

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202293220 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.12.27

(51) Int. Cl. *A61K 38/13* (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01)
A61P 31/14 (2006.01)
C07K 7/64 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.05.08

(54) СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ ИЛИ ПРЕДОТВРАЩЕНИЯ ВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ

(31) 63/021,239; 63/022,357

(72) Изобретатель:

(32) 2020.05.07; 2020.05.08

Тенг И.К. Онно (NL), Хейзинга
Роберт Б., Соломонс Нил, Кросс
Дженнифер (CA)

(33) US

(86) PCT/IB2021/053922

(87) WO 2021/224890 2021.11.11

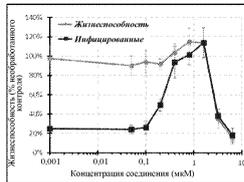
(74) Представитель:

Заявитель:
АУРИНИЯ ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ
ИНК. (CA)

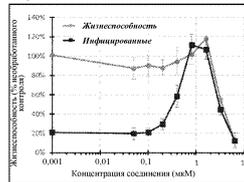
Медведев В.Н. (RU)

(57) В настоящем изобретении предлагаются способы лечения или предотвращения вирусной инфекции, особенно вирусной инфекции у субъектов, которым требуется иммуносупрессивная терапия.

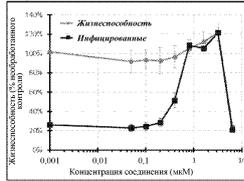
Партия 1 *MT701*



Партия 2 *YJL8401*



Партия 3 *NS-20*



Партия 4 *NS-50*



A1

202293220

202293220

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-576399EA/032

СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ ИЛИ ПРЕДОТВРАЩЕНИЯ ВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ

Перекрестная ссылка на родственные заявки

[1] Настоящая заявка претендует на приоритет по отношению к предварительной заявке США № 63/021 239, поданной 7 мая 2020 г. и озаглавленной «СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ ИЛИ ПРЕДОТВРАЩЕНИЯ ВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ», и предварительной заявке США № 63/022 357, поданной 8 мая 2020 г., озаглавленной «СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ ИЛИ ПРЕДОТВРАЩЕНИЯ ВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ», содержание которых полностью включено в данный документ посредством ссылки.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[2] В настоящем изобретении предлагаются способы лечения или предотвращения вирусной инфекции, особенно вирусной инфекции у субъектов, которым требуется иммуносупрессивная терапия.

Уровень техники

[3] Вирусная инфекция может привести к смертельным заболеваниям. Например, коронавирусная болезнь-2019 (COVID-19), вызываемая коронавирусом-2 тяжелого острого респираторного синдромом (SARS-CoV-2), может привести к быстрому развитию острого респираторного дистресс-синдрома (ARDS) в дополнение к сердечно-легочному дистрессу. Распространение COVID-19 трудно сдержать из-за высокой контагиозности и длительного, часто бессимптомного, инкубационного периода.

[4] Некоторые люди подвергаются значительно повышенному риску заражения и смерти во время вирусной вспышки или пандемии. Например, многим пациентам требуется прерывистая, длительная или даже пожизненная иммуносупрессивная терапия по медицинским показаниям (например, из-за аутоиммунных заболеваний или трансплантации паренхиматозных органов). Эти пациенты более восприимчивы к вирусной инфекции из-за ослабленного иммунитета. Таким образом, существует потребность в лекарственном препарате, который мог бы поддерживать пациентов, нуждающихся в иммуносупрессивной терапии, в здоровом состоянии, несмотря на их фоновые заболевания, и в то же время оказывать противовирусное действие. В настоящем изобретении предлагаются варианты осуществления, которые удовлетворяют такие потребности.

Краткое изложение сущности изобретения

[5] В настоящем изобретении предлагаются способы лечения или предотвращения вирусной инфекции у субъекта, включающие введение указанному субъекту воклоспорина, например, терапевтически эффективного количества воклоспорина. В некоторых из предложенных вариантов осуществления субъект нуждается в иммуносупрессивной терапии. В некоторых из предложенных вариантов осуществления вирусная инфекция ослабевает за счет ингибирования циклофилина А (СурА) или пути, ассоциированного с СурА.

[6] В некоторых из предложенных вариантов осуществления, в настоящем изобретении предлагается способ лечения или предотвращения вирусной инфекции у субъекта, нуждающегося в иммуносупрессивной терапии, включающий введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества воклоспорина, при этом вирусная инфекция ослабевает за счет ингибирования циклофилина А (СурА) или пути, ассоциированного с СурА.

[7] В некоторых из предложенных вариантов осуществления вирусная инфекция вызывается вирусом, который является представителем семейства Coronaviridae.

[8] В некоторых из предложенных вариантов осуществления вирус представляет собой альфакоронавирус, бетакоронавирус, дельтакоронавирус или гаммакоронавирус.

[9] В некоторых из предложенных вариантов осуществления вирус представляет собой коронавирус человека OC43 (HCoV-OC43), коронавирус человека HKU1 (HCoV-HKU1), коронавирус человека 229E (HCoV-229E), коронавирус человека NL63 (HCoV-NL63), коронавирус, связанный с ближневосточным респираторным синдромом (MERS-CoV), коронавирус тяжелого острого респираторного синдрома (SARS-CoV) или коронавирус 2 тяжелого острого респираторного синдрома (SARS-CoV-2).

[10] В некоторых из предложенных вариантов осуществления вирус представляет собой MERS-CoV, SARS-CoV или SARS-CoV-2.

[11] В некоторых из предложенных вариантов осуществления вирус представляет собой SARS-CoV-2.

[12] В некоторых из предложенных вариантов осуществления терапевтически эффективное количество составляет от около 0,1 мг/кг/день до около 2 мг/кг/день.

[13] В некоторых из предложенных вариантов осуществления терапевтически эффективное количество составляет около 7,9 мг 2 р/д, около 15,8 мг 2 р/д, около 23,7 мг 2 р/д, около 31,6 мг 2 р/д, около 39,5 мг 2 р/д, около 47,4 мг 2 р/д или около 55,3 мг 2 р/д.

[14] В некоторых из предложенных вариантов осуществления терапевтически эффективное количество составляет около 7,9 мг 1 р/д, около 15,8 мг 1 р/д, около 23,7 мг 1 р/д, около 31,6 мг 1 р/д, около 39,5 мг 1 р/д, около 47,4 мг 1 р/д, около 55,3 мг 1 р/д, около 63,2 мг 1 р/д, около 71,1 мг 1 р/д, около 79,0 мг 1 р/д, около 86,9 мг 1 р/д, около 94,8 мг 1 р/д, около 102,7 мг 1 р/д или около 110,6 мг 1 р/д.

[15] В некоторых из предложенных вариантов осуществления терапевтически эффективное количество эквивалентно или может достигать концентрации от около 0,05 мкМ до около 10 мкМ, от около 0,1 мкМ до около 5 мкМ, от около 0,2 мкМ до около 2,5 мкМ, от около 0,3 мкМ до около 1,0 мкМ, от около 0,4 мкМ до около 0,9 мкМ, от около 0,5 мкМ до около 0,8 мкМ, от около 0,1 мкМ до около 0,5 мкМ, или от около 0,2 мкМ до около 0,4 мкМ, или около 0,05, около 0,1, около 0,15, около 0,2, около 0,25, около 0,3, около 0,35, около 0,4, около 0,45, около 0,5, около 0,55, около 0,6, около 0,7, около 0,8, около 0,9, около 1,0, около 1,5, около 2,0, около 2,5, около 3,0, около 3,5, около 4,0, около 4,5, около 5,0, около 6,0, около 7,0, около 8,0, около 9,0 или около 10,0 мкМ или меньше.

[16] В некоторых из предложенных вариантов осуществления указанный способ

дополнительно включает мониторинг функции почек субъекта.

[17] В некоторых из предложенных вариантов осуществления указанный мониторинг функции почек субъекта включает:

(а) оценку расчетной скорости клубочковой фильтрации (pСКФ) у субъекта по меньшей мере в первый момент времени и во второй момент времени в разные дни; а также

(b) (i) если pСКФ у субъекта снижается более чем на целевой % до уровня ниже заданного значения между первым и вторым моментами времени, то следует снизить суточную дозу или прекратить введение воклоспорина субъекту;

(ii) если pСКФ у субъекта снижается менее чем на целевой % между первым и вторым моментами времени, следует продолжать введение субъекту той же суточной дозы воклоспорина.

[18] В некоторых из предложенных вариантов осуществления заданное значение составляет от около 50 до около 90 мл/мин/1,73 м².

[19] В некоторых из предложенных вариантов осуществления заданное значение составляет около 60 мл/мин/1,73 м².

[20] В некоторых из предложенных вариантов осуществления целевой процент составляет от около 20% до около 45%.

[21] В некоторых из предложенных вариантов осуществления целевой процент составляет около 20%.

[22] В некоторых из предложенных вариантов осуществления субъект имеет аутоиммунное заболевание или патологическое состояние, ассоциированное с отторжением трансплантата.

[23] В некоторых из предложенных вариантов осуществления субъект имеет патологическое состояние, ассоциированное с отторжением трансплантата.

[24] В некоторых из предложенных вариантов осуществления указанное патологическое состояние ассоциировано с отторжением трансплантата сердца, легких, печени, почек, поджелудочной железы, кожи, кишечника или роговицы.

[25] В некоторых из предложенных вариантов осуществления указанное патологическое состояние ассоциировано с отторжением трансплантата почки.

[26] В некоторых из предложенных вариантов осуществления у субъекта имеется аутоиммунное заболевание.

[27] В некоторых из предложенных вариантов осуществления терапевтически эффективное количество воклоспорина вводят без введения терапевтически эффективного количества мофетила микофенолата (MMF) и/или терапевтически эффективного количества кортикостероида.

[28] В некоторых из предложенных вариантов осуществления указанный способ дополнительно включает введение терапевтически эффективного количества мофетила микофенолата (MMF) и/или кортикостероида.

[29] В некоторых из предложенных вариантов осуществления воклоспорин вводят

путем энтерального введения (например, перорального введения, подъязычного введения или ректального введения) или парентерального введения (например, внутривенной инъекции, внутримышечной инъекции, подкожной инъекции, внутривенной инфузии или ингаляции/инсуффляции).

[30] В некоторых из предложенных вариантов осуществления воклоспорин вводят путем энтерального введения (например, перорального введения, подъязычного введения или ректального введения).

[31] В некоторых из предложенных вариантов осуществления воклоспорин вводят перорально.

[32] В некоторых из предложенных вариантов осуществления воклоспорин вводят путем парентерального введения (например, внутривенной инъекции, внутримышечной инъекции, подкожной инъекции, внутривенной инфузии или ингаляции/инсуффляции).

[33] В некоторых из предложенных вариантов осуществления воклоспорин вводят путем ингаляции или инсуффляции.

[34] В некоторых из предложенных вариантов осуществления воклоспорин вводят путем ингаляции или инсуффляции.

[35] В некоторых из предложенных вариантов осуществления воклоспорин вводят в фармацевтической композиции. В некоторых из предложенных вариантов осуществления указанная фармацевтическая композиция содержит один или большее количество фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ. В некоторых из предложенных вариантов осуществления фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества независимо выбирают из одного или большего количества следующих веществ: спирт, D- α -токоферол (витамин E), полиэтиленгликоль сукцинат (TPGS), полисорбат 20 (Tween 20), полисорбат 40 (Tween 40), триглицериды со средней длиной цепи, желатин, сорбит, глицерин, оксид железа желтый, оксид железа красный, диоксид титана и вода.

Краткое описание графических материалов

[36] **Фиг. 1А** демонстрирует постановку анализа снижения цитопатического эффекта (CPE).

[37] **Фиг. 1В** демонстрирует эффект воклоспорина в анализах снижения CPE SARS-CoV-2.

[38] **Фиг. 1С** демонстрирует сравнение эффекта воклоспорина и такролимуса, направленного против SARS-CoV-2.

[39] **Фиг. 2А** демонстрирует эффект воклоспорина в анализе снижения вирусной нагрузки SARS-CoV-2 с применением клеток Vero E6.

[40] **Фиг. 2В** демонстрирует эффект воклоспорина в анализе снижения вирусной нагрузки SARS-CoV-2 с применением клеток Calu.

[41] **Фиг. 2С** демонстрирует эффект воклоспорина на инфицированные SARS-CoV-2 клетки Vero E6. Цифры под панелями указывают концентрацию тестируемого соединения (воклоспорина). Сигнал флуоресценции (зеленая флуоресценция) указывает на окрашивание вируса NSP4 (объектив 20x). Время воздействия было одинаковым в

разных условиях

[42] **Фиг. 3** демонстрирует минимальные уровни воклоспорина и такролимуса в крови реципиентов трансплантата почки.

[43] **Фиг. 4** демонстрирует схему исследования, в котором оценивается противовирусный эффект воклоспорина у пациентов с положительным результатом на SARS-CoV-2, перенесших трансплантацию почки.

[44] **Фиг. 5A-5E** демонстрируют ингибирование репликации SARS-CoV-2 различными иммунодепрессантами и их влияние на жизнеспособность неинфицированных клеток (цитотоксичность) и инфицированных клеток (противовирусный эффект). Воклоспорин (**Фиг. 5A**), циклоспорин А (**Фиг. 5B**), эверолимус (**Фиг. 5C**), такролимус (**Фиг. 5D**), микофенолят (**Фиг. 5E**).

[45] **Фиг. 6A-6D** демонстрируют влияние лечения циклоспорином А (CsA), такролимусом (TAC) и воклоспорином (VCS) на продуцирование инфекционного потомства SARS-CoV-2 клетками Calu-3 человека. Эксперименты проводились с использованием либо стеклянной (**Фиг. 6A** и **Фиг. 6C**) либо пластиковой лабораторной посуды (**Фиг. 6B** и **FIG. 6D**). Клетки инфицировали SARS-CoV-2 в присутствии различных концентраций VCS, CsA и TAC, применяя исходные растворы, приготовленные из чистых порошков, растворенных в DMSO. Вирусную нагрузку в среде инфицированных клеток определяли с помощью анализа бляшек на клетках Vero E6 с применением надосадочной жидкости, собранной через 24 ч после инфицирования. Жизнеспособность неинфицированных клеток Calu-3, обработанных тем же диапазоном концентраций соединения, измеряли параллельно с помощью колориметрического анализа жизнеспособности (**Фиг. 6C**; n=12; **Фиг. 6D**; n=3). Приведены средние значения \pm SD, и статистическую значимость разницы между каждой концентрацией и контрольным растворителем оценивали с помощью однофакторного ANOVA. *, p<0,1; **, p<0,01; ***, p<0,001; ****, p<0,0001.

[46] **Фиг. 7A-7E** демонстрируют эффекты различных соединений на жизнеспособность клеток в анализе снижения CPE с клетками Vero E6, инфицированными SARS-CoV-2. Репликацию SARS-CoV-2 (цветные символы и кривые) в клетках Vero E6 под действием различных препаратов определяли с помощью анализа снижения CPE. Для каждого препарата тестировали двукратные серийные разведения фармацевтических составов. VCS (**Фиг. 7A**), циклоспорин А/Neoral (**Фиг. 7B**), TAC/Prograf (**Фиг. 7C**), EVL/Certican (**Фиг. 7D**), и MMF/Cellcept (**Фиг. 7E**). После предварительной инкубации с соединением, клетки инфицировали SARS-CoV-2 и выдерживали в среде, содержащей препарат, в течение 3 дней, после чего с помощью колориметрического анализа измеряли жизнеспособность клеток. Цитотоксичность препаратов оценивали параллельно с применением ложно инфицированных клеток, обработанных соединением (сплошная серая линия). Точки данных представляют собой среднее \pm SD двух независимых экспериментов. CC_{50} и EC_{50} определяли с помощью нелинейного регрессионного анализа, и кривые регрессии наносили на графики (сплошные линии).

[47] **Фиг. 8А-8В** демонстрируют ингибирование репликации SARS-CoV-2 в клетках Vero E6, обработанных фармацевтическим составом VCS (**Фиг. 8А**) или плацебо (**Фиг. 8В**), что определено с помощью анализа снижения CPE.

[48] **Фиг. 9** демонстрируют вирулицидную активность порошка VCS (3,2 мкМ), фармацевтического состава VCS (3,2 мкМ), содержания составов плацебо (соответствует 3,2 мкМ VCS) и 50% этанола (положительный контроль) в анализе бляшек.

[49] **Фиг. 10А-10D** демонстрируют ингибирование репликации SARS-CoV-2 различными иммуносупрессивными соединениями в анализах снижения CPE с исходными материалами, приготовленными из порошков чистых соединений. VCS (**Фиг. 10А**), CsA (**Фиг. 10В**), TAC (**Фиг. 10С**) и MPA (**Фиг. 10D**).

Подробное описание

[50] В настоящем изобретении предлагаются способы лечения или предотвращения вирусной инфекции у субъекта. В некоторых аспектах указанные способы включают введение субъекту воклоспорина, например, терапевтически эффективного количества воклоспорина. В некоторых из предложенных вариантов осуществления субъект нуждается в иммуносупрессивной терапии.

[51] Вирусная инфекция может привести к летальному исходу, особенно среди уязвимых групп населения. В период с декабря 2019 года по январь 2021 года коронавирус 2 тяжелого острого респираторного синдрома (SARS-CoV-2), возбудитель коронавирусной болезни-2019 (COVID-19), привел к более чем 90 миллионам инфицированных во всем мире. Более тяжелое течение COVID-19 коррелирует с сопутствующими заболеваниями, обычно присутствующими у реципиентов паренхиматозных органов (Zhou et al., *Lancet*. Mar 28 2020;395(10229):1054-1062; Huang et al., *Lancet*. Feb 15 2020;395(10223):497-506; Guan et al., *Eur Respir J*. May 2020;55(5)doi:10.1183/13993003.00547-2020). Более того, первичные сообщения свидетельствуют, что такие реципиенты относятся к группе повышенного риска смерти, связанной с COVID-19 (Williamson et al., *Nature*. Aug 2020;584(7821):430-436). В частности, этим субъектам часто требуется прерывистая, длительная или даже пожизненная иммуносупрессивная терапия по медицинским показаниям (например, по поводу аутоиммунных заболеваний или трансплантации паренхиматозных органов), и они подвергаются существенно повышенному риску инфицирования и смерти при вирусной инфекции.

[52] Необходимо найти баланс между предотвращением отторжения и контролем инфекций при назначении иммуносупрессивных схем реципиентам трансплантатов. Например, реципиенты трансплантата почки (KTR) подвергаются повышенному риску более тяжелого течения COVID-19 из-за их более старшего возраста, сопутствующих заболеваний и/или поддерживающей иммуносупрессивной терапии. Некоторые авторы рекомендуют снизить дозу иммуносупрессивной терапии у KTR с тяжелым острым респираторным синдромом, вызванным коронавирусом 2 (SARS-CoV-2). Необходимо проведение анализа приписываемого эффекта иммуносупрессивной терапии при более

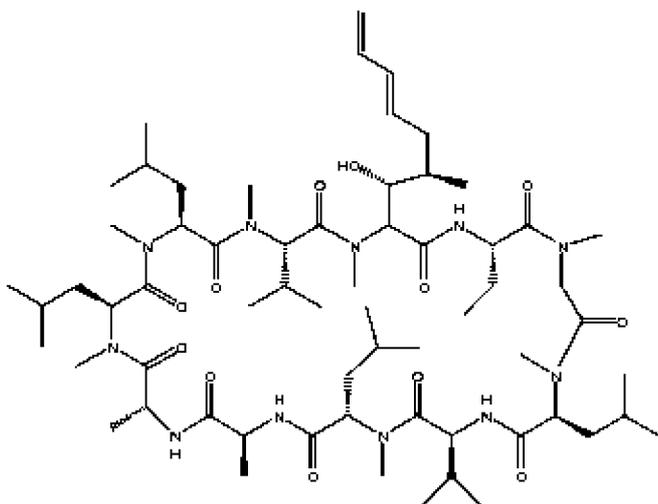
тяжелом течении COVID-19, а также наиболее оптимального лечения для KTR. В различных сообщениях были приведены данные о том, что иммуносупрессивная терапия не приводит к увеличению риска тяжелого заболевания COVID-19 или смертности (Li et al., *J Heart Lung Transplant*. May 2020;39(5):496-497; Zhang et al., *Eur Urol*. Jun 2020;77(6):742-747; Guillen et al., *Am J Transplant*. Jul 2020;20(7):1875-1878; Montagud-Marrahi et al., *Am J Transplant*. Oct 2020;20(10):2958-2959). Однако у пациентов с ослабленным иммунитетом наблюдалась повышенная смертность при COVID-19. Поскольку эффективность вакцин у KTR не определена, крайне необходима разработка способов лечения субъектов, особенно нуждающихся в иммуносупрессивной терапии. В целом, COVID-19 имеет трифазное течение: начинается с легких гриппоподобных симптомов, затем следует вторая фаза вирусной репликации и пневмонии, которая в небольшом проценте случаев сменяется третьей фазой угрожающего жизни заболевания, например, вследствие цитокинового шторма (Siddiqi et al., *J Heart Lung Transplant*. May 2020). Ожидается, что лечение противовирусными препаратами будет наиболее эффективным на самых ранних стадиях заболевания, в то время как иммунодепрессанты (например, стероиды, тоцилизумаб) могут рассматриваться в качестве терапевтического варианта на более поздних стадиях заболевания для уменьшения воспаления. В идеале иммуносупрессивная схема должна предотвращать отторжение, обладать противовирусными свойствами и уменьшать (избыточное) воспаление, но при этом обеспечивать эффективный противовирусный ответ для предотвращения тяжелого течения заболевания одновременно. В некоторых рекомендациях говорится о снижении дозы, но не полном прекращении иммуносупрессивной терапии, а некоторые авторы рекомендуют применять стероиды с CNI, основываясь на преимуществах, наблюдаемых *in vitro*.

[53] Современный стандарт иммуносупрессивной терапии в большинстве центров трансплантации включает ингибитор кальциневрина (CNI), такролимус (TAC) или циклоспорин А (CsA), антиметаболитный агент, такой как микофенолат (MPA/MPS), и, чаще всего, поддерживающие стероиды. Ингибитор mTOR, такой как эверолимус (EVL), может быть назначен в качестве альтернативы MPA или вместо CNI. Точное влияние иммуносупрессивной терапии на течение COVID-19 изучено недостаточно. На ранних стадиях заболевания (избыточная) иммуносупрессивная терапия может препятствовать надлежащему противовирусному ответу, тогда как на более поздних стадиях некоторая иммуносупрессия может защитить от патологической иммунной гиперактивации, что приведет к менее тяжелому течению заболевания. Следовательно, некоторые авторы рекомендуют уменьшить, но не полностью отказаться от иммуносупрессивной терапии у KTR, инфицированных SARS-CoV-2, в зависимости от риска отторжения и тяжести заболевания.

[54] Ингибиторы кальциневрина (CNI) являются основными иммунодепрессантами у KTR, а некоторые из них, как сообщалось, обладают противовирусной активностью в отношении РНК-вирусов. Сообщается, что CNI и ингибиторы mTOR, такие как EVL, в

дополнение к МРА, проявляют противовирусную активность против коронавирусов человека, таких как SARS-CoV и вируса, вызывающего ближневосточный респираторный синдром (MERS-) CoV. Было продемонстрировано, что циклоспорин А (CsA) оказывает противовирусное действие *in vitro* на широкий спектр РНК-содержащих вирусов, включая вирус гриппа (Ma et al., *Antiviral Res.* 2016;133:62-72), hepatitis C (Ishii et al., *J Virol.* 2006;80(9):4510-4520), ВИЧ (Braaten et al., *J Virol.* 1996;70(8):5170-5176), норовирус (Dang et al, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2017;61(11):1-17) и SARS-CoV (de Wilde et al., *J Gen Virol.* 2011;92:2542-2548; Pfefferle et al., *PLoS Pathog* 2011;7(10): 1-15). Не будучи связанными какой-либо теорией, авторы считают, что противовирусное действие CsA может включать кальциневрин-зависимые и циклофилин-зависимые механизмы. В случае SARS-CoV, вирусный белок Nsp1 взаимодействует с циклофилином А (CypA), усиливая высвобождение (NFAT)-управляемых цитокинов под влиянием ядерного фактора активированных Т-клеток кальциневрин-зависимым образом (Pfefferle et al., 2011). Однако все *in vitro* модели CsA и его влияние на вирусную репликацию показывают, что он может быть эффективным только в дозах, значительно превышающих те, которые считаются безопасными для человека.

[55] Воклоспорин (VCS; также известен как LX214 или ISA247) представляет собой новый ингибитор кальциневрина (CNI), который структурно похож на CsA, за исключением новой модификации функциональной группы на остатке аминокислоты-1 молекулы, которая усиливает его связывание с кальциневрином и обеспечивает лучшую метаболическую стабильность. Воклоспорин изучался при псориазе, трансплантации почек, а недавно был одобрен FDA для лечения активного волчаночного нефрита в комбинации с фоновой иммуносупрессивной терапией. Результаты наблюдений демонстрируют, что VCS является более мощным и менее токсичным на терапевтическом уровне, чем другие иммунодепрессанты этого класса. Более того, было показано, что VCS ингибирует репликацию норовируса CypA-зависимым образом и более эффективно, чем CsA. Это изменение модифицировало связывание воклоспорина с кальциневрином и увеличило аффинность связывания до пяти раз по сравнению с CsA как *in vitro* и *in vivo* (Kuglstatter et al., *Acta Cryst.* 2011; D67:119-23). Эта модификация также изменила метаболический профиль воклоспорина, сместив метаболизм от аминокислоты-1, которая является основным местом метаболизма для CsA. Измененный метаболический профиль привел к более быстрому выведению метаболитов, что обусловило более низкую экспозицию метаболитов по сравнению с CsA. Сочетание повышения активности и снижения экспозиции метаболитов воклоспорина по сравнению с CsA привело к улучшению соотношения PK/PD, применению более низких доз и потенциально улучшенному профилю безопасности по сравнению с CsA. Воклоспорин имеет структуру, продемонстрированную ниже, и описан в патенте США № 7 332 472, который полностью включен в данный документ посредством ссылки.



[56] Подобно CsA, воклоспорин также связывает CypA (Kuglstatter et al., *Acta Cryst.* 2011; D67:119-23). Таким образом, описанные в данном документе способы могут поддерживать пациентов, нуждающихся в иммуносупрессивной терапии, в здоровом состоянии, несмотря на их фоновые заболевания, и в то же время оказывать противовирусное действие.

[57] Предложенные варианты осуществления основаны на описанном в данном документе наблюдении, основанном на сравнении эффекта CNIs, такролимуса, циклоспорина А и воклоспорина (VCS), а также других иммунодепрессантов, обычно применяемых в КТР, на репликацию SARS-CoV-2 в клеточных анализах. Поскольку эффективность вакцин у людей с ослабленным иммунитетом, таких как КТР, сомнительна, а возможности эффективного (противовирусного) лечения ограничены, поиск альтернативных решений имеет решающее значение для защиты этих людей. Как показано в данном документе, CNI продемонстрировали более мощный ингибирующий эффект в отношении репликации SARS-CoV-2 (в культуре клеток), чем другие классы иммуносупрессивных агентов. Примечательно, что VCS проявлял противовирусную активность при 8-кратном снижении концентрации по сравнению с TAC. Концентрации VCS, которые снижали вирусную нагрузку SARS-CoV-2, могут быть соотнесены с допустимыми дозами для человека, которые достижимы в КТР. VCS снижал выход вирусного потомства в клетках человека Calu-3 в низких микромолярных концентрациях и осуществлял это более эффективно, чем циклоспорин А и такролимус. Описанные в данном документе наблюдения демонстрируют потенциальную пользу циклофилинзависимых CNI, в частности VCS. Результаты, описанные в данном документе, показывают, что VCS проявляет сильную ингибирующую активность в отношении репликации SARS-CoV-2, даже в низкой концентрации, и демонстрируют пользу VCS для лечения вирусных инфекций, таких как COVID-19, у субъекта, особенно у субъектов, нуждающихся в иммуносупрессивной терапии. Преимуществом воклоспорина является также то, что он обладает более высокой аффинностью к кальциневрину и меньшей нефротоксичностью. Воклоспорин также может проникать в такие органы, как легкие, в более высоких концентрациях, чем наблюдаемые в крови, и при этом более

высокие концентрации обнаруживаются в эритроцитах. Следовательно, более высокие концентрации в определенных органах или клетках могут привести к ингибированию вируса. Таким образом, полученные результаты подтверждают целесообразность применения VCS для лечения вирусных инфекций, в частности, у KTR, которые подвержены риску заражения или были инфицированы SARS-CoV-2.

[58] Кроме того, описанные в данном документе результаты демонстрируют неожиданные наблюдения. Фармацевтические вспомогательные вещества, применяемые при приготовлении иммуносупрессивных соединений, продемонстрировали противовирусный эффект в клеточных анализах. Неожиданно, полученные результаты не были обусловлены вирусоцидным действием поверхностно-активных веществ, которые могут повреждать вирусную оболочку. Порошки высокой степени чистоты различных иммуносупрессивных соединений для обхода помех, вызванных вспомогательными веществами в описанных противовирусных анализах, продемонстрировали, что вспомогательные вещества, улучшающие растворимость и биодоступность активного соединения в фармацевтических препаратах, также влияют на результаты клеточных анализов. Учитывая липофильную природу воклоспорина и на основании результатов, описанных в данном документе, действие VCS и других соединений оценивали с использованием стеклянной лабораторной посуды (что минимизирует связывание VCS с пластиковым материалом). Результаты продемонстрировали, что VCS снижал продукцию инфекционного потомства SARS-CoV-2 дозозависимым образом в инфицированных клетках Calu-3 и более эффективно, чем CsA и TAC, а также другие классы иммунодепрессантов, такие как EVL и MPA.

Способы лечения

[59] В настоящем изобретении предлагаются способы лечения или предотвращения вирусной инфекции у субъекта, включающие введение указанному субъекту воклоспорина. В настоящем изобретении также предлагаются применения воклоспорина для лечения или предотвращения вирусной инфекции у субъекта. В некоторых аспектах предложенные способы или применения включают использование терапевтически эффективного количества воклоспорина. В некоторых аспектах субъект нуждается в иммуносупрессивной терапии. В некоторых аспектах вирусная инфекция ослабевает за счет ингибирования циклофилина А (СурА) или пути, ассоциированного с СурА.

[60] В некоторых вариантах осуществления, в настоящем изобретении предлагается способ лечения или предотвращения вирусной инфекции у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества воклоспорина, при этом вирусная инфекция ослабевает за счет ингибирования циклофилина А (СурА) или пути, ассоциированного с СурА. В некоторых вариантах осуществления субъект нуждается в иммуносупрессивной терапии. В некоторых вариантах осуществления вирусная инфекция ослабевает за счет ингибирования циклофилина А (СурА). В некоторых вариантах осуществления вирусная инфекция ослабевает за счет ингибирования пути, ассоциированного с СурА.

[61] В некоторых аспектах воклоспорин (также известный как LX214 или ISA247), его терапевтически эффективное количество и/или композиция, включающая воклоспорин, применяется в предложенных композициях, способах и применениях. Применения включают применения воклоспорина или композиции, включающей его, в таких способах, как терапевтические способы и лечение, например, схема лечения, и применения воклоспорина или композиции, включающей его, в приготовлении лекарственного средства для осуществления таких терапевтических способов и лечения. Также предлагаются воклоспорин или композиция, включающая его, для применения в лечении или предотвращении вирусной инфекции, снижения вирусной репликации, облегчения симптомов, ассоциированных с вирусной инфекцией, или снижения тяжести заболевания или смертности. В некоторых аспектах такие применения включают выполнение способов или проведение лечения, как описано в данном документе, таких как любые терапевтические способы или схемы лечения. В некоторых из предложенных вариантов осуществления воклоспорин или содержащую его композицию вводят в виде монотерапии, например, без введения одного или большего количества дополнительных агентов. В некоторых из предложенных вариантов осуществления воклоспорин или содержащую его композицию вводят без введения ММФ и/или кортикостероида. В некоторых из предложенных вариантов осуществления воклоспорин или содержащую его композицию вводят без введения терапевтически эффективного количества ММФ и/или терапевтически эффективного количества кортикостероида.

[62] В некоторых вариантах осуществления указанный способ или применения предназначены для лечения вирусной инфекции или инфекции, вызванной вирусом. В некоторых вариантах осуществления указанный способ или применения предназначены для предотвращения вирусной инфекции или инфекции, вызванной вирусом. В некоторых вариантах осуществления указанный способ включает лечение вирусной инфекции. В некоторых вариантах осуществления указанный способ включает предотвращение вирусной инфекции.

[63] В некоторых вариантах осуществления вирусная инфекция вызывается вирусом, который является представителем семейства *Coronaviridae* (например, альфакоронавирус, бетакоронавирус, дельтакоронавирус или гаммакоронавирус), *Orthomyxoviridae* (например, вирус гриппа), *Flaviviridae* (например, флавивирус или гепацивирус), или *Caliciviridae* (например, норовирус).

[64] В некоторых вариантах осуществления вирусная инфекция вызывается вирусом, который является представителем семейства *Coronaviridae*. В некоторых вариантах осуществления вирус представляет собой альфакоронавирус (например, HCoV-229E или HCoV-NL63), бетакоронавирус (например, HCoV-OC43, HCoV-NKU1, MERS-CoV, SARS-CoV или SARS-CoV-2), дельтакоронавирус или гаммакоронавирус.

[65] В некоторых вариантах осуществления вирус представляет собой альфакоронавирус. В некоторых вариантах осуществления вирус представляет собой HCoV-229E или HCoV-NL63. В некоторых вариантах осуществления вирус представляет

собой HCoV-229E. В некоторых вариантах осуществления вирус представляет собой HCoV-NL63.

[66] В некоторых вариантах осуществления вирус представляет собой бетакоронавирус. В некоторых вариантах осуществления вирус представляет собой HCoV-OC43, HCoV-NKU1, MERS-CoV, SARS-CoV или SARS-CoV-2. В некоторых вариантах осуществления вирус представляет собой MERS-CoV, SARS-CoV или SARS-CoV-2. В некоторых вариантах осуществления вирус представляет собой HCoV-OC43. В некоторых вариантах осуществления вирус представляет собой HCoV-NKU1. В некоторых вариантах осуществления вирус представляет собой HMERS-CoV. В некоторых вариантах осуществления вирус представляет собой SARS-CoV. В некоторых вариантах осуществления вирус представляет собой SARS-CoV-2.

[67] В некоторых вариантах осуществления вирус представляет собой дельтакоронавирус. В некоторых вариантах осуществления вирус представляет собой гаммакоронавирус.

[68] В некоторых вариантах осуществления вирусная инфекция вызывается вирусом, который является представителем семейства Orthomyxoviridae (например, вирус гриппа).

[69] В некоторых вариантах осуществления вирусная инфекция вызывается вирусом, который является представителем семейства Flaviviridae. В некоторых вариантах осуществления вирус представляет собой флавивирус. В некоторых вариантах осуществления вирус представляет собой гепацивирус. В некоторых вариантах осуществления вирус представляет собой гепацивирус С.

[70] В некоторых вариантах осуществления вирусная инфекция вызывается вирусом, который является представителем семейства Caliciviridae. В некоторых вариантах осуществления вирус представляет собой норовирус.

Доза

[71] В некоторых вариантах осуществления способов и применений, описанных в данном документе, воклоспорин вводят четыре раза в день, три раза в день, два раза в день или один раз в день. В некоторых вариантах осуществления воклоспорин вводят четыре раза в день. В некоторых вариантах осуществления воклоспорин вводят три раза в день. В некоторых вариантах осуществления воклоспорин вводят два раза в день. В некоторых вариантах осуществления воклоспорин вводят один раз в день.

[72] В некоторых вариантах осуществления суточная доза воклоспорина составляет от около 1 мг до около 250 мг, от около 5 мг до около 250 мг, от около 10 мг до около 250 мг, от около 50 мг до около 250 мг, от около 100 мг до около 250 мг, от около 150 мг до около 250 мг, от около 200 мг до около 250 мг, от 1 мг до около 200 мг, от около 5 мг до около 200 мг, от около 10 мг до около 200 мг, от около 50 мг до около 200 мг, от около 100 мг до около 200 мг, от около 150 мг до около 200 мг, от около 1 мг до около 150 мг, от около 5 мг до около 150 мг, от около 10 мг до около 150 мг, от около 50 мг до около 150 мг, от около 100 мг до около 150 мг, около 1 мг от около 100 мг, от около 5 мг до около

100 мг, от около 10 мг до около 100 мг, от около 50 мг до около 100 мг, от около 1 мг до около 50 мг, от около 5 мг до около 50 мг или от около 10 мг до около до 50 мг. В некоторых вариантах осуществления суточная доза воклоспорина составляет около 1 мг, около 5 мг, около 10 мг, около 20 мг, около 30 мг, около 40 мг, около 50 мг, около 60 мг, около 70 мг, около 80 мг, около 90 мг, около 100 мг, около 110 мг, около 120 мг, около 130 мг, около 140 мг, около 150 мг, около 160 мг, около 170 мг, около 180 мг, около 190 мг, около 200 мг, около 210 мг, около 220 мг, около 230 мг, около 240 мг или около 250 мг. В некоторых вариантах осуществления суточная доза воклоспорина составляет по меньшей мере около 1 мг, по меньшей мере около 5 мг, по меньшей мере около 10 мг, по меньшей мере около 20 мг, по меньшей мере около 30 мг, по меньшей мере около 40 мг, по меньшей мере около 50 мг, по меньшей мере около 60 мг, по меньшей мере около 70 мг, по меньшей мере около 80 мг, по меньшей мере около 90 мг, по меньшей мере около 100 мг, по меньшей мере около 110 мг, по меньшей мере около 120 мг, по меньшей мере около 130 мг, по меньшей мере около 140 мг, по меньшей мере около 150 мг, по меньшей мере около 160 мг, по меньшей мере около 170 мг, по меньшей мере около 180 мг, по меньшей мере около 190 мг или по меньшей мере около 200 мг.

[73] В некоторых вариантах осуществления доза воклоспорина составляет от 0,1 мг/кг/день до 2 мг/кг/день, от 0,5 мг/кг/день до 2 мг/кг/день, от 1 мг/кг/день до 2 мг/кг/день, от 1,5 мг/кг/день до 2 мг/кг/день, от 0,1 мг/кг/день до 1,5 мг/кг/день, от около 0,5 мг/кг/день до около 1,5 мг/кг/день, от около 1 мг/кг/день до около 1,5 мг/кг/день, от около 0,1 мг/кг/день до около 1,0 мг/кг/день, от около 0,5 мг/кг/день до около 1,0 мг/кг/день или от около 0,1 мг/кг/день до около 0,5 мг/кг/день. В некоторых вариантах осуществления доза воклоспорина составляет около 0,1, около 0,2, около 0,3, около 0,4, около 0,5, около 0,6, около 0,7, около 0,8, около 0,9, около 1,0, около 1,1, около 1,2, около 1,3, около 1,4, около 1,5, около 1,6, около 1,7, около 1,8, около 1,9 или около 2,0 мг/кг/день. В некоторых вариантах осуществления суточная доза воклоспорина составляет по меньшей мере около 0,1, по меньшей мере около 0,2, по меньшей мере около 0,3, по меньшей мере около 0,4, по меньшей мере около 0,5, по меньшей мере около 0,6, по меньшей мере около 0,7, по меньшей мере около 0,8, по меньшей мере около 0,9, по меньшей мере около 1,0, по меньшей мере около 1,1, по меньшей мере около 1,2, по меньшей мере около 1,3, по меньшей мере около 1,4, по меньшей мере около 1,5, по меньшей мере около 1,6, по меньшей мере около 1,7, по меньшей мере около 1,8, по меньшей мере около 1,9 или по меньшей мере около 2,0 мг/кг/день.

[74] В некоторых вариантах осуществления подходящие дозы составляют около 7,9 мг. В некоторых из предложенных вариантов осуществления доза воклоспорина составляет около 7,9 мг 1 р/д, около 15,8 мг 1 р/д, около 23,7 мг 1 р/д, около 31,6 мг 1 р/д, около 39,5 мг 1 р/д, около 47,4 мг 1 р/д, около 55,3 мг 1 р/д, около 63,2 мг 1 р/д, около 71,1 мг 1 р/д, около 79,0 мг 1 р/д, около 86,9 мг 1 р/д, около 94,8 мг 1 р/д, около 102,7 мг 1 р/д или около 110,6 мг 1 р/д. В некоторых вариантах осуществления доза воклоспорина составляет около 7,9 мг 2 р/д, около 15,8 мг 2 р/д, около 23,7 мг 2 р/д, около 31,6 мг 2 р/д,

около 39,5 мг 2 р/д, около 47,4 мг 2 р/д или около 55,3 мг 2 р/д.

[75] В некоторых вариантах осуществления минимальный уровень в крови составляет от около 25 до около 60 нг/мл. В некоторых вариантах осуществления минимальный уровень в крови составляет около 25, около 30, около 35, около 40, около 45, около 50, около 55 или около 60 нг/мл.

[76] В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективное количество представляет собой количество, которое эквивалентно, может быть экстраполировано, может достигать или может достигать C_{\max} концентрации от около 0,05 мкМ до около 10 мкМ, от около 0,1 мкМ до около 5 мкМ, от около 0,2 мкМ до около 2,5 мкМ, от около 0,3 мкМ до около 1,0 мкМ, от около 0,4 мкМ до около 0,9 мкМ, от около 0,5 мкМ до около 0,8 мкМ, от около 0,1 мкМ до около 0,5 мкМ или от около 0,2 мкМ до около 0,4 мкМ. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективное количество представляет собой количество, которое эквивалентно, может быть экстраполировано, может достигать или может достигать C_{\max} концентрации около 0,05, около 0,1, около 0,15, около 0,2, около 0,25, около 0,3, около 0,35, около 0,4, около 0,45, около 0,5, около 0,55, около 0,6, около 0,7, около 0,8, около 0,9, около 1,0, около 1,5, около 2,0, около 2,5, около 3,0, около 3,5, около 4,0, около 4,5, около 5,0, около 6,0, около 7,0, около 8,0, около 9,0 или около 10,0 мкМ или меньше. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективное количество представляет собой количество, которое эквивалентно, может быть экстраполировано, может достигать или может достигать C_{\max} концентрации около 0,2 мкМ. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективное количество представляет собой количество, которое эквивалентно, может быть экстраполировано, может достигать или может достигать C_{\max} концентрации около 0,3 мкМ. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективное количество представляет собой количество, которое эквивалентно, может быть экстраполировано, может достигать или может достигать C_{\max} концентрации около 0,4 мкМ. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективное количество представляет собой количество, которое эквивалентно, может быть экстраполировано, может достигать или может достигать C_{\max} концентрации около 0,5 мкМ.

Коррекция дозы

[77] В некоторых вариантах осуществления описанных в данном документе способов и применений, способ или лечение дополнительно включает или предусматривает мониторинг функции почек субъекта. В некоторых из предложенных вариантов осуществления способа, описанного в данном документе, указанный способ дополнительно включает мониторинг функции почек субъекта. Одним из важнейших параметров, используемых для оценки целесообразности снижения дозы, является расчетная скорость клубочковой фильтрации (рСКФ) по формуле СКД-EP1 или другому соответствующему методу. Снижение рСКФ - это негативный побочный эффект, который может возникнуть во время лечения. Если снижение слишком сильное, следует изменить дозу.

[78] В некоторых вариантах осуществления указанный мониторинг функции почек субъекта включает:

(а) оценку расчетной скорости клубочковой фильтрации (pСКФ) у субъекта по меньшей мере в первый момент времени и во второй момент времени в разные дни; а также

(b) (i) если pСКФ у субъекта снижается более чем на целевой % до уровня ниже заданного значения между первым и вторым моментами времени, то следует снизить суточную дозу или прекратить введение воклоспорина субъекту;

(ii) если pСКФ у субъекта снижается менее чем на целевой % между первым и вторым моментами времени, следует продолжать введение субъекту той же суточной дозы воклоспорина.

[79] В некоторых вариантах осуществления первый момент времени находится перед началом лечения, в начале лечения или во время лечения. В некоторых вариантах осуществления первый момент времени находится в первый день лечения перед любым введением воклоспорина.

[80] В некоторых вариантах осуществления заданное значение составляет от около 50 до около 90 мл/мин/1,73 м². В некоторых вариантах осуществления заданное значение составляет около 50, около 55, около 60, около 65, около 70, около 75, около 80, около 85 или около 90 мл/мин/1,73 м².

[81] В некоторых вариантах осуществления целевой % составляет от около 20% до около 45%. В некоторых вариантах осуществления целевой % составляет около 20%, около 25%, около 30%, около 35%, около 40% или около 45%.

Пути введения

[82] В некоторых вариантах осуществления способов и применений, описанных в данном документе, воклоспорин можно вводить в любой подходящей форме и любым подходящим путем, который обеспечит достаточный уровень воклоспорина для лечения или предотвращения вирусной инфекции, например, путем энтерального введения (например, пероральное введение, подъязычное введение или ректальное введение) или парентерального введения (например, внутривенная инъекция, внутримышечная инъекция, подкожная инъекция, внутривенная инфузия или ингаляция/инсуффляция).

[83] В некоторых вариантах осуществления воклоспорин вводят энтерально. Типовые способы энтерального введения включают, помимо прочего, пероральное введение, подъязычное введение и ректальное введение (например, через прямую кишку). В некоторых вариантах осуществления энтеральное введение включает пероральное введение. В некоторых вариантах осуществления энтеральное введение включает подъязычное введение. В некоторых вариантах осуществления энтеральное введение включает ректальное введение.

[84] В некоторых вариантах осуществления воклоспорин вводят парентерально. Типовые пути парентерального введения включают, помимо прочего, внутривенную инъекцию, внутримышечную инъекцию, подкожную инъекцию, внутривенную инфузию и

ингаляцию/инсуффляцию. В некоторых вариантах осуществления парентеральное введение включает внутривенную инъекцию. В некоторых вариантах осуществления парентеральное введение включает внутримышечную инъекцию. В некоторых вариантах осуществления парентеральное введение включает подкожную инъекцию. В некоторых вариантах осуществления парентеральное введение включает внутривенную инфузию. В некоторых вариантах осуществления парентеральное введение включает ингаляцию/инсуффляцию.

[85] В некоторых вариантах осуществления воклоспорин вводят путем ингаляции или инсуффляции. Типовые типы препаратов для ингаляции и/или инсуффляции включают, помимо прочего, спреи, аэрозоли, аэрозоли, капсулы, порошки или картриджи для использования в ингаляторе или инсуффляторе и растворы/суспензии для распыления. В некоторых вариантах осуществления воклоспорин вводят в форме аэрозоля, спрея, пара или порошка. В некоторых вариантах осуществления воклоспорин вводят в форме аэрозоля. Примеры различных типов устройств для введения путем ингаляции или инсуффляции включают, помимо прочего, небулайзер, дозирующий ингалятор (MDI) и ингалятор для сухого порошка.

Комбинации

[86] В некоторых вариантах осуществления способов и применений, описанных в данном документе, способ или лечение также включает введение терапевтически эффективного количества мофетила микофенолата (MMF) и/или кортикостероида. В некоторых вариантах осуществления способа, описанного в данном документе, указанный способ также включает введение терапевтически эффективного количества MMF и/или кортикостероида. В некоторых вариантах осуществления указанный способ включает введение терапевтически эффективного количества MMF. В некоторых вариантах осуществления указанный способ включает введение терапевтически эффективного количества кортикостероида.

[87] В некоторых вариантах осуществления указанный способ включает введение воклоспорина без терапевтически эффективного количества MMF и/или терапевтически эффективного количества кортикостероида.

[88] В некоторых вариантах осуществления способов и применений, описанных в данном документе, способ или лечение также включает введение терапевтически эффективного количества дополнительного противовирусного агента. В некоторых вариантах осуществления указанный способ также включает введение терапевтически эффективного количества дополнительного противовирусного агента. В некоторых вариантах осуществления дополнительным противовирусным агентом является ремдесивир, лопинавир/ритонавир, IFN- α , лопинавир, ритонавир, пенцикловир, галидесивир, дисульфирам, дарунавир, кобицистат, ASC09F, дисульфирам, нафамостат, гриффитсин, алиспоривир, хлорохин, гидроксихлорохин, нитазоксанид, балоксавир марбоксил, осельтамивир, занамивир, перамивир, амантадин, римантадин, фавипиравир, ланинамивир, рибавирин, умифеновир или любая их комбинация. В некоторых вариантах

осуществления противовирусный агент представляет собой хлорохин. В некоторых вариантах осуществления противовирусный агент представляет собой гидроксихлорохин. В некоторых вариантах осуществления противовирусный агент представляет собой ремдесивир.

Композиции

[89] В некоторых вариантах осуществления способов и применений, описанных в данном документе, способ или лечение включает введение композиции, такой как фармацевтическая композиция или терапевтическая композиция, содержащей воклоспорин. В некоторых вариантах осуществления способы, описанные в данном документе, включают введение композиции, содержащей воклоспорин. В некоторых вариантах осуществления указанная композиция содержит изомерную смесь воклоспорина и его Z-изоформы. В некоторых вариантах осуществления изомерная смесь включает по меньшей мере около 99%, около 98%, около 97%, около 96%, около 95%, около 94%, около 93%, около 92%, около 91%, около 90%, около 80%, около 70%, около 60%, около 50%, около 40%, около 30%, около 20% или около 10% воклоспорина по массе. В некоторых вариантах осуществления изомерная смесь включает по меньшей мере около 95% воклоспорина по массе.

[90] В некоторых вариантах осуществления способов и применений, описанных в данном документе, композиция, содержащая воклоспорин, представляет собой или содержит фармацевтический состав, содержащий воклоспорин. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция, содержащая воклоспорин, содержит один или большее количество фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ, буферов, носителей и/или несущих сред.

[91] В некоторых вариантах осуществления указанная композиция содержит обычные фармацевтические носители и вспомогательные вещества, подходящие для предполагаемого типа введения.

[92] В некоторых вариантах осуществления композиции, которые содержат воклоспорин, могут быть приготовлены в фармацевтически приемлемом буфере, таком как тот, который содержит фармацевтически приемлемый носитель или несущую среду. Как правило, фармацевтически приемлемые носители или несущие среды, такие как присутствующие в фармацевтически приемлемом буфере, могут быть любыми, известными в данной области техники. В публикации Remington's Pharmaceutical Sciences, E. W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 19th Edition (1995), описаны композиции и составы, подходящие для фармацевтической доставки одного или большего количества терапевтических соединений. Фармацевтически приемлемые композиции, как правило, готовят с учетом разрешений регулирующего органа или другого агентства и в соответствии с общепризнанной фармакопеей для применения у животных и людей.

[93] Фармацевтические композиции могут включать носители, такие как разбавитель, адьювант, вспомогательное вещество или несущая среда, с которыми вводят соединение. Примеры подходящих фармацевтических носителей описаны в "Remington's

Pharmaceutical Sciences" авторства E. W. Martin. Такие композиции будут содержать терапевтически эффективное количество соединения, как правило, в очищенной форме вместе с подходящим количеством носителя, чтобы обеспечить форму для надлежащего введения пациенту. Такие фармацевтические носители могут представлять собой стерильные жидкости, такие как вода и масла, в том числе нефтяного, животного, растительного или синтетического происхождения. Вода является типовым носителем при внутривенном введении фармацевтической композиции. В качестве жидких носителей, в частности, для растворов для инъекций также можно применять солевые растворы и водные растворы декстрозы и глицерина. Композиция, если желательна, также может содержать незначительные количества смачивающих или эмульгирующих агентов или буферных агентов для поддержания pH. Как правило, композиции, содержащие соединения, составляют в фармацевтические композиции с помощью методик и процедур, хорошо известных в данной области техники (см., например, Ansel Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms, Fourth Edition, 1985, 126). Как правило, способ приготовления зависит от пути введения.

[94] В некоторых вариантах осуществления фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, буферы, носители и/или несущие среды включают одно или большее количество из следующих веществ: спирт, D- α -токоферол (витамин E), полиэтиленгликоль сукцинат (TPGS), полисорбат 20 (Tween 20), полисорбат 40 (Tween 40), триглицериды со средней длиной цепи, желатин, сорбит, глицерин, оксид железа желтый, оксид железа красный, диоксид титана и вода. Различные составы смесей воклоспорина также описаны в патентах США №№ 7 060 672; 7 429 562 и 7 829 533.

Популяция пациентов

[95] В некоторых вариантах осуществления субъект, подлежащий лечению в соответствии со способами и применениями, описанными в данном документе, включает субъектов, подверженных риску развития вирусной инфекции или заразившихся вирусной инфекцией. В некоторых вариантах осуществления субъект, подлежащий лечению в соответствии со способами и применениями, описанными в данном документе, включает субъектов, нуждающихся в иммуносупрессивной терапии. В некоторых аспектах субъект нуждается в иммуносупрессивной терапии и подвергается риску развития вирусной инфекции или заразился вирусной инфекцией. В некоторых вариантах осуществления субъект, подлежащий лечению в соответствии со способами и применениями, описанными в данном документе, включает субъектов, нуждающихся в иммуносупрессивной терапии, например, из-за риска отторжения трансплантата. В некоторых аспектах субъект является кандидатом на трансплантацию, такую как трансплантация органа, трансплантация ткани или трансплантация клеток, и при этом субъект нуждается в иммуносупрессивной терапии

[96] В некоторых вариантах осуществления субъект, вовлеченный в описанные в данном документе способы, имеет аутоиммунное заболевание или патологическое состояние, ассоциированное с отторжением трансплантата. В некоторых из предложенных

вариантов осуществления субъект является реципиентом трансплантата почки (КТР).

[97] В некоторых вариантах осуществления субъект имеет патологическое состояние, ассоциированное с отторжением трансплантата. В некоторых вариантах осуществления указанное патологическое состояние ассоциировано с отторжением трансплантата сердца, легких, печени, почек, поджелудочной железы, кожи, кишечника или роговицы. В некоторых вариантах осуществления указанное патологическое состояние ассоциировано с отторжением трансплантата сердца. В некоторых вариантах осуществления указанное патологическое состояние ассоциировано с отторжением трансплантата легкого. В некоторых вариантах осуществления указанное патологическое состояние ассоциировано с отторжением трансплантата печени. В некоторых вариантах осуществления указанное патологическое состояние ассоциировано с отторжением трансплантата почки. В некоторых вариантах осуществления указанное патологическое состояние ассоциировано с отторжением трансплантата поджелудочной железы. В некоторых вариантах осуществления указанное патологическое состояние ассоциировано с отторжением трансплантата кожи. В некоторых вариантах осуществления указанное патологическое состояние ассоциировано с отторжением трансплантата кишечника. В некоторых вариантах осуществления указанное патологическое состояние ассоциировано с отторжением трансплантата роговицы.

[98] В некоторых вариантах осуществления субъект имеет аутоиммунное заболевание. Примеры аутоиммунных заболеваний включают, помимо прочего, аутоиммунные гематологические заболевания (включая, например, гемолитическую анемию, апластическую анемию, чисто эритроцитаную анемию и идиопатическую тромбоцитопению), системную красную волчанку, волчаночный нефрит, полихондрит, склеродому, гранулематоз Вегенера, дерматомиозит, хронический активный гепатит, миастению гравис, псориаз, синдром Стивена-Джонсона, идиопатическую спру, (аутоиммунные) воспалительные заболевания кишечника (включая, например, язвенный колит и болезнь Крона), эндокринную офтальмопатию, болезнь Грейвса, саркоидоз, рассеянный склероз, первичный билиарный цирроз, ювенильный диабет (сахарный диабет I типа), увеит (передний и задний), сухой кератоконъюнктивит и весенний кератоконъюнктивит, интерстициальный фиброз легких, псориатический артрит, гломерулонефрит (с нефротическим синдромом или без него, например, включая идиопатический нефротический синдром или нефропатию с минимальными изменениями) и ювенильный дерматомиозит.

Определения

[99] В контексте данного документа и в прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа включают отсылку на множественное число, если из контекста явно не следует иное.

[100] В контексте данного документа и если не указано иное, термины "около" и "приблизительно", когда они применяются в связи с дозами или количествами, подразумевают дозу или количество в пределах 10%, в пределах 5%, в пределах 4%, в

пределах 3%, в пределах 2%, в пределах 1% или в пределах 0,5% от указанной дозы или количества.

[101] В контексте данного документа термин «терапевтически эффективное количество» означает количество, которое приводит к желаемому фармакологическому и/или физиологическому эффекту при данном патологическом состоянии. Эффект может быть профилактическим с точки зрения полного или частичного предотвращения патологического состояния или его симптомов и/или может быть терапевтическим с точки зрения частичного или полного излечения патологического состояния и/или нежелательного явления, связанного с этим патологическим состоянием.

[102] В контексте данного документа термины «лечить», «лечение» и «воздействие» означают подход, позволяющий получить полезные или желаемые результаты, включая клинические результаты. Полезные или желаемые результаты включают, помимо прочего, один или большее количество из следующих эффектов: уменьшение одного или большее количество симптомов, вызванных заболеванием или нарушением, уменьшение степени заболевания или нарушения, стабилизация заболевания или нарушения (*например*, предотвращение или задержка ухудшения заболевания или нарушения), отсрочку возникновения или рецидива заболевания или расстройства, отсрочку или замедление прогрессирования заболевания или нарушения, улучшение состояния при заболевании или нарушении, обеспечение ремиссии (частичной или полной) заболевания или нарушения, снижение дозы одного или большего количества других лекарственных средств, необходимых для лечения заболевания или нарушения, усиление эффекта другого лекарственного средства, применяемого для лечения заболевания или нарушения, отсрочку прогрессирования заболевания или нарушения, повышение качества жизни и/или продление выживания пациента. Также под «лечением» понимается уменьшение патологических последствий заболевания или нарушения. Способы по настоящему изобретению предусматривают любые один или большее количество из этих аспектов лечения.

[103] Термин «субъект» относится к животному, включающему, помимо прочего, примата (*например*, человека), обезьяну, корову, свинью, овцу, козу, лошадь, собаку, кошку, кролика, крысу или мышь. Термины «субъект» и «пациент» применяют взаимозаменяемо в данном документе при упоминании, например, субъекта-млекопитающего, такого как человек.

Типовые примеры вариантов осуществления изобретения

[104] Среди предложенных вариантов осуществления:

1. Способ лечения или предотвращения вирусной инфекции у субъекта, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества воклоспорина.
2. Способ по варианту осуществления 2, отличающийся тем, что указанный субъект нуждается в иммуносупрессивной терапии.
3. Способ по варианту осуществления 1 или 2, отличающийся тем, что вирусная инфекция ослабевает за счет ингибирования циклофилина А (СурА) или пути,

ассоциированного с СурА.

4. Способ лечения или предотвращения вирусной инфекции у субъекта, нуждающегося в иммуносупрессивной терапии, включающий введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества воклоспорина, при этом вирусная инфекция ослабевает за счет ингибирования циклофилина А (СурА) или пути, ассоциированного с СурА.

5. Композиция, содержащая воклоспорин, для применения при лечении или предотвращении вирусной инфекции у субъекта, при этом указанная композиция содержит терапевтически эффективное количество воклоспорина и вводится указанному субъекту.

6. Композиция для применения по варианту осуществления 5, отличающаяся тем, что субъект нуждается в иммуносупрессивной терапии.

7. Композиция для применения по варианту осуществления 5 или 6, отличающаяся тем, что вирусная инфекция ослабевает за счет ингибирования циклофилина А (СурА) или пути, ассоциированного с СурА.

8. Композиция, содержащая воклоспорин, для применения при лечении или предотвращении вирусной инфекции у субъекта, нуждающегося в иммуносупрессивной терапии, при этом указанная композиция содержит терапевтически эффективное количество воклоспорина и вводится субъекту; и при этом вирусная инфекция ослабевает за счет ингибирования циклофилина А (СурА) или пути, ассоциированного с СурА.

9. Применение воклоспорина для лечения или предотвращения вирусной инфекции у субъекта, при этом субъекту вводят терапевтически эффективное количество воклоспорина.

10. Применение воклоспорина в изготовлении лекарственного средства для лечения или предотвращения вирусной инфекции у субъекта, при этом указанное лекарственное средство содержит терапевтически эффективное количество воклоспорина и вводится субъекту.

11. Применение по варианту осуществления 9 или 10, отличающееся тем, что указанный субъект нуждается в иммуносупрессивной терапии.

12. Применение по любому из вариантов осуществления 9-11, отличающееся тем, что вирусная инфекция ослабевает за счет ингибирования циклофилина А (СурА) или пути, ассоциированного с СурА.

13. Применение воклоспорина для лечения или предотвращения вирусной инфекции у субъекта, нуждающегося в иммуносупрессивной терапии, при этом указанному субъекту вводят терапевтически эффективное количество воклоспорина; и при этом вирусная инфекция ослабевает за счет ингибирования циклофилина А (СурА) или пути, ассоциированного с СурА.

14. Применение воклоспорина в изготовлении лекарственного средства для лечения или предотвращения вирусной инфекции у субъекта, нуждающегося в иммуносупрессивной терапии, при этом указанное лекарственное средство содержит

терапевтически эффективное количество воклоспорина и вводится субъекту; и при этом вирусная инфекция ослабевает за счет ингибирования циклофилина А (СурА) или пути, ассоциированного с СурА.

15. Способ, композиция для применения или применение по любому из вариантов осуществления 1-14, отличающийся тем, что вирусная инфекция вызвана вирусом, который является представителем семейства Coronaviridae.

16. Способ, композиция для применения или применение по варианту осуществления 15, отличающийся тем, что вирус представляет собой альфакоронавирус, бетакоронавирус, дельтакоронавирус или гаммакоронавирус.

17. Способ, композиция для применения или применение по варианту осуществления 15 или 16, отличающийся тем, что вирус представляет собой коронавирус человека OC43 (HCoV-OC43), коронавирус человека HKU1 (HCoV-HKU1), коронавирус человека 229E (HCoV-229E), коронавирус человека NL63 (HCoV-NL63), коронавирус, связанный с ближневосточным респираторным синдромом (MERS-CoV), коронавирус тяжелого острого респираторного синдрома (SARS-CoV) или коронавирус 2 тяжелого острого респираторного синдрома (SARS-CoV-2).

18. Способ, композиция для применения или применение по любому из вариантов осуществления 15-17, отличающийся тем, что вирус представляет собой MERS-CoV, SARS-CoV или SARS-CoV-2.

19. Способ, композиция для применения или применение по любому из вариантов осуществления 15-18, отличающийся тем, что вирус представляет собой SARS-CoV-2.

20. Способ, композиция для применения или применение по любому из вариантов осуществления 1-19, отличающийся тем, что терапевтически эффективное количество составляет от около 0,1 мг/кг/день до около 2 мг/кг/день.

21. Способ, композиция для применения или применение по любому из вариантов осуществления 1-20, отличающийся тем, что терапевтически эффективное количество составляет около 7,9 мг 2 р/д, около 15,8 мг 2 р/д, около 23,7 мг 2 р/д, около 31,6 мг 2 р/д, около 39,5 мг 2 р/д, около 47,4 мг 2 р/д или около 55,3 мг 2 р/д.

22. Способ, композиция для применения или применение по любому из вариантов осуществления 1-20, отличающийся тем, что терапевтически эффективное количество составляет около 7,9 мг 1 р/д, около 15,8 мг 1 р/д, около 23,7 мг 1 р/д, около 31,6 мг 1 р/д, около 39,5 мг 1 р/д, около 47,4 мг 1 р/д, около 55,3 мг 1 р/д, около 63,2 мг 1 р/д, около 71,1 мг 1 р/д, около 79,0 мг 1 р/д, около 86,9 мг 1 р/д, около 94,8 мг 1 р/д, около 102,7 мг 1 р/д или около 110,6 мг 1 р/д.

23. Способ, композиция для применения или применение по любому из вариантов осуществления 1-20, отличающийся тем, что терапевтически эффективное количество эквивалентно или может достигать концентрации от около 0,05 мкМ до около 10 мкМ, от около 0,1 мкМ до около 5 мкМ, от около 0,2 мкМ до около 2,5 мкМ, от около 0,3 мкМ до около 1,0 мкМ, от около 0,4 мкМ до около 0,9 мкМ, от около 0,5 мкМ до около 0,8 мкМ, от около 0,1 мкМ до около 0,5 мкМ, или от около 0,2 мкМ до около 0,4 мкМ, или около

0,05, около 0,1, около 0,15, около 0,2, около 0,25, около 0,3, около 0,35, около 0,4, около 0,45, около 0,5, около 0,55, около 0,6, около 0,7, около 0,8, около 0,9, около 1,0, около 1,5, около 2,0, около 2,5, около 3,0, около 3,5, около 4,0, около 4,5, около 5,0, около 6,0, около 7,0, около 8,0, около 9,0 или около 10,0 мкМ или меньше.

24. Способ, композиция для применения или применение по любому из вариантов осуществления 1-23, отличающийся тем, что осуществляется мониторинг функции почек субъекта.

25. Способ, композиция для применения или применение по варианту осуществления 24, отличающийся тем, что мониторинг функции почек субъекта включает:

(а) оценку расчетной скорости клубочковой фильтрации (pСКФ) у субъекта по меньшей мере в первый момент времени и во второй момент времени в разные дни; а также

(b) (i) если pСКФ у субъекта снижается более чем на целевой % до уровня ниже заданного значения между первым и вторым моментами времени, то следует снизить суточную дозу или прекратить введение воклоспорина субъекту;

(ii) если pСКФ у субъекта снижается менее чем на целевой % между первым и вторым моментами времени, следует продолжать введение субъекту той же суточной дозы воклоспорина.

26. Способ, композиция для применения или применение по варианту осуществления 25, отличающийся тем, что заданное значение составляет от около 50 до около 90 мл/мин/1,73 м².

27. Способ, композиция для применения или применение по варианту осуществления 25 или 26, отличающийся тем, что заданное значение составляет около 60 мл/мин/1,73 м².

28. Способ, композиция для применения или применение по любому из вариантов осуществления 25-27, отличающийся тем, что целевой % составляет от около 20% до около 45%.

29. Способ, композиция для применения или применение по любому из вариантов осуществления 25-28, отличающийся тем, что целевой % составляет около 20%.

30. Способ, композиция для применения или применение по любому из вариантов осуществления 1-29, отличающийся тем, что субъект имеет аутоиммунное заболевание или патологическое состояние, ассоциированное с отторжением трансплантата.

31. Способ, композиция для применения или применение по любому из вариантов осуществления 1-30, отличающийся тем, что субъект имеет патологическое состояние, ассоциированное с отторжением трансплантата.

32. Способ, композиция для применения или применение по варианту осуществления 30 или 31, отличающийся тем, что указанное патологическое состояние ассоциировано с отторжением трансплантата сердца, легких, печени, почек, поджелудочной железы, кожи, кишечника или роговицы.

33. Способ, композиция для применения или применение по любому из вариантов осуществления 30-32, отличающийся тем, что патологическое состояние ассоциировано с отторжением трансплантата почки.

34. Способ, композиция для применения или применение по варианту осуществления 30, отличающийся тем, что субъект имеет аутоиммунное заболевание.

35. Способ, композиция для применения или применение по любому из вариантов осуществления 1-34, отличающийся тем, что терапевтически эффективное количество воклоспорина вводят без введения терапевтически эффективного количества мофетила микофенолата (MMF) и/или кортикостероида.

36. Способ, композиция для применения или применение по любому из вариантов осуществления 1-34, дополнительно включающий введение терапевтически эффективного количества мофетила микофенолата (MMF) и/или терапевтически эффективного количества кортикостероида.

37. Способ, композиция для применения или применение по любому из вариантов осуществления 1-36, отличающийся тем, что воклоспорин вводят путем энтерального введения, перорального введения, подъязычного введения или ректального введения, парентерального введения, внутривенной инъекции, внутримышечной инъекции, подкожной инъекции, внутривенной инфузии или ингаляции/инсуффляции.

38. Способ, композиция для применения или применение по варианту осуществления 37, отличающийся тем, что воклоспорин вводят путем энтерального введения, перорального введения, подъязычного введения или ректального введения.

39. Способ, композиция для применения или применение по варианту осуществления 37 или 38, отличающийся тем, что воклоспорин вводят перорально.

40. Способ, композиция для применения или применение по любому из вариантов осуществления 37, отличающийся тем, что воклоспорин вводят путем парентерального введения, внутривенной инъекции, внутримышечной инъекции, подкожной инъекции, внутривенной инфузии или ингаляции/инсуффляции.

41. Способ, композиция для применения или применение по варианту осуществления 37 или 40, отличающийся тем, что воклоспорин вводят путем ингаляции/инсуффляции.

42. Способ, композиция для применения или применение по варианту осуществления 41, отличающийся тем, что воклоспорин вводят в форме аэрозоля.

43. Способ, композиция для применения или применение по любому из вариантов осуществления 1-42, отличающийся тем, что воклоспорин вводят в фармацевтической композиции.

44. Способ, композиция для применения или применение по варианту осуществления 43, отличающийся тем, что фармацевтическая композиция включает одно или большее количество фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ.

45. Способ, композиция для применения или применение по варианту осуществления 44, отличающийся тем, что указанные фармацевтически приемлемые

вспомогательные вещества независимо выбирают из одного или большего количества следующих веществ: спирт, D- α -токоферол (витамин E), полиэтиленгликоль сукцинат (TPGS), полисорбат 20 (Tween 20), полисорбат 40 (Tween 40), триглицериды со средней длиной цепи, желатин, сорбит, глицерин, оксид железа желтый, оксид железа красный, диоксид титана и вода.

46. Способ, композиция для применения или применение по любому из вариантов осуществления 1-45, отличающийся тем, что у субъекта после введения воклоспорина снижается вирусная нагрузка.

47. Способ, композиция для применения или применение по любому из вариантов осуществления 1-46, отличающийся тем, что после введения воклоспорина продлевается выживание у субъекта.

Примеры

[105] Следующие примеры являются исключительно иллюстративными и не предназначены для ограничения объема изобретения.

Пример 1

[106] С целью исследования соединений-кандидатов на предмет ингибирования цитопатического эффекта (CPE) SARS-CoV-2, клетки Vero E6 (эпителиальные клетки почек африканской зеленой мартышки) предварительно инкубировали с воклоспорином, циклоспорином А (CsA) или такролимусом перед заражением SARS-CoV-2, а затем оценивали их на жизнеспособность.

Способ

[107] Клетки Vero E6 выращивали в 96-луночных планшетах и предварительно инкубировали в течение 60 минут со средой, носителем и либо воклоспорином (0,8-100 мкМ), CsA (0,8-100 мкМ), либо такролимусом (0,8-100 мкМ). Затем клетки оставляли неинфицированными или инфицированными SARS-CoV-2 при множественности заражения (MOI) 0,015 в присутствии соответствующих соединений в указанной концентрации в течение 60 минут. Затем вирус удаляли из среды, клетки промывали PBS и далее инкубировали со свежей средой с соответствующими соединениями до тех пор, пока необработанные инфицированные контрольные клетки не демонстрировали полный CPE (3 дня). В конце инкубации клетки подвергали анализу жизнеспособности MTS, а затем фиксировали перед анализом поглощения в планшет-ридере (Фиг. 1А). Жизнеспособность клеток оценивали с помощью анализа MTS для определения как цитотоксичности соединений (неинфицированные клетки), так и цитотоксичности вирусов.

Результаты

[108] Такролимус не защищал инфицированные клетки от вызванных вирусом цитопатических эффектов, это было очевидно при применении доз до 25 мкМ, после чего наблюдалась цитотоксичность, связанная с соединением. В альтернативном варианте защитное действие CsA проявлялось в диапазоне 1,6-12 мкМ, после чего соединение становилось цитотоксическим. Обработка инфицированных клеток 0,8 мкМ воклоспорина

обеспечивала защиту от вирусов на том же уровне жизнеспособности клеток, что и в ложно инфицированном контроле.

[109] Как продемонстрировано на **Фиг. 1В**, воклоспорин не проявлял токсичности по отношению к неинфицированным клеткам при концентрациях ниже 2 мкМ, а воклоспорин партии 4 не проявлял токсичности по отношению к неинфицированным клеткам при концентрациях вплоть до 10 мкМ. С другой стороны, все протестированные партии воклоспорина способствовали ингибированию CPE SARS-CoV-2 в концентрациях от 0,01 мкМ до 1 мкМ дозозависимым образом, о чем свидетельствует увеличение жизнеспособности инфицированных клеток. Для всех партий воклоспорина обработка 0,8 мкМ была эффективной относительно сохранения жизнеспособности клеток до уровней, наблюдаемых для неинфицированных клеток.

[110] Как продемонстрировано на **Фиг. 1С**, воклоспорин был способен ингибировать SARS-CoV-2 при гораздо более низких концентрациях ($EC_{50} \sim 0.4$ мкМ) по сравнению с такролимусом ($EC_{50} \sim 25$ мкМ). Кроме того, обработка такролимусом приводила к связанной с соединением цитотоксичности при концентрациях выше 25 мкМ (данные не показаны). Эти результаты продемонстрировали, что воклоспорин проявлял ингибирование SARS-CoV-2 *in vitro* в диапазонах концентраций, которые не влияли на жизнеспособность тестируемых клеток.

Пример 2

[111] С целью изучения влияния воклоспорина на SARS-CoV-2 *in vitro*, клетки Vero E6 или клетки Calu (эпителиальные клетки бронхиальных дыхательных путей человека) предварительно инкубировали с воклоспорином перед заражением SARS-CoV-2, а затем собирали для определения вирусной нагрузки с помощью анализа бляшек.

Способы

[112] Клетки Vero E6 и Calu выращивали в 96-луночных планшетах и предварительно инкубировали с 0,01 мкМ до 10,00 мкМ воклоспорина в течение 60 минут. Затем клетки инфицировали SARS-CoV-2 при $MOI=1$ в присутствии воклоспорина в указанной концентрации в течение 60 минут. В последующем вирус удаляли из среды, клетки промывали PBS и далее инкубировали со свежей средой с воклоспорином в указанной концентрации в течение 16 часов. В конце инкубации культуральную среду собирали для определения вирусной нагрузки с помощью анализа бляшек. Для иллюстрации степени инфицирования, соответствующие клетки также подвергали окрашиванию вирусным NSP4, что визуализировали с помощью флуоресцентной микроскопии.

Результаты

[113] Как продемонстрировано на **Фиг. 2А-2С**, воклоспорин ингибировал вирусную нагрузку SARS-CoV-2 дозозависимым образом в клетках Vero E6 и клетках Calu. Воклоспорин партии 2 ингибировал вирусную нагрузку SARS-CoV-2 в клетках E6 дозозависимым образом от 0,01 до 1,00 мкМ, а при увеличении концентрации выше 1,00 мкМ титр вируса снижался до предела обнаружения (**Фиг. 2А**). Точно так же воклоспорин

партии 3 ингибировал вирусную нагрузку SARS-CoV-2 в клетках E6 и Calu человека, соответственно, дозозависимым образом от 0,01 до 4,00 мкМ (**FIG. 2B**). Как продемонстрировано на **Фиг. 2C**, воклоспорин уменьшал количество инфицированных SARS-CoV-2 клеток дозозависимым образом, что отражалось в снижении флуоресцентного окрашивания вирусного NSP4.

Пример 3

[114] С целью оценки профиля эффективности и безопасности лечения воклоспорином для предотвращения отторжения у пациентов с трансплантацией почки, пациентам с трансплантацией почки de novo вводили либо воклоспорин, либо такролимус, и оценивали отторжение и другие неблагоприятные исходы.

Способы

[115] Реципиенты трансплантата почки de novo были включены в 6-месячное многоцентровое рандомизированное открытое исследование фазы 2b. Реципиентам трансплантата почки de novo вводили два раза в день (2 р/д) высокие дозы воклоспорина (0,8 мг/кг), средние дозы воклоспорина (0,6 мг/кг), низкие дозы воклоспорина (0,4 мг/кг) или стандартную дозу такролимуса (0,05 мг/кг). Кроме того, все субъекты получали индукционную иммуносупрессию посредством внутривенного введения даклизумаба или базиликсимаба (доза согласно этикетке продукта) и во время исследования получали сопутствующее лечение ММФ и кортикостероидами. Минимальный уровень воклоспорина или такролимуса в крови измеряли в течение 180 дней. Регистрировали нежелательные реакции и оценивали отторжение почечного трансплантата по классификации Banff. В моменты времени 3 и 6 месяцев анализировали нежелательные реакции. Выживаемость трансплантата и выживаемость пациентов также фиксировали в момент времени 6 месяцев.

Результаты

[116] Как продемонстрировано на **Фиг. 3**, минимальные уровни в крови (C_0) воклоспорина для групп с низкими, средними и высокими дозами составляли 20-30 нг/мл, 35-50 нг/мл и 60-85 нг/мл соответственно в течение 0-3 месяцев; и 11-20 нг/мл, 21-30 нг/мл и 31-40 нг/мл соответственно в течение 3-6 месяцев. Для сравнения, минимальный уровень стандартной дозы такролимуса в крови составляет 7-20 нг/мл в течение 0-3 месяцев; и 5-15 нг/мл в течение 0-6 месяцев.

[117] Клиническое влияние введения воклоспорина оценивали по частоте отторжения трансплантата. Как продемонстрировано в Таблице 1, группа, получавшая среднюю дозу воклоспорина (0,6 мг/кг 2 р/д), демонстрировала аналогичные показатели отторжения по сравнению с группой, получавшей стандартную дозу такролимуса, что подтверждается подтвержденным биопсией острым отторжением (BPAR). Частота новых случаев диабета после трансплантации (NODAT) в группах низких, средних и высоких доз воклоспорина составила соответственно 1,6%, 5,7% и 17,7% по сравнению с 16,4% в группе стандартной дозы такролимуса. pСКФ по Nankivell (показатель почечной функции) для групп с низкими, средними и высокими дозами воклоспорина составляла

соответственно: 71, 72 и 68 мл/мин по сравнению с 69 мл/мин для группы со стандартной дозой такролимуса. Это 6-месячное исследование продемонстрировало, что VCS так же эффективен, как и TAC, в предотвращении острого отторжения с аналогичной функцией почек в группах с низкой и средней дозой и потенциально ассоциируется со снижением частоты NODAT.

Таблица 1: Частота острого отторжения в момент времени 6 месяцев после трансплантации при лечении воклоспорином или такролимусом

	Воклоспорин в низкой дозе (N=84)	Воклоспорин в средней дозе (N=77)	Воклоспорин в высокой дозе (N=87)	Такролимус в стандартной дозе (N=86)
Центральное BPAR	9 (10,7%)	7 (9,1%)	2 (2,3%)	5 (5,8%)
NODAT	1,6%	5,7%	17,7%	16,4%
Выживаемость трансплантата	100%	100%	98,9%	97,7%
Выживаемость пациента	100%	100%	98,9%	97,7%

Пример 4

[118] Фармакокинетические данные были получены в ходе исследования пациентов с активным волчаночным нефритом. Минимальные концентрации для различных доз приведены в Таблице 2. РК демонстрирует линейность зависимости дозы от минимальной концентрации, так что проводимые клинические исследования не требуют проведения мониторинга терапевтического средства.

Таблица 2. Минимальные концентрации для доз

Доза	Минимальная концентрация
39,5 мг п/о 2 р/д	32,7 нг/мл
23,7 мг п/о 2 р/д	21,1 нг/мл
7,9 мг п/о 2 р/д	7,3 нг/мл

Пример 5

[119] Для оценки противовирусного действия воклоспорина у пациентов с положительным результатом на SARS-CoV-2 после трансплантации почки, реципиенты трансплантата почки с симптомами SARS-CoV-2 от легкой до умеренной степени тяжести были включены в исследование для оценки эффективности комбинированной терапии преднизолоном и такролимусом.

Способы

[120] Пациенты с положительным результатом на SARS-CoV-2, перенесшие трансплантацию почки, участвуют в открытом одноцентровом предварительном исследовании, которое предполагает лечение воклоспорином. Перед включением в

исследование или во время него стандартную иммуносупрессивную терапию субъектов сокращали до двойной терапии преднизолоном и такролимусом в соответствии с действующими местными рекомендациями (руководство по лечению Центра трансплантологии LUMC для COVID-положительных пациентов с трансплантатом). До Дня 1 реципиентов трансплантата почки с подозрением на инфекцию COVID-19 тестировали на SARS-CoV-2 и информировали об исследовании. После подтверждения инфекции COVID-19 и получения согласия субъектов рандомизировали в группы исследования, и в День 1 проводили соответствующие процедуры исследования. В частности, 15 из 30 субъектов оставались на терапии преднизолоном и такролимусом на время исследования, а остальные 15 субъектов переходили с такролимуса на воклоспорин. Воклоспорин назначают по 6 капсул (по 7,9 мг) 2 р/д на период лечения до 1 года (**Фиг. 4**). Мониторинг безопасности лекарственных средств проводится во время исследования, чтобы гарантировать, что минимальные уровни воклоспорина поддерживаются в пределах 25-60 нг/мл, а минимальные уровни такролимуса поддерживаются в пределах 3-7 нг/мл. Если минимальные уровни не находятся в пределах этих уровней, осуществляли коррекцию дозы.

[121] Со Дня 2 по День 14 для субъектов был организован ежедневный домашний мониторинг; а со Дня 16 по День 28 они мониторировались через день. Домашний мониторинг осуществлялся с помощью видеоконсультаций и включал в себя самостоятельные измерения температуры, артериального давления, пульса, веса, частоты дыхания и насыщения кислородом, а также данные цитопатического эффекта (CPE) SARS-CoV-2. Кроме того, субъекты собирали первые утренние мазки из горла для оценки вирусной нагрузки.

[122] Для субъектов также было запланировано 4 визита в клинику: на День 4 (Визит 2), День 7 (Визит 3), День 14 (Визит 4) и День 28 (Визит 5/окончание исследования/досрочное завершение исследования) (**Фиг. 4**). Во время визитов также брали первые утренние мазки из горла. После Дня 28 за субъектами устанавливали длительное наблюдение за безопасностью с визитами на День 42, 90, 180, 270 и 360 для осуществления оценок. Исследуемое лекарственное средство выдавали тем субъектам, которые решили продолжить прием воклоспорина после Визита 5 на срок до 1 года.

Результаты

[123] Проведено сравнение титров вируса SARS-CoV-2, а также цитопатических эффектов у субъектов, получающих терапию преднизолоном и такролимусом, и субъектов, получающих терапию преднизолоном и воклоспорином. Ожидается, что у субъектов в группе воклоспорина будет наблюдаться более эффективное снижение вирусной нагрузки и менее выраженные CPE по сравнению с группой такролимуса.

[124] Субъектов, получающих терапию преднизолоном и такролимусом, и субъектов, получающих терапию преднизолоном и воклоспорином, также сравнивали по частоте отторжения трансплантата, новых случаев диабета после трансплантации и других нежелательных эффектов. Ожидается, что у субъектов в группе воклоспорина будет

сравнимая или более низкая частота отторжения трансплантата, диабета и нежелательных эффектов по сравнению с группой такролимуса.

Пример 6

[125] Исходные растворы воклоспорина (Aurinia), циклоспорина (Novartis), такролимуса (Astellas), микофенолата (Roche) и эверолимуса (Novartis) готовили путем растворения фармацевтической композиции этих препаратов в DMSO (поэтому концентрации на **Фиг. 5А-5Е** являются расчетными концентрациями). Клетки Vero E6 (~20 000 клеток/лунку) в 96-луночных планшетах для культивирования клеток заражали SARS-CoV-2 (множественность заражения=0,015) с последующей инкубацией в 150 мкл среды с серийными разведениями иммунодепрессантов. Вызванную вирусом гибель клеток количественно определяли через три дня после инфицирования с помощью анализа MTS, а поглощение измеряли при 495 нм. Параллельно оценивали жизнеспособность неинфицированных клеток для определения цитотоксичности препарата. Для каждого препарата проводили два независимых эксперимента (в четырехкратной повторности). 50% эффективную концентрацию (EC_{50}), определяемую как концентрацию, которая подавляет индуцированную вирусом гибель клеток на 50%, и 50% цитотоксическую концентрацию (CC_{50}), концентрацию, которая снижает жизнеспособность неинфицированных клеток до 50% от жизнеспособности необработанных контрольных клеток, определяли с помощью нелинейной регрессии в GraphPad Prism v8.0. Как продемонстрировано на **Фиг. 5А-5Е**, воклоспорин (**Фиг. 5А**), циклоспорин (**Фиг. 5В**), такролимус (**Фиг. 5Д**) и микофенолат (**Фиг. 5Е**), взятые отдельно, ингибировали индуцированную вирусом гибель клеток со значениями EC_{50} 0,27, 3,2, 12 и 3,1 мкМ, соответственно.

[126] Концентрации EC_{50} такролимуса (**Фиг. 5Д**) и циклоспорина (**Фиг. 5В**), вероятно, являются токсичными при соответствующих концентрациях *in vivo*. Однако, как продемонстрировано на **Фиг. 5А**, воклоспорин поддерживал жизнеспособность клеток и ингибировал репликацию вируса SARS-CoV-2 при концентрациях примерно в 40 и 10 раз ниже, чем такролимус и циклоспорин соответственно. EC_{50} воклоспорина находится в пределах C_{max} , наблюдаемого у пациентов, перенесших трансплантацию.

Пример 7: Ингибирование репликации SARS-CoV-2 в клетках Calu-3 посредством VCS, CsA и TAC

[127] Для оценки влияния трех ингибиторов кальциневрина: циклоспорина А (CsA), такролимуса (TAC) и воклоспорина (VCS), а также других иммунодепрессантов, обычно применяемых у реципиентов трансплантата почки (KTR), на репликацию SARS-CoV-2 с помощью клеточных анализов проводили анализы снижения СРЕ и снижения выхода вируса.

Способы

Вирус и клеточные линии

[128] SARS-CoV-2/Leiden-0002 (GenBank MT510999) был выделен из образца, полученного из носоглотки, в Медицинском центре Лейденского университета (LUMC) в

марте 2020 года. Инфицирование проводили с применением вирусной массы, дважды пассированной в клетках Vero E6. Клетки Vero E6 и клетки Calu-3 2B4 (Tseng et al., *J Virol.* Aug 2005;79(15):9470-9), именуемые в данном документе как клетки Calu-3, культивировали, как описано ранее (Salgado-Benvindo et al., *Antimicrob Agents Chemother.* Jul 22 2020;64(8) doi:10.1128/AAC.00900-20). Инфицирование проводили в минимальной основной среде Игла (EMEM; Lonza) с 25 mM HEPES (Lonza), 2% FCS, 2 mM L-глутамина и антибиотиками (EMEM-2% FCS). Все эксперименты с инфекционным SARS-CoV-2 проводили в помещении с уровнем биобезопасности 3 в LUMC.

Иммуносупрессивные соединения

[129] Исходные растворы воклоспорина (VCS; LupkynisTM), циклоспорина А (CsA; Neoral®, Novartis), такролимуса (TAC; Prograf®, Astellas), мофетила микофенолата (MMF; CellCept®, Roche) или эверолимуса (EVL; Certican®, Novartis) готовили путем растворения фармацевтического состава этих препаратов в диметилсульфоксиде (DMSO). Были получены капсулы плацебо и чистый порошок VCS, такролимус (PHR1809), циклоспорин А (30024) и микофеноловая кислота (M5255). Ремдесивир (RDV; HY-104077) применяли в качестве контроля во всех экспериментах. Все соединения растворяли в DMSO и аликвоты для одноразового применения хранили при -20 °C.

Измерение концентраций циклоспорина А, такролимуса и воклоспорина проводили с помощью валидированной LC-MS/MS

[130] Количественное определение CsA и TAC проводили с помощью LC-MS/MS, как описано ранее (Zwart et al., *Br J Clin Pharmacol.* Dec 2018;84(12):2889-2902) путем разбавления образцов в метаноле, а затем в холостой цельной крови. Перед анализом образцы разводили в метаноле, а затем в цельной крови, чтобы они находились в пределах калибровочной линии 0-15-600 мкг/л VCS. К образцам объемом 10 или 20 мкл добавляли цельную кровь человека до конечного объема 200 мкл и добавляли 200 мкл 0,1 М сульфата цинка и 500 мкл раствора внутреннего стандарта (32 мкг/л VCS D4 в ацетонитриле). Затем образцы встряхивали при 2000 об/мин в течение 5 минут и центрифугировали при 13000 об/мин в течение 5 минут, после чего 20 мкл вводили в систему LC-MS/MS. Метод прошел валидацию в соответствии с руководством ЕМА по валидации биоаналитического метода (ЕМЕА/СНМР/ЕWР/192217/2009 - Руководство по валидации биоаналитического метода (2011 г.)).

Анализ снижения цитопатического эффекта (CPE)

[131] Анализ снижения CPE в клетках Vero E6 проводили, как правило, как описано выше, за исключением того, что предварительная инкубация клеток с тестируемыми соединениями продолжалась 30 минут. Планшеты инкубировали в течение трех дней при 37 °C и определяли жизнеспособность клеток с помощью колориметрического анализа, измеряя поглощение при 495 нм. Определяли EC₅₀ и CC₅₀ каждого соединения и анализировали полученные данные с помощью нелинейной регрессии. Для каждого соединения проводили не менее двух независимых экспериментов (каждый в четырехкратной повторности).

Анализ снижения выхода вируса

[132] Клетки Calu-3 высевали в 96-луночные планшеты (3×10^4 клеток на лунку) в 100 мкл культуральной среды. На следующий день клетки предварительно инкубировали в течение 60 мин с 2-кратными серийными разведениями CsA, TAC или VCS, начиная с концентрации 25 мкМ, и RDV, начиная с концентрации 10 мкМ. Затем клетки инфицировали SARS-CoV-2 (MOI 1, исходя из титра, определенного на клетках Vero E6) в 50 мкл среды с соединением. После 1 ч инкубации при 37 °С клетки трижды промывали PBS и добавляли 100 мкл среды с соединением. Среду собирали из лунок через 24 часа после инфицирования (ч п.и.). Анализ вирусного потомства, высвобождаемого из инфицированных клеток Calu-3, проводили с помощью анализа бляшек на клетках Vero E6. Концентрации VCS измеряли с помощью валидированной LC-MS/MS после добавления 9 объемов метанола к собранной среде. Анализ цитотоксичности с ложно инфицированными клетками, обработанными таким же образом, проводили параллельно, как описано для анализа снижения CPE.

Снижение выхода вируса в стеклянных флаконах

[133] Флаконы из боросиликатного стекла (50 мл) обрабатывали ледяной уксусной кислотой для удаления возможных остатков детергента, после чего дважды промывали абсолютным этанолом. Флаконы высушивали и стерилизовали УФ-излучением перед использованием. Трехкратно концентрированные растворы соединений готовили в EMEM-2% FCS с использованием стерильных стеклянных культуральных пробирок, стеклянного шприца на 50 мкл и стеклянных пастеровских пипеток. Один мл каждого разведения соединения переносили в три разных флакона с реагентами (три повтора). Конфлюэнтные монослои клеток Calu-3, выращенных в культуральных флаконах, инфицировали SARS-CoV-2/Leiden-002 при множественности заражения=1. После инкубации в течение 1 ч при 37°С клетки трижды промывали теплым PBS, трипсинизировали и ресуспендировали в EMEM-2% FCS. Два мл этой клеточной суспензии ($\sim 10^6$ клеток) добавляли в каждый флакон с реагентом, который содержал 1 мл 3-кратного концентрированного раствора соединения в среде. После инкубации в течение 24 ч при 37 °С среду собирали и определяли инфекционный титр вируса с помощью анализа бляшек на клетках Vero E6.

Определение цитотоксичности соединений в стеклянных культуральных пробирках

[134] Клетки Calu-3 обрабатывали трипсином и $1,5 \times 10^5$ клеток в 1 мл EMEM-2% FCS и распределяли по стеклянным культуральным пробиркам. Двукратные разведения VCS, TAC и CsA, начиная с концентрации **150** мкМ (3-кратная конечная концентрация), готовили в EMEM-2% FCS с использованием стеклянной лабораторной посуды и добавляли по 0,5 мл в соответствующие пробирки с клетками (по три пробирки на концентрацию). Через 24 ч инкубации определяли жизнеспособность клеток, как описано выше.

Результаты

[135] Чтобы оценить влияние VCS, CsA и TAC на репликацию SARS-CoV-2, были

проведены анализы снижения вирусной нагрузки с применением эпителиальных клеток легких человека (Calu-3), которые продемонстрировали свою перmissивность к SARS-CoV-2. Поскольку VCS обладает высокой липофильностью и может связываться с пластиком, что может снижать биодоступность в анализах с использованием пластиковой лабораторной посуды, эффект VCS сравнивали в стандартных клеточных анализах с использованием пластиковой лабораторной посуды и в индивидуальных анализах с использованием стеклянных пробирок, контейнеров и пипеток. RDV был включен в качестве положительного контроля для ингибирования репликации SARS-CoV-2.

[136] **Фиг. 6А-6D** демонстрируют влияние циклоспорина А, такролимуса и воклоспорина на продукцию инфекционного потомства SARS-CoV-2 после инфицирования (**Фиг. 6А** и **Фиг. 6В**) и жизнеспособность клеток Calu-3 после ложного заражения (**Фиг. 6С** и **Фиг. 6D**). **Фиг. 6А** и **Фиг. 6С** демонстрируют данные, полученные в результате экспериментов, проведенных с использованием стеклянной лабораторной посуды, а **Фиг. 6В** и **Фиг. 6D** демонстрируют результаты при использовании пластиковой лабораторной посуды. Клетки Calu-3 в стекле оставались жизнеспособными и поддерживали репликацию SARS-CoV-2, так как титры $1,7 \times 10^6$ PFU/мл были измерены в среде через 24 ч после инфицирования (**Фиг. 6А**). Обработка инфицированных клеток 10 мкМ ремдесивира ингибировала репликацию вируса, что приводило к титрам инфекционного потомства чуть выше предела обнаружения анализа бляшек (данные не приведены). Обработка клеток 3,2 мкМ воклоспорина вызывала более чем 1,5 log снижение титра инфекционного потомства SARS-CoV-2, в то время как при применении той же концентрации циклоспорина А или такролимуса наблюдалось ~ 0,5 log снижение (**Фиг. 6А**). Однако обработка 3,2 мкМ воклоспорина или циклоспорина А также вызывала цитотоксические эффекты, поскольку жизнеспособность клеток падала до ~75% (**Фиг. 6С**). В совокупности эти результаты демонстрируют мощную противовирусную активность воклоспорина, которая может быть частично опосредована цитотоксичностью.

[137] Наблюдаемые результаты согласуются с предыдущим сообщением о том, что CsA ингибирует репликацию SARS-CoV-2 в клетках HuH7.5 и Calu-3, но не в клетках Vero (Dittmar et al., bioRxiv. 2020:2020.06.19.161042). Однако, в отличие от наблюдений, что TAC ингибирует репликацию SARS-CoV-2 в клетках Vero E6 с $EC_{50} \sim 15$ мкМ, в предыдущем сообщении не было обнаружено активности TAC ни в одной из этих клеточных линий, что может быть связано с применением различных субклонов клеток Vero.

[138] В экспериментах с использованием пластиковых материалов наблюдалось дозозависимое снижение титров инфекционного потомства при обработке клеток VCS, что приводило к снижению более чем на 1 log при 6,4 мкМ (**Фиг. 6В**). Обработка CsA приводила к аналогичному снижению при 25 мкМ, но при 6,4 мкМ ингибировала меньше, чем VCS. Однако в концентрациях 12,5 мкМ или выше CsA проявлял значительную цитотоксичность, в то время как VCS не проявлял (**Фиг. 6D**). TAC не проявлял значительной цитотоксичности, но для снижения титра потомства инфекционного вируса

более чем на 1 log требовалась концентрация 25 мкМ. VCS оказал более сильный эффект в экспериментах, проведенных со стеклянной лабораторной посудой по сравнению с пластиковой, вероятно, из-за потери связи соединения с пластиком. Концентрацию свободного VCS измеряли после инкубации с различными растворами в стеклянных емкостях, как с клетками, так и без них. После 24-часовой инкубации при 37 °С в стекле без клеток не наблюдалось значительной потери соединения из раствора (Табл. 3). При инкубации растворов VCS с концентрацией от 0,2 до 3,2 мкМ в стеклянных флаконах с клетками Calu-3 наблюдалось снижение концентрации VCS на ~75%, что свидетельствует о том, что соединение связывалось или поглощалось клетками. Также измеряли концентрацию VCS в среде инфицированных клеток после 24-часовой обработки 25 мкМ VCS в экспериментах, проведенных со стандартной пластиковой лабораторной посудой, и обнаруженная концентрация воклоспорина составила всего 0,68 мкМ.

Таблица 3: Концентрация VCS в образцах из экспериментов с использованием только стеклянной лабораторной посуды, измеренная с помощью LC-MS/MS

	Концентрация VCS в поставляемом растворе											
	3,2 мкМ		3,2 мкМ		1,6 мкМ		0,8 мкМ		0,4 мкМ		0,2 мкМ	
	Без клеток		С клетками									
Время инкубации	Конц (мкМ)	% ост	Конц (мкМ)	% ост	Конц (мкМ)	% ост	Конц (мкМ)	% ост	Конц (мкМ)	% ост	Конц (мкМ)	% ост
0 ч	2,91		2,91		1,77		0,99		0,45		0,33	
24 ч	2,79	96	0,82	28	0,35	20	0,15	15	0,10	22	<0,07 *	НД

* Ниже предела обнаружения LC/MS-MS: Проценты показывают соотношение измеренной (истинной) концентрации через 24 часа и концентрации приготовленного раствора, введенного в клетки (при времени инкубации 0 часов); % ост: % оставшейся концентрации

[139] Даже принимая во внимание снижение на 75% из-за связывания или поглощения клетками, эти результаты показывают, что 90% VCS было потеряно из-за связывания с пластиком. Аналогичное снижение титра вируса на 3,2 и 25 мкМ VCS в стекле и пластике, соответственно, подтверждает, что при использовании пластика биодоступное количество VCS, вероятно, составляет ~ 10% от того, что было добавлено изначально. Связывание VCS с пластиком может привести к потере > 80% соединения из раствора. Следовательно, при применении исходных растворов, приготовленных из чистого порошка VCS с использованием пластиковой лабораторной посуды, может быть недооценка эффективности соединения в антивирусных анализах. Поскольку VCS является сильно липофильным соединением, и взаимодействие между пластиковыми

поверхностями и гидрофобными препаратами может иметь отрицательный эффект, противовирусный эффект VCS, вероятно, больше, чем наблюдаемый в анализах с использованием пластика. Результаты показывают, что потеря соединения из-за связывания с пластиком и интерференция вспомогательных веществ в фармацевтических препаратах усложняют определение значений EC_{50} в антивирусных анализах, включающих использование пластика.

[140] Результаты экспериментов с использованием стеклянной лабораторной посуды показали, что VCS снижает производство инфекционного потомства SARS-CoV-2 дозозависимым образом в инфицированных клетках Calu-3 и более эффективно, чем CsA и TAC. Полученные результаты демонстрируют, что циклофилин-зависимые CNI ингибируют репликацию SARS-CoV-2 в культуре клеток более сильно, чем другие классы иммунодепрессантов, такие как EVL и MPA. VCS ингибировал репликацию SARS-CoV-2 при концентрациях в 8 раз ниже, чем TAC. Концентрации TAC, необходимые для ингибирования репликации SARS-CoV-2, вероятно, являются непереносимыми или токсичными для человека (EC_{50} 0,2 мкМ равняется 160 нг/мл для TAC), без учета того, что свободная доля в трафике составляет около одной десятой от общей концентрации. Для CsA и VCS, 0,2 мкМ соответствует концентрации 241 и 243 нг/мл соответственно. Примечательно, что VCS может проникать в такие органы, как легкие, в более высоких концентрациях, чем наблюдаемые в крови, и при этом более высокие концентрации обнаруживаются в эритроцитах. Следовательно, более высокие концентрации в определенных органах или клетках могут ингибировать вирус. Соответственно, полученные результаты подтверждают пригодность VCS для применения в качестве CNI для терапии, которая также может ингибировать репликацию SARS-CoV-2 в концентрациях, безопасных для человека. Поскольку считается, что VCS обладает сравнимой с TAC эффективностью для предотвращения отторжения у KTR, VCS может быть полезен при лечении пациентов с COVID-19. Результаты, описанные в данном документе, демонстрируют преимущество циклофилин-зависимых CNI, в частности VCS, среди иммунодепрессантов, обычно применяемых в трансплантационной медицине, для субъектов, нуждающихся в иммуносупрессивной терапии, например, KTR, которые подвержены риску инфекции SARS-CoV-2.

Пример 8: Ингибирование репликации SARS-CoV-2 фармацевтическими составами иммунодепрессантов

[141] Эксперименты по оценке жизнеспособности клеток в ответ на инфекцию SARS-CoV-2 проводили с фармацевтическими составами, обычно применяемыми для лечения реципиентов трансплантата почки. Принимая во внимание результаты, полученные в Примере 7, предполагалось, что проблем, связанных с растворимостью или связыванием с пластиком, можно избежать при применении фармацевтических составов, содержащих, например, растворители и вспомогательные вещества.

Способы

[142] Фармацевтические составы (включая вспомогательные вещества,

сорастворители и другие компоненты) VCS, CsA, TAC, EVL и MMF оценивали в анализе снижения CPE с применением клеток Vero E6, как описано выше. Ремдесивир (RDV; HY-104077) применяли в качестве контроля во всех экспериментах. Клетки выдерживали в среде, содержащей препарат, в течение 3 дней после предварительной инкубации и заражения SARS-CoV-2. Как указано выше, параллельно проводили анализы с ложно инфицированными клетками для оценки цитотоксичности тестируемых составов. Для VCS, достижение концентрации при растворении исходных растворов при 6,4 мкМ было подтверждено с помощью LC-MS/MS (данные не приведены).

Результаты

[143] **Фиг. 7А-7Е** демонстрируют влияние различных фармацевтических составов на жизнеспособность клеток в инфицированных и ложно инфицированных клетках. CN1, VCS, CsA и TAC ингибировали вызванную вирусом гибель клеток со значениями EC_{50} в диапазоне от субмикромольного до низкого (**Фиг. 7А-7С**). EVL (**Фиг. 7D**) не проявлял ингибирующего действия в тестируемых концентрациях. Пролекарство MMF (**Фиг. 7Е**) было включено в сравнение, но не ожидалось, что оно будет ингибировать репликацию вируса, поскольку оно, вероятно, не метаболизируется в его активную форму микофенолата (также известного как микофеноловая кислота; MPA)(Ransom, Ther Drug Monit. 1995; 17(6):681-4) во время анализа (Ritter and Pirofski, Transp Infect Dis. 2009; 11(4):290-7 и Neyts et al., Antimicrob Agents Chemother. 1998; 42(2):216-22). Таким образом, очевидное противовирусное действие MMF может быть связано с наличием в составе препарата вспомогательных веществ.

[144] Значения EC_{50} VCS, CsA и TAC составляли $0,22 \pm 0,01$ мкМ, $4,3 \pm 0,6$ мкМ и 10 ± 1 мкМ соответственно. Кроме VCS, ни одно из соединений не проявляло цитотоксичности, поэтому их значения CC_{50} превышали 100 мкМ. Хотя VCS показал более высокую цитотоксичность с $CC_{50} \sim 4$ мкМ, его значение EC_{50} также было в 18-45 раз ниже по сравнению с другими протестированными соединениями. Эти результаты демонстрируют превосходящее действие VCS на ингибирование опосредованной вирусом гибели клеток по сравнению с другими протестированными соединениями

Пример 9: Влияние фармацевтического состава VCS на репликацию SARS-CoV-2

[145] Были проведены анализы для оценки противовирусного эффекта содержимого капсул VCS и капсул плацебо, например, для определения того, вносят ли одно или большее количество вспомогательных веществ в препарате Lurкупа™ (фармацевтический состав VCS) вклад в эффект VCS, например, низкое значение $EC_{50} \sim 0,22$ мкМ, как продемонстрировано в Примере 8 (**Фиг. 7А**).

Способы

[146] Анализы снижения CPE проводили, как описано выше. Клетки Vero E6, инфицированные SARS-CoV-2, подвергались воздействию VCS или плацебо для сравнения противовирусного (инфицированные клетки) и цитотоксического (ложно инфицированные клетки) эффектов каждого из них. Отсутствие VCS в капсулах плацебо было подтверждено анализом LC-MS/MS (данные не приведены).

Результаты

[147] На **Фиг. 8А-8В** приведено сравнение эффектов фармацевтической композиции VCS и плацебо на жизнеспособность клеток. На удивление, но как состав VCS (**Фиг. 8А**), так и плацебо (**Фиг. 8В**) ингибировали репликацию SARS-CoV-2 сходным дозозависимым образом. Эти результаты указывают на то, что одно или большее количество вспомогательных веществ в составе препарата VCS могут опосредовать противовирусную активность в описанных экспериментальных условиях.

Пример 10: Оценка вирулицидного действия состава VCS

[148] Далее оценивали потенциальную вирулицидную активность капсулы плацебо.

Способы

[149] Для определения вирулицидного потенциала соединений или составов вирионы SARS-CoV-2 (5×10^4 PFU) инкубировали в течение 2 ч при 37°C с одним из следующих растворов: среда, раствор VCS, приготовленный из чистого порошка (3,2 мкМ), растворенное содержимое капсул VCS (3,2 мкМ), капсулы плацебо или растворы Tween (присутствуют в капсулах, что соответствует 3,2 мкМ VCS). В качестве отрицательного контроля применяли PBS, а в качестве положительного контроля вирулицидной активности применяли 50% этанол. Тестируемые соединения инкубировали с исходным материалом вируса SARS-CoV-2 в течение двух часов. Титр оставшегося инфекционного вируса определяли с помощью анализа бляшек на клетках Vero E6, как описано, например, в публикации Salgado-Benvindo et al., *Antimicrob Agents Chemother.* Jul 22 2020;64(8) doi:10.1128/AAC.00900-20.

Результаты

[150] Как продемонстрировано на **Фиг. 9**, только контрольная обработка (50% этанол) снижала количество инфекционного SARS-CoV-2 до уровня ниже предела обнаружения (<100 PFU/мл). Ни одна из других обработок существенно не повлияла на оставшуюся инфекционность вируса.

[151] Полученные результаты продемонстрировали, что вспомогательные вещества лекарственного препарата не оказывали вирулицидного действия в описанных экспериментальных условиях. Результаты указали на возможность того, что наличие вспомогательного вещества по неустановленному механизму препятствовало считыванию данных анализов снижения CPE.

Пример 11: Получение иммуносупрессивных соединений из порошков высокой чистоты и их активность в анализах снижения CPE

[152] Оценивали влияние вспомогательных веществ в фармацевтических композициях на эффект VCS и других иммуносупрессивных соединений.

Способы

[153] Анализы снижения CPE проводили, как описано выше, с применением порошков иммунодепрессантов порошков с высокой чистотой, солюбилизированных в DMSO. Исследуемые исходные растворы готовили из чистых порошков каждого

соединения. В случае применения Neoral (микроэмульсия CsA) оценивали порошок CsA, наиболее часто применяемое производное CsA при лечении KTR.

Результаты

[154] **Фиг. 10A-10D** демонстрируют влияние солюбилизованных иммуносупрессивных соединений высокой чистоты на жизнеспособность клеток в анализе снижения CPE. Как продемонстрировано на **Фиг. 10A**, Растворы VCS, приготовленные из чистого порошка, не обеспечивали такого же уровня защиты клеток, инфицированных SARS-CoV-2, как растворы, приготовленные из фармацевтического состава (сравните с **Фиг. 8A**). Однако раствор VCS из чистого порошка также вызывал меньшую цитотоксичность, как это наблюдалось на ложно инфицированных клетках (сравните с **Фиг. 6C**). **Фиг. 10B** и **10D** демонстрируют аналогичные результаты для клеток, обработанных CsA и MPA, соответственно. При сравнении **Фиг. 7C** и **Фиг. 10C**, растворы TAC, приготовленные из чистого порошка, ингибировали SARS-CoV-2 с такой же эффективностью, что и составы препарата, т. е. с $EC_{50} \sim 15$ мкМ.

[155] В совокупности эти результаты указывают на то, что вспомогательные вещества некоторых фармацевтических составов способствуют их наблюдаемой эффективности. Тестирование порошков высокой степени чистоты различных иммуносупрессивных соединений с целью устранения помех, вызванных вспомогательными веществами в противовирусных анализах, привело к значительно более высоким значениям EC_{50} для VCS, CsA и TAC, демонстрируя, что вспомогательные вещества, которые улучшают растворимость и биодоступность активного соединения в фармацевтических препаратах также могут повлиять на результаты клеточных анализов. Однако оказалось, что фармацевтический состав TAC не содержит вспомогательных веществ с противовирусным действием.

[156] Полученные результаты продемонстрировали, что иммуносупрессивным соединениям могут потребоваться вспомогательные вещества для обеспечения растворимости и/или биодоступности для их оптимальной активности. Приготовление соединения, например, фармацевтической композиции или солюбилизованного порошка высокой чистоты, может повлиять на результаты анализов, а также на растворимость и биодоступность соединений при введении.

Пример 12: Оценка влияния пластиковых материалов в составе воклоспорина

[157] Ввиду потенциального взаимодействия между VCS и пластиковой лабораторной посудой были проведены эксперименты, чтобы определить, будет ли пластиковое покрытие предотвращать связывание VCS. Как описано выше, вспомогательные вещества в фармацевтическом составе VCS могут влиять на биодоступность, например, предотвращая связывание VCS с пластиком, но их неспецифические противовирусные эффекты также могут влиять на определение истинного значения EC_{50} VCS. Пластиковый материал, покрытый различными агентами, был протестирован, чтобы оценить, будет ли покрытие предотвращать связывание VCS с пластиком и позволит ли потенциально применять растворы VCS, приготовленные из

чистого порошка, в антивирусных анализах.

Способы

Покрытие пластиковых материалов

[158] Пластиковую лабораторную посуду покрывали тремя различными покрывающими агентами: 100 мг/мл бычьего сывороточного альбумина в PBS (BSA; Sigma), 1% полиэтиленгликоля 3350 в воде MilliQ (PEG-3350; Sigma) и 0,2% полисорбата 40 в воде MilliQ (Tween40; Fluka). Кроме того, пластиковые материалы с VCS обрабатывали 500 мМ раствором VCS в DMSO (Sigma). Лабораторную посуду, включая все пробирки, наконечники и пластик для культивирования, заполняли блокирующим раствором и инкубировали в течение 2 ч при комнатной температуре при покачивании для однородного покрытия поверхностей. После двукратного ополаскивания водой MilliQ предметы оставляли сохнуть при комнатной температуре до дальнейшего использования в экспериментах. Растворы 0,2 и 2 мкМ VCS готовили в EMEM-2% FCS и по 100 мкл каждого раствора VCS инкубировали в покрытых 96-луночных планшетах. После 2-часовой инкубации при 37°C оставшуюся концентрацию VCS измеряли с помощью валидированной LC-MS/MS. С помощью аналогичных способов также оценивали связывание TAC или CsA.

Результаты

[159] Ни одна из обработок покрытия не смогла уменьшить неспецифическое связывание с пластиком и потерю VCS (см. Таблицу 4), так как после 2-часовой инкубации восстанавливалось только 5-7% исходной концентрации. Даже при t=0 можно было восстановить только ~27% исходной концентрации из-за потери VCS в наконечниках пипеток и пробирках в ходе приготовления разведений. Насыщение мест связывания на пластике путем обработки 500 мМ VCS предотвращало потерю VCS из раствора, но приводило к неконтролируемому выщелачиванию VCS из пластика. Это привело к непредсказуемым концентрациям, которые были выше, чем концентрации во входном растворе, например, концентрация VCS > 15 мкМ была измерена, когда раствор 2 мкМ инкубировали в пластиковом планшете, насыщенном VCS.

Таблица 4. Концентрация VCS в образцах, инкубированных в пластиковой лабораторной посуде с различными покрытиями, измеренная методом LC-MS/MS

	Тип нанесенного покрытия									
	Непокрытая		500 мМ VCS		100 мг/мл раствора BSA		1% раствор PEG-3350		0,2% раствор Твин-40	
Время инкубации	Конц (мкМ)	% ост	Конц (мкМ)	% ост	Конц (мкМ)	% ост	Конц (мкМ)	% ост	Конц (мкМ)	% ост
0 ч	0,56±0,25	28	17,21±2,36	861%	0,55±0,21	27%	0,51±0,16	26%	0,56±0,35	28%

2 ч	0,13±0,07	7	2,73±1,00	137%	0,10±0,04	5%	0,09±0,02	4%	0,09±0,04	4%
-----	-----------	---	-----------	------	-----------	----	-----------	----	-----------	----

Конц: концентрация; % ост: % оставшейся концентрации Проценты указывают оставшуюся концентрацию по отношению к концентрации исходного 2 мкМ исходного раствора VCS.

[160] Для TAC, связывание с пластиком было минимальным (потеря 24%). Для CsA, после 2-часовой инкубации оставшаяся концентрация составляла 62% от начальной концентрации (см. Таблицу 5).

Таблица 5. Концентрация TAC и CsA в образцах, инкубированных в пластиковой лабораторной посуде, измерена методом LC-MS/MS

Время инкубации	TAC		CsA	
	Конц (мкМ)	% ост	Конц (мкМ)	% ост
0 ч	0,85		0,76	
2 ч	0,65	76	0,47	62

Проценты указывают оставшуюся концентрацию по отношению к концентрации исходного маточного раствора соединения (0,8 мкМ).

[161] Полученные результаты продемонстрировали, что покрывающие агенты не предотвращают неспецифическое связывание VCS с пластиком. В некоторых аспектах потеря соединения из-за связывания с пластиком и интерференция вспомогательных веществ в фармацевтических составах усложняла определение значений EC₅₀ в некоторых анализах. Поскольку ни одна из обработок покрытия не предотвратила неспецифическое связывание с пластиком, в других экспериментах (например, см. Таблицу 3) вместо пластика использовалась стеклянная посуда, чтобы обойти потенциальные проблемы.

[162] Все публикации, в том числе патенты, патентные заявки и научные статьи, упомянутые в данном описании, полностью включены в настоящий документ посредством ссылки для всех целей в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация, включая патент, патентную заявку или научную статью, о чем было бы специально и отдельно указано, были включены в настоящий документ посредством ссылки.

[163] Несмотря на то, что вышеизложенное изобретение было описано довольно подробно посредством иллюстрации и примера для целей ясности понимания, специалистам в данной области техники будет очевидно, что некоторые незначительные изменения и модификации могут быть реализованы в свете вышеизложенного. Следовательно, описание и примеры не следует рассматривать как ограничивающие объем изобретения. Различные модификации описанных композиций и способов станут очевидными из приведенного в данном документе описания и методик. Такие варианты могут применяться на практике без отклонения от истинного объема и сути изобретения, и предполагается, что они входят в объем настоящего изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения или предотвращения вирусной инфекции у субъекта, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества воклоспорина.

2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что субъект нуждается в иммуносупрессивной терапии.

3. Способ по п. 1 или п. 2, отличающийся тем, что вирусная инфекция ослабевает за счет ингибирования циклофилина А (СурА) или пути, ассоциированного с СурА.

4. Способ по любому из пп. 1-3, отличающийся тем, что вирусная инфекция вызвана вирусом, который является представителем семейства Coronaviridae.

5. Способ по п. 4, отличающийся тем, что вирус представляет собой альфакоронавирус, бетакоронавирус, дельтакоронавирус или гаммакоронавирус.

6. Способ по п. 3 или п. 4, отличающийся тем, что вирус представляет собой коронавирус человека OC43 (HCoV-OC43), коронавирус человека HKU1 (HCoV-HKU1), коронавирус человека 229E (HCoV-229E), коронавирус человека NL63 (HCoV-NL63), коронавирус, связанный с ближневосточным респираторным синдромом (MERS-CoV), коронавирус тяжелого острого респираторного синдрома (SARS-CoV) или коронавирус тяжелого острого респираторного синдрома 2 (SARS-CoV-2).

7. Способ по любому из пп. 3-6, отличающийся тем, что вирус представляет собой MERS-CoV, SARS-CoV или SARS-CoV-2.

8. Способ по любому из пп. 3-7, отличающийся тем, что вирус представляет собой SARS-CoV-2.

9. Способ по любому из пп. 1-8, отличающийся тем, что терапевтически эффективное количество составляет от около 0,1 мг/кг/день до около 2 мг/кг/день.

10. Способ по любому из пп. 1-8, отличающийся тем, что терапевтически эффективное количество составляет около 7,9 мг 2 р/д, около 15,8 мг 2 р/д, около 23,7 мг 2 р/д, около 31,6 мг 2 р/д, около 39,5 мг 2 р/д, около 47,4 мг 2 р/д или около 55,3 мг 2 р/д.

11. Способ по любому из пп. 1-8, отличающийся тем, что терапевтически эффективное количество составляет около 7,9 мг 1 р/д, около 15,8 мг 1 р/д, около 23,7 мг 1 р/д, около 31,6 мг 1 р/д, около 39,5 мг 1 р/д, около 47,4 мг 1 р/д, около 55,3 мг 1 р/д, около 63,2 мг 1 р/д, около 71,1 мг 1 р/д, около 79,0 мг 1 р/д, около 86,9 мг 1 р/д, около 94,8 мг 1 р/д, около 102,7 мг 1 р/д или около 110,6 мг 1 р/д.

12. Способ по любому из пп. 1-8, отличающийся тем, что терапевтически эффективное количество эквивалентно или может достигать концентрации от около 0,05 мкМ до около 10 мкМ, от около 0,1 мкМ до около 5 мкМ, от около 0,2 мкМ до около 2,5 мкМ, от около 0,3 мкМ до около 1,0 мкМ, от около 0,4 мкМ до около 0,9 мкМ, от около 0,5 мкМ до около 0,8 мкМ, от около 0,1 мкМ до около 0,5 мкМ, или от около 0,2 мкМ до около 0,4 мкМ, или около 0,05, около 0,1, около 0,15, около 0,2, около 0,25, около 0,3, около 0,35, около 0,4, около 0,45, около 0,5, около 0,55, около 0,6, около 0,7, около 0,8, около 0,9, около 1,0, около 1,5, около 2,0, около 2,5, около 3,0, около 3,5, около 4,0, около 4,5, около 5,0, около 6,0, около 7,0, около 8,0, около 9,0 или около 10,0 мкМ или меньше.

13. Способ по любому из пп. 1-12, отличающийся тем, что осуществляется мониторинг функции почек субъекта.

14. Способ по п. 13, отличающийся тем, что мониторинг функции почек субъекта включает:

(a) оценку расчетной скорости клубочковой фильтрации (pСКФ) у субъекта по меньшей мере в первый момент времени и во второй момент времени в разные дни; а также

(b) (i) если pСКФ у субъекта снижается более чем на целевой % до уровня ниже заданного значения между первым и вторым моментами времени, то следует снизить суточную дозу или прекратить введение воклоспорина субъекту;

(ii) если pСКФ у субъекта снижается менее чем на целевой % между первым и вторым моментами времени, следует продолжать введение субъекту той же суточной дозы воклоспорина.

15. Способ по п. 14, отличающийся тем, что заданное значение составляет от около 50 до около 90 мл/мин/1,73 м².

16. Способ по п. 14 или п. 15, отличающийся тем, что заданное значение составляет около 60 мл/мин/1,73 м².

17. Способ по любому из пп. 14-16, отличающийся тем, что целевой % составляет от около 20% до около 45%.

18. Способ по любому из пп. 14-17, отличающийся тем, что целевой % составляет около 20%.

19. Способ по любому из пп. 1-18, отличающийся тем, что субъект имеет аутоиммунное заболевание или патологическое состояние, ассоциированное с отторжением трансплантата.

20. Способ по любому из пп. 1-19, отличающийся тем, что субъект имеет патологическое состояние, ассоциированное с отторжением трансплантата.

21. Способ по п. 19 или п. 20, отличающийся тем, что патологическое состояние ассоциировано с отторжением трансплантата сердца, легких, печени, почек, поджелудочной железы, кожи, кишечника или роговицы.

22. Способ по любому из пп. 19-21, отличающийся тем, что патологическое состояние ассоциировано с отторжением трансплантата почки.

23. Способ по п. 19, отличающийся тем, что субъект имеет аутоиммунное заболевание.

24. Способ по любому из пп. 1-23, отличающийся тем, что терапевтически эффективное количество воклоспорина вводят без введения терапевтически эффективного количества мопетила микофенолата (MMF - англ.: mycophenolate mofetil) и/или терапевтически эффективного количества кортикостероида.

25. Способ по любому из пп. 1-23, дополнительно включающий введение терапевтически эффективного количества мопетила микофенолата (MMF) и/или терапевтически эффективного количества кортикостероида.

26. Способ по любому из пп. 1-25, отличающийся тем, что воклоспорин вводят энтерально, перорально, сублингвально или ректально, парентерально, путем внутривенной инъекции, внутримышечной инъекции, подкожной инъекции, внутривенной инфузии или ингаляции/инсуффляции.

27. Способ по п. 26, отличающийся тем, что воклоспорин вводят энтерально, перорально, сублингвально или ректально.

28. Способ по п. 25 или п. 27, отличающийся тем, что воклоспорин вводят перорально.

29. Способ по п. 26, отличающийся тем, что воклоспорин вводят парентерально, путем внутривенной инъекции, внутримышечной инъекции, подкожной инъекции, внутривенной инфузии или ингаляции/инсуффляции.

30. Способ по п. 26 или п. 29, отличающийся тем, что воклоспорин вводят путем ингаляции или инсуффляции.

31. Способ по п. 30, отличающийся тем, что воклоспорин вводят в форме аэрозоля.

32. Способ по любому из пп. 1-31, отличающийся тем, что воклоспорин вводят в составе фармацевтической композиции.

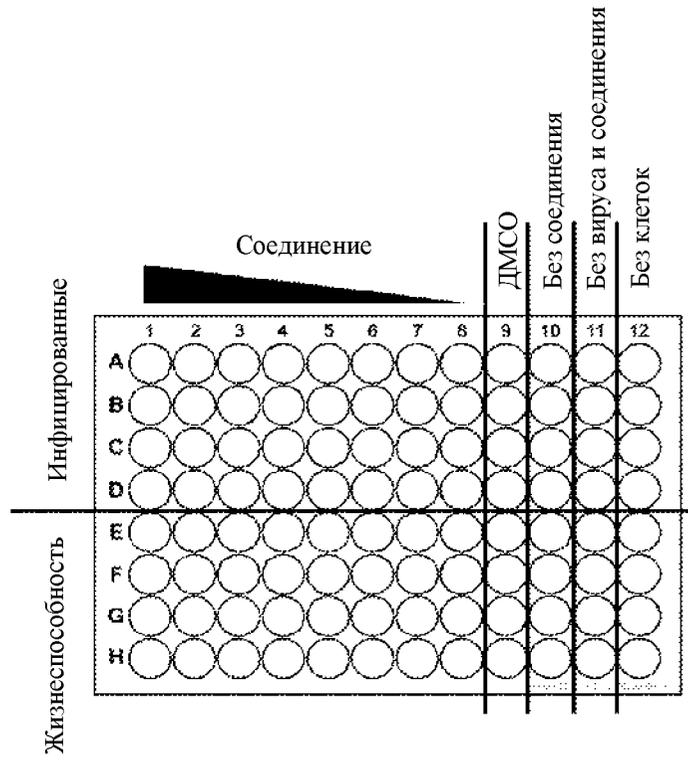
33. Способ по п. 32, отличающийся тем, что фармацевтическая композиция включает одно или большее количество фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ.

34. Способ по п. 33, отличающийся тем, что фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества независимо выбраны из одного или большего количества следующих веществ: спирт, полиэтиленгликоль сукцинат D- α -токоферола (витамина E) (TPGS - англ.: D- α -tocopherol polyethylene glycol succinate), полисорбат 20 (Tween 20), полисорбат 40 (Tween 40), триглицериды со средней длиной цепи, желатин, сорбит, глицерин, оксид железа желтый, оксид железа красный, диоксид титана и вода.

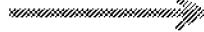
35. Способ по любому из пп. 1-34, отличающийся тем, что у субъекта после введения воклоспорина снижается вирусная нагрузка.

36. Способ по любому из пп. 1-35, отличающийся тем, что у субъекта после введения воклоспорина возрастает период выживания.

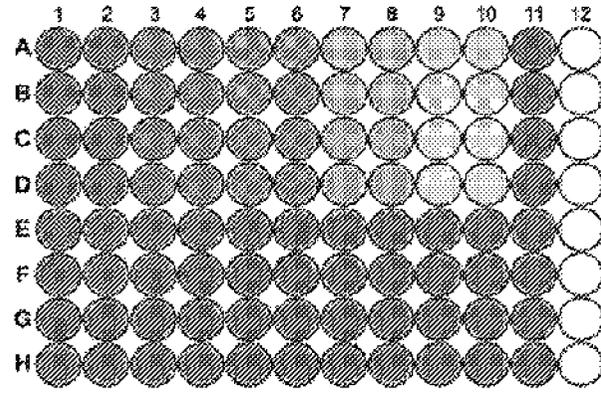
По доверенности



ФИГ. 1А

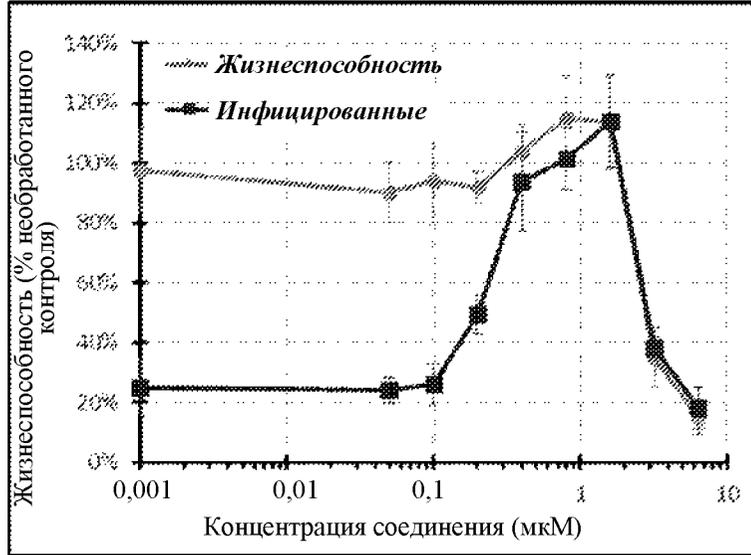


Анализ жизнеспособности (MTS)

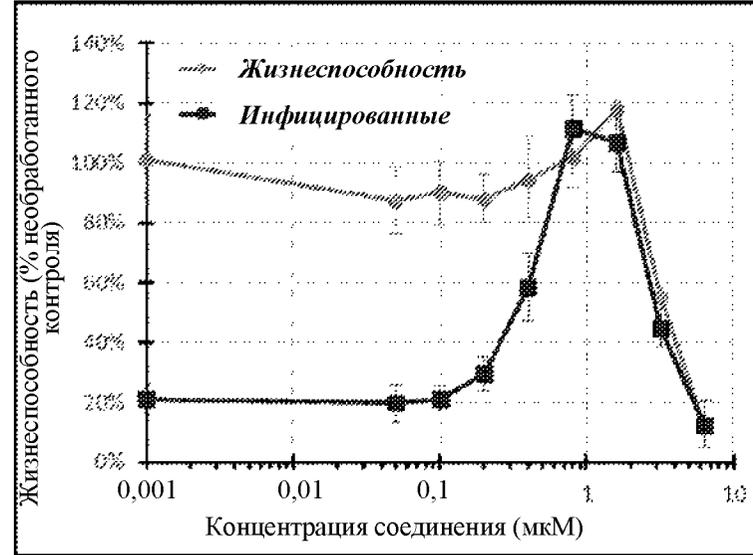


ФИГ. 1В

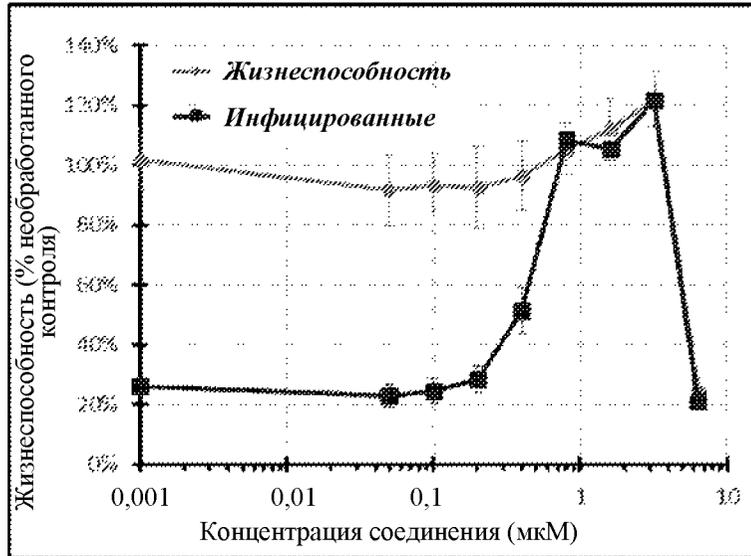
Партия 1 *MVH01*



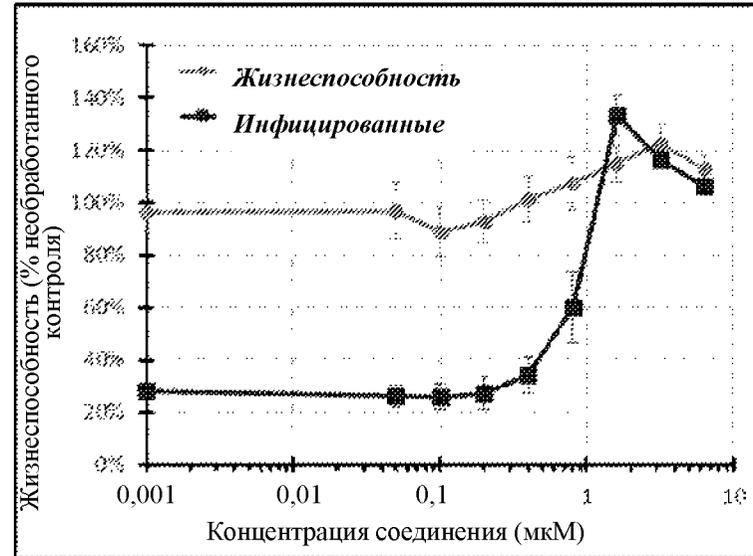
Партия 2 *ViLRA01*



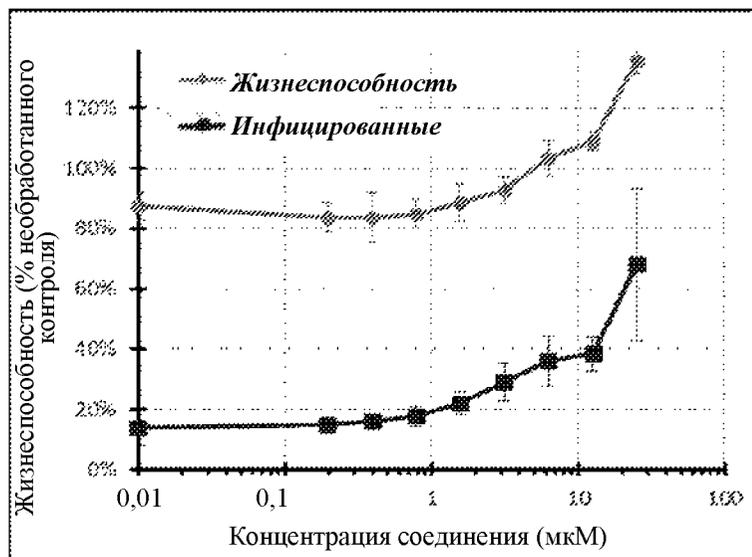
Партия 3 *NO-20*



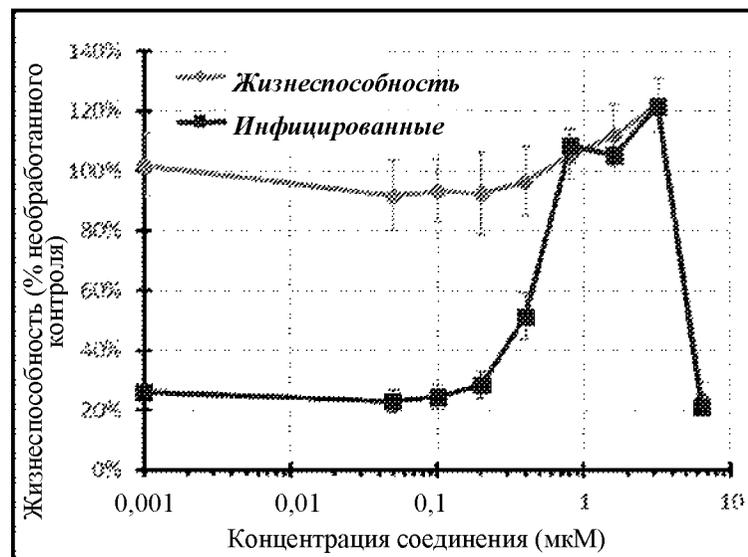
Партия 4 *No-80*



ФИГ. 1С



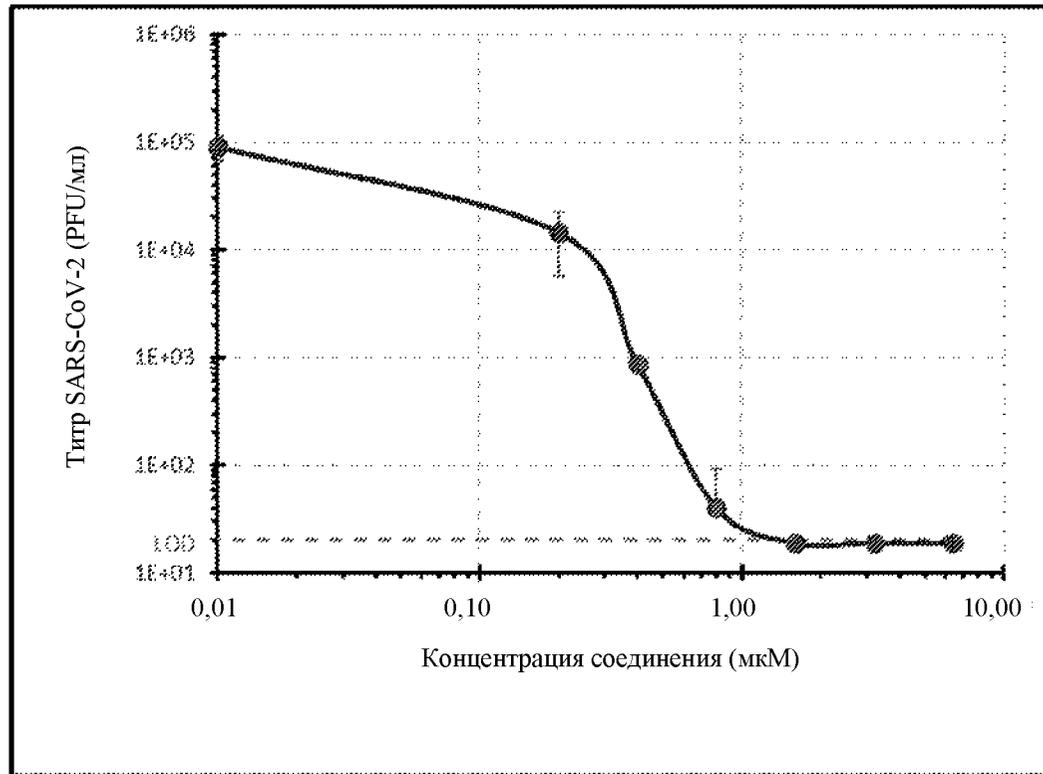
Такролимус



Воклоспорин

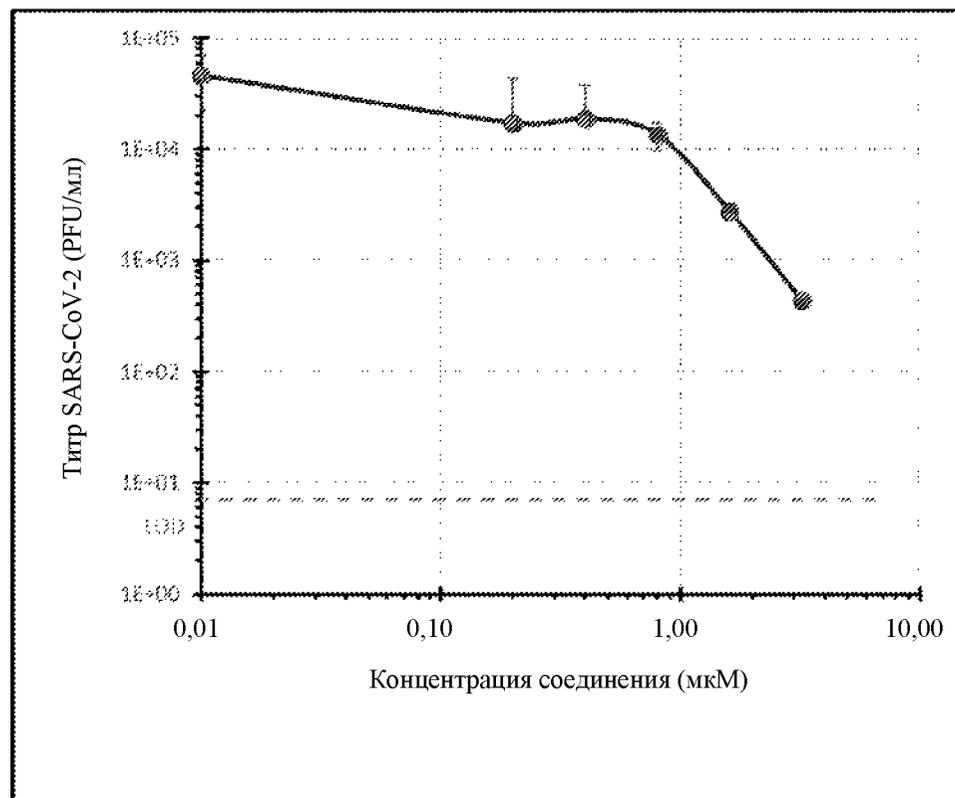
ФИГ. 2А

Партия 2 *ViLRA01*

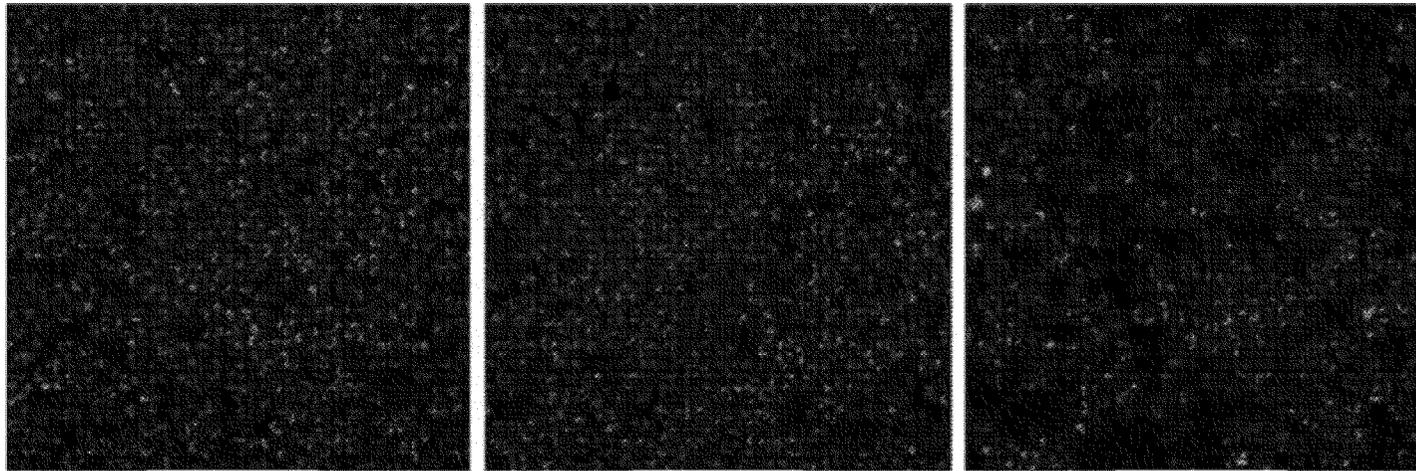


ФИГ. 2В

Партия 3 NO-20



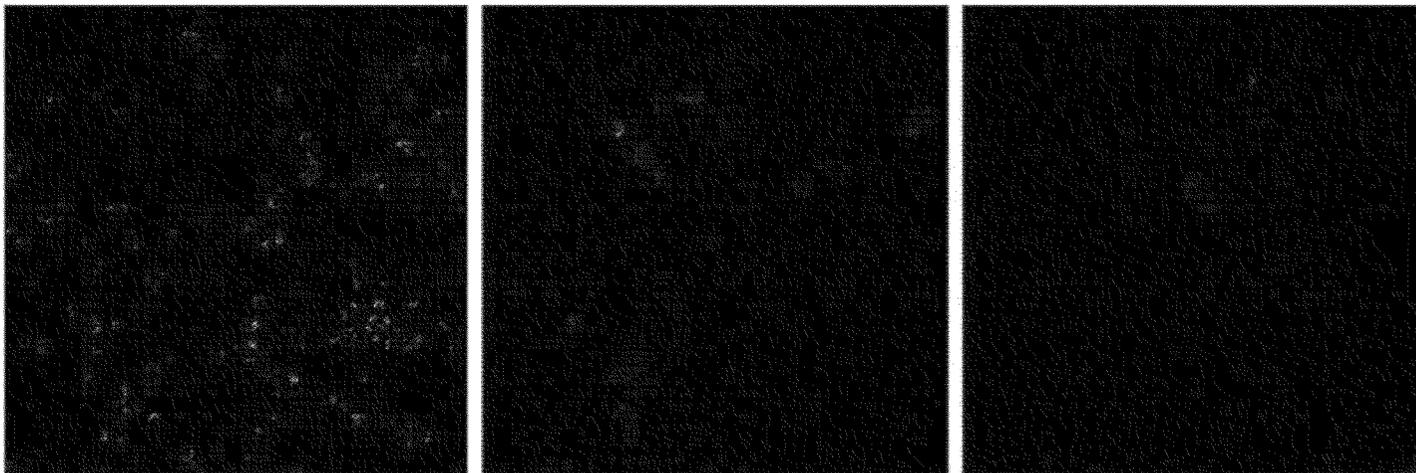
ФИГ. 2С



ДМСО

0,2

0,4



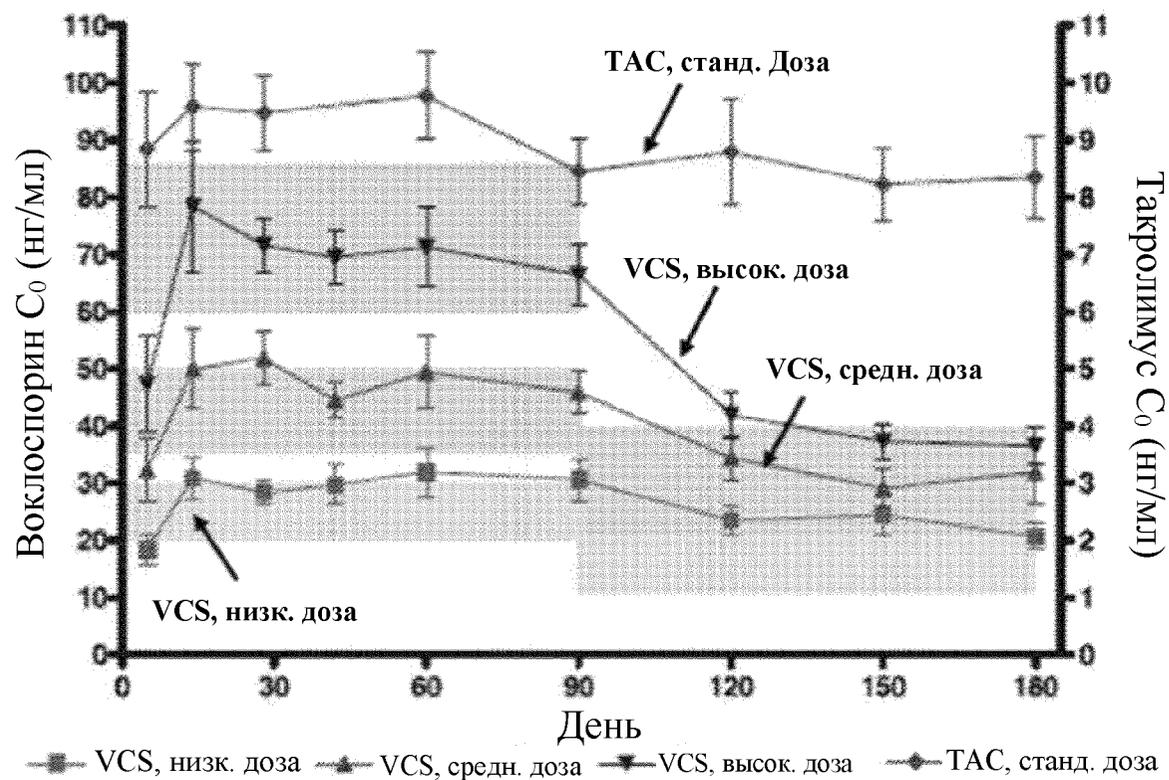
0,8

1,6

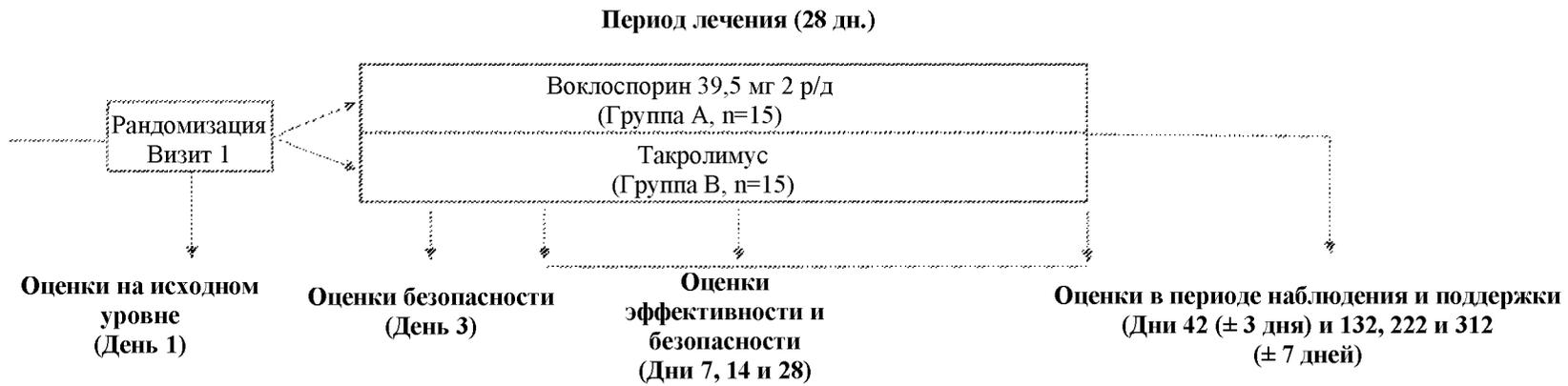
3,2

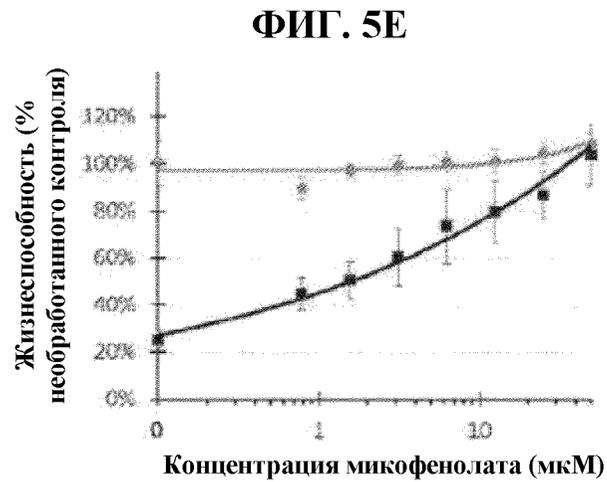
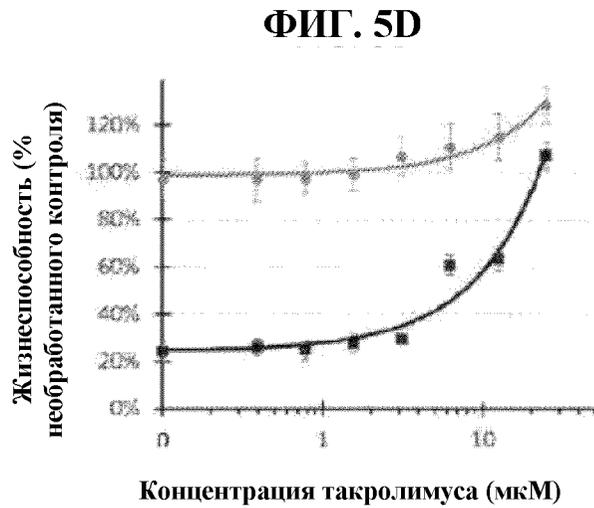
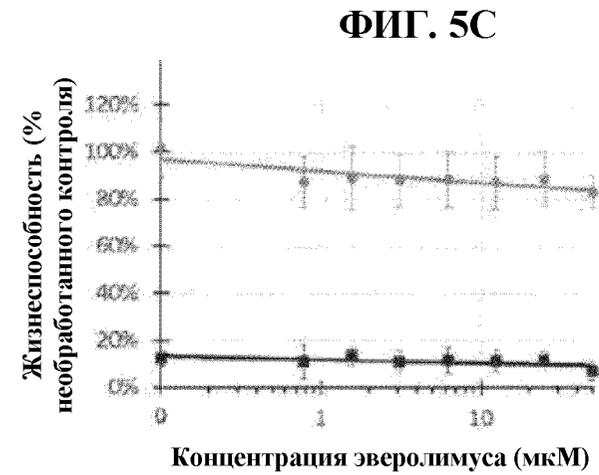
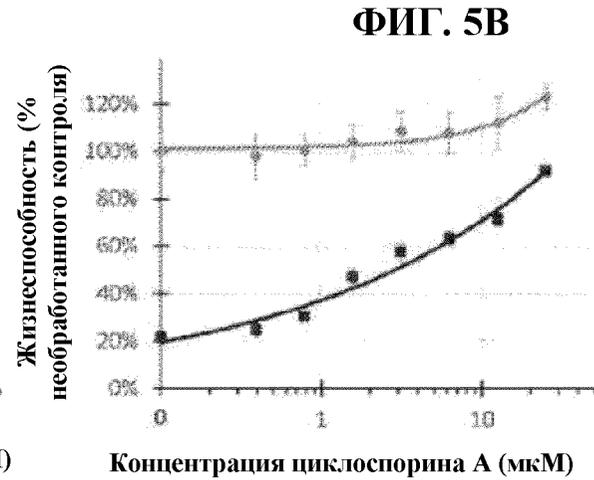
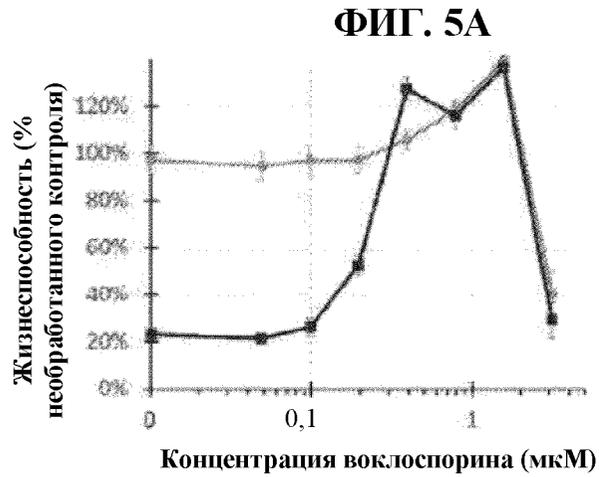
ФИГ. 3

	VCS, низк. (нг/мл)	VCS, средн. (нг/мл)	VCS, высок. (нг/мл)	Такролимус, станд. доза (нг/мл)
Месяцы 0-3	20 – 30	35 – 50	60 – 85	7 – 20
Месяцы 3-6	11 – 20	21 – 30	31 – 40	5 – 15



ФИГ. 4

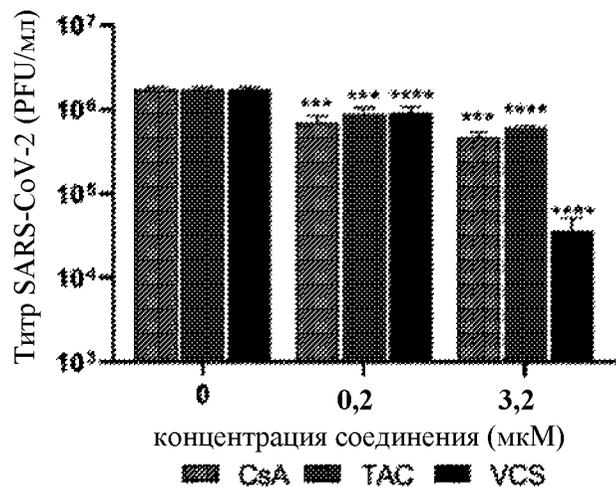




—●— Неинфицированные
—■— Инфицированные

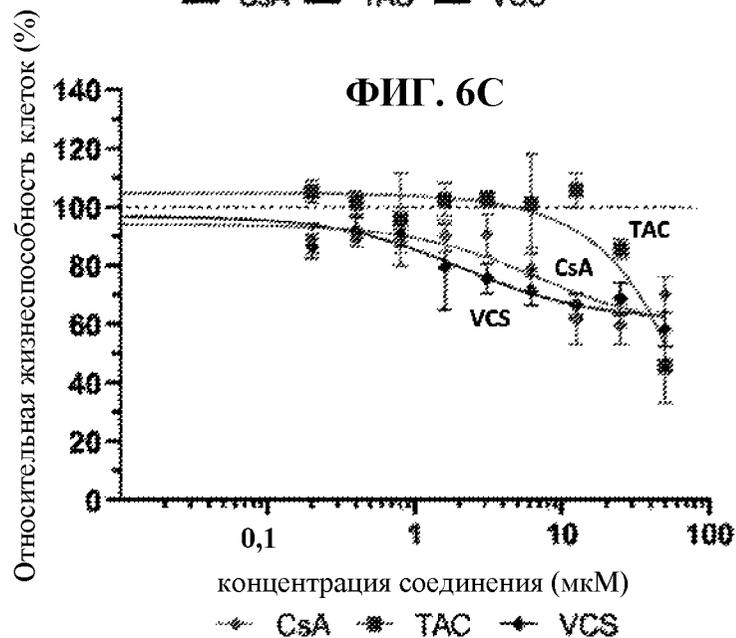
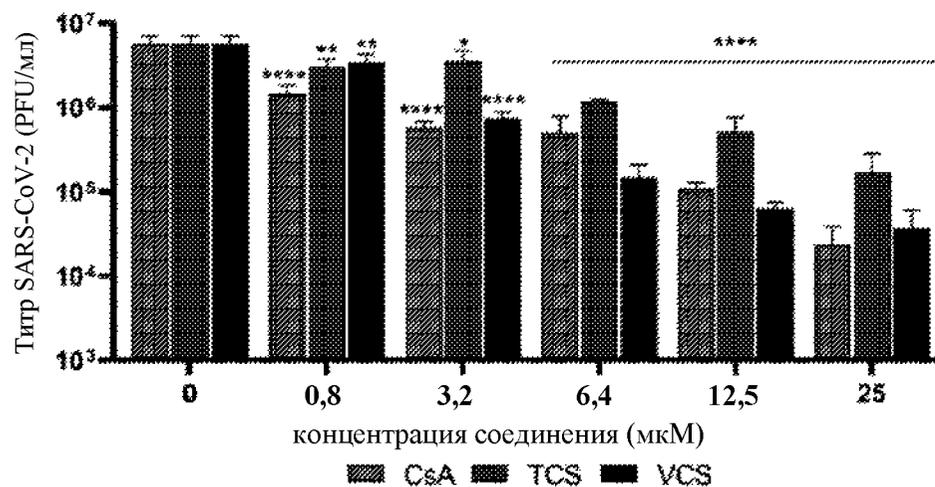
ФИГ. 6А

Стекло

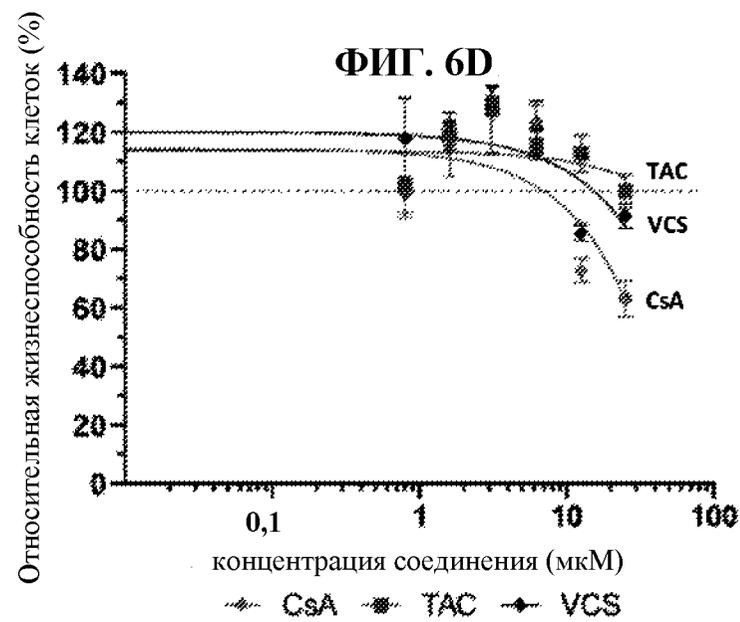


ФИГ. 6В

Пластик



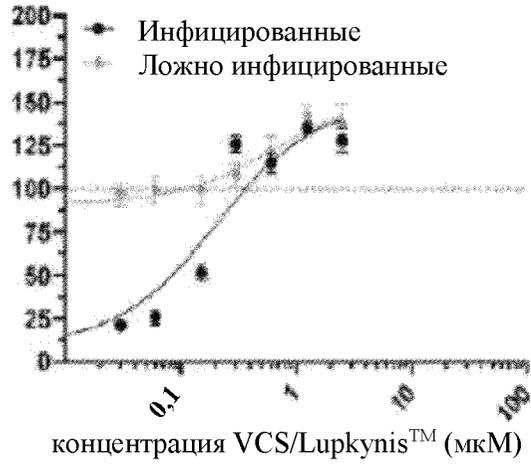
ФИГ. 6С



ФИГ. 6D

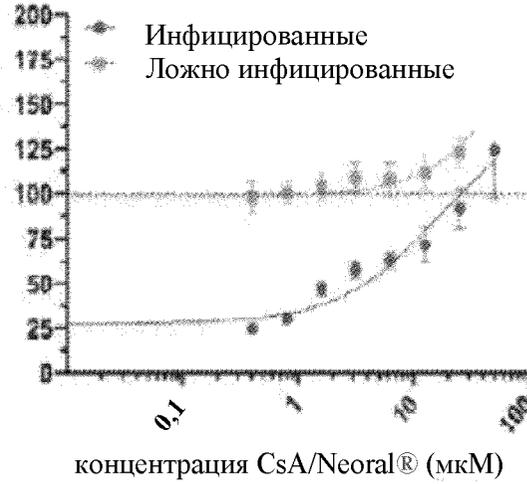
Относительная жизнеспособность клеток (%)

ФИГ. 7А



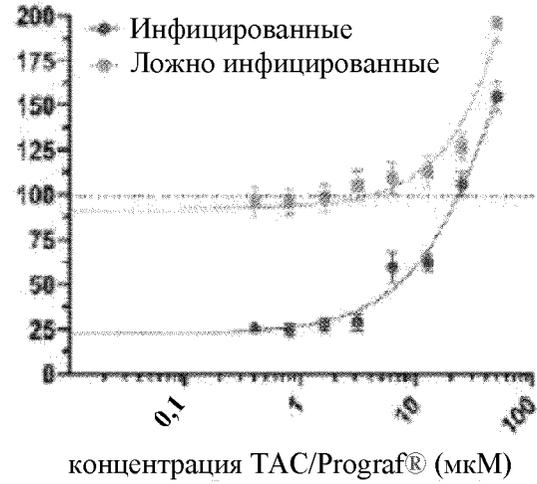
Относительная жизнеспособность клеток (%)

ФИГ. 7В



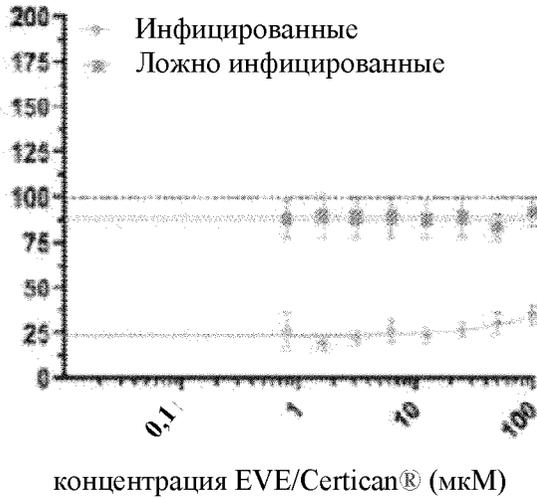
Относительная жизнеспособность клеток (%)

ФИГ. 7С



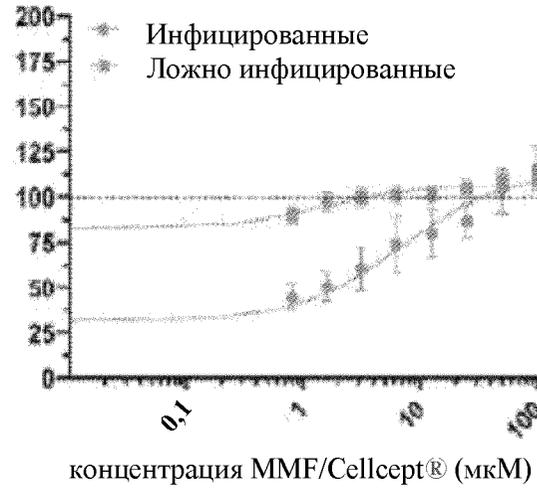
Относительная жизнеспособность клеток (%)

ФИГ. 7D

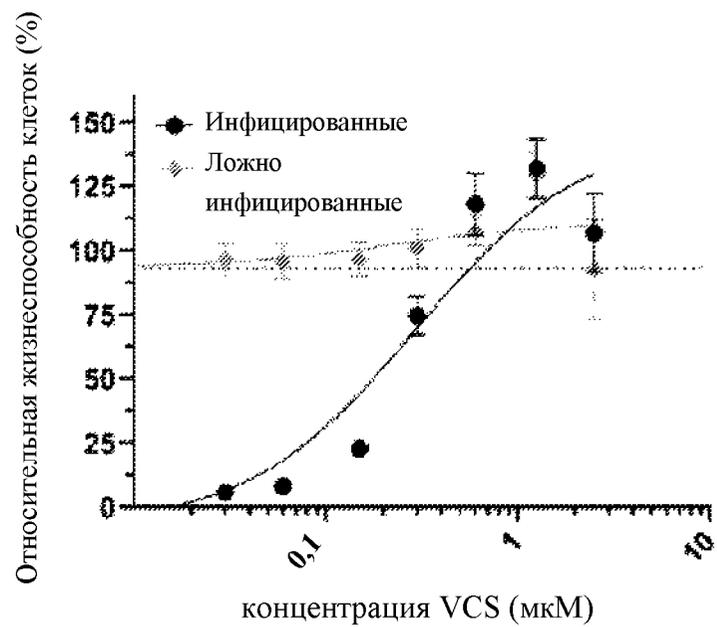


Относительная жизнеспособность клеток (%)

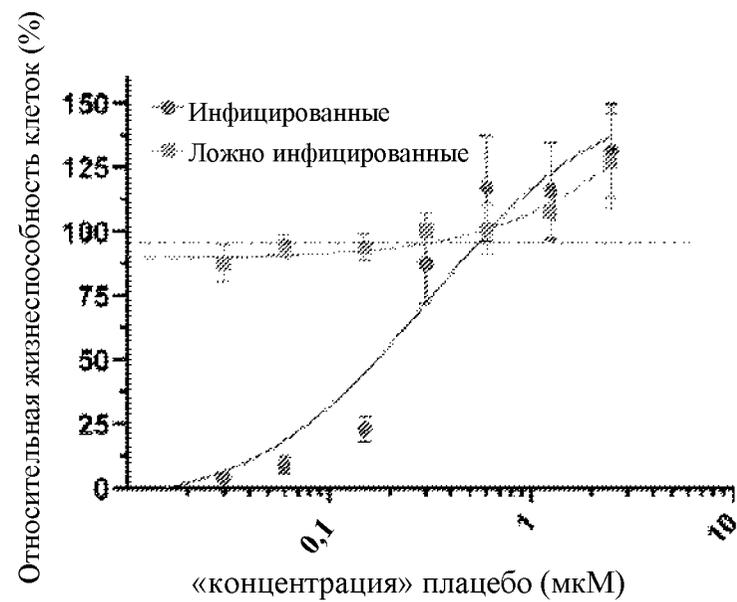
ФИГ. 7Е



ФИГ. 8А



ФИГ. 8В



ФИГ. 9

