пациенты обычно выздоравливают без осложнений. Повторное инфицирование гетерологичным серотипом вируса денге может вызвать геморрагическую лихорадку денге/шоковый синдром денге (DHF/DSS), характеризующийся утечкой плазмы и аномальным кровотечением, которые могут привести к шоку и смерти. Отличительной чертой тяжелой лихорадки денге является временное нарушение целостности кровеносных сосудов и коагуляции. Восстановление обычно быстрое и полное, что свидетельствует о том, что ключевыми механизмами являются функциональные, а не структурные изменения в сосудистой сети, что, скорее всего, связано с действием цитокинов местного происхождения. Исследования, демонстрирующие чрезмерную иммунную активацию при тяжелой лихорадке денге, убедительно свидетельствуют о критической роли иммунного ответа в патогенезе денге. В этом процессе участвуют как врожденный, так и адаптивный иммунитет (и их взаимодействие). В ранней экспрессии генов в клетках периферической крови больных денге преобладают гены ответа, опосредованного IFN I типа, в дополнение к IFN I типа, дендритные клетки и

моноциты/макрофаги также продуцируют провоспалительные цитокины, которые могут повышать проницаемость сосудов. Это цунами цитокинов в течение короткого периода вызывает разрушение клеток эндотелия сосудов и нарушение регуляции системы свертывания крови, что приводит к утечке плазмы, кровоизлиянию и шоку.

Эукариотический фактор элонгации 1A (eEF1A) является прямым активатором SphK1. РНК DENV-2 совместно локализуется и осаждается вместе с eEF1A из инфицированных клеток. Снижение активности SphK1 на поздних стадиях в DENV-2-инфицированных клетках может быть следствием того, что DENV-2 опережает SphK1 в борьбе за связывание eEF1A и захватывает клеточный eEF1A для своей собственной стратегии репликации.

2. Вирус Зика

Вирус Зика (ZIKV), возбудитель лихорадки Зика, принадлежит к семейству *Flaviviridae*. ZIKV представляет собой небольшой оболочечный оц (+) РНК-вирус с геномом длиной около 11 тысяч пар оснований, который кодирует один полипротеин, который расщепляется с образованием 10 вирусных белков. Инфекции ZIKV у людей были спорадическими, прежде чем они появились в Тихоокеанском регионе и в Америке в последнее десятилетие. Действительно, инфекцию ZIKV ассоциировали лишь с легким заболеванием до крупной вспышки во Французской Полинезии в 2013 и 2014 годах, когда были зарегистрированы тяжелые неврологические осложнения, и появления в Бразилии резкого увеличения тяжелых врожденных пороков развития (микроцефалии), связанных с инфекцией ZIKV во время беременности. Большинство случаев (около 80%) протекает бессимптомно. При появлении симптомов они обычно слабо выражены, проходят самостоятельно и аналогичны другим арбовирусным инфекциям (например DENV и CHIKV (вирус чикунгунья)). Обычно сообщаемые симптомы включают сыпь, лихорадку, артралгию и головную боль. Описаны редкие случаи смерти пациентов, инфицированных вирусом Зика. В настоящее время известно, что ZIKV вызывает инфекцию плода и врожденный синдром Зика, который включает микроцефалию, пороки развития головного мозга, офтальмологические дефекты и дефекты слуха, а также артрогрипоз.

Во время ZIKV были описаны незначительные повышения уровней маркеров воспаления. Подобно тому, что происходит при инфекции DENV, при инфекции ZIKV система интерферона является центральным медиатором защиты хозяина и мишенью вирусной контратаки. Полифункциональная иммунная активация наблюдалась во время

острой фазы инфекции ZIKV с повышенными профилями цитокинов, связанными с ответами клеток Th1 (IL-2), Th2 (IL-4, IL-13), Th17 (IL-17), а также Th9 (IL-9) (16). Повышенные уровни IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 и IP-10 также наблюдаются у пациентов, инфицированных ZIKV. Хотя у пациенток с ZIKV не наблюдается «цитокинового шторма», в инфицированных ZIKV плацентах наблюдалось массивное воспаление, которое могло препятствовать благополучному исходу беременности (17). ZIKV нарушает про-/противовоспалительный баланс плаценты, что приводит к повреждению тканей и массивной инфильтрации ядра ворсинок воспалительными клетками Хофбауэра.

3. Вирус желтой лихорадки

Желтая лихорадка (YF) является летальной вирусной геморрагической лихорадкой (VHF), вызываемой вирусом желтой лихорадки (YFV), принадлежащим к семейству *Flaviviridae*. YFV представляет собой небольшой оболочечный оц (+) РНК-вирус с геномом длиной около 11 тысяч пар оснований, который кодирует один полипротеин, который расщепляется с образованием 10 вирусных белков. В то время как большинство инфекций YFV протекают бессимптомно или имеют очень легкие симптомы, тяжелая YF возникает приблизительно у 12% пациентов, проявляясь желтухой, кровотечением и полиорганной недостаточностью. Инфекция YFV характеризуется тяжелым гепатитом, почечной недостаточностью, кровотечением и быстрыми терминальными событиями с шоком и полиорганной недостаточностью.

В течении желтой лихорадки (YF) выделяют три фазы: фаза «инфекции», гриппоподобное заболевание, характеризующееся лихорадкой, головной болью, тошнотой и миалгией, начинается после инкубационного периода от трех до шести суток. Пик вирусемии приходится на эту фазу инфекции. Затем следует период «ремиссии», после которого большинство пациентов выздоравливают. Наконец, при тяжелой форме заболевания после этой ремиссии пациенты переходят в фазу интоксикации, в которой возникают геморрагические и печеночные признаки болезни, наряду с полиорганной дисфункцией.

Ранние признаки инфекции, вероятно, связаны с врожденным иммунным ответом на инфекцию, включая продукцию острофазовых агентов, таких как интерферон- α и TNF- α . При тяжелой форме заболевания синдром внезапного системного воспалительного ответа («цитокиновый шторм») способствует терминальным событиям и смерти. У обезьян вирус YF преимущественно реплицируется в лимфоидных тканях, и

эта репликация выходит за рамки появления нейтрализующих антител. Лимфоидные ткани претерпевают глубокие изменения при инфицировании YF, и активация клеток в этих тканях способствует развитию системных терминальных признаков YF, характеризующихся высвобождением провоспалительных цитокинов. Терминальные события развиваются быстро и клинически характеризуются сердечно-сосудистым шоком и полиорганной недостаточностью. Особенности этой фазы убедительно свидетельствуют о том, что они опосредованы воспалительным каскадом, хотя непосредственно исследовано было мало пациентов. При естественно приобретенном заболевании про- и противовоспалительные цитокины (IL-6, IL-8, TNF- α , моноцитарный хемоаттрактантный протеин-1, антагонист рецептора IL-1, IL-10), наподобие бактериального сепсиса, были значительно повышены при летальных исходах. Иммунный клиренс антителами и Т-клетками приводит к высвобождению провоспалительных цитокинов, передаче сигналов с помощью GPCR (рецепторы, сопряженные с G-белком), активации NF κ B и продукции свободных радикалов кислорода, что способствует патогенезу и цитокиновому шторму.

4. Вирус Западного Нила

Вирус Западного Нила (WNV) является важным быстрораспространяющимся нейротропным вирусом, ответственным за все более тяжелые вспышки энцефалита у людей и лошадей во всем мире. WNV является членом семейства *Flaviviridae* и кодируется геномом положительно-смысловой одноцепочечной РНК (оцРНК) размером приблизительно 11 тысяч пар нуклеотидов. Геном транслируется как один полипротеин, и последующее расщепление этого полипротеина вирусными протеазами и протеазами хозяина дает 10 вирусных белков. Патогенез WNV состоит из трех фаз: ранней фазы начальной инфекции и распространения (ранняя фаза), периферической амплификации вируса (фаза диссеминации во внутренние органы) и нейроинвазии (фаза поражения центральной нервной системы (ЦНС)). Врожденный иммунный ответ, включая интерферон I типа (IFN) и врожденные клеточно-опосредованные ответы, отвечает за ранний контроль WNV, тогда как адаптивный иммунный ответ, включая гуморальные и адаптивные иммунные клеточно-опосредованные ответы (CD4⁺, CD8⁺ и регуляторные Т-клетки), необходим для клиренса WNV и ограничения возможного повреждения, опосредованного иммунным ответом, на более поздних стадиях инфекции.

Ранняя фаза после подкожного инфицирования определяется репликацией WNV в кератиноцитах и резидентных DC (дендритных клетках) кожи с последующей

амплификацией вируса в дренирующих лимфатических узлах, что приводит к вирусемии и распространению во внутренние органы. Специфические клетки-мишени для инфицирования WNV четко не определены, но считается, что это подмножества DC, макрофагов и, возможно, нейтрофилов. Инвазия WNV в ткани ЦНС (например в головной и спинной мозг) составляет третью фазу инфекции. WNV может проникать в мозг посредством комбинации механизмов, которые облегчают вирусную нейроинвазию, таких как прямое инфицирование с нарушением гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) или без него и/или транспорт вируса по периферическим нейронам.

Врожденная противовирусная защита необходима для контроля инфекции WNV, включая продукцию IFN I типа и провоспалительных цитокинов, экспрессию противовирусных генов и последующую активацию адаптивного иммунного ответа. При инфекции WNV врожденная иммунная активность в основном запускается посредством передачи сигналов RIG-1-подобного рецептора (RLR), хотя Toll-подобные рецепторы (TLR) также могут способствовать активации NF-κB и продукции интерферонов I типа и провоспалительных цитокинов. DC и макрофаги, из которых и те, и другие являются сигнальными клетками врожденного иммунитета и клетками-мишенями инфекции WNV, играют ключевую роль в связывании врожденного и адаптивного иммунных ответов. Макрофаги и DC легко активируются WNV, высвобождая провоспалительные цитокины и хемокины, такие как IFN типа I, TNF, IL-1β, CCL2, CCL3, CCL5 и IL-8. Эти цитокины важны для регуляции врожденных клеточно-опосредованных ответов (с участием NK-клеток, нейтрофилов и γδ-T-клеток), а также для развития адаптивных иммунных ответов. Основным отличительным признаком патогенеза WNV является нейровоспаление, вызванное чрезмерным врожденным и приобретенным иммунным ответом. Аккумуляция воспалительных моноцитов в головном мозге и их дифференцировка в макрофаги и микроглию также может усугубить нейровоспаление и повреждение ЦНС, что продемонстрировано на мышинной модели нелетальной инфекции WNV. Распознавание нуклеиновой кислоты WNV в моноцитах/микроглии с помощью TLR может привести к продукции TNF-α, что приводит к потере тесных контактов, позволяя WNV и иммунным клеткам проникать в периваскулярное пространство головного мозга у мышей. Таким образом, активация клеток моноцитарно-макрофагальной системы с помощью WNV, по-видимому, приводит к важным нейрпатологическим последствиям, а чрезмерные врожденные ответы могут вызывать воспаление, изменяя проницаемость гематоэнцефалического барьера и позволяя вирусу

проникать в ЦНС. Действительно, лечение инфицированных нейрональных клеток антителами, блокирующими TNF- α и другие провоспалительные медиаторы, приводит к значительному снижению WNV-опосредованной гибели нейронов, что свидетельствует о том, что такие медиаторы играют важную роль в патогенезе инфекции WNV в ЦНС.

5. Вирус гепатита С

Вирус гепатита С (HCV) вызывает прогрессирующее заболевание печени, которое переходит от хронического воспаления к фиброзу, циррозу и даже к гепатоцеллюлярной карциноме. Вызванный HCV гепатит, по оценкам, встречается у 71 миллиона инфицированных людей и вызывает около 400000 смертей в год. Вирус гепатита С (HCV), принадлежащий к семейству *Flaviviridae*, представляет собой небольшой оболочечный вирус, содержащий одноцепочечную (+) РНК длиной приблизительно 10 тысяч оснований, которая кодирует один полипротеин, расщепляемый клеточными и вирусными протеазами с образованием 10 вирусных белков. При инфицировании HCV гепатоциты и иммунные клетки (макрофаги, тучные клетки, дендритные клетки и естественные клетки-киллеры), рекрутированные в печень, инициируют врожденный иммунный ответ, что приводит к спонтанной элиминации острой инфекции HCV. Однако в 70-80% случаев иммунные ответы не могут уничтожить вирус в острой фазе, что приводит к хронической инфекции. Постоянная репликация HCV в гепатоцитах приводит к неконтролируемому воспалению и продукции хемокинов. Избыток цитокинов, как воспалительных агентов, в дальнейшем вызывает воспаление в печени, что в конечном итоге усугубляет повреждение тканей и прогрессирование заболевания печени.

Прямое противовирусное лечение является первым выбором для лечения HCV, но одних противовирусных препаратов недостаточно для блокирования тяжелого воспаления и повреждения печени у инфицированных HCV индивидуумов. HCV является лишь пусковым механизмом патофизиологических процессов, но стойкий воспалительный цитокиновый шторм и индуцированное HCV повреждение гепатоцитов усугубляют прогрессирование тяжелых заболеваний печени. РНК HCV вызывает опосредованную TLR активацию NF- κ B и высвобождение воспалительных цитокинов, в то время как белки HCV активируют NLRP3. Высвобожденные воспалительные факторы связываются с соответствующими рецепторами и затем индуцируют активацию NF- κ B, что приводит к последующему воспалительному ответу. Таким образом, длительный, стойкий и неконтролируемый воспалительный ответ является отличительной чертой

этих заболеваний и в дальнейшем приводит к повреждению печени и более тяжелому прогрессированию заболевания. Некоторые пациенты, у которых достигнут устойчивый противовирусный ответ после прямой противовирусной терапии, по-прежнему подвержены долгосрочному риску прогрессирования до цирроза печени и гепатоцеллюлярной карциномы. Таким образом, сочетание прямой противовирусной терапии с противовоспалительными/гепатопротекторными препаратами является многообещающей схемой лечения для пациентов с HCV.

6. Вирус клещевого энцефалита

Вирус клещевого энцефалита (TBEV) вызывает тяжелое заболевание, которое может привести к необратимым неврологическим состояниям или даже смерти. Тяжесть TBE изменяется в зависимости от подтипа вируса: европейского (TBEV-Eu), сибирского (TBEV-Sib) и дальневосточного (TBEV-FE). TBEV-Eu является самым легким вариантом (менее 2% летальности), в то время как TBEV-FE представляет собой наихудший вариант с высокой частотой неврологических осложнений и до 40% летальных исходов. TBEV представляет собой небольшой оболочечный вирус, содержащий одноцепочечную (+) РНК длиной приблизительно 11 тысяч оснований, кодирующую один полипротеин, который расщепляется клеточными и вирусными протеазами с образованием 10 вирусных белков. Клещевой энцефалит (TBE) представляет собой синдром с трехфазным течением, начинающийся с гриппоподобного заболевания (характеризующегося лихорадкой, утомляемостью и болью в теле), после чего у 65-70% инфицированных людей происходит выведение вируса. Около трети пациентов переходят в бессимптомную фазу заболевания и, наконец, в нейроинвазивную фазу с неврологическими симптомами различной степени тяжести, от менингита до тяжелого менингоэнцефалита с миелитом или без него.

Было предложено, чтобы иммунные и неиммунные механизмы способствовали проникновению TBEV через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) и инвазии в ЦНС. Цитокины могут способствовать этому процессу. Цитокины, такие как TNF- α и IL-6, влияют на проницаемость эндотелиальных клеток, что может вызвать нарушение ГЭБ, что приводит к проникновению вируса в ЦНС. TBEV-инфицированные иммунные клетки, такие как дендритные клетки, нейтрофилы, моноциты, макрофаги и Т-клетки, также могут мигрировать в паренхиматозный компартмент, вызывая инфицирование нейронов или других клеток головного и спинного мозга.

Инфекция TBEV активирует продукцию IFN 1 типа посредством распознавания TLR3 вирусной дцРНК во внеклеточной среде или в цитоплазме. Система IFN- α , по-видимому, играет ключевую роль в активации врожденного иммунитета. Она влияет на активацию иммунокомпетентных клеток и индукцию других провоспалительных цитокинов. В мышинных моделях TBEV индуцирует цитокиновый шторм на терминальной стадии инфекции, которую можно рассматривать как цитокиновый шторм.

Интересно, что в фазе острой инфекции у TBEV-инфицированных пациентов уровни S1P в крови и спинномозговой жидкости сильно повышены. Это увеличение может способствовать провоспалительному ответу. Повышенная продукция внеклеточного S1P может регулироваться модуляторами пути S1P. Действительно, фактор элонгации eEF1A связывается с SPHK и активирует его, фосфорилируя сфингозин и продуцируя S1P. Плитидепсин нацеливается на eEF1A, ингибируя продукцию S1P в обработанных клетках.

7. Вирус классической чумы свиней

Классическая чума свиней (CSF) остается одной из самых серьезных трансграничных вирусных болезней свиней во всем мире. Она оказывает огромное влияние на здоровье животных и свиноводство и поэтому подлежит регистрации во Всемирной организации по охране здоровья животных. Вирус классической чумы свиней (CSFV) представляет собой небольшой оболочечный вирус, принадлежащий к семейству *Flaviviridae*. Он имеет одноцепочечный (+) геном РНК размером приблизительно 12,3 тысяч пар нуклеотидов, который транслируется в один полипротеин. Ко- и посттрансляционный процессинг белка-предшественника вирусными и клеточными протеазами приводит к 13 зрелым белкам. Предполагаемым рецептором вируса в свинных клетках является CD46. Классическую чуму свиней можно разделить на следующие формы заболевания: острое (транзиторное или летальное), хроническое и персистирующее течение, которое обычно требует инфицирования во время беременности (34). В течение первых двух недель после инфицирования острая фаза характеризуется неспецифическими (часто называемыми «атипичными») клиническими признаками, такими как высокая температура, анорексия, симптомы расстройства желудочно-кишечного тракта, общая слабость и конъюнктивит. Примерно через две-четыре недели после инфицирования могут появиться неврологические признаки, включая нарушение координации, парез, паралич и судороги. В то же время

кожные кровоизлияния или цианоз могут появиться в разных местах организма, таких как уши, конечности и брюшная полость. Эти поздние признаки являются хрестоматийными случаями и поэтому называются «типичными» признаками CSF. При остро-летальном течении смерть обычно наступает через 2-4 недели после инфицирования CSFV, и смертность может достигать 100%. Хроническое течение возникает, когда инфицированная свинья не способна выработать адекватный иммунный ответ. В целом у инфицированных животных наблюдаются только неспецифические клинические признаки, такие как ремиттирующая лихорадка, депрессия, истощение и диффузный дерматит.

Отличительной чертой острой классической чумы свиней являются высокие уровни интерферона (IFN)- α , обнаруживаемые в сыворотке крови сразу после инфицирования, за которыми следует воспалительный цитокиновый шторм. Активированные макрофаги, по-видимому, играют решающую роль в иммунопатогенезе CSF. Действительно, прямое повреждение вирусом может быть почти исключено для многих поражений, возникающих в ходе инфекции CSFV.

Семейство ретровирусов

Ретровирусы представляют собой семейство положительно-смысловых одноцепочечных РНК-вирусов, характеризующихся экспрессией обратной транскриптазы, РНК-зависимой ДНК-полимеразы, которая генерирует ДНК из РНК-генома, которая затем последовательно интегрируется в хозяйский геном инфицированных растений. Вирусы *Retroviridae* включают ВИЧ-1 и ВИЧ-2 (вирус иммунодефицита человека), которые вызывают СПИД (синдром приобретенного иммунодефицита) и HTLV (Т-лимфотропный вирус человека). ВИЧ-инфекция, в частности, вызывает иммунный ответ, который проявляется в виде острого ретровирусного синдрома (ARS), а у некоторых индивидуумов или в запущенных случаях инфекции в виде воспалительного синдрома, соответствующего синдрому цитокинового шторма.

Семейство пикорнавирусов

Пикорнавирусы представляют собой безоболочечные небольшие одноцепочечные (+) РНК-вирусы. Их небольшой геном охватывает более 8 тысяч пар оснований, содержащих открытую рамку считывания, которая транслируется в один полипептид, который впоследствии процессируется вирусными протеазами в 11-12 отдельных вирусных белков. Семейство включает энтеровирусы (EV), гепатовирусы,

пареховирусы, риновирусы, афтовирусы и кардиовирусы. Одной из основных особенностей тяжелых патогенных заболеваний в результате нескольких пикорнавирусных инфекций (диабет 1 типа, миокардит или паралич) является тесная связь с аутоиммунитетом. Простейшим объяснением может быть то, что инфицирование цитопатическими инфекционными агентами приводит к гибели или повреждению клеток, таким образом высвобождая либо секвестрированные, либо клеточные аутоантигены, которые присутствуют в низких концентрациях до инфицирования, таким образом предотвращая аутосенсбилизацию. Поскольку некоторые пикорнавирусы, в том числе вирус полиомиелита (PV), вирус Коксаки (CVB) и вирус ящура, могут вызывать персистирующие вирусные инфекции, хроническая активация MDA5 и повышение уровня IFN-I могут вызывать адьювантный эффект, признаваемый некоторыми исследователями основным фактором, способствующим возникновению аутоиммунитета при пикорнавирусных инфекциях.

1. Вирус ящура

Вирус ящура (FMDV) является возбудителем острого везикулярного заболевания, поражающего свиней, крупный рогатый скот и других домашних и диких животных во всем мире. FMDV, небольшой безоболочечный вирус из семейства *Picornaviridae*, имеет одноцепочечный (+) РНК-геном длиной около 8,5 тысяч пар нуклеотидов, кодирующий один полипротеин, который подвергается протеолитическому процессингу вирусными протеазами с образованием 14 вирусных белков.

Вирусные инфекции могут стимулировать множественные пути индукции IFN I типа и III типа, которые обладают противовирусными, антипролиферативными и иммуномодулирующими функциями. Созреванию дендритных клеток (DC) способствует IFN-I, влияющий на эффективность индуцированных адаптивных иммунных ответов. Некоторые вирусные протеазы могут ингибировать продукцию IFN I типа и передачу сигналов NF- κ B посредством расщепления рецепторов, адаптеров и регуляторов, участвующих в этих путях. Затем ответ IFN усиливается и распространяется на окружающие неинфицированные клетки за счет экспрессии сотен IFN-стимулированных генов. MDA5 участвует в распознавании пикорнавирусов. Значимость двухцепочечной РНК-зависимой протеинкиназы R (PKR), индуцированной IFN I типа, в ингибировании репликации FMDV в клетках свиней и крупного рогатого скота хорошо документирована. Обработка ингибитором PKR увеличивала выход вируса в несколько раз по сравнению с необработанными инфицированными клетками,

а подавление PKR с помощью РНК-интерференции также приводило к более высоким титрам вируса, что еще раз подтвердило прямую функцию PKR в контроле репликации FMDV. Фактор элонгации eEF1A2 связывает PKR и удерживает киназу в режиме ожидания. Плитидепсин связывается с eEF1A2, высвобождая PKR из комплекса с фактором элонгации и активируя киназу (48). Таким образом, плитидепсин может усиливать ответ в отношении инфекции FMDV.

2. Энтеровирус А71

Заболевание кистей рук, стоп и полости рта (HFMD) представляет собой контагиозное вирусное заболевание и поражает в основном младенцев и детей младшего возраста. Основными проявлениями являются лихорадка, везикулярные высыпания на кистях, стопах и ягодицах, язвы на слизистой оболочке полости рта. Обычно HFMD является самоограничивающимся, при этом у пациентов наблюдается лихорадка, макуло-папулезная или папуло-везикулярная сыпь на руках и подошвах ног и болезненные изъязвления в полости рта, которые обычно проходят менее чем за десять суток. Тем не менее, у небольшой части детей могут возникнуть тяжелые осложнения, включая менингит, энцефалит, острый вялый паралич и нейрореспираторный синдром, и даже смерть. HFMD вызывается двумя патогенами: энтеровирусом 71 (EV-A71) и вирусом Коксаки А16 (CV-A16). EV-A71 представляет собой небольшой икосаэдрический безоболочечный одноцепочечный (+) РНК-вирус из семейства *Picornaviridae*. Геном EV71 размером приблизительно 7,4 тысяч пар нуклеотидов кодирует один полипротеин, который протеолитически расщепляется до различных структурных и неструктурных вирусных белков.

Летальные инфекции EV-A71 протекают с обширной дегенерацией нейронов, тяжелым воспалением и некрозом ЦНС, застоем в легких и кровоизлиянием. Системный воспалительный ответ в сочетании с воспалением ЦНС и цитокиновым штормом может играть важную роль в развитии фульминантного отека легких, связанного с EV71. Провоспалительные цитокины головного мозга могут поступать в системный кровоток после возникновения постэнцефалитного нарушения гематоэнцефалического барьера, системно активируя воспалительный каскад, тем самым способствуя развитию постэнцефалитного синдрома системного воспалительного ответа (SIRS) и последующей сердечно-легочной недостаточности и отеку легких.

3. Вирусы Коксаки

Вирусы Коксаки (CV) являются относительно распространенными энтеровирусами, вызывающими ряд серьезных заболеваний человека, включая миокардит и менингоэнцефалит. Вирусы Коксаки представляют собой небольшие икосаэдрические безоболочечные одноцепочечные (+) РНК-вирусы из семейства *Picornaviridae* с геномом длиной 7-8 тысяч пар оснований, ковалентно связанным с вирусным белком VPg, который действует как праймер для синтеза РНК. Передача осуществляется фекально-оральным путем. Вирусы Коксаки могут быть разделены на две группы, А и В. Вирусы группы А поражают преимущественно кожу и слизистые оболочки, вызывая такие заболевания, как заболевание кистей рук, стоп и полости рта (HFMD). Вирусы группы Коксаки (CVB) имеют тенденцию поражать вместо этого внутренние органы, вызывая панкреатит, гепатит, миокардит и так далее. В частности, вирусы серотипа В3 (CVB3) связаны с развитием миокардита у людей.

CV является относительно распространенным поражающим детей вирусом, обычно вызывающим легкие инфекции в диапазоне от субклинических до гриппоподобных симптомов и легкого гастроэнтерита. Было показано, что CV поражает сердце, поджелудочную железу и ЦНС. В некоторых случаях CV вызывают тяжелые системные воспалительные заболевания, такие как менингоэнцефалит, панкреатит и миокардит, все из которых могут быть летальными или приводить к стойкой дисфункции органов, включая дилатационную кардиомиопатию и энцефаломиелит, с летальностью вплоть до 10%.

После проникновения через желудочно-кишечный тракт хозяина CVB3 инфицирует и реплицируется в лимфоцитах и макрофагах пейеровых бляшек и селезенки. Впоследствии инфекционные вирионы попадают в кровоток и распространяются в такие органы, как сердце и поджелудочная железа. Развитие вирусного миокардита обычно делится на три отдельные фазы. Первые 3–4 суток являются «острой» фазой, характеризующейся репликацией вируса. Лизис клеток, вызванный вирусом, и распознавание PAMP рецепторами TLR индуцируют экспрессию провоспалительных цитокинов, включая IL-1b, IL-6, IL-18, TNF- α и интерфероны I типа и II типа (IFN). Эти цитокины продуцируются резидентными клетками сердца, включая миоциты, фибробласты, эндотелиальные клетки и дендритные клетки (DC). Эти цитокиновые сигналы активируют локальные макрофаги и усиливают регуляцию молекул адгезии эндотелиальных клеток, а также хемокинов и хемокиновых рецепторов, что в совокупности вызывает рекрутирование клеток врожденного иммунитета.

Подострая фаза, с 4-х или 5-х суток до приблизительно 14-х суток, начинается с инфильтрации сердца клетками врожденной иммунной системы. Моноциты участвуют в фагоцитозе мертвых клеток и сильно увеличивают экспрессию провоспалительных цитокинов. Во время подострой фазы иммунный ответ не только уничтожает инфицированные и мертвые клетки, но также в значительной степени способствует необратимому повреждению сердца. Третья стадия вирусного миокардита начинается после полной элиминации вируса и характеризуется репарацией сердца и замещением мертвых тканей фиброзным рубцом, влияющим на функцию сердца в долгосрочной перспективе.

4. Риновирус

Человеческие риновирусы (HRV) являются причиной более половины простудных заболеваний и ежегодно обходятся в миллиарды долларов на визиты к врачу и в виде пропущенных рабочих дней. HRV передаются от человека к человеку контактным (прямо или через фомит) или аэрозольным (мелкие или крупные частицы) путем. HRV принадлежат к семейству *Picornaviridae* и представляют собой одноцепочечные (+) РНК-вирусы с геномом приблизительно 7200 пар оснований, охватывающим одну ORF, кодирующую полипротеин, который расщепляется кодируемыми вирусом протеазами с образованием 11 вирусных белков. Существуют три генетически различные группы HRV, обозначаемые как группы А, В и С.

Большинство серотипов HRV-А и -В (основная группа рецепторов) проникают в эпителиальные клетки дыхательных путей через ICAM-1 (молекулы межклеточной адгезии 1), член суперсемейства иммуноглобулинов. HRV нечасто ассоциируется с цитопатологией верхних дыхательных путей. В дополнение к прямому влиянию на респираторные эпителиальные клетки врожденные и адаптивные ответы хозяина также играют роль в патогенезе инфекции HRV. Ответ интерферона I типа (IFN) опосредован MDA-5 (ген 5, ассоциированный с дифференцировкой меланомы) и RIG-1 (ген 1, индуцируемый ретиноевой кислотой). Эти рецепторы максимизируют индукцию IFN I и II типов и провоспалительных цитокинов, включая RANTES (хемокин, экспрессируемый и секретлируемый Т-клетками при активации), IP-10, IL-6, IL-8 и ENA-78 (эпителиальный нейтрофил-активирующий пептид 78). HRV стимулирует продукцию IL-8 частично опосредована через NF- κ B-зависимый путь активации транскрипции. Уровни IL-8 коррелировали с тяжестью симптомов (ринорея и заложенность носа) и достигали максимума через 48-72 часа после заражения вирусом.

5. Вирус гепатита А

Вирус гепатита А (HAV) ежегодно вызывает около 1,4 миллиона случаев гепатита, передающегося кишечным путем (Информационный бюллетень ВОЗ № 328, Гепатит А, 2013 г.), по-прежнему являясь причиной смертности, несмотря на существование эффективной вакцины. В отличие от остальных пикорнавирусов, HAV имеет оболочку, которая делает его чрезвычайно стабильным и не может остановить синтез белка хозяина. Молекула клеточной поверхности TIM-1 действует как рецептор для HAV. Тяжесть заболевания зависит от возраста, протекая легко или бессимптомно у детей раннего возраста и проявляясь острым гепатитом (желтуха, утомляемость, общее недомогание и так далее) и более высокой частотой молниеносного гепатита в более старшем возрасте. Молниеносный гепатит поражает людей старше 50 лет, при этом уровень смертности достигает 5,4%.

HAV представляет собой одноцепочечный (+) РНК-вирус с псевдооболочкой, принадлежащий к семейству *Picornaviridae*. Его геном включает 7,5 тысяч пар оснований, содержащих единственную открытую рамку считывания, кодирующую полипротеин, который расщепляется вирусными протеазами на 10 вирусных белков. В геноме РНК отсутствует структура 5'-кэпа, но он связан с белком VPg.

Инфекция HAV протекает с начальными симптомами, такими как лихорадка или желтуха, примерно в 70% случаев, при этом около трети пациентов остаются бессимптомными. HAV-инфекция не имеет хронического носительства и не приводит к хроническому гепатиту или циррозу печени. Цитозольная РНК пикорнавирусов, таких как HAV, определяется MDA5, но в отличие от HCV, HAV минимально стимулирует ответы IFN в инфицированной печени. Протеаза HAV 3C расщепляет основной модулятор NF-κB (NEMO), тем самым ослабляя активацию ядерного фактора-κB (NF-κB) после и MAVS (митохондриальный противовирусный сигнальный белок), и TLR3. Повреждение печени не может быть напрямую вызвано HAV, а может быть вызвано иммуноопосредованными механизмами. Клетки Treg у пациентов с АНА претерпевают качественные изменения, приводящие к продукции TNF-α. Кроме того, Treg-клетки, продуцирующие TNF-α, у пациентов с АНА проявляют Th17-подобные признаки с точки зрения их фенотипа и имеют ослабленную супрессорную функцию. Воспалительные Treg-клетки связаны с иммунопатологическим поражением печени при АНА.

Семейство тогавирусов

Семейство *Togaviridae* содержит только один род, *Alphaviridae*, включающий 31 вид. Альфавирусы представляют собой небольшие оболочечные икосаэдрические вирусы с одноцепочечным (+) РНК-геномом размером около 11-12 тысяч оснований. Этот кэпированный геном РНК разделен на неструктурный домен, кодирующий неструктурные белки (две трети на 5'-конце генома), и структурный домен, кодирующий три структурных белка вируса (одна треть на 3'-конце генома). Неструктурные белки транслируются как один или два полипротеина из самой геномной РНК. Эти полипротеины расщепляются с образованием nsP1, nsP2, nsP3 и nsP4, а также ряда промежуточных продуктов расщепления, которые обладают важными функциями, отличными от конечных продуктов. Структурный домен транслируется как полипротеин из кэпированной субгеномной мРНК, мРНК 26S.

Альфавирусы представляют серьезную или потенциальную угрозу для здоровья человека во многих областях. Вирус восточного энцефалита лошадей (EEEV) и вирус западного энцефалита лошадей (WEEV) регулярно вызывают смертельный энцефалит у людей как в Северной, так и в Южной Америке, хотя число случаев невелико. Вирус венесуэльского лошадиного энцефалита (VEEV) также вызывает заболевания человека. Вирус чикунгунья (CHIKV) и его близкий родственник вирус О'Ньонг-Ньонг (ONNV) вызвали миллионы случаев тяжелых, но не смертельных заболеваний, характеризующихся лихорадкой, сыпью и болезненной артралгией. Вирус реки Росс (RRV), вирус леса Барма (BFV) и вирус Синдбис (SINV) вызывают эпидемический полиартрит у людей, симптомы которого длятся годами. Вирус леса Семлики (SFV) вызывает заболевание, характеризующееся исключительно сильной головной болью, лихорадкой, миалгией и артралгией.

1. Вирус чикунгунья

Вирус чикунгунья (CHIKV) является этиологическим агентом переносимой комарами лихорадки чикунгунья, инвалидизирующего артрита, вызывающего колоссальную заболеваемость и до некоторой степени смертность среди людей, включая новорожденных. CHIKV имеет одноцепочечный (+) РНК-геном длиной приблизительно 12 тысяч пар оснований. Этот геном организован в виде двух открытых рамок считывания (ORF): 5'-ORF, которая транслируется с геномной РНК и кодирует четыре неструктурных белка, и 3'-ORF, которая транслируется с субгеномной 26S РНК и кодирует полипротеин, который расщепляется на 5 структурных белков.

Лихорадка чикунгунья (CF) имеет инкубационный период менее 10 суток. Бессимптомными пациентами являются менее 30%, меньше чем при других альфавирусных заболеваниях. Пациенты с симптомами страдают от внезапного появления высокой температуры, полиартралгии, головной боли и утомляемости. Наиболее характерным симптомом является полиартралгия, особенно боль в периферических суставах. Также частой является миалгия. У половины пациентов встречаются кожные проявления, включая макулярную сыпь. Сообщалось о множестве других клинических симптомов во время острой стадии лихорадки чикунгунья, таких как конъюнктивит, нейроретинит, иридоциклит, миокардит, перикардит, пневмония, сухой кашель, лимфаденопатия, нефрит, гепатит и панкреатит. Зарегистрированными причинами смерти были сердечная недостаточность, синдром полиорганной недостаточности, токсический гепатит, энцефалит, буллезный дерматоз, дыхательная недостаточность, почечная недостаточность, пневмония, острый инфаркт миокарда, цереброваскулярное заболевание, гипотиреоз или септицемия.

Геном РНК СHКV может инициировать рецепторы распознавания образов хозяина (PRR), включая эндосомальные Toll-подобные (TLR3 и TLR7) и цитоплазматические RIG-I-подобные (RIG-I и MDA5) рецепторы, которые активируют нижестоящие адапторные молекулы (TRIF, MyD88 и MAVS) для индукции ядерной транслокации регуляторных факторов интерферонов (IRF1, IRF3, IRF5 и IRF7) и факторов транскрипции NF- κ B, которые индуцируют экспрессию IFN I типа, IFN-стимулированных генов (ISG) и провоспалительных цитокинов и хемокинов. Считается, что воспалительные цитокины и хемокины вовлечены в патогенез СHКV и связаны с тяжелыми клиническими проявлениями, а также с развитием внезапной и стойкой артралгии. Сообщалось о значительном повышении уровней IL-1 β и IL-6 в тяжелых случаях по сравнению с нетяжелыми случаями CF. В смертельном случае, описанном в Италии, анализ воспалительных цитокинов выявил заметное и сильное увеличение циркулирующего IFN I типа, а также провоспалительного цитокина IL-6, что согласуется с возможной ролью IFN I типа в вызванном СHКV цитокиновом шторме, который, в свою очередь, мог способствовать усилению повреждения тканей и смерти.

2. Вирус Синдбис

Вирус Синдбис (SinV) является наиболее широко распространенным из всех известных вирусов, передающихся членистоногими. Вирусы Погоста, Оккельбо и карельской лихорадки относятся к группе Синдбис. Болезнь Оккельбо,

характеризующаяся артритом, сыпью и иногда лихорадкой, была впервые обнаружена в деревне Оккельбо в центральной Швеции. Позже это же заболевание было описано в Финляндии как болезнь Погоста. В России болезнь получила название карельской лихорадки. Нет никаких доказательств каких-либо заболеваний, вызванных SinV, у других позвоночных, кроме человека. В целом инкубационный период колеблется от 2 до 10 суток, симптоматическое заболевание начинается внезапно, а продолжительность заболевания короткая, менее 20 суток. Однако существует значительная доля инфекций SinV, которые могут протекать с хроническим заболеванием. Как и в случае с другими альфавирусами, дети заражаются часто, но у них развиваются только субклинические заболевания. Основными симптомами являются лихорадка, мышечная боль, головная боль, боль в горле, макулопапулезная сыпь и боль в суставах. В макрофагах человека инфекция способствует активации, что приводит к высвобождению фактора ингибитора миграции макрофагов (MIF) из внутриклеточных пулов и вызывает секрецию TNF- α , IL-1 β и IL-6. У мышей репликация SinV приводила к индукции высоких уровней TNF- α , IFN- γ , IFN- α/β , IL-6 и кортикостерона в сыворотке, двум причинам синдрома системного воспалительного ответа (SIRS, цитокиновый шторм) (76). Таким образом, имеются веские косвенные доказательства участия SIRS в заболевании, вызванном вирулентным вирусом Синдбис.

3. Вирус леса Семлики

Вирус леса Семлики (SFV) представляет собой одноцепочечный (+) РНК-вирус рода *Alphavirus* семейства *Togaviridae*. Геном SFV имеет длину 13 тысяч пар оснований, кодируя только 9 белков в двух открытых рамках считывания (ORF). Четыре неструктурных белка кодируются в виде полипротеина в первой ORF, расположенной в 5'-области генома и напрямую транскрибируемой с геномной ДНК. Остальные 5 структурных белков кодируются в виде полипротеина во второй ORF, которая транскрибируется с субгеномного вида РНК, называемого 26S, и расположена в 3'-области генома. Затем полипротеины разрезаются вирусными протеазами на отдельные белки.

Исходный изолят SFV L10 проявляет полную вирулентность у инбредных штаммов мышей, вызывая летальный энцефалит в результате инфекции центральной нервной системы (ЦНС). Критическое различие между вирулентными и не смертельными штаммами может заключаться в быстрой индукции повреждения нейронов в ЦНС, что вызывает смерть инфицированных мышей до того, как иммунная система сможет вмешаться. Инфицирование не летальными штаммами SFV вызывает

воспалительные спонгиозные поражения в головном мозге мышей. Эти поражения отсрочиваются у мышей, получавших иммуносупрессивное лекарственное средство циклофосфамид (Berger ML, 1980). Следовательно, прямой вирусный цитолиз не является существенным для развития патологии. Тот факт, что голые мыши страдают от таких же воспалительных спонгиозных поражений, хотя и лишены функциональных Т-клеток, указывает на то, что иммунопатология не зависит от них. Вместо этого поражения, по-видимому, связаны с присутствием мононуклеарных клеток моноцитарно-макрофагального происхождения, которые могут рекрутироваться в инфицированную ткань и вызывать спонгиозный некроз.

4. Вирус восточного энцефалита лошадей/Вирус западного энцефалита лошадей/Вирус венесуэльского энцефалита лошадей

Три вируса рода *Alphavirus* (семейство *Togaviridae*), вирусы восточного, западного и венесуэльского энцефалита лошадей (EEEV, WEEV и VEEV соответственно), могут вызывать тяжелые вспышки энцефалита у лошадей и людей. EEEV был впервые выявлен у людей в 1938 году во время крупной вспышки, поразившей Массачусетс. Большинство инфекций EEEV у взрослых людей протекают бессимптомно или вызывают легкое заболевание, характеризующееся лихорадкой, ознобом, головной болью, тошнотой, рвотой и миалгией. Смертность у пациентов с симптомами приближается к 80%, у многих выживших наблюдаются серьезные последствия, такие как умственная отсталость, судороги и паралич. Летальность от WEEV колеблется от 3 до 7%, при этом 15-50% выживших после энцефалита, особенно дети младшего возраста, страдают необратимыми неврологическими нарушениями. Энцефалит, связанный с VEEV, вызвал серьезную заболеваемость и смертность во время вспышек в Колумбии и Венесуэле, с более чем 75000 пораженных, более 3000 пациентов с неврологическими заболеваниями и более 300 смертей.

Как и остальные альфавирусы, EEEV, WEEV и VEEV представляют собой одноцепочечные (+) РНК-вирусы с коротким кэпированным геномом длиной около 11,7 тысяч пар оснований. Геном имеет две ORF: 5'-ORF, кодирующая четыре неструктурных белка, которые транслируются как один полипептид с геномной РНК, и 3'-ORF, которая транслируется с субгеномной 26S РНК как один полипептид, содержащий три структурных белка. Полипептиды расщепляются на отдельные белки вирусными протеазами.

У лабораторных мышей, инфицированных экспериментально, EEEV вызывает неврологическое заболевание, напоминающее таковое после инфицирования человека и лошадей. Вирус обнаруживается в головном мозге на 1-е сутки после заражения (PI), а признаки заболевания проявляются на 3-4 сутки PI. Клинические признаки болезни мышей включают взъерошенные волосы, анорексию, рвоту, вялость, паралич задних конечностей, судороги и кому. Патологические изменения у инфицированных мышей включают дегенерацию нейронов, клеточную инфильтрацию и периваскулярную инфильтрацию, подобные патологическим изменениям ЦНС, описанным у людей, инфицированных естественным путем. VEEV инфицирует дендритные клетки (DC) и макрофаги в лимфоидных тканях, вызывая сывороточную вирусемию и облегчая нейроинвазию. В отличие от этого, EEEV плохо реплицируется в лимфоидных тканях.

5. Вирус краснухи

Инфекция, вызванная вирусом краснухи (RV), у детей и взрослых обычно протекает бессимптомно (до 50% случаев) или характеризуется легкой лихорадкой, болью в горле, лимфаденопатией и макуло-папулезной сыпью. Однако при инфицировании беременных женщин RV вызывает врожденные дефекты и гибель плода. RV является серьезной проблемой общественного здравоохранения, поскольку ежегодно регистрируется более 100000 случаев синдрома врожденной краснухи (CRS). Вирус краснухи (RV), единственный представитель рода рубивирусов в семействе *Togaviridae*, имеет геном одноцепочечной (+) РНК размером около 10 тысяч пар оснований, который кодирует пять белков. Геном содержит две ORF: 5' ORF, которая кодирует два неструктурных белка, непосредственно транслируемых с геномной РНК, и вторую 3' ORF, которая кодирует три структурных белка, транслируемых с субгеномной мРНК.

Инфекция RV на критических стадиях развития органов у плода (в первом триместре беременности) может привести к развитию CRS, синдрома, характеризующегося тяжелыми дефектами органов чувств (глаз и ушей), центральной нервной системы и сердечно-сосудистой системы. При CRS вирус краснухи способен инфицировать плаценту, распространяться на плод и изменять функцию многих систем плода, препятствуя формированию органов и вызывая системное воспаление. Увеит, ассоциированный с вирусом краснухи (RVU), является одним из воспалительных синдромов, вызванных RV. Этот воспалительный процесс характеризуется высокими внутриглазными уровнями воспалительных цитокинов, включая IL-6, IL-6RA и MCP-1.

Семейство калицивирусов

Семейство *Caliciviridae* состоит из 11 родов, при этом семь родов (*Lagovirus*, *Norovirus*, *Nebovirus*, *Recovirus*, *Sapovirus*, *Valovirus* и *Vesivirus*) поражают млекопитающих, два рода (*Bavovirus* и *Nacovirus*) поражают птиц, и два рода (*Minovirus* и *Salovirus*) поражают рыб. Калицивирусы вызывают видоспецифические инфекции, при этом большинство норовирусов, саповирусов и небовирусов ограничены желудочно-кишечным трактом, в то время как лаговвирусы, саловирусы и везивирусы могут вызывать тяжелые системные инфекции у своих естественных хозяев. Семейство включает безоболочечные вирусы с одноцепочечными (+) РНК-геномами размером около 7-8 тысяч оснований, организованными в две, три или четыре ORF. Калицивирусы похожи на пикорнавирусы наличием белка VPg, присоединенного к 5'-концу их генома, и последовательностью нескольких белков.

1. Вирус Норфолк

Норовирус (NoV) представляет собой род семейства *Caliciviridae*, состоящий из одного вида, вируса Норфолк. Норовирус человека является основной причиной эпидемического и спорадического острого гастроэнтерита во всем мире и может хронически инфицировать пациентов с ослабленным иммунитетом. Инфекция NoV вызывает типичные симптомы гастроэнтерита, включая диарею, рвоту и боль в животе, а также может провоцировать лихорадку, головную боль и ломоту в теле. Норовирусы представляют собой безоболочечные вирусы с одноцепочечным (+) РНК-геномом длиной около 7,5 тысяч оснований. Геном организован в три или четыре ORF. 5' ORF1 кодирует большой полипротеин, который расщепляется вирусными протеазами на 6 неструктурных белков. ORF2 кодирует один структурный капсидный белок. ORF3 кодирует минорный структурный белок. Субгеномная РНК кодирует два дополнительных структурных белка. Наконец, ORF4 (которая перекрывается с ORF2) в мышинном норовирусе кодирует дополнительный белок, фактор вирулентности 1. 5'-концы геномной и субгеномной РНК NoV ковалентно связаны с небольшим кодируемым вирусом белком, известным как VPg, а 3'-концы полиаденилированы.

В последние годы накопились убедительные доказательства, демонстрирующие, что основной мишенью NoVs являются антигенпрезентирующие клетки (АПК). MuNoV эффективно реплицируются в первичных дендритных клетках и макрофагах, а также в ряде макрофагоподобных клеточных линий *in vitro*. Способность NoV инфицировать кишечные иммунные клетки, несомненно, оказывает значительное влияние на патогенез NoV и иммунный ответ хозяина на инфекцию NoV. В соответствии с короткой

продолжительностью симптомов NoV врожденный иммунитет и, в частности, IFN I типа, имеет решающее значение для контроля острых инфекций NoV.

Семейство коронавирусов

Коронавирусы являются патогенами, которые могут инфицировать животных и людей, в основном вызывая легкие или тяжелые кишечные или респираторные заболевания, которые в некоторых случаях могут быть опасными для жизни, как, например, MERS-CoV, SARS-CoV или новый SARS-CoV-2, причем последний вызывает заболевание COVID-19, которое недавно возникло в Ухане, провинция Хубэй, Китай. Как SARS-CoV-2, так и близкородственный SARS-CoV принадлежат к подроду *Sarbecoviridae* внутри рода *Betacoronaviridae* (к которому также принадлежит MERS-CoV), одного из четырех родов *Coronaviridae*. Коронавирусы представляют собой оболочечные одноцепочечные (+) РНК-вирусы с геномами размером около 26-32 тысяч пар оснований, что является самым большим известным геномом для РНК-вируса. Впервые они были идентифицированы в 1964 году Джун Алмейда. Их название происходит от сходства их изображений, полученных с помощью электронного микроскопа, с солнечной короной. Их геном кодирует 14 открытых рамок считывания, то есть ORF репликазы 1a и 1b (которые кодируют 15 или 16 зрелых неструктурных белков, также известных как белки репликазы), четыре общих гена структурных белков CoV (S, E, M и N) и ORF, кодирующие так называемые аксессуарные белки. Белки-репликазы, по-видимому, выполняют несколько функций, они необходимы для синтеза или процессинга вирусной РНК, а также для установления взаимодействий вирус-хозяин для облегчения проникновения вируса, экспрессии генов, синтеза РНК или высвобождения вируса. Белки CoV N представляют собой структурные белки, содержащие от 350 до 450 аминокислот, широко фосфорилированные по сериновым остаткам, высокоосновные, и их основная функция заключается в связывании с вирусной РНК с образованием длинного спирального рибонуклеопротеина. Белки N также участвуют в транскрипции, трансляции вирусной РНК и элиминации вируса. Белок N SARS-CoV имеет высокую гомологию с белком SARS-CoV-2.

MERS-CoV, SARS-CoV и SARS-CoV-2 могут вызывать острый респираторный дистресс-синдром (ОРДС), наиболее острую и фатальную стадию заболевания, характеризующуюся широко распространенным воспалением в легких в результате aberrантного иммунного ответа на вирусную инфекцию.

1. SARS-CoV-1

Тяжелый острый респираторный синдром (SARS), вызванный SARS-CoV, начался в китайской провинции Гуандун в 2002 году и затронул 8096 человек во всем мире, что привело к 774 смертельным исходам (уровень смертности 10%). Геном SARS-CoV состоит из 29,7 тысяч пар оснований, содержащих 11 ORF, кодирующих 23 белка.

Наиболее распространенными симптомами SARS являются высокая температура, миалгия, сухой кашель и лимфопения. У приблизительно 30% пациентов также развивалась атипичная форма пневмонии с острой дыхательной недостаточностью в результате острого повреждения легких. Несколько факторов, включая пожилой возраст, мужской пол, высокий пиковый уровень лактатдегидрогеназы, высокий пиковый уровень креатинкиназы и высокое исходное абсолютное количество нейтрофилов, были важными прогностическими факторами для госпитализации в отделение интенсивной терапии и смерти. Чрезмерная воспалительная реакция в легких объясняет развитие острого поражения легких, тем более, когда у пациентов еще проявляется поражение легких в период падения вирусной нагрузки.

Острая вирусная инфекция может вызвать повреждение клеток хозяина за счет непосредственно цитопатии или опосредованного иммунопатологического нарушения. На ранней стадии цитопатия сопровождается вирусной амплификацией, то время, когда лечение противовирусными препаратами может быть особенно эффективным. На поздней стадии, когда развивается адаптивный иммунный ответ, элиминация вируса может сопровождаться тяжелым воспалительным поражением. Цитокиновый шторм, связанный с IFN- γ , может произойти в этой поздней фазе коронавирусной инфекции SARS, и этот цитокиновый шторм может быть связан с иммунопатологическим нарушением у пациентов с SARS.

2. MERS-CoV

Ближневосточный респираторный синдром (MERS), вызванный MERS-CoV, начался в Саудовской Аравии в 2012 году и затронул 2506 человек, что привело к 862 смертельным исходам по всему миру при уровне смертности 35%. Геном MERS-CoV имеет длину 30,1 тысяч пар оснований, включая 10 ORF, которые кодируют 16 неструктурных белков и 5 структурных белков.

Наиболее распространенными симптомами MERS являются лихорадка, кашель, озноб, боль в горле, миалгия и артралгия, за которыми следует одышка и быстрое прогрессирование в пневмонию в течение первой недели, часто требующее искусственной вентиляции легких и поддержки других органов. В то время как у

молодых людей наблюдается клиническое заболевание легкой или средней степени тяжести, пожилые люди или люди с сопутствующими заболеваниями, такими как диабет, ожирение, сердечная недостаточность и почечная недостаточность, среди прочего переносят тяжелое заболевание после заражения MERS-CoV. В наиболее тяжелой форме MERS вызывает острую пневмонию с летальным исходом. У лиц с тяжелым MERS обнаруживаются повышенные уровни провоспалительных цитокинов (IL-6 и IFN- α) и хемокинов (IL-8, CXCL-10 и CCL5) в сыворотке по сравнению с лицами с заболеванием легкой и средней степени тяжести. Высокие уровни цитокинов и хемокинов в сыворотке крови у пациентов с MERS коррелируют с повышенным числом нейтрофилов и моноцитов в легких и в периферической крови, поскольку эти клетки являются преобладающим источником цитокинов и хемокинов, связанных с летальным острым респираторным дистресс-синдромом, который приводит к смерти пациентов с MERS.

3. SARS-CoV-2

COVID-19, вызванный SARS-CoV-2, начался в городе Ухань в Китае в декабре 2019 года, быстро распространился по миру и перерос в глобальную пандемию. Уровень смертности до сих пор не определен, хотя он кажется меньше, чем при заболеваниях SARS и MERS. Геном SARS-CoV-2 кодирует 14 открытых рамок считывания, включая ORF репликазы 1a и 1b (которые кодируют 15 или 16 зрелых неструктурных белков, также известных как белки репликазы), четыре общих гена структурных белков CoV (S, E, M и N) и ORF, кодирующие так называемые акцессорные белки. Белки-репликазы, по-видимому, выполняют несколько функций, они необходимы для синтеза или процессинга вирусной РНК, а также для других этапов жизненного цикла вируса. Белок N представляет собой широко фосфорилированный высокоосновный структурный белок, основная функция которого заключается в связывании с вирусной РНК с образованием длинного спирального рибонуклеопротеина. Белок N также участвует в транскрипции, трансляции вирусной РНК и элиминации вируса. Белки N SARS-CoV и SARS-CoV-2 имеют высокую степень гомологии. Несколько клеточных белков действуют совместно с вирусными белками для поддержания пролиферации вируса, среди них eEF1A, который взаимодействует с белком N для поддержания репликации и распространения вируса.

Общими легкими симптомами ранней стадии инфекции являются лихорадка, сухой кашель, миалгия и утомляемость. Реже встречаются головная боль, кровохарканье

и диарея. При переходе в тяжелую стадию заболевания развиваются такие симптомы, как одышка и гипоксия. Наконец, тяжелая форма заболевания проявляется острым респираторным дистресс-синдромом (ОРДС) вместе с тяжелым воспалением и повреждением легких. Осложнения на тяжелой стадии заболевания связаны с вызванным вирусом гипервоспалением, подобным тому, что наблюдалось ранее при инфекциях SARS-CoV и MERS-CoV.

При SARS-CoV-2 макрофаги презентуют антигены CoV клеткам Th17, что приводит к массивному высвобождению провоспалительных цитокинов, таких как IL-1, IL-6, IL-8, IL-21, TNF- α и MCP-1. Это отвечает за амплификацию иммунного ответа и частично отвечает за повреждение тканей в стенках респираторных альвеол, бронхиол и интерстициальной ткани легких. Кроме того, повышенная экспрессия медиаторов воспаления оказывает подавляющее регулирующее действие на NK-клетки и клетки CD8, которые также важны для элиминации вируса (Kaul, D (2020)). Таким образом, при инфекциях SARS-CoV-2 гиперцитокинемия стала основным фактором, обуславливающим более тяжелый клинический исход.

Что касается SARS-CoV-2, настоящее изобретение может относиться к лечению инфекции SARS-CoV-2. Лечение может заключаться в лечении инфекции COVID-19. Лечение может быть лечением COVID-19. Лечение может быть лечением заболевания, которое возникает в результате инфицирования CoV. Лечение может представлять собой лечение заболевания, возникающего в результате инфицирования SARS-CoV-2. Лечение может заключаться в лечении пневмонии, вызванной инфекцией CoV. Лечение может заключаться в лечении пневмонии, вызванной инфекцией SARS-CoV-2. Лечение может заключаться в лечении пневмонии, вызванной инфекцией COVID-19. Лечение может заключаться в лечении пневмонии, вызванной COVID-19. Лечение может заключаться в лечении острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС), вызванного инфекцией SARS-CoV-2.

Инфекция может представлять собой инфекцию средней степени тяжести. Инфекция может представлять собой тяжелую инфекцию. Инфекция может представлять собой инфекцию легкой степени.

Лечение может уменьшить осложнения, связанные с инфекцией CoV, включая госпитализацию, попадание в отделение интенсивной терапии и смерть.

Настоящее изобретение может быть полезно в лечении острой инфекции COVID-19 (признаки и симптомы COVID-19 до 4 недель); лечении (или минимизации) текущих

симптомов COVID-19 (признаки и симптомы COVID-19 от 4 недель до 12 недель); или лечении или минимизации пост-COVID-19-синдрома (признаки и симптомы, которые развиваются во время или после инфекции, совместимой с COVID-19, продолжают в течение более 12 недель и не объясняются альтернативным диагнозом. Обычно он проявляется группами симптомов, часто накладывающихся друг на друга, которые могут колебаться и меняться с течением времени и могут влиять на любую систему организма. Пост-COVID-19-синдром можно заподозрить до 12 недель, при этом также оценивается возможность наличия другого основного заболевания). С помощью соединений по настоящему изобретению можно лечить пациента с признаками и симптомами COVID-19 вплоть до 4 недель. С помощью соединений по настоящему изобретению можно лечить пациента с признаками и симптомами COVID-19 в течение периода от 4 до 12 недель. С помощью соединений по настоящему изобретению можно лечить пациента с признаками и симптомами COVID-19 в течение более 12 недель.

Лечение может заключаться в профилактике, купировании или лечении персистирующего COVID (также известного как долгий COVID или пост-COVID-синдром). Соединения по настоящему изобретению могут свести к минимуму вероятность того, что пациент будет страдать от стойких симптомов COVID. Соединения по настоящему изобретению могут альтернативно уменьшать тяжесть таких симптомов, предпочтительно могут минимизировать симптомы инфекции CoV.

Пост-COVID-синдром можно рассматривать как признаки и симптомы, развивающиеся во время или после инфекции, характерной для COVID-19, которые продолжают более 12 недель и не объясняются альтернативным диагнозом. Состояние обычно проявляется кластерами симптомов, часто перекрывающихся, которые могут меняться со временем и могут влиять на любую систему в организме. Многие люди с пост-COVID-синдромом также могут испытывать генерализованную боль, усталость, постоянную высокую температуру и психические проблемы. Симптомы включают (но не ограничиваются ими) симптомы, возникающие со стороны сердечно-сосудистой, респираторной, пищеварительной, нервной, костно-мышечной, метаболической, почечной, дерматологической, отоларингологической, кроветворной и вегетативной систем, в дополнение к психическим проблемам, генерализованной боли, утомляемости и персистирующей лихорадке.

Лечение может снижать инфекционность пациентов с CoV. Настоящее изобретение обеспечивает быстрое и значительное снижение вирусной нагрузки.

Снижение вирусной нагрузки может снизить инфекционность пациентов. Это особенно полезно для пациентов, которые бессимптомны или еще малосимптомны, но имеют высокую вирусную нагрузку (например ТС менее 25). Такие пациенты могут являться суперконтагаторами или суперраспространителями. Введение соединений по настоящему изобретению при обнаружении инфекции может снижать вирусную нагрузку и, следовательно, снижать инфекционность пациента.

Лечение может привести к снижению вирусной нагрузки. Это может быть выражено в виде значения порогового цикла репликации (Ct), превышающего 30 (Ct более 30), на 6-е сутки после введения. Лечение может снижать вирусную нагрузку по сравнению с исходным уровнем. Это может быть выражено в виде снижения процента пациентов, нуждающихся в госпитализации после введения. Это может быть выражено в виде снижения процента пациентов, которым требуется инвазивная искусственная вентиляция легких и/или госпитализация в отделение интенсивной терапии после введения. Это может быть выражено в виде уменьшения числа пациентов, у которых развиваются последствия, связанные с персистирующим заболеванием. Это может быть выражено в виде увеличения процента пациентов с нормализацией аналитических показателей, выбранных в качестве критериев неблагоприятного прогноза (включая, например лимфопению, ЛДГ (лактатдегидрогеназа), D-димер или ПЦР). Это может быть выражено в виде увеличения процента пациентов с нормализацией клинических критериев (исчезновение симптомов), включая, например: головную боль, лихорадку, кашель, утомляемость, одышку (затруднение дыхания), артромиалгию или диарею.

Флебовирусы

Флебовирусы представляют собой негативные или амбисенсные одноцепочечные оболочечные РНК-вирусы из семейства *Bunyavirus* с геномами в диапазоне приблизительно 11-12 тысяч пар оснований. Флебовирусы можно условно разделить на две группы: группу вирусов флеботомной лихорадки (SFV) и группу Укуниемиподобных вирусов (ULV). SFV передаются двукрылыми, в том числе флеботоминами и комарами, и являются эндемичными в Средиземноморье и других регионах. Симптомы инфекции SFV включают лихорадку, головную боль, боль в мышцах и суставах, утомляемость и боль в животе. Обычно пациенты выздоравливают в течение 7-14 суток. В некоторых случаях инфекция ЦНС может привести к энцефалиту и менингиту. Группа ULV передается клещами, но они непатогенны для человека.

Наиболее изученным флебовирусом является вирус лихорадки долины Рифт (RVF), который преимущественно поражает домашних животных, но также может вызывать умеренную или тяжелую инфекцию у людей. Вспышки RVF среди людей произошли в странах Африки к югу от Сахары и в Аравии через инфицированных животных или комаров. Симптомы обычно легкие, напоминают грипп и могут включать двухфазную лихорадку. У небольшой части пациентов развиваются тяжелые осложнения, такие как геморрагическая лихорадка, энцефалит или ретинит. Неврологическое заболевание представляет собой отсроченное, часто фатальное осложнение, которое может возникнуть через 5-30 суток после первоначального заболевания. Во время вспышки в Саудовской Аравии в 2000 году уровень смертности пациентов с осложнениями со стороны ЦНС составила 50%.

Взаимодействие вирусных белков с иммунным ответом хозяина может играть роль в патогенности и может объяснить, почему клинические проявления RVF различаются у разных людей. Хемокины, провоспалительные цитокины и противовоспалительные цитокины были значительно повышены (IL-8, CXCL9, MCP-1, IP-10, IL-10) или снижены (RANTES) в летальных случаях во время вспышки в Южной Африке 2010/2011 годов. У трех пациентов из Уганды с тяжелой геморрагической инфекцией уровни IL-8, IL-10, IP-10, MCP-2, MCP-3, фракталкина и GRO- α были повышены, при этом уровни MCP-2 и IP-10 коррелировали с вирусной нагрузкой. Повышенные уровни провоспалительных маркеров у трех пациентов из Уганды нормализовались по мере выздоровления пациентов. Кроме того, генетические полиморфизмы путей врожденного иммунитета, включая IL-6, могут быть связаны с различной степенью тяжести симптомов RVFV. Воспалительный ответ хозяина может повлиять на исход инфекции RVFV у людей, а неконтролируемый воспалительный ответ может привести к летальному исходу.

Ареновирусы

Ареновирусы (AV) представляют собой семейство оболочечных плеоморфных одноцепочечных РНК-вирусов с приблизительным размером генома 11 тысяч пар оснований, охватывающих малый и большой сегменты, причем каждый сегмент кодирует два белка амбисенсным образом. Передача человеку происходит при контакте с грызунами. Некоторые ареновирусы могут вызывать у людей заболевания от легкой до тяжелой степени, включая геморрагическую болезнь. После длительного инкубационного периода продолжительностью 6-21 суток инфекция AV обычно

начинается с лихорадки, общей слабости и недомогания, за которыми следуют головная боль, боль в горле, тошнота, рвота, диарея и боль в животе. В более тяжелых случаях симптомы могут включать кровотечение, шок, судороги, кому и даже смерть.

AV можно разделить на две серогруппы: «Старый Свет» и «Новый Свет». Вирусы «Старого Света» включают лихорадку Ласса и вирус лимфоцитарного хориоменингита. Лихорадка Ласса эндемична в регионах Западной Африки, вызывая приблизительно 5000 смертей в год. Лихорадка Ласса вызывает системное заболевание, но большинство инфекций протекает бессимптомно. Тяжелое заболевание, вызванное вирусной геморрагической лихорадкой, встречается у 20% индивидуумов. Общая летальность составляет около 1%. Для госпитализированных пациентов уровень смертности составляет 15-25%. Летальные случаи у людей характеризуются некрозом печени, селезенки и надпочечников.

Вирусы «Нового Света» включают вирус Пичинде и возбудителей аргентинской, боливийской и венесуэльской геморрагических лихорадок. Вирус Пичинде непатогенен для человека. Южноамериканская геморрагическая лихорадка имеет продромальную фазу продолжительностью 6-14 суток. Через 8-12 суток приблизительно у 20-30% пациентов развивается неврологическая и геморрагическая фаза. Симптомы включают спутанность сознания, судороги, кому и кровотечение из отверстий тела. Показатель летальности в эндемичных регионах может составлять 10-30%.

Первоначально аренавирусы нацелены на макрофаги и дендритные клетки человека, которые продуцируют высокие уровни интерферонов и цитокинов. Инфицирование этих антигенпрезентирующих клеток, вероятно, ответственно за распространение вируса, развитие системных инфекций и обеспечение значительного количества вирусного продукта и высвобождения. Инфицирование вирусом Ласса подавляет ответ интерферона I типа, который имеет решающее значение для борьбы с инфекцией, что приводит к неконтролируемому продуцированию вируса. Напротив, инфицирование аренавирусами «Нового Света» связано с высокими уровнями интерферонов и цитокинов в тяжелых и смертельных случаях. Действительно, у пациентов, инфицированных вирусом Хунин, возбудителем аргентинской геморрагической лихорадки, может развиваться цитокиновый шторм и могут быть повышены уровни TNF- α , IFN- α , IL-6 и IL-10. У пациентов с тяжелым течением болезни и с летальным исходом постоянно обнаруживаются повышенные уровни TNF- α и IFN- α .

Герпесвирусы

Вирусы герпеса (HSV) представляют собой большие оболочечные двухцепочечные ДНК-вирусы со сложными геномами. Геномы HSV имеют размер от 125 до 240 тысяч пар оснований и кодируют десятки вирусных генов. Передача HSV происходит через кожный или пероральный контакт между инфицированными людьми, при этом основным путем передачи является половой путь. Симптомы герпеса включают болезненные волдыри или язвы в месте заражения, но большинство инфекций протекают бессимптомно. Ввиду этого, HSV очень распространены среди людей и животных, по оценкам, 90% населения мира инфицировано одним или обоими типами вируса: простого герпеса типа 1 (HSV-1) и простого герпеса типа 2 (HSV-2). HSV-1 связан с орофациальными инфекциями, тогда как HSV-2 может вызывать генитальные инфекции. Младенцы также могут быть инфицированы HSV-2 во время родов, что вызывает тяжелое заболевание центральной нервной системы или диссеминированную инфекцию.

Инфицирование HSV неизлечимо из-за их способности поддерживать латентную инфекцию в клетках хозяина. После попадания в очаг первичной инфекции HSV могут поддерживать латентность в нейрональных клетках. Например, HSV-1 может поддерживать латентность в ганглиях тройничного нерва, тогда как HSV-2 может поддерживать латентность в крестцовых ганглиях. В латентном периоде вирусный геном может интегрироваться в ДНК клетки-хозяина или оставаться во внехромосомном состоянии. Экспрессируются транскрипты РНК, ассоциированные с латентностью, которые регулируют геном клетки-хозяина и подавляют механизмы гибели клетки-хозяина, сохраняя вирусную инфекцию клеток хозяина и допуская последующие рецидивы нелатентных периодов. Нелатентные периоды обычно симптоматичны и позволяют вирусу инфицировать нового хозяина.

В некоторых случаях инфекция HSV может привести к энцефалиту. HSV-энцефалит начинается с гриппоподобных симптомов и прогрессирует до неврологического ухудшения, которое может привести к летальному исходу, если его не лечить. Кроме того, у новорожденных с тяжелой диссеминированной инфекцией системный воспалительный ответ на вирусную инфекцию HSV может приводить к повреждению и дисфункции органов, что может привести к смерти.

Ортомиксовирусы

Семейство *Orthomyxoviridae* представляет собой семейство РНК-вирусов с отрицательным смыслом и содержит важные патогены как человека, так и животных. В

семейство входят семь родов, включая вирус гриппа А, вирус гриппа В, вирус гриппа С, тогатовирус, каранджавирус и изавирус.

1. Вирус гриппа

Существует четыре класса вирусов гриппа: А, В, С и D, причем вирусы гриппа А и В, в частности, вызывают зимние эпидемии гриппа, являющиеся причиной приблизительно от 300 до 650 тысяч смертей в год. Вирусы гриппа А имеют особое клиническое значение, поскольку они были причиной ряда пандемий гриппа, когда многие страны пострадали от крупных вспышек. Вирусы гриппа А представляют собой одноцепочечные сегментированные РНК-вирусы с отрицательным смыслом, которые делятся на подтипы на основе двух белков на поверхности вируса: гемагглютинина (H) и нейраминидазы (N). Существует 18 различных подтипов гемагглютинина и 11 различных подтипов нейраминидазы (от H1 до H18 и от N1 до N11, соответственно), поэтому существует множество подтипов вируса гриппа, которые могут циркулировать в популяции в любой момент времени, вызывая заболевание, известное как грипп.

Грипп характеризуется заболеванием от легкой до тяжелой степени, симптомы которого включают высокую температуру, насморк, боль в горле, боль в мышцах и суставах, головную боль, кашель и усталость, хотя у детей, инфицированных вирусом, также могут возникать рвота и диарея. Эти симптомы обычно появляются через одни-четыре суток после заражения и, как правило, проходят сами по себе, однако в некоторых случаях, особенно у людей с более слабой иммунной системой, могут возникать такие осложнения, как пневмония и сепсис.

Тяжелая инфекция гриппа связана со значительными патологическими изменениями в легочных тканях, связанными с повышенными уровнями воспалительных цитокинов и хемокинов. Этот чрезмерный иммунный ответ, известный как цитокиновый шторм, связан с высокими уровнями провоспалительных цитокинов и обширным повреждением тканей. Фактически, термин «цитокиновый шторм» впервые был использован при описании иммунного ответа на гриппозную энцефалопатию. Считается, что инфицирование гриппом эпителиальных клеток в дыхательных путях приводит к волне выработки воспалительных цитокинов из этих клеток, приводя в действие различные гены, регулируемые интерфероном, которые затем вызывают дальнейшую выработку цитокинов за счет активации клеток врожденной иммунной системы, таких как макрофаги, нейтрофилы и дендритные клетки, которые в тяжелых случаях могут вызывать повреждение тканей и хроническое воспаление. Именно эта

положительная обратная связь воспаления может привести к осложнениям, связанным с гриппозной инфекцией, и в конечном итоге может привести к смерти наиболее тяжело пораженных пациентов.

В соединениях по настоящему изобретению группы могут быть выбраны в соответствии со следующими рекомендациями:

Алкильные группы могут быть разветвленными или неразветвленными и предпочтительно имеют от 1 до приблизительно 12 атомов углерода. Еще один предпочтительный класс алкильных групп имеет от 1 до приблизительно 6 атомов углерода. Еще более предпочтительными являются алкильные группы, имеющие 1, 2, 3 или 4 атома углерода. Метил, этил, *n*-пропил, изопропил и бутил, включая *n*-бутил, *трет*-бутил, *втор*-бутил и изобутил, являются особенно предпочтительными алкильными группами в соединениях по настоящему изобретению. Используемый здесь термин алкил, если не оговорено особо, относится как к циклическим, так и к нециклическим группам, однако циклические группы будут содержать по меньшей мере три члена углеродного кольца.

Предпочтительные алкенильные и алкинильные группы в соединениях по настоящему изобретению могут быть разветвленными или неразветвленными, имеют одну или более чем одну ненасыщенную связь и от 2 до приблизительно 12 атомов углерода. Еще один предпочтительный класс алкенильных и алкинильных групп имеет от 2 до приблизительно 6 атомов углерода. Еще более предпочтительными являются алкенильные и алкинильные группы, имеющие 2, 3 или 4 атома углерода. Используемые здесь термины алкенил и алкинил, если не оговорено особо, относятся как к циклическим, так и к нециклическим группам, однако циклические группы будут содержать по меньшей мере три члена углеродного кольца.

Подходящие арильные группы в соединениях по настоящему изобретению включают соединения с одним и несколькими кольцами, включая соединения с несколькими кольцами, которые содержат отдельные и/или конденсированные арильные группы. Типичные арильные группы содержат от 1 до 3 отдельных или конденсированных колец и от 6 до приблизительно 18 атомов углерода в кольце. Предпочтительно арильные группы содержат от 6 до приблизительно 10 атомов углерода в кольце. Особо предпочтительные арильные группы включают замещенный или незамещенный фенил, замещенный или незамещенный нафтил, замещенный или

незамещенный бифенил, замещенный или незамещенный фенантрин и замещенный или незамещенный антрин.

Подходящие гетероциклические группы включают гетероароматические и гетероалициклические группы, содержащие от 1 до 3 отдельных или конденсированных колец и от 5 до приблизительно 18 атомов в кольце. Предпочтительно гетероароматические и гетероалициклические группы содержат от 5 до приблизительно 10 атомов в кольце, наиболее предпочтительно 5, 6 или 7 атомов в кольце. Подходящие гетероароматические группы в соединениях по настоящему изобретению содержат один, два или три гетероатома, выбранные из атомов N, O или S, и включают, например, кумаринил, включая 8-кумаринил, хинолил, включая 8-хинолил, изохинолил, пиридил, пиазинил, пиазолил, включая пиазол-3-ил, пиазол-4-ил и пиазол-5-ил, пиаимидинил, фуранил, включая фуран-2-ил, фуран-3-ил, фуран-4-ил и фуран-5-ил, пирролил, тиенил, тиазолил, включая тиазол-2-ил, тиазол-4-ил и тиазол-5-ил, изотиазолил, тиадиазолил, включая тиадиазол-4-ил и тиадиазол-5-ил, триазолил, тетразолил, изоксазолил, включая изоксазол-3-ил, изоксазол-4-ил и изоксазол-5-ил, оксазолил, имидазолил, индолил, изоиндолил, индазолил, индолизинил, фталазинил, птеридинил, пуринил, оксадиазолил, тиадиазолил, фуразанил, пиадазинил, триазинил, циннолинил, бензимидазолил, бензофуранил, бензофуразанил, бензотиофенил, включая бензо[b]тиофен-2-ил и бензо[b]тиофен-3-ил, бензотиазолил, бензоксазолил, имидазо[1,2-а]пиадинил, включая имидазо[1,2-а]пиадин-2-ил, и имидазо[1,2-а]пиадин-3-ил, хиназолинил, хиноксалинил, нафтиридинил и фуропиадил. Подходящие гетероалициклические группы в соединениях по настоящему изобретению содержат один, два или три гетероатома, выбранные из атомов N, O или S, и включают, например, пирролидинил, тетрагидрофуранил, дигидрофуранил, тетрагидротиенил, тетрагидротиопиранил, пиперидинил, включая пиперидин-3-ил, пиперидин-4-ил и пиперидин-5-ил, морфолинил, тиоморфолинил, тиоксанил, пиперазинил, азетидинил, оксетанил, тиетанил, гомопиперидил, оксепанил, тиепанил, оксазепинил, диазепинил, тиазепинил, 1,2,3,6-тетрагидропиадил, 2-пирролинил, 3-пирролинил, дигидропирролил, индолинил, 2H-пиарил, 4H-пиарил, диоксанил, 1,3-диоксоланил, пиазолинил, дитианил, дитиоланил, дигидропиарил, дигидротиенил, дигидрофуранил, пиазолидинил, имидазолинил, имидазолидинил, 3-азабицикло[3.1.0]гексил, 3-азабицикло[4.1.0]гептил, 3H-индолил и хинолизинил.

В вышеупомянутых группах один или более чем один атом водорода может быть замещен одной или более чем одной подходящей группой, такой как OR', =O, SR', SOR', SO₂R', NO₂, NHR', NR'R', =N-R', NHCOR', N(COR')₂, NHSO₂R', NR'C(=NR')NR'R', CN, галоген, COR', COOR', OCOR', OCONHR', OCONR'R', CONHR', CONR'R', замещенный или незамещенный C₁-C₁₂алкил, замещенный или незамещенный C₁-C₁₂алкенил, замещенный или незамещенный C₁-C₁₂алкинил, замещенный или незамещенный арил и замещенная или незамещенная гетероциклическая группа, где каждая из групп R' независимо выбрана из группы, состоящей из водорода, OH, NO₂, NH₂, SH, CN, галогена, COH, COалкила, CO₂H, замещенного или незамещенного C₁-C₁₂алкила, замещенного или незамещенного C₁-C₁₂алкенила, замещенного или незамещенного C₁-C₁₂алкинила, замещенного или незамещенного арила и замещенной или незамещенной гетероциклической группы. Когда такие группы сами замещены, заместители могут быть выбраны из приведенного выше перечня. Когда замещающая группа заканчивается двойной связью (например =O и =NR'), она заменяет 2 атома водорода по одному и тому же атому углерода.

Подходящие галогеновые заместители в соединениях по настоящему изобретению включают F, Cl, Br и I.

Термин «фармацевтически приемлемые соли» относится к любой соли, которая при введении пациенту способна (прямо или опосредованно) образовывать соединение, как описано здесь. Следует понимать, что соли, не являющиеся фармацевтически приемлемыми, также входят в объем изобретения, поскольку они могут быть использованы в получении фармацевтически приемлемых солей. Получение солей может быть осуществлено способами, известными в данной области техники. Например, фармацевтически приемлемые соли соединений, предложенных здесь, синтезируют из исходного соединения, которое содержит основную или кислотную группировку, общепринятыми химическими способами. Как правило, такие соли получают, например, посредством взаимодействия свободных кислотных или основных форм этих соединений со стехиометрическим количеством соответствующего основания или кислоты в воде или в органическом растворителе или в их смеси. Как правило, предпочтительными являются неводные среды, такие как эфир, этилацетат, этанол, изопропанол или ацетонитрил. Примеры солей присоединения кислот включают соли присоединения неорганических кислот, такие как, например, гидрохлорид, гидробромид, гидройодид, сульфат, нитрат, фосфат, и соли присоединения органических

кислот, такие как, например, ацетат, трифторацетат, малеат, фумарат, цитрат, оксалат, сукцинат, тартрат, малат, манделат, метансульфонат и *пара*-толуолсульфонат. Примеры солей присоединения оснований включают неорганические соли, такие как, например, соли натрия, калия, кальция и аммония, и органические соли щелочных металлов, такие как, например, соли этилендиамина, этаноламина, N,N-диалкиленэтанолламина, триэтанолламина и основных аминокислот.

Соединения по изобретению могут находиться в кристаллической форме, либо в виде свободных соединений, либо в виде сольватов (например гидратов, алкоголятов, особенно метанолатов), и предполагается, что обе формы входят в объем настоящего изобретения. Способы сольватации обычно известны в данной области техники. Соединения по изобретению могут представлять собой различные полиморфные формы, и предполагается, что изобретение охватывает все такие формы.

Подразумевается, что любое соединение, упомянутое здесь, представляет собой такое конкретное соединение, а также некоторые варианты или формы. В частности, соединения, упомянутые здесь, могут иметь центры асимметрии и, следовательно, существовать в различных энантиомерных или диастереомерных формах. Таким образом, подразумевается, что любое данное соединение, упомянутое здесь, представляет собой любое из рацемата, одной или более чем одной энантиомерной формы, одной или более чем одной диастереомерной формы и их смесей. Также возможна стереоизомерия или геометрическая изомерия положения двойной связи, поэтому в некоторых случаях молекула может существовать в виде (*E*)-изомера или (*Z*)-изомера (*транс*- и *цис*-изомеры). Если молекула содержит несколько двойных связей, каждая двойная связь будет иметь свою собственную стереоизомерию, которая может быть такой же или отличной от стереоизомерии других двойных связей молекулы. Кроме того, соединения, упомянутые здесь, могут существовать в виде атропоизомеров. Все стереоизомеры, включая энантиомеры, диастереоизомеры, геометрические изомеры и атропоизомеры соединений, упомянутых здесь, и их смеси, рассматриваются в объеме настоящего изобретения.

В соединениях общей формулы I и II особенно предпочтительные R₁, R₅, R₉, R₁₁ и R₁₅ независимо выбраны из водорода и замещенного или незамещенного C₁-C₆алкила. Более предпочтительные R₁, R₅, R₉, R₁₁ и R₁₅ независимо выбраны из водорода, замещенного или незамещенного метила, замещенного или незамещенного этила, замещенного или незамещенного *n*-пропила, замещенного или незамещенного

изопропила и замещенного или незамещенного бутила, включая замещенный или незамещенный *n*-бутил, замещенный или незамещенный *трет*-бутил, замещенный или незамещенный изобутил и замещенный или незамещенный *втор*-бутил. Предпочтительными заместителями указанных групп являются OR', =O, SR', SOR', SO₂R', NO₂, NHR', NR'R', =N-R', NHCOR', N(COR')₂, NHSO₂R', NR'C(=NR')NR'R', CN, галоген, COR', COOR', OCOR', OCONHR', OCONR'R', CONHR', CONR'R', замещенный или незамещенный C₁-C₁₂алкил, замещенный или незамещенный C₂-C₁₂алкенил, замещенный или незамещенный C₂-C₁₂алкинил, замещенный или незамещенный арил и замещенная или незамещенная гетероциклическая группа, где каждая из групп R' независимо выбрана из группы, состоящей из водорода, OH, NO₂, NH₂, SH, CN, галогена, COH, COалкила, CO₂H, замещенного или незамещенного C₁-C₁₂алкила, замещенного или незамещенного C₂-C₁₂алкенила, замещенного или незамещенного C₂-C₁₂алкинила, замещенного или незамещенного арила и замещенной или незамещенной гетероциклической группы. Когда такие группы сами замещены, заместители могут быть выбраны из приведенного выше перечня. Наиболее предпочтительными группами R₁, R₅, R₉, R₁₁ и R₁₅ являются водород, метил, *n*-пропил, изопропил, изобутил, *втор*-бутил, 4-аминобутил, 3-амино-3-оксопропил, бензил, *пара*-метоксибензил, *пара*-гидроксибензил и циклогексилметил. В частности, особенно предпочтительный R₁ выбран из *втор*-бутила и изопропила, причем наиболее предпочтительным является *втор*-бутил. Особенно предпочтительный R₅ выбран из изобутила и 4-аминобутила, причем наиболее предпочтительным является изобутил. Особенно предпочтительным R₁₁ является метил и изобутил. Особенно предпочтительный R₉ выбран из *пара*-метоксибензила, *пара*-гидроксибензила и циклогексилметила, причем наиболее предпочтительным является *пара*-метоксибензил. Особенно предпочтительный R₁₅ выбран из метила, *n*-пропила и бензила, причем наиболее предпочтительными являются метил и бензил.

В соединениях общей формулы III особенно предпочтительные R₁, R₅, R₉ и R₁₅ независимо выбраны из водорода и замещенного или незамещенного C₁-C₆алкила. Более предпочтительные R₁, R₅, R₉ и R₁₅ независимо выбраны из водорода, замещенного или незамещенного метила, замещенного или незамещенного этила, замещенного или незамещенного *n*-пропила, замещенного или незамещенного изопропила и замещенного или незамещенного бутила, включая замещенный или незамещенный *n*-бутил, замещенный или незамещенный *трет*-бутил, замещенный или незамещенный изобутил

и замещенный или незамещенный *втор*-бутил. Предпочтительными заместителями указанных групп являются OR', =O, SR', SOR', SO₂R', NO₂, NHR', NR'R', =N-R', NHCOR', N(COR')₂, NHSO₂R', NR'C(=NR')NR'R', CN, галоген, COR', COOR', OCOR', OCONHR', OCONR'R', CONHR', CONR'R', замещенный или незамещенный C₁-C₁₂алкил, замещенный или незамещенный C₂-C₁₂алкенил, замещенный или незамещенный C₂-C₁₂алкинил, замещенный или незамещенный арил и замещенная или незамещенная гетероциклическая группа, где каждая из групп R' независимо выбрана из группы, состоящей из водорода, OH, NO₂, NH₂, SH, CN, галогена, COH, COалкила, CO₂H, замещенного или незамещенного C₁-C₁₂алкила, замещенного или незамещенного C₂-C₁₂алкенила, замещенного или незамещенного C₂-C₁₂алкинила, замещенного или незамещенного арила и замещенной или незамещенной гетероциклической группы. Когда такие группы сами замещены, заместители могут быть выбраны из приведенного выше перечня. Наиболее предпочтительными группами R₁, R₅, R₉ и R₁₅ являются водород, метил, *n*-пропил, изопропил, изобутил, *втор*-бутил, 4-аминобутил, 3-амино-3-оксипропил, бензил, *пара*-метоксибензил, *пара*-гидроксибензил и циклогексилметил. В частности, особенно предпочтительный R₁ выбран из *втор*-бутила и изопропила, причем наиболее предпочтительным является *втор*-бутил. Особенно предпочтительный R₅ выбран из изобутила и 4-аминобутила, причем наиболее предпочтительным является изобутил. Особенно предпочтительный R₉ выбран из *пара*-метоксибензила, *пара*-гидроксибензила и циклогексилметила, причем наиболее предпочтительным является *пара*-метоксибензил. Особенно предпочтительный R₁₅ выбран из метила, *n*-пропила и бензила, причем наиболее предпочтительными являются метил и бензил.

В соединениях общей формулы I, II и III особенно предпочтительные R₈, R₁₀, R₁₂ и R₁₆ независимо выбраны из водорода и замещенного или незамещенного C₁-C₆алкила. Более предпочтительные R₈, R₁₀, R₁₂ и R₁₆ независимо выбраны из водорода, метила, этила, *n*-пропила, изопропила и бутила, включая *n*-бутил, *трет*-бутил, изобутил и *втор*-бутил, и еще более предпочтительно они независимо выбраны из водорода и метила. В частности, особенно предпочтительными R₈, R₁₀ и R₁₂ является метил, а особенно предпочтительным R₁₆ является водород.

В соединениях общей формулы I и III особенно предпочтительные R₃ и R₄ независимо выбраны из водорода и замещенного или незамещенного C₁-C₆алкила. Более предпочтительные R₃ и R₄ независимо выбраны из водорода, замещенного или незамещенного метила, замещенного или незамещенного этила,

замещенного или незамещенного *n*-пропила, замещенного или незамещенного изопропила и замещенного или незамещенного бутила, включая замещенный или незамещенный *n*-бутил, замещенный или незамещенный *трет*-бутил, замещенный или незамещенный изобутил и замещенный или незамещенный *втор*-бутил. Предпочтительными заместителями указанных групп являются OR', =O, SR', SOR', SO₂R', NO₂, NHR', NR'R', =N-R', NHCOR', N(COR')₂, NHSO₂R', NR'C(=NR')NR'R', CN, галоген, COR', COOR', OCOR', OCONHR', OCONR'R', CONHR', CONR'R', замещенный или незамещенный C₁-C₁₂алкил, замещенный или незамещенный C₂-C₁₂алкенил, замещенный или незамещенный C₂-C₁₂алкинил, замещенный или незамещенный арил и замещенная или незамещенная гетероциклическая группа, где каждая из групп R' независимо выбрана из группы, состоящей из водорода, OH, NO₂, NH₂, SH, CN, галогена, COH, COалкила, CO₂H, замещенного или незамещенного C₁-C₁₂алкила, замещенного или незамещенного C₂-C₁₂алкенила, замещенного или незамещенного арила и замещенной или незамещенной гетероциклической группы. Когда такие группы сами замещены, заместители могут быть выбраны из приведенного выше перечня. Наиболее предпочтительными группами R₃ и R₄ являются водород, метил, изопропил и *втор*-бутил. В частности, особенно предпочтительным R₃ является метил и изопропил, а особенно предпочтительным R₄ является метил или водород.

В одном воплощении соединений общей формулы **I**, **II** и **III** особенно предпочтительные R₆ и R₇ независимо выбраны из водорода и замещенного или незамещенного C₁-C₆алкила. Более предпочтительный R₇ выбран из водорода, замещенного или незамещенного метила, замещенного или незамещенного этила, замещенного или незамещенного *n*-пропила, замещенного или незамещенного изопропила и замещенного или незамещенного бутила, включая замещенный или незамещенный *n*-бутил, замещенный или незамещенный *трет*-бутил, замещенный или незамещенный изобутил и замещенный или незамещенный *втор*-бутил. Предпочтительными заместителями указанных групп являются OR', =O, SR', SOR', SO₂R', NO₂, NHR', NR'R', =N-R', NHCOR', N(COR')₂, NHSO₂R', NR'C(=NR')NR'R', CN, галоген, COR', COOR', OCOR', OCONHR', OCONR'R', CONHR', CONR'R', замещенный или незамещенный C₁-C₁₂алкил, замещенный или незамещенный C₂-C₁₂алкенил, замещенный или незамещенный C₂-C₁₂алкинил, замещенный или незамещенный арил и замещенная или незамещенная гетероциклическая группа, где

каждая из групп R' независимо выбрана из группы, состоящей из водорода, OH, NO₂, NH₂, SH, CN, галогена, COH, COалкила, CO₂H, замещенного или незамещенного C₁-C₁₂алкила, замещенного или незамещенного C₂-C₁₂алкенила, замещенного или незамещенного C₂-C₁₂алкинила, замещенного или незамещенного арила и замещенной или незамещенной гетероциклической группы. Когда такие группы сами замещены, заместители могут быть выбраны из приведенного выше списка. Более предпочтительный R₆ выбран из водорода, метила, этила, *n*-пропила, изопропила и бутила, включая *n*-бутил, *трет*-бутил, изобутил и *втор*-бутил. Наиболее предпочтительный R₆ выбран из водорода и метила, а наиболее предпочтительным R₇ является метил.

В другом воплощении соединений общей формулы I, II и III особенно предпочтительно, когда R₆ и R₇ вместе с соответствующим атомом N и атомом C, к которым они присоединены, образуют замещенную или незамещенную гетероциклическую группу. В этом отношении предпочтительная гетероциклическая группа представляет собой гетероалициклическую группу, содержащую один, два или три гетероатома, выбранных из атомов N, O или S, наиболее предпочтительно один атом N, и имеющую от 5 до приблизительно 10 атомов в кольце, наиболее предпочтительно 5, 6 или 7 атомов в кольце. Наиболее предпочтительной является пирролидиновая группа.

В одном воплощении соединений общей формулы I, II и III особенно предпочтительные R₁₃ и R₁₄ независимо выбраны из водорода и замещенного или незамещенного C₁-C₆алкила. Более предпочтительный R₁₃ выбран из водорода, замещенного или незамещенного метила, замещенного или незамещенного этила, замещенного или незамещенного *n*-пропила, замещенного или незамещенного изопропила и замещенного или незамещенного бутила, включая замещенный или незамещенный *n*-бутил, замещенный или незамещенный *трет*-бутил, замещенный или незамещенный изобутил и замещенный или незамещенный *втор*-бутил. Предпочтительными заместителями указанных групп являются OR', =O, SR', SOR', SO₂R', NO₂, NHR', NR'R', =N-R', NHCOR', N(COR')₂, NHSO₂R', NR'C(=NR')NR'R', CN, галоген, COR', COOR', OCOR', OCONHR', OCONR'R', CONHR', CONR'R', замещенный или незамещенный C₁-C₁₂алкил, замещенный или незамещенный C₂-C₁₂алкенил, замещенный или незамещенный C₂-C₁₂алкинил, замещенный или незамещенный арил и замещенная или незамещенная гетероциклическая группа, где

каждая из групп R' независимо выбрана из группы, состоящей из водорода, OH, NO₂, NH₂, SH, CN, галогена, COH, COалкила, CO₂H, замещенного или незамещенного C₁-C₁₂алкила, замещенного или незамещенного C₂-C₁₂алкенила, замещенного или незамещенного C₂-C₁₂алкинила, замещенного или незамещенного арила и замещенной или незамещенной гетероциклической группы. Когда такие группы сами замещены, заместители могут быть выбраны из приведенного выше перечня. Более предпочтительный R₁₄ выбран из водорода, метила, этила, *n*-пропила, изопропила и бутила, включая *n*-бутил, *трет*-бутил, изобутил и *втор*-бутил. Наиболее предпочтительный R₁₃ выбран из водорода, метила, изопропила, изобутила и 3-амино-3-оксопропила, а наиболее предпочтительным R₁₄ является водород.

В другом воплощении соединений общей формулы I, II и III особенно предпочтительно, когда R₁₃ и R₁₄ вместе с соответствующим атомом N и атомом C, к которым они присоединены, образуют замещенную или незамещенную гетероциклическую группу. В этом отношении предпочтительная гетероциклическая группа представляет собой гетероалициклическую группу, содержащую один, два или три гетероатома, выбранных из атомов N, O или S, наиболее предпочтительно один атом N, и имеющую от 5 до приблизительно 10 атомов в кольце, наиболее предпочтительно 5, 6 или 7 атомов в кольце. Наиболее предпочтительной является пирролидиновая группа.

В соединениях общей формулы I, II и III особенно предпочтительный R₂ выбран из водорода, замещенного или незамещенного C₁-C₆алкила и COR_a, где R_a представляет собой замещенный или незамещенный C₁-C₆алкил, и еще более предпочтительным R_a является метил, этил, *n*-пропил, изопропил и бутил, включая *n*-бутил, *трет*-бутил, *втор*-бутил и изобутил. Более предпочтительно R₂ представляет собой водород.

В соединениях общей формулы I, II и III особенно предпочтительный R₁₇ выбран из водорода, COR_a, COOR_a, CONHR_b, (C=S)NHR_b и SO₂R_c, где каждый R_a, R_b и R_c предпочтительно и независимо выбран из замещенного или незамещенного C₁-C₆алкила, замещенного или незамещенного C₂-C₆алкенила, замещенного или незамещенного C₂-C₆алкинила, замещенного или незамещенного арила и замещенной или незамещенной гетероциклической группы. Предпочтительными заместителями указанных групп являются OR', =O, SR', SOR', SO₂R', NO₂, NHR', NR'R', =N-R', NHCOR', N(COR')₂, NHSO₂R', NR'C(=NR')NR'R', CN, галоген, COR', COOR', OCOR', OCONHR', OCONR'R', CONHR', CONR'R', замещенный или незамещенный

C_1 - C_{12} алкил, замещенный или незамещенный C_2 - C_{12} алкенил, замещенный или незамещенный C_2 - C_{12} алкинил, замещенный или незамещенный арил и замещенная или незамещенная гетероциклическая группа, где каждая из групп R' независимо выбрана из группы, состоящей из водорода, OH, NO_2 , NH_2 , SH, CN, галогена, COH, COалкила, CO_2H , замещенного или незамещенного C_1 - C_{12} алкила, замещенного или незамещенного C_2 - C_{12} алкенила, замещенного или незамещенного C_2 - C_{12} алкинила, замещенного или незамещенного арила и замещенной или незамещенной гетероциклической группы. Когда такие группы сами замещены, заместители могут быть выбраны из приведенного выше перечня. Наиболее предпочтительными группами R_{17} являются водород, $CO R_a$, $COOR_a$ и $SO_2 R_c$, а водород, COОбензил, COбензо[b]тиофен-2-ил, SO_2 (*para*-метилфенил), $COCOCH_3$ и $COOC(CH_3)_3$ являются даже более предпочтительными.

В другом воплощении соединений общей формулы **I**, **II** и **III** особенно предпочтительно, когда Y представляет собой CO. В другом воплощении особенно предпочтительно, когда Y представляет собой $-COCH(CH_3)CO-$.

В другом воплощении соединений общей формулы **I**, **II** и **III** особенно предпочтительно, когда X представляет собой O. В другом воплощении особенно предпочтительно, когда X представляет собой NH.

В другом воплощении соединений общей формулы **I** и **II** особенно предпочтительно, когда n , r и q равны 0. В другом воплощении особенно предпочтительно, когда n равен 1, а r и q равны 0. В другом воплощении особенно предпочтительно, когда n и r равны 1, а q равен 0. В другом воплощении особенно предпочтительно, когда n , r и q равны 1. В другом воплощении особенно предпочтительно, когда n и r равны 1, а q равен 2.

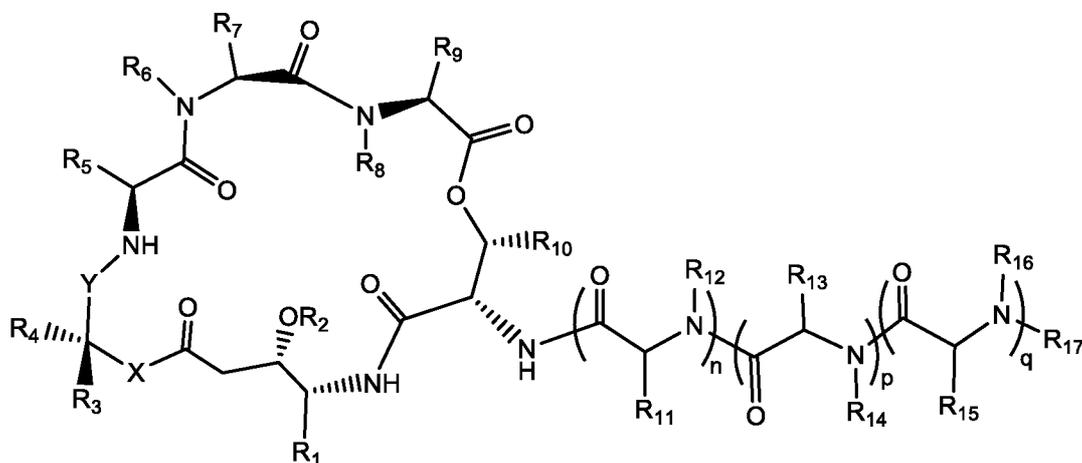
В другом воплощении соединений общей формулы **III** особенно предпочтительно, когда r и q равны 0. В другом воплощении особенно предпочтительно, когда r равен 1, а q равен 0. В другом воплощении особенно предпочтительно, когда r и q равны 1. В другом воплощении особенно предпочтительно, когда r равен 1, а q равен 2.

В дополнительных предпочтительных воплощениях комбинируются предпочтения, описанные выше для различных заместителей. Настоящее изобретение также относится к таким комбинациям предпочтительных замещений формулы **I**, **II** и **III**, указанных выше.

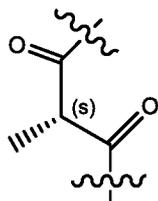
В настоящем описании и определениях, когда в соединениях по изобретению присутствует несколько групп R_a , R_b и R_c , и если это прямо не указано, следует понимать, что каждая из них может независимо отличаться в рамках данного определения, то есть R_a не обязательно одновременно представляет одну и ту же группу в данном соединении по изобретению.

В соединениях общей формулы **I**, **II** и **III**, когда q принимает значение 2, в соединении присутствуют две группы R_{15} и две группы R_{16} . Таким образом, разъясняется, что каждая группа R_{15} и каждая группа R_{16} в данном соединении могут быть независимо выбраны из различных вариантов, описанных выше для таких групп.

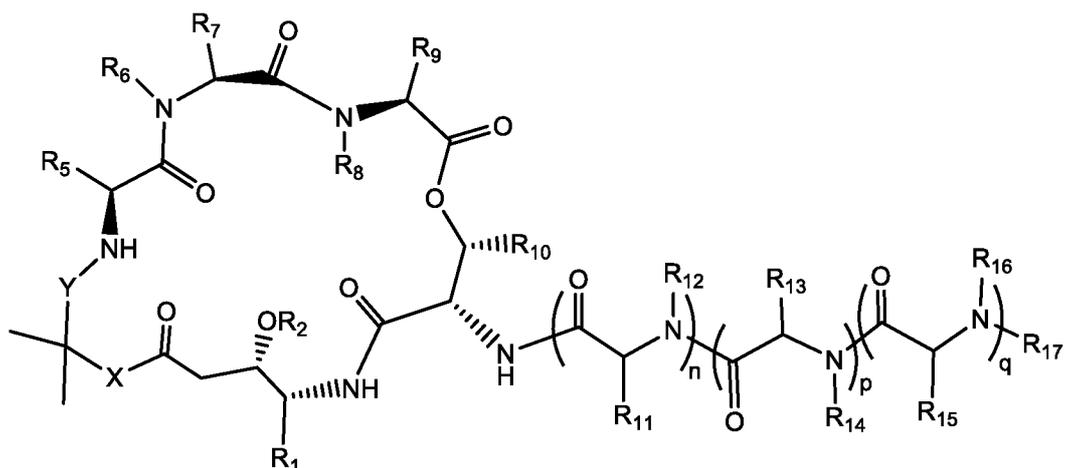
Особенно предпочтительная стереохимическая формула для соединений общей формулы **I** представляет собой



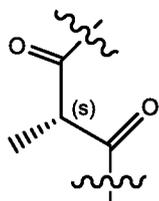
где X , Y , n , p , q и R_1 - R_{17} являются такими, как определено выше, и когда Y представляет собой $-\text{COCH}(\text{CH}_3)\text{CO}-$, он имеет следующую стереохимическую формулу:



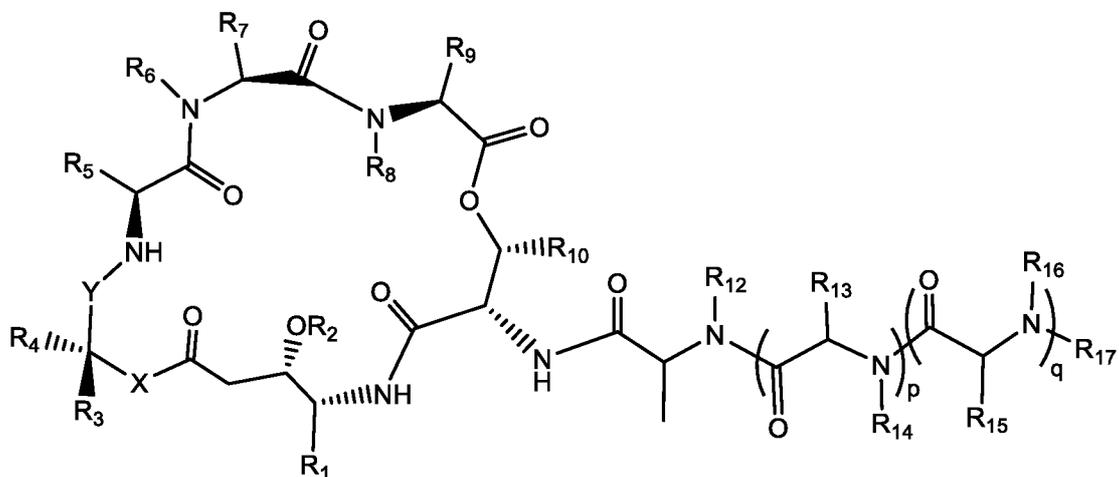
Особенно предпочтительная стереохимическая формула для соединений общей формулы **II** представляет собой



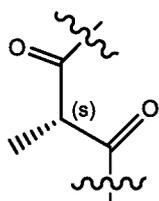
где X, Y, n, p, q, R₁, R₂ и R₅-R₁₇ являются такими, как определено выше, и когда Y представляет собой -COCH(CH₃)CO-, он имеет следующую стереохимическую формулу:



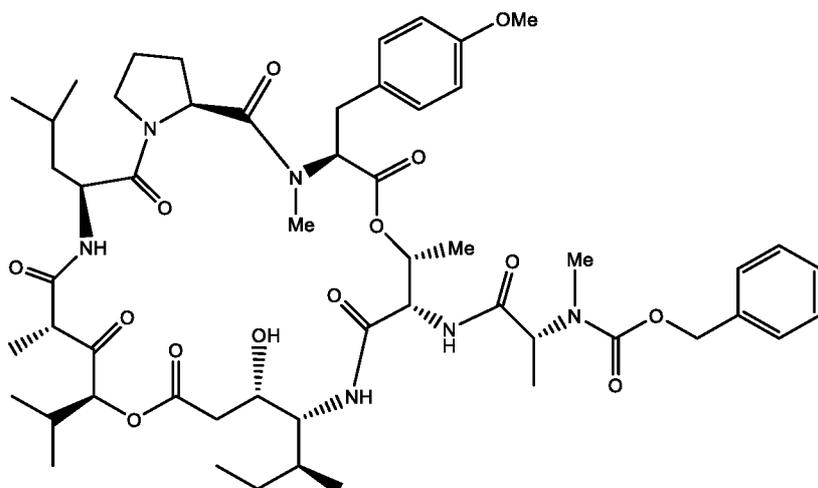
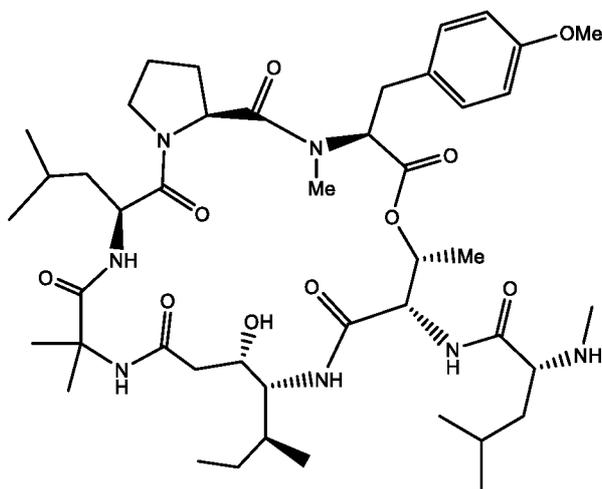
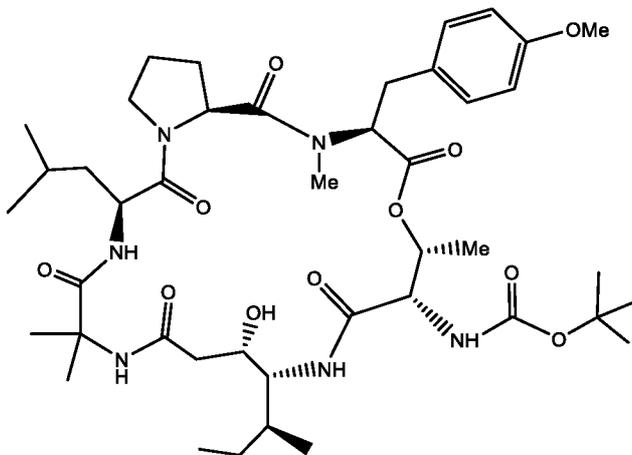
Особенно предпочтительная стереохимическая формула для соединений общей формулы III представляет собой

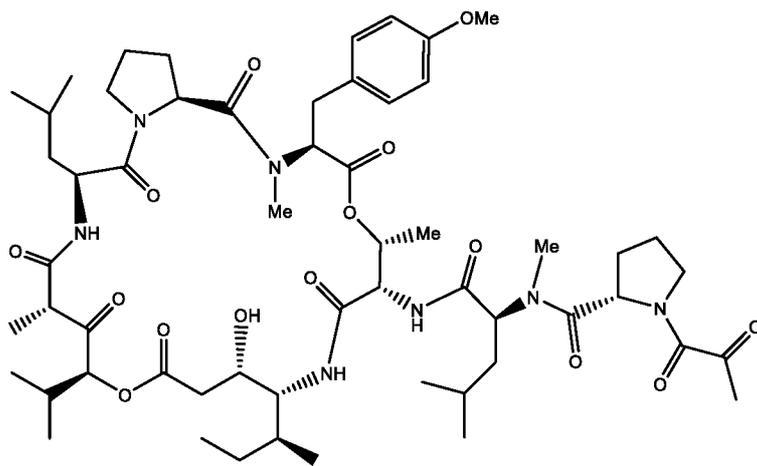
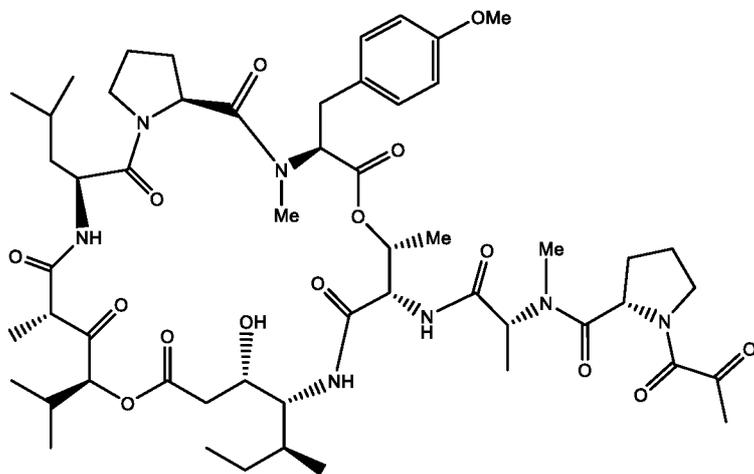
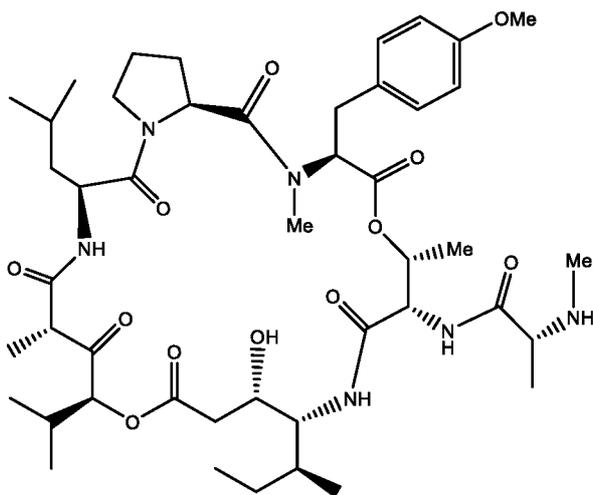


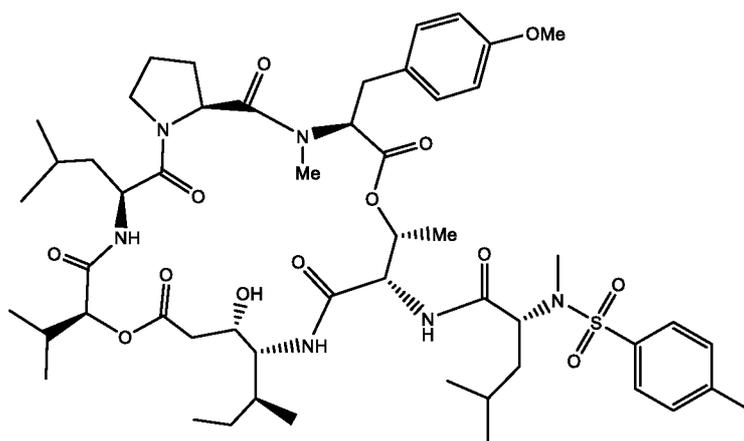
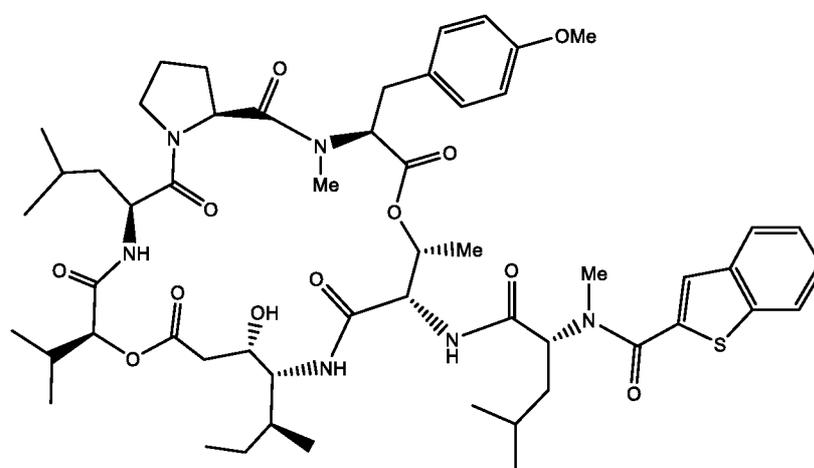
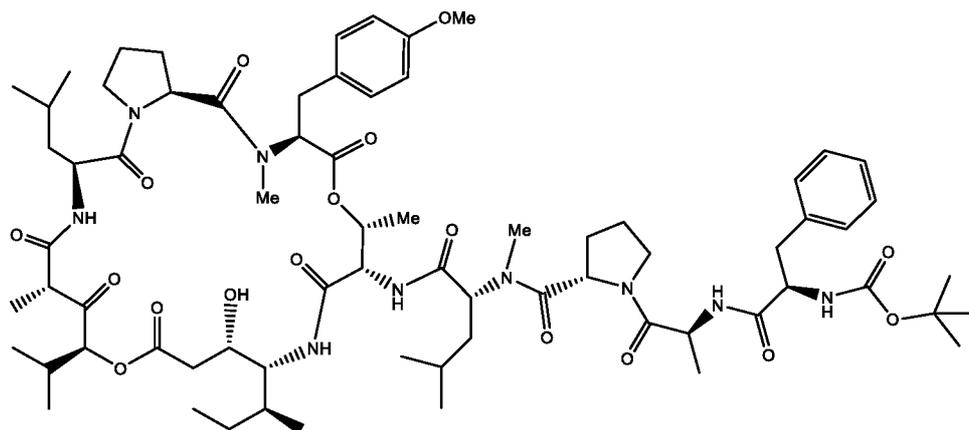
где X, Y, p, q, R₁-R₁₀ и R₁₂-R₁₇ являются такими, как определено выше, и когда Y представляет собой -COCH(CH₃)CO-, он имеет следующую стереохимическую формулу:



Особенно предпочтительными соединениями по изобретению являются следующие:





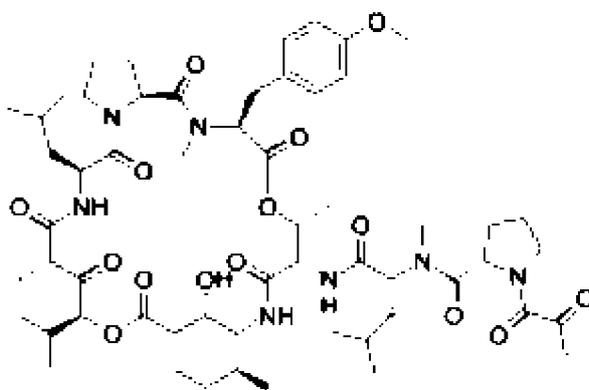


или их фармацевтически приемлемые соли или стереоизомеры.

Соединения общей формулы I, II и III могут быть получены в соответствии с любым из способов синтеза, раскрытых в Vera et al. Med. Res. Rev. 2002, 22(2), 102-145, WO 2011/020913 (см., в частности, Примеры 1-5), WO 02/02596, WO 01/76616 и WO 2004/084812, которые включены здесь посредством ссылки.

Предпочтительным соединением является PLD или его фармацевтически приемлемые соли или стереоизомеры. Наиболее предпочтительным является PLD.

Химическим названием плитидепсина является (-)-(3S,6R,7S,10R,11S,15S,17S,20S,25aS)-11-гидрокси-3-(4-метоксибензил)-2,6,17-триметил-15-(1-метилэтил)-7-[[[(2R)-4-метил-2-[метил[[[(2S)-1-(2-оксопропаноил)-пирролидин-2-ил]карбонил]амино]пентаноил]амино]-10-[(1S)-1-метилпропил]-20-(2-метилпропил)-тетрадекагидро-15H-пирроло[2,1-f]-[1,15,4,7,10,20]диоксатетразациклотрикозин-1,4,8,13,16,18,21(17H)-гептон, соответствующий молекулярной формуле $C_{57}H_{87}N_7O_{15}$. Он имеет относительную молекулярную массу 1110,34 г/моль и следующую структуру:



Плитидепсин представляет собой циклический депсипептид, первоначально выделенный из средиземноморского морского оболочника (*Aplidium albicans*), и в настоящее время полностью изготавливается посредством химического синтеза. Он лицензирован и продается в Австралии под торговым наименованием плитидепсин для лечения множественной миеломы.

Было показано, что в эукариотических клетках плитидепсин нацелен на эукариотический фактор элонгации (eEF1A), который играет ключевую роль в модулировании взаимодействия с другими белками, некоторые из которых, как полагают, необходимы для репликации вируса. Примечательно, что одним из вышеупомянутых белков является белок коронавируса N, который в избытке продуцируется внутри инфицированных клеток и, как известно, взаимодействует с фактором элонгации EF1A. Как сказано выше, взаимодействие между плитидепсином и EF1A, таким образом, может снижать эффективность синтеза вирусного капсида *de novo* и, следовательно, приводить к снижению вирусной нагрузки.

Согласно настоящему изобретению предложено применение соединения по настоящему изобретению в лечении воспаления. В частности, согласно изобретению

предложено применение соединения по настоящему изобретению в лечении воспаления и, в частности, воспаления, связанного или с активацией Toll-подобных рецепторов, и/или воспаления в результате инфицирования патогенами.

В одном аспекте изобретения предложено соединение по настоящему изобретению для применения в лечении воспаления. В другом аспекте изобретения предложено применение соединения по настоящему изобретению в изготовлении лекарственного средства для лечения воспаления. В другом аспекте изобретения предложен способ лечения воспаления, включающий введение нуждающемуся в этом индивидууму терапевтически эффективного количества соединения по настоящему изобретению.

В одном воплощении воспаление характеризуется избыточной или повышенной продукцией или секрецией провоспалительных цитокинов, и предпочтительно по меньшей мере одного из IL-12, IL-10, IL-1, IL-6, IL-8, CCL-2 и TNF- α , и более предпочтительно по меньшей мере одного из IL-1, IL-6, IL-8 и TNF- α . В другом воплощении воспаление представляет собой гипервоспаление. Гипервоспаление характеризуется избыточной продукцией или секрецией цитокинов (также известной как цитокиновый шторм). В одном воплощении гипервоспаление определяется высокими уровнями (выше нормальных уровней) по меньшей мере одного из следующих цитокинов: интерлейкина (IL)-1, IL-2, IL-6, GM-CSF, IFN- γ и TNF, а также хемокинов, хемокинового лиганда с мотивом C-C (CCL)-2, CCL-3 и CCL-5. В другом воплощении воспаление представляет собой хроническое воспаление.

В конкретных воплощениях вирус представляет собой SARS-CoV-2 и связанное с ним заболевание COVID-19. Смертность, связанная с заболеванием COVID-19, по-видимому, связана с (а) тяжелой дыхательной недостаточностью, вторичной по отношению к респираторному дистрессу, и (б) воспалительным статусом, вызванным цитокиновым штормом. Таким образом, доля пациентов с тяжелым заболеванием, требующих госпитализации с высокопоточной оксигенотерапией или без нее, и пациентов, нуждающихся в искусственной вентиляции легких, оценивалась примерно в 15% и 5%, соответственно, в исходной серии из Китая. Однако в Европе цифры, сообщаемые органами здравоохранения, более высокие, достигающие 30% серьезных случаев, требующих госпитализации (в Мадриде) без необходимости искусственной вентиляции, и около 10% пациентов, нуждающихся в искусственной вентиляции. Точно так же продолжительность потребности в искусственной вентиляции легких в китайской

серии исследований намного короче чем, согласно сообщениям, в таких городах, как Мадрид, поэтому обычный поток пациентов в отделения интенсивной терапии изменяется из-за длительного пребывания пациентов. Это ложится огромным бременем на больничные службы, что вынуждает принимать чрезвычайные, беспрецедентные меры. Считается, что размеры первоначально описанных осложнений можно предотвратить или уменьшить благодаря использованию настоящего изобретения у пациентов с ранней стадией пневмонии, вызванной COVID-19, поскольку после возникновения цитокинового шторма и респираторного дистресс-синдрома, как правило, противовирусному препарату становится труднее оказывать благоприятное терапевтическое действие. Однако в воплощениях соединения по настоящему изобретению также полезны на более поздних стадиях вирусной инфекции, например, у пациентов, у которых имел место цитокиновый шторм и респираторный дистресс.

Как упоминалось выше, в эукариотических клетках эксперименты FLIM-FRET показали, что плитидепсин локализуется достаточно близко к eEF1A с подтверждением образования комплексов лекарство-белок. В отдельной серии экспериментов, проведенных с 14C-плитидепсином и очищенным eEF1A из мышцы кролика, показано, что плитидепсин связывает eEF1A с высоким сродством и низкой скоростью диссоциации.

Активность плитидепсина в отношении SARS-CoV-2 *in vitro*

Здесь было проведено и описано несколько экспериментов *in vitro*, направленных на определение влияния плитидепсина на SARS-CoV-2. Два исследования, в каждом из которых использовали клетки Vero E6, инфицированные SARS-CoV-2, и прямое количественное определение нуклеокапсидного белка (N) SARS-CoV-2, который очевидно участвует в механизме плитидепсин-индуцированной противовирусной активности, показали, что плитидепсин является мощным ингибитором роста SARS-CoV-2 *in vitro* с IC₅₀ от 0,7 до 3,0 нМ. В другом исследовании полученные из стволовых клеток человека пневмоцитоподобные клетки подвергали профилактическому воздействию 10 нМ плитидепсина в течение 1 часа, а затем инфицировали SARS-CoV-2 (4×10⁴ бляшкообразующих единиц). После 48-часового инкубационного периода определяли как противовирусное, так и цитотоксическое действие плитидепсина. Результаты показали, что плитидепсин полностью устраняет репликацию SARS-CoV-2 без наблюдаемой цитотоксичности в отношении пневмоцитоподобных клеток.

Влияние плитидепсина на SARS-CoV-2 *in vivo*

Плтидипсин продемонстрировал мощное противовирусное действие *in vivo* при использовании описанной ранее мышинной модели с аденовирус-опосредованным hACE2 инфицирования SARS-CoV-2. Плтидипсин также продемонстрировал мощное противовирусное действие *in vivo* с использованием описанной ранее модели трансгенных мышей, экспрессирующих hACE2, управляемых промотором гена цитокератина-18 (K18-hACE2), инфицированных SARS-CoV-2.

Влияние плтидипсина на воспалительный ответ хозяина

Подобно SARS-CoV, инфекция SARS-CoV-2 также вызывает гиперсекрецию нескольких цитокинов с повышением уровня в плазме по мере прогрессирования заболевания, что предполагает возможную связь между высвобождением цитокинов и тяжестью заболевания.

Врожденный иммунитет является первой линией защиты от вторжения патогенов. В случае SARS-CoV-2 проникновение вируса в эпителиальные клетки хозяина опосредуется взаимодействием между спайковым белком (S) вирусной оболочки и рецептором ACE2 клеточной поверхности. Вирусные РНК, как ассоциированные с патогенами молекулярные паттерны, затем обнаруживаются паттерн-распознающими рецепторами хозяина, которые включают семейство Toll-подобных рецепторов. Toll-подобные рецепторы затем активируют противовирусные и провоспалительные медиаторы, такие как интерлейкин (IL)-6, IL-8 и интерферон (IFN)- γ , посредством активации ядерного фактора транскрипции каппа-B (NF- κ B). Важность NF- κ B в экспрессии провоспалительных генов, особенно в легких, была подчеркнута исследованиями, направленными на изучение инфекции SARS CoV у неклинических видов, а также у пациентов. У мышей, инфицированных SARS CoV, фармакологическое ингибирование NF- κ B приводило к более высокой выживаемости и снижению экспрессии фактора некроза опухоли альфа (TNF α), CCL2 и CXCL2 в легких.

Как показано здесь, плтидипсин индуцирует подавление NF- κ B в опухолевых клетках. Впоследствии были также проведены исследования как *in vitro*, так и *ex vivo* для оценки воздействия плтидипсина на иммунные клетки.

Исследования *in vitro* проводили с использованием клеток ТНР-1, спонтанно иммортализованной моноцитоподобной клеточной линии, полученной из периферической крови ребенка с острым моноцитарным лейкозом, которая широко используется для изучения структуры и функции моноцитов. Как показано на Фиг. 1 и 2, все соединения, имитирующие патоген-ассоциированные молекулярные паттерны,

индуцировали продукцию провоспалительных цитокинов в клетках THP-1, а добавление плитидепсина значительно снижало секрецию провоспалительных цитокинов.

В исследовании *ex vivo* оценивали влияние плитидепсина на экспрессию цитокинов IL-6, IL-10 и TNF α в легких мышей. Как показано на Фиг. 51, кластер дифференцировки клеток (CD)45+ мышей, получавших плацебо, был способен продуцировать IL-6, IL-10 и TNF α при стимуляции LPS-B5. Однако клетки CD45+ мышей, получавших плитидепсин, не показали заметного увеличения IL-6, IL-10 и TNF α по сравнению с нестимулированным контролем. Эти результаты свидетельствуют о том, что воздействие плитидепсина *in vivo* предотвращает повышенную продукцию провоспалительных цитокинов, опосредованную LPS-B5, в клетках CD45+, выделенных из бронхоальвеолярного лаважа.

В одном аспекте изобретения предложено соединение, как определено здесь, для применения в лечении воспаления, связанного с (или вызванного) активацией Toll-подобных рецепторов. В другом аспекте изобретения предложено применение соединения, как определено здесь, в изготовлении лекарственного средства для лечения воспаления, связанного с активацией Toll-подобных рецепторов. В другом аспекте изобретения предложен способ лечения воспаления, связанного с активацией Toll-подобных рецепторов, включающий введение нуждающемуся в этом индивидууму терапевтически эффективного количества соединения, как определено здесь.

Под «воспалением, связанным с активацией Toll-подобных рецепторов» подразумевают воспаление, которое возникает в результате агонизма (то есть стимуляции) одного или более чем одного Toll-подобного рецептора (TLR) и активации сигнального каскада Toll-подобных рецепторов или усиления передачи сигналов посредством по меньшей мере одного TLR (что может быть вызвано повышенной экспрессией по меньшей мере одного TLR). Способы измерения активации передачи сигналов TLR в ответ на известный или возможный агонист TLR должны быть хорошо известны специалисту в данной области техники, но в одном примере уровни трансактивации NF- κ B могут быть использованы в качестве индикатора активации TLR. Как описано здесь, трансактивация NF- κ B может быть измерена при использовании меченой люциферазой трансактивации NF- κ B, как описано в Примерах. В другом примере активация TLR может быть определена путем измерения фосфорилирования любой из IRAK1 (киназа, ассоциированная с рецептором IL), IRAK4 и активации TAK1 (киназа-1, активируемая трансформирующим фактором роста β). В данной области

техники известны другие индикаторы активации TLR (см., например, Kawai & Akira, 2007, где описан путь TLR). В одном воплощении TLR представляет собой TLR-3, TLR4, TLR7 или TLR8.

Toll-подобные рецепторы или TLR могут быть активированы микробными патогенами. В одном воплощении микробный патоген может представлять собой бактерию, вирус, паразит, грибок или другой микроорганизм.

В предпочтительном воплощении Toll-подобный рецептор активируется вирусом. В одном воплощении вирус представляет собой РНК-содержащий вирус.

В одном воплощении вирус представляет собой одноцепочечный (+) РНК-вирус. В другом предпочтительном воплощении вирус выбран из семейства *Flaviviridae*, *Picornaviridae*, *Togaviridae*, *Caliciviridae*, *Retroviridae* и *Coronaviridae*. В альтернативном воплощении вирус представляет собой респираторный вирус.

В одном воплощении, где вирус представляет собой вирус семейства *Flaviviridae*, вирус выбран из вируса гепатита С, вируса желтой лихорадки (YFV), вируса Западного Нила (WNV), вируса денге (DENV), вируса японского энцефалита (JEV), вируса клещевого энцефалита (TBEV), вируса классической чумы свиней и вируса Зика (ZIKV). В другом воплощении, где вирус представляет собой вирус семейства *Picornaviridae*, вирус выбран из вируса ящура, энтеровируса А71, вирусов Коксаки, риновируса и вируса гепатита А. В другом воплощении, где вирус представляет собой вирус семейства *Togaviridae*, вирус выбран из альфавирусов и, в частности, вируса чикунгунья, вируса Синдбис, вируса леса Семлики, вируса восточного энцефалита лошадей/вируса западного энцефалита лошадей/вируса венесуэльского энцефалита лошадей и вируса краснухи. В другом воплощении, где вирус представляет собой вирус семейства *Caliciviridae*, вирус выбран из лаговируса, норовируса, небовируса, рековируса, саповируса, валовируса и везивируса и, в частности, вируса Норфолк.

В одном воплощении вирусная инфекция представляет собой инфекцию CoV. Термин «инфекция CoV» означает любую инфекцию, вызванную вирусом семейства *Coronaviridae* и подсемейства *Orthocoronavirinae*. В одном воплощении инфекция вызвана вирусом рода *Betacoronavirus*, который включает бетакоронавирус 1, коронавирус человека HKU1, мышинный коронавирус, коронавирус летучих мышей *Pipistrellus HKU5*, коронавирус летучих мышей *Rousettus HKU9*, коронавирус, связанный с тяжелым острым респираторным синдромом (SARS-CoV), коронавирус летучих мышей *Tytonycteris HKU4*, коронавирус, связанный с ближневосточным респираторным

синдромом, коронавирус человека OC43 и коронавирус европейского ежа 1 типа (EriCoV). Предпочтительно вирус выбран из HCoV-229E α -типа, HCoV-NL63; HCoV-NKU1 β -типа, SARS-CoV, MERS-CoV и HCoV-OC43; и SARS-CoV-2. Ранее SARS-CoV-2 был назван 2019-nCoV, и здесь такие термины могут быть использованы взаимозаменяемо.

В другом воплощении, где вирус является вирусом семейства *Retroviridae*, вирус представляет собой ВИЧ (вирус иммунодефицита человека).

В другом воплощении вирус представляет собой одноцепочечный РНК-вирус с отрицательным смыслом. В одном воплощении вирус выбран из семейства *Orthomyxoviridae*, *Phlebovirus* и *Arenaviridae*.

В одном воплощении вирус семейства *Orthomyxoviridae* выбран из вируса гриппа А, вируса гриппа В, вируса гриппа С, тогатовируса, кваранджавируса и изавируса. В другом воплощении вирус семейства *Orthomyxoviridae* представляет собой вирус гриппа А, предпочтительно выбранный из H1N1, H1N2 и H3N2. В другом воплощении вирус семейства *Orthomyxoviridae* представляет собой вирус гриппа В, предпочтительно выбранный из линий Ямагата или Виктория.

В одном воплощении, где вирус принадлежит к семейству *Phlebovirus*, вирус представляет собой вирус флеботомной лихорадки или вирус лихорадки долины Рифт. В одном воплощении, где вирус выбран из семейства *Arenaviridae*, вирус представляет собой вирус Пичинде.

В другом воплощении вирус представляет собой вирус дцДНК. В одном воплощении вирус выбран из семейства *Herpesviridae*, предпочтительно вируса простого герпеса 1 или 2.

В другом воплощении вирус является респираторным вирусом. Респираторные вирусы включают риновирусы и энтеровирусы (*Picornaviridae*), ортомиксовирусы, вирусы (гриппа) парагриппа, метапневмовирусы и респираторно-синцитиальные вирусы (*Paramyxoviridae*), коронавирусы (*Coronaviridae*) и несколько аденовирусов. За исключением аденовирусов, все они обладают РНК-геномом.

В другом воплощении соединение по изобретению может быть дополнительно введено в комбинации с противовирусным средством. Противовирусное средство может быть введено одновременно, последовательно или отдельно с введением соединения по изобретению. В этом примере соединение по изобретению может быть использовано в

качестве противовоспалительного средства для лечения воспаления или гипервоспаления, связанных с вирусной инфекцией или являющихся ее следствием.

В другом аспекте изобретения предложено соединение, как определено здесь, для применения в лечении расстройства, выбранного из пневмонии и иммунопатологии, в частности гиперцитокинемии (синдром цитокинового шторма), сепсиса и болезни «трансплантат против хозяина». В другом аспекте изобретения предложено применение соединения, как определено здесь, в изготовлении лекарственного средства для лечения расстройства, выбранного из пневмонии и иммунопатологии, в частности гиперцитокинемии (синдром цитокинового шторма), сепсиса и болезни «трансплантат против хозяина». В другом аспекте изобретения предложен способ лечения расстройства, выбранного из пневмонии и иммунопатологии, в частности гиперцитокинемии (синдром цитокинового шторма), сепсиса и болезни «трансплантат против хозяина», включающий введение нуждающемуся в этом индивидууму терапевтически эффективного количества соединения, как определено здесь. В особенно предпочтительном воплощении расстройство представляет собой иммунопатологию и, в частности, гиперцитокинемию.

В другом аспекте изобретения предложено соединение, как определено здесь, для применения в лечении воспаления, вызванного патогенами. В другом аспекте изобретения предложено применение соединения, как определено здесь, в изготовлении лекарственного средства для лечения воспаления, вызванного патогенами. В другом аспекте изобретения предложен способ лечения воспаления, вызванного патогенами, включающий введение нуждающемуся в этом индивидууму терапевтически эффективного количества соединения, как определено здесь.

В другом аспекте изобретения предложено соединение, как определено здесь, для применения в комбинированном лечении вирусной инфекции и воспаления, связанного с активацией Toll-подобных рецепторов, или воспаления, связанного с вызванной патогенами инфекцией. В другом аспекте изобретения предложено применение соединения, как определено здесь, в изготовлении лекарственного средства для комбинированного лечения вирусной инфекции и воспаления, связанного с активацией Toll-подобных рецепторов, или воспаления, связанного с вызванной патогенами инфекцией. В другом аспекте изобретения предложен способ комбинированного лечения вирусной инфекции и воспаления, связанного с активацией Toll-подобных рецепторов, или воспаления, связанного с вызванной патогенами инфекцией,

включающий введение нуждающемуся в этом индивидууму терапевтически эффективного количества соединения, как определено здесь.

В одном воплощении воспаление может представлять собой гиперцитокинемию.

Под «воспалением, вызванным патогенами» подразумевают любое воспаление или иммунопатологию, вызванную инфицированием патогенами. Соответственно, в одном аспекте изобретения предложены соединения и способы, как описано здесь, для лечения иммунопатологии. Патоген может представлять собой микробный патоген. Более предпочтительно микробный патоген может представлять собой бактерию, вирус, паразит, грибок или другой микроорганизм. В одном воплощении патоген вызывает активацию TLR. В альтернативном воплощении патоген не вызывает активацию TLR. В другом воплощении патоген вызывает активацию макрофагов. Воспаление может представлять собой хроническое воспаление. В предпочтительном воплощении патоген представляет собой вирус.

В предпочтительном воплощении Toll-подобный рецептор активируется вирусом.

В одном воплощении вирус представляет собой одноцепочечный (+) РНК-вирус с положительным смыслом. В другом предпочтительном воплощении вирус выбран из семейства: *Flaviviridae*, *Picornaviridae*, *Togaviridae*, *Caliciviridae*, *Retroviridae* and *Coronaviridae*. В одном воплощении, где вирус представляет собой вирус семейства *Flaviviridae*, вирус выбран из вируса гепатита С, вируса желтой лихорадки (YFV), вируса Западного Нила (WNV), вируса денге (DENV), вируса японского энцефалита (JEV), вируса клещевого энцефалита (TBEV), вируса классической чумы свиней и вируса Зика (ZIKV). В одном воплощении, где вирус представляет собой вирус семейства *Picornaviridae*, вирус выбран из вируса ящура, энтеровируса А71, вирусов Коксаки, риновируса и вируса гепатита А. В другом воплощении, где вирус представляет собой вирус семейства *Togaviridae*, вирус выбран из альфавирусов и, в частности, вируса чикунгунья, вируса Синдбис, вируса леса Семлики, вируса восточного энцефалита лошадей/вируса западного энцефалита лошадей/вируса венесуэльского энцефалита лошадей и вируса краснухи. В другом воплощении, где вирус представляет собой вирус семейства *Caliciviridae*, вирус выбран из лаговируса, норовируса, небовируса, рековируса, саповируса, валовируса и везивируса и, в частности, вируса Норфолк.

В одном воплощении вирусная инфекция представляет собой инфекцию CoV. Термин «инфекция CoV» означает любую инфекцию, вызванную вирусом семейства

Coronaviridae и подсемейства *Orthocoronavirinae*. В одном воплощении инфекция вызвана вирусом рода *Betacoronavirus*, который включает бетакоронавирус 1, коронавирус человека HKU1, мышинный коронавирус, коронавирус летучих мышей *Pipistrellus HKU5*, коронавирус летучих мышей *Rousettus HKU9*, коронавирус, связанный с тяжелым острым респираторным синдромом (SARS-CoV), коронавирус летучих мышей *Tytonycteris HKU4*, коронавирус, связанный с ближневосточным респираторным синдромом, коронавирус человека OC43 и коронавирус европейского ежа 1 типа (EriCoV). Предпочтительно вирус выбран из HCoV-229E α -типа, HCoV-NL63; HCoV-HKU1 β -типа, SARS-CoV, MERS-CoV и HCoV-OC43; и SARS-CoV-2. Ранее SARS-CoV-2 был назван 2019-nCoV, и здесь такие термины могут быть использованы взаимозаменяемо.

В другом воплощении, где вирус является вирусом семейства *Retroviridae*, вирус представляет собой ВИЧ (вирус иммунодефицита человека).

В другом воплощении вирус представляет собой одноцепочечный РНК-вирус с отрицательным смыслом. В одном воплощении вирус выбран из семейства *Orthomyxoviridae*, *Phlebovirus* и *Arenaviridae*.

В одном воплощении вирус семейства *Orthomyxoviridae* выбран из вируса гриппа А, вируса гриппа В, вируса гриппа С, тогатовируса, кваранджавируса и изавируса. В другом воплощении вирус семейства *Orthomyxoviridae* представляет собой вирус гриппа А, предпочтительно выбранный из H1N1, H1N2 и H3N2. В другом воплощении вирус семейства *Orthomyxoviridae* представляет собой вирус гриппа В, предпочтительно выбранный из линий Ямагата или Виктория.

В одном воплощении, где вирус принадлежит к семейству *Phlebovirus*, вирус представляет собой вирус флеботомной лихорадки или вирус лихорадки долины Рифт. В другом воплощении, где вирус выбран из семейства *Arenaviridae*, вирус представляет собой вирус Пичинде.

В другом воплощении вирус представляет собой вирус дцДНК. В одном воплощении вирус выбран из семейства *Herpesviridae*, предпочтительно вируса простого герпеса 1 или 2.

В другом воплощении вирус является респираторным вирусом. Респираторные вирусы включают риновирусы и энтеровирусы (*Picornaviridae*), вирусы парагриппа, метапневмовирусы и респираторно-синцитиальные вирусы (*Paramyxoviridae*),

коронавирусы (*Coronaviridae*) и несколько аденовирусов. За исключением аденовирусов, все они обладают РНК-геномом.

Соответственно, в конкретном воплощении предложено соединение, как определено здесь, для применения в комбинированном лечении инфекции SARS-CoV-2 и гиперцитокинемии. Воспалительный ответ хозяина на инфекцию также может вызывать пневмонию или ОРДС. Соответственно, в другом воплощении предложено соединение, как определено здесь, для применения в комбинированном лечении инфекции SARS-CoV-2 и (ассоциированной) пневмонии (также называемой пневмонией COVID-19) или ассоциированного ОРДС. В другом аспекте изобретения предложено применение соединения, как определено здесь, в изготовлении лекарственного средства для комбинированного лечения инфекции SARS-CoV-2 и гиперцитокинемии. В другом аспекте предложено применение соединения, как определено здесь, в изготовлении лекарственного средства для комбинированного лечения инфекции SARS-CoV-2 и пневмонии, вызванной COVID-19. В другом аспекте изобретения предложено применение соединения, как определено здесь, в изготовлении лекарственного средства для комбинированного лечения инфекции SARS-CoV-2 и ОРДС. В другом аспекте изобретения предложен способ комбинированного лечения инфекции SARS-CoV-2 и гиперцитокинемии, включающий введение нуждающемуся в этом индивидууму терапевтически эффективного количества соединения, как определено здесь. В другом воплощении предложен способ комбинированного лечения инфекции SARS-CoV-2 и пневмонии, вызванной COVID-19, включающий введение нуждающемуся в этом индивидууму терапевтически эффективного количества соединения, как определено здесь. В другом воплощении предложен способ комбинированного лечения инфекции SARS-CoV-2 и ОРДС, включающий введение нуждающемуся в этом индивидууму терапевтически эффективного количества соединения, как определено здесь. Существующие стратегии лечения как вирусной инфекции, так и воспалительного ответа хозяина на инфекцию (то есть гиперцитокинемии) (которая может привести к пневмонии или ОРДС) требуют присутствия нескольких агентов для воздействия на каждое показание (то есть на репликацию и элиминацию вируса) и на воспаление отдельно. Как показано в Примере 12 и на Фиг. 39-42, авторы обнаружили, что PLD может быть использован в качестве единственного агента для лечения как инфекции, так и последующей гиперцитокинемии или гипервоспаления (такие термины могут быть использованы здесь взаимозаменяемо).

Альтернативно, вирусная инфекция представляет собой инфекцию ВИЧ (вирус иммунодефицита человека). Соответственно, в конкретном воплощении предложено применение соединения, как определено здесь, в комбинированном лечении ВИЧ-инфекции и гиперцитокинемии. В другом аспекте изобретения предложено применение соединения, как определено здесь, в изготовлении лекарственного средства для комбинированного лечения ВИЧ-инфекции и гиперцитокинемии. В другом аспекте изобретения предложен способ комбинированного лечения ВИЧ-инфекции и гиперцитокинемии, включающий введение нуждающемуся в этом индивидууму терапевтически эффективного количества соединения, как определено здесь.

Соединения по изобретению могут быть использованы в фармацевтических композициях, обладающих биологической/фармакологической активностью, для лечения вышеупомянутых состояний. Эти фармацевтические композиции содержат соединение по изобретению вместе с фармацевтически приемлемым носителем. Термин «носитель» относится к разбавителю, адъюванту, эксципиенту или наполнителю, с которым вводят активный ингредиент. Подходящие фармацевтические носители описаны в «Remington's Pharmaceutical Sciences» E.W. Martin, 1995. Примеры фармацевтических композиций включают любые твердые (таблетки, пилюли, капсулы, гранулы и так далее) или жидкие (растворы, суспензии, эмульсии и так далее) композиции для перорального, местного или парентерального введения. Фармацевтические композиции, содержащие соединения по изобретению, могут быть доставлены посредством инкапсуляции в липосомы или наносферы, в препаратах с продолжительным высвобождением или с помощью других стандартных средств доставки.

Типичная композиция находится в форме порошка для приготовления раствора для инфузий. Например, композиции, как описано в WO 9942125. Например, лиофилизированный препарат соединения по изобретению, включающий водорастворимое вещество, и, во-вторых, раствор смешанных растворителей для восстановления. Конкретным примером является лиофилизированный препарат PLD и маннита и раствор смешанных растворителей для восстановления, например ПЭГ-35 касторового масла, этанола и воды для инъекций. Каждый флакон, например, может содержать 2 мг PLD. После восстановления каждый мл восстановленного раствора может содержать: 0,5 мг PLD, 158 мг ПЭГ-35 касторового масла и 0,15 мл/мл этанола.

Конкретная дозировка и схема лечения для любого конкретного пациента могут варьировать и будут зависеть от множества факторов, включая активность конкретного используемого соединения, конкретный используемый препарат, способ применения, возраст, массу тела, общее состояние здоровья, пол, режим питания, время введения, скорость выведения, комбинацию лекарственных средств, аллергические реакции и тяжесть конкретного заболевания или состояния, подвергаемого лечению.

В воплощениях изобретения соединения по настоящему изобретению могут быть введены в соответствии с режимом дозирования суточной дозы.

В воплощениях изобретения соединения по настоящему изобретению могут быть введены в соответствии с режимом дозирования один раз в сутки.

В дополнительных воплощениях соединения по настоящему изобретению могут быть введены в соответствии с режимом дозирования суточной дозы в течение 10 суток, 9 суток, 8 суток, 7 суток, 6 суток, 5 суток, 4 суток, 3 суток, 2 суток или 1 суток. Предпочтительный режим составляет 2-5 суток, или 3-5 суток, или 3, 4 или 5 суток, наиболее предпочтительно 3 суток или 5 суток.

Доза может составлять 5 мг в сутки или менее, 4,5 мг в сутки или менее, 4 мг в сутки или менее, 3,5 мг в сутки или менее, 3 мг в сутки или менее, 2,5 мг в сутки или менее или 2 мг в сутки или менее.

Конкретные дозы включают 0,5 мг/сутки, 1 мг/сутки, 1,5 мг/сутки, 2 мг/сутки, 2,5 мг/сутки, 3 мг/сутки, 3,5 мг/сутки, 4 мг/сутки, 4,5 мг/сутки или 5 мг/сутки. Предпочтительные дозы составляют 1 мг/сутки, 1,5 мг/сутки, 2 мг/сутки и 2,5 мг/сутки.

В других воплощениях соединения по настоящему изобретению могут быть введены в общей дозе 1-50 мг, 1-40 мг, 1-30 мг, 1-20 мг, 1-15 мг, 3-15 мг, 3-12 мг, 4-12 мг, 4-10 мг или 4,5-10 мг. Общие дозы могут составлять 4 мг, 4,5 мг, 5 мг, 5,5 мг, 6 мг, 6,5 мг, 7 мг, 7,5 мг, 8 мг, 8,5 мг, 9 мг, 9,5 мг или 10 мг. Предпочтительные общие дозы составляют 4,5 мг, 5 мг, 6 мг, 7,5 мг, 8 мг, 9 мг или 10 мг. Общая доза может быть разделена на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 суток, предпочтительно на 3 суток или 5 суток.

В конкретном воплощении соединения по настоящему изобретению могут быть введены в соответствии с режимом дозирования один раз в сутки в течение 5 суток в дозе 2,5 мг в сутки или менее.

В другом воплощении соединения по настоящему изобретению могут быть введены в соответствии с режимом дозирования один раз в сутки в течение 5 суток в дозе 2 мг в сутки или менее.

В другом воплощении соединения по настоящему изобретению могут быть введены в соответствии с режимом дозирования один раз в сутки в течение 3 суток в дозе 1,5 мг в сутки или менее.

В другом воплощении соединения по настоящему изобретению могут быть введены в соответствии с режимом дозирования один раз в сутки в течение 3 суток в дозе 2 мг в сутки или менее.

В другом воплощении соединения по настоящему изобретению могут быть введены в соответствии с режимом дозирования один раз в сутки в течение 3 суток в дозе 2,5 мг в сутки или менее.

В другом воплощении соединения по настоящему изобретению могут быть введены в соответствии с режимом дозирования один раз в сутки в течение 3 суток в дозе 1,5 мг в сутки.

В другом воплощении соединения по настоящему изобретению могут быть введены в соответствии с режимом дозирования один раз в сутки в течение 3 суток в дозе 2,0 мг в сутки.

В другом воплощении соединения по настоящему изобретению могут быть введены в соответствии с режимом дозирования один раз в сутки в течение 3 суток в дозе 2,5 мг в сутки.

В другом воплощении соединения по настоящему изобретению могут быть введены в соответствии с режимом дозирования один раз в сутки в течение 3 суток в дозе от 1,5 до 2,5 мг в сутки.

Альтернативный режим представляет собой разовую дозу в 1-е сутки. Разовая доза может составлять 1-10 мг, 4-10 мг, 4,5-10 мг; 4 мг, 4,5 мг, 5 мг, 5,5 мг, 6 мг, 6,5 мг, 7 мг, 7,5 мг, 8 мг, 8,5 мг, 9 мг, 9,5 мг или 10 мг; предпочтительно 4,5 мг, 5 мг, 6 мг, 7,5 мг, 8 мг, 9 мг или 10 мг; более предпочтительно 5-9 мг, 6,5-8,5 мг, 7-8 мг или 7,5 мг.

В другом воплощении соединения по настоящему изобретению могут быть введены в соответствии с настоящим изобретением, где соединения по настоящему изобретению вводят с кортикостероидом. Предпочтительно кортикостероид представляет собой дексаметазон.

Кортикостероид можно вводить ежедневно вместе с соединениями по настоящему изобретению. Введение может быть поочередным, одновременным или последовательным. Кортикостероид можно дополнительно вводить в сутки после введения соединений по настоящему изобретению. Например, при 3-суточном режиме

дозирования кортикостероид можно вводить на 1-3 сутки, а затем дополнительно вводить ежедневно в течение 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 или более суток.

В конкретном воплощении кортикостероид можно вводить на 1-3 сутки путем внутривенного введения, а затем на 6-10 сутки путем перорального введения. В другом воплощении доза кортикостероида может быть выше во время фазы совместного введения с соединениями по настоящему изобретению и снижена в последующие сутки.

Конкретные схемы дозирования включают:

- Плитидепсин в дозе 1,5 мг/сутки внутривенно (в/в) в комбинации с 6,6 мг/сутки дексаметазона в/в на 1-3 сутки с последующим введением 6 мг/сутки дексаметазона перорально (п/о)/в/в с 4-х и по 10-е сутки (согласно заключению врача в соответствии с клиническим состоянием пациента и дальнейшим развитием клинической картины).

- Плитидепсин в дозе 2,0 мг/сутки внутривенно (в/в) в комбинации с 6,6 мг/сутки дексаметазона в/в на 1-3 сутки с последующим введением 6 мг/сутки дексаметазона перорально (п/о)/в/в с 4-х по 10-е сутки (согласно заключению врача в соответствии с клиническим состоянием пациента и дальнейшим развитием клинической картины).

- Плитидепсин в дозе 2,5 мг/сутки внутривенно (в/в) в комбинации с 6,6 мг/сутки дексаметазона в/в на 1-3 сутки с последующим введением 6 мг/сутки дексаметазона перорально (п/о)/в/в с 4-х по 10-е сутки (согласно заключению врача в соответствии с клиническим состоянием пациента и дальнейшим развитием клинической картины).

В одном воплощении, чтобы избежать реакций, связанных с инфузионным введением, пациенты могут получать следующие лекарства за 20-30 минут до начала инфузии соединения по настоящему изобретению:

- ондансетрон 8 мг в/в (или эквивалент);
- дифенгидрамина гидрохлорид 25 мг в/в (или эквивалент);
- ранитидин 50 мг в/в (или эквивалент);
- дексаметазон 6,6 мг внутривенно (включен в приведенную выше схему);

Кроме того, на 4 и 5 сутки пациенты, получавшие лечение соединениями по настоящему изобретению, могут получать ондансетрон по 4 мг дважды в сутки п/о.

Дозы дексаметазона, ондансетрона и ранитидина определены здесь в расчете на основную форму. Доза дифенгидрамина гидрохлорида дана в расчете на гидрохлорид. Дозы соединений по изобретению даны в расчете на основную форму.

Суточные дозы могут быть введены в виде инфузии. Инфузия может представлять собой 1-часовую инфузию, 1,5-часовую инфузию, 2-часовую инфузию, 3-часовую инфузию или дольше. Предпочтительно инфузия длится 1,5 часа.

В некоторых воплощениях доза может быть введена в соответствии со схемой, в которой применяют нагрузочную дозу и поддерживающую дозу. Нагрузочные/поддерживающие дозы по настоящему изобретению включают:

нагрузочную дозу 2,5 мг на 1-е сутки с последующим введением поддерживающей дозы 2 мг/сутки в течение всех последующих суток;

нагрузочную дозу 2,5 мг на 1-е сутки с последующим введением поддерживающей дозы 1,5 мг/сутки в течение всех последующих суток;

нагрузочную дозу 2,5 мг на 1-е сутки с последующим введением поддерживающей дозы 1 мг/сутки в течение всех последующих суток;

нагрузочную дозу 2,5 мг на 1-е сутки с последующим введением поддерживающей дозы 0,5 мг/сутки в течение всех последующих суток;

нагрузочную дозу 2 мг на 1-е сутки с последующим введением поддерживающей дозы 1,5 мг/сутки в течение всех последующих суток;

нагрузочную дозу 2 мг на 1-е сутки с последующим введением поддерживающей дозы 1 мг/сутки в течение всех последующих суток;

нагрузочную дозу 2 мг на 1-е сутки с последующим введением поддерживающей дозы 0,5 мг/сутки в течение всех последующих суток;

нагрузочную дозу 1,5 мг на 1-е сутки с последующим введением поддерживающей дозы 1 мг/сутки в течение всех последующих суток;

нагрузочную дозу 1,5 мг на 1-е сутки с последующим введением поддерживающей дозы 0,5 мг/сутки в течение всех последующих суток; и

нагрузочную дозу 1 мг на 1-е сутки с последующим введением поддерживающей дозы 0,5 мг/сутки в течение всех последующих суток.

В соответствии с дополнительным воплощением суточная доза может быть снижена в последние сутки или несколько суток данной схемы.

В соответствии с дополнительным воплощением, если суточная доза составляет 2 мг, доза может быть снижена до 1 мг на 4-е и 5-е сутки.

Конкретные схемы дозирования включают:

- 1 мг плитидепсина, вводимого в виде 1,5-часовой инфузии один раз в сутки в течение 5 суток подряд. (суммарная доза 5 мг);

- 2 мг плитидепсина, вводимого в виде 1,5-часовой инфузии один раз в сутки в течение 5 суток подряд. По усмотрению исследователя доза может быть снижена до 1 мг/сутки на 4-е и 5-е сутки (суммарная доза 8-10 мг);

- 1,5 мг плитидепсина, вводимого в виде 1,5-часовой инфузии один раз в сутки в течение 3 суток подряд (суммарная доза 4,5 мг);

- 2 мг плитидепсина, вводимого в виде 1,5-часовой инфузии один раз в сутки в течение 3 суток подряд (суммарная доза 6 мг); и

- 2,5 мг плитидепсина, вводимого в виде 1,5-часовой инфузии один раз в сутки в течение 3 суток подряд (суммарная доза 7,5 мг).

Схема однократного дозирования включает:

- Плитидепсин, вводимый в виде 1,5-часовой инфузии один раз в 1-е сутки в дозе 1-10 мг, 4-10 мг, 4,5-10 мг, 4 мг, 4,5 мг, 5 мг, 5,5 мг, 6 мг, 6,5 мг, 7 мг, 7,5 мг, 8 мг, 8,5 мг, 9 мг, 9,5 мг или 10 мг, предпочтительно 4,5 мг, 5 мг, 6 мг, 7,5 мг, 8 мг, 9 мг или 10 мг, более предпочтительно 5-9 мг, 6,5-8,5 мг, 7-8 мг или наиболее предпочтительно 7,5 мг.

- Схема однократного дозирования может дополнительно включать следующие профилактические лекарственные препараты за 20-30 минут до инфузии плитидепсина:

- дифенгидрамина гидрохлорид 25 мг в/в.

- ранитидин 50 мг в/в.

- дексаметазон 6,6 мг внутривенно.

- ондансетрон 8 мг в/в в виде медленной 15-минутной инфузии.

- 4 мг ондансетрона перорально можно назначать каждые 12 часов в течение 3 суток после введения плитидепсина для облегчения тошноты и рвоты, вызванных лекарственными препаратами. Если плитидепсин вводят утром, пациент может получить первую дозу ондансетрона во второй половине дня.

В соответствии с дополнительными воплощениями пациенты могут быть отобраны для лечения соединениями по настоящему изобретению на основании клинических параметров и/или характеристик пациента. Подходящими параметрами могут являться измерения, раскрытые в настоящей заявке.

Схемы и дозы, описанные выше, применимы к обоим способам лечения согласно настоящему изобретению, их применению и применению соединения, как определено здесь, в изготовлении лекарственных средств, как определено здесь.

В дополнительном аспекте изобретения предложен способ снижения экспрессии и/или секреции одного или более чем одного провоспалительного цитокина у субъекта,

или в образце, полученном от субъекта, или в культуре клеток, включающий введение соединения, как определено здесь.

В другом аспекте изобретения предложен способ повышения активации макрофагов у субъекта, или в образце, полученном от субъекта, или в культуре клеток, включающий введение соединения, как определено здесь.

В воплощениях настоящее изобретение относится к соединению для применения в соответствии с настоящим изобретением, где соединение вводят в комбинации с одним или более чем одним из следующих профилактических лекарственных средств: дифенгидрамина гидрохлоридом, ранитидином, дексаметазоном, ондансетроном. В частности, с одним или более чем одним из 25 мг гидрохлорида дифенгидрамина внутривенно или эквивалента; 50 мг ранитидина внутривенно или эквивалента; 8 мг дексаметазона внутривенно; 8 мг ондансетрона в/в в виде медленной 15-минутной инфузии или эквивалента. Пациенты могут получать указанные профилактические лекарственные средства за 20-30 минут до инфузии плитидепсина. 8 мг дексаметазона внутривенно могут быть представлены в виде дексаметазона фосфата, что соответствует 6,6 мг дексаметазона основания.

Чтобы обеспечить более краткое описание, некоторые из количественных выражений, приведенных здесь, не снабжены термином «приблизительно». Понятно, что независимо от того, используется ли термин «приблизительно» непосредственно или нет, каждая величина, приведенная здесь, подразумевается как относящаяся к фактическому заданному значению, а также относится к приближению к такому заданному значению, которое можно логично вывести на основе опыта специалиста в данной области техники, включая эквиваленты и приближения, обусловленные условиями эксперимента и/или измерения для такого заданного значения.

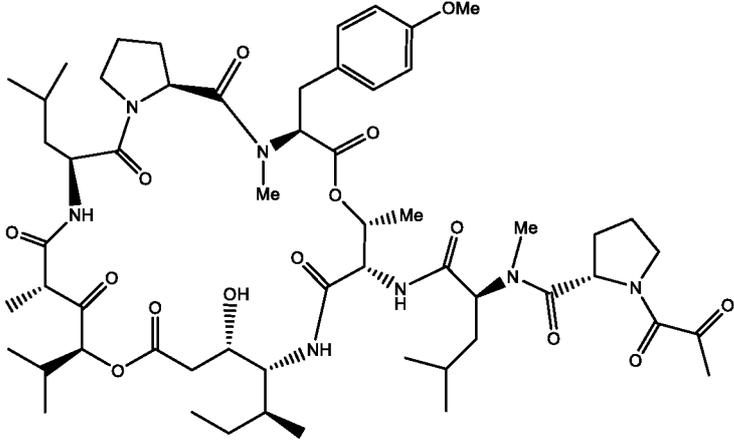
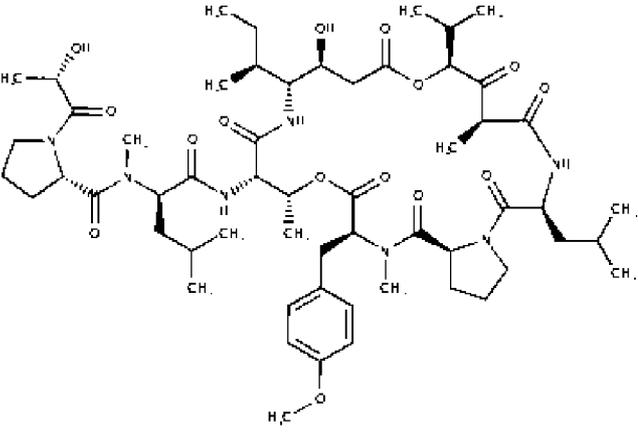
В то время как вышеприведенное раскрытие обеспечивает общее описание предмета, который охватывается объемом настоящего изобретения, включая способы, а также наилучший принцип его осуществления и применения этого изобретения, следующие примеры приведены для того, чтобы дополнительно обеспечить возможность специалистам в данной области техники применять это изобретение на практике и предоставить его полное письменное описание. Однако специалистам в данной области техники будет понятно, что конкретные особенности этих примеров не следует рассматривать как ограничивающие изобретение, объем которого следует понимать из формулы изобретения и ее эквивалентов, прилагаемой к настоящему

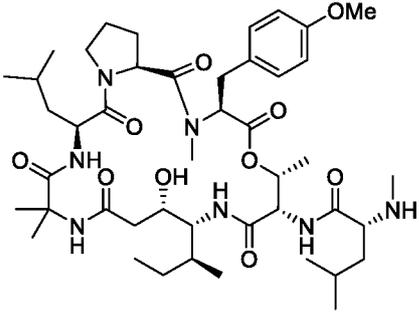
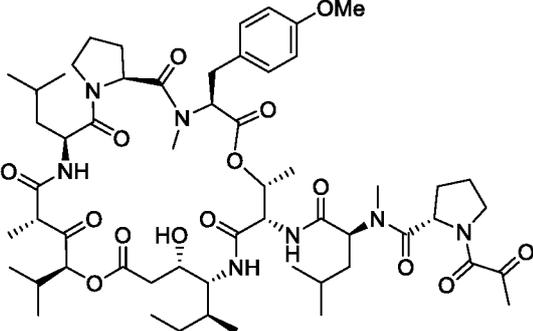
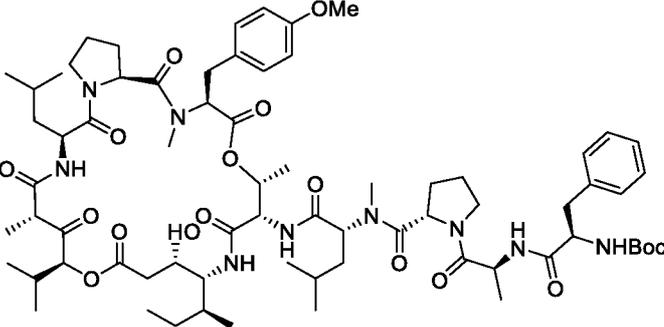
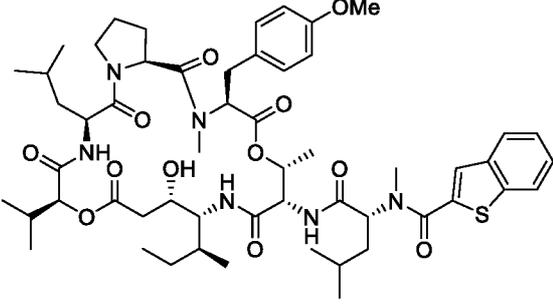
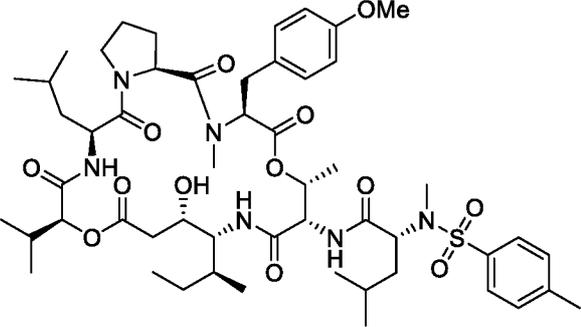
описанию. Различные дополнительные аспекты и воплощения настоящего изобретения будут очевидны специалистам в данной области техники в свете настоящего раскрытия.

ПРИМЕРЫ

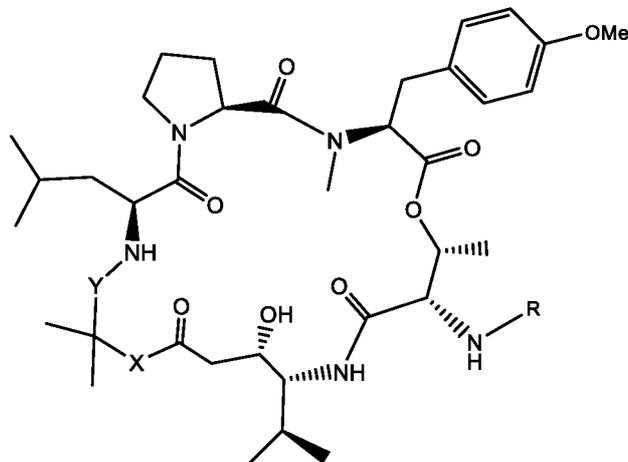
Соединения по настоящему изобретению могут быть получены согласно способам, изложенным в литературе, например: Vera et al. Med. Res. Rev. 2002, 22(2), 102-145, WO 2011/020913 (см., в частности, Примеры 1-5), WO 02/02596, WO 01/76616 и WO 2004/084812, содержание которых включено здесь посредством ссылки.

Конкретные соединения, используемые в экспериментах по настоящему изобретению, представляют собой:

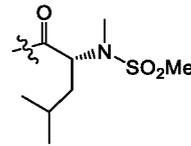
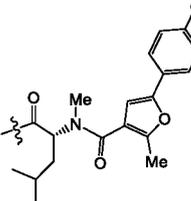
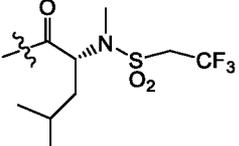
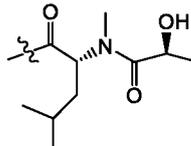
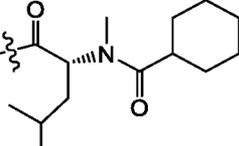
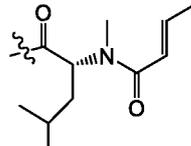
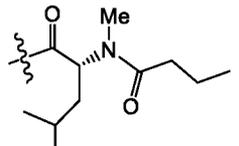
Соединение	Структура
PLD	
Дидемнин В (соединение 240)	

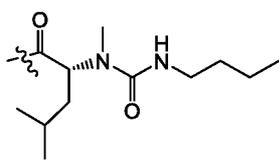
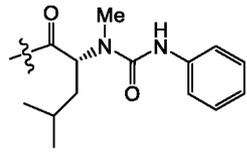
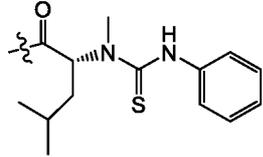
Соединение 3	
Соединение 8	
Соединение 9	
Соединение 10	
Соединение 11	

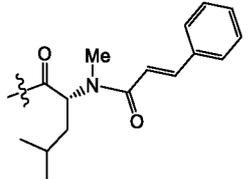
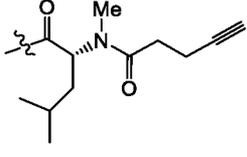
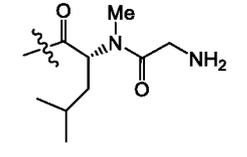
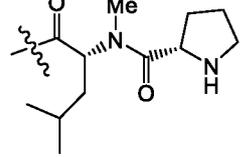
Следуя способам, описанным в WO 02/02596 и в данном описании, и дополнительно раскрытым в предыдущих примерах, можно получить следующие соединения:

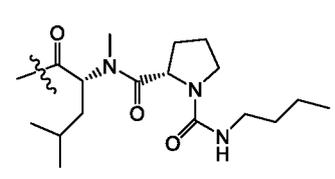
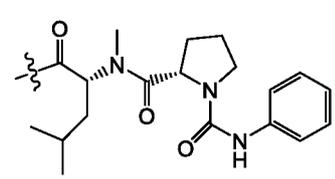
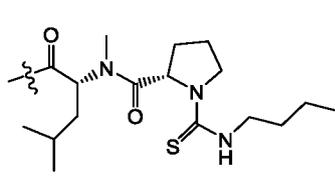
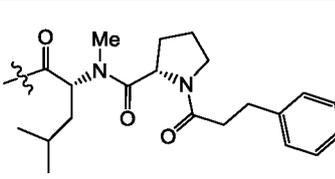
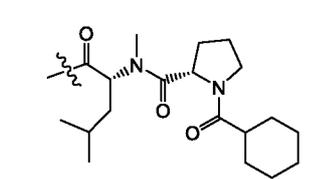
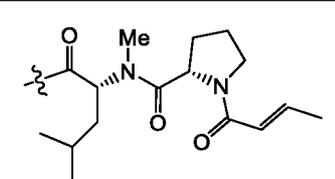


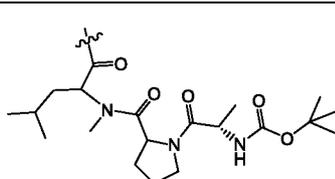
Соединение	X	Y	R
12	O	CO	
13	NH	CO	
14	O	-COCH(CH ₃)CO-	
15	NH	-COCH(CH ₃)CO-	
16	O	CO	
17	NH	CO	
18	O	-COCH(CH ₃)CO-	
19	NH	-COCH(CH ₃)CO-	
20	O	CO	
21	NH	CO	
22	O	-COCH(CH ₃)CO-	
23	NH	-COCH(CH ₃)CO-	
24	O	CO	
25	NH	CO	
26	O	-COCH(CH ₃)CO-	
27	NH	-COCH(CH ₃)CO-	

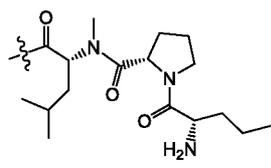
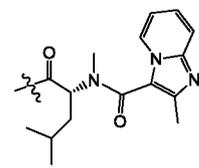
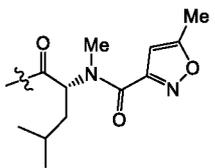
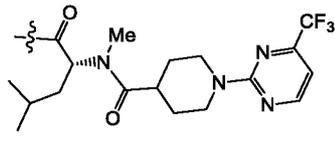
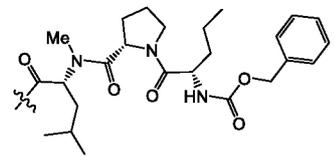
Соединение	X	Y	R
28	O	CO	
29	NH	CO	
30	O	-COCH(CH ₃)CO-	
31	NH	-COCH(CH ₃)CO-	
32	O	CO	
33	NH	CO	
34	O	-COCH(CH ₃)CO-	
35	NH	-COCH(CH ₃)CO-	
36	O	CO	
37	NH	CO	
38	O	-COCH(CH ₃)CO-	
39	NH	-COCH(CH ₃)CO-	
40	O	CO	
41	NH	CO	
42	O	-COCH(CH ₃)CO-	
43	NH	-COCH(CH ₃)CO-	
44	O	CO	
45	NH	CO	
46	O	-COCH(CH ₃)CO-	
47	NH	-COCH(CH ₃)CO-	
48	O	CO	
49	NH	CO	
50	O	-COCH(CH ₃)CO-	
51	NH	-COCH(CH ₃)CO-	
52	O	CO	
53	NH	CO	
54	O	-COCH(CH ₃)CO-	
55	NH	-COCH(CH ₃)CO-	

Соединение	X	Y	R
56	O	CO	
57	NH	CO	
58	O	-COCH(CH ₃)CO-	
59	NH	-COCH(CH ₃)CO-	
60	O	CO	
61	NH	CO	
62	O	-COCH(CH ₃)CO-	
63	NH	-COCH(CH ₃)CO-	
64	O	CO	
65	NH	CO	
66	O	-COCH(CH ₃)CO-	
67	NH	-COCH(CH ₃)CO-	

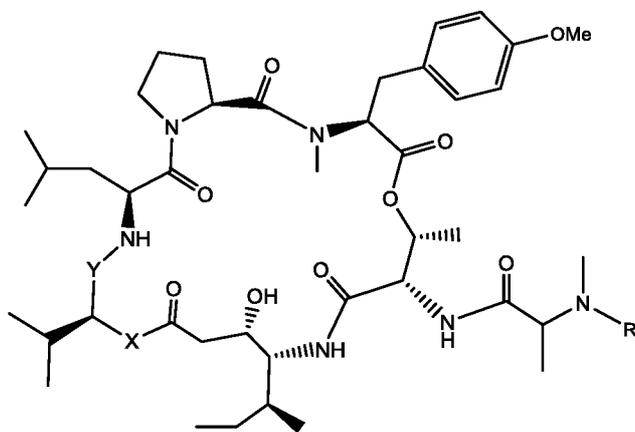
Соединение	X	Y	R
68	O	CO	
69	NH	CO	
70	O	-COCH(CH ₃)CO-	
71	NH	-COCH(CH ₃)CO-	
72	O	CO	
73	NH	CO	
74	O	-COCH(CH ₃)CO-	
75	NH	-COCH(CH ₃)CO-	
76	O	CO	
77	NH	CO	
78	O	-COCH(CH ₃)CO-	
79	NH	-COCH(CH ₃)CO-	
80	O	CO	
81	NH	CO	
82	O	-COCH(CH ₃)CO-	
83	NH	-COCH(CH ₃)CO-	

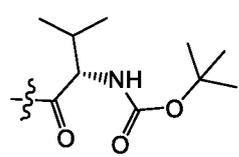
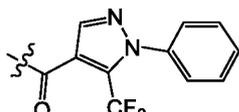
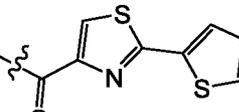
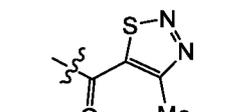
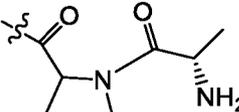
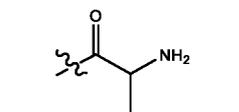
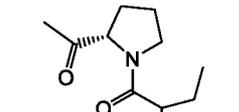
84	O	CO	
85	NH	CO	
86	O	-COCH(CH ₃)CO-	
87	NH	-COCH(CH ₃)CO-	
88	O	CO	
89	NH	CO	
90	O	-COCH(CH ₃)CO-	
91	NH	-COCH(CH ₃)CO-	
92	O	CO	
93	NH	CO	
94	O	-COCH(CH ₃)CO-	
95	NH	-COCH(CH ₃)CO-	
96	O	CO	
97	NH	CO	
98	O	-COCH(CH ₃)CO-	
99	NH	-COCH(CH ₃)CO-	
100	O	CO	
101	NH	CO	
102	O	-COCH(CH ₃)CO-	
103	NH	-COCH(CH ₃)CO-	
104	O	CO	
105	NH	CO	
106	O	-COCH(CH ₃)CO-	
107	NH	-COCH(CH ₃)CO-	

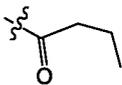
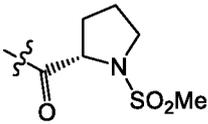
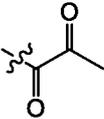
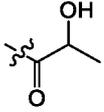
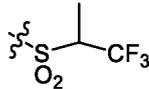
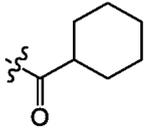
Соединение	X	Y	R
108	O	CO	
109	NH	CO	
110	O	-COCH(CH ₃)CO-	
111	NH	-COCH(CH ₃)CO-	

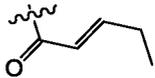
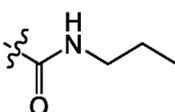
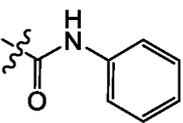
112	O	CO	
113	NH	CO	
114	O	-COCH(CH ₃)CO-	
115	NH	-COCH(CH ₃)CO-	
116	O	CO	
117	NH	CO	
118	O	-COCH(CH ₃)CO-	
119	NH	-COCH(CH ₃)CO-	
120	O	CO	
121	NH	CO	
122	O	-COCH(CH ₃)CO-	
123	NH	-COCH(CH ₃)CO-	
124	O	CO	
125	NH	CO	
126	O	-COCH(CH ₃)CO-	
127	NH	-COCH(CH ₃)CO-	
128	O	CO	
129	NH	CO	
130	O	-COCH(CH ₃)CO-	
131	NH	-COCH(CH ₃)CO-	

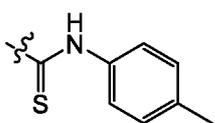
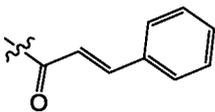
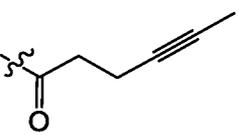
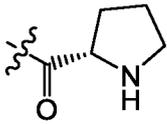
Следуя способам, описанным в WO 02/02596 и в данном описании, и дополнительно раскрытым в предыдущих примерах, можно получить следующие соединения:

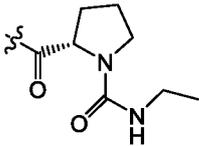
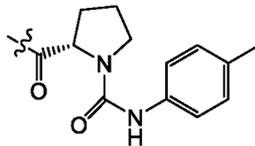
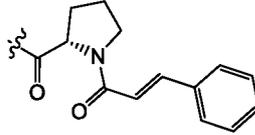
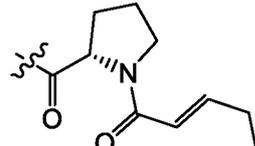
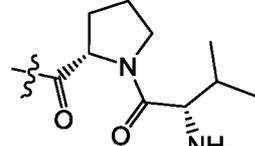
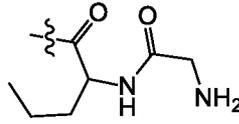


Соединение	X	Y	R
132	O	CO	
133	NH	CO	
134	O	-COCH(CH ₃)CO-	
135	NH	-COCH(CH ₃)CO-	
136	O	CO	
137	NH	CO	
138	O	-COCH(CH ₃)CO-	
139	NH	-COCH(CH ₃)CO-	
140	O	CO	
141	NH	CO	
142	O	-COCH(CH ₃)CO-	
143	NH	-COCH(CH ₃)CO-	
144	O	CO	
145	NH	CO	
146	O	-COCH(CH ₃)CO-	
147	NH	-COCH(CH ₃)CO-	
148	O	CO	
149	NH	CO	
150	O	-COCH(CH ₃)CO-	
151	NH	-COCH(CH ₃)CO-	
152	O	CO	
153	NH	CO	
154	O	-COCH(CH ₃)CO-	
155	NH	-COCH(CH ₃)CO-	
156	O	CO	
157	NH	CO	
158	O	-COCH(CH ₃)CO-	
159	NH	-COCH(CH ₃)CO-	

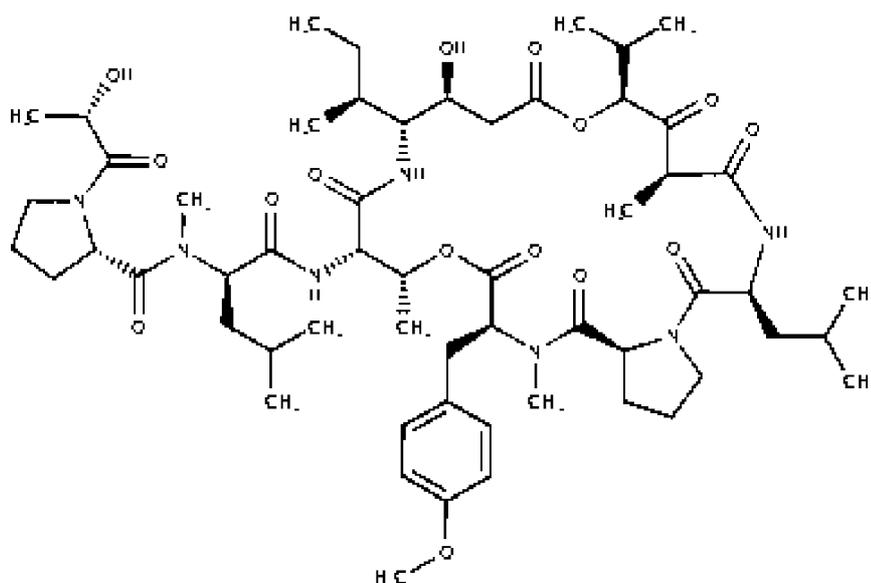
Соединение	X	Y	R
160	O	CO	
161	NH	CO	
162	O	-COCH(CH ₃)CO-	
163	NH	-COCH(CH ₃)CO-	
164	O	CO	
165	NH	CO	
166	O	-COCH(CH ₃)CO-	
167	NH	-COCH(CH ₃)CO-	
168	O	CO	
169	NH	CO	
170	O	-COCH(CH ₃)CO-	
171	NH	-COCH(CH ₃)CO-	
172	O	CO	
173	NH	CO	
174	O	-COCH(CH ₃)CO-	
175	NH	-COCH(CH ₃)CO-	
176	O	CO	-SO ₂ Me
177	NH	CO	
178	O	-COCH(CH ₃)CO-	
179	NH	-COCH(CH ₃)CO-	
180	O	CO	
181	NH	CO	
182	O	-COCH(CH ₃)CO-	
183	NH	-COCH(CH ₃)CO-	
184	O	CO	
185	NH	CO	
186	O	-COCH(CH ₃)CO-	
187	NH	-COCH(CH ₃)CO-	

188	O	CO	
189	NH	CO	
190	O	-COCH(CH ₃)CO-	
191	NH	-COCH(CH ₃)CO-	
192	O	CO	
193	NH	CO	
194	O	-COCH(CH ₃)CO-	
195	NH	-COCH(CH ₃)CO-	
196	O	CO	
197	NH	CO	
198	O	-COCH(CH ₃)CO-	
199	NH	-COCH(CH ₃)CO-	

Соединение	X	Y	R
200	O	CO	
201	NH	CO	
202	O	-COCH(CH ₃)CO-	
203	NH	-COCH(CH ₃)CO-	
204	O	CO	
205	NH	CO	
206	O	-COCH(CH ₃)CO-	
207	NH	-COCH(CH ₃)CO-	
208	O	CO	
209	NH	CO	
210	O	-COCH(CH ₃)CO-	
211	NH	-COCH(CH ₃)CO-	
212	O	CO	
213	NH	CO	
214	O	-COCH(CH ₃)CO-	
215	NH	-COCH(CH ₃)CO-	

216	O	CO	
217	NH	CO	
218	O	-COCH(CH ₃)CO-	
219	NH	-COCH(CH ₃)CO-	
220	O	CO	
221	NH	CO	
222	O	-COCH(CH ₃)CO-	
223	NH	-COCH(CH ₃)CO-	
224	O	CO	
225	NH	CO	
226	O	-COCH(CH ₃)CO-	
227	NH	-COCH(CH ₃)CO-	
228	O	CO	
229	NH	CO	
230	O	-COCH(CH ₃)CO-	
231	NH	-COCH(CH ₃)CO-	
232	O	CO	
233	NH	CO	
234	O	-COCH(CH ₃)CO-	
235	NH	-COCH(CH ₃)CO-	
236	O	CO	
237	NH	CO	
238	O	-COCH(CH ₃)CO-	
239	NH	-COCH(CH ₃)CO-	

Еще одним соединением является соединение 240, известное как дидемнин В, структура которого показана ниже:



ПРИМЕР 1

Как показано на Фиг. 1, PLD ингибирует трансактивацию NF-κB *in vitro*.

Авторы проверили, регулируется ли транскрипционная активность NF-κB плитидепсином. С этой целью авторы воспользовались клетками THP-1, стабильно трансфицированными репортерной плазмидой люциферазы NF-κB. Авторы обрабатывали клетки 100 нг/мл TNFα (активатор NF-κB), 500 мкг/мл Poly I:C (лиганд TLR3), 10 мкг/мл LPS-B5 (лиганд TLR4) или 10 мкг/мл резиквимода (лиганд TLR-7/8). Соединения использовали либо по отдельности (серые столбцы на Фиг. 1A), либо в сочетании со 100 нМ плитидепсина (черные столбцы на Фиг. 1A) в течение 6 часов и количественно определяли активность люциферазы при каждом условии. В присутствии каждого из лигандов TLR плитидепсин отчетливо ингибировал продукцию люциферазы, указывая на то, что трансактивация NF-κB ингибировалась в присутствии лекарственного средства. Выживаемость анализировали с помощью анализа МТТ (серые столбцы на Фиг. 1B (активаторы) и красные столбцы (активаторы в сочетании со 100 нМ плитидепсина)). Цитотоксическое действие не было выявлено.

Как показано на Фиг. 2, PLD также ингибирует секрецию провоспалительных цитокинов IL-1, IL-6, IL-8 и TNF-альфа в моноцитах человека *in vitro*.

Чтобы выяснить, ингибирует ли плитидепсин секрецию цитокинов, запускаемую TLR, авторы обрабатывали клетки THP-1 100 нг/мл TNFα (активатор NF-κB), 500 мкг/мл Poly I:C (лиганд TLR3), 10 мкг/мл LPS-B5 (лиганд TLR4) или 10 мкг/мл резиквимода (лиганд TLR-7/8). Соединения использовали либо по отдельности (серые столбцы), либо

в сочетании со 100 нМ плитидепсина (красные столбцы) в течение 6 часов. Авторы сравнивали варианты секреции цитокинов в супернатантах клеточных культур между различными обработками с помощью с помощью твердофазного ИФА анализа. Как видно на Фиг. 2, Poly I:C, LPS и резиквимод индуцируют секрецию IL-1, IL-6, IL-8 и TNF- α . Кроме того, плитидепсин отчетливо ингибировал продукцию IL-1, IL-6, IL-8 и TNF- α . TNF- α не увеличивал секрецию IL-1 и IL-6. Возможно, клеткам THP-1 требуется другое время воздействия TNF- α для секреции этих цитокинов. Также, плитидепсин не мог снизить уровень IL-8 и TNF- α в клетках, стимулированных TNF- α . Это связано с тем, что авторы измеряли секретируемый TNF- α и TNF α , добавленный в среду для культивирования клеток. Таким образом, обработка TNF- α маскировала уровни секретируемого TNF- α .

В присутствии каждого из лигандов TLR плитидепсин отчетливо ингибировал секрецию провоспалительных цитокинов IL-1, IL-6, IL-8.

В дополнительном эксперименте *in vitro* изучали влияние предварительной обработки плитидепсином (APL) на клетки THP-1. Используя линию THP-1 NF- κ B Luc, за 8 часов до стимуляции резиквимодом (RQ) в концентрации 2,5 или 5 мкг/мл добавляли 1, 10 или 50 нМ APL или DMSO (0,2%). RQ является агонистом TLR-7/8 и имитирует оцРНК. Через 24 часа измеряли уровень цитокинов или жизнеспособность клеток. Как показано на Фиг. 50, предварительная обработка PLD ингибировала секрецию провоспалительных цитокинов: IL6, IL8, IL1 β и TNF- α , индуцированную RQ. Следует отметить, что добавление PLD не снижает жизнеспособность по сравнению с необработанным контролем ни при одной из 2 протестированных концентраций RQ. Хотя RQ сам по себе проявляет некоторую дозозависимую токсичность, этот эффект не усиливается присутствием PLD в культуре, и, следовательно, изменения в продукции цитокинов не связаны с этой небольшой цитотоксичностью, индуцированной RQ.

ПРИМЕР 2

Как показано на Фиг. 3, PLD ингибирует *ex vivo* секрецию провоспалительных цитокинов, IL-6, IL-8 и TNF-альфа, выделенных из БАЛ (бронхоальвеолярный лаваж), у мышей.

Авторы проверили, ингибирует ли плитидепсин секрецию цитокинов, запускаемую LPS, в альвеолярных макрофагах. С этой целью мышам внутривенно вводили плитидепсин (1 мг/кг) или носитель и через 12 часов после введения отбирали жидкость бронхоальвеолярного лаважа (БАЛ). Клетки высевали и *ex vivo* обрабатывали

или не обрабатывали 15 мкг/мл LPS-B5 в течение 3 или 6 часов и измеряли секретируемые цитокины. Как можно видеть, LPS индуцируют секрецию IL-6, IL-10 и TNF- α (серые столбцы). Кроме того, у животных, получавших плитидепсин, лекарственный препарат отчетливо ингибировал продукцию провоспалительных цитокинов IL-6 и TNF- α , индуцированную LPS (красные столбцы), и приводил к общему противовоспалительному эффекту.

Далее это снова показано на Фиг. 51. У животных, получавших плитидепсин, плитидепсин был способен значительно снижать секрецию IL-6, IL-10 и TNF- α , индуцированную LPS-B5, через 3 и 6 часов в клетках CD45+, выделенных из бронхоальвеолярного лаважа. Этот эффект не был связан с жизнеспособностью клеток, как показано на Фиг. 51(b).

Далее авторы проверили, ингибирует ли плитидепсин секрецию цитокинов, запускаемую резиквимодом (RQ), в ЖБАЛ. Мышам внутривенно вводили плитидепсин (1 мг/кг) или носитель за 1 час до интраназальной инокуляции резиквимодом в дозе 50 мкг/мышь. Через 1 или 3 часа после интраназального введения RQ отбирали жидкость бронхоальвеолярного лаважа (ЖБАЛ). Клетки высевали и измеряли секретируемые цитокины. Как можно видеть, RQ индуцирует секрецию TNF- α как через 1, так и через 3 часа после введения. *In vivo* введение PLD предотвращало повышенную продукцию TNF- α . Как можно видеть на Фиг. 52, RQ индуцирует секрецию TNF- α как через 1, так и через 3 часа после введения. *In vivo* введение PLD предотвращало повышенную продукцию TNF- α .

Также авторы проверили влияние плитидепсина на рекрутирование альвеолярных макрофагов. Активированные макрофаги моноцитарного происхождения способствуют цитокиновому шторму COVID-19 посредством высвобождения огромного количества провоспалительных цитокинов. Клетки бронхоальвеолярного лаважа окрашивали и анализировали с помощью проточной цитометрии. Плитидепсин снижает процент макрофагов, присутствующих в бронхоальвеолярном лаваже, без цитотоксического действия.

ПРИМЕР 3

Как показано на Фиг. 4, после однократного внутривенного введения мышам PLD снижает количество макрофагов в БАЛ.

Чтобы выяснить, снижает ли плитидепсин процент альвеолярных макрофагов у животных с острым воспалением, авторы вводили мышам плитидепсин (1 мг/кг)

внутривенно, LPS (20 мкг/кг) внутрибрюшинно в стерильном физиологическом растворе или плитидепсин (1 мг/кг; в/в) в сочетании с LPS (20 мкг/кг, внутрибрюшинно). Через три часа отбирали бронхоальвеолярный лаваж. Клетки бронхоальвеолярного лаважа получали посредством центрифугирования и анализировали с помощью проточной цитометрии (Фиг. 4b). Верхние панели показывают стратегию анализа популяции макрофагов, присутствующих в образцах. Нижняя правая панель показывает тот же результат, выраженный в процентном соотношении клеток. Нижняя левая панель показывает процент живых клеток CD45+ (маркер лейкоцитов). Как можно видеть, LPS индуцируют рекрутирование альвеолярных макрофагов. Обработка плитидепсином снижает процент макрофагов, присутствующих в бронхоальвеолярном лаваже, без цитотоксического действия.

ПРИМЕР 4

Как показано на Фиг. 5, PLD распределяется в легких у мышей (которые являются неклиническими видами, используемыми в фармакологических моделях). Кроме того, аналогичное содержание в плазме достигается у неклинических видов и пациентов.

Концентрация плитидепсина в легких была постоянно выше чем в плазме, в любое время отбора проб с соотношением легкое-к-плазме (рассчитываемое как $\frac{\text{легочная } AUC_{0-\infty}}{\text{плазменная } AUC_{0-\infty}}$) у мышей, крыс и хомяков 133, 460 и 909, соответственно, тем самым подтверждая распределение плитидепсина в легких.

Таблица 1

Вид (пол)	Штамм	Доза [†] (мг/кг)	C _{max} (нг/мл)	AUC _{0-∞} (нг·ч/мл)	t _{1/2} (ч)	Cl (л/ч/кг)	Vd _{ss} (л/кг)
Мышь (Ж)	C57BL6/J	1,0 ^a	50,7	225,3	18,2	4,4	101,8
Человек (М/Ж)	-	0,135 ^b	29,1	256,0	20-80	0,7-0,9	29-33
	-	0,02 ^c	8,5 ^d	174,0 ^d	-	-	-

Ж, женский пол; М, мужской пол.

[†]Схема:

- Неклинические виды: однократное внутривенное болюсное введение.
- Пациенты: 3-часовая внутривенная инфузия.

^a Максимальная переносимая доза.

^b Рассчитывали исходя из рекомендуемой дозы 5 мг/м², 3-часовой инфузии или 9,5 мг/пациент.

^c Эквивалентно 1,5 мг/пациента, эта доза используется в APLICOV (1-часовая инфузия на 1, 2 и 3 сутки).

^d Оценивали по модели популяционной фармакокинетики плитидепсина (CPR/2016/01) после 3 ежедневных доз 1,5 мг/пациент.

Площадь поверхности тела человека, 1,9.

Масса тела человека, 60 кг

Материалы и методы

Люциферазный анализ трансактивации

Трансактивацию NF-κB анализировали с использованием системы анализа люциферазы Bright-Glo™ в соответствии с инструкциями производителя. NF-κB репортерные (Luc)-THP-1 моноциты человека, стабильно трансфицированные плазмидой NF-κB-Luc (содержащей четыре сайта связывания NF-κB, минимальный промотор и ген люциферазы), подвергали воздействию 100 нг/мл TNFα (положительный контроль), 500 мкг/мл Poly I:C (полиинозиново-полицитидиловая кислота), 10 мкг/мл LPS-B5 (липополисахарид из *Escherichia coli* 055:B5) или 10 мкг/мл резиквимода. Соединения использовали либо отдельно, либо в сочетании со 100 нМ плитидепсина в течение 6 часов. Люминесценцию измеряли в ридере Perkin-Elmer EnVision. Одновременно проводили анализ клеточной пролиферации МТТ (бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия) для контроля цитотоксичности соединений. Выживаемость клеток выражали в процентах от роста контрольных клеток. Представленные данные являются средними из трех независимых экспериментов, проведенных в трех повторностях.

ИФА анализы секретируемых цитокинов

Культуры клеток THP1-NF-κB-LUC обрабатывали, как описано выше, и образцы культуральной среды отбирали через 6 часов после обработки для анализа секретируемых цитокинов с помощью твердофазного ИФА. Образцы сред хранили при 4°C. Секрецию белков IL-8, IL-1β, IL-6 и TNF-α в культуральной среде количественно определяли с использованием высокоспецифичных и чувствительных наборов ИФА. Наборы для ИФА ELISA OptEIA™ на человеческий IL-1b, человеческий IL-6, человеческий IL-8 и человеческий TNF были получены от BD Biosciences, и анализ проводили, как описано производителем. Представленные данные являются средними из трех независимых экспериментов, проведенных в трех повторностях.

Анализ МТТ

Клетки высевали в 96-луночные микротитрационные планшеты и оставляли на 24 часа при 37°C и 5% CO₂ перед обработкой, описанной выше. После 6 часов непрерывной обработки жизнеспособность клеток оценивали по превращению МТТ в его окрашенный продукт реакции, МТТ-формазан, который растворяли для измерения его поглощения при 540 нм. Представленные здесь данные являются репрезентативными для серии из трех независимых экспериментов, проведенных в трех повторностях.

Введение “*in vivo*” и обработка “*ex vivo*”

Мышей рандомизировали в группы по пять животных для обработки. Мышам вводили внутривенно (в/в) плитидепсин (1 мг/кг) и через 12 часов после введения подвергали эвтаназии. Контрольная группа получала носитель плитидепсина, разбавленный физиологическим раствором (кремофор/этанол/вода). Жидкость бронхоальвеолярного лаважа (БАЛ) каждой группы отбирали и центрифугировали для получения клеток бронхоальвеолярного лаважа. Клетки подвергали лизису эритроцитов (Roche), высевали и *ex vivo* обрабатывали или не обрабатывали 15 мкг/мл LPS-B5 в течение 3 или 6 часов. Секретируемые цитокины измеряли с использованием высокоспецифичных и чувствительных наборов ИФА. Наборы для ИФА DuoSet ELISA на мышиный IL-6, мышиный IL-10 и мышиный TNF были получены от R&D Systems, и анализы проводили, как описано производителем. Представленные здесь данные являются репрезентативными для серии из трех независимых экспериментов.

Животная модель воспаления

Мышей рандомизировали в группы по два животных для обработки. Мышам вводили плитидепсин (1 мг/кг) внутривенно (в/в), LPS (20 мкг/кг) внутрибрюшинно (в/б) в стерильном физиологическом растворе или плитидепсин (1 мг/кг; в/в) в комбинации с LPS (20 мкг/кг; в/б). Контрольная группа получала носитель плитидепсина (кремофор/этанол/вода), разбавленный физиологическим раствором. Через три часа животных подвергали эвтаназии и собирали бронхоальвеолярный лаваж (всего 1,2 мл; PBS (фосфатно-солевой буфер)). Клетки бронхоальвеолярного лаважа получали посредством центрифугирования и анализировали с помощью проточной цитометрии. Представленные здесь данные являются репрезентативными для серии из трех независимых экспериментов.

В другой модели воспаления мышей рандомизировали в группы по два животных для обработки. Мышам вводили плитидепсин (1 мг/кг) внутривенно (в/в) с последующим введением резиквимода (50 мкг/мышь; интраназально) через 1 час. Контрольная группа

получала носитель плитидепсина (кремофор/этанол/вода), разбавленный физиологическим раствором. Через 1 и 3 часа животных подвергали эвтаназии, собирали бронхоальвеолярный лаваж (всего 1,2 мл; PBS) и затем определяли количество TNF α с помощью наборов для твердофазного ИФА. Представленные здесь данные являются репрезентативными для серии из трех независимых экспериментов.

Анализ макрофагов с помощью проточной цитометрии

Клетки бронхоальвеолярного лаваж окрашивали моноклональными антителами против F4/80-BV510, CD45-APC700, CD11b-BV650, CD11c-APC-Fire, CD24-PC7 и Ly6C-BV605 (Biolegend) и набором для окрашивания LIVE/DEAD™ Fixable Green Dead Cell для возбуждения при длине волны 488 нм (ThermoFisher). Макрофаги (F4/80+) гейтировали по живым иммунным клеткам (CD45+ краситель LIVE/DEAD-), в то время как альвеолярные макрофаги (F4/80+ CD24-) специфически гейтировали по CD11c+ CD11b- популяции живых иммунных клеток. Изотипические контроли и компенсационные гранулы использовали для установки стратегий компенсаций и гейтирования.

ПРИМЕР 5. Противовирусная активность соединений по настоящему изобретению была продемонстрирована в отношении ВИЧ

Анализ рекомбинантного вируса проводили как на клетках MT-2, так и на PBMC (мононуклеарные клетки периферической крови), предварительно активированных РНА (фитогемагглютинин) плюс IL-2. Клетки инфицировали супернатантами, полученными из клеток 293t, трансфицированных полноразмерными инфекционными плазмидами ВИЧ-1: pNL4.3-Luc (X4-тропный вирус), pNL4.3-Renilla (X4-тропный вирус, способный проводить более одного цикла репликации), pNL4.3-Denv-Luc плюс pVSV-env (ВИЧ, псевдотипированный белком G VSV (вирус везикулярного стоматита)) или pJR-Renilla (R5-тропный вирус, способный проводить более одного цикла репликации). Устойчивые вирусы были получены клонированием в *pol* ген плазмиды NL4.3-Renilla вирусов от разных инфицированных доноров. Вирус 9D несет следующие мутации: 41L, 67N, 70R, 98G, 118I, 184V, 215F, 219Q, 74I, а вирус 4D: K65R, K70R, V75I, F77L, F116Y, Q151M, M184I, L10I. Затем анализ проводили в 96-луночных микропланшетах, засеянных 100 мкл, содержащими 250000 (PBMC) или 100000 (MT-2) клеток на лунку. Тестируемые соединения добавляли к культуре в диапазоне концентраций от 50 до 0,0016 мкг/мл (100 мкл/лунка). Наконец, клеточную культуру инфицировали супернатантами, полученными в результате трансфекции различными плазмидами, описанными выше.

Через 48 часов супернатант клеточной культуры удаляли и клетки лизировали с помощью системы анализа люциферазы или системы анализа люциферазы Renilla (оба от компании Promega) согласно инструкциям производителя, и активность люциферазы Renilla измеряли с помощью люминометра (Berthold Detection systems). Все эксперименты контролировали с помощью клеток, обработанных носителем (DMSO), и необработанных клеток.

Ингибирование репликации ВИЧ-1 оценивали посредством измерения снижения активности люциферазы Renilla или RLU (относительных световых единиц) на люминометре при 100% инфицировании необработанных клеток.

Соединение 3 (Фиг. 6А и 6В) демонстрировало противовирусную активность как в клетках МТ-2, так и в РВМС (IC_{50} 1,39 мкМ и 0,16 мкМ, соответственно). Это соединение было более токсичным для РВМС, как показано на Фиг. 6. Токсичные концентрации не достигались при 57,3 мкМ в клетках МТ-2, в то время как в РВМС значение CC_{50} составляло приблизительно 27 мкМ.

Соединение 8 (Фиг. 7А и 7В) также демонстрировало противовирусную активность как в клетках МТ-2, так и в РВМС. Хотя при концентрации 50 мкМ она была неспецифической, при 10 мкМ она была специфической, при этом значение IC_{50} было в 100 раз ниже.

Соединения 9 (Фиг. 8А и 8В), 10 (Фиг. 9А и 9В) и 11 (Фиг. 10А и 10В) были наиболее активными соединениями из всех протестированных соединений. Соединения 9, 10 и 11 демонстрировали значения IC_{50} в наномолярном диапазоне в РВМС (0,63, 0,86 и 69,4 нМ, соответственно), и они являются одними из наиболее эффективных противовирусных соединений *in vitro*, описанных в литературе.

ПРИМЕР 6: Противовирусная активность соединений по изобретению была продемонстрирована в отношении *Coronaviridae*

Противовирусную активность соединений по изобретению тестировали на клетках Huh-7 (клеточная линия гепатомы человека), инфицированных HCoV-229E. HCoV-229E имеет механизм размножения и распространения, очень похожий на SARS-CoV-2. Действительно, белок N HCoV-229E обладает более 90% белковой гомологией с гомологичным белком N в SARS-CoV-2. Полагают, что всем коронавирусам необходим белок N (нуклеокапсид), чтобы связываться с EF1A для эффективной репликации и синтеза вирусных белков. Снижение или прекращение связывания N с EF1A снижает жизнеспособность вируса для распространения.

Соединения по изобретению, представленные в Таблице 2 ниже, разводили в DMSO и хранили при -20°C.

Клетки Huh-7 (клеточная линия гепатомы человека), выращенные до конфлюентности в M96-луночном планшете, инфицировали вирусом HCoV-229E-GFP при MOI (множественность заражения) 0,01 БОЕ. Вирусный материал представлял собой HCoV-229E-GFP (от 31 января 2013 года) в концентрации 3×10^7 БОЕ/мл. Через 8 часов после инфицирования среду заменяли средой с соответствующими разведениями соединений (конечная концентрация DMSO 2%), следуя схеме:

Таблица 2

	1	2	3	4	5
A (Фиг. 11-15)	50 нМ	5 нМ	0,5 нМ	5 нМ	0,5 нМ
B (Фиг. 16-19)	50 нМ	5 нМ	0,5 нМ	0,5 нМ	
C (Фиг. 20-23)	50 нМ	5 нМ	0,5 нМ	0,5 нМ	
D (Фиг. 24-26)	50 нМ	5 нМ	0,5 нМ		
E (Фиг. 27-29)	50 нМ	5 нМ	0,5 нМ		
F (Фиг. 30-33)	50 нМ	5 нМ	0,5 нМ	0,5 нМ	

A - DMSO (контроль); B - соединение 240 (дидемнин B); C - PLD; D - соединение 9; E - соединение 10; F - PLD.

Флуоресцентные клетки наблюдали через 24 часа после инфицирования. Фотографии были получены при использовании автоматизированной системы. Клетки фиксировали в течение 30 мин с помощью 4% PFA (параформальдегид), промывали PBS, и ядра клеток окрашивали DAPI (4',6-диамидин-2-фенилиндол) 1:200 в PBS в течение 20 мин при комнатной температуре. Зеленым цветом на изображениях показаны меченные GFP вирусные частицы. Синим цветом на изображениях показаны ядра, окрашенные DAPI.

В течение короткого времени конфлюэнтные культуры Huh-7 инфицировали при множественности заражения (MOI) 0,01 БОЕ/лунка вирусным инокулятом 3×10^7 БОЕ/мл, а через 8 часов добавляли плитидепсин в диапазоне концентраций от 0,5 нМ до 50 мкМ. Культуры с плитидепсином инкубировали в течение 48 часов и затем определяли жизнеспособность вируса с помощью флуоресценции. Полученные результаты показали противовирусный эффект, индуцированный плитидепсином при концентрациях всего лишь 0,5 нМ (0,555 мкг/л), что намного ниже, чем у других противовирусных препаратов.

Показано, что соединения по изобретению являются эффективными противовирусными агентами в диапазоне протестированных концентраций, сохраняя при этом жизнеспособность клеток.

ПРИМЕР 7

Многоцентровое рандомизированное параллельное и подтверждающее концепцию исследование было проведено для оценки профиля безопасности трех доз плитидепсина у пациентов с COVID-19, нуждающихся в госпитализации. Подробности исследования доступны через ClinicalTrials.gov Идентификатор: NCT04382066.

Основная цель исследования состояла в том, чтобы определить профиль безопасности и токсикологический профиль плитидепсина при каждом уровне дозы, вводимой в соответствии с предложенной схемой введения, у пациентов с диагностированным COVID-19.

Вторичные цели состояли в том, чтобы оценить эффективность плитидепсина у пациентов с COVID-19 при предложенных уровнях доз исходя из: изменения вирусной нагрузки SARS-CoV-2 по сравнению с исходным уровнем; времени до отрицательного результата теста на обнаружение SARS-CoV-2 посредством метода ПЦР; кумулятивной инцидентности по тяжести заболевания (оценка на основании: летальности; потребности в инвазивной искусственной вентиляции легких и/или госпитализации в отделение интенсивной терапии; потребности в неинвазивной искусственной вентиляции легких; потребности в оксигенотерапии) и подбора рекомендуемых уровней доз плитидепсина для II/ III фазы исследования эффективности.

Пациенты, включенные в исследование, были рандомизированы в соотношении 1:1:1 для получения:

- Группа А) 1,5 мг плитидепсина, вводимого в виде 1,5-часовой инфузии один раз в сутки в течение 3 суток подряд (суммарная доза 4,5 мг).

- Группа В) 2,0 мг плитидепсина, вводимого в виде 1,5-часовой инфузии один раз в сутки в течение 3 суток подряд (суммарная доза 6,0 мг).

- Группа С) 2,5 мг плитидепсина, вводимого в виде 1,5-часовой инфузии один раз в сутки в течение 3 суток подряд (суммарная доза 7,5 мг).

Все пациенты за 20-30 минут до инфузии плитидепсина получали следующие профилактические лекарственные препараты:

- дифенгидрамина гидрохлорид 25 мг в/в или эквивалент;
- ранитидин 50 мг в/в или эквивалент;

- дексаметазон 6,6 мг внутривенно;
- ондансетрон 8 мг в/в в виде медленной 15-минутной инфузии или эквивалент.

Пациенты, включенные в исследование, получали лечение в течение 3 суток.

Плителидесин выпускают в виде порошка для приготовления концентрата для приготовления раствора для инфузии в концентрации 2 мг/флакон. Перед применением содержимое флаконов разводили 4 мл растворителя с получением раствора от бесцветного до слегка желтоватого цвета, содержащего 0,5 мг/мл плителидесина, 25 мг/мл маннита, 0,15 мл/мл масла рицинолеата макроголглицерина, 0,15 мл/мл этанола и 0,70 мл/мл воды для инъекций. Перед инфузией необходимо сделать дополнительное разведение в любом подходящем растворе для внутривенного введения.

Плителидесин 2 мг выпускают во флаконах из прозрачного стекла типа I с бромбутиловой резиновой пробкой, закрытой алюминиевым колпачком. В каждом флаконе содержится 2 мг плителидесина.

Растворитель для восстановления рицинолеат макроголглицерина (полиоксил 35 касторовое масло)/абсолютный этанол/вода для инъекций, 15%/15%/70% (об./об./об.), выпускают во флаконе из бесцветного стекла типа I. Ампулы имеют объем 4 мл.

Плителидесин будет промаркирован кодом протокола исследования, номером серии, составом, сроком годности, условиями хранения, именем исследователя и спонсора. Исследуемый препарат будет промаркирован в соответствии с Приложением 13 Европейской надлежащей производственной практики. Плителидесин следует хранить при температуре от 2°C до 8°C, а флаконы следует хранить в картонной упаковке для защиты от света. Лекарственный препарат в этих условиях стабилен в течение 60 месяцев.

После восстановления во флаконе 2 мг плителидесина с помощью 4 мл раствора рицинолеат макроголглицерина/этанол/вода для инъекций восстановленный раствор следует развести и использовать сразу после приготовления. Если продукт не используется немедленно, ответственность за время и условия хранения до использования лежит на пользователе. Было показано, что восстановленный концентрированный раствор лекарственного препарата физически, химически и микробиологически стабилен в течение 24 часов при хранении в холодильнике (5°C±3°C) и в течение 6 часов при хранении в оригинальном флаконе при внутреннем освещении при комнатной температуре. Если перед введением требуется хранение, растворы

следует хранить в холодильнике и в защищенном от света месте и использовать в течение 24 часов после восстановления.

Концентрация в плазме

На Фиг. 34 проиллюстрировано моделирование профилей общей концентрации плитидепсина в плазме в зависимости от времени после приема суточной дозы (D1-D5) 1,0 мг и 2,0 мг. Горизонтальные черные линии представляют общие концентрации в плазме, связанные с концентрациями в легких, эквивалентные IC_{50} , IC_{90} и $3 \times IC_{90}$ *in vitro*. При обоих уровнях дозы (1,0 мг и 2,0 мг) концентрации в плазме выше IC_{50} будут достигаться в течение всего периода лечения и будут оставаться выше IC_{90} в течение большей части интервала введения. Кумуляция после пяти повторных введений является минимальной.

Дальнейший режим дозирования составляет 1,5 мг в сутки в течение 5 суток. На Фиг. 35 проиллюстрирован дополнительный режим, который модулирует общие концентрации плитидепсина в плазме, связанные с начальной фиксированной дозой 1 мг (1 сутки), вводимой в виде 1-часовой в/в инфузии с последующим введением суточных доз по 0,5 мг (D2-D5). При таком режиме дозирования концентрации плитидепсина в плазме превышают IC_{50} в течение всего периода лечения и остаются выше IC_{90} в течение 18 и 14 часов после инфузии дозы 1 мг и 0,5 мг, соответственно. То есть прогнозируется минимальная кумуляция после повторного введения. Согласно этому режиму предусмотрена нагрузочная доза 1 мг плитидепсина, вводимая в виде 1-часовой в/в инфузии в первые сутки лечения, с последующим введением поддерживающей дозы 0,5 мг один раз в сутки в течение 4 суток.

На Фиг. 36 проиллюстрировано моделирование профилей общей концентрации плитидепсина в плазме в зависимости от времени после приема суточной дозы (D1-D3) 1,5 мг, 2,0 мг и 2,5 мг. Горизонтальные черные линии представляют общие концентрации в плазме, связанные с концентрациями в легких, эквивалентные IC_{50} , IC_{90} и $3 \times IC_{90}$ *in vitro*. При всех трех уровнях дозировки (1,5 мг, 2,0 мг и 2,5 мг) концентрации в плазме выше IC_{50} будут достигаться в течение всего периода лечения и будут оставаться выше IC_{90} в течение большей части интервала введения. Кумуляция после трех повторных введений является минимальной.

Промежуточные результаты

На сегодняшний день доступны данные по девяти пациентам. PLD вводили в виде 90-минутной в/в инфузии ежедневно в течение 3 суток подряд (1-3 сутки) с оценкой

вирусной нагрузки с помощью ПЦР на исходном уровне, на 4-е сутки, 7-е сутки, 15-е сутки и 31-е сутки.

Пациент 1: мужчина 50 лет, двусторонняя пневмония. Получал PLD 1,5 мг×3. ПЦР-тест на COVID 19: ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ на исходном уровне, сменился на ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ (отсутствие вирусной нагрузки) на 4-е сутки. Резкое клиническое улучшение. Выписка из стационара на 7-е сутки. Таким образом, при PLD 1,5 мг×3 вирусная нагрузка была подавлена на 4-е сутки. С PLD достигнуто резкое клиническое улучшение, включая подавление всей вирусной нагрузки и лечение двусторонней пневмонии, что позволило выписать пациента из стационара на 7-е сутки.

Пациент 2: мужчина 40 лет, двусторонняя пневмония. Получал PLD 1,5 мг×3. На шестые сутки улучшение не наступило, переход на ремдесивир плюс ТОЛ плюс кортикостероиды плюс опиаты. ПЦР сменился на отрицательный на 15-е сутки, выписка из стационара на 19-е сутки.

Пациент 3: мужчина 53 лет, двусторонняя пневмония. Получал PLD 1,5 мг×3. PLD предотвратил клиническое ухудшение. Выписка из стационара на 10-е сутки, ПЦР сменился на отрицательный на 31-е сутки.

Пациент 4: мужчина 42 лет, двусторонняя пневмония. Получал PLD 2,0 мг×3. Потребовалась терапия кортикостероидами. ПЦР-тест на COVID-19: ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ на исходном уровне и все еще положительный на 7-е сутки. На 15-е сутки у пациента был отрицательный результат ПЦР, как показано на Фиг. 42а. Пациент в достаточной степени восстановился для выписки из стационара на 10-е сутки.

Пациент 5: женщина 33 лет, двусторонняя пневмония при поступлении. Получала PLD 1,5 мг×3. ПЦР-тест на COVID 19: ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ на исходном уровне, сменился на ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ (отсутствие вирусной нагрузки) на 4-е сутки, как показано на Фиг. 42b. Двусторонняя пневмония регрессировала на 6-е сутки (нормальное R_x Lung). Значительное клиническое улучшение. Выписка из стационара на 8-е сутки. Рентгенограммы, показывающие регрессию пневмонии, показаны на Фиг. 39а-с. На Фиг. 39а явно видна двусторонняя пневмония. После лечения PLD отмечено улучшение на 6-е сутки. На Фиг. 39b показан пластинчатый ателектаз. Последующее рентгенологическое исследование на 15-е сутки показало возвращение к норме на Фиг. 39с. При PLD 1,5 мг×3 вирусная нагрузка была подавлена на 4-е сутки. С PLD достигнуто значительное клиническое улучшение, включая подавление всей

вирусной нагрузки и лечение двусторонней пневмонии, что позволило выписать пациента из стационара на 8-е сутки.

Пациент 6: женщина 69 лет, ХОБЛ с выраженными симптомами. Односторонняя пневмония при поступлении. Получала PLD 1,5 мг×3. ПЦР-тест на COVID 19: ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ на исходном уровне, сменился на ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ (отсутствие вирусной нагрузки) на 7-е сутки, как показано на Фиг. 42с. Видно значительное клиническое улучшение. Пациент выписан на 8-е сутки. Рентгеновские снимки, показывающие прогрессирование пневмонии, показаны на Фиг. 40а-с. На Фиг. 40а явно видна односторонняя пневмония, которая прогрессировала до двусторонней пневмонии на Фиг. 40b. На Фиг. 40с видно улучшение. С PLD достигнуто значительное клиническое улучшение, включая подавление всей вирусной нагрузки и лечение пневмонии, как показано на Фиг. 40d, что позволило выписать пациента из стационара на 8-е сутки.

Пациент 7: женщина 39 лет, инфильтративные изменения в легких. Получала PLD 2,0 мг×3. ПЦР-тест на COVID 19: ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ на исходном уровне, сменился на ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ (отсутствие вирусной нагрузки) на 7-е сутки, как показано на Фиг. 42d. После лечения PLD значительное клиническое улучшение. Выписка из стационара на 8-е сутки.

Пациент 8: мужчина 32 лет. Получал PLD 1,5 мг×3. Эффективность не поддается оценке, выписка из стационара на 4-е сутки.

Пациент 9: мужчина 34 лет. Получал PLD 2,0 мг×3. ПЦР-тест на COVID-19: ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ на исходном уровне и все еще положительный на 7-е сутки. Однако значительное клиническое улучшение и выписка из стационара на 8-е сутки.

Анализы на С-реактивный белок

У пациентов 5, 7 и 9 также измеряли влияние PLD на воспалительные цитокины, и результаты анализов на С-реактивный белок показаны на Фиг. 41. У пациента 5 (Фиг. 41а) после введения PLD наблюдается резкое падение на 2-е сутки. У пациентов 7 (Фиг. 41b) и 9 (Фиг. 41с) после введения PLD резкое падение наблюдается на 3-и сутки. Эти данные демонстрируют противовоспалительные свойства PLD.

Обсуждение

Предварительные результаты клинических испытаний PLD на пациентах с COVID-19 еще раз демонстрируют замечательные свойства PLD при лечении инфекции SARS-CoV-2 и COVID-19.

6 из 8 поддающихся оценке пациентов продемонстрировали изменения ПЦР-теста при SARS-CoV-2 на отрицательный, при этом медианное время изменения ПЦР составило 7 суток (4-31). Противовирусные свойства PLD при инфекции CoV, а именно SARS-CoV-2, клинически продемонстрированы с полным подавлением вирусной нагрузки.

Примечательно, что из 9 пациентов, протестированных на данный момент, благодаря введению PLD ни один из пациентов не нуждался в искусственной вентиляции легких или в помещении в отделение интенсивной терапии, и в ходе исследования не было смертей. С PDL достигался контроль над заболеванием и значительные клинические улучшения у 6 из 8 пациентов, поддающихся оценке, и только 2 из 8 нуждались в специфической терапии против COVID-19 после PLD. Медианное время до выписки из стационара составило 8 суток (7-19). Эти результаты демонстрируют, что PLD является эффективной терапией инфекции SARS-CoV-2 и COVID-19, а также пневмонии, вызванной инфекцией SARS-CoV-2.

Специальный анализ первой когорты при дозах 1,5 мг и 2 мг подтвердил, что PLD в введенных дозах был активен, приводил к быстрому улучшению и полному контролю над заболеванием. Полное подавление вирусной нагрузки отмечено у подавляющего большинства пациентов.

Результаты

По завершении исследования 45 пациентов, госпитализированных с COVID-19, были рандомизированы для лечения плитидепсином в дозах 1,5, 2,0 и 2,5 мг ежедневно в течение 3 суток. Лечение хорошо переносилось во всех 3 дозовых когортах. Результаты лечения, оцениваемые по частоте выписки из стационара, зависели от тяжести заболевания и исходной вирусной нагрузки. Во всех дозовых когортах 100% (9/9) пациентов с легким заболеванием, 82% (23/28) с заболеванием средней степени тяжести и 57% (4/7) с тяжелым заболеванием были выписаны на 15-е сутки. Во всех дозовых когортах медиана вирусной нагрузки на исходном уровне составляла 6,2 (от 0 до 10,6) \log_{10} копий/мл, а среднее снижение вирусной нагрузки на -3,1 \log_{10} копий/мл было достигнуто на 7-е сутки и -4,5 \log_{10} копий/мл на 15-е сутки.

Исследование представляло собой многоцентровое открытое исследование фазы 1, в котором 45 пациентов, госпитализированных для лечения COVID-19, были рандомизированы на 3 дозовые группы, включающие 1,5, 2,0 и 2,5 мг плитидепсина, вводимого в виде 1,5-часовой в/в инфузии один раз в сутки в течение 3 суток подряд.

Основная цель этого исследования состояла в том, чтобы определить профиль безопасности и токсикологический профиль при каждом уровне дозы исходя из (1) частоты нежелательных явлений, возникающих в ходе лечения, (TEAE) не менее чем 3 степени на 3, 7, 15 и 31 сутки с использованием общих терминологических критериев нежелательных явлений (CTCAE), версия 5.0, Национального института онкологии США (NCI); (2) процента пациентов, не способных завершить лечение, и причин; (3) процента пациентов с TEAE и SAE (тяжелые нежелательные явления) на 3, 7, 15 и 31 сутки; (4) изменения исходных гематологических и негематологических параметров на 3, 7, 15 и 31 сутки; и (5) процента пациентов с отклонениями ЭКГ на 2, 3, 4, 5, 6, 7, 15 и 31 сутки. Вторичная цель состояла в том, чтобы выбрать рекомендуемую дозу для опорного исследования.

Результаты для конечных точек безопасности, указанных в протоколе, резюмированы следующим образом:

- AE (нежелательные явления) не менее чем 3 степени: только у 31% (14/45) пациентов наблюдались AE не менее чем 3 степени, и только у 2 пациентов развились AE не менее чем 3 степени, связанные с лечением: по 1 случаю анафилактической реакции во время первой инфузии плитидепсина, что привело к прекращению лечения, и случай диареи, который не повлиял на лечение плитидепсином. В соответствии с тем, что AE не менее чем 3 степени в основном связаны с инфекцией COVID-19, распространенность AE не менее чем 3 степени в значительной степени отражала процент пациентов с тяжелым заболеванием в каждой когорте, с самой высокой распространенностью в когорте 2,5 мг (26,7% с тяжелым заболеванием, 40,0% AE не менее чем 3 степени), более низкий процент в когорте 1,5 мг (13,3% с тяжелым заболеванием, 33,3% AE не менее чем 3 степени) и самый низкий процент в когорте 2,0 мг (6,7% с тяжелым заболеванием, 20,0% AE не менее чем 3 степени). Ни одно из событий, представляющих особый интерес, не произошло, за исключением 1 случая повышения ALT (аланинтрансаминаза) не менее чем 3 степени.

- Пациенты, которые не смогли завершить лечение: только 1 пациент не смог завершить лечение плитидепсином.

- Пациенты с SAE: в общей сложности 10 пациентов испытывали SAE, в том числе 6 пациентов, получавших дозу 1,5 мг, 1 пациент, получавший дозу 2,0 мг, и 3 пациента, получавших дозу 2,5 мг. За исключением 1 случая анафилактической реакции, все эти события были связаны с инфекцией COVID-19.

- Пациенты с АЕ: для любых регистрируемых АЕ не было отмечено дозозависимых тенденций, а наиболее часто регистрируемые АЕ (за исключением инфекций) соответствовали профилю безопасности, наблюдаемому у пациентов с прогрессирующими гематологическими злокачественными новообразованиями и солидными опухолями, получающих плитидепсин в качестве монотерапии, включая желудочно-кишечные расстройства в виде запора (29% против 18% для пациентов с раком и COVID-19, соответственно), диареи (31% против 18%), тошноты (64% против 42%) и рвоты (38% против 18%) и генерализованные симптомы астении/усталости (83% против 13%) и лихорадки (28% против 47%).

- Изменения лабораторных параметров: хотя приблизительно у половины пациентов (51%) наблюдалось изменение гематологических параметров не менее чем 1 степени, а у большинства пациентов (89%) в ходе исследования наблюдалось изменение биохимических показателей не менее чем 1 степени, у немногих пациентов наблюдалось изменение более 1 степени. По гематологическим показателям у 6 пациентов имелось ухудшение лимфопении на 2-3 степени, а у 2 пациентов ухудшение нейтропении на 2 степени. По химическим показателям у 5 пациентов имелось повышение ALT (аланинтрансаминаза) на 2-3 степени, у 2 пациентов повышение AST (аспартаттрансаминаза) на 2-3 степени, у 2 пациентов повышение GGT (*гамма*-глутамилтрансфераза) на 2-3 степени и у 1 пациента повышение СРК (креатинфосфокиназа) на 2 степени.

На основании этих результатов сделан вывод, что лечение плитидепсином хорошо переносилось, и не было возможности обнаружить разницу в безопасности между 3 исследуемыми дозами.

Эффективность у пациентов с COVID-19

Эффективность оценивали в общей сложности у 44 пациентов; у 1 пациента в когорте 1,5 мг, у которого развилась анафилактическая реакция во время первой инфузии плитидепсина, лечение было прекращено, и его эффективность не оценивали. Результаты для конечных точек эффективности, указанных в протоколе, показали эквивалентные результаты для всех 3 дозовых когорт (Таблица 3). Результаты лечения зависели от исходной тяжести заболевания и вирусной нагрузки. В соответствии с этими результатами недавнее исследование показало, что вирусная нагрузка SARS-CoV-2 связана с повышенной тяжестью заболевания и смертностью. Во всех дозовых когортах 100% (9/9) пациентов с легким заболеванием были выписаны на 15-е сутки по сравнению

с 82% (23/28) с заболеванием средней степени тяжести и 57% (4/7) с тяжелым заболеванием.

Конечная точка	Дозовая когорта			
	1,5 мг N=14 ^A	2,0 мг N=15	2,5 мг N=15	Суммарно N=44
Пациенты, выписанные из стационара на	n (%)			
8 сутки	6 (42,9)	9 (60,0)	10 (66,7)	25 (56,8)
15 сутки	11 (78,6)	14 (93,3)	11 (73,3)	36 (81,8)
31 сутки	13 (92,9)	14 (93,3)	13 (86,7)	40 (90,9)
Смертность с 1 суток по				
7 сутки	0	0	0	0
15 сутки	0	0	0	0
31 сутки	1 (7,1)	0	1 (6,7)	2 (4,5)
Пациенты, нуждающиеся в инвазивной искусственной вентиляции легких и/или госпитализации в ОИТ с 1-х суток по				
7 сутки	2 (14,3)	1 (6,7)	2 (13,3)	5 (11,4)
15 сутки	2 (14,3)	1 (6,7)	3 (20,0)	6 (13,6)
31 сутки	2 (14,3)	1 (6,7)	3 (20,0)	6 (13,6)
Пациенты, нуждающиеся в неинвазивной искусственной вентиляции легких с 1-х суток по				
7 сутки	3 (21,4)	0	1 (6,7)	4 (9,1)
15 сутки	3 (21,4)	0	2 (13,3)	5 (11,4)
31 сутки	3 (21,4)	1 (6,7)	2 (13,3)	6 (13,6)
Пациенты, нуждающиеся в госпитализации в ОИТ с 1-х суток по				
7 сутки	2 (14,3)	1 (6,7)	2 (13,3)	5 (11,4)
15 сутки	2 (14,3)	1 (6,7)	3 (20,0)	6 (13,6)
31 сутки	2 (14,3)	1 (6,7)	3 (20,0)	6 (13,6)
Пациенты, нуждающиеся в оксигенотерапии на				
7 сутки	10 (71,4)	10 (66,7)	11 (73,3)	31 (70,5)

15 сутки	4 (28,6)	1 (6,7)	4 (26,7)	9 (20,5)
31 сутки	0	2 (13,3)	1 (6,7)	3 (6,8)
Среднее изменение вирусной нагрузки от исходного уровня на ^B	log ₁₀ копий/мл			
4 сутки	-1,58	-1,92	-2,16	-1,90
7 сутки	-3,39	-2,69	-3,21	-3,07
15 сутки	-5,47	-3,62	-4,40	-4,48
31 сутки	-6,06	-4,71	-5,20	-5,27
Среднее время от исходного уровня до неопределяемой вирусной нагрузки, сутки	7	13	12	11

Таблица 3. Сводные данные конечных точек эффективности, указанных в протоколе, в исследовании APLICOV-PC

Аббревиатуры: ОИТ - отделение интенсивной терапии

А: Лечение пациента, у которого развилась анафилактическая реакция во время первой инфузии плитидепсина, было прекращено, и его эффективность не оценивали.

В: Результаты основаны на данных 39 пациентов: 1 пациент пропустил оценку исходной вирусной нагрузки, а у 4 пациентов исходная вирусная нагрузка была ниже предела количественного определения, несмотря на положительный результат теста полимеразной цепной реакции в течение 48 часов до включения в исследование.

Заключение о соотношении польза-риск

В исследовании APLICOV-PC у большинства пациентов (84%) имелось заболевание от легкой до средней степени тяжести, а 82% пациентов были выписаны на 15-е сутки. Поскольку прогрессирующее ухудшение дыхательной функции и развитие синдрома высвобождения цитокинов обычно происходят в среднем через 10 суток после появления симптомов, считают, что конечная точка выписки из стационара на 15-е сутки отражает успешное уменьшение интенсивности угрожающих жизни осложнений.

Апостериорный анализ показал, что ответ на лечение, оцениваемый по частоте выписки из стационара, коррелировал с исходной тяжестью заболевания и вирусной нагрузкой. В дозовых когортах 100% (9/9) пациентов с легким заболеванием были выписаны на 15-е сутки по сравнению с 82% (23/28) с заболеванием средней степени тяжести и 57% (4/7) с тяжелым заболеванием.

В исследовании APLICOV-PC медиана исходной вирусной нагрузки составляла 6,1 log₁₀ копий/мл, а на 15-е сутки наблюдали среднее снижение вирусной нагрузки на

-4,2 log₁₀. Эти результаты подтверждают вывод о том, что плитидепсин снижает репликацию вируса.

Принимая во внимание низкую частоту связанных с приемом лекарств АЕ не менее чем 3 степени и высокую частоту выписки на 15-е сутки, а также среднее снижение исходной вирусной нагрузки на -4,2 log₁₀ на 15-е сутки (зарегистрированное снижение на -3,0 log для пациентов с заболеванием средней степени тяжести), продемонстрировано положительное соотношение пользы и риска плитидепсина для лечения пациентов, госпитализированных с инфекцией COVID-19.

ПРИМЕР 8

Активность плитидепсина в отношении SARS-CoV-2 была дополнительно подтверждена в анализе *in vitro* с использованием клеток Vero.

Вирус и клетки

SARS-CoV-2 был получен из Корейских центров по контролю и профилактике заболеваний (KCDC). Клетки Vero были получены из Американской коллекции типовых культур (ATCC CCL-81).

Анализ кривой зависимости доза-эффект (DRC) посредством иммунофлуоресценции

Соединение готовили посредством двукратных серийных разведений с 20 точками концентраций с помощью DMSO и Ampolla (кремофор:этанол:вода (15:15:70)) соответственно. Через 24 часа после посева клетки обрабатывали соединением при максимальной концентрации 5 мкМ. Через час планшеты переносили в контейнер BSL-3 для инфицирования вирусом и добавляли SARS-CoV-2 при множественности заражения (MOI) 0,0125. Планшеты инкубировали при 37°C в течение 24 часов. Клетки фиксировали через 24 часа после инфицирования с помощью 4% параформальдегида (PFA) для пермеабилзации. Клетки обрабатывали 1-м антителом против нуклеокапсида (N) SARS-CoV-2 и 2-м 488-конъюгированным козьим анти-кроличьим IgG-антителом, и обрабатывали красителем Hoechst 33342 для окрашивания клеток для анализа посредством иммунофлуоресценции. Изображения, полученные с помощью системы клеточной визуализации Operetta (Perkin Elmer), анализировали с использованием собственного программного обеспечения для количественного определения числа клеток и степени инфицирования, а противовирусную активность нормализовали к положительному (имитация) и отрицательному (0,5% DMSO) контролям в каждой планшете для анализа.

DRC (кривые доза-эффект) были подобраны с помощью сигмоидальных моделей доза-эффект по следующему уравнению: $Y = Bottom + (Top - Bottom)/(1 + (IC50/X)^{Hillslope})$ с использованием программного обеспечения XLfit 4 или Prism7. Значения IC₅₀ рассчитывали из нормированных кривых, соответствующих набору данных активности. Все значения IC₅₀ и CC₅₀ измеряли в двух повторностях, и качество каждого анализа контролировали с помощью Z'-фактора и коэффициента вариабельности в процентах (%CV).

Кривые доза-эффект показаны на Фиг. 37А-С (три повтора). Синие квадраты представляют ингибирование вирусной инфекции (%), а красные треугольники представляют жизнеспособность клеток (%). Средние значения ± стандартное отклонение рассчитывали исходя из повторных экспериментов. Плитидепсин был способен ингибировать вызванные вирусом цитопатические эффекты (квадраты) в концентрациях, при которых цитотоксические эффекты препарата не наблюдались (кружки) во всех экспериментах. В этом эксперименте плитидепсин имел IC₅₀ 0,0033-0,0039 мкМ по сравнению с CC₅₀ 0,178-0,431 мкМ, что дает SI 49,95-129,92.

ПРИМЕР 9

Активность плитидепсина в отношении SARS-CoV-2 была дополнительно подтверждена в отдельном анализе *in vitro* с использованием клеток Vero.

Культуры клеток

Клетки Vero E6 (ATCC CRL-1586) культивировали в модифицированной по способу Дульбекко среде Игла (DMEM; Lonza) с добавлением 5% фетальной телячьей сыворотки (FCS; EuroClone), 100 ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 2 мМ глутамина (все от компании ThermoFisher Scientific).

Выделение вируса, титрование и секвенирование

Вирус SARS-CoV-2 был выделен из мазка из носоглотки, взятого у 89-летнего пациента мужского пола, давшего информированное согласие и получавшего бетаферон и гидроксихлорохин в течение 2 суток перед отбором образца. Мазок отбирали в 3 мл среды (Deltaswab VICUM) для снижения вязкости и хранили при -80°C до использования. Клетки Vero E6 культивировали в колбе для культивирования клеток (25 см²) в количестве $1,5 \times 10^6$ клеток в течение ночи перед инокуляцией 1 мл обработанного образца, в течение 1 часа при 37°C и 5% CO₂. После этого добавляли 4 мл DMEM с добавлением 2% FCS, и клетки инкубировали в течение 48 часов. Супернатант собирали, центрифугировали при 200×g в течение 10 мин для удаления

клеточного дебриса и хранили при -80°C . Клетки ежедневно оценивали на цитопатический эффект и супернатант подвергали экстракции вирусной РНК и специфической ОТ-кПЦР (количественной ПЦР с обратной транскрипцией) с использованием анализов области генов *UpE*, *RdRp* и *N* вируса SARS-CoV-2 (Corman et al., 2020). Вирус размножали за два пассажа, и вирусный материал готовили, собирая супернатант с Vero E6.

Вирусную РНК экстрагировали непосредственно из вирусного материала с использованием набора Indimag Pathogen (Indical Biosciences) и транскрибировали в кДНК с использованием набора реагентов PrimeScript™ RT (Takara) с использованием олиго-dT и случайных гексамеров в соответствии с инструкцией производителя. Подготовку библиотеки ДНК проводили с использованием панели SWIFT amplicon SARS-CoV-2 (Swift Biosciences). Затем готовые библиотеки для секвенирования загружали на платформу MiSeq Illumina и набор для секвенирования парных концов на 300 пар оснований. Чтения последовательностей отфильтровывали по качеству, а последовательности адаптерных праймеров обрезали с использованием триммоматика (trimmomatic). Последовательности праймеров для амплификации удаляли с помощью программы Cutadapt (Martin, 2011). Затем чтения последовательностей картировали на референсную последовательность коронавируса (NC_045512.2) с использованием программного инструмента Bowtie2 (Langmead, B. and Salzberg, S, 2012). Консенсусную геномную последовательность задавали из полученного выравнивания при среднем перекрытии $18 \times 1800 \times 879$ с использованием набора утилит Samtools (Li et al., 2009). Геномная последовательность была депонирована в репозитории GISAID (<http://gisaid.org>) под номером доступа EPI_ISL_510689.

Соединение

Плтидеспин использовали в диапазоне концентраций от 100 М до 0,0512 нМ при серийных разведениях 1/5, а также анализировали от 10 мкМ до 0,5 нМ при разведениях 1/3.

Противовирусная активность

Плтидеспин в возрастающих концентрациях добавляли к клеткам Vero E6 вместе с $10^{1.8}$ TCID₅₀/мл SARS-CoV-2, концентрация, при которой достигается 50% цитопатического эффекта. Неэкспонированные клетки использовали в качестве отрицательного контроля инфекции. Для обнаружения любого цитотоксического эффекта, связанного с лекарственным средством, клетки Vero E6 аналогичным образом

культивировали в присутствии увеличивающихся концентраций лекарственного средства, но в отсутствие вируса. Цитопатические или цитотоксические эффекты вируса или лекарственных средств измеряли через 3 суток после инфицирования с использованием люминесцентного анализа жизнеспособности клеток CellTiter-Glo (Promega). Люминесценцию измеряли на люцинометре Fluoroskan Ascent FL (ThermoFisher Scientific).

Расчет IC₅₀ и статистический анализ

Кривые отклика были скорректированы в соответствии с нелинейной регрессионной моделью, рассчитанной с помощью четырехпараметрической логистической кривой с переменным наклоном. Клетки, не подвергшиеся воздействию вируса, использовали в качестве отрицательного контроля инфекции и принимали за 100%-ную жизнеспособность, а также использовали для нормализации данных и расчета процента цитопатического эффекта. Статистические отличия от 100% оценивали с помощью t-критерия для одной выборки. Все анализы и фигуры были созданы с помощью программного обеспечения GraphPad Prism v8.0b.

Цитопатический эффект на клетки Vero E6, подвергшиеся воздействию фиксированной концентрации SARS-CoV-2 в присутствии возрастающих концентраций плитидепсина, показан на Фиг. 38. Лекарственный препарат использовали в диапазоне концентраций от 10 мкМ до 0,5 нМ при разведении 1/3. Показана нелинейная аппроксимация к переменной кривой отклика из одного репрезентативного эксперимента в двух повторностях (квадраты). Конкретное значение IC₅₀ для этого эксперимента указано на данной фигуре. Также показан цитотоксический эффект на клетки Vero E6, подвергнутые воздействию возрастающих концентраций плитидепсина в отсутствие вируса (кружки).

SARS-CoV-2 в постоянной концентрации смешивали с плитидепсином в возрастающих концентрациях и добавляли к клеткам Vero E6. Для контроля вызванной лекарственным препаратом цитотоксичности клетки Vero E6 также культивировали с возрастающими концентрациями плитидепсина в отсутствие SARS-CoV-2. Плитидепсин был способен ингибировать индуцированные вирусом цитопатические эффекты (красные квадраты) в концентрациях, при которых не наблюдалось цитотоксических эффектов лекарственного препарата (серые кружки). Среднее значение IC₅₀ и стандартное отклонение для плитидепсина в двух экспериментах с двумя повторностями каждый составило $0,06 \pm 0,02$ мкМ.

ПРИМЕР 10

Цель данного эксперимента заключалась в оценке *in vivo* воздействия плитидепсина при лечении тяжелой пневмонии, вызванной адаптированным для мышей вирусом гриппа A/H1N1 (A/Puerto Rico/8/34), а также на уровне титра вируса.

Постановка эксперимента: для достижения этой цели авторы использовали *in vivo* модель вирусного патогенеза, основанную на введении высоких доз вируса гриппа PR8 (2×10^5 БОЕ), что вызывало тяжелую инфекцию в легких. Затем авторы оценили терапевтическое действие плитидепсина на тяжелую инфекцию вируса гриппа у мышей. Самок мышей в возрасте 9 недель анестезировали посредством внутривентральной инъекции раствора кетамин-ксилазин и проводили инфицирование посредством интраназального введения PBS раствора вируса по 20 мкл в ноздри.

Мышам, получавшим лечение, вводили подкожно 0,3 мг/кг или 0,15 мг/кг плитидепсина. Затем контролировали выживаемость и потерю массы тела до 3-х суток после введения. За время лечения не было зарегистрировано ни одной гибели мышей или мышей с потерей массы тела более 30% от исходной массы тела.

Контроль гриппозной инфекции в дыхательных путях осуществляли по усилению воспаления в жидкости бронхоальвеолярного лаважа (ЖБАЛ). На Фиг. 43 показан воспалительный профиль в ЖБАЛ инфицированных мышей при лечении плитидепсином или без него. Среди основных провоспалительных цитокинов плитидепсин сильно снижал уровни IL-6, CCL2, IL-1 α , IFN- γ и TNF- α . Мыши, получавшие только половину дозы лекарственного препарата, были менее защищены и демонстрировали промежуточный фенотип.

Также оценивали титр вируса в легких. Как показано на Фиг. 44, плитидепсин снижал титр вируса в легких как при 0,3 мг/кг, так и при 0,15 мг/кг.

Клеточный состав ЖБАЛ рассматривают в качестве маркера иммунного ответа на вирусную инфекцию в легких. Количественное измерение инфильтрирующих клеток по отношению к уровням воспалительных цитокинов проводили у мышей, инфицированных гриппом. Лечение плитидепсином не снижало общий клеточный состав ЖБАЛ ($CD45^+ \times 10^6$). Как показано на Фиг. 45, авторы также обнаружили увеличение инфильтрации альвеолярными макрофагами (AM), что свидетельствует о том, что AM способствуют элиминации вируса.

В совокупности эти результаты подтвердили, что три последовательных введения (суммарная доза 0,9 мг/кг) плитидепсина мышам, инфицированным гриппом, могут

положительно уменьшать воспаление, о чем свидетельствует снижение ранних провоспалительных цитокинов в результате лечения. Кроме того, авторы обнаружили увеличение абсолютного числа альвеолярных макрофагов, что может свидетельствовать о том, что АМ играют критическую роль в распространении вируса и защите. Авторы также наблюдали пониженный титр вируса в легких мышей, получавших высокую дозу плитидепсина.

ПРИМЕР 11

В данном примере изучали противовирусную активность плитидепсина в отношении распространения вируса Западного Нила в культуре клеток.

а) Рекомбинантный вирус WNV-GFP (линия 2; молекулярный клон WN956) в клетках гепатомы человека (Huh7) и клетках почек африканской зеленой мартышки (Vero-E6).

Для определения противовирусного потенциала плитидепсина в отношении ВЗН-GFP клеточные линии-мишени Vero-E6 и Huh7 инокулировали разведением исходного патогенного вируса в присутствии возрастающих концентраций плитидепсина, начиная с 2,3 пМ или 2,5 пг/мл и используя 4,5 мкМ или 5 мкг/мл как самую высокую концентрацию. Эффективность инфицирования оценивали через 48 часов, после того как вирус распространился на значительную часть клеток-мишеней в культурах, обработанных носителем.

Относительную эффективность инфицирования оценивали с помощью автоматизированной флуоресцентной микроскопии в зеленом канале, а общую биомассу клеток на лунку оценивали посредством окрашивания ядер с помощью DAPI в синем канале в качестве предварительной оценки эффективных доз соединения, а также общей цитотоксичности соединения.

Как показано на Фиг. 46, эффективность инфицирования WNV-GFP быстро снижалась при дозах около 5 нМ в клетках VeroE6, достигая фоновых уровней флуоресценции при 36 нМ и выше. Количество клеток оставалось неизменным до 36 нМ, но значительно уменьшалось при более высоких концентрациях (180 нМ; p менее 0,05), что свидетельствует о том, что плитидепсин влияет на способность клеток к размножению при концентрациях выше 36 нМ. Расчетное значение EC_{50} для плитидепсина в клетках VeroE6 составляет 4,9 нМ, а EC_{90} составляет 9,5 нМ. Исходя из клеточной биомассы, значение CC_{50} составляет 2330 нМ. Таким образом,

терапевтический индекс, выраженный как отношение CC_{50}/EC_{50} в клетках VeroE6, составляет 475.

В клетках Huh7, как показано на Фиг. 47, наблюдается дозозависимое снижение эффективности инфицирования со значениями EC_{50} и EC_{90} , равными 0,665 и 3,86 нМ, соответственно. Это снижение связано с параллельной потерей клеточной биомассы в лунке, что является статистически значимым при 7,2 нМ (p менее 0,05) со значением CC_{50} , равным 14,7 и терапевтическим индексом 22.

Приведенные выше данные показывают, что плитидепсин препятствует размножению WNV-GFP в моделях инфицирования клеточных культур как в клетках Vero-E6, так и в клетках Huh-7. В одном примере противовирусную активность при отсутствии измеримого вмешательства в жизнеспособность клеток можно наблюдать при 1,5 нМ (p менее 0,05) в клетках Huh-7 и 7,2 нМ (p менее 0,05) в клетках Vero-E6.

б) Рекомбинантный вирус с геномом дикого типа WNV-NY99 (линия 1; молекулярный клон NY99) в клетках гепатомы человека Huh7 и клетках почки африканской зеленой мартышки (Vero-E6).

В этом примере оценивали влияние плитидепсина на размножение WNV-NY99 с использованием вирусной нагрузки РНК в качестве показателя эффективности инфекции. Клетки Vero-E6 или Huh-7 инокулировали (MOI 0,01) рекомбинантным вирусом на основе штамма NY99 WNV. Инфицирование проводили в присутствии носителя или плитидепсина в диапазоне доз, проявляющих биологическую активность в модели WNV-GFP (45, 15, 5, 1,5 нМ; см. выше). Инокулированные клетки инкубировали в течение 48 часов, время, за которое образцы супернатантов обрабатывали для определения эффективности инфицирования посредством титрования внеклеточной инфекционности. Кроме того, из контрольных клеток и клеток, обработанных плитидепсином, экстрагировали суммарную РНК для определения вирусной нагрузки РНК и независимой оценки общей эффективности инфицирования вирусом.

Титры внеклеточной инфекционности показывают, что присутствие плитидепсина сильно препятствует размножению WNV, как показано на Фиг. 48, со снижением более чем на 3 порядка при 45 нМ в клетках VeroE6 и Huh-7. Это явление является дозозависимым в обеих клеточных линиях.

Внутриклеточную нагрузку РНК WNV определяли с помощью ОТ-кПЦР в контрольных и обработанных плитидепсином клетках. Следует отметить, что, как показано на Фиг. 49, из клеток Huh-7, обработанных 45 нМ плитидепсина, не удалось

выделить РНК. Тем не менее, вирусная нагрузка РНК была определена в остальных группах образцов в обеих клеточных линиях. В соответствии с тенденцией, проявляемой титрами внеклеточной инфекционности, вирусная нагрузка РНК значительно снижалась дозозависимым образом при 15 и 45 нМ в клетках Vero-E6, в то время как вирусная нагрузка при 5 и 1,5 нМ не отличалась от таковой в контроле (Фиг. 49). Точно так же в клетках Huh-7 показано заметное снижение вирусной нагрузки при 15 нМ, величина которой снижалась дозозависимым образом.

Данные об эффективности распространения инфекции WNV подтверждают, что плитидепсин препятствует репликации вируса в дозах выше 5 нМ как в клетках Vero-E6, так и в клетках Huh-7, хотя некоторое влияние может наблюдаться при более низких концентрациях в клетках Huh-7. Результаты измерения общей эффективности размножения с использованием функционального (инфекционность), а также молекулярного (ОТ-кПЦР) подходов подтверждают, что плитидепсин снижает эффективность размножения вируса в ожидаемом диапазоне концентраций на основании данных, полученных с помощью WNV-GFP.

Таким образом, добавление в среду для культивирования клеток увеличивающихся доз плитидепсина приводило к сильному снижению эффективности размножения WNV в моделях с двойным инфицированием (WNV-GFP и WNV/NY99) и в клетках Vero-E6 и Huh-7.

в) Способы

Приготовление соединения: предварительно взвешенное твердое вещество разбавляли до конечного раствора 1 мг/мл в диметилсульфоксиде (DMSO) и разделяли на аликвоты при -20°C до дальнейшего использования. Культура клеток: субконфлюэнтные культуры клеток Vero-E6 и клеток Huh-7 поддерживали на полных средах [(DMEM с добавлением 10 mM HEPES (4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота), 1× заменимых аминокислот (Gibco), 100 ед/мл пенициллина-стрептомицина (Gibco) и 10% фетальной бычьей сыворотки (инактивированной нагреванием при 56°C в течение 30 мин)].

Вирусы: рекомбинантные вирусы WNV (NY99) и WNV-GFP выделяли из клонированной кДНК, как описано ранее. Исходные титры инфекционности определяли посредством метода бляшек на клетках Vero-E6, как описано ранее.

Часть 1: модель WNV-GFP

Эксперименты по инфицированию: клетки высевали на 96-луночные планшеты (2×10^4 клеток/луночка). На следующие сутки готовили серийные 5-кратные разведения плитидепсина в полных средах, содержащих 2% FCS, до достижения указанных конечных концентраций. Исходный материал WNV-GFP разводили в полной среде, содержащей 2% FCS, для достижения требуемой множественности заражения (MOI 0,01). Разведения соединения и вируса смешивали 1:1 и добавляли к клеткам-мишеням. Клетки инкубировали 48 часов при 37°C; 5% CO₂ и 95% влажности.

Клетки фиксировали посредством добавления 5× раствора формальдегида до достижения конечной концентрации 4% в течение 30 минут при комнатной температуре. Клетки промывали PBS и окрашивали DAPI (4',6-диамидино-2-фенилиндол) в соответствии с рекомендациями производителя. Относительную эффективность инфицирования оценивали с помощью анализа изображений на автоматизированной установке для микроскопии (Tecan Spark Cyto). Неинфицированные клетки и контроли, обработанные носителем, были включены в каждый планшет.

Часть 2: модель WNV (NY99)

Клетки высевали на 24-луночный планшет, используя $1,2 \times 10^5$ клеток/луночка. На следующий день клетки инокулировали исходным материалом WNV/NY99 для достижения множественности заражения 0,01 (MOI 0,01) и указанной концентрации плитидепсина в конечном объеме 1 мл. Культуры поддерживали при 37°C в течение 48 часов, время, за которое супернатанты собирали и хранили при -80°C. Общую РНК собирали из клеток, добавляя реагент Trizol™ непосредственно к клеткам и следуя инструкциям производителя.

Титрование инфекционности: титры инфекционности определяли с помощью конечного разведения и иммунофлуоресцентной микроскопии с использованием моноклонального антитела против белка Е флавивируса (4G2; ATCC® HB-112™). Вкратце, клетки Huh-7 инокулировали разведениями супернатанта в 96-луночном формате. Через 48 часов после инфицирования клетки фиксировали в течение 30 минут при комнатной температуре 4% раствором формальдегида в PBS, дважды промывали PBS и инкубировали со связывающим буфером (0,3% Triton X-100, 3% BSA (бычий сывороточный альбумин) в PBS) в течение 1 часа. Первичное антитело разводили в буфере для связывания и инкубировали с клетками в течение 1 часа, после чего клетки промывали PBS и затем инкубировали с разведением 1:500 козьего антимышиного конъюгированного с Alexa 488 антитела (ThermoFisher). DAPI (4',6-диамидино-2-

фенилиндол; ThermoFisher) использовали в качестве реагента для окрашивания ядер для оценки числа клеток. Клетки промывали PBS и определяли количество очагов инфекции под флуоресцентным микроскопом.

Обратная транскрипция и количественная ПЦР: 60 нг общей клеточной РНК подвергали ОТ-кПЦР с использованием мастер-микса для зондов NZYSpeedy One-Step qPCR с использованием рекомендаций производителя и праймеров.

Статистический анализ: средние значения и SEM рассчитывали с использованием Excel. Средние значения сравнивали с использованием однофакторного дисперсионного анализа ANOVA и апостериорного критерия Даннета (2-сторонний; альфа равен 0,05) с использованием IBM-SPSS.

ПРИМЕР 12. Фаза 3 многоцентрового рандомизированного контролируемого исследования для определения эффективности и безопасности двух уровней доз плитидепсина по сравнению с контролем у взрослых пациентов, нуждающихся в госпитализации для лечения инфекции COVID-19 средней степени тяжести

Показание: лечение пациентов, госпитализированных для лечения инфекции COVID-19 средней степени тяжести.

Цели:

Первичная цель:

- Сравнение плитидепсина 1,5 или 2,5 мг с контролем по проценту пациентов, достигших полного выздоровления на 8-е сутки (± 1), определяемому как (I) соответствие категориям от 0 до 2 по 11-балльной шкале клинического прогрессирования Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), приведенной ниже, (II) наличие индекса Бартеля более 90/100 на момент выписки и (III) отсутствие повторной госпитализации по поводу инфекции COVID-19 вплоть до 31-х суток.

0: не инфицирован, вирусная РНК не обнаружена

1: бессимптомный, обнаружена вирусная РНК

2: с проявлением симптомов, независим от посторонней помощи

3: с проявлением симптомов, требуется помощь

4: госпитализирован, без оксигенотерапии (если госпитализирован только для изоляции, регистрировать статус как для амбулаторного пациента)

5: госпитализирован, кислород через маску или назальные канюли

6: госпитализирован, кислород с помощью неинвазивной вентиляции (НИВ) или высокого потока

7: интубация и искусственная вентиляция легких $pO_2/FIO_2 \geq 150$ или $SpO_2/FIO_2 \geq 200$

8: искусственная вентиляция легких $pO_2/FIO_2 < 150$ ($SpO_2/FIO_2 < 200$) или вазопрессоры

9: искусственная вентиляция легких $pO_2/FIO_2 < 150$ и вазопрессоры, диализ или экстракорпоральная мембранная оксигенация (ЭКМО)

10: смерть

Ключевые вторичные цели этого исследования состоят в том, чтобы сравнить плитидепсин 1,5 и 2,5 мг с контролем по следующим параметрам:

- Время до полного выздоровления (в сутках), определяемое как первые сутки, начиная с 1-х суток и вплоть до конца исследования на 31-е сутки, когда пациент (I) соответствует категориям от 0 до 2 по 11-балльной шкале клинического прогрессирования ВОЗ, приведенной выше, (II) имеет индекс Бартеля $>90/100$ на момент выписки и (III) не имеет последующей повторной госпитализации по поводу инфекции COVID-19

- Клинический статус, оцененный по 11-балльной шкале клинического прогрессирования ВОЗ, на 8-е сутки (± 1).

Другие вторичные цели данного исследования представляют собой:

- Безопасность и переносимость на основании нежелательных явлений, возникающих в ходе лечения (TEAE), TEAE не менее чем 3 степени, тяжелых нежелательных явлений (SAE) и тяжелых нежелательных реакций (SAR).

- Сравнение эффективности и безопасности/переносимости между группами плитидепсина (1,5 и 2,5 мг) в случае, если обе группы значительно лучше, чем контрольная группа, по первичной конечной точке.

- Сравнение процента пациентов, достигших полного выздоровления на 8-е сутки (± 1), как определено выше, для объединенных групп, получавших плитидепсин, по сравнению с контрольной группой.

- Процент пациентов в каждой группе исследования, нуждающихся в повторной госпитализации по поводу инфекции COVID-19.

- Клинический статус в каждой группе исследования, оцененный по 11-балльной шкале клинического прогрессирования ВОЗ на 4-е, 15-е и 31-е сутки.

- Продолжительность оксигенотерапии (в сутках) для каждой группы исследования

- Процент пациентов в каждой группе исследования, нуждающихся в высокопоточной оксигенации на 4-е, 8-е, 15-е и 31-е сутки.
- Процент пациентов в каждой группе исследования, нуждающихся в неинвазивной искусственной вентиляции легких на 4-е, 8-е, 15-е и 31-е сутки.
- Процент пациентов в каждой группе исследования, нуждающихся в инвазивной искусственной вентиляции легких или ЭКМО на 4-е, 8-е, 15-е и 31-е сутки.
- Процент пациентов в каждой группе исследования, нуждающихся в госпитализации в отделение интенсивной терапии (ОИТ) на 4-е, 8-е, 15-е и 31-е сутки.
- Продолжительность госпитализации в ОИТ для каждой группы исследования.
- Процент пациентов, получающих последующую противовирусную терапию или иммуномодулирующие препараты на 4-е, 8-е, 15-е и 31-е сутки.
- Процент пациентов с внутрибольничной инфекцией в каждой группе исследования.
- Смертность в каждой группе исследования на 4-е, 8-е, 15-е и 31-е сутки.
- Изменение вирусной нагрузки коронавируса-2 тяжелого острого респираторного синдрома (SARS-CoV-2) в каждой группе исследования с 1-х суток до введения исследуемого препарата до 8-х суток, измеренное с помощью количественной полимеразной цепной реакции (кПЦР) из образцов оро-назофарингеального экссудата.
- Процент пациентов в каждой группе исследования с неопределяемой вирусной нагрузкой SARS-CoV-2 на 8-е сутки, измеренной с помощью кПЦР из образцов оро-назофарингеального экссудата.

Изменение провоспалительных биомаркеров (С-реактивный белок [CRP], лактатдегидрогеназа [LDH], ферритин, интерлейкин [IL]-6, IL-1 β , IL-10 и фактор некроза опухоли альфа [TNF α]) в каждой группе исследования от исходного уровня до 2-х, 3-х, 4-х, 8-х, 15-х и 31-х суток.

Методология/дизайн исследования:

Это многоцентровое открытое контролируемое исследование фазы 3, в котором взрослые, нуждающиеся в госпитализации и добавлении O₂ для лечения инфекции COVID-19 средней степени тяжести, будут рандомизированы в соотношении 1:1:1 в:

- Группу 1,5 мг плитидепсина: пациенты будут получать 1,5 мг/сутки плитидепсина внутривенно (в/в) в комбинации с 6,6 мг/сутки дексаметазона в/в на 1-3 сутки с последующим пероральным (п/о)/в/в введением 6 мг/сутки дексаметазона с

4-х суток и по 10-е сутки (согласно заключению врача в соответствии с клиническим состоянием пациента и дальнейшим развитием клинической картины).

- Группу 2,5 мг плитидепсина: пациенты будут получать 2,5 мг/сутки плитидепсина в/в в комбинации с 6,6 мг/сутки дексаметазона в/в на 1-3 сутки с последующим введением 6 мг/сутки дексаметазона (п/о)/в/в с 4-х суток и по 10-е сутки (согласно заключению врача в соответствии с клиническим состоянием пациента и дальнейшим развитием клинической картины).

- Контрольную группу: пациенты будут получать 6,6 мг/сутки дексаметазона в/в на 1-3 сутки с последующим введением 6 мг/сутки дексаметазона (п/о)/в/в с 4-х суток и по 10-е сутки (согласно заключению врача в соответствии с клиническим состоянием пациента и дальнейшим развитием клинической картины). Кроме того, в соответствии с местными рекомендациями по лечению, пациенты могут получать 200 мг ремдесивира в/в в 1-е сутки с последующим введением по 100 мг/сутки в/в со 2-х по 5-е сутки.

Рандомизация будет стратифицирована по 2 факторам:

- Намерение вводить ремдесивир, если пациент рандомизирован в контрольную группу (да или нет); и

- Индекс коморбидности Чарльсона 13,14 (0-1 против более 1).

С момента начала лечения в 1-е сутки пациенты будут наблюдаться в больнице в течение по меньшей мере 4 суток, а затем на протяжении 31 суток или до регрессии/стабилизации ТЕАЕ, возникших в течение 31 суток. Пациенты, выписанные из больницы до 8-х суток, будут возвращаться в амбулаторию для оценки на 8-е и 31-е сутки.

Независимый комитет по мониторингу данных (НКМД) будет контролировать проведение исследования (конечную точку безопасности и основную конечную точку), включая анализ сводных данных по безопасности в соответствии с требованиями испытаний.

Диагноз и основные критерии включения и исключения:

Ниже приведены критерии включения:

1. Подписанное информированное согласие, полученное до начала каких-либо конкретных процедур исследования и лечения в рамках исследования.

2. Лабораторно подтвержденная инфекция SARS-CoV-2, определенная с помощью качественной полимеразной цепной реакцией (ПЦР) в местной лаборатории

из оро-назофарингеального экссудата (или другого образца из дыхательных путей), собранного не более чем за 48 часов до лечения в рамках исследования в 1 сутки.

3. Госпитализация по клиническим показаниям для лечения инфекции SARS-CoV-2 (COVID-19) средней степени тяжести, определяемой по следующим критериям:

- Положительный ПЦР-тест на SARS-CoV-2
- Симптомы заболевания COVID-19 средней степени тяжести, которые могут включать любые симптомы легкой формы заболевания или одышку при физической нагрузке

- Клинические признаки, указывающие на заболевание COVID-19 средней степени тяжести, такие как частота дыхания не менее 20 вдохов, но менее 30 вдохов в минуту, уровень SpO₂ (сатурация) более 93%, но менее 95% при комнатном воздухе на уровне моря, частота сердечных сокращений не менее 90, но менее 125 ударов в минуту, и требующие добавки O₂

- Отсутствие клинических признаков, указывающих на тяжелое заболевание, которые могут включать одышку в покое или респираторный дистресс-синдром

4. Появление симптомов COVID-19 не позднее чем за 6 суток до начала лечения в рамках исследования в 1 сутки.

5. Мужчина или женщина в возрасте ≥ 18 лет и старше.

6. Адекватная функция костного мозга, печени, почек и метаболизма, определяемая следующими тестами, проводимыми в местной лаборатории:

- Абсолютное количество нейтрофилов не менее 1000/мм³ ($1,0 \times 10^9$ /л)
- Количество лимфоцитов не менее 500/мм³ ($0,5 \times 10^9$ /л)
- Количество тромбоцитов не менее 100000/мм³ (100×10^9 /л)
- Гемоглобин более 9,0 г/дл
- Аланинтрансаминаза (ALT), аспартаттрансаминаза (AST) не более 3× верхнего предела нормы (ВПН)
- Билирубин сыворотки не более 1× ВПН (не более 3× ВПН, если подтвержден синдром Жильбера)
- Расчетный клиренс креатинина не менее 30 мл/мин (формула Кокрофта и Голта)
- Креатинфосфокиназа не более 2,5× ВПН

7. Согласие не участвовать в другом интервенционном клиническом исследовании на протяжении 31 суток.

8. Женщины репродуктивного возраста должны иметь отрицательный результат анализа крови на беременность в местной лаборатории при включении в исследование и должны быть не кормящими.

9. Женщины и мужчины, имеющие партнеров детородного возраста, должны использовать эффективные средства контрацепции во время лечения в рамках исследования и в течение 3 месяцев после приема последней дозы плитидепсина.

Критерии исключения были следующими:

1. Субъекты с предыдущим (то есть в предыдущем месяце) ухудшением общего состояния здоровья по любой причине, кроме COVID-19, которым требуется либо помощь в повседневной жизни, либо постоянная оксигенотерапия.

2. Участие в другом клиническом испытании по лечению инфекции COVID-19 либо пациентов, ранее включенных в клинические испытания и находящихся в настоящее время под наблюдением, либо пациентов, ранее вакцинированных от COVID-19.

3. Доказательства дыхательной недостаточности на момент рандомизации, основанные на использовании ресурсов, требующих по меньшей мере одного из следующего: эндотрахеальная интубация и искусственная вентиляция легких, доставка кислорода через назальную канюлю с высоким потоком, неинвазивная вентиляция с положительным давлением, ЭКМО (экстракорпоральная мембранная оксигенация) или клинически диагностированная дыхательная недостаточность (то есть клиническая потребность в одном из предшествующих способов лечения, но предшествующие способы лечения не могут быть назначены в условиях ограниченных ресурсов).

4. Пациенты с клиническими показаниями для лечения SARS-CoV-2 (COVID 19) с исходной тяжестью заболевания, оцененной как тяжелая (при положительном результате стандартного анализа ОТ-ПЦР или эквивалентного теста на тяжелое заболевание COVID-19 указывают симптомы, которые могут включать любой симптом заболевания средней тяжести или одышку в покое, или респираторный дистресс-синдром, клинические признаки, указывающие на тяжелое системное заболевание COVID-19, такие как частота дыхания не менее 30 в минуту, частота сердечных сокращений не менее 125 ударов в минуту, SpO₂ не более 93% при комнатном воздухе на уровне моря, или PaO₂/FiO₂ менее 300).

5. Пациенты, получающие противовирусные препараты, ингибитор рецептора IL-6, кортикостероиды или иммуномодулирующие препараты для лечения инфекции COVID-19 в течение 4 недель до включения в исследование.

6. Иммунизация живой вакциной в анамнезе в течение последних 4 недель до включения в исследование; субъекты не должны получать живую аттенуированную вакцину против гриппа в течение 4 недель до включения или в любое время во время исследования.

7. Пациенты, получающие лечение хлорохином или производными в течение 8 недель до включения в исследование или во время исследования.

8. Лечение сильными ингибиторами или индукторами цитохрома P450 3A4 (CYP3A4).

9. Вирусное заболевание (кроме COVID-19), требующее лечения, за исключением пациентов с пролеченной и адекватно контролируемой (неопределяемой) инфекцией вируса иммунодефицита человека.

10. Интервал QT, скорректированный с использованием формулы с поправкой на удлинение Фридеридии, более 450 мс для мужчин или более 470 мс для женщин на основании трехкратной регистрации электрокардиограммы (ЭКГ) при скрининге.

11. Ранее существовавшие невропатии любого типа не менее 2 степени.

12. Повышенная чувствительность к активному ингредиенту или любому из эксципиентов (маннит, макроголглицерингидроксистеарат и этанол).

13. Беременные женщины (отрицательный результат анализа крови на беременность требовался для всех женщин детородного возраста при скрининге) или кормящие грудью

14. Женщины и мужчины с партнерами детородного возраста (женщины, без хирургической стерилизации или в постменопаузе, определяемой как аменорея в течение более 12 месяцев), которые не используют по меньшей мере 1 способ контрацепции, указанный в протоколе.

15. Любое другое клинически значимое заболевание или отклонение лабораторных показателей, которое, по мнению исследователя, могло бы поставить под угрозу безопасность пациента или потенциально повлиять на соблюдение пациентом режима лечения или наблюдения за безопасностью/эффективностью в исследовании.

Исследуемые продукты, дозы и способ введения:

Плитидепсин для инъекций представлен во флаконах, содержащих 2 мг порошка плитидепсина. Для введения содержимое флакона восстанавливают посредством добавления 4 мл растворителя для плитидепсина с получением слегка желтоватого раствора, содержащего 0,5 мг/мл плитидепсина с эксципиентами: маннитом, макроглицерингидроксистеаратом и этанолом. Необходимое количество восстановленного раствора плитидепсина добавляют в пакет для внутривенного вливания, содержащий 0,9% раствор натрия хлорида для инъекций или 5% раствор глюкозы для инъекций, и вводят в виде в/в инфузии в течение 60 минут.

Для предотвращения инфузионных реакций, связанных с плитидепсином, все пациенты должны получить следующие лекарственные средства за 20-30 минут до начала инфузии плитидепсина:

- Ондансетрон 8 мг внутривенно (или эквивалент; примечание: ондансетрон является запрещенным препаратом для пациентов в субисследовании скорректированного интервала QT [QTc] во время оценки QT [1-3 сутки])

- Дифенгидрамина гидрохлорид 25 мг в/в (или эквивалент)

- Ранитидин 50 мг в/в (или эквивалент)

- Дексаметазон 6,6 мг в/в

Кроме того, на 4-е и 5-е сутки пациенты, получавшие плитидепсин, должны получать ондансетрон по 4 мг два раза в сутки перорально.

Референсная терапия, доза, лекарственная форма и способ введения:

Дексаметазон: пациенты, как в группе плитидепсина, так и в контрольной группе, будут получать 6,6 мг/сутки дексаметазона в/в с 1-х по 3-и сутки с последующим введением 6 мг/сутки дексаметазона п/о/в/в с 4-х суток и по 10-е сутки (согласно заключению врача в соответствии с клиническим состоянием пациента и дальнейшим развитием клинической картины).

Ремдесивир: в соответствии с местными рекомендациями по лечению пациенты, рандомизированные в контрольную группу, могут получать 200 мг ремдесивира в/в в 1-е сутки с последующим введением 100 мг/сутки в/в со 2-х по 5-е сутки.

Лучшая поддерживающая терапия (BSC): BSC в соответствии с рекомендациями по лечению COVID-19 Национального института здравоохранения США (www.covid19treatmentguidelines.nih.gov) или другими рекомендациями страны будет предоставлена всем участникам исследования.

ПРИМЕР 13. Открытое рандомизированное исследование II фазы для оценки безопасности и снижения вирусной нагрузки терапии единственной линией плитидепсином у взрослых пациентов с COVID-19 при выписке из отделения неотложной помощи

Показания: Лечение пациентов с легкой формой инфекции COVID-19.

Пациенты будут включены в исследование при наличии острой клинической инфекции (появление симптомов в предыдущие 5 суток), при которой диагноз инфекция COVID-19 установлен с помощью диагностического метода, который может представлять собой положительный результат теста на антиген или положительный результат ПЦР-теста.

В исследование включены две группы:

группа (А) однократная доза 7,5 мг плитидепсина, вводимая в виде медленной инфузии в течение 90 минут (\pm 10 минут), плюс симптоматическое лечение в соответствии с обычной клинической практикой в центрах, участвующих в исследовании.

группа (В) симптоматическое лечение в соответствии с обычной клинической практикой в центрах, участвующих в исследовании.

Все пациенты получают следующие профилактические лекарственные средства за 20-30 минут до инфузии плитидепсина:

- Дифенгидрамина гидрохлорид 25 мг в/в,
- Ранитидин 50 мг в/в,
- Дексаметазон 6,6 мг внутривенно,
- Ондансетрон 8 мг в/в в виде 15-минутной медленной инфузии.

4 мг ондансетрона перорально назначают каждые 12 часов в течение 3 суток после введения плитидепсина для облегчения тошноты и рвоты, вызванных лекарственными препаратами. Если плитидепсин вводят утром, пациент получает первую дозу ондансетрона во второй половине дня.

Исследование может показать, что однократная доза плитидепсина, введенная пациентам, приводит к снижению вирусной нагрузки. Это может быть выражено в виде значения порогового цикла репликации (Ct), превышающего 30 (Ct более 30), на 6-е сутки после введения. Например, исследование может показать, что у пациентов с инфекцией COVID-19, которые должны быть выписаны из отделения неотложной помощи, наблюдается снижение вирусной нагрузки на 6-е сутки после выписки из

отделения неотложной помощи, выраженное в виде значения порогового цикла репликации (Ct), превышающего 30 (Ct более 30), при введении однократной дозы плитидепсина. Это может быть выражено в виде снижения вирусной нагрузки SARS-CoV-2 по сравнению с исходным уровнем. Это может быть выражено в виде снижения процента пациентов, нуждающихся в госпитализации после введения. Это может быть выражено в виде снижения процента пациентов, которым требуется инвазивная искусственная вентиляция легких и/или госпитализация в отделение интенсивной терапии после введения. Это может быть выражено в виде уменьшения числа пациентов, у которых развиваются последствия, связанные с персистирующим заболеванием. Это может быть выражено в виде увеличения процента пациентов с нормализацией аналитических показателей, выбранных в качестве критериев неблагоприятного прогноза (включая, например лимфопению, ЛДГ, D-димер или ПЦР). Это может быть выражено в виде увеличения процента пациентов с нормализацией клинических критериев (исчезновение симптомов), включая, например: головную боль, лихорадку, кашель, утомляемость, одышку (затруднение дыхания), артромиалгию или диарею.

Исследование может показать, что лечение однократной дозой плитидепсина может устранить вирусную нагрузку SARS-CoV-2 у пациента на 6-е сутки, что, по данным ряда исследований, приводит к клиническому улучшению и, следовательно, снижению осложнений, понимаемых как госпитализация, попадание в ОИТ и смерть. В дополнение к улучшению прогноза пациентов в краткосрочной перспективе снижение вирусной нагрузки, как полагают, является ключевым для достижения двух других целей. Во-первых, снижение инфекционности бессимптомных или малосимптомных пациентов с высокой вирусной нагрузкой (ТС менее 25), известных как суперконтагаторы. Во-вторых, снижение вирусной нагрузки может иметь решающее значение для предотвращения долгосрочных осложнений, известных как персистирующий или долгий COVID.

Валидированная популяционная фармакокинетическая модель плитидепсина (Nalda-Molina R, et al. Population pharmacokinetics meta-analysis of плитидепсин in cancer subjects. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2009 Jun;64(1):97-108. doi: 10.1007/s00280-008-0841-4) была использована для подтверждения того, что общая концентрация в плазме может достичь расчетных целевых концентраций в легких. На Фиг. 53 показаны результаты, и можно видеть, что концентрации в плазме выше IC_{50} и IC_{90} могут быть получены в течение более чем 6 суток.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Almazan, F., Galan, C., Enjuanes, L., 2004. The nucleoprotein is required for efficient coronavirus genome replication. *J. Virol.* 78, 12683-12688. 10 Baric et al., **1988**.
- Baric, R.S., Nelson, G.W., Fleming, J.O., Deans, R.J., Keck, J.G., Casteel, N., Stohlman, S.A. Interactions between coronavirus nucleocapsid protein and viral RNAs: implications for viral transcription. *J. Virol.* **1988**, 62, 4280-4287.
- Escors, D., Camafeita, E., Ortego, J., Laude, H., Enjuanes, L. Organization of two transmissible gastroenteritis coronavirus membrane protein topologies within the virion and core. *J. Virol.* **2001**, 75, 12228-12240.
- Fang, S.G.; Shen, H.; Wang, J.; Tay, F.P.; Liu, D.X. Proteolytic processing of polyproteins 1a and 1ab between non-structural proteins 10 and 11/12 of Coronavirus infectious bronchitis virus is dispensable for viral replication in cultured cells. *Virology* **2008**, 379, 175-180.
- Graham, R.L.; Donaldson, E.F.; Baric, R.S. A decade after SARS: Strategies for controlling emerging coronaviruses. *Nat. Rev. Microbiol.* **2013**, 11, 836-848.
- Lai, M.M.; Cavanagh, D. The molecular biology of coronaviruses. *Adv. Virus Res.* **1997**, 48, 1-100.
- Losada A, Berlanga JJ, Molina-Guijarro JM, Jiménez-Ruiz A, Gago F, Avilés P, de Haro C, Martínez-Leal JF., Generation of endoplasmic reticulum stress and inhibition of autophagy by plitidepsin induces proteotoxic apoptosis in cancer cells. *Biochem Pharmacol.* **2020** Feb; 172:113744.
- Losada A, Muñoz-Alonso MJ, García C, Sánchez-Murcia PA, Martínez-Leal JF, Domínguez JM, Lillo MP, Gago F, Galmarini CM., Translation Elongation Factor eEF1A2 is a Novel Anticancer Target for the Marine Natural Product Plitidepsin. *Sci Rep.* **2016** 7;6:35100.
- Losada A, Muñoz-Alonso MJ, Martínez-Díez M, Gago F, Domínguez JM, Martínez-Leal JF, Galmarini CM., Binding of eEF1A2 to the RNA-dependent protein kinase PKR modulates its activity and promotes tumour cell survival. *Br J Cancer.* **2018**;119(11):1410-1420.
- M. D. Vera and M. M. Joullié, Natural products as probes of cell biology: 20 years of didemnin research *Med. Res. Rev.*, **2002**, 22, 102.
- Pyrc, K.; Berkhout, B.; van der Hoek, L. The novel human coronaviruses NL63 and HKU1. *J. Virol.* **2007**, 81, 3051-3057.

- Rabouw HH, Langereis MA, Knaap RC, Dalebout TJ, Canton J, Sola I, Enjuanes L, Bredenbeek PJ, Kikkert M, de Groot RJ, van Kuppeveld FJ., Middle East Respiratory Coronavirus Accessory Protein 4a Inhibits PKR-Mediated Antiviral Stress Responses. *PLoS Pathog.* **2016**, 26;12(10):e1005982.
- Remington s Pharmaceutical Sciences, 17th Ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., **1995**.
- Risco, C., Anton, I.M., Enjuanes, L., Carrascosa, J.L. The transmissible gastroenteritis coronavirus contains a spherical core shell consisting of M and N proteins. *J. Virol.* **1996**, 70, 4773-4777.
- Snijder, E.J.; Bredenbeek, P.J.; Dobbe, J.C.; Thiel, V.; Ziebuhr, J.; Poon, L.L.; Guan, Y.; Rozanov, M.; Spaan, W.J.; Gorbalenya, A.E. Unique and conserved features of genome and proteome of SARS-coronavirus, an early split-off from the coronavirus group 2 lineage. *J. Mol. Biol.* **2003**, 331, 991-1004.
- Stark G.R., Kerr, I.M., Williams, B.R., Silverman, R.H., and Schreiber, R.D., How cells respond to interferons. *Annu. Rev. Biochem.* **1998**, 67: 227-264.
- Stohlman, S.A., Baric, R.S., Nelson, G.N., Soe, L.H., Welter, L.M., Deans, R.J. Specific interaction between coronavirus leader RNA and nucleocapsid protein. *J. Virol.* **1988**, 62, 4288-4295.
- Sturman, L.S., Holmes, K.V., Behnke, J. Isolation of coronavirus envelope glycoproteins and interaction with the viral nucleocapsid. *J. Virol.* **1980**, 33, 449-462.
- Williams B.R. PKR; a sentinel kinase for cellular stress. *Oncogene.* **1999**;18:6112-6120.
- Xin Z, Hongyan S, Jianfei C, Da S, Changlong L, Li F., EF1A interacting with nucleocapsid protein of transmissible gastroenteritis coronavirus and plays a role in virus replication. *Vet Microbiol.* **2014**, 27;172(3-4):443-8.
- Xu, Jiabao & Zhao, Shizhe & Teng, Tieshan & Abdalla, Abualgasim & Zhu, Wan & Xie, Longxiang & Wang, Yunlong & Guo, Xiangqian., Systematic Comparison of Two Animal-to-Human Transmitted Human Coronaviruses: SARS-CoV-2 and SARS-CoV. *Viruses.* **2020**, 12. 244.
- Zhou, B., Liu, J., Wang, Q., Liu, X., Li, X., Li, P., Ma, Q., Cao, C. The nucleocapsid protein of severe acute respiratory syndrome coronavirus inhibits cell cytokinesis and proliferation by interacting with translation elongation factor 1 alpha. *J. Virol.* **2008**, 82, 6962-6971.

- Ranieri VM, Rubenfeld GD, Thompson BT, et al. Acute respiratory distress syndrome: the Berlin Definition. *JAMA* 2012; 307: 2526-2533.
- Technical document. Clinical management of COVID-19: hospital care. Date: 03/19/2020 Source: Ministry of Health. Spain.
- Wiersinga WJ, Bonten MJ, Boersma WG, et al. Management of community-acquired pneumonia in adults: 2016 guideline update from the Dutch Working Party on Antibiotic Policy (SWAB) and Dutch Association of Chest Physicians (NVALT). *Neth J Med.* 2018 Jan; 76 (1): 4-13.
- Lim WS1, Baudouin SV, George RC, et al. BTS guidelines for the management of community acquired pneumonia in adults: update 2009. *Thorax.* 2009 Oct; 64 Suppl 3: iii1-55. doi: 10.1136/thx.2009.121434.]
- Rodriguez-Morales AJ, Cardona-Ospina JA, Gutiérrez-Ocampo E, et al. Clinical, laboratory and imaging features of COVID-19: A systematic review and meta-analysis. *Travel Med Infect Dis.* 2020 Mar 13: 101623.
- Contingency plan for intensive medicine services against the pandemic COVID-19 of the Spanish Society of Intensive Nursing and Coronary Units.
- Fleming TR. One-sample multiple testing procedure for phase II clinical trials. *Biometrics.* 1982 Mar; 38 (1): 143-51.
- Rinehart KL Jr, Gloer JB, Hughes RG et al. Didemnins: antiviral and antitumor depsipeptides from a caribbean tunicate. *Science.* 1981 May 22; 212 (4497): 933-5.
- Canonico PG, Pannier WL, Huggins JW, Rienehart KL. Inhibition of RNA viruses in vitro and in Rift Valley fever-infected mice by didemnins A and B. *Antimicrob Agents Chemother.* 1982 Oct; 22 (4): 696-7.
- Losada, A., et al., Translation Elongation Factor eEF1A2 is a Novel Anticancer Target for the Marine Natural Product Plitidepsin. *Sci Rep*, 2016. 6: p. 35100.
- Mateyak, M.K. and T.G. Kinzy, eEF1A: thinking outside the ribosome. *J Biol Chem*, 2010. 285 (28): p. 21209-13.
- Zhou, B., et al., The nucleocapsid protein of severe acute respiratory syndrome coronavirus inhibits cell cytokinesis and proliferation by interacting with translation elongation factor 1alpha. *J Virol*, 2008. 82 (14): p. 6962-71.
- Ma-Lauer, Y., et al., Influences of cyclosporin A and non-immunosuppressive derivatives on cellular cyclophilins and viral nucleocapsid protein during human coronavirus 229E replication. *Antiviral Res*, 2020. 173: p. 104620.

- Cervantes-Barragan, L., et al., Dendritic cell-specific antigen delivery by coronavirus vaccine vectors induces long-lasting protective antiviral and antitumor immunity. *mBio*, 2010. 1 (4).
- Wang M, Cao R, Zhang L, et al. Remdesivir and chloroquine effectively inhibit the recently emerged novel coronavirus (2019-nCoV) in vitro. *Cell Research* 2020; 30: 269-271.
- PharmaMar, data on file; VPT1992 / 2014.
- PharmaMar, data on file; VPT2678 / 2014.
- Maroun, J.A., et al., Phase I study of Aplidine in a dailyx5 one-hour infusion every 3 weeks in patients with solid tumors refractory to standard therapy. A National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group study: NCIC CTG IND 115. *Ann Oncol*, 2006. 17 (9): p. 1371-8.
- Nalda-Molina R, et al. Population pharmacokinetics meta-analysis of plitidepsin (Aplidin) in cancer subjects. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2009 Jun; 64 (1): 97-108. doi: 10.1007 / s00280-008-0841-4.
- Kaul D. An overview of coronaviruses including the SARS-2 coronavirus - Molecular biology, epidemiology and clinical implications [published online ahead of print, 2020 Apr 9] [published correction appears in *Curr Med Res Pract*. 2020 May-Jun;10(3):135]. *Curr Med Res Pract*. 2020;10(2):54-64. doi:10.1016/j.cmrp.2020.04.001.
- Wang C et al. Alveolar macrophage activation and cytokine storm in the pathogenesis of severe COVID-19; *Immunology Network*; 25 March 2020.
- Kawai T & Akira S (2007); Signaling to NF- κ B by Toll-like receptors; *Trends in Molecular Medicine*; Volume 13, Issue 11, p.460-469.
- Pang T, Cardoso MJ, Guzman MG. Of cascades and perfect storms: the immunopathogenesis of dengue haemorrhagic fever-dengue shock syndrome (DHF/DSS). *Immunol Cell Biol*. 2007;85(1):43-5.
- Monath TP. Treatment of yellow fever. *Antiviral Res*. 2008;78(1):116-24.
- Rothman AL. Immunity to dengue virus: a tale of original antigenic sin and tropical cytokine storms. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(8):532-43.
- Henchal EA, Putnak JR. The dengue viruses. *Clin Microbiol Rev*. 1990;3(4):376-96.
- Hayes EB, Gubler DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Pediatr Infect Dis J*. 1992;11(4):311-7.

- Monath TP. Dengue: the risk to developed and developing countries. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(7):2395-400.
- Srikiatkachorn A, Mathew A, Rothman AL. Immune-mediated cytokine storm and its role in severe dengue. *Semin Immunopathol*. 2017;39(5):563-74.
- Rothman AL. Immunology and immunopathogenesis of dengue disease. *Adv Virus Res*. 2003;60:397-419.
- Leclercq TM, Moretti PA, Pitson SM. Guanine nucleotides regulate sphingosine kinase 1 activation by eukaryotic elongation factor 1A and provide a mechanism for eEF1A-associated oncogenesis. *Oncogene*. 2011;30(3):372-8.
- Carr JM, Kua T, Clarke JN, Calvert JK, Zebol JR, Beard MR, et al. Reduced sphingosine kinase 1 activity in dengue virus type-2 infected cells can be mediated by the 3' untranslated region of dengue virus type-2 RNA. *J Gen Virol*. 2013;94(Pt 11):2437-48.
- Kuno G, Chang GJ. Full-length sequencing and genomic characterization of Bagaza, Kedougou, and Zika viruses. *Arch Virol*. 2007;152(4):687-96.
- Duffy MR, Chen TH, Hancock WT, Powers AM, Kool JL, Lanciotti RS, et al. Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *N Engl J Med*. 2009;360(24):2536-43.
- Rasmussen SA, Jamieson DJ, Honein MA, Petersen LR. Zika Virus and Birth Defects-Reviewing the Evidence for Causality. *N Engl J Med*. 2016;374(20):1981-7.
- Watrin L, Ghawche F, Larre P, Neau JP, Mathis S, Fournier E. Guillain-Barre Syndrome (42 Cases) Occurring During a Zika Virus Outbreak in French Polynesia. *Medicine (Baltimore)*. 2016;95(14):e3257.
- Tappe D, Perez-Giron JV, Zammarchi L, Rissland J, Ferreira DF, Jaenisch T, et al. Cytokine kinetics of Zika virus-infected patients from acute to convalescent phase. *Med Microbiol Immunol*. 2016;205(3):269-73.
- Chen Q, Gouilly J, Ferrat YJ, Espino A, Glaziou Q, Cartron G, et al. Metabolic reprogramming by Zika virus provokes inflammation in human placenta. *Nat Commun*. 2020;11(1):2967.
- ter Meulen J, Sakho M, Koulemou K, Magassouba N, Bah A, Preiser W, et al. Activation of the cytokine network and unfavorable outcome in patients with yellow fever. *J Infect Dis*. 2004;190(10):1821-7.
- Heim MH, Thimme R. Innate and adaptive immune responses in HCV infections. *J Hepatol*. 2014;61(1 Suppl):S14-25.

- Zeremski M, Petrovic LM, Talal AH. The role of chemokines as inflammatory mediators in chronic hepatitis C virus infection. *J Viral Hepat.* 2007;14(10):675-87.
- Li H, Li T, Crispe IN, Tu Z. HCV immune evasion and regulatory T cell activation: cause or consequence? *Cell Mol Immunol.* 2018;15(5):536-8.
- Lindquist L, Vapalahti O. Tick-borne encephalitis. *Lancet.* 2008;371(9627):1861-71.
- Blom K, Cuapio A, Sandberg JT, Varnaite R, Michaelsson J, Bjorkstrom NK, et al. Cell-Mediated Immune Responses and Immunopathogenesis of Human Tick-Borne Encephalitis Virus-Infection. *Front Immunol.* 2018;9:2174.
- Haller O, Kochs G, Weber F. The interferon response circuit: induction and suppression by pathogenic viruses. *Virology.* 2006;344(1):119-30.
- Shevtsova AS, Motuzova OV, Kuragina VM, Akhmatova NK, Gmyl LV, Kondrat'eva YI, et al. Lethal Experimental Tick-Borne Encephalitis Infection: Influence of Two Strains with Similar Virulence on the Immune Response. *Front Microbiol.* 2016;7:2172.
- Kulakowska A, Byfield FJ, Zendzian-Piotrowska M, Zajkowska JM, Drozdowski W, Mroczko B, et al. Increased levels of sphingosine-1-phosphate in cerebrospinal fluid of patients diagnosed with tick-borne encephalitis. *J Neuroinflammation.* 2014;11:193.
- Leclercq TM, Moretti PA, Vadas MA, Pitson SM. Eukaryotic elongation factor 1A interacts with sphingosine kinase and directly enhances its catalytic activity. *J Biol Chem.* 2008;283(15):9606-14.
- Moennig V, Floegel-Niesmann G, Greiser-Wilke I. Clinical signs and epidemiology of classical swine fever: a review of new knowledge. *Vet J.* 2003;165(1):11-20.
- Petrov A, Blohm U, Beer M, Pietschmann J, Blome S. Comparative analyses of host responses upon infection with moderately virulent classical swine fever virus in domestic pigs and wild boar. *Virol J.* 2014;11:134.
- Blome S, Staubach C, Henke J, Carlson J, Beer M. Classical Swine Fever-An Updated Review. *Viruses.* 2017;9(4).
- Husser L, Ruggli N, Summerfield A. N(pro) of classical swine fever virus prevents type I interferon-mediated priming of conventional dendritic cells for enhanced interferon-alpha response. *J Interferon Cytokine Res.* 2012;32(5):221-9.
- Massilamany C, Koenig A, Reddy J, Huber S, Buskiewicz I. Autoimmunity in picornavirus infections. *Curr Opin Virol.* 2016;16:8-14.

- Baj A, Colombo M, Headley JL, McFarlane JR, Liethof MA, Toniolo A. Post-poliomyelitis syndrome as a possible viral disease. *Int J Infect Dis.* 2015;35:107-16.
- Chapman NM, Kim KS. Persistent coxsackievirus infection: enterovirus persistence in chronic myocarditis and dilated cardiomyopathy. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2008;323:275-92.
- Klein J. Understanding the molecular epidemiology of foot-and-mouth-disease virus. *Infect Genet Evol.* 2009;9(2):153-61.
- Fairweather D, Frisancho-Kiss S, Rose NR. Viruses as adjuvants for autoimmunity: evidence from Coxsackievirus-induced myocarditis. *Rev Med Virol.* 2005;15(1):17-27.
- Fensterl V, Chattopadhyay S, Sen GC. No Love Lost Between Viruses and Interferons. *Annu Rev Virol.* 2015;2(1):549-72.
- Schulz KS, Mossman KL. Viral Evasion Strategies in Type I IFN Signaling - A Summary of Recent Developments. *Front Immunol.* 2016;7:498.
- Feng Q, Langereis MA, Lork M, Nguyen M, Hato SV, Lanke K, et al. Enterovirus 2Apro targets MDA5 and MAVS in infected cells. *J Virol.* 2014;88(6):3369-78.
- Chinsangaram J, Koster M, Grubman MJ. Inhibition of L-deleted foot-and-mouth disease virus replication by alpha/beta interferon involves double-stranded RNA-dependent protein kinase. *J Virol.* 2001;75(12):5498-503.
- de Los Santos T, de Avila Botton S, Weiblen R, Grubman MJ. The leader proteinase of foot-and-mouth disease virus inhibits the induction of beta interferon mRNA and blocks the host innate immune response. *J Virol.* 2006;80(4):1906-14.
- Losada A, Berlanga JJ, Molina-Guijarro JM, Jimenez-Ruiz A, Gago F, Aviles P, et al. Generation of endoplasmic reticulum stress and inhibition of autophagy by plitidepsin induces proteotoxic apoptosis in cancer cells. *Biochem Pharmacol.* 2020;172:113744.
- Lin TY, Hsia SH, Huang YC, Wu CT, Chang LY. Proinflammatory cytokine reactions in enterovirus 71 infections of the central nervous system. *Clin Infect Dis.* 2003;36(3):269-74.
- Weller AH, Simpson K, Herzum M, Van Houten N, Huber SA. Coxsackievirus-B3-induced myocarditis: virus receptor antibodies modulate myocarditis. *J Immunol.* 1989;143(6):1843-50.
- Arnesjo B, Eden T, Ihse I, Nordenfelt E, Ursing B. Enterovirus infections in acute pancreatitis - a possible etiological connection. *Scand J Gastroenterol.* 1976;11(7):645-9.

- David P, Baleriaux D, Bank WO, Amrom D, De Temmerman D, Babusiaux C, et al. MRI of acute disseminated encephalomyelitis after coxsackie B infection. *J Neuroradiol.* 1993;20(4):258-65.
- Klingel K, Stephan S, Sauter M, Zell R, McManus BM, Bultmann B, et al. Pathogenesis of murine enterovirus myocarditis: virus dissemination and immune cell targets. *J Virol.* 1996;70(12):8888-95.
- Corsten MF, Schroen B, Heymans S. Inflammation in viral myocarditis: friend or foe? *Trends Mol Med.* 2012;18(7):426-37.
- Fuse K, Chan G, Liu Y, Gudgeon P, Husain M, Chen M, et al. Myeloid differentiation factor-88 plays a crucial role in the pathogenesis of Coxsackievirus B3-induced myocarditis and influences type I interferon production. *Circulation.* 2005;112(15):2276-85.
- Papageorgiou AP, Heymans S. Interactions between the extracellular matrix and inflammation during viral myocarditis. *Immunobiology.* 2012;217(5):503-10.
- Triantafilou K, Vakakis E, Richer EA, Evans GL, Villiers JP, Triantafilou M. Human rhinovirus recognition in non-immune cells is mediated by Toll-like receptors and MDA-5, which trigger a synergetic pro-inflammatory immune response. *Virulence.* 2011;2(1):22-9.
- Slater L, Bartlett NW, Haas JJ, Zhu J, Message SD, Walton RP, et al. Co-ordinated role of TLR3, RIG-I and MDA5 in the innate response to rhinovirus in bronchial epithelium. *PLoS Pathog.* 2010;6(11):e1001178.
- Zhu Z, Tang W, Gwaltney JM, Jr., Wu Y, Elias JA. Rhinovirus stimulation of interleukin-8 in vivo and in vitro: role of NF-kappaB. *Am J Physiol.* 1997;273(4):L814-24.
- Turner RB, Weingand KW, Yeh CH, Leedy DW. Association between interleukin-8 concentration in nasal secretions and severity of symptoms of experimental rhinovirus colds. *Clin Infect Dis.* 1998;26(4):840-6.
- Deinhardt F. Prevention of viral hepatitis A: past, present and future. *Vaccine.* 1992;10 Suppl 1:S10-4.
- Wang X, Ren J, Gao Q, Hu Z, Sun Y, Li X, et al. Hepatitis A virus and the origins of picornaviruses. *Nature.* 2015;517(7532):85-8.
- Kaplan G, Totsuka A, Thompson P, Akatsuka T, Moritsugu Y, Feinstone SM. Identification of a surface glycoprotein on African green monkey kidney cells as a receptor for hepatitis A virus. *EMBO J.* 1996;15(16):4282-96.

- FitzSimons D, Hendrickx G, Vorsters A, Van Damme P. Hepatitis A and E: update on prevention and epidemiology. *Vaccine*. 2010;28(3):583-8.
- Wang D, Fang L, Wei D, Zhang H, Luo R, Chen H, et al. Hepatitis A virus 3C protease cleaves NEMO to impair induction of beta interferon. *J Virol*. 2014;88(17):10252-8.
- Choi YS, Jung MK, Lee J, Choi SJ, Choi SH, Lee HW, et al. Tumor Necrosis Factor-producing T-regulatory Cells Are Associated With Severe Liver Injury in Patients With Acute Hepatitis A. *Gastroenterology*. 2018;154(4):1047-60.
- Thiberville SD, Moyen N, Dupuis-Maguiraga L, Nougairede A, Gould EA, Roques P, et al. Chikungunya fever: epidemiology, clinical syndrome, pathogenesis and therapy. *Antiviral Res*. 2013;99(3):345-70.
- White LK, Sali T, Alvarado D, Gatti E, Pierre P, Streblow D, et al. Chikungunya virus induces IPS-1-dependent innate immune activation and protein kinase R-independent translational shutoff. *J Virol*. 2011;85(1):606-20.
- Ng KW, Chow A, Win MK, Dimatatac F, Neo HY, Lye DC, et al. Clinical features and epidemiology of chikungunya infection in Singapore. *Singapore Med J*. 2009;50(8):785-90.
- Colavita F, Vita S, Lalle E, Carletti F, Bordi L, Vincenti D, et al. Overproduction of IL-6 and Type-I IFN in a Lethal Case of Chikungunya Virus Infection in an Elderly Man During the 2017 Italian Outbreak. *Open Forum Infect Dis*. 2018;5(11):ofy276.
- Shirako Y, Niklasson B, Dalrymple JM, Strauss EG, Strauss JH. Structure of the Ockelbo virus genome and its relationship to other Sindbis viruses. *Virology*. 1991;182(2):753-64.
- Laine M, Luukkainen R, Toivanen A. Sindbis viruses and other alphaviruses as cause of human arthritic disease. *J Intern Med*. 2004;256(6):457-71.
- Laine M, Vainionpaa R, Oksi J, Luukkainen R, Toivanen A. The prevalence of antibodies against Sindbis-related (Pogosta) virus in different parts of Finland. *Rheumatology (Oxford)*. 2003;42(5):632-6.
- Assuncao-Miranda I, Bozza MT, Da Poian AT. Pro-inflammatory response resulting from sindbis virus infection of human macrophages: implications for the pathogenesis of viral arthritis. *J Med Virol*. 2010;82(1):164-74.
- Klimstra WB, Ryman KD, Bernard KA, Nguyen KB, Biron CA, Johnston RE. Infection of neonatal mice with sindbis virus results in a systemic inflammatory response syndrome. *J Virol*. 1999;73(12):10387-98.

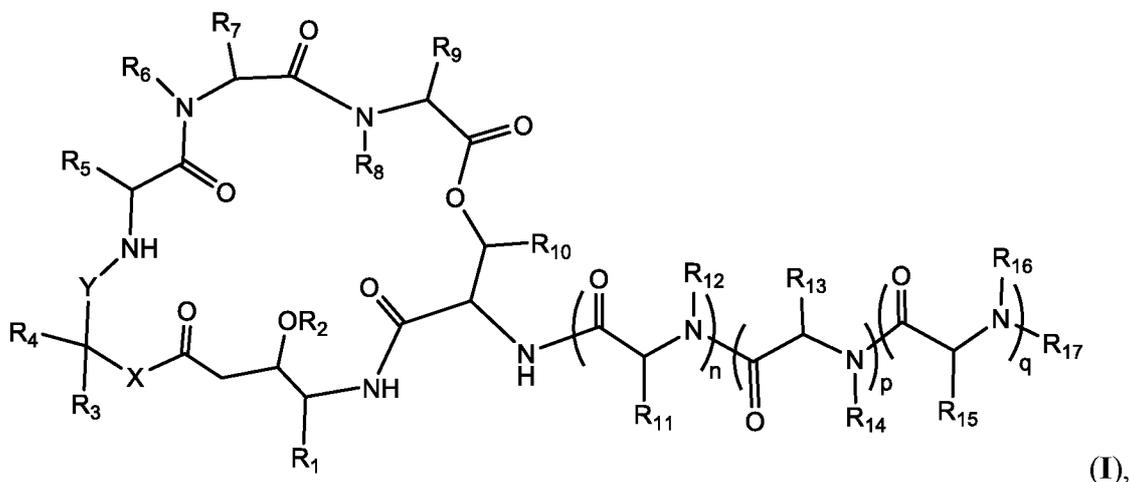
- Davies MG, Hagen PO. Systemic inflammatory response syndrome. *Br J Surg.* 1997;84(7):920-35.
- Atkins GJ, Sheahan BJ, Liljestrom P. The molecular pathogenesis of Semliki Forest virus: a model virus made useful? *J Gen Virol.* 1999;80 (Pt 9):2287-97.
- Balluz IM, Glasgow GM, Killen HM, Mabruk MJ, Sheahan BJ, Atkins GJ. Virulent and avirulent strains of Semliki Forest virus show similar cell tropism for the murine central nervous system but differ in the severity and rate of induction of cytolytic damage. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 1993;19(3):233-9.
- Berger ML. Humoral and cell-mediated immune mechanisms in the production of pathology in avirulent Semliki Forest virus encephalitis. *Infect Immun.* 1980;30(1):244-53.
- Aguilar PV, Adams AP, Wang E, Kang W, Carrara AS, Anishchenko M, et al. Structural and nonstructural protein genome regions of eastern equine encephalitis virus are determinants of interferon sensitivity and murine virulence. *J Virol.* 2008;82(10):4920-30.
- Painter GR, Bowen RA, Bluemling GR, DeBergh J, Edpuganti V, Gruddanti PR, et al. The prophylactic and therapeutic activity of a broadly active ribonucleoside analog in a murine model of intranasal Venezuelan equine encephalitis virus infection. *Antiviral Res.* 2019;171:104597.
- Weaver SC, Salas R, Rico-Hesse R, Ludwig GV, Oberste MS, Boshell J, et al. Re-emergence of epidemic Venezuelan equine encephalomyelitis in South America. VEE Study Group. *Lancet.* 1996;348(9025):436-40.
- Vogel P, Kell WM, Fritz DL, Parker MD, Schoepp RJ. Early events in the pathogenesis of eastern equine encephalitis virus in mice. *Am J Pathol.* 2005;166(1):159-71.
- Gardner CL, Burke CW, Tesfay MZ, Glass PJ, Klimstra WB, Ryman KD. Eastern and Venezuelan equine encephalitis viruses differ in their ability to infect dendritic cells and macrophages: impact of altered cell tropism on pathogenesis. *J Virol.* 2008;82(21):10634-46.
- George S, Viswanathan R, Sapkal GN. Molecular aspects of the teratogenesis of rubella virus. *Biol Res.* 2019;52(1):47.
- Alford CA, Jr., Neva FA, Weller TH. Virologic and Serologic Studies on Human Products of Conception after Maternal Rubella. *N Engl J Med.* 1964;271:1275-81.
- Fazil Z, Ten Berge JC, Langerak AW, Rothova A, Dik WA. An Intraocular Inflammatory Profile of Rubella Associated Uveitis. *Ocul Immunol Inflamm.* 2019;27(3):418-23.

- Vinje J, Estes MK, Esteves P, Green KY, Katayama K, Knowles NJ, et al. ICTV Virus Taxonomy Profile: Caliciviridae. *J Gen Virol*. 2019;100(11):1469-70.
- Karst SM, Wobus CE, Goodfellow IG, Green KY, Virgin HW. Advances in norovirus biology. *Cell Host Microbe*. 2014;15(6):668-80.
- Wobus CE, Karst SM, Thackray LB, Chang KO, Sosnovtsev SV, Belliot G, et al. Replication of Norovirus in cell culture reveals a tropism for dendritic cells and macrophages. *PLoS Biol*. 2004;2(12):e432.
- Weiss SR, Navas-Martin S. Coronavirus pathogenesis and the emerging pathogen severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2005;69(4):635-64.
- Ruan YJ, Wei CL, Ee AL, Vega VB, Thoreau H, Su ST, et al. Comparative full-length genome sequence analysis of 14 SARS coronavirus isolates and common mutations associated with putative origins of infection. *Lancet*. 2003;361(9371):1779-85.
- Huang KJ, Su IJ, Theron M, Wu YC, Lai SK, Liu CC, et al. An interferon-gamma-related cytokine storm in SARS patients. *J Med Virol*. 2005;75(2):185-94.
- Zumla A, Hui DS, Perlman S. Middle East respiratory syndrome. *Lancet*. 2015;386(9997):995-1007.
- Min CK, Cheon S, Ha NY, Sohn KM, Kim Y, Aigerim A, et al. Comparative and kinetic analysis of viral shedding and immunological responses in MERS patients representing a broad spectrum of disease severity. *Sci Rep*. 2016;6:25359.
- Cardone M, Yano M, Rosenberg AS, Puig M. Lessons Learned to Date on COVID-19 Hyperinflammatory Syndrome: Considerations for Interventions to Mitigate SARS-CoV-2 Viral Infection and Detrimental Hyperinflammation. *Front Immunol*. 2020;11:1131.
- Xu J, Yang X, Yang L, Zou X, Wang Y, Wu Y, et al. Clinical course and predictors of 60-day mortality in 239 critically ill patients with COVID-19: a multicenter retrospective study from Wuhan, China. *Crit Care*. 2020;24(1):394.
- Mehta P, McAuley DF, Brown M, Sanchez E, Tattersall RS, Manson JJ, et al. COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression. *Lancet*. 2020;395(10229):1033-4.
- Davis WG, Blackwell JL, Shi PY, Brinton MA. Interaction between the cellular protein eEF1A and the 3'-terminal stem-loop of West Nile virus genomic RNA facilitates viral minus-strand RNA synthesis. *J Virol*. 2007;81(18):10172-87.

- Suthar MS, Diamond MS, Gale M, Jr. West Nile virus infection and immunity. *Nat Rev Microbiol.* 2013;11(2):115-28.
- Rossi SL, Ross TM, Evans JD. West Nile virus. *Clin Lab Med.* 2010;30(1):47-65.
- Rossini G, Landini MP, Gelsomino F, Sambri V, Varani S. Innate host responses to West Nile virus: Implications for central nervous system immunopathology. *World J Virol.* 2013;2(2):49-56.
- Getts DR, Terry RL, Getts MT, Muller M, Rana S, Shrestha B, et al. Ly6c+ "inflammatory monocytes" are microglial precursors recruited in a pathogenic manner in West Nile virus encephalitis. *J Exp Med.* 2008;205(10):2319-37.
- Wang T, Town T, Alexopoulou L, Anderson JF, Fikrig E, Flavell RA. Toll-like receptor 3 mediates West Nile virus entry into the brain causing lethal encephalitis. *Nat Med.* 2004;10(12):1366-73.
- Kumar M, Verma S, Nerurkar VR. Pro-inflammatory cytokines derived from West Nile virus (WNV)-infected SK-N-SH cells mediate neuroinflammatory markers and neuronal death. *J Neuroinflammation.* 2010;7:73.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение общей формулы I



где X выбран из O и NH;

Y выбран из CO и -COCH(CH₃)CO-;

каждый n и p независимо выбран из 0 и 1, и q выбран из 0, 1 и 2;

каждый R₁, R₃, R₅, R₉, R₁₁ и R₁₅ независимо выбран из водорода, замещенного или незамещенного C₁-C₆алкила, замещенного или незамещенного C₂-C₆алкенила и замещенного или незамещенного C₂-C₆алкинила;

R₂ выбран из водорода, COR_a, COOR_a, замещенного или незамещенного C₁-C₆алкила, замещенного или незамещенного C₂-C₆алкенила и замещенного или незамещенного C₂-C₆алкинила;

каждый R₄, R₈, R₁₀, R₁₂ и R₁₆ независимо выбран из водорода и замещенного или незамещенного C₁-C₆алкила;

каждый R₇ и R₁₃ независимо выбран из водорода, замещенного или незамещенного C₁-C₆алкила, замещенного или незамещенного C₂-C₆алкенила и замещенного или незамещенного C₂-C₆алкинила; каждый R₆ и R₁₄ независимо выбран из водорода и замещенного или незамещенного C₁-C₆алкила; или R₆ и R₇ и/или R₁₃ и R₁₄ вместе с соответствующим атомом N и атомом C, к которым они присоединены, могут образовывать замещенную или незамещенную гетероциклическую группу;

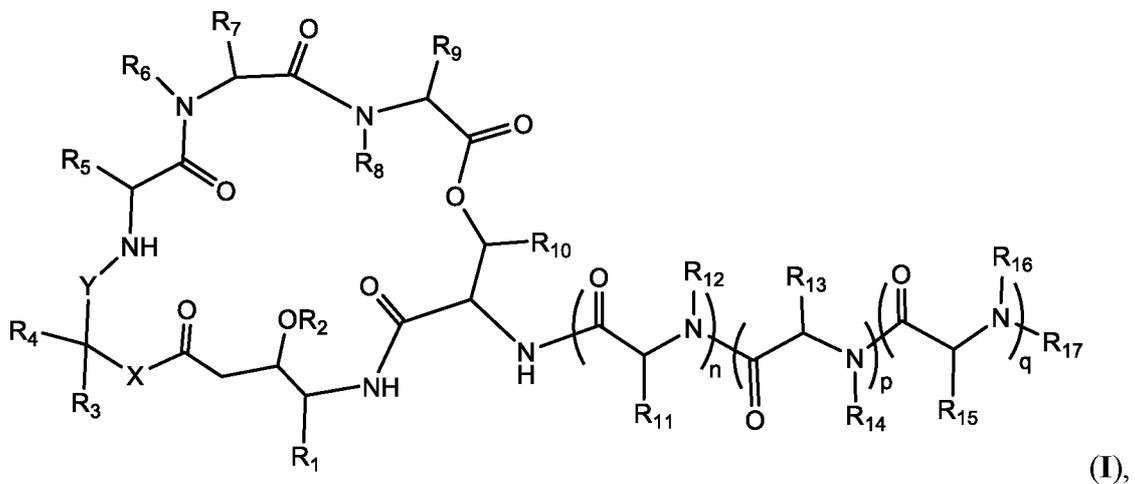
R₁₇ выбран из водорода, COR_a, COOR_a, CONHR_b, COSR_c, (C=NR_b)OR_a, (C=NR_b)NHR_b, (C=NR_b)SR_c, (C=S)OR_a, (C=S)NHR_b, (C=S)SR_c, SO₂R_c, SO₃R_c, замещенного или незамещенного C₁-C₁₂алкила, замещенного или незамещенного C₂-C₁₂алкенила, замещенного или незамещенного C₂-C₁₂алкинила, замещенного или

незамещенного арила и замещенной или незамещенной гетероциклической группы, при условии что, когда n , p и q равны 0, тогда R_{17} не является водородом; и

каждый R_a , R_b и R_c независимо выбран из водорода, замещенного или незамещенного C_1 - C_{12} алкила, замещенного или незамещенного C_2 - C_{12} алкенила, замещенного или незамещенного C_2 - C_{12} алкинила, замещенного или незамещенного арила и замещенной или незамещенной гетероциклической группы;

или его фармацевтически приемлемые соль или стереоизомер для применения в лечении воспаления.

2. Соединение общей формулы I



где X выбран из O и NH;

Y выбран из CO и $-\text{COCH}(\text{CH}_3)\text{CO}-$;

каждый n и p независимо выбран из 0 и 1, и q выбран из 0, 1 и 2;

каждый R_1 , R_3 , R_5 , R_9 , R_{11} и R_{15} независимо выбран из водорода, замещенного или незамещенного C_1 - C_6 алкила, замещенного или незамещенного C_2 - C_6 алкенила и замещенного или незамещенного C_2 - C_6 алкинила;

R_2 выбран из водорода, COR_a , COOR_a , замещенного или незамещенного C_1 - C_6 алкила, замещенного или незамещенного C_2 - C_6 алкенила и замещенного или незамещенного C_2 - C_6 алкинила;

каждый R_4 , R_8 , R_{10} , R_{12} и R_{16} независимо выбран из водорода и замещенного или незамещенного C_1 - C_6 алкила;

каждый R_7 и R_{13} независимо выбран из водорода, замещенного или незамещенного C_1 - C_6 алкила, замещенного или незамещенного C_2 - C_6 алкенила и замещенного или незамещенного C_2 - C_6 алкинила; каждый R_6 и R_{14} независимо выбран из водорода и замещенного или незамещенного C_1 - C_6 алкила; или R_6 и R_7 и/или R_{13} и R_{14}

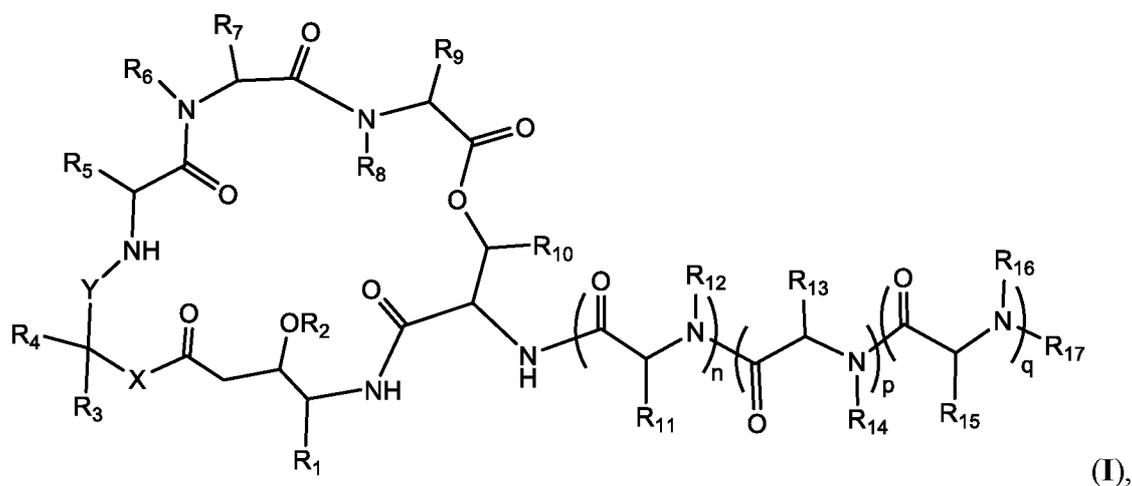
вместе с соответствующим атомом N и атомом C, к которым они присоединены, могут образовывать замещенную или незамещенную гетероциклическую группу;

R_{17} выбран из водорода, COR_a , $COOR_a$, $CONHR_b$, $COSR_c$, $(C=NR_b)OR_a$, $(C=NR_b)NHR_b$, $(C=NR_b)SR_c$, $(C=S)OR_a$, $(C=S)NHR_b$, $(C=S)SR_c$, SO_2R_c , SO_3R_c , замещенного или незамещенного C_1 - C_{12} алкила, замещенного или незамещенного C_2 - C_{12} алкенила, замещенного или незамещенного C_2 - C_{12} алкинила, замещенного или незамещенного арила и замещенной или незамещенной гетероциклической группы, при условии что, когда n , p и q равны 0, тогда R_{17} не является водородом; и

каждый R_a , R_b и R_c независимо выбран из водорода, замещенного или незамещенного C_1 - C_{12} алкила, замещенного или незамещенного C_2 - C_{12} алкенила, замещенного или незамещенного C_2 - C_{12} алкинила, замещенного или незамещенного арила и замещенной или незамещенной гетероциклической группы;

или его фармацевтически приемлемые соль или стереоизомер для применения в лечении воспаления, связанного с активацией Toll-подобных рецепторов.

3. Соединение общей формулы I



где X выбран из O и NH;

Y выбран из CO и $-COCH(CH_3)CO-$;

каждый n и p независимо выбран из 0 и 1, и q выбран из 0, 1 и 2;

каждый R_1 , R_3 , R_5 , R_9 , R_{11} и R_{15} независимо выбран из водорода, замещенного или незамещенного C_1 - C_6 алкила, замещенного или незамещенного C_2 - C_6 алкенила и замещенного или незамещенного C_2 - C_6 алкинила;

R_2 выбран из водорода, COR_a , $COOR_a$, замещенного или незамещенного C_1 - C_6 алкила, замещенного или незамещенного C_2 - C_6 алкенила и замещенного или незамещенного C_2 - C_6 алкинила;

каждый R_4 , R_8 , R_{10} , R_{12} и R_{16} независимо выбран из водорода и замещенного или незамещенного C_1 - C_6 алкила;

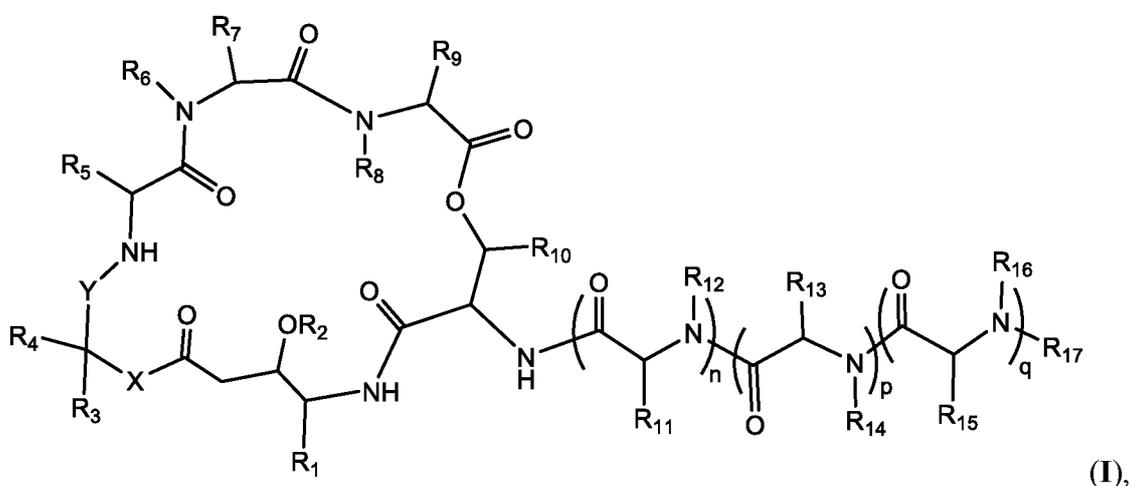
каждый R_7 и R_{13} независимо выбран из водорода, замещенного или незамещенного C_1 - C_6 алкила, замещенного или незамещенного C_2 - C_6 алкенила и замещенного или незамещенного C_2 - C_6 алкинила; каждый R_6 и R_{14} независимо выбран из водорода и замещенного или незамещенного C_1 - C_6 алкила; или R_6 и R_7 и/или R_{13} и R_{14} вместе с соответствующим атомом N и атомом C, к которым они присоединены, могут образовывать замещенную или незамещенную гетероциклическую группу;

R_{17} выбран из водорода, COR_a , $COOR_a$, $CONHR_b$, $COSR_c$, $(C=NR_b)OR_a$, $(C=NR_b)NHR_b$, $(C=NR_b)SR_c$, $(C=S)OR_a$, $(C=S)NHR_b$, $(C=S)SR_c$, SO_2R_c , SO_3R_c , замещенного или незамещенного C_1 - C_{12} алкила, замещенного или незамещенного C_2 - C_{12} алкенила, замещенного или незамещенного C_2 - C_{12} алкинила, замещенного или незамещенного арила и замещенной или незамещенной гетероциклической группы, при условии что, когда n, p и q равны 0, тогда R_{17} не является водородом; и

каждый R_a , R_b и R_c независимо выбран из водорода, замещенного или незамещенного C_1 - C_{12} алкила, замещенного или незамещенного C_2 - C_{12} алкенила, замещенного или незамещенного C_2 - C_{12} алкинила, замещенного или незамещенного арила и замещенной или незамещенной гетероциклической группы;

или его фармацевтически приемлемые соль или стереоизомер для применения в лечении расстройства, выбранного из пневмонии, острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС), иммунопатологии, предпочтительно гиперцитокинемии (синдром цитокинового шторма), сепсиса и болезни «трансплантат против хозяина».

4. Соединение общей формулы I



где X выбран из O и NH;

Y выбран из CO и -COCH(CH₃)CO-;

каждый p и r независимо выбран из 0 и 1, и q выбран из 0, 1 и 2;

каждый R₁, R₃, R₅, R₉, R₁₁ и R₁₅ независимо выбран из водорода, замещенного или незамещенного C₁-C₆алкила, замещенного или незамещенного C₂-C₆алкенила и замещенного или незамещенного C₂-C₆алкинила;

R₂ выбран из водорода, COR_a, COOR_a, замещенного или незамещенного C₁-C₆алкила, замещенного или незамещенного C₂-C₆алкенила и замещенного или незамещенного C₂-C₆алкинила;

каждый R₄, R₈, R₁₀, R₁₂ и R₁₆ независимо выбран из водорода и замещенного или незамещенного C₁-C₆алкила;

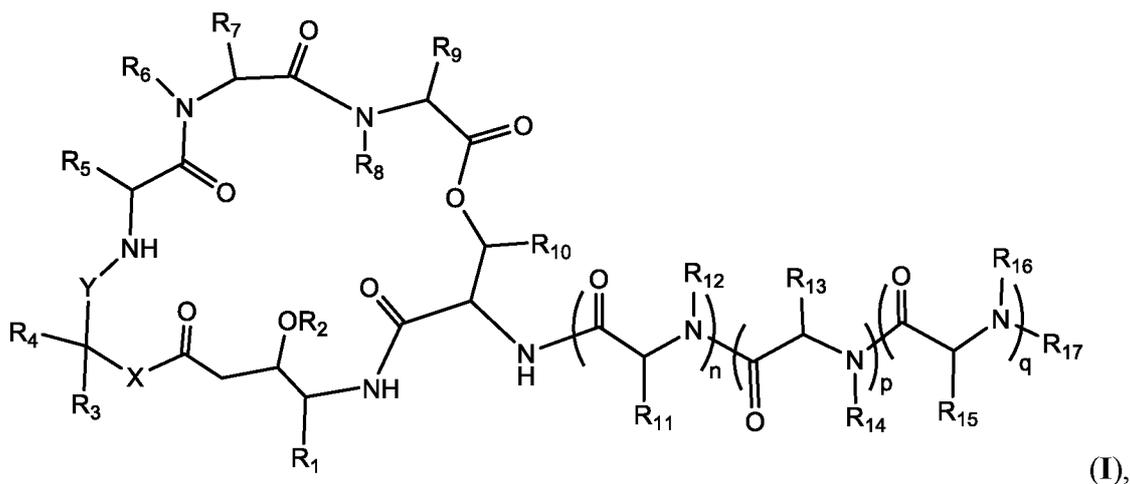
каждый R₇ и R₁₃ независимо выбран из водорода, замещенного или незамещенного C₁-C₆алкила, замещенного или незамещенного C₂-C₆алкенила и замещенного или незамещенного C₂-C₆алкинила; каждый R₆ и R₁₄ независимо выбран из водорода и замещенного или незамещенного C₁-C₆алкила; или R₆ и R₇ и/или R₁₃ и R₁₄ вместе с соответствующим атомом N и атомом C, к которым они присоединены, могут образовывать замещенную или незамещенную гетероциклическую группу;

R₁₇ выбран из водорода, COR_a, COOR_a, CONHR_b, COSR_c, (C=NR_b)OR_a, (C=NR_b)NHR_b, (C=NR_b)SR_c, (C=S)OR_a, (C=S)NHR_b, (C=S)SR_c, SO₂R_c, SO₃R_c, замещенного или незамещенного C₁-C₁₂алкила, замещенного или незамещенного C₂-C₁₂алкенила, замещенного или незамещенного C₂-C₁₂алкинила, замещенного или незамещенного арила и замещенной или незамещенной гетероциклической группы, при условии что, когда p, r и q равны 0, тогда R₁₇ не является водородом; и

каждый R_a, R_b и R_c независимо выбран из водорода, замещенного или незамещенного C₁-C₁₂алкила, замещенного или незамещенного C₂-C₁₂алкенила, замещенного или незамещенного C₂-C₁₂алкинила, замещенного или незамещенного арила и замещенной или незамещенной гетероциклической группы;

или его фармацевтически приемлемые соль или стереоизомер для применения в лечении воспаления, вызванного патогенами.

5. Соединение по п. 4, где патоген выбран из вируса и бактерии.
6. Соединение общей формулы I



где X выбран из O и NH;

Y выбран из CO и $-\text{COCH}(\text{CH}_3)\text{CO}-$;

каждый n и p независимо выбран из 0 и 1, и q выбран из 0, 1 и 2;

каждый R_1 , R_3 , R_5 , R_9 , R_{11} и R_{15} независимо выбран из водорода, замещенного или незамещенного C_1 - C_6 алкила, замещенного или незамещенного C_2 - C_6 алкенила и замещенного или незамещенного C_2 - C_6 алкинила;

R_2 выбран из водорода, COR_a , COOR_a , замещенного или незамещенного C_1 - C_6 алкила, замещенного или незамещенного C_2 - C_6 алкенила и замещенного или незамещенного C_2 - C_6 алкинила;

каждый R_4 , R_8 , R_{10} , R_{12} и R_{16} независимо выбран из водорода и замещенного или незамещенного C_1 - C_6 алкила;

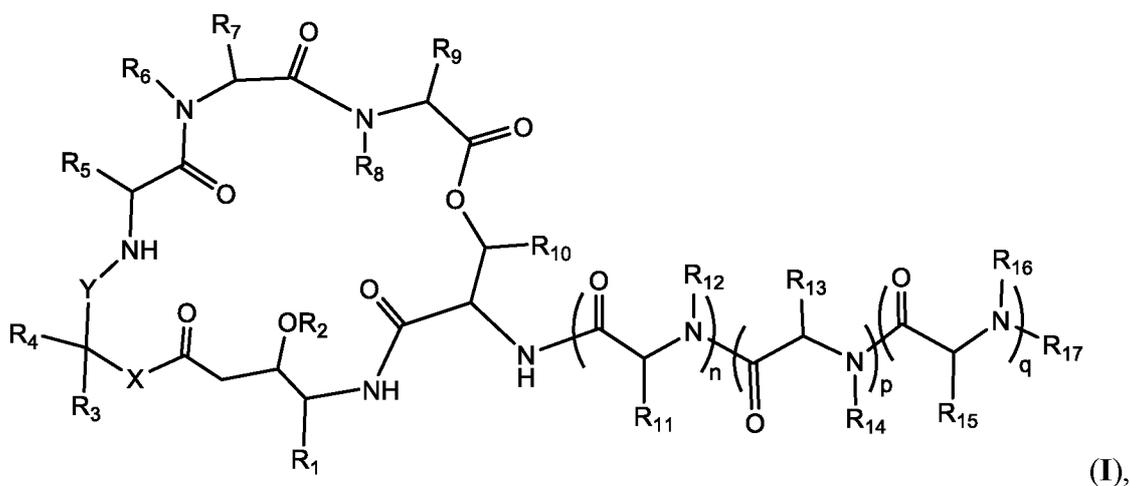
каждый R_7 и R_{13} независимо выбран из водорода, замещенного или незамещенного C_1 - C_6 алкила, замещенного или незамещенного C_2 - C_6 алкенила и замещенного или незамещенного C_2 - C_6 алкинила; каждый R_6 и R_{14} независимо выбран из водорода и замещенного или незамещенного C_1 - C_6 алкила; или R_6 и R_7 и/или R_{13} и R_{14} вместе с соответствующим атомом N и атомом C, к которым они присоединены, могут образовывать замещенную или незамещенную гетероциклическую группу;

R_{17} выбран из водорода, COR_a , COOR_a , CONHR_b , COSR_c , $(\text{C}=\text{NR}_b)\text{OR}_a$, $(\text{C}=\text{NR}_b)\text{NHR}_b$, $(\text{C}=\text{NR}_b)\text{SR}_c$, $(\text{C}=\text{S})\text{OR}_a$, $(\text{C}=\text{S})\text{NHR}_b$, $(\text{C}=\text{S})\text{SR}_c$, SO_2R_c , SO_3R_c , замещенного или незамещенного C_1 - C_{12} алкила, замещенного или незамещенного C_2 - C_{12} алкенила, замещенного или незамещенного C_2 - C_{12} алкинила, замещенного или незамещенного арила и замещенной или незамещенной гетероциклической группы, при условии что, когда n, p и q равны 0, тогда R_{17} не является водородом; и

каждый R_a , R_b и R_c независимо выбран из водорода, замещенного или незамещенного C_1 - C_{12} алкила, замещенного или незамещенного C_2 - C_{12} алкенила, замещенного или незамещенного C_2 - C_{12} алкинила, замещенного или незамещенного арила и замещенной или незамещенной гетероциклической группы;

или его фармацевтически приемлемые соль или стереоизомер для применения в комбинированном лечении воспаления, связанного с активацией Toll-подобных рецепторов, или воспаления, вызванного патогенами, и в лечении вирусной инфекции.

7. Соединение общей формулы I



где X выбран из O и NH;

Y выбран из CO и $-\text{COCH}(\text{CH}_3)\text{CO}-$;

каждый n и p независимо выбран из 0 и 1, и q выбран из 0, 1 и 2;

каждый R_1 , R_3 , R_5 , R_9 , R_{11} и R_{15} независимо выбран из водорода, замещенного или незамещенного C_1 - C_6 алкила, замещенного или незамещенного C_2 - C_6 алкенила и замещенного или незамещенного C_2 - C_6 алкинила;

R_2 выбран из водорода, COR_a , COOR_a , замещенного или незамещенного C_1 - C_6 алкила, замещенного или незамещенного C_2 - C_6 алкенила и замещенного или незамещенного C_2 - C_6 алкинила;

каждый R_4 , R_8 , R_{10} , R_{12} и R_{16} независимо выбран из водорода и замещенного или незамещенного C_1 - C_6 алкила;

каждый R_7 и R_{13} независимо выбран из водорода, замещенного или незамещенного C_1 - C_6 алкила, замещенного или незамещенного C_2 - C_6 алкенила и замещенного или незамещенного C_2 - C_6 алкинила; каждый R_6 и R_{14} независимо выбран из водорода и замещенного или незамещенного C_1 - C_6 алкила; или R_6 и R_7 и/или R_{13} и R_{14}

вместе с соответствующим атомом N и атомом C, к которым они присоединены, могут образовывать замещенную или незамещенную гетероциклическую группу;

R_{17} выбран из водорода, COR_a , $COOR_a$, $CONHR_b$, $COSR_c$, $(C=NR_b)OR_a$, $(C=NR_b)NHR_b$, $(C=NR_b)SR_c$, $(C=S)OR_a$, $(C=S)NHR_b$, $(C=S)SR_c$, SO_2R_c , SO_3R_c , замещенного или незамещенного C_1 - C_{12} алкила, замещенного или незамещенного C_2 - C_{12} алкенила, замещенного или незамещенного C_2 - C_{12} алкинила, замещенного или незамещенного арила и замещенной или незамещенной гетероциклической группы, при условии что, когда n, p и q равны 0, тогда R_{17} не является водородом; и

каждый R_a , R_b и R_c независимо выбран из водорода, замещенного или незамещенного C_1 - C_{12} алкила, замещенного или незамещенного C_2 - C_{12} алкенила, замещенного или незамещенного C_2 - C_{12} алкинила, замещенного или незамещенного арила и замещенной или незамещенной гетероциклической группы;

или его фармацевтически приемлемые соль или стереоизомер для применения в качестве противовоспалительного и противовирусного средства.

8. Соединение по любому из пп. 1-7, где R_3 и R_4 независимо выбраны из водорода и замещенного или незамещенного C_1 - C_6 алкила; предпочтительно, где R_3 представляет собой изопропил, и R_4 представляет собой водород.

9. Соединение по любому из пп. 1-8 общей формулы II, где R_3 и R_4 представляют собой метил.

10. Соединение по любому из пп. 1-9, где R_{11} выбран из водорода и замещенного или незамещенного C_1 - C_6 алкила; предпочтительно, где R_{11} представляет собой метил или изобутил.

11. Соединение по любому из пп. 1-10 общей формулы III, где R_{11} представляет собой метил, и n равен 1.

12. Соединение по любому из пп. 1-11, где R_1 , R_5 , R_9 и R_{15} независимо выбраны из водорода и замещенного или незамещенного C_1 - C_6 алкила; предпочтительно, где R_1 выбран из *втор*-бутила и изопропила, R_5 представляет собой изобутил, R_9 представляет собой *пара*-метоксибензил, и R_{15} выбран из метила и бензила.

13. Соединение по любому из пп. 1-12, где R_8 , R_{10} , R_{12} и R_{16} независимо выбраны из водорода и замещенного или незамещенного C_1 - C_6 алкила; предпочтительно, где R_8 , R_{10} и R_{12} представляют собой метил, и R_{16} представляет собой водород.

14. Соединение по любому из пп. 1-13, где R_6 и R_{14} независимо выбраны из водорода и замещенного или незамещенного C_1 - C_6 алкила; предпочтительно, где R_6 выбран из водорода и метила, и R_{14} представляет собой водород.

15. Соединение по любому из пп. 1-14, где R_7 и R_{13} независимо выбраны из водорода и замещенного или незамещенного C_1 - C_6 алкила; предпочтительно, где R_7 представляет собой метил, и R_{13} выбран из водорода, метила, изопропила, изобутила и 3-амино-3-оксопропила.

16. Соединение по любому из пп. 1-13, где R_6 и R_7 и/или R_{13} и R_{14} вместе с соответствующим атомом N и атомом C, к которым они присоединены, образуют замещенную или незамещенную пирролидиновую группу.

17. Соединение по любому из пп. 1-16, где R_2 выбран из водорода, замещенного или незамещенного C_1 - C_6 алкила и COR_a , и где R_a представляет собой замещенный или незамещенный C_1 - C_6 алкил; предпочтительно, где R_2 представляет собой водород.

18. Соединение по любому из пп. 1-17, где R_{17} выбран из водорода, COR_a , $COOR_a$, $CONHR_b$, $(C=S)NHR_b$ и SO_2R_c , и где каждый R_a , R_b и R_c независимо выбран из замещенного или незамещенного C_1 - C_6 алкила, замещенного или незамещенного C_2 - C_6 алкенила, замещенного или незамещенного C_2 - C_6 алкинила, замещенного или незамещенного арила и замещенной или незамещенной гетероциклической группы; предпочтительно, где R_{17} выбран из водорода, COO бензила, CO бензо[b]тиофен-2-ила, группы SO_2 (*para*-метилфенил), $COCOCH_3$ и $COOC(CH_3)_3$.

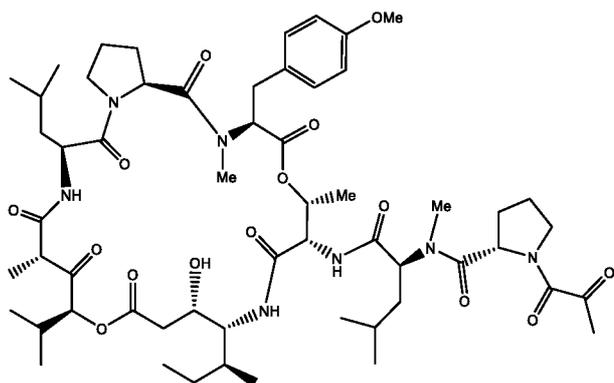
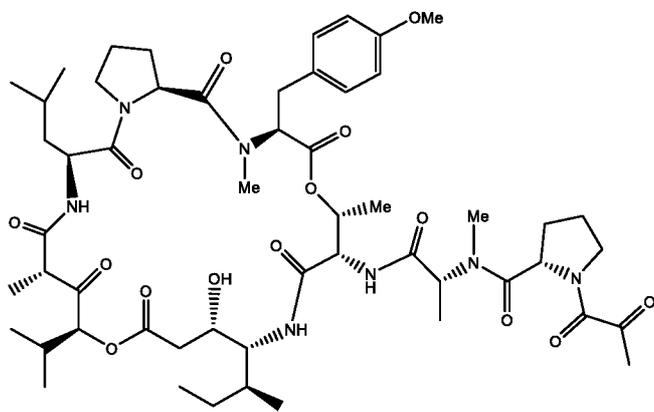
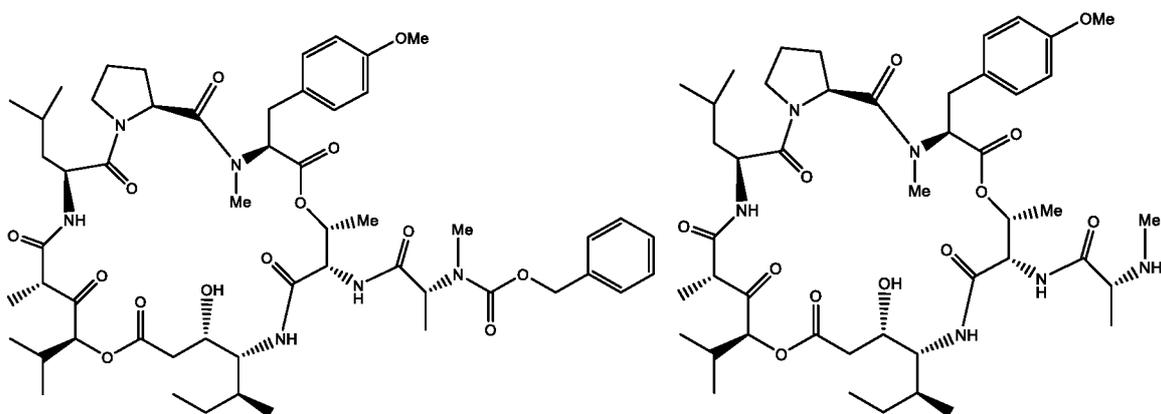
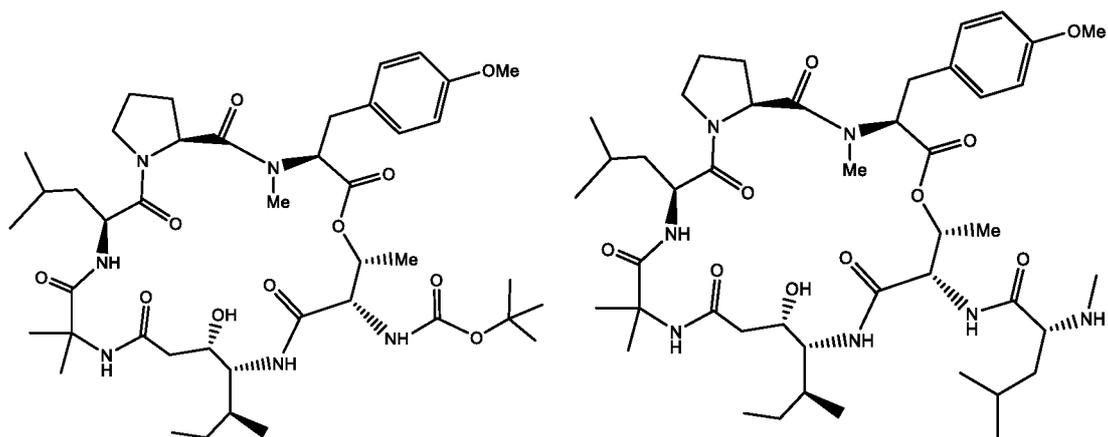
19. Соединение по любому из пп. 1-18, где X представляет собой NH.

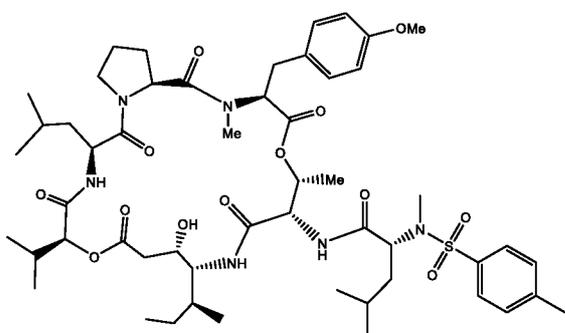
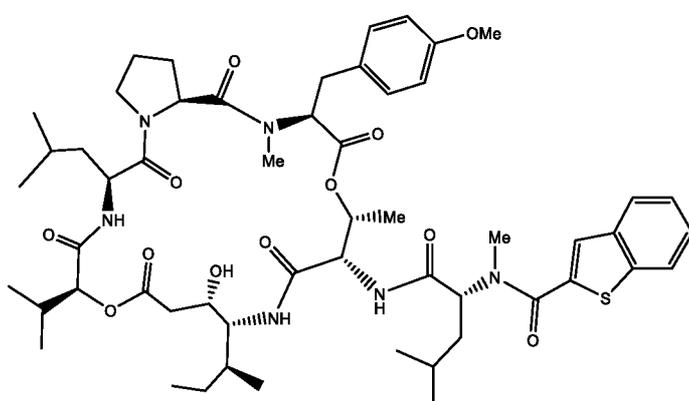
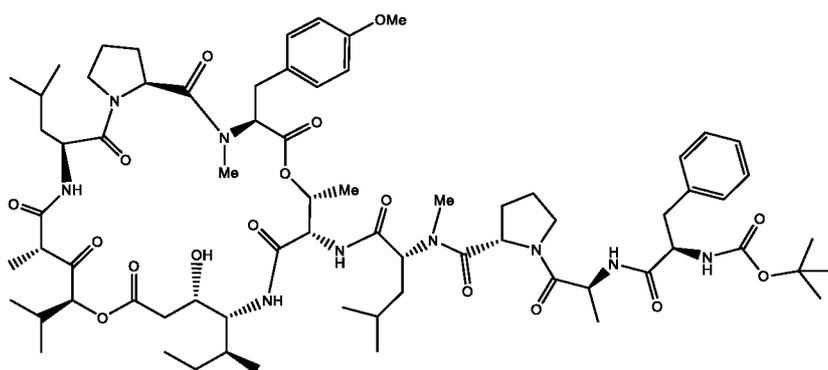
20. Соединение по любому из пп. 1-18, где X представляет собой O.

21. Соединение по любому из пп. 1-20, где Y представляет собой CO.

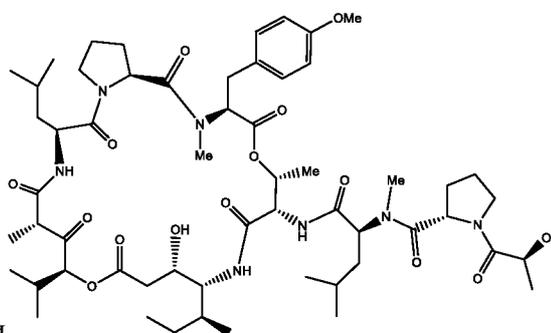
22. Соединение по любому из пп. 1-20, где Y представляет собой $-COCH(CH_3)CO-$.

23. Соединение по любому из пп. 1-7, имеющее следующую структуру:





ИЛИ



или его фармацевтически приемлемые соли или стереоизомеры.

24. Соединение по любому из пп. 1-7, где соединение представляет собой плитидепсин (PLD) или его фармацевтически приемлемые соли или стереоизомеры.

25. Соединение по любому из пп. 1-7, где соединение представляет собой дидемнин В или его фармацевтически приемлемые соли или стереоизомеры.

26. Соединение по п. 2, где Toll-подобные рецепторы активированы одноцепочечным РНК-вирусом, где предпочтительно вирус выбран из *Flaviviridae*, *Picornaviridae*, *Togaviridae*, *Caliciviridae*, *Retroviridae*, *Coronaviridae*, *Orthomyxoviridae*,

Phlebovirus и *Arenaviridae*, или двухцепочечным (дц)ДНК-вирусом, предпочтительно *Herpesviridae*.

27. Соединение по любому из пп. 4-6, где патоген представляет собой вирус, предпочтительно одноцепочечный РНК-вирус, где предпочтительно вирус выбран из *Flaviviridae*, *Picornaviridae*, *Togaviridae*, *Caliciviridae*, *Retroviridae*, *Coronaviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Phlebovirus* и *Arenaviridae*, или дцДНК-вирус, предпочтительно *Herpesviridae*.

28. Соединение по п. 5, 6 или 7, где вирус представляет собой одноцепочечный РНК-вирус, где предпочтительно вирус выбран из *Flaviviridae*, *Picornaviridae*, *Togaviridae*, *Caliciviridae*, *Retroviridae*, *Coronaviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Phlebovirus* и *Arenaviridae*, или дцДНК-вирус, предпочтительно *Herpesviridae*.

29. Соединение по любому из пп. 26-28, где вирус представляет собой вирус семейства *Flaviviridae* и возможно выбран из вируса желтой лихорадки (YFV), вируса гепатита С, вируса Западного Нила (WNV), вируса денге (DENV), вируса японского энцефалита (JEV), вируса клещевого энцефалита (TBEV), вируса классической чумы свиней и вируса Зика (ZIKV).

30. Соединение по любому из пп. 26-28, где вирус представляет собой вирус семейства *Coronavirinae* и возможно является SARS-CoV-2.

31. Соединение по любому из пп. 26-28, где вирус представляет собой вирус семейства *Picornaviridae* и возможно является вирусом ящура, энтеровирусом А71, вирусами Коксаки, риновирусом и вирусом гепатита А.

32. Соединение по любому из пп. 26-28, где вирус представляет собой вирус семейства *Togaviridae* и возможно является вирусом чикунгунья, вирусом Синдбис, вирусом леса Семлики, вирусом восточного энцефалита лошадей/вирусом западного энцефалита лошадей/вирусом венесуэльского энцефалита лошадей и вирусом краснухи.

33. Соединение по любому из пп. 26-28, где вирус представляет собой вирус семейства *Caliciviridae* и возможно является лаговиром, норовирусом, небовирусом, рековиром, саповирусом, валовирусом и везивирусом и, в частности, вирусом Норфолк.

34. Соединение по любому из пп. 26-28, где вирус представляет собой вирус семейства *Retroviridae* и возможно является ВИЧ (вирусом иммунодефицита человека).

35. Соединение по любому из пп. 26-28, где вирус представляет собой вирус семейства *Orthomyxoviridae* и возможно является вирусом гриппа.

36. Соединение по любому из пп. 26-28, где вирус представляет собой вирус семейства *Phlebovirus* и возможно является вирусом флеботомной лихорадки или вирусом лихорадки долины Рифт.

37. Соединение по любому из пп. 26-28, где вирус представляет собой вирус семейства *Arenaviridae* и возможно является вирусом Пичинде.

38. Соединение по любому из пп. 26-28, где вирус представляет собой вирус семейства *Herpesviridae*, предпочтительно вирус простого герпеса 1 или 2.

39. Соединение по любому из пп. 26-28, где вирус представляет собой респираторный вирус.

40. Соединение по любому из пп. 1-39, где вирус представляет собой SARS-CoV-2, для применения в лечении COVID-19 и/или для применения в лечении пневмонии или ОРДС, вызванных COVID-19.

41. Соединение по п. 30, где коронавирусная (CoV) инфекция представляет собой инфекцию легкой степени; и/или где CoV инфекция представляет собой инфекцию средней степени тяжести; и/или где CoV инфекция представляет собой тяжелую инфекцию.

42. Соединение по п. 30, где CoV инфекция представляет собой острую CoV инфекцию, предпочтительно где CoV инфекция представляет собой острую инфекцию COVID-19; и/или где CoV инфекция представляет собой продолжающуюся симптоматическую CoV инфекцию, предпочтительно где CoV инфекция представляет собой продолжающуюся симптоматическую инфекцию COVID-19; и/или где CoV инфекция представляет собой постковидный синдром, персистирующий ковид или долгий ковид; предпочтительно, где CoV инфекция представляет собой пост-COVID-19-синдром, персистирующий COVID или долгий COVID.

43. Соединение по п. 42, где постковидный синдром, персистирующий ковид или долгий ковид включают один или более чем один симптом, возникающий со стороны сердечно-сосудистой, респираторной, пищеварительной, нервной, костно-мышечной, метаболической, почечной, дерматологической, отоларингологической, кроветворной и вегетативной систем; психические проблемы, генерализованную боль, утомляемость и/или постоянную лихорадку.

44. Соединение по п. 30 для применения в лечении пациента с признаками и симптомами CoV инфекции (предпочтительно COVID-19) в течение вплоть до 4 недель; и/или для применения в лечении пациента с признаками и симптомами CoV инфекции

(предпочтительно COVID-19) в течение от 4 недель до 12 недель; и/или для применения в лечении пациента с признаками и симптомами CoV инфекции, предпочтительно COVID-19, в течение более 12 недель.

45. Соединение по п. 30 для применения в профилактике, купировании или лечении персистирующего COVID, долгого COVID или пост-COVID-синдрома; предпочтительно, где профилактика, купирование или лечение сводят к минимуму вероятность того, что пациент будет страдать от симптомов персистирующего COVID, долгого COVID или пост-COVID-синдрома; и/или уменьшают тяжесть таких симптомов; более предпочтительно, где лечение сводит к минимуму симптомы CoV инфекции.

46. Соединение по п. 30, где лечение снижает инфекционность пациентов с CoV инфекцией; в том числе, когда пациент бессимптомен или еще малосимптомен, но имеет высокую вирусную нагрузку.

47. Соединение для применения по любому из пп. 1-46, где соединение вводят в комбинации с кортикостероидом, предпочтительно дексаметазоном.

48. Соединение для применения по п. 47, где соединение и кортикостероид вводят одновременно, отдельно или последовательно.

49. Соединение для применения по любому из пп. 1-48, где соединение вводят согласно схеме одна доза в сутки в течение 10 суток, 9 суток, 8 суток, 7 суток, 6 суток, 5 суток, 4 суток, 3 суток, 2 суток или 1 суток; предпочтительно 2-5 суток, 3-5 суток или 3, 4 или 5 суток; наиболее предпочтительно 3 суток или 5 суток; наиболее предпочтительно 3 суток.

50. Соединение для применения по любому из пп. 1-49, где соединение вводят в дозе 5 мг в сутки или менее; 4,5 мг в сутки или менее; 4 мг в сутки или менее; 3,5 мг в сутки или менее; 3 мг в сутки или менее; 2,5 мг в сутки или менее или 2 мг в сутки или менее; 0,5 мг/сутки, 1 мг/сутки, 1,5 мг/сутки, 2 мг/сутки, 2,5 мг/сутки, 3 мг/сутки, 3,5 мг/сутки, 4 мг/сутки, 4,5 мг/сутки или 5 мг/сутки; предпочтительно 1 мг/сутки, 1,5 мг/сутки, 2 мг/сутки или 2,5 мг/сутки; более предпочтительно 1,5-2,5 мг/сутки; наиболее предпочтительно 1,5 мг/сутки, 2 мг/сутки или 2,5 мг/сутки.

51. Соединение для применения по любому из пп. 1-50, где соединение вводят в общей дозе 1-50 мг, 1-40 мг, 1-30 мг, 1-20 мг, 1-15 мг, 3-15 мг, 3-12 мг, 4-12 мг, 4-10 мг или 4,5-10 мг; 4 мг, 4,5 мг, 5 мг, 5,5 мг, 6 мг, 6,5 мг, 7 мг, 7,5 мг, 8 мг, 8,5 мг, 9 мг, 9,5 мг или 10 мг; предпочтительно 4,5 мг, 5 мг, 6 мг, 7,5 мг, 8 мг, 9 мг или 10 мг; более предпочтительно 4,5-7,5 мг/сутки.

52. Соединение для применения по любому из пп. 1-51, где соединение вводят посредством инфузии.

53. Соединение для применения по п. 52, где инфузия представляет собой 1-часовую инфузию, 1,5-часовую инфузию, 2-часовую инфузию или 3-часовую инфузию; предпочтительно 1,5-часовую инфузию.

54. Соединение для применения по любому из пп. 1-53, где 1,5 мг плитидепсина вводят в виде 1,5-часовой инфузии один раз в сутки в течение 3 суток подряд; или где 2 мг плитидепсина вводят в виде 1,5-часовой инфузии один раз в сутки в течение 3 суток подряд; где 2,5 мг плитидепсина вводят в виде 1,5-часовой инфузии один раз в сутки в течение 3 суток подряд; или где 1 мг плитидепсина вводят в виде 1,5-часовой инфузии один раз в сутки в течение 5 суток подряд; или где 2 мг плитидепсина вводят в виде 1,5-часовой инфузии один раз в сутки в течение 5 суток подряд.

55. Соединение для применения по любому из пп. 1-54, где соединение вводят с использованием нагрузочной дозы и поддерживающей дозы.

56. Соединение для применения по п. 55, где схема приема представляет собой:

нагрузочную дозу 2,5 мг на 1-е сутки с последующим введением поддерживающей дозы 2 мг/сутки в течение последующих суток;

нагрузочную дозу 2,5 мг на 1-е сутки с последующим введением поддерживающей дозы 1,5 мг/сутки в течение последующих суток;

нагрузочную дозу 2,5 мг на 1-е сутки с последующим введением поддерживающей дозы 1 мг/сутки в течение последующих суток;

нагрузочную дозу 2,5 мг на 1-е сутки с последующим введением поддерживающей дозы 0,5 мг/сутки в течение последующих суток;

нагрузочную дозу 2 мг на 1-е сутки с последующим введением поддерживающей дозы 1,5 мг/сутки в течение последующих суток;

нагрузочную дозу 2 мг на 1-е сутки с последующим введением поддерживающей дозы 1 мг/сутки в течение последующих суток;

нагрузочную дозу 2 мг на 1-е сутки с последующим введением поддерживающей дозы 0,5 мг/сутки в течение последующих суток;

нагрузочную дозу 1,5 мг на 1-е сутки с последующим введением поддерживающей дозы 1 мг/сутки в течение последующих суток;

нагрузочную дозу 1,5 мг на 1-е сутки с последующим введением поддерживающей дозы 0,5 мг/сутки в течение последующих суток; или

нагрузочную дозу 1 мг на 1-е сутки с последующим введением поддерживающей дозы 0,5 мг/сутки в течение последующих суток.

57. Соединение для применения по любому из пп. 1-56, где соединение вводят в комбинации с кортикостероидом, и где кортикостероид вводят в те же сутки, что и введение соединения по любому из пп. 1-25.

58. Соединение для применения по п. 57, где кортикостероид также может быть введен в одни или более чем одни последующие сутки; предпочтительно, где кортикостероид вводят вместе с соединением на 1-3 сутки, и кортикостероид дополнительно вводят в одни или более чем одни сутки 4-10.

59. Соединение для применения по п. 58, где кортикостероид вводят внутривенно в те сутки, когда вводят соединение, но в последующие сутки вводят перорально или внутривенно.

60. Соединение для применения по любому из пп. 57-59, где кортикостероид представляет собой дексаметазон; предпочтительно, где дексаметазон вводят в дозе 6,6 мг/сутки внутривенно в те сутки, когда вводят соединение по настоящему изобретению.

61. Соединение для применения по п. 60, где дексаметазон вводят в дозе 6 мг/сутки перорально или внутривенно в последующие сутки, предпочтительно в одни или более чем одни сутки 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10.

62. Соединение для применения по любому из пп. 1-61, где PLD вводят в дозе 1,5 мг/сутки внутривенно (в/в) в комбинации с 6,6 мг/сутки дексаметазона в/в на 1-3 сутки с последующим введением 6 мг/сутки дексаметазона перорально (п/о)/в/в с 4-х по 10-е сутки включительно (согласно заключению врача в соответствии с клиническим состоянием пациента и дальнейшим развитием клинической картины); или

где PLD вводят в дозе 2,0 мг/сутки внутривенно (в/в) в комбинации с 6,6 мг/сутки дексаметазона в/в на 1-3 сутки с последующим введением 6 мг/сутки дексаметазона перорально (п/о)/в/в с 4-х по 10-е сутки включительно (согласно заключению врача в соответствии с клиническим состоянием пациента и дальнейшим развитием клинической картины); или

где PLD вводят в дозе 2,5 мг/сутки внутривенно (в/в) в комбинации с 6,6 мг/сутки дексаметазона в/в на 1-3 сутки с последующим введением 6 мг/сутки дексаметазона

перорально (п/о)/в/в с 4-х по 10-е сутки включительно (согласно заключению врача в соответствии с клиническим состоянием пациента и дальнейшим развитием клинической картины).

63. Соединение для применения по любому из пп. 57-62, где кортикостероид вводят за 20-30 минут до начала лечения соединением по любому из пп. 1-25.

64. Соединение для применения по любому из пп. 1-63, где пациент дополнительно получает следующие лекарственные препараты, предпочтительно за 20-30 минут до начала лечения соединением по любому из пп. 1-25:

ондансетрон 8 мг в/в (или эквивалент);

дифенгидрамина гидрохлорид 25 мг в/в (или эквивалент); и

ранитидин 50 мг в/в (или эквивалент).

65. Соединение для применения по любому из пп. 1-64, где на 4 и 5 сутки пациенты получают ондансетрон (или эквивалент) по 4 мг дважды в сутки п/о.

66. Соединение для применения по любому из пп. 1-53, где соединение вводят в виде однократной дозы (в 1 сутки).

67. Соединение для применения по п. 66, где однократная доза представляет собой 1-10 мг, 4-10 мг, 4,5-10 мг, 4 мг, 4,5 мг, 5 мг, 5,5 мг, 6 мг, 6,5 мг, 7 мг, 7,5 мг, 8 мг, 8,5 мг, 9 мг, 9,5 мг или 10 мг, предпочтительно 4,5 мг, 5 мг, 6 мг, 7,5 мг, 8 мг, 9 мг или 10 мг, более предпочтительно 5-9 мг, 6,5-8,5 мг, 7-8 мг или наиболее предпочтительно 7,5 мг.

68. Соединение для применения по любому из пп. 66-67, где соединение вводят в виде 1,5-часовой инфузии.

69. Соединение для применения по любому из пп. 66-68, где кортикостероид вводят согласно схеме приема по любому из пп. 57-63.

70. Соединение для применения по любому из пп. 66-69, где за 20-30 минут до введения соединения по изобретению вводят следующие профилактические лекарственные препараты:

ондансетрон 8 мг в/в (или эквивалент), в частности в виде медленной 15-минутной инфузии;

дифенгидрамина гидрохлорид 25 мг в/в (или эквивалент);

ранитидин 50 мг в/в (или эквивалент).

71. Соединение для применения по любому из пп. 66-70, где 4 мг ондансетрона перорально назначают каждые 12 часов в течение 3 суток после введения соединения по настоящему изобретению.

72. Соединение для применения по любому из пп. 1-71, где дексаметазон представляет собой дексаметазона фосфат, и его вводят в дозе 8 мг при введении в те же сутки, когда вводят соединение по изобретению (что соответствует дозе 6,6 мг основания), и вводят в дозе 7,2 мг, если вводят позже (что соответствует дозе 6 мг основания).

73. Фармацевтическая композиция, содержащая соединение по любому из пп. 1-72 или его фармацевтически приемлемые соль или стереоизомер и фармацевтически приемлемый носитель, для применения в лечении воспаления.

74. Фармацевтическая композиция, содержащая соединение по любому из пп. 1-72 или его фармацевтически приемлемые соль или стереоизомер и фармацевтически приемлемый носитель, для применения в лечении воспаления, связанного с активацией Toll-подобных рецепторов.

75. Фармацевтическая композиция, содержащая соединение по любому из пп. 1-72 или его фармацевтически приемлемые соль или стереоизомер и фармацевтически приемлемый носитель, для применения в лечении расстройства, выбранного из пневмонии, острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС) и иммунопатологии, в частности гиперцитокинемии (синдром цитокинового шторма), сепсиса и болезни «трансплантат против хозяина».

76. Фармацевтическая композиция, содержащая соединение по любому из пп. 1-72 или его фармацевтически приемлемые соль или стереоизомер и фармацевтически приемлемый носитель, для применения в лечении воспаления, вызванного патогенами.

77. Фармацевтическая композиция, содержащая соединение по любому из пп. 1-72 или его фармацевтически приемлемые соль или стереоизомер и фармацевтически приемлемый носитель, для применения в комбинированном лечении воспаления, связанного с активацией Toll-подобных рецепторов, или воспаления, вызванного патогенами, и в лечении вирусной инфекции.

78. Фармацевтическая композиция, содержащая соединение по любому из пп. 1-72 или его фармацевтически приемлемые соль или стереоизомер и фармацевтически приемлемый носитель, для применения в качестве противовоспалительного и противовирусного средства.

79. Применение соединения по любому из пп. 1-72 или его фармацевтически приемлемых соли или стереоизомера в изготовлении лекарственного средства для лечения воспаления.

80. Применение соединения по любому из пп. 1-72 или его фармацевтически приемлемых соли или стереоизомера в изготовлении лекарственного средства для лечения воспаления, связанного с активацией Toll-подобных рецепторов.

81. Применение соединения по любому из пп. 1-72 или его фармацевтически приемлемых соли или стереоизомера в изготовлении лекарственного средства для лечения расстройства, выбранного из пневмонии, острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС) и иммунопатологии, в частности гиперцитокинемии (синдром цитокинового шторма), сепсиса и болезни «трансплантат против хозяина».

82. Применение соединения по любому из пп. 1-72 или его фармацевтически приемлемых соли или стереоизомера в изготовлении лекарственного средства для лечения воспаления, вызванного патогенами.

83. Применение соединения по любому из пп. 1-72 или его фармацевтически приемлемых соли или стереоизомера в изготовлении лекарственного средства для комбинированного лечения воспаления, связанного с активацией Toll-подобных рецепторов, или воспаления, вызванного патогенами, и в лечении вирусной инфекции.

84. Применение соединения по любому из пп. 1-72 или его фармацевтически приемлемых соли или стереоизомера в изготовлении лекарственного средства в качестве противовоспалительного и противовирусного средства.

85. Способ лечения воспаления, включающий введение нуждающемуся в этом индивидууму терапевтически эффективного количества соединения по любому из пп. 1-72 или его фармацевтически приемлемых соли или стереоизомера.

86. Способ лечения воспаления, связанного с активацией Toll-подобных рецепторов, включающий введение нуждающемуся в этом индивидууму терапевтически эффективного количества соединения по любому из пп. 1-72 или его фармацевтически приемлемых соли или стереоизомера.

87. Способ лечения расстройства, выбранного из пневмонии, острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС) и иммунопатологии, в частности гиперцитокинемии (синдром цитокинового шторма), сепсиса и болезни «трансплантат против хозяина», включающий введение нуждающемуся в этом индивидууму

терапевтически эффективного количества соединения по любому из пп. 1-72 или его фармацевтически приемлемых соли или стереоизомера.

88. Способ лечения воспаления, вызванного патогенами, включающий введение нуждающемуся в этом индивидууму терапевтически эффективного количества соединения по любому из пп. 1-72 или его фармацевтически приемлемых соли или стереоизомера.

89. Способ комбинированного лечения воспаления, связанного с активацией Toll-подобных рецепторов, или воспаления, вызванного патогенами, и при лечении вирусной инфекции, включающий введение нуждающемуся в этом индивидууму терапевтически эффективного количества соединения по любому из пп. 1-72 или его фармацевтически приемлемых соли или стереоизомера.

90. Способ противовоспалительного и противовирусного лечения, включающий введение нуждающемуся в этом индивидууму терапевтически эффективного количества соединения по любому из пп. 1-72 или его фармацевтически приемлемых соли или стереоизомера.

91. Набор, содержащий соединение по любому из пп. 1-72 вместе с инструкциями по лечению воспаления; по лечению воспаления, связанного с активацией Toll-подобных рецепторов; по лечению расстройства, выбранного из пневмонии, острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС) и иммунопатологии, в частности гиперцитокинемии (синдром цитокинового шторма), сепсиса и болезни «трансплантат против хозяина»; по лечению воспаления, вызванного патогенами; по комбинированному лечению воспаления, связанного с активацией Toll-подобных рецепторов, или воспаления, вызванного патогенами, и при лечении вирусной инфекции; или для применения в качестве противовоспалительного и противовирусного средства.

92. Способ снижения экспрессии и/или секреции одного или более чем одного провоспалительного цитокина у субъекта, или в образце, полученном от субъекта, или в культуре клеток, включающий введение соединения по любому из пп. 1-72.

93. Способ повышения активации и/или рекрутирования макрофагов у субъекта, или в образце, полученном от субъекта, или в культуре клеток, включающий введение соединения по любому из пп. 1-72.

94. Способ профилактики, купирования или лечения воспалительных аспектов персистирующего ковида, долгого ковида или постковидного синдрома, включающий введение нуждающемуся в этом индивидууму терапевтически

эффективного количества соединения по любому из пп. 1-72 или его фармацевтически приемлемых соли или стереоизомера, предпочтительно, когда ковид представляет собой SARS-CoV-2; возможно, когда лечение сводит к минимуму вероятность того, что пациент будет страдать от симптомов персистирующего COVID, долгого COVID или пост-COVID-синдрома; и/или уменьшает тяжесть таких симптомов.

95. Способ снижения инфекционности и воспаления у пациентов с ковидом, включающий введение нуждающемуся в этом индивидууму терапевтически эффективного количества соединения по любому из пп. 1-72 или его фармацевтически приемлемых соли или стереоизомера; предпочтительно, когда ковид представляет собой SARS-CoV-2; возможно, когда пациент бессимптомен или еще малосимптомен, но имеет высокую вирусную нагрузку.

96. Способ минимизации воспалительных симптомов CoV инфекции, включающий введение нуждающемуся в этом индивидууму терапевтически эффективного количества соединения по любому из пп. 1-72 или его фармацевтически приемлемых соли или стереоизомера; предпочтительно, когда ковид представляет собой SARS-CoV-2.

97. Кортикостероид для применения в лечении воспаления, где кортикостероид вводят в комбинации с соединением по любому из пп. 1-72.

98. Соединение по любому из пп. 1-25 и кортикостероид для применения в лечении воспаления; где применение соответствует любому из пп. 1-72.

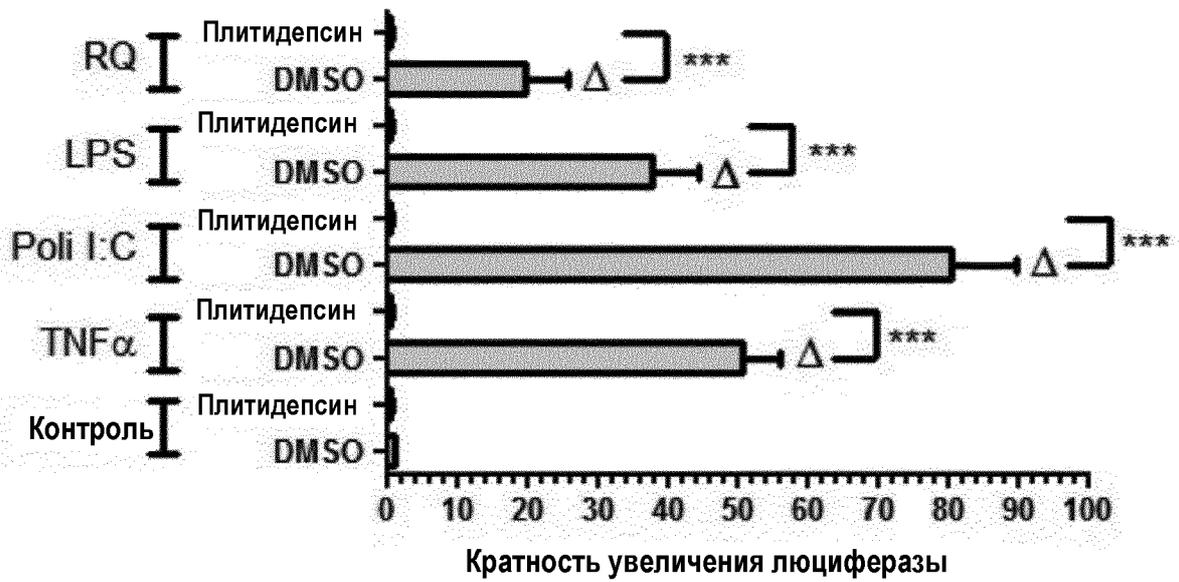
99. Способ лечения воспаления, включающий применение комбинированной терапии соединением по любому из пп. 1-25 или его фармацевтически приемлемой солью и кортикостероидом у нуждающегося в этом пациента, вследствие чего происходит лечение воспаления; где указанный способ соответствует любому из пп. 1-72.

100. Применение соединения по любому из пп. 1-72 или его фармацевтически приемлемых соли или стереоизомера в изготовлении лекарственного средства для лечения воспаления; где указанное лечение включает введение кортикостероида.

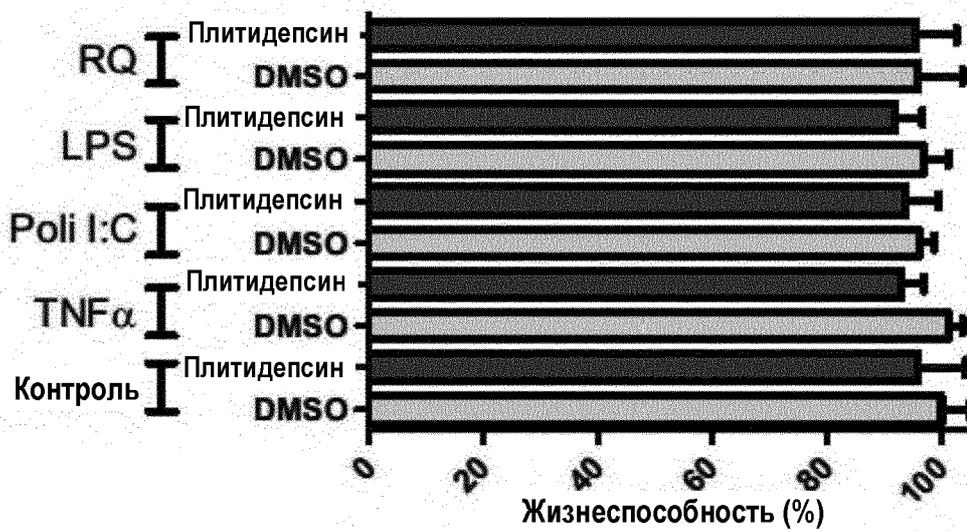
101. Применение кортикостероида в изготовлении лекарственного средства для лечения воспаления; где указанное лечение включает введение соединения по любому из пп. 1-72 или его фармацевтически приемлемых соли или стереоизомера.

102. Применение соединения по любому из пп. 1-72 или его фармацевтически приемлемых соли или стереоизомера и кортикостероида в изготовлении лекарственного средства для лечения воспаления.

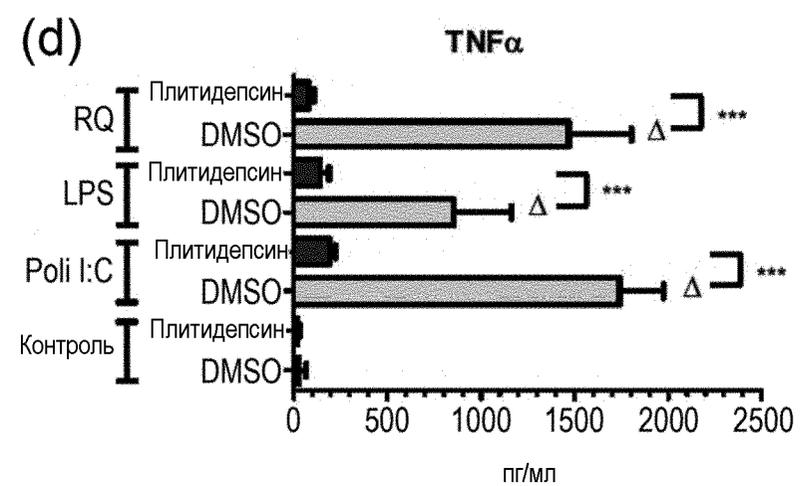
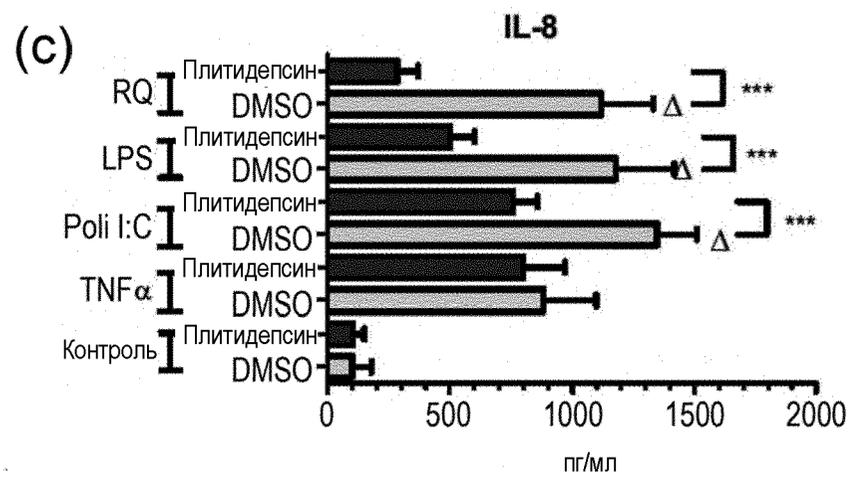
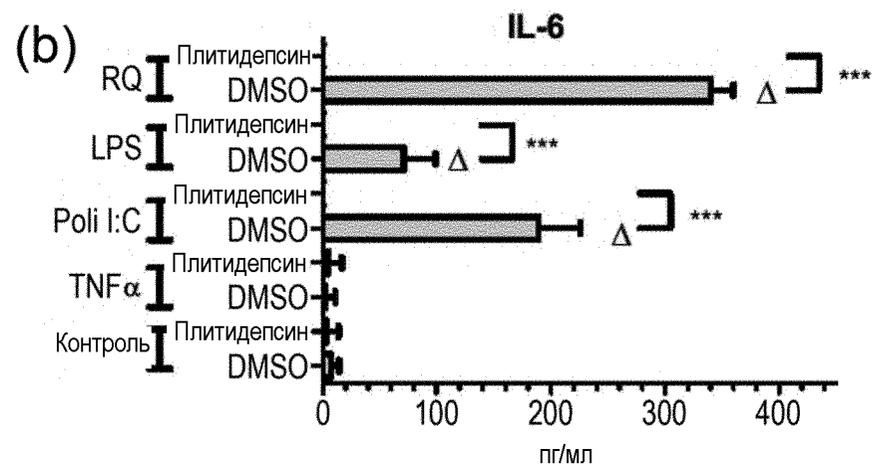
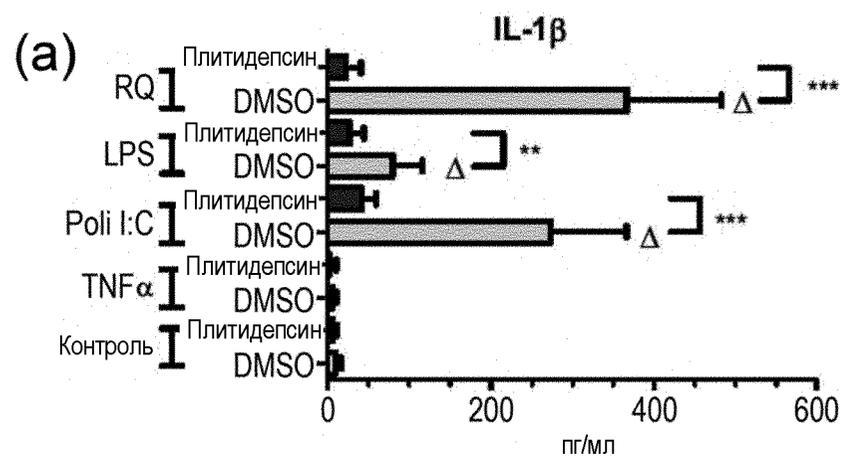
103. Фармацевтическая упаковка, содержащая соединение по любому из пп. 1-25 и кортикостероид, возможно дополнительно содержащая инструкции согласно любому из пп. 1-72.



Фиг. 1a

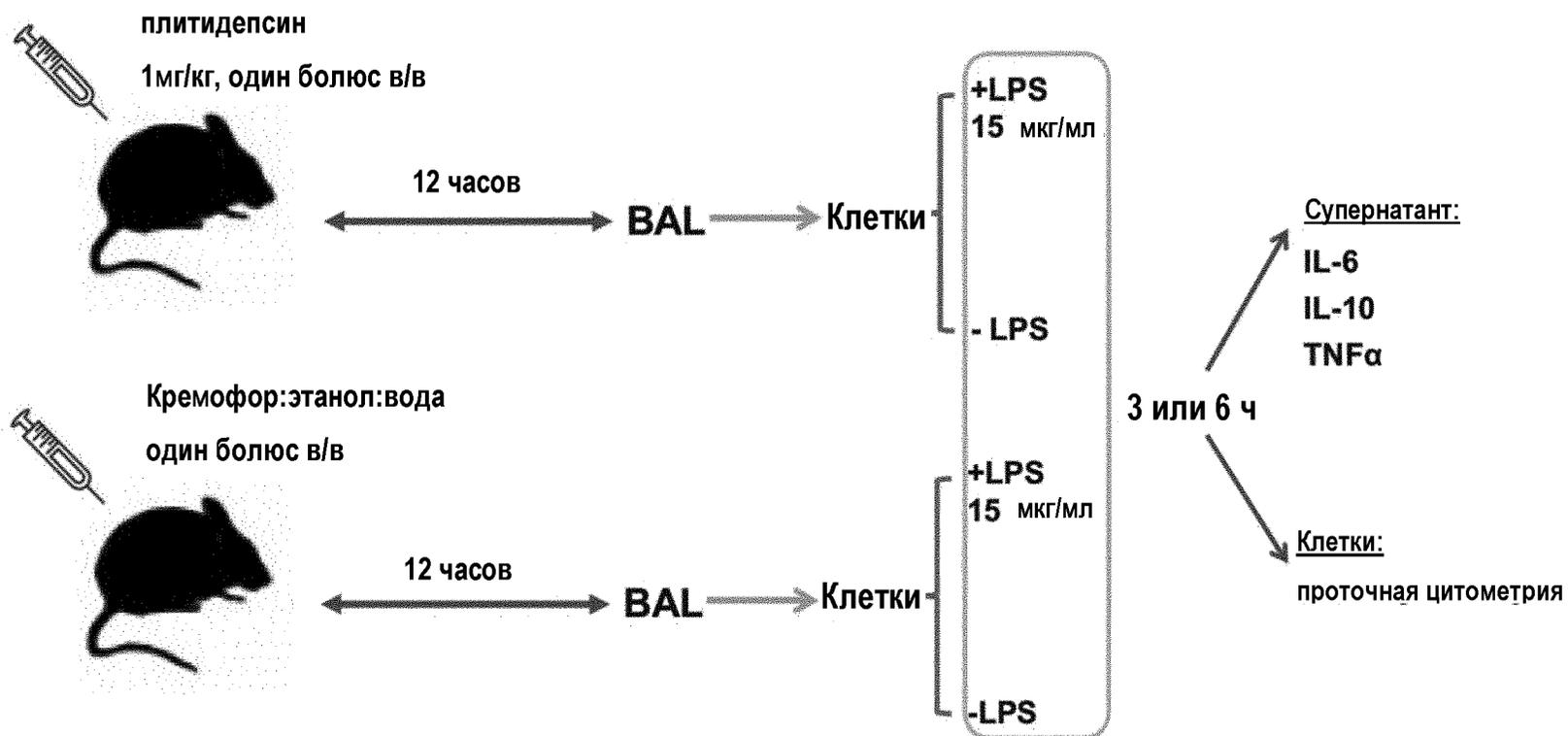


Фиг. 1b



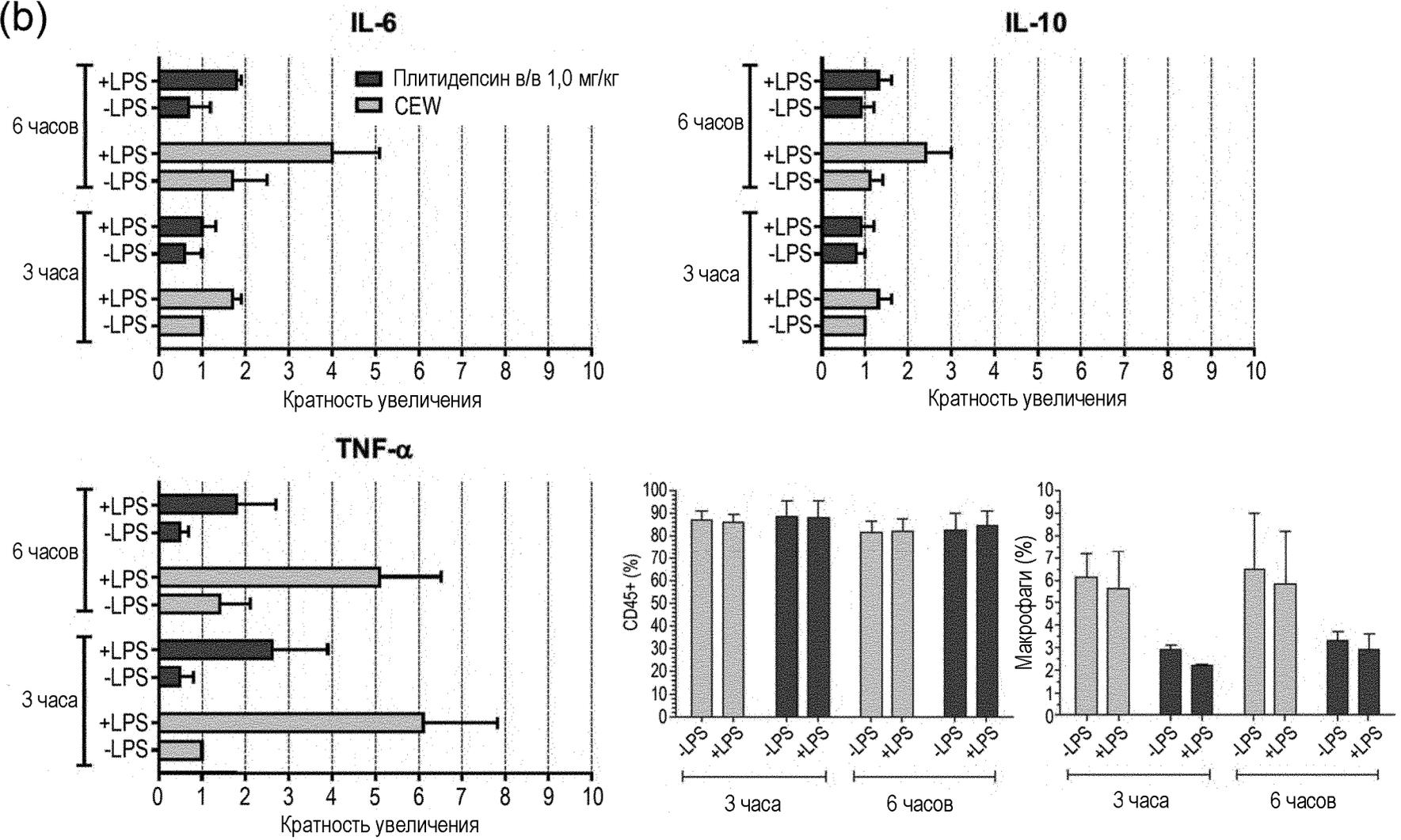
Фиг. 2

(a)



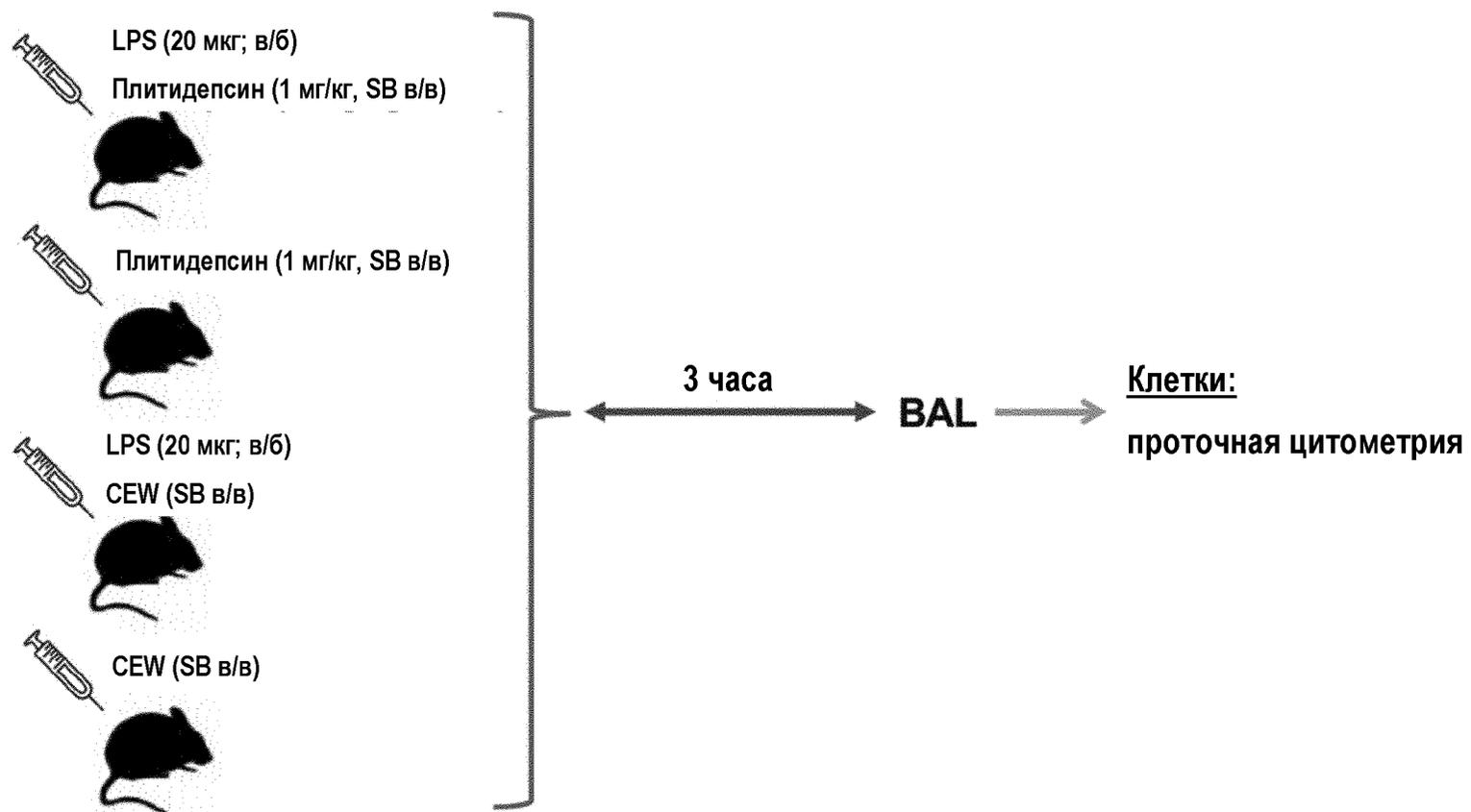
Фиг. 3

(b)



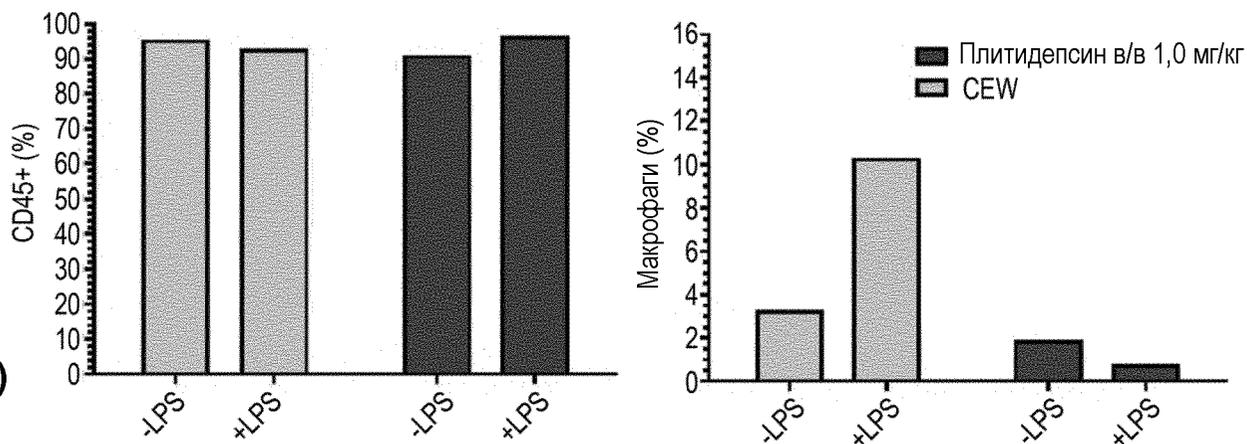
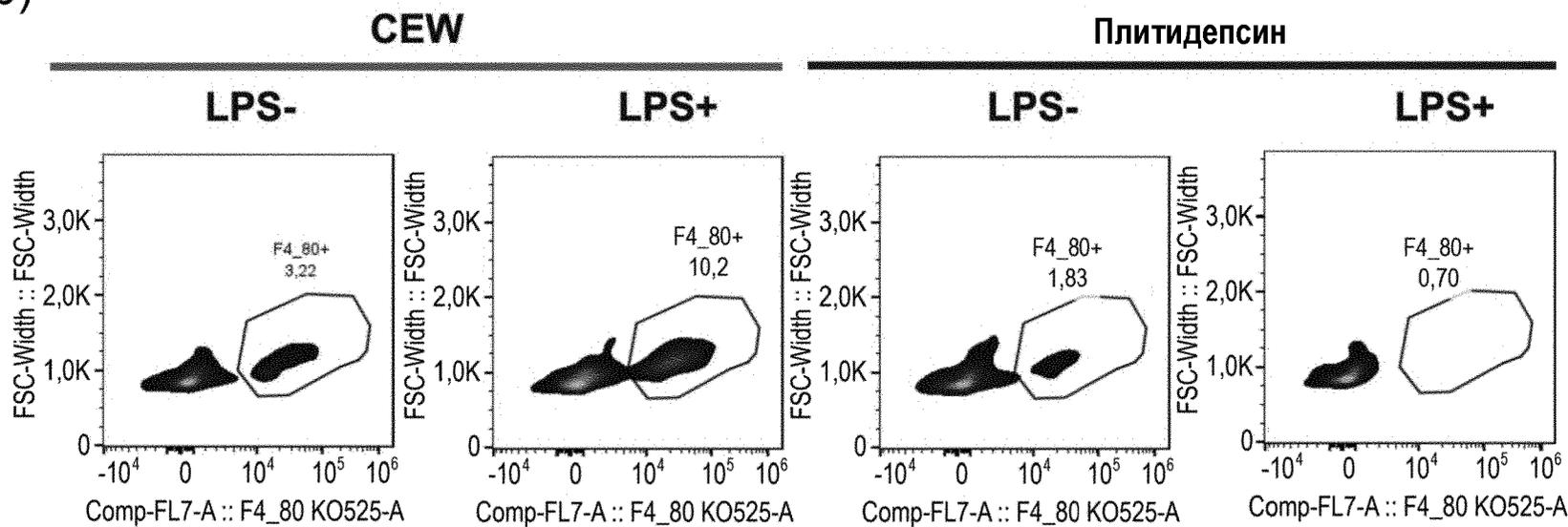
Фиг. 3 (продолжение)

(a)



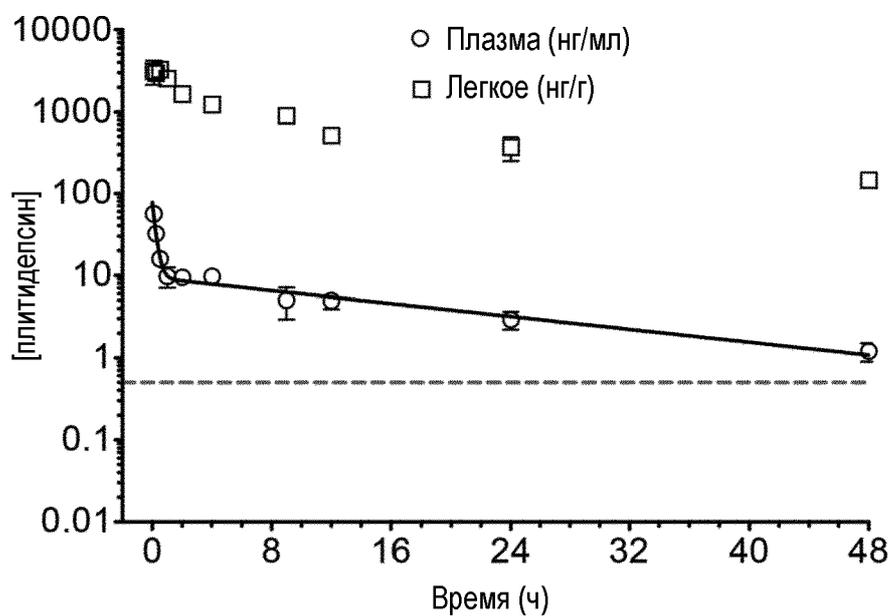
Фиг. 4

(b)

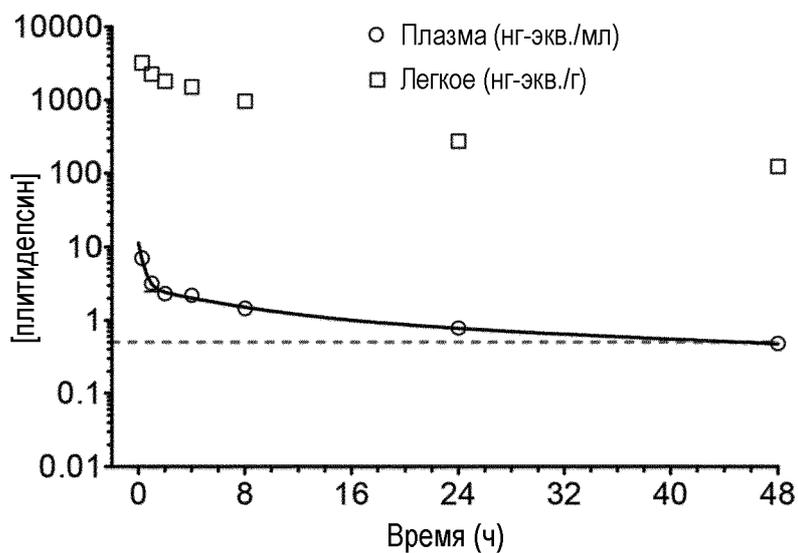


Фиг. 4
(продолжение)

1 мг/кг, один болюс в/в (MTD)

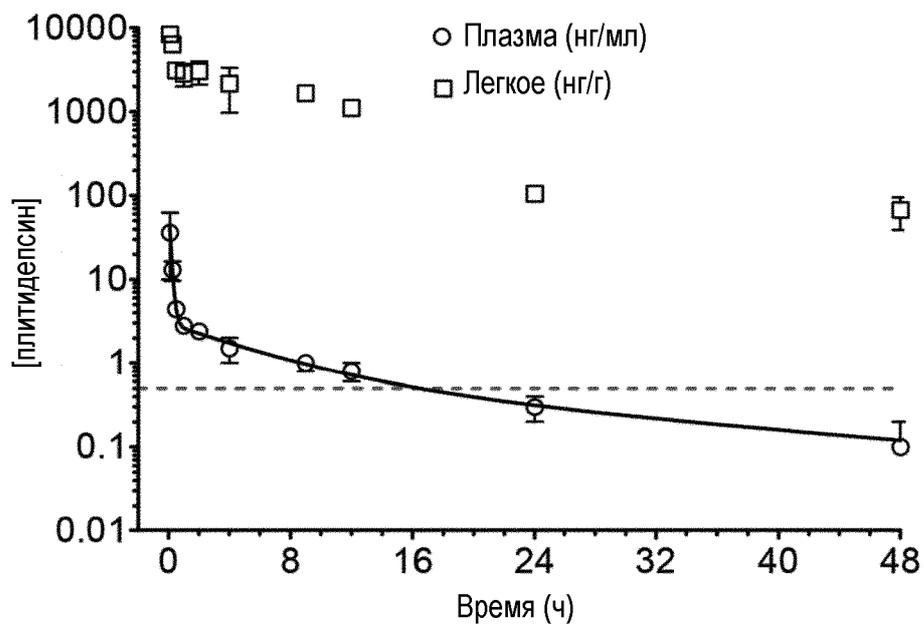


Фиг. 5а

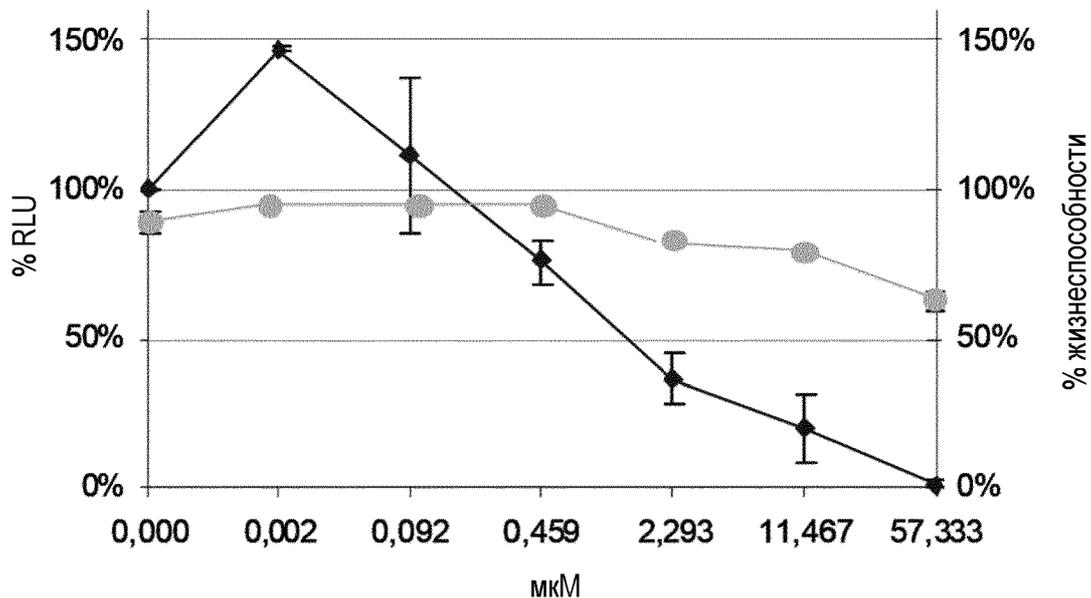
0,2 мг/кг, один болюс в/в (MTD); $^{14}\text{C}_1$ -пептидепсин

Фиг. 5b

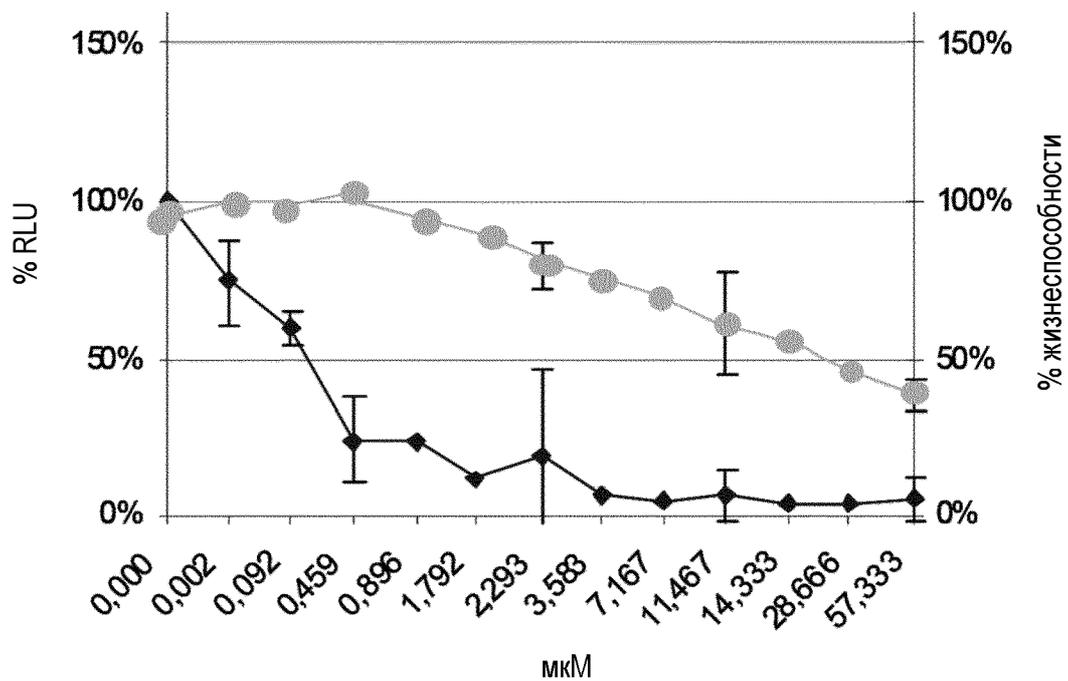
0,2 мг/кг, один болюс в/в



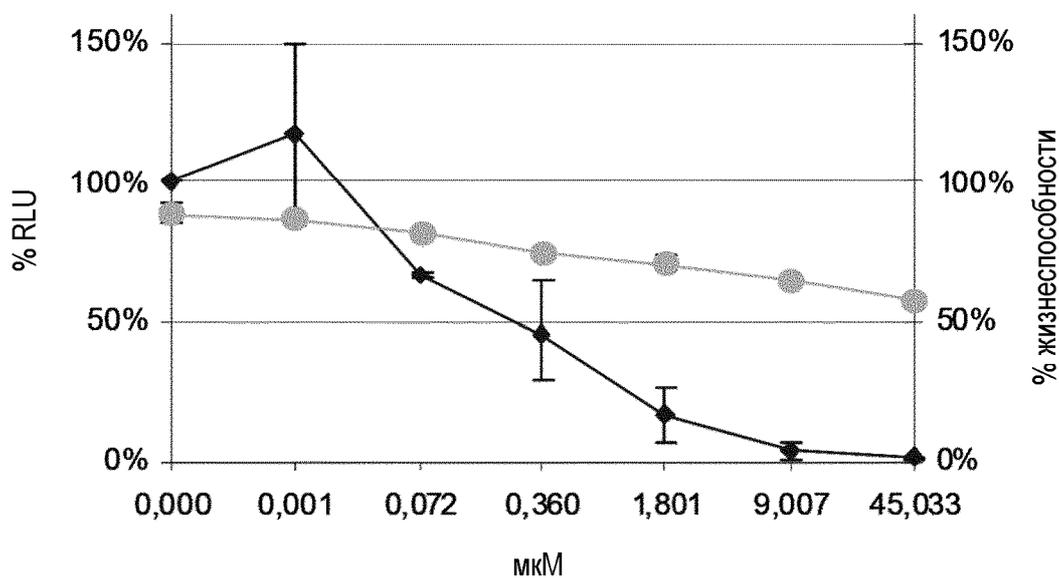
Фиг. 5с



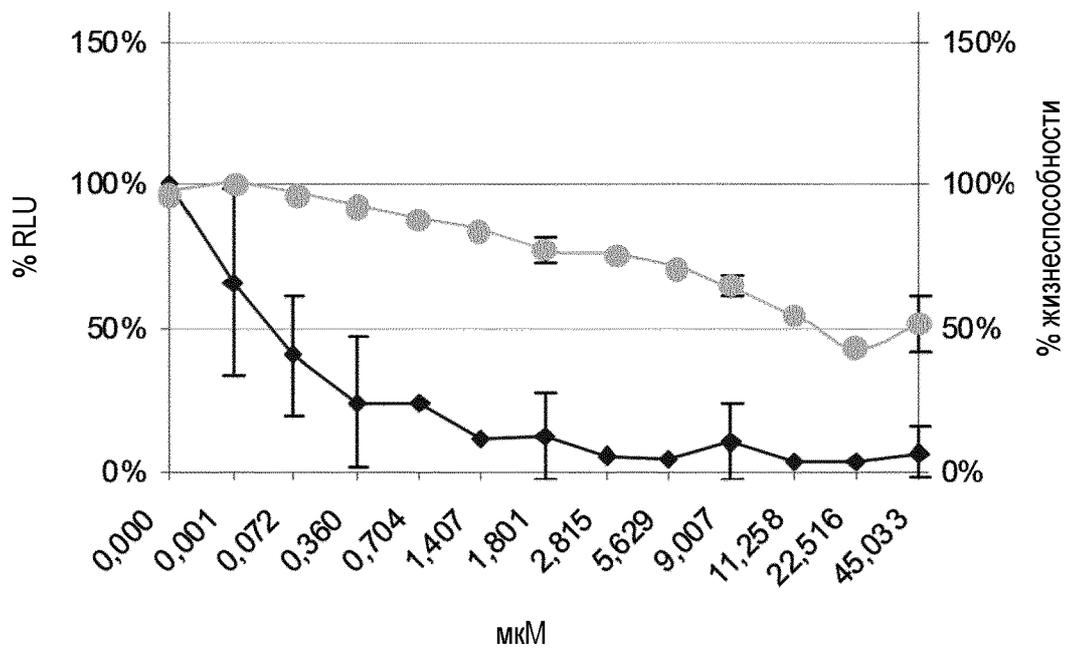
Фиг. 6а



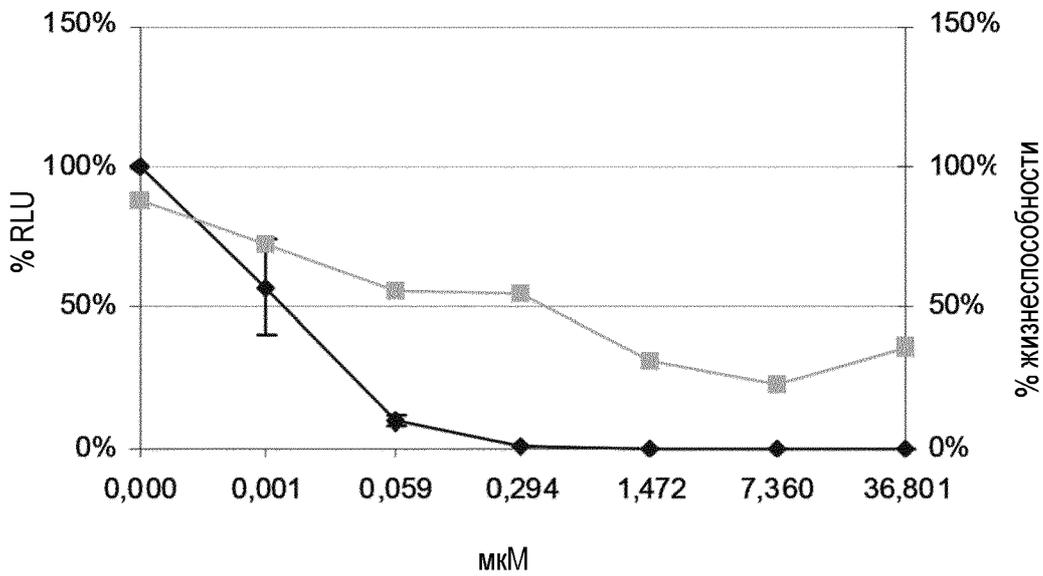
Фиг. 6б



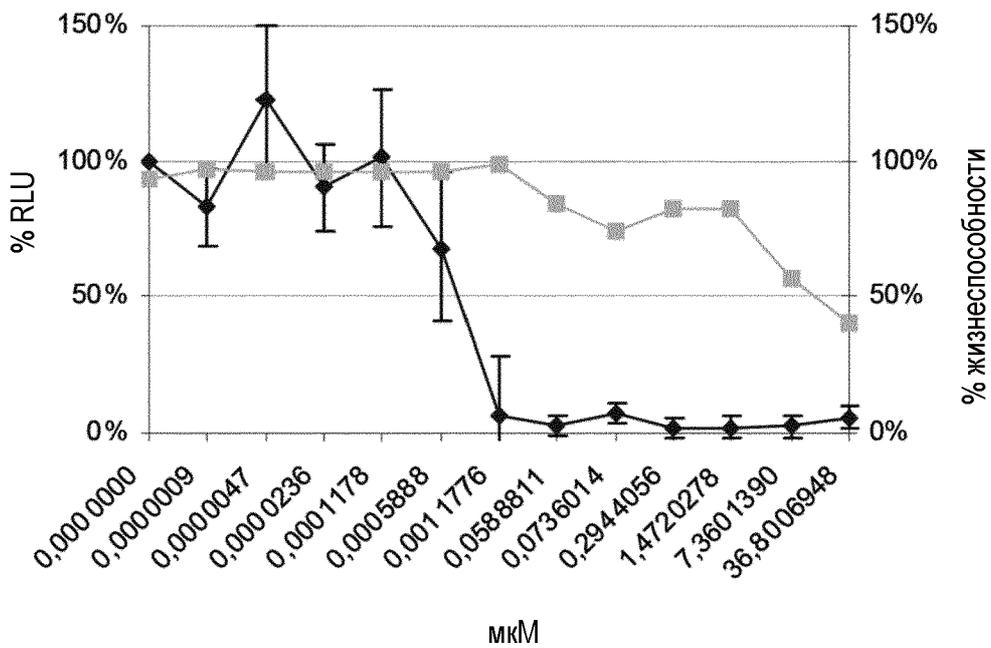
Фиг. 7а



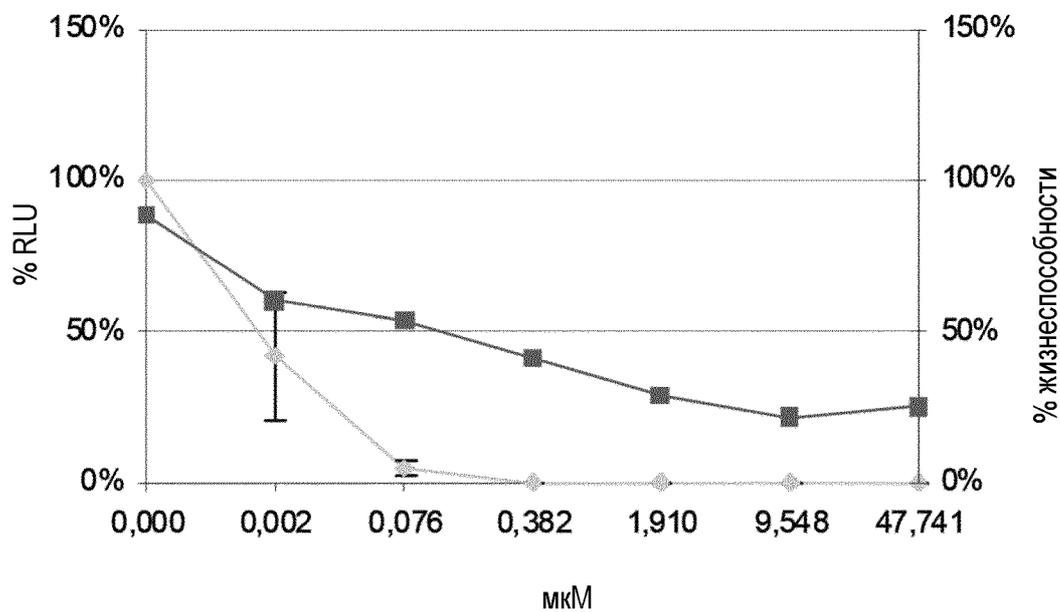
Фиг. 7б



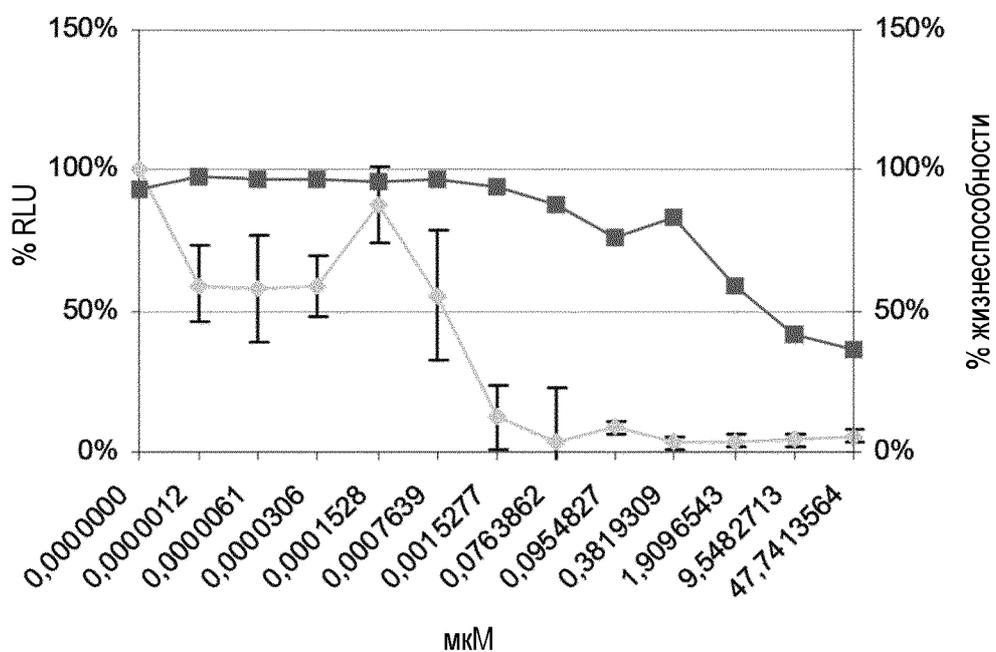
Фиг. 8а



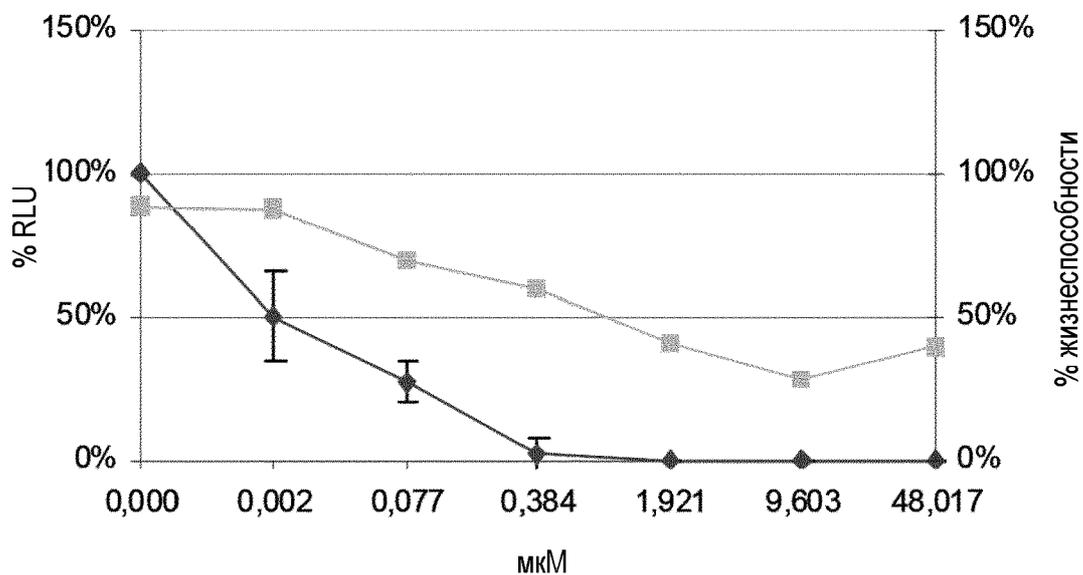
Фиг. 8b



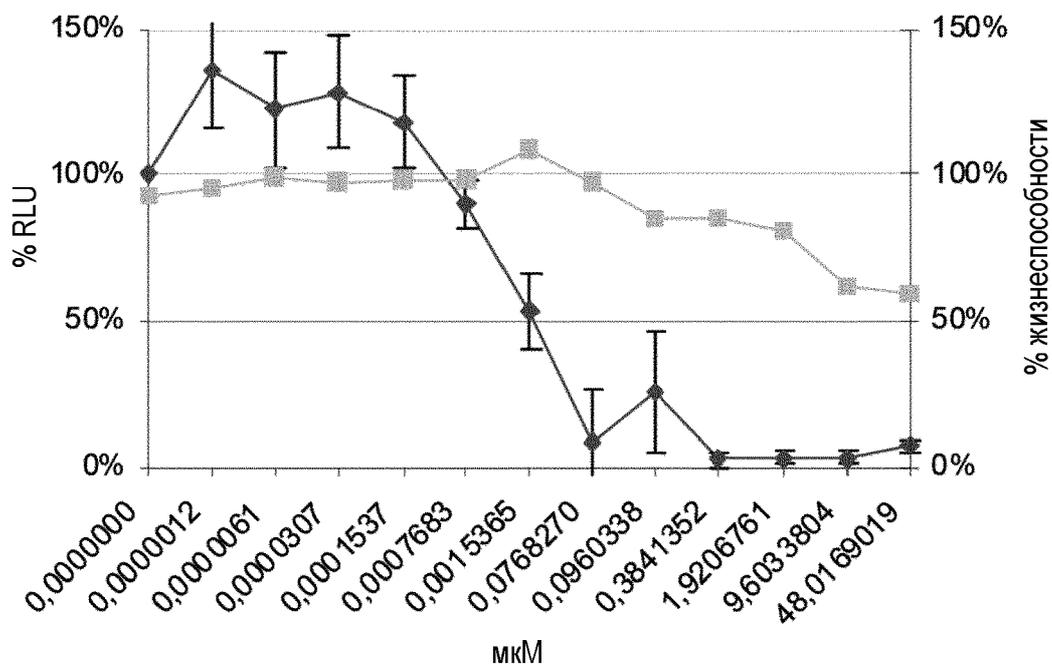
Фиг. 9а



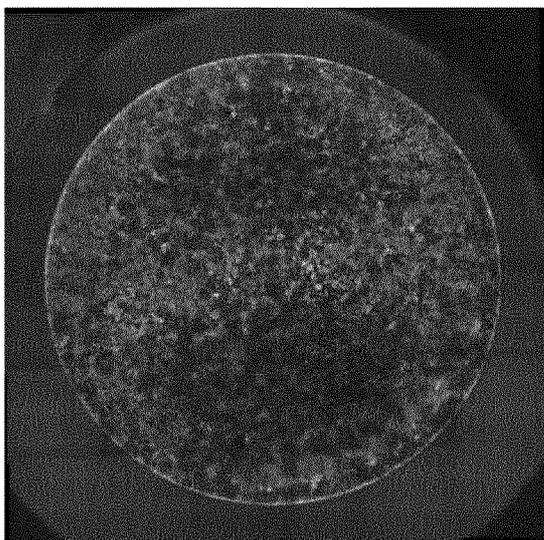
Фиг. 9b



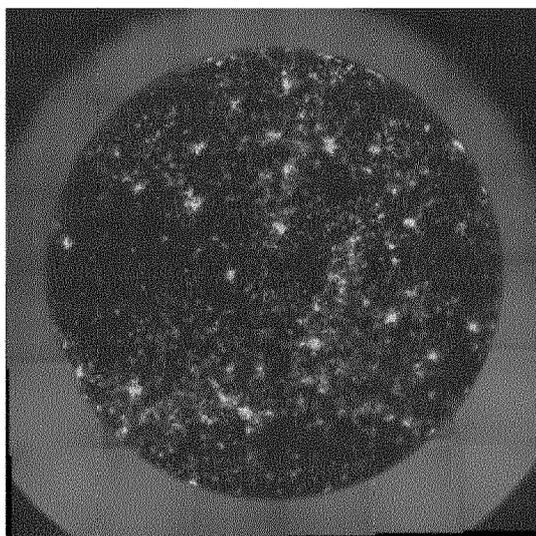
Фиг. 10а



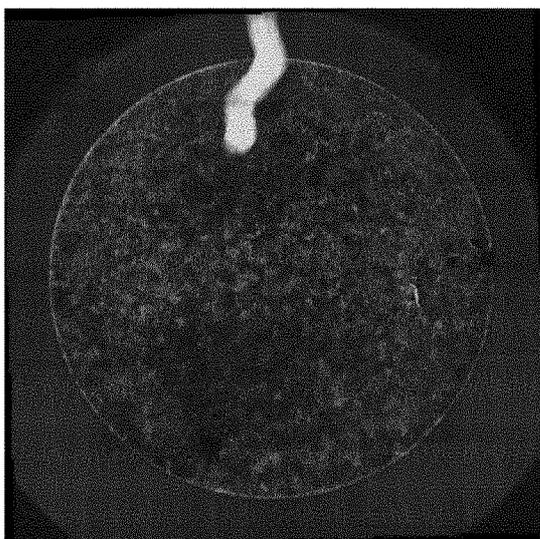
Фиг. 10б



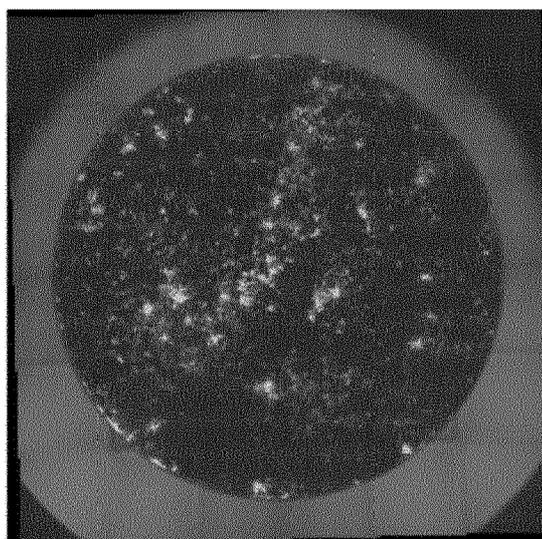
Фиг. 11а



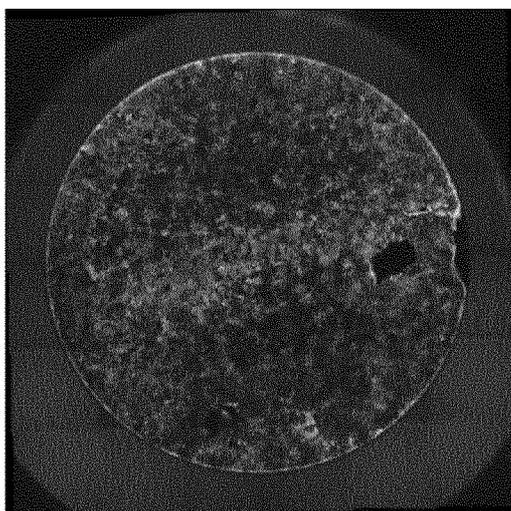
Фиг. 11б



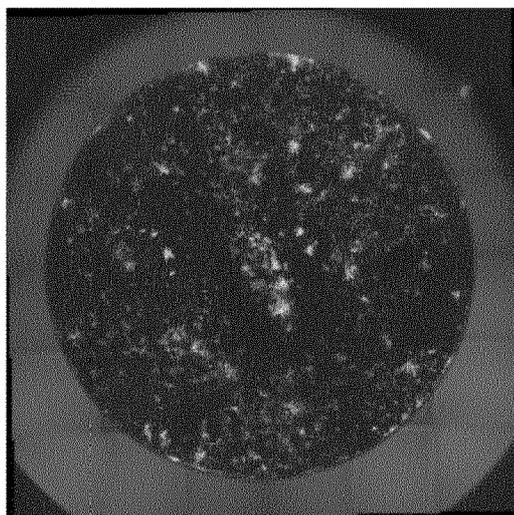
Фиг. 12а



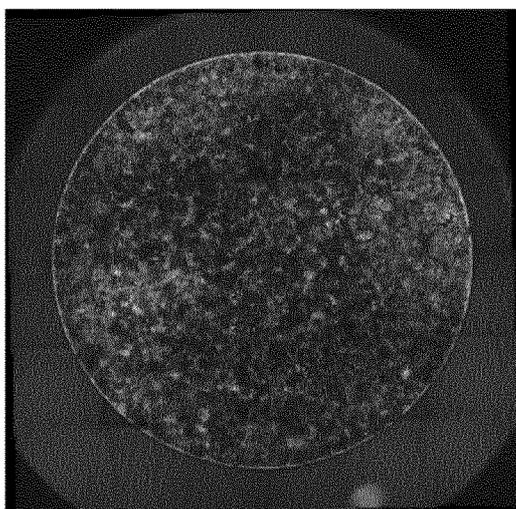
Фиг. 12б



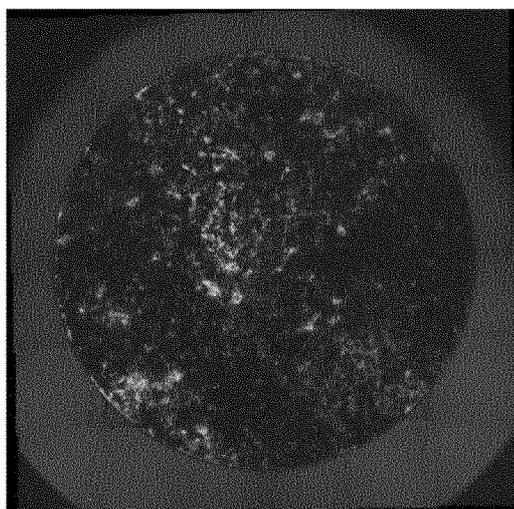
Фиг. 13а



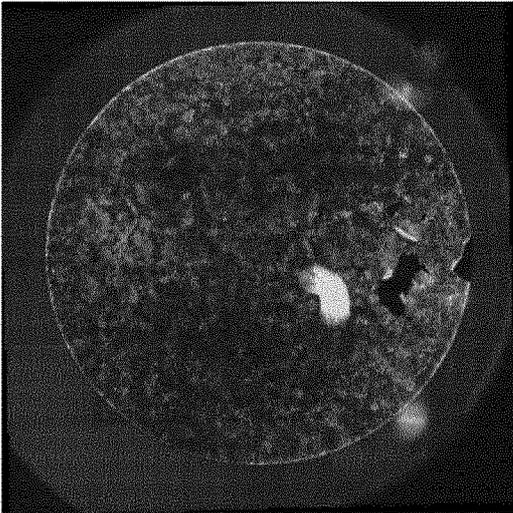
Фиг. 13б



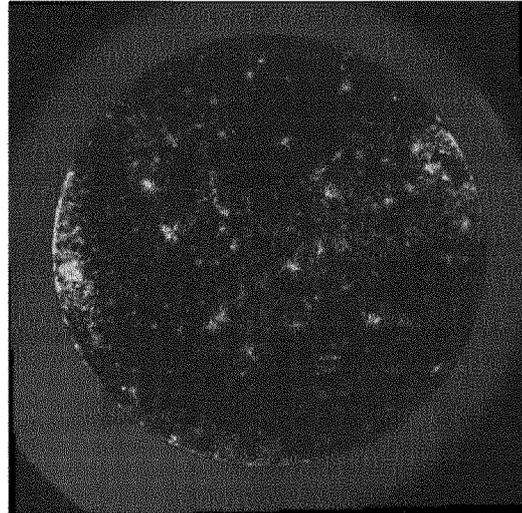
Фиг. 14а



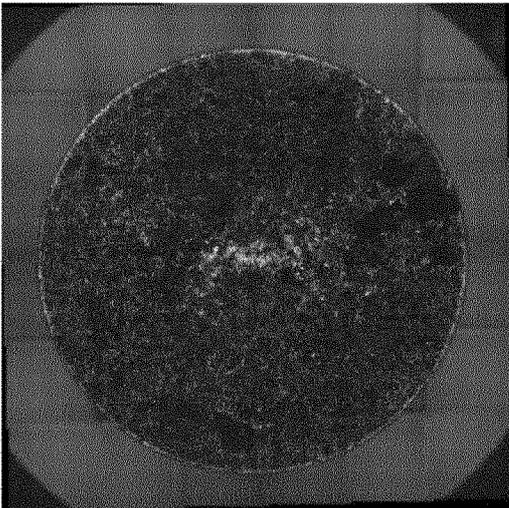
Фиг. 14б



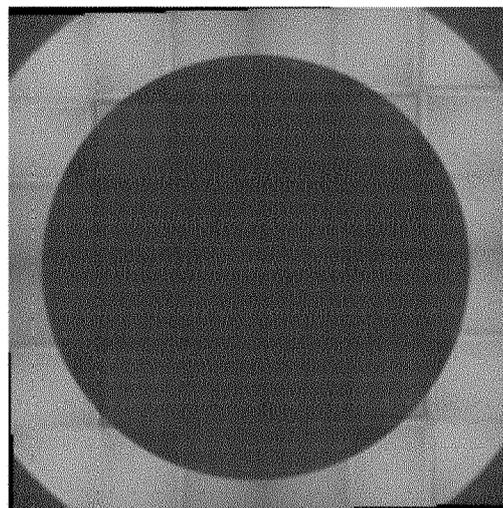
Фиг. 15а



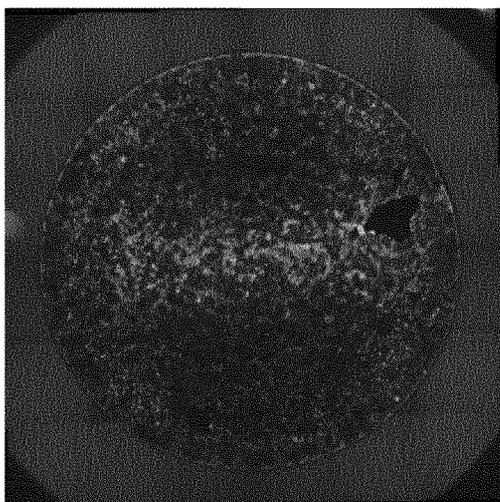
Фиг. 15б



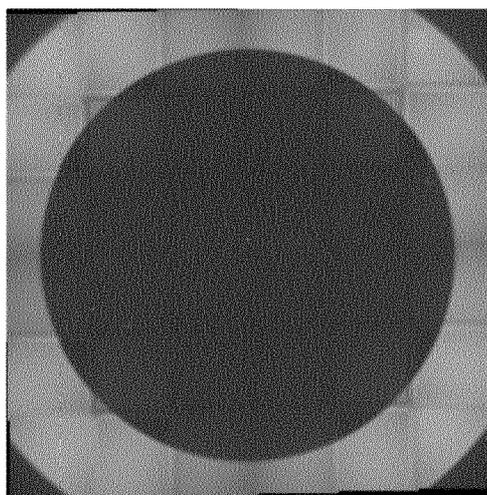
Фиг. 16а



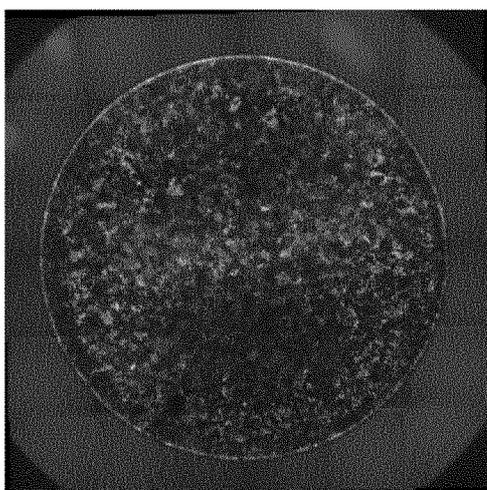
Фиг. 16б



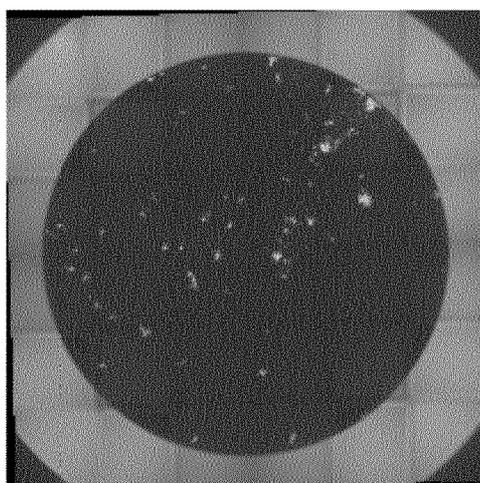
Фиг. 17а



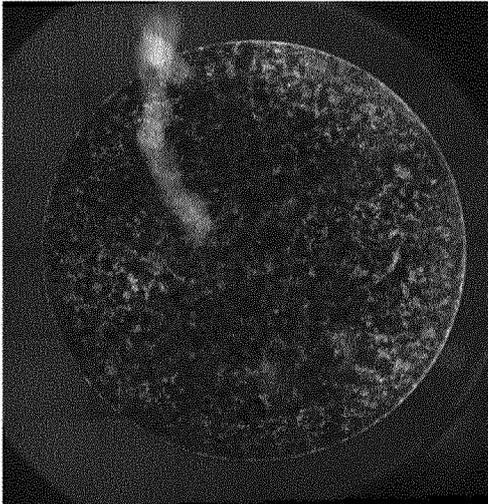
Фиг. 17б



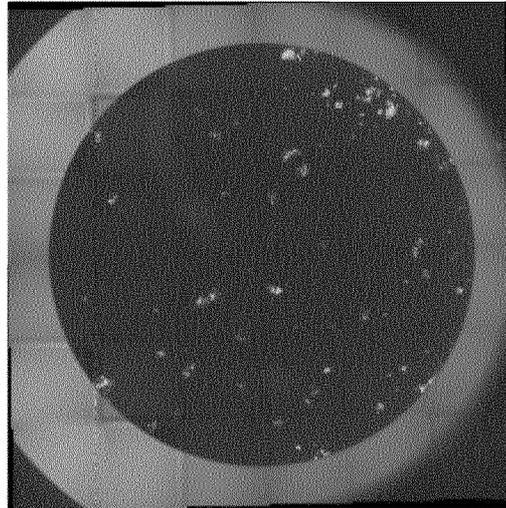
Фиг. 18а



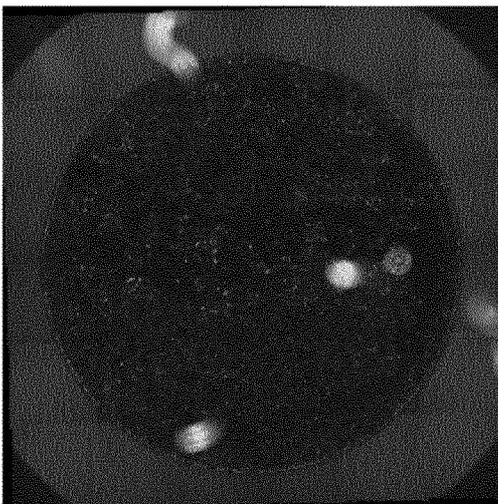
Фиг. 18б



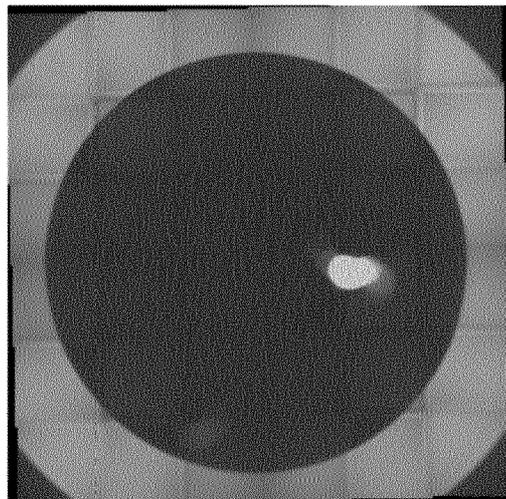
Фиг. 19а



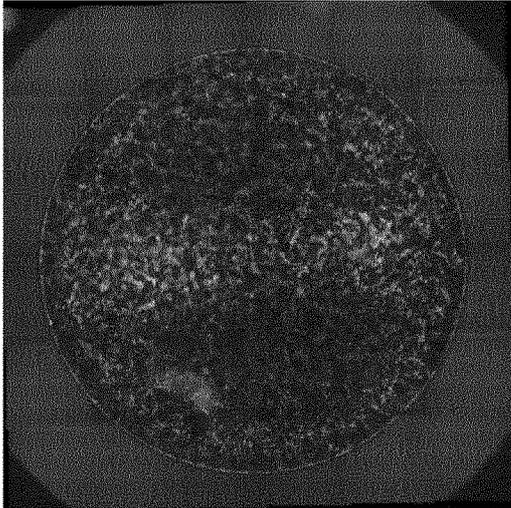
Фиг. 19б



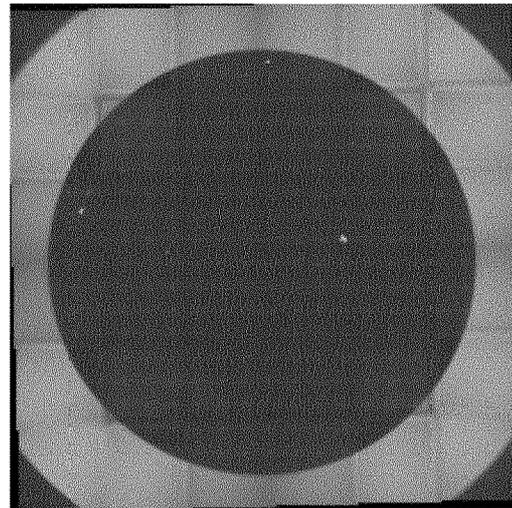
Фиг. 20а



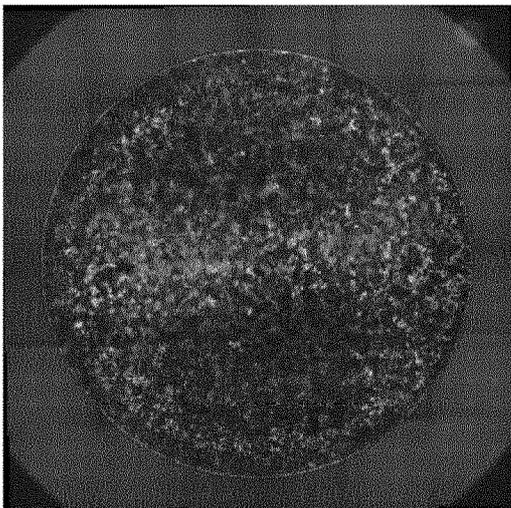
Фиг. 20б



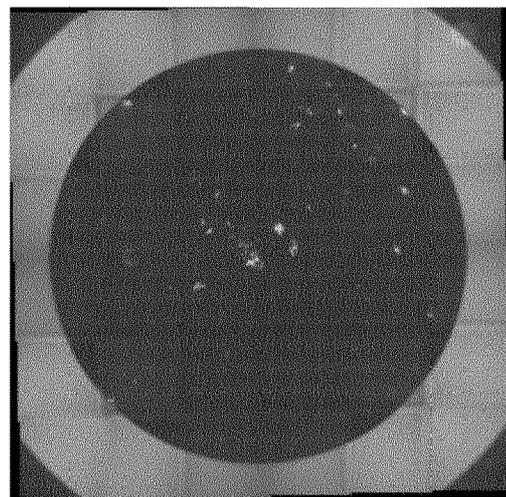
Фиг. 21а



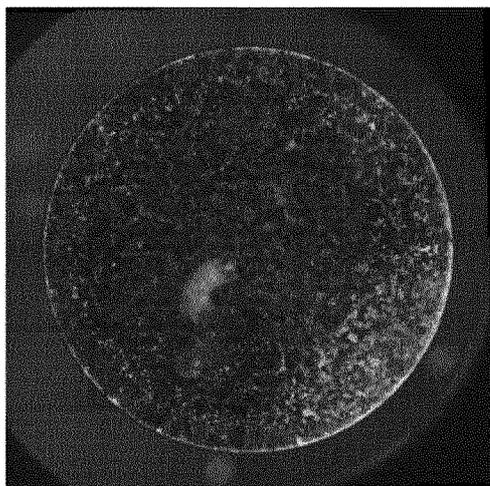
Фиг. 21б



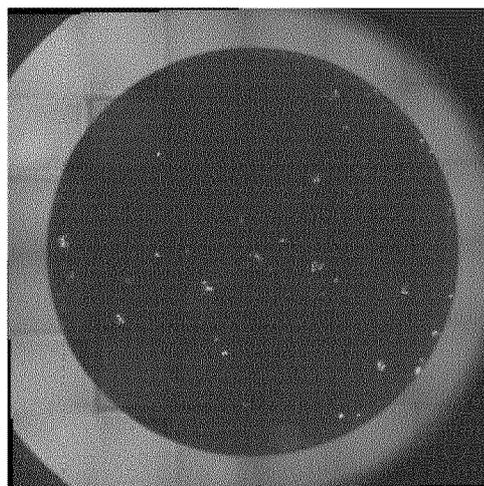
Фиг. 22а



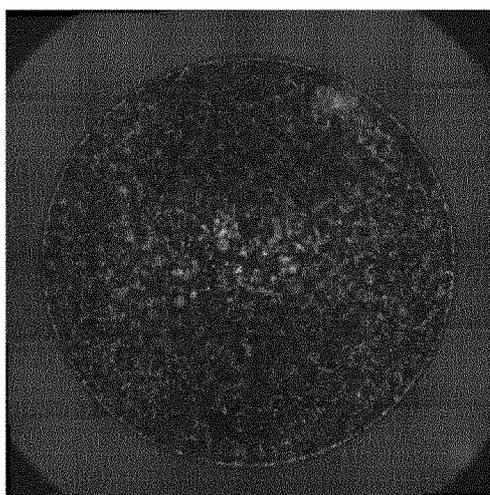
Фиг. 22б



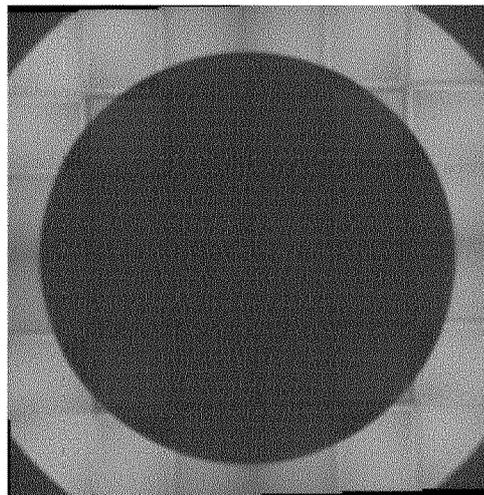
Фиг. 23а



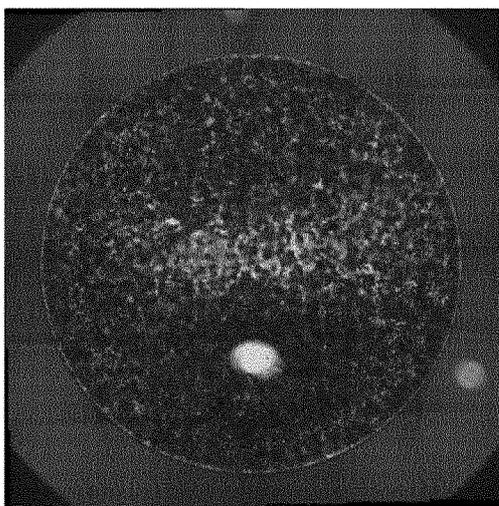
Фиг. 23b



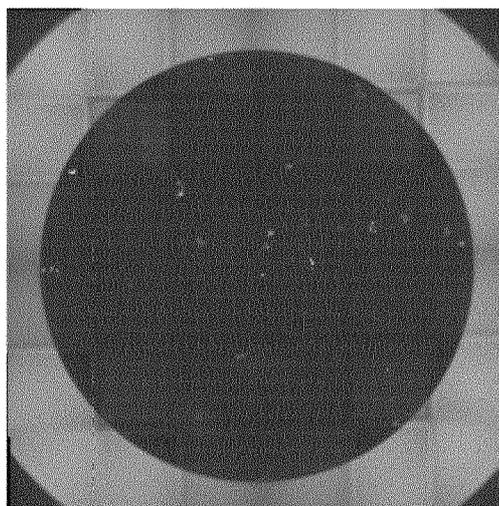
Фиг. 24а



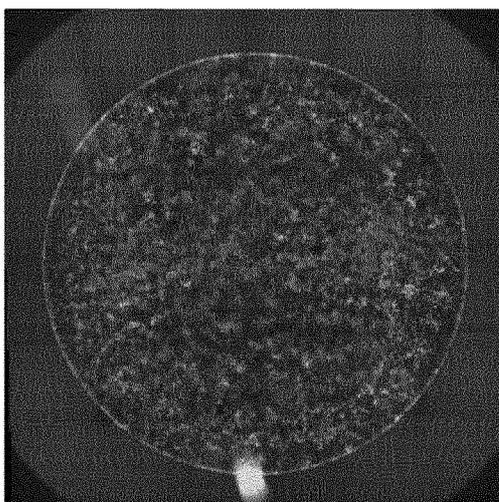
Фиг. 24b



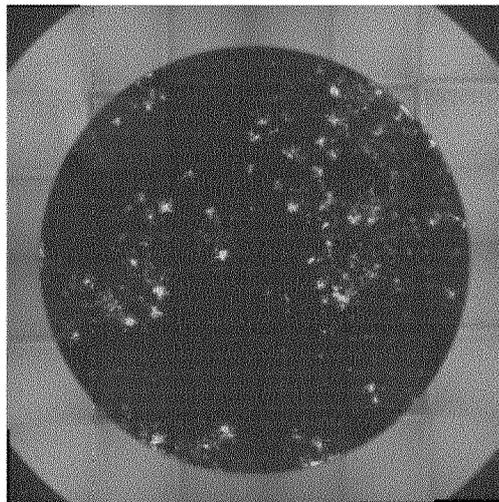
Фиг. 25a



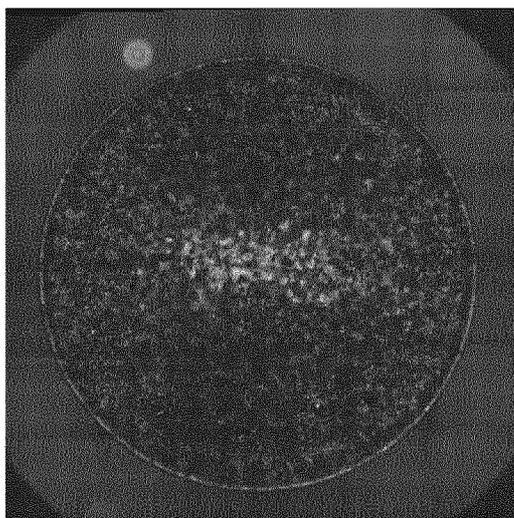
Фиг. 25b



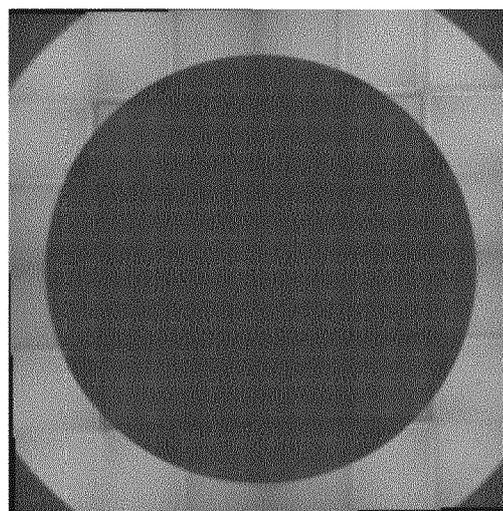
Фиг. 26a



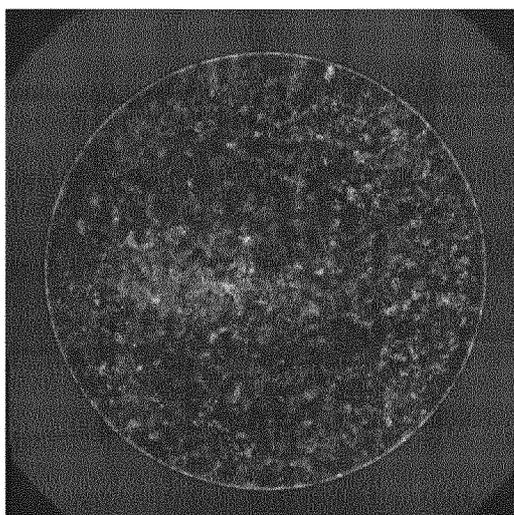
Фиг. 26b



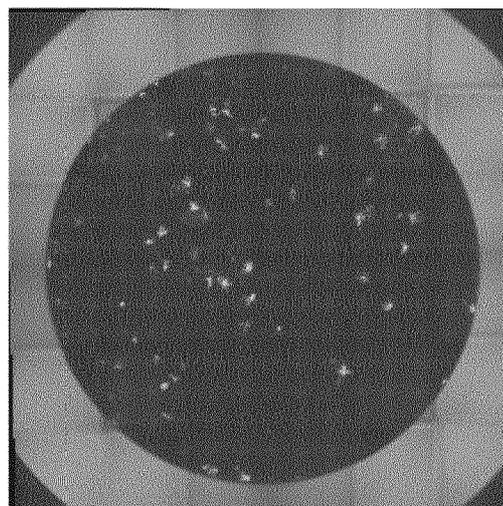
Фиг. 27а



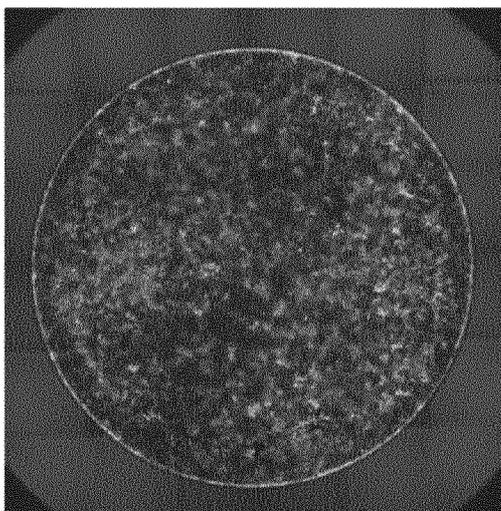
Фиг. 27б



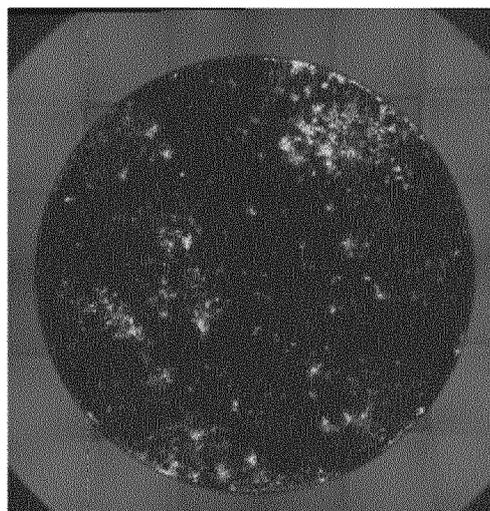
Фиг. 28а



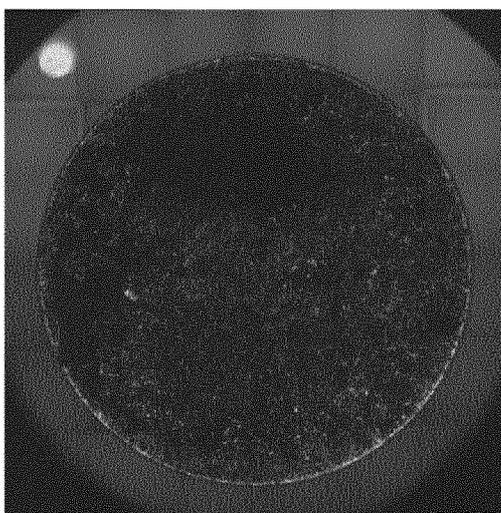
Фиг. 28б



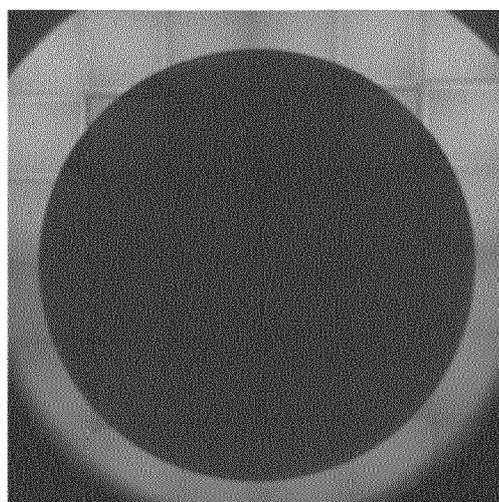
Фиг. 29а



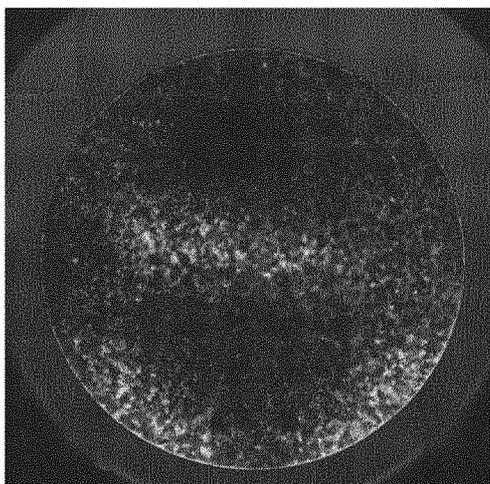
Фиг. 29б



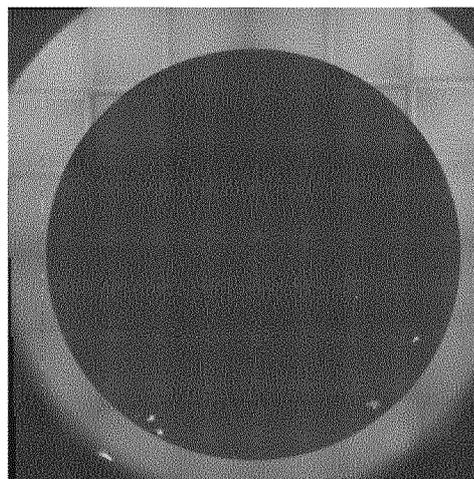
Фиг. 30а



Фиг. 30б

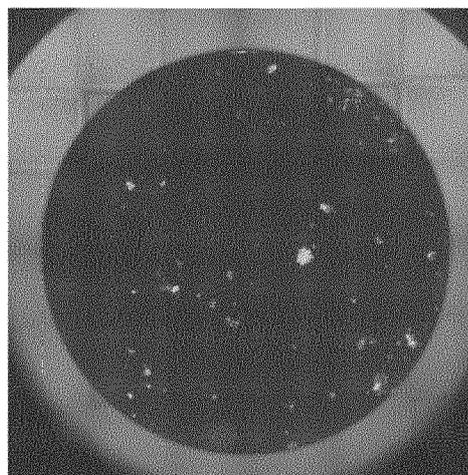


Фиг. 31a



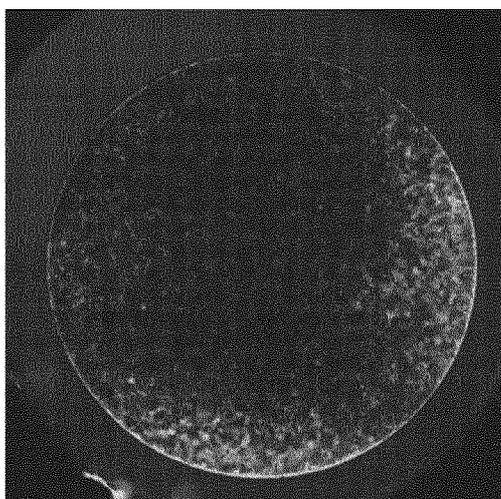
Фиг. 31b

не показано

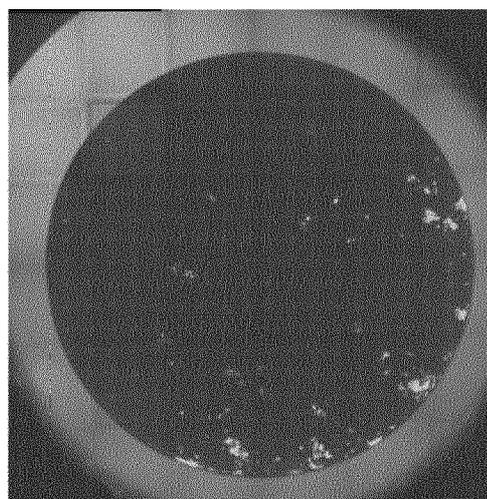


Фиг. 32a

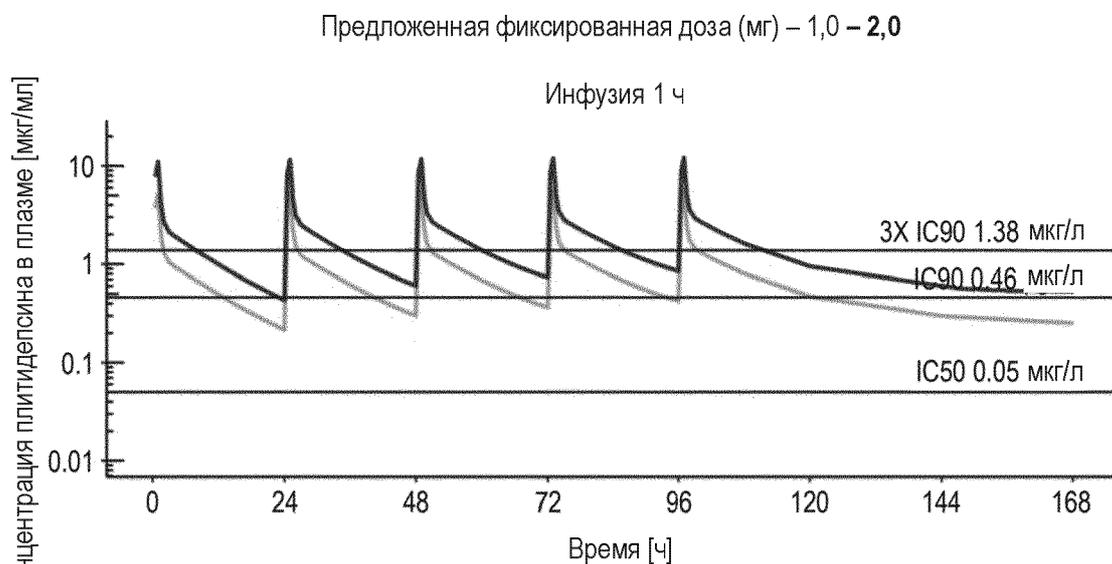
Фиг. 32b



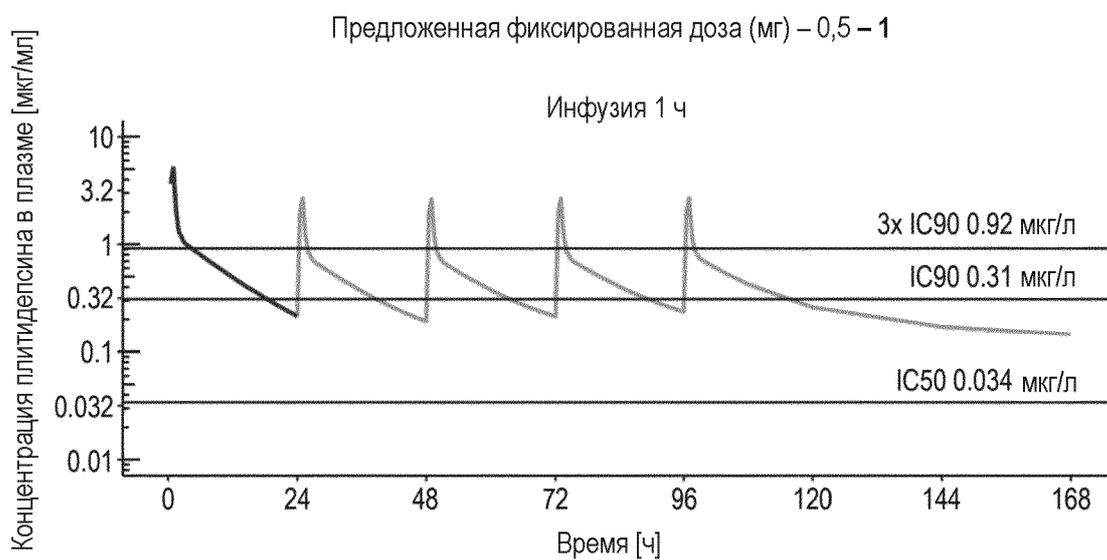
Фиг. 33а



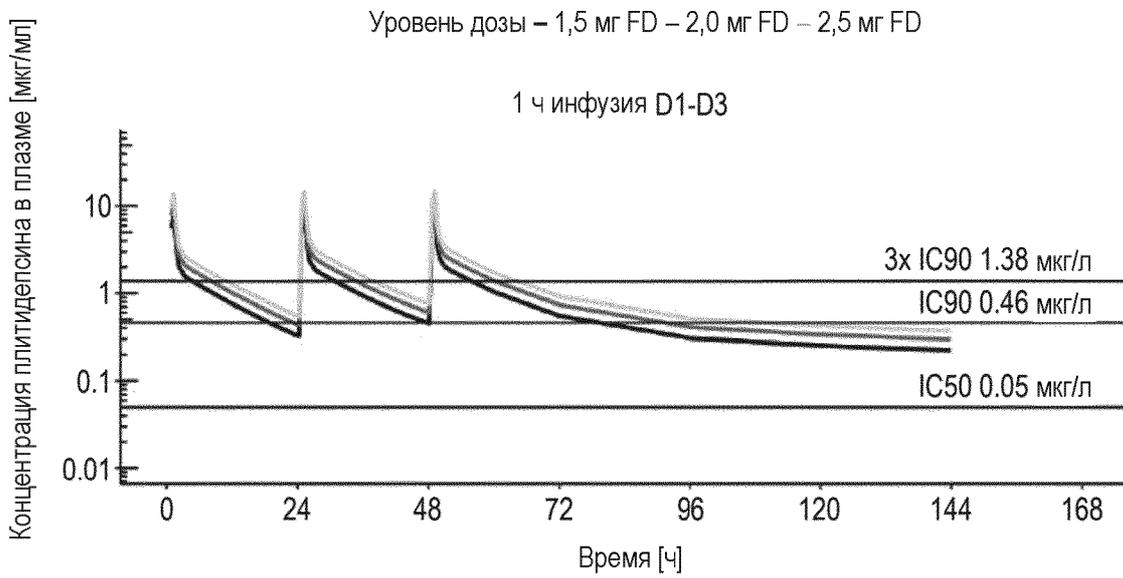
Фиг. 33б

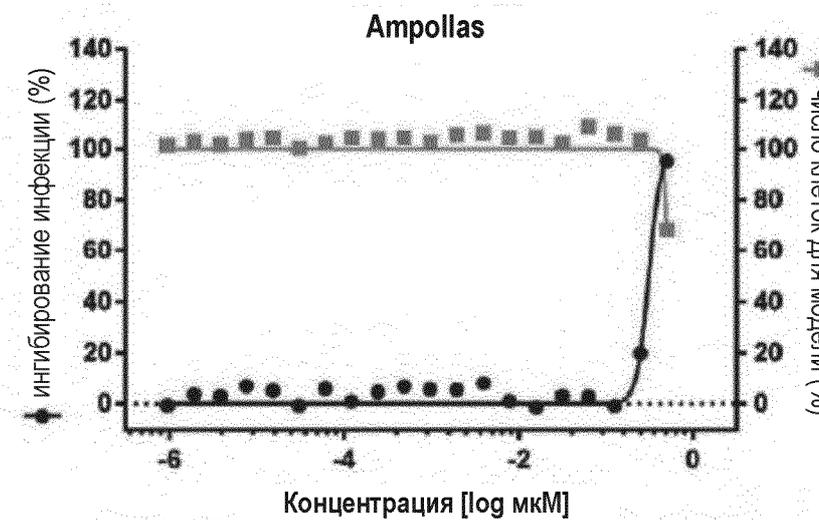
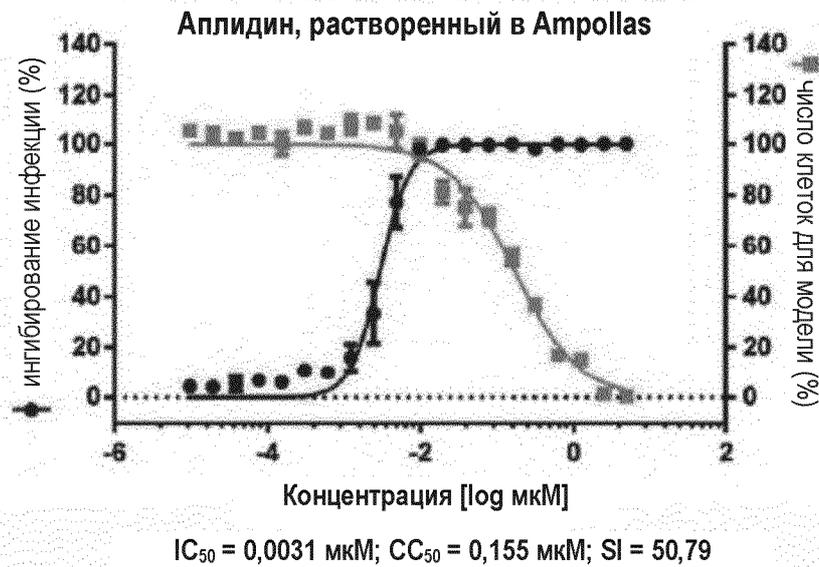
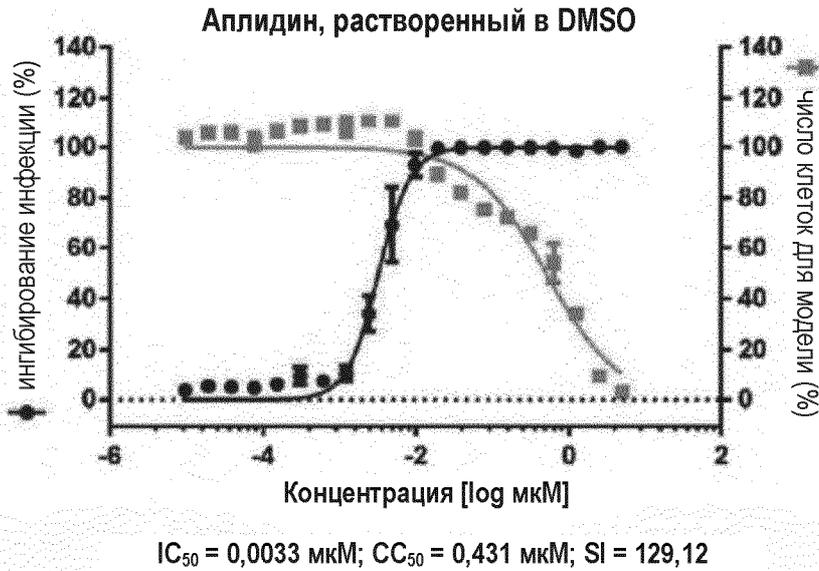


Фиг. 34



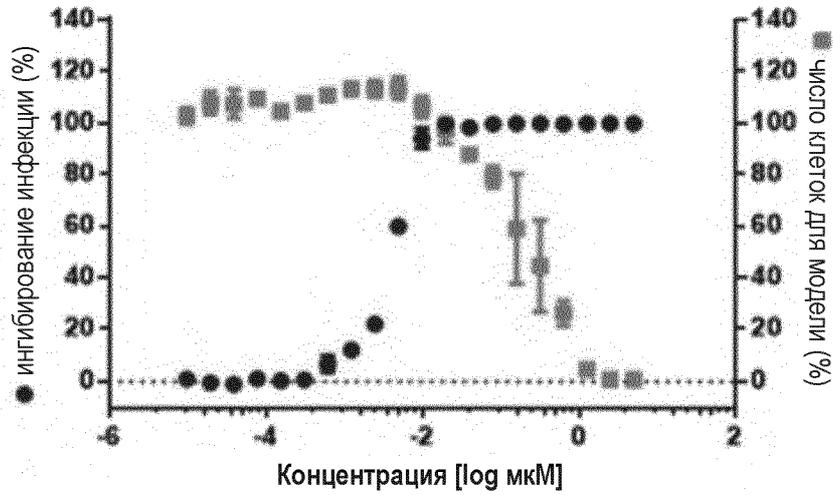
Фиг. 35

**Фиг. 36**



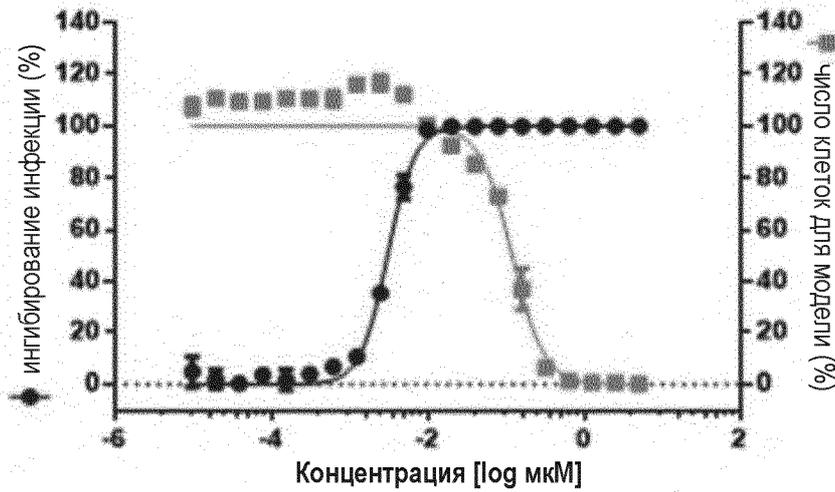
Фиг. 37А

Аплидин, растворенный в DMSO



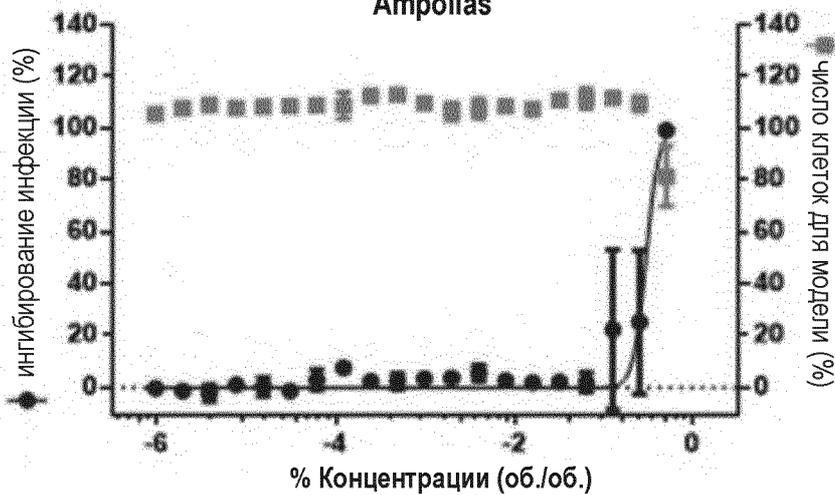
$IC_{50} = 0,0039 \mu\text{M}$; $CC_{50} = 0,207 \mu\text{M}$; $SI = 52,72$

Аплидин, растворенный в Ampollas



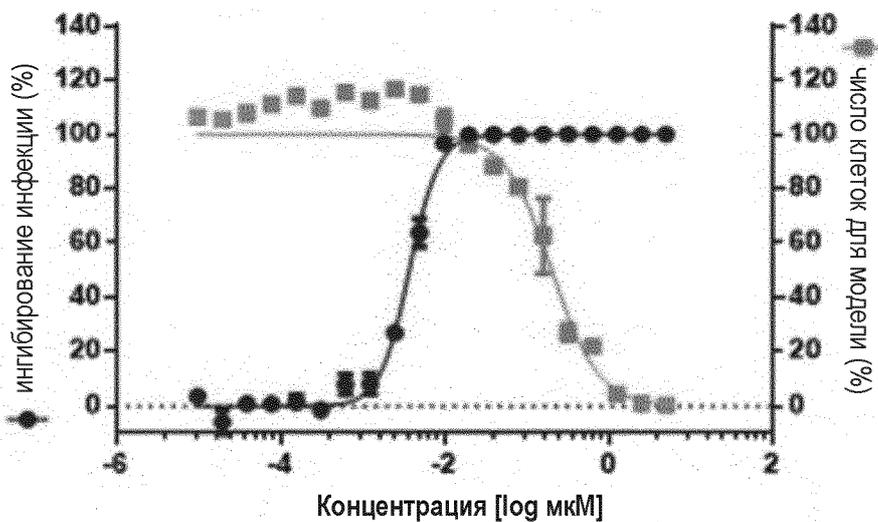
$IC_{50} = 0,003 \mu\text{M}$; $CC_{50} = 0,103 \mu\text{M}$; $SI = 34,26$

Ampollas



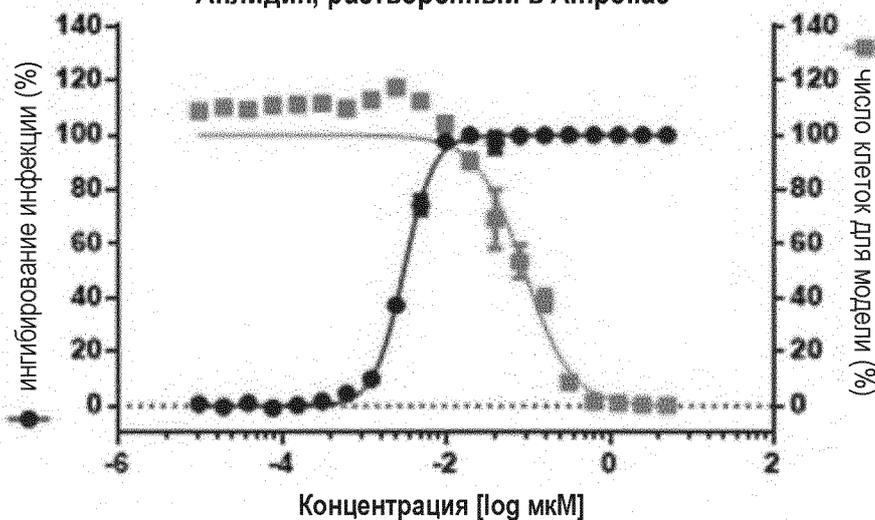
Фиг. 37В

Аплидин, растворенный в DMSO



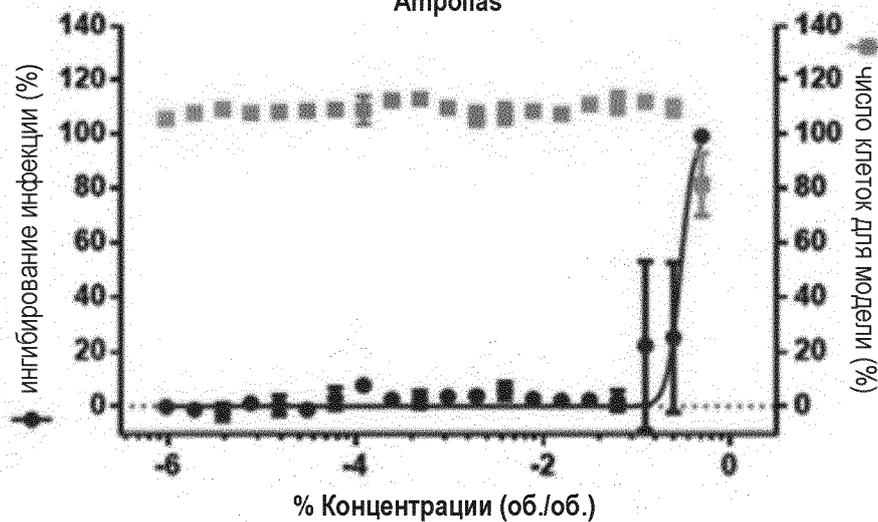
$IC_{50} = 0,0036 \text{ мкМ}$; $CC_{50} = 0,178 \text{ мкМ}$; $SI = 49,95$

Аплидин, растворенный в Ampollas

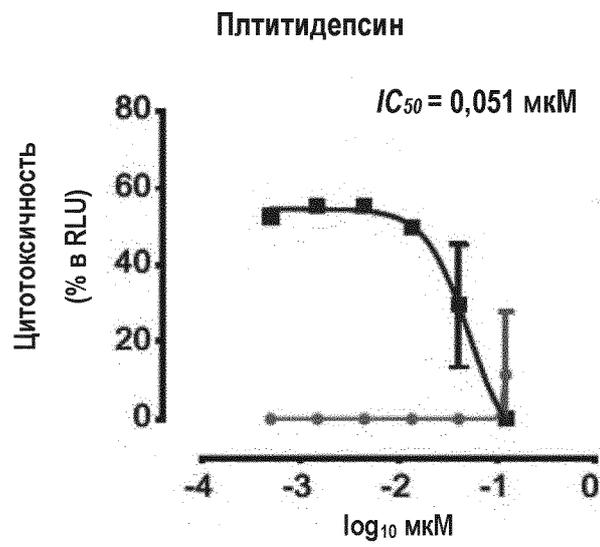


$IC_{50} = 0,0030 \text{ мкМ}$; $CC_{50} = 0,079 \text{ мкМ}$; $SI = 26,14$

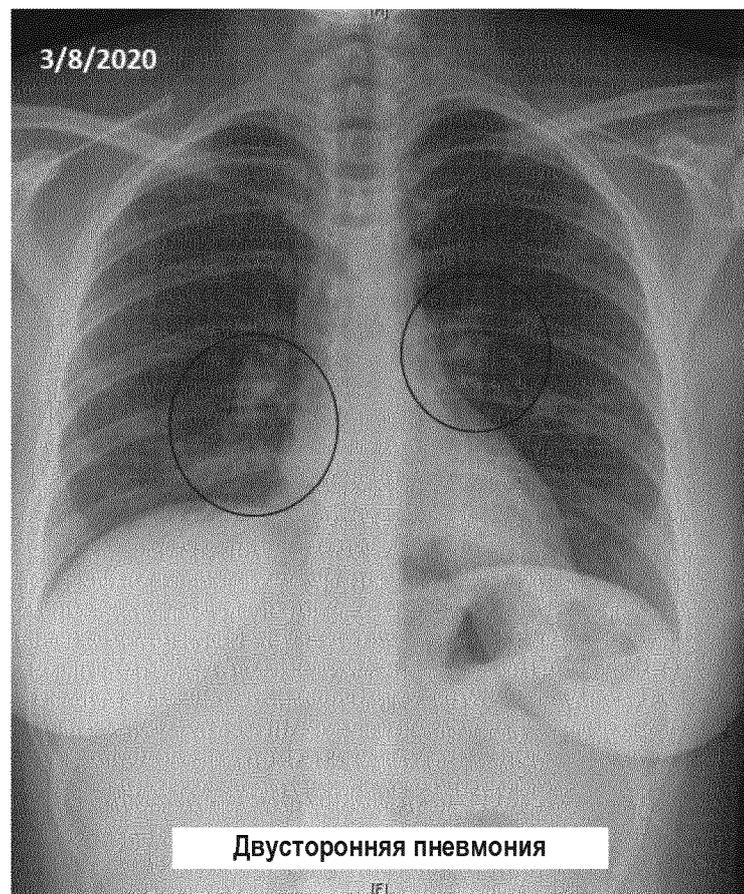
Ampollas



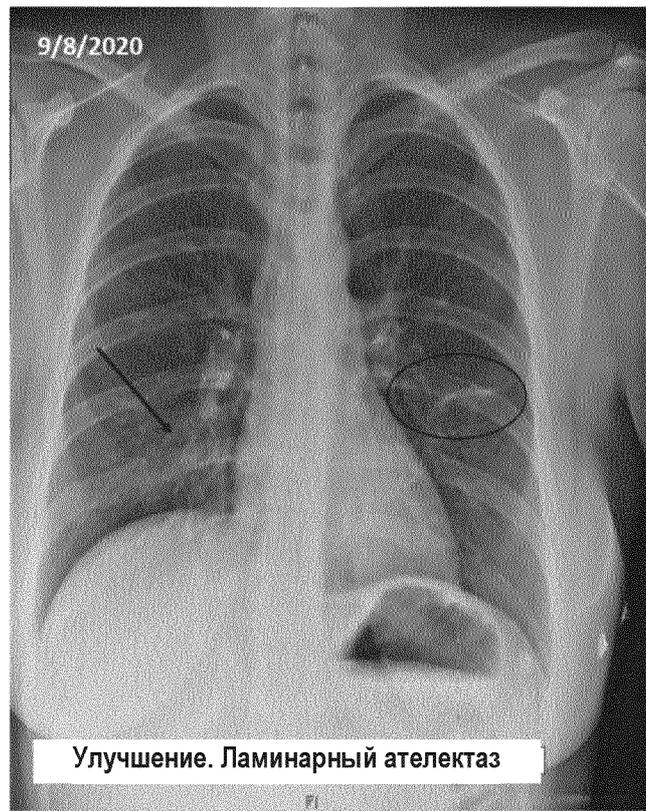
Фиг. 37С



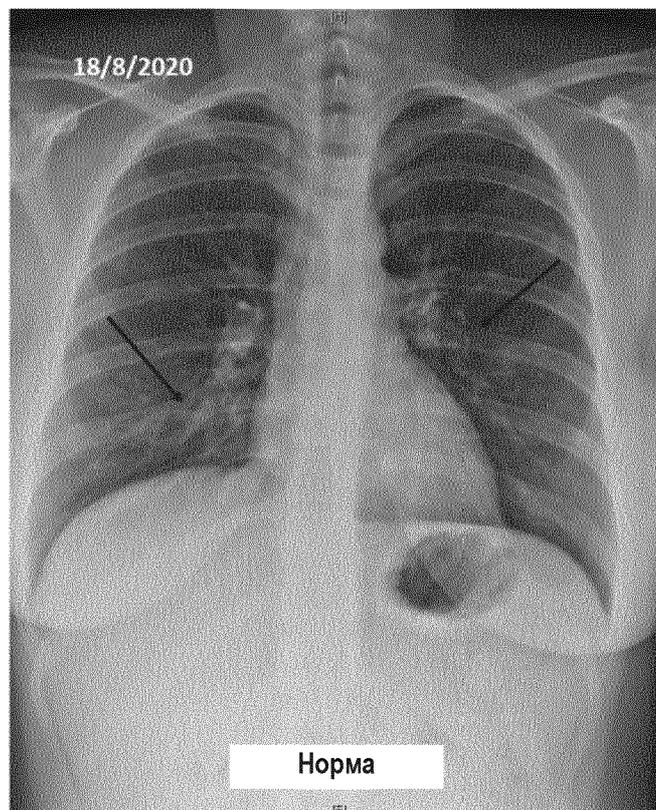
Фиг. 38



Фиг. 39а



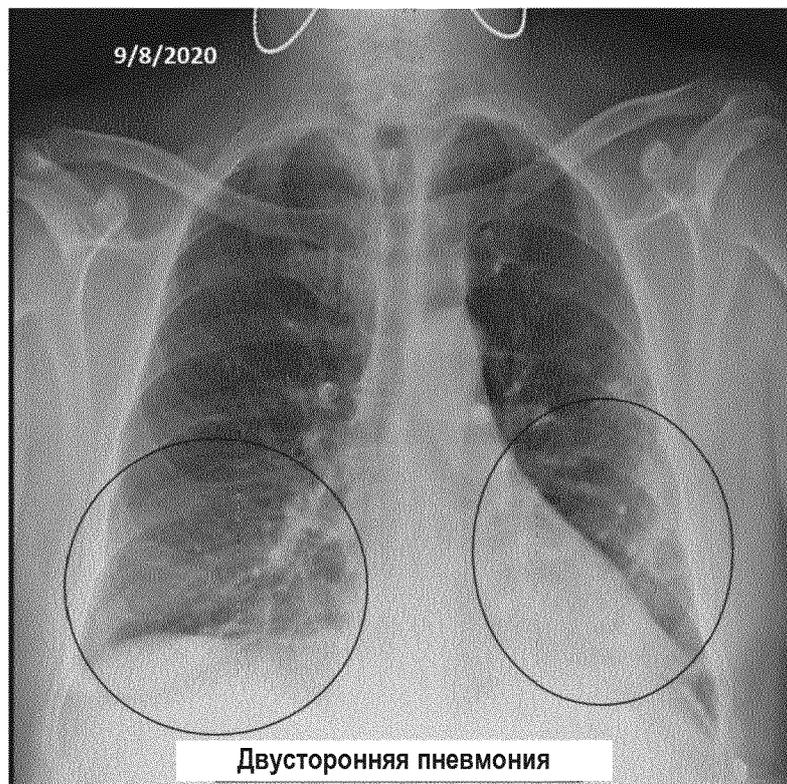
Фиг. 39b



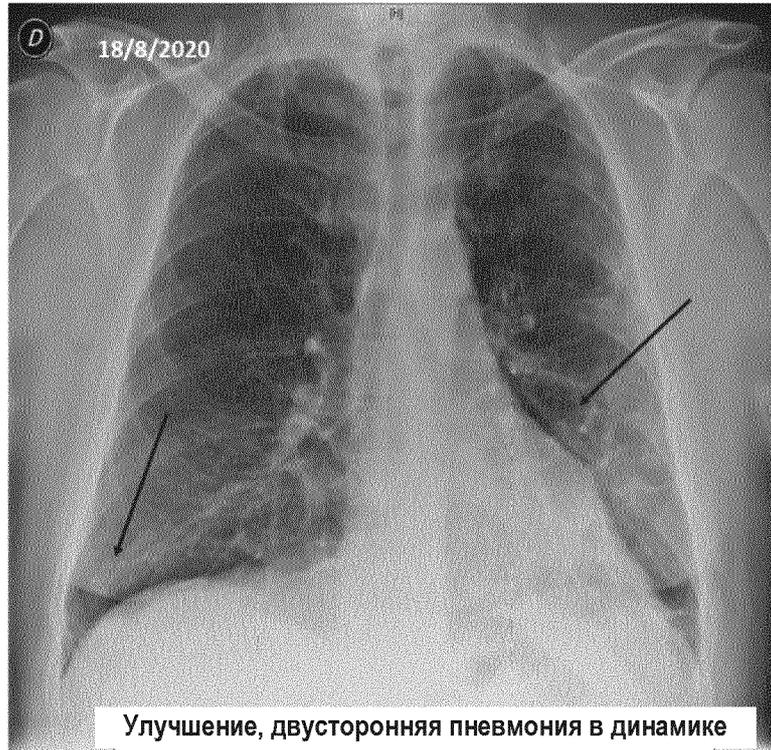
Фиг. 39с



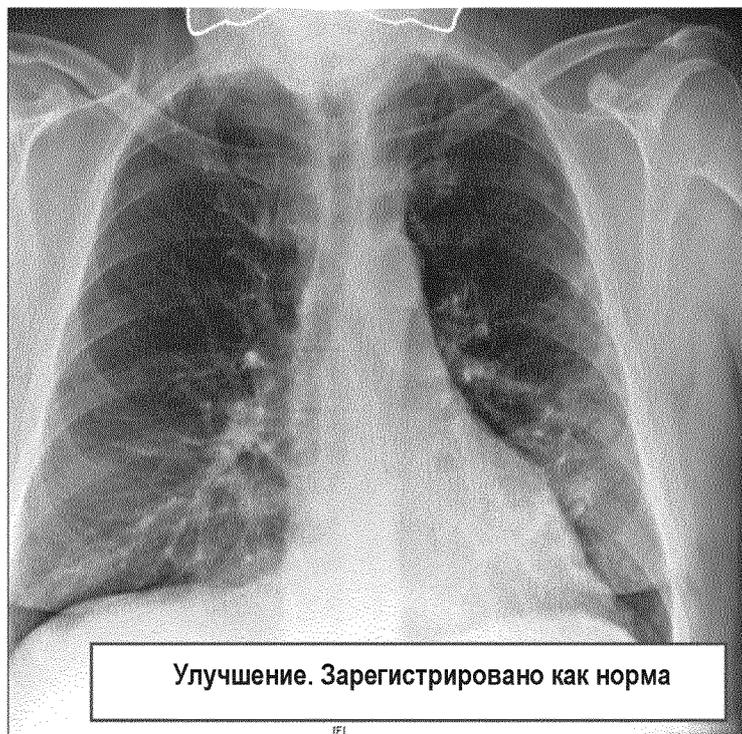
Фиг. 40а



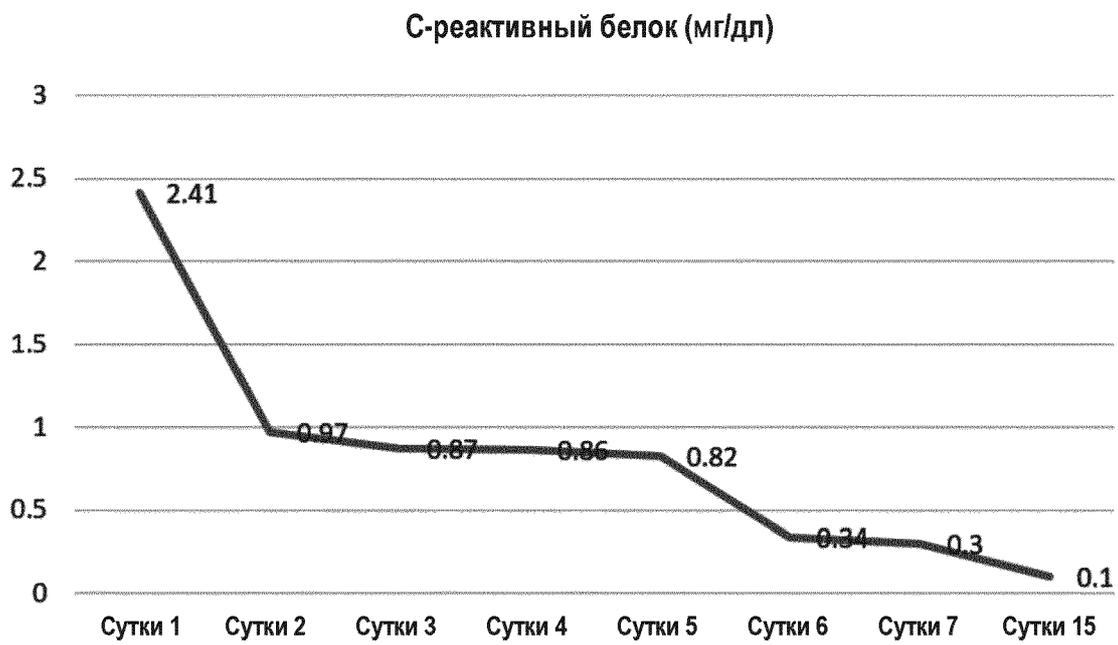
Фиг. 40б

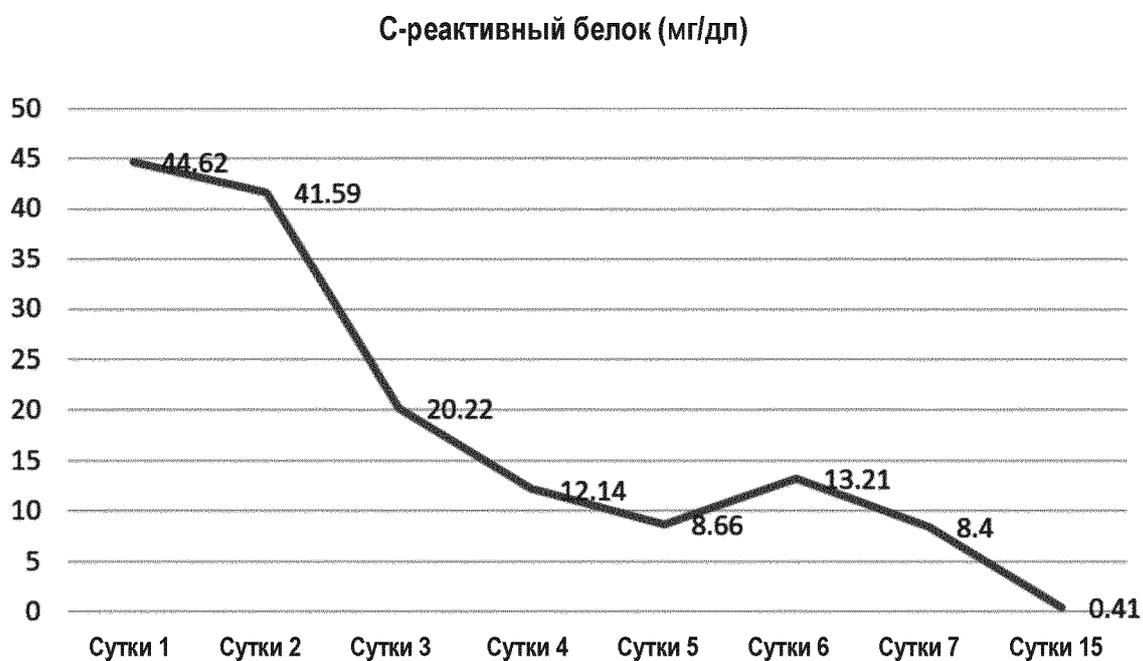


Фиг. 40с

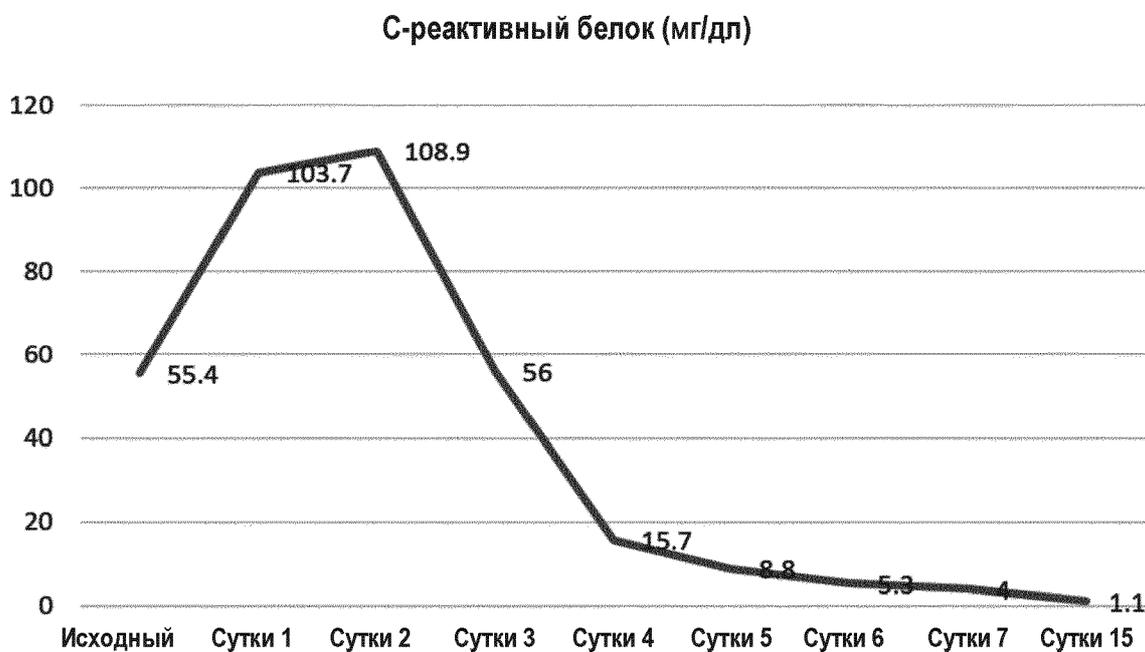


Фиг. 40d

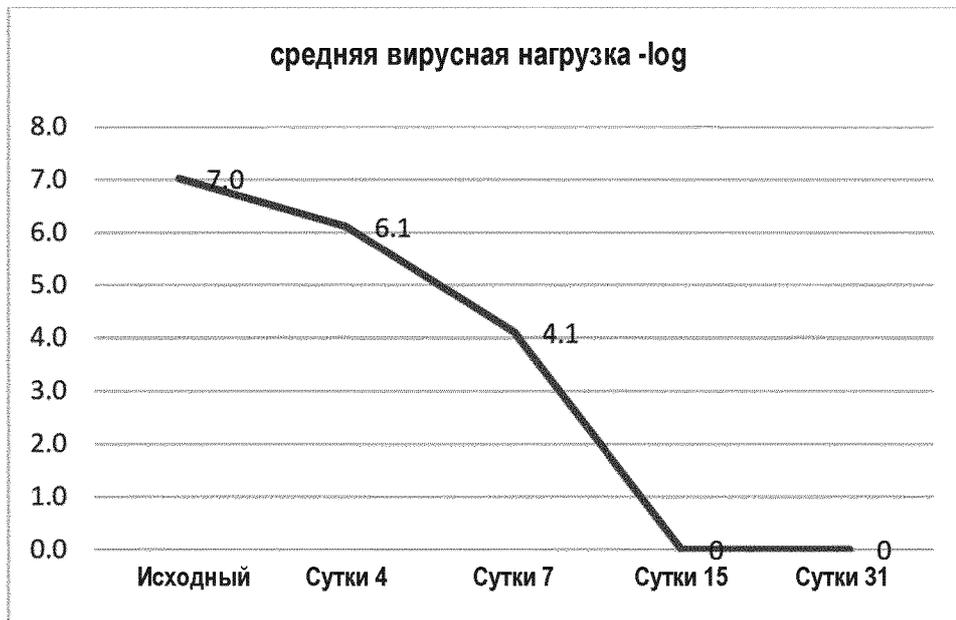
**Фиг. 41а**



Фиг. 41b



Фиг. 41с



Фиг. 42a



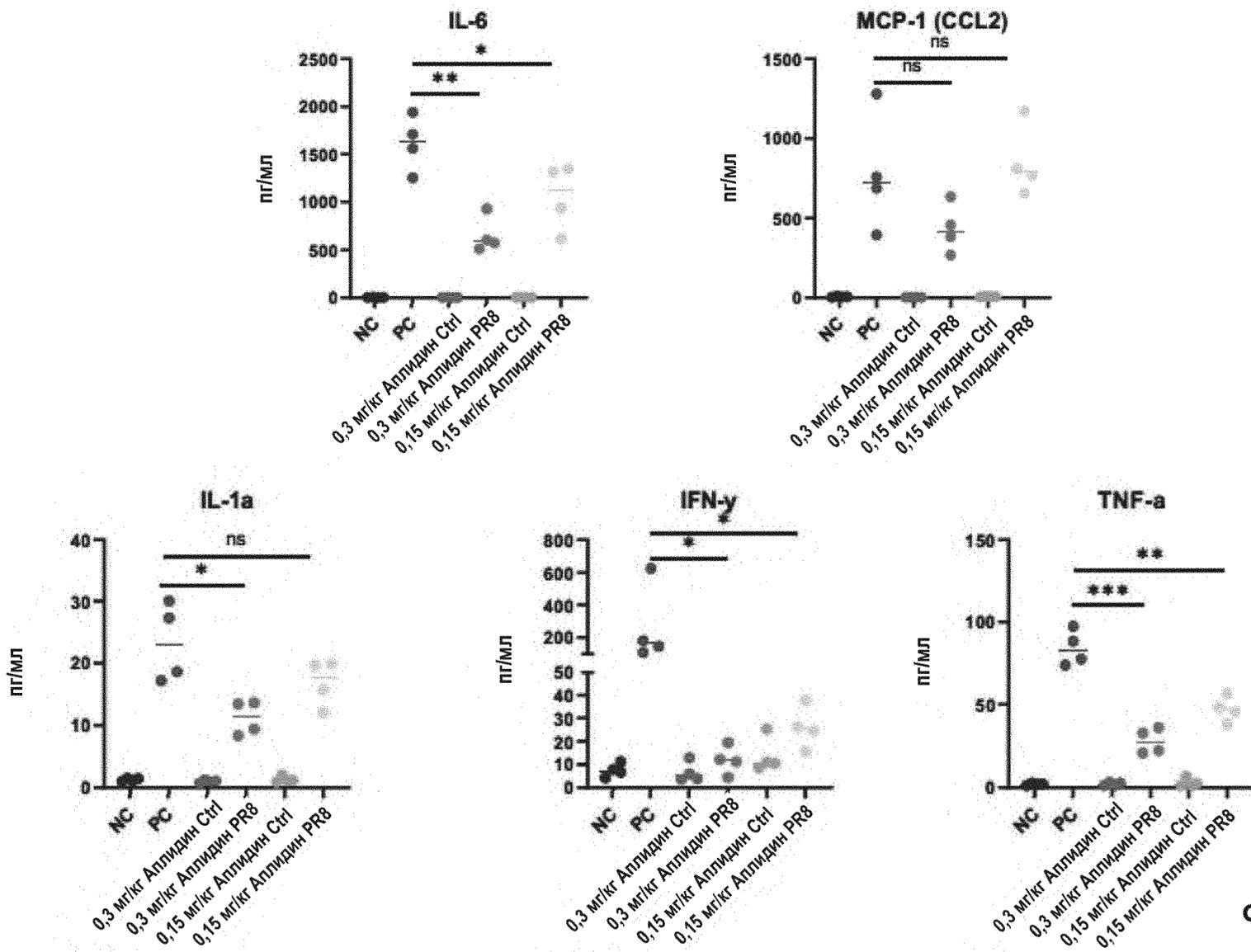
Фиг. 42b



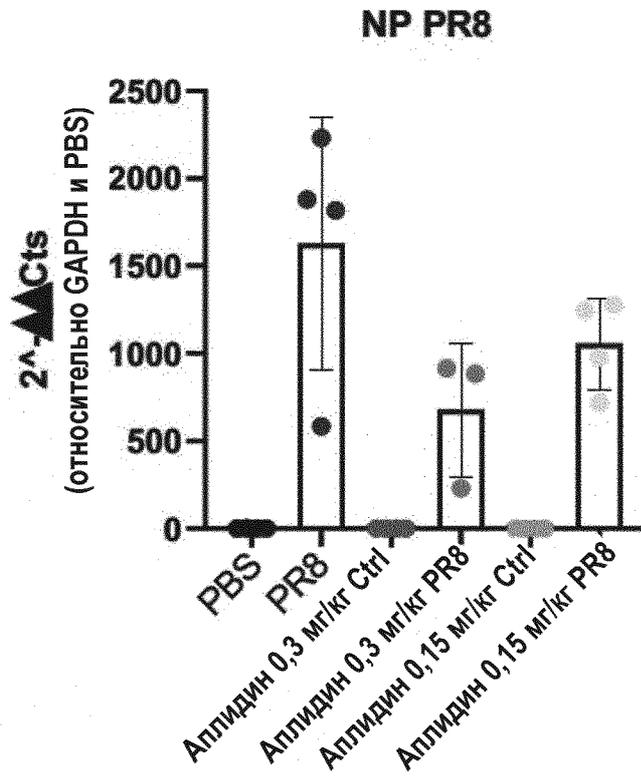
Фиг. 42с



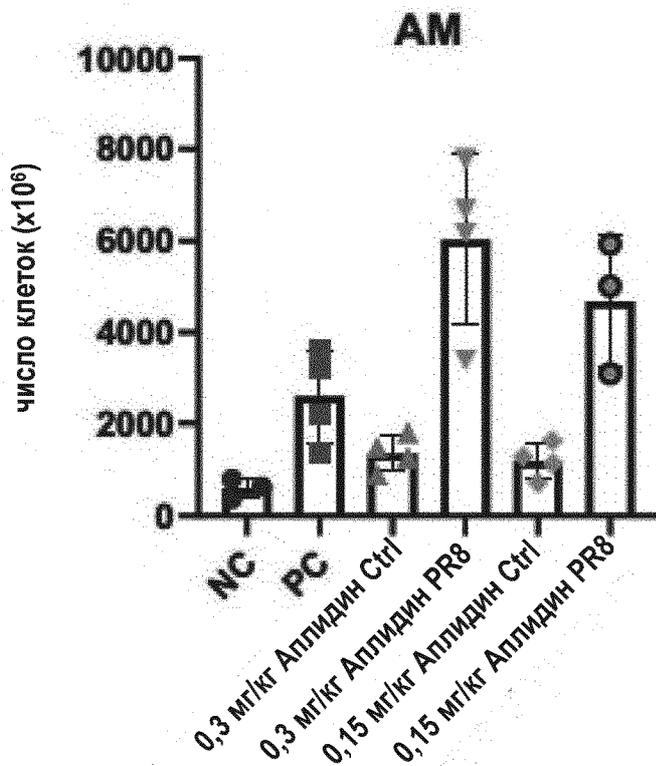
Фиг. 42d



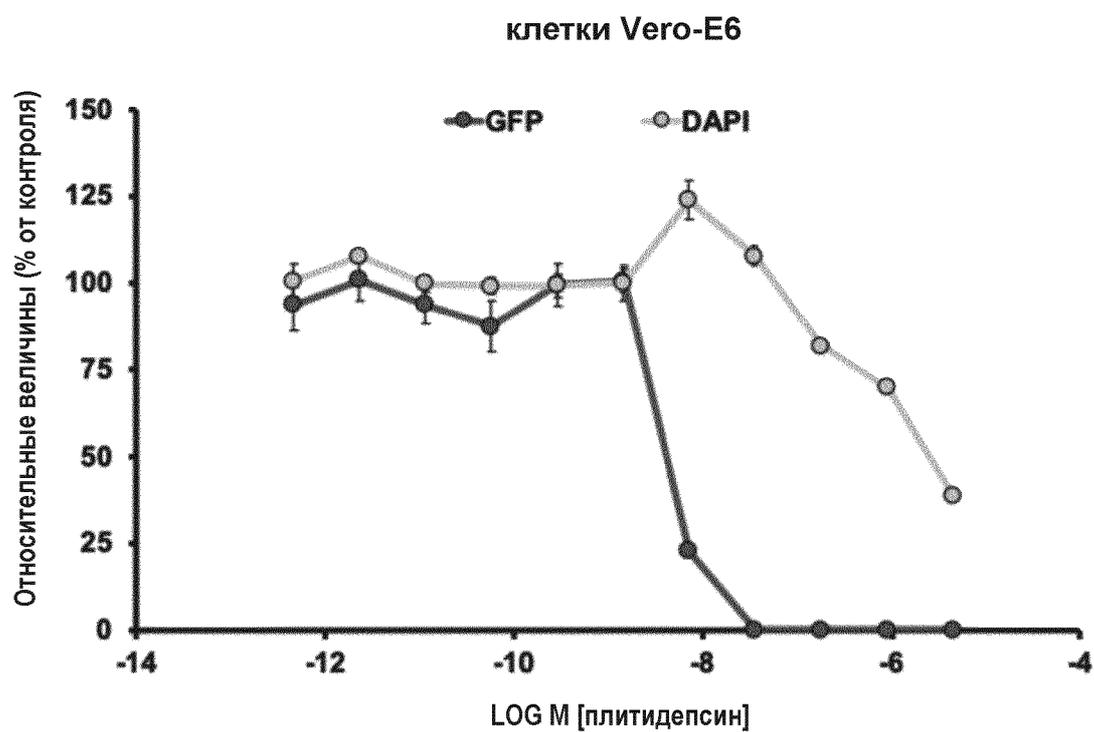
Фиг. 43



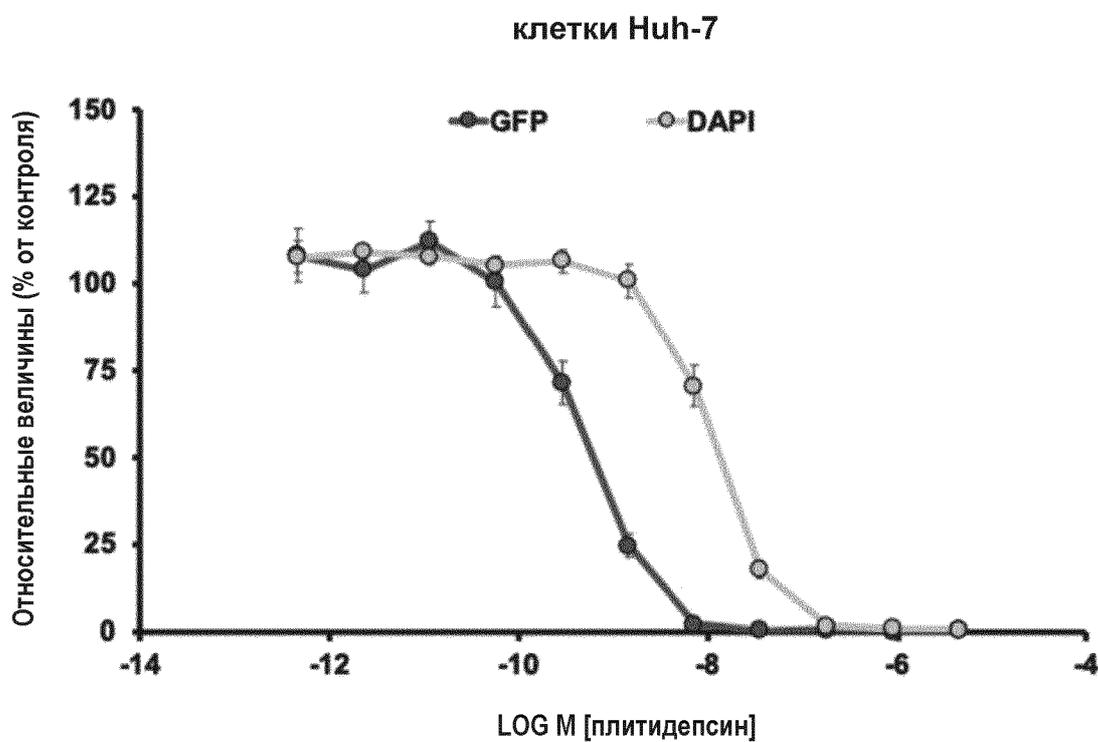
Фиг. 44



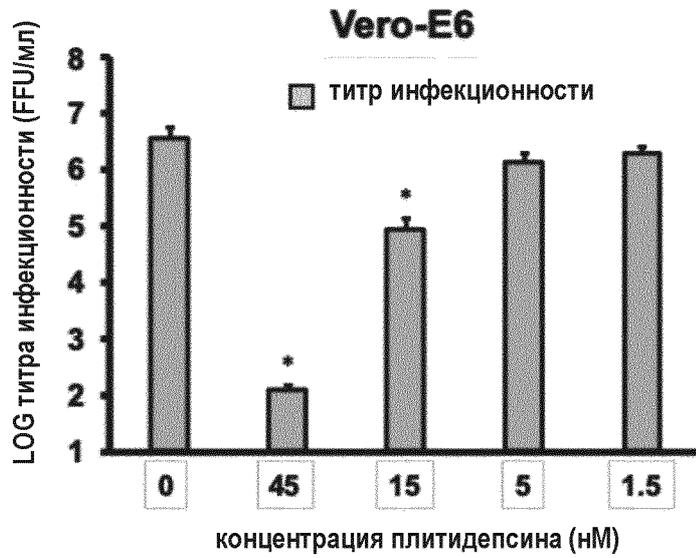
Фиг. 45



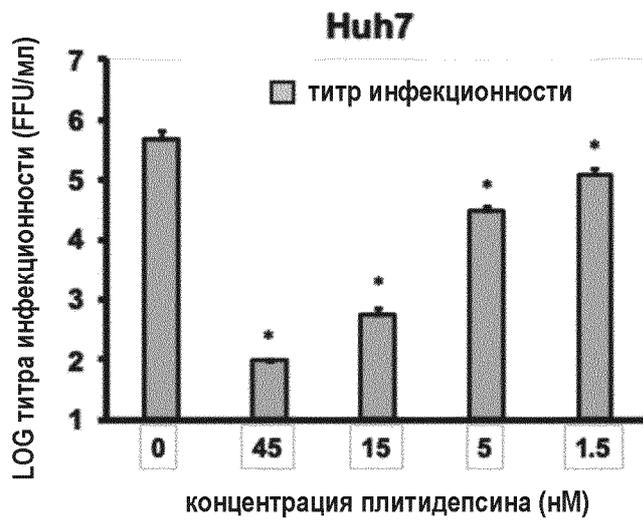
Фиг. 46



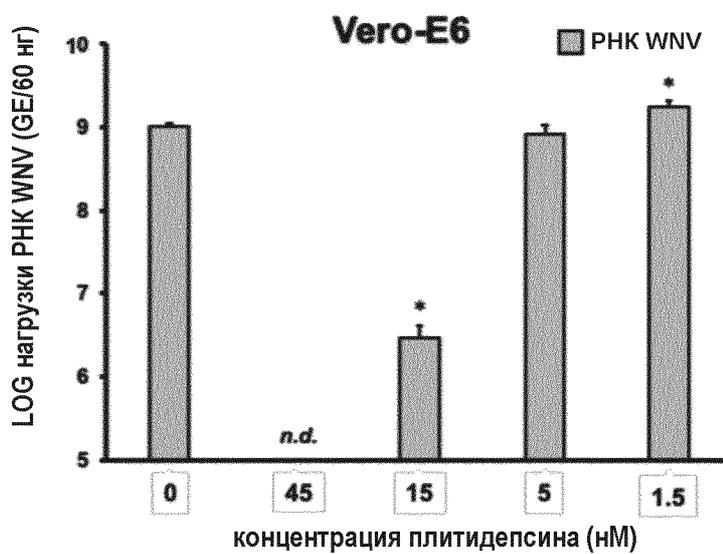
Фиг. 47



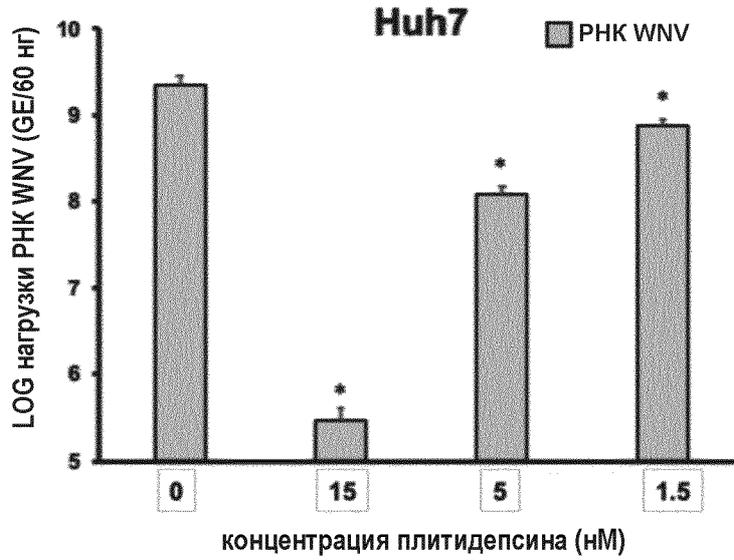
Фиг. 48а



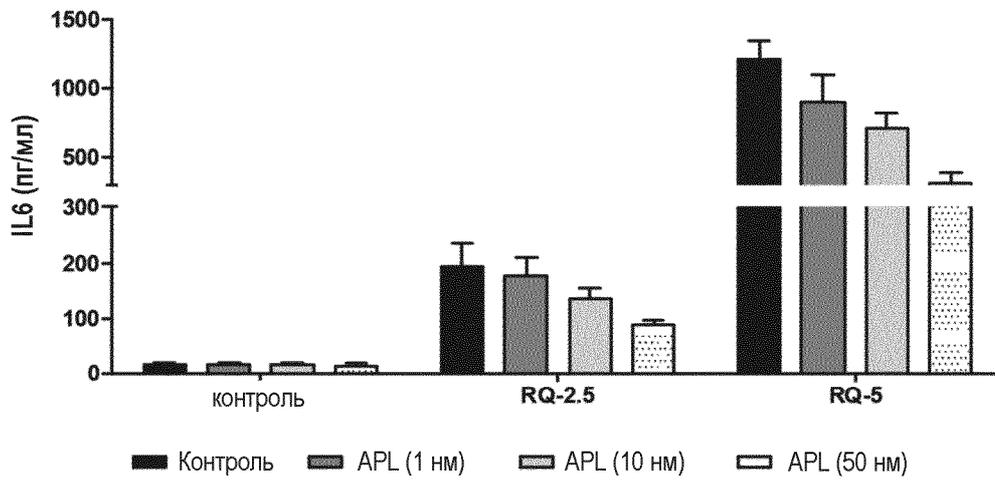
Фиг. 48b



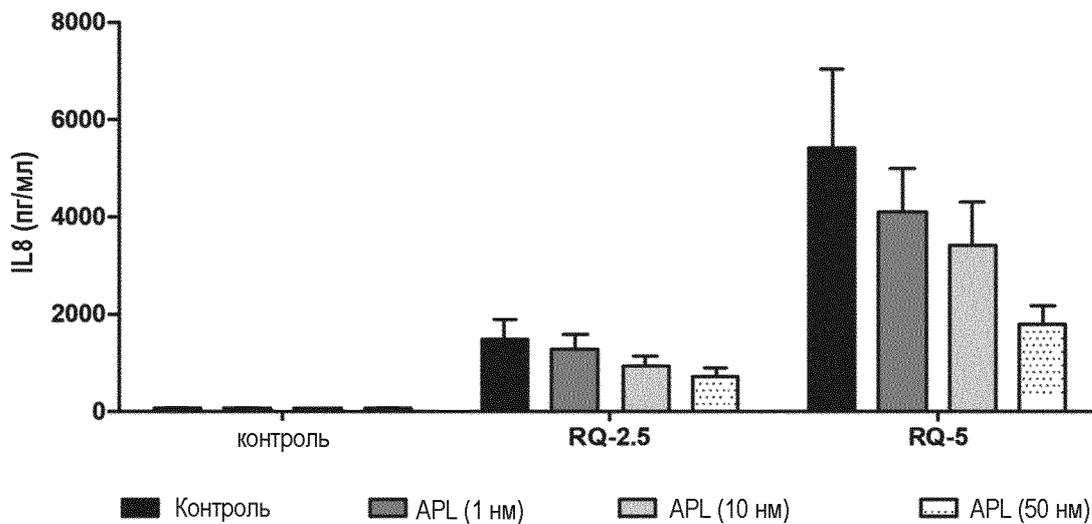
Фиг. 49а



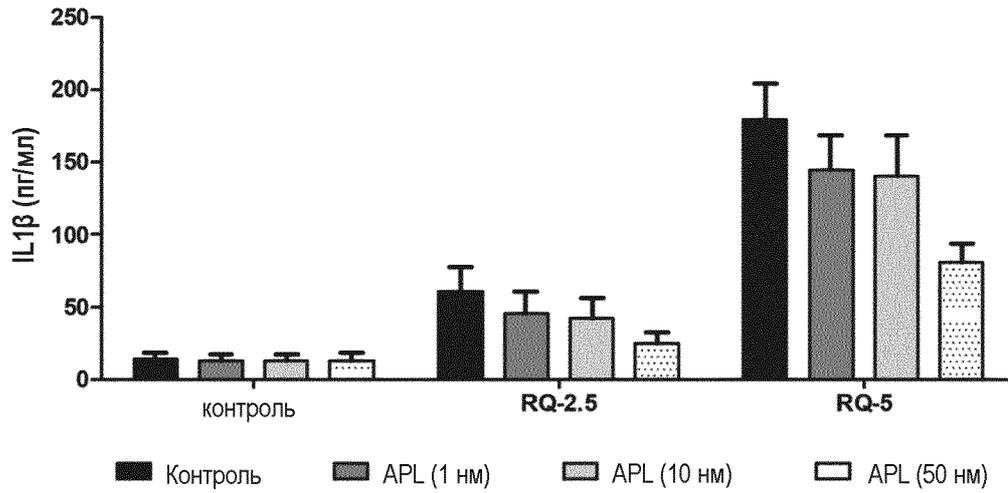
Фиг. 49b



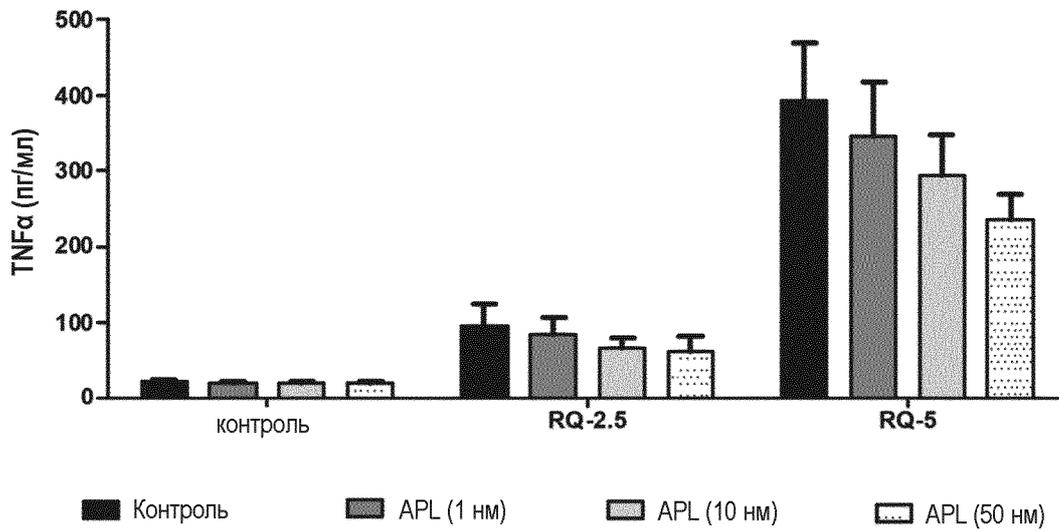
Фиг. 50a



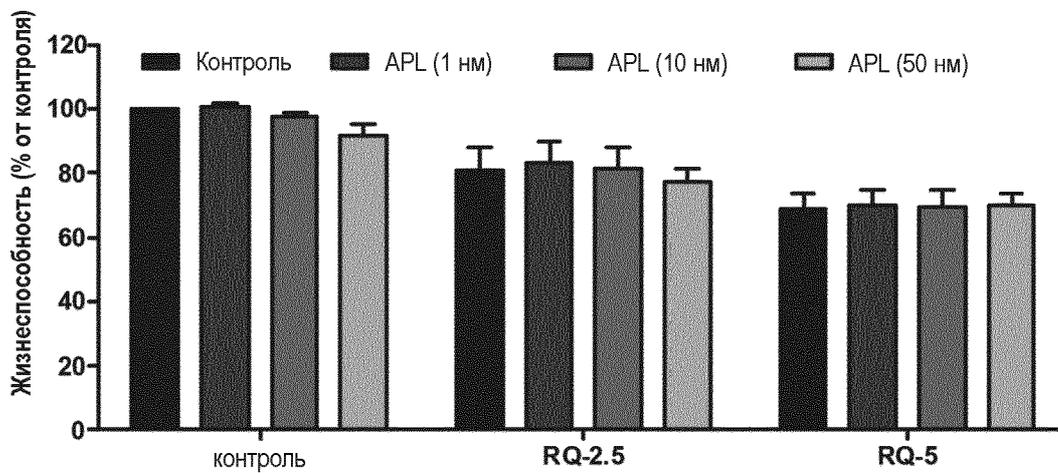
Фиг. 50b



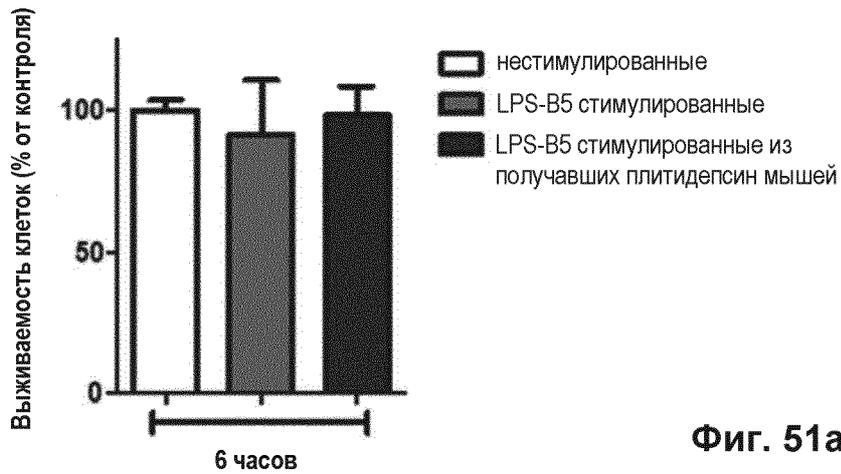
Фиг. 50с



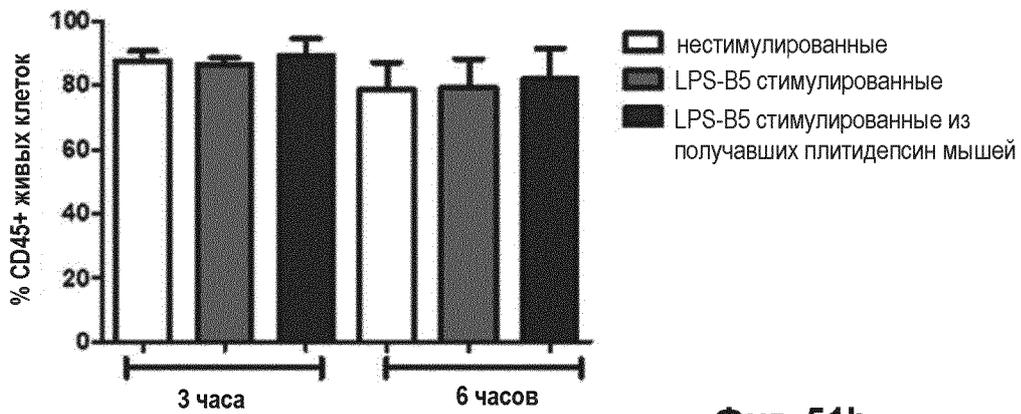
Фиг. 50d



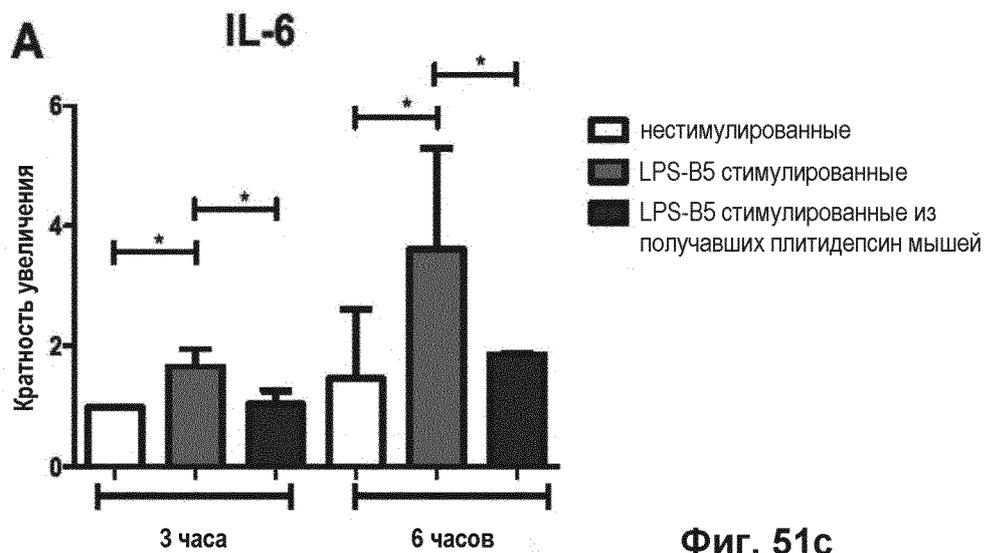
Фиг. 50е



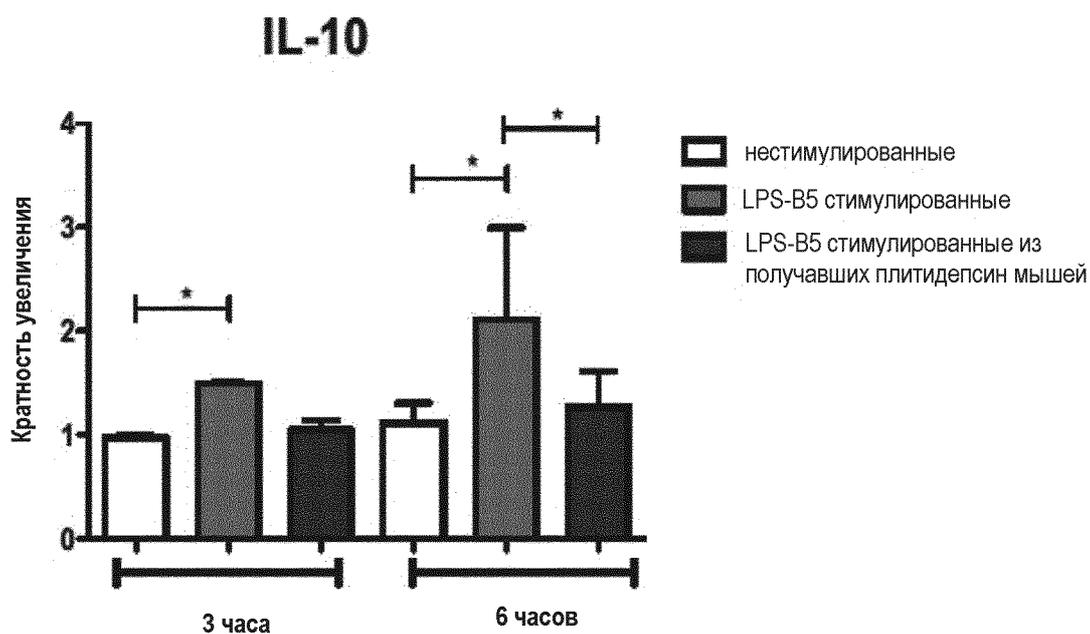
Фиг. 51a



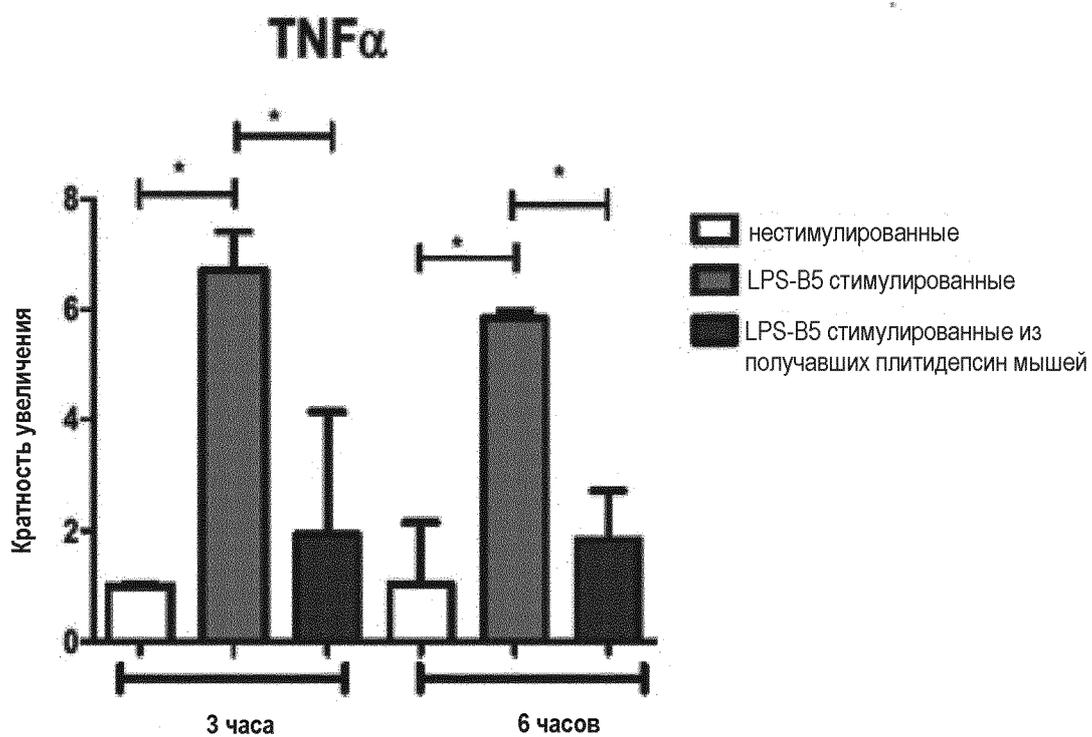
Фиг. 51b



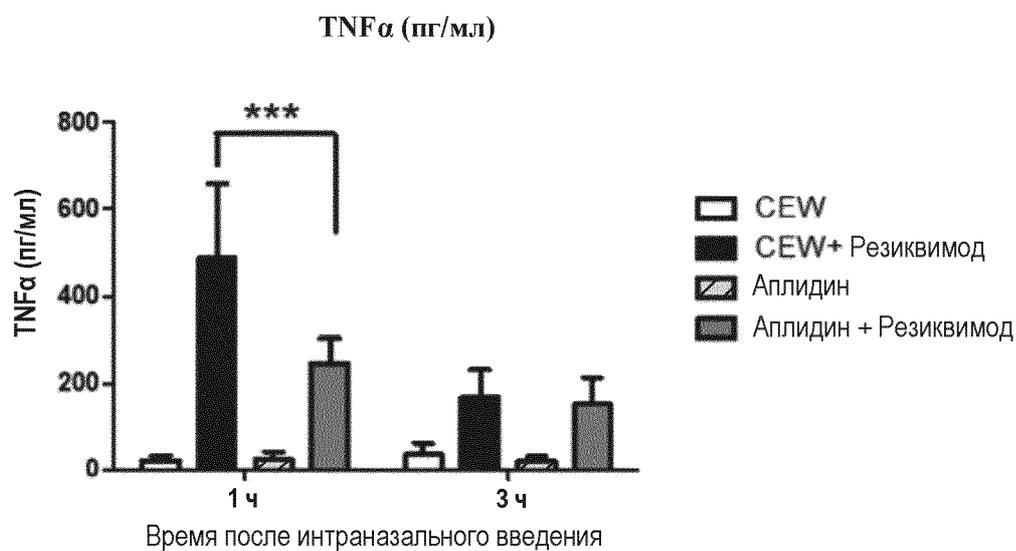
Фиг. 51c



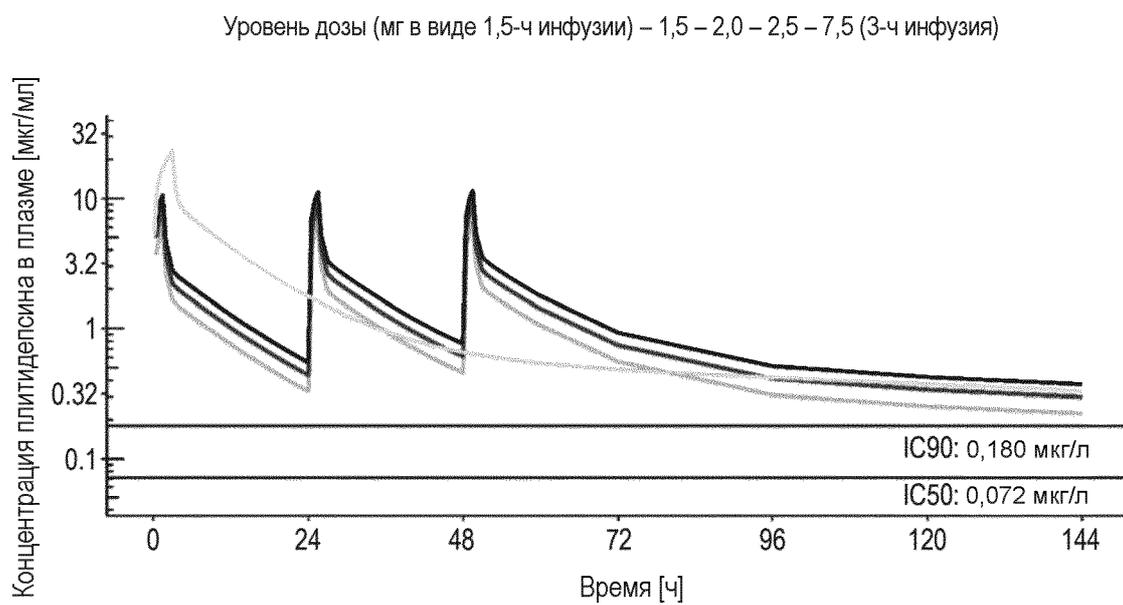
Фиг. 51d



Фиг. 51e



Фиг. 52



Фиг. 53