

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(11) 030679

(13) B1

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента  
2018.09.28

(21) Номер заявки  
201270077

(22) Дата подачи заявки  
2010.06.23

(51) Int. Cl. A61K 31/426 (2006.01)  
A61P 31/16 (2006.01)

### (54) СОЕДИНЕНИЯ И СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ ГРИППА

(31) 61/220,891

(32) 2009.06.26

(33) US

(43) 2012.12.28

(86) PCT/US2010/039638

(87) WO 2010/151577 2010.12.29

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
РОМАРК ЛЭБОРЕТЕРИЗ Эл.Си. (US)

(72) Изобретатель:  
Росиньоле Жан-Франсуа, Сэмпл Дж.  
Эдвард (US)

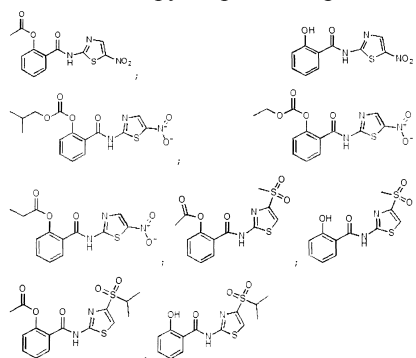
(74) Представитель:  
Медведев В.Н. (RU)

(56) US-A1-20060194853  
US-A1-20040242518  
US-A1-20050112751  
US-A-6136835

Kabanov. Polymer Genomics: An Insight into  
Pharmacology and Toxicology of Nanomedicines.  
Adv Drug Deliv Rev., 2006, Vol 58(15): pp  
1597-1621; entire document esp. pg4

US-B1-6849254  
US-A1-20070004661  
US-A1-20090036467  
US-A1-20100009970

(57) Изобретение относится к способам лечения и предотвращения инфекции гриппа посредством ингибирования процессов созревания НА вируса гриппа с применением соединений, выбранных из



Оно также относится к комбинациям для лечения и предотвращения инфекции гриппа, содержащим соединения по изобретению и другие средства.

B1

030679

030679

B1

### Перекрестные ссылки на родственные заявки

По данной заявке испрашивается приоритет на основании предварительной заявки США № 61/220891, зарегистрированной 26 июня 2009 года, включенной в настоящий документ в качестве ссылки в полном объеме.

### Уровень техники

Изобретение относится к способам и продуктам, использующих тиазолиды для лечения и предотвращения инфекции гриппа.

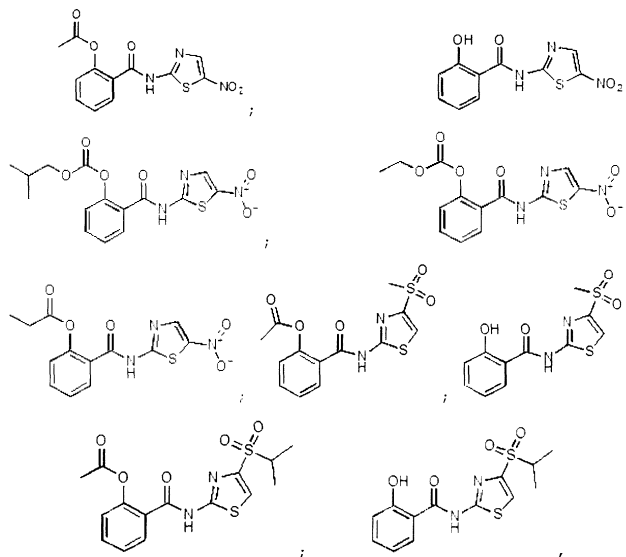
Грипп, высоко контагиозное острое респираторное заболевание, действующее на все возрастные группы, вызывает приблизительно 36000 смертельных случаев и более 226000 случаев госпитализации в год только в США. Классифицируемые (как типы А, В и С) по антигенным различиям в их нуклеопротеине и белке матрикса, вирусы гриппа включают РНК-вирусы с отрицательной цепью; тип А является наиболее клинически важным. Многие субтипы вируса гриппа А отличаются по двум своим поверхностным гликопротеинам, гемагглютинину ("НА") и нейраминидазе ("НА"), являющимся основными мишенями защитного иммунного ответа, и их обозначают по типу гемагглютинина (обозначаемому числом Н) и нейраминидазы (обозначаемому числом N). НА и NA непрерывно меняются в результате антигенного дрейфа и антигенной изменчивости. Известны шестнадцать субтипов Н (или "серотипов") и девять субтипов N.

Появление высоко патогенных штаммов вируса гриппа А, таких как новый свиной грипп H1N1, представляет особенно серьезную угрозу для здоровья людей во всем мире. В дополнение к наблюдению и ранней диагностике, попытки контролировать новые штаммы гриппа ускорили разработку и эффективных вакцин, и новых противовирусных лекарственных средств.

Гемагглютинин вируса гриппа А является тримерным гликопротеином, содержащим 3-9 N-связанных сиквонов гликозилирования на субъединицу в зависимости от штамма. НА исходно синтезируется и гликозилируется в эндоплазматической сети как предшественник массой 75-79 кДа (NA0), собирающийся в нековалентно связанные гомотримеры. Тримеры быстро транспортируются в комплекс Гольджи и достигают цитоплазматической мембраны, где встраивание НА инициирует процесс сборки и созревание вновь образующихся вирусных частиц. Непосредственно до встраивания в цитоплазматическую мембрану или одновременно с ним каждую субъединицу тримера протеолитически расщепляют на два гликопротеина, NA1 и NA2, остающиеся связанными дисульфидной связью.

### Сущность изобретения

Данное изобретение относится к способам лечения и предотвращения вирусной инфекции посредством блокирования созревания вирусного гемагглютинина на стадии, предшествующей достижению устойчивости к расщеплению эндогликозидазой. Лечение и предотвращение осуществляют введением соединения, выбранного из



или его фармацевтически приемлемой соли, в отдельности или в комбинации с другими средствами. Соединения по изобретению проявляют противовирусную активность посредством нового механизма селективного блокирования созревания вирусного поверхностного белка НА, таким образом, нарушая внутриклеточный транспорт и встраивание в цитоплазматическую мембрану клетки-хозяина. Предварительные результаты позволяют предполагать, что соединения по изобретению составляют новый класс противовирусных лекарственных средств, эффективных против инфекции гриппа А. Настоящее изобретение также относится к препарату, содержащему соединение по изобретению, или его фармацевтически приемлемую соль, и эффективное количество дополнительного противовирусного средства, или иммуностимулятора, или вакцины, в качестве комбинированного препарата для раздельного, одновременного

или последовательного применения в противовирусной терапии.

#### **Краткое описание**

Изобретение относится к способам, фармацевтическим композициям и комбинированным препаратам с применением тиазolidов по изобретению для лечения и предотвращения инфекции гриппа посредством ингибирования созревания НА вируса гриппа. В комбинированных препаратах, фармацевтических композициях и способах лечения по настоящему изобретению противовирусное средство может содержать от 1 до 4 соединений или препаратов, а также может включать вакцину и/или иммуностимулятор.

В одном из вариантов осуществления данное изобретение относится к фармацевтической композиции или подразумевает под собой таковую, содержащую терапевтически эффективное количество соединения по изобретению, или его фармацевтически приемлемую соль или сложный эфир, и фармацевтически приемлемый носитель.

В другом варианте осуществления данное изобретение относится к комбинации или подразумевает под собой таковое, применимое для лечения гриппа, содержащее соединение по изобретению, или его фармацевтически приемлемую соль, и другое противовирусное средство.

В более конкретном варианте осуществления данное изобретение относится к комбинации или подразумевает под собой таковое, применимое для лечения гриппа, содержащее соединение по изобретению, или его фармацевтически приемлемую соль, и ингибитор нейраминидазы.

В еще более конкретном варианте осуществления данное изобретение относится к комбинации или подразумевает под собой таковое, применимое для лечения гриппа, содержащее соединение по изобретению, или его фармацевтически приемлемую соль, и иммуностимулятор.

В еще более конкретном варианте осуществления данное изобретение относится к комбинации или подразумевает под собой таковое, применимое для лечения гриппа, содержащее соединение по изобретению, или его фармацевтически приемлемую соль, и пегилированный интерферон.

В еще более конкретном варианте осуществления данное изобретение относится к комбинации или подразумевает под собой таковое, применимое для лечения гриппа, содержащее соединение по изобретению, или его фармацевтически приемлемую соль, и слитый белок рекомбинантной сиалидазы.

В еще более конкретном варианте осуществления данное изобретение относится к комбинации или подразумевает под собой таковое, применимое для лечения гриппа, содержащее соединение по изобретению, или его фармацевтически приемлемую соль, и вакцину.

В еще более конкретном варианте осуществления данное изобретение относится к комбинации или подразумевает под собой таковое, применимое для лечения гриппа, содержащее соединение по изобретению, или его фармацевтически приемлемую соль, и антисмысловой олигонуклеотид.

В еще более конкретном варианте осуществления данное изобретение относится к комбинации или подразумевает под собой таковое, применимое для лечения гриппа, содержащее соединение по изобретению, или его фармацевтически приемлемую соль, и другое противовирусное средство, где два средства вводят, в основном, одновременно.

В еще более конкретном варианте осуществления данное изобретение относится к комбинации или подразумевает под собой таковое, применимое для лечения гриппа, содержащее соединение по изобретению, или его фармацевтически приемлемую соль, и другое противовирусное средство, где два средства вводят, в основном, последовательно.

В другом варианте осуществления данное изобретение относится к способам лечения и предотвращения вирусной инфекции посредством введения соединения по изобретению или его фармацевтически приемлемой соли.

В другом варианте осуществления данное изобретение относится к способам лечения и предотвращения вирусной инфекции посредством введения соединения по изобретению, или его фармацевтически приемлемой соли, в комбинации с иммуностимулятором.

В другом варианте осуществления данное изобретение относится к способам лечения и предотвращения вирусной инфекции посредством введения соединения по изобретению, или его фармацевтически приемлемой соли, в комбинации с ингибитором нейраминидазы.

В другом варианте осуществления данное изобретение относится к способам лечения и предотвращения вирусной инфекции посредством введения соединения по изобретению, или его фармацевтически приемлемой соли, в комбинации с вакциной.

В другом варианте осуществления данное изобретение относится к способам лечения и предотвращения вирусной инфекции посредством введения соединения по изобретению, или его фармацевтически приемлемой соли, в комбинации с антисмысловым олигонуклеотидом.

В другом варианте осуществления данное изобретение относится к способам лечения и предотвращения вирусной инфекции посредством введения соединения по изобретению, или его фармацевтически приемлемой соли, в комбинации с аналогом адамантина.

В другом варианте осуществления данное изобретение относится к комбинированному пакету или набору, применимому для лечения гриппа, содержащему соединение по изобретению, или его фармацевтически приемлемую соль, и ингибитор нейраминидазы.

В другом варианте осуществления данное изобретение относится к комбинированному пакету или

набору, применимому для лечения гриппа, содержащему соединение по изобретению, или его фармацевтически приемлемую соль, и иммуностимулятор.

В другом варианте осуществления данное изобретение относится к комбинированному пакету или набору, применимому для лечения гриппа, содержащему соединение по изобретению, или его фармацевтически приемлемую соль, и аналог адамантина.

В другом варианте осуществления данное изобретение относится к комбинированному пакету или набору, применимому для лечения гриппа, содержащему соединение по изобретению, или его фармацевтически приемлемую соль, и слитый белок рекомбинантной сиалидазы.

В другом варианте осуществления данное изобретение относится к комбинированному пакету или набору, применимому для лечения гриппа, содержащему соединение по изобретению, или его фармацевтически приемлемую соль, и антисмысловый олигонуклеотид.

### **Подробное описание изобретения**

Как используют в настоящем документе, следующие термины обладают указанными значениями.

Как применяют в настоящем документе, если не указано иначе, термин "один или несколько заместителей" относится к числу возможных заместителей от одного до максимального числа на основании числа доступных участков связывания.

Как применяют в настоящем документе, термин "лечение" относится к реверсированию, облегчению, ингибированию прогрессирования или предотвращению нарушения или состояния, к которому применяют такой термин, или одного или нескольких симптомов такого состояния или нарушения. Как применяют в настоящем документе, термин "лечение" относится к действию лечения так, как обозначают "лечение" непосредственно выше.

Термины "комбинация", "комбинированное лечение" и "котерапия" включают введение соединения по изобретению и другого средства в качестве части конкретной схемы лечения, предназначенной для предоставления положительного воздействия от согласованного действия данных терапевтических средств. Положительное воздействие комбинации включает, в качестве неограничивающих примеров, фармакокинетическое или фармакодинамическое совместное действие, обусловленное комбинацией терапевтических средств. Введение данных терапевтических средств в комбинации, как правило, осуществляют в течение определенного периода времени (как правило, минуты, часы, дни или недели, в зависимости от выбранной комбинации).

Как правило, "комбинированное лечение" не предназначено для включения введения двух или более из данных терапевтических средств в качестве части отдельных монотерапевтических схем лечения, случайно и произвольно приводящих к комбинации по настоящему изобретению. "Комбинированное лечение" предназначено для включения введения терапевтических средств, в основном, одновременным образом или последовательным образом. В основном, одновременное введение можно осуществлять, например, введением одной капсулы, содержащей фиксированное соотношение терапевтических средств, или введением одной капсулы для каждого из терапевтических средств. И последовательное, и, в основном, одновременное введение терапевтических средств можно осуществлять любым подходящим способом, включая в качестве неограничивающих примеров пероральные способы, внутривенные способы, внутримышечные способы и прямую абсорбцию через ткани слизистой оболочки. Терапевтические средства можно вводить одним и тем же способом или различными способами. Например, первое терапевтическое средство из выбранной комбинации можно вводить внутривенной инъекцией, в то время как другие терапевтические средства из комбинации можно вводить перорально. Альтернативно, например, все терапевтические средства можно вводить перорально или все терапевтические средства можно вводить внутривенной инъекцией. Порядок, в котором вводят терапевтические средства, может являться критичным или может являться некритичным. "Комбинированное лечение" также может включать введение терапевтических средств, как описано выше, в дополнительной комбинации с другими биологически активными ингредиентами (в качестве неограничивающих примеров, такими как различные противовирусные средства, вакцины или иммуностимуляторы), а также безмедикаментозными способами терапии, включая питательные добавки.

Термин "соли" применяют в его широчайшем смысле. Например, термин соли включает кислые и основные соли с ионами настоящего соединения. В некоторых вариантах осуществления термин соль может являться подклассом, обозначаемым как фармацевтически приемлемые соли, являющиеся солями настоящих соединений, обладающими фармакологической активностью и не являющимися биологически или иным образом нежелательными. Во всех вариантах осуществления с кислотами могут образовываться соли, такие как, в качестве неограничивающих примеров, кислые соли, галогениды, ацетат, адипинат, альгинат, аспартат, бензоат, бензолсульфонат, бисульфат, бутират, цитрат, камфорат, камфоро-сульфонат, циклопентанпропионат, диглюконат, додецилсульфат, этансульфонат, фумарат, глюкогептаноат, глицерофосфат, гемисульфат, гептаноат, гексаноат, гидрохлорид гидробромид, йодогидрат, 2-гидроксиэтан сульфат, лактат, малеат, метансульфонат, 2-нафталенсульфонат, никотинат, оксалат, тиоцианат, тозилат и ундеканат. Во всех вариантах осуществления с основаниями могут образовываться соли, такие как, в качестве неограничивающих примеров, гидроксид, соли аммония, соли щелочных металлов, такие как литиевые, натриевые и калиевые соли, соли щелочноземельных металлов, такие как

кальциевые, магниевые соли, соли алюминия, соли с органическими основаниями, такими как аммиак, метиламин, диэтиламин, этаноламин, дициклогексиламин, N-метилморфолин, N-метил-D-глюкамин, и соли с аминокислотами, такими как аргинин и лизин.

Основные азотосодержащие группы можно кватернизировать средствами, включающими галогениды низших алкилов, такими как метил-, этил-, пропил- и бутилхлориды, бромиды и йодиды; диалкилсульфаты, такие как диметил-, диэтил-, дибутил- и диамилсульфаты; галогениды с длинной цепью, такие как децил-, лаурил-, миристил- и стеарилхлориды, бромиды и йодиды; и аралкилгалогениды, такие как бензил- и фенэтилбромиды.

Как применяют в настоящем документе, термины "терапевтически приемлемая соль" и "фармацевтически приемлемая соль" представляют соли и цвиттерионные соли соединений по настоящему изобретению, растворимые в воде или масле или дисперсные; подходящие для лечения заболевания без чрезмерной токсичности, раздражения и аллергического ответа;

соответствующие пригодному соотношению польза/риск; и эффективные для их предполагаемого применения. Соли можно получать при конечном выделении и очистке соединений или отдельно посредством реакции соответствующего соединения в форме свободного основания с подходящей кислотой. Общепринятые кислые соли присоединения включают ацетат, адипинат, альгинат, L-аскорбат, аспартат, бензоат, бензол сульфат (бесилат), бисульфат, бутират, камфорат, камфоросульфат, цитрат, диглюконат, формиат, fumarat, гентизинат, глутарат, глицерофосфат, гликолят, гемисульфат, гептаноат, гексаноат, гиппурат, гидрохлорид, гидробромид, йодогидрат, 2-гидроксиэтансульфонат (изетионат), лактат, малеат, малонат, DL-соль миндальной кислоты, мезитиленсульфонат, метансульфонат, нафтиленсульфонат, никотинат, 2-нафталенсульфонат, оксалат, памоат, пектинат, персульфат, 3-фенилпропионат, фосфонат, пикрат, пивалат, пропионат, пироглютамат, сукцинат, сульфат, пируват, L-пируват, трихлорацетат, трифторацетат, фосфат, глутамат, бикарбонат, пара-толуолсульфонат (п-тозилат) и ундеканат. Кроме того, основные группы в соединениях по настоящему изобретению можно кватернизировать метил-, этил-, пропил- и бутилхлоридами, бромиды и йодиды; диметил-, диэтил-, дибутил- и диамилсульфатами; децил-, лаурил-, миристил и стеарилхлоридами, бромиды и йодиды; и бензил- и фенэтиlbромиды. Примеры кислот, которые можно применять для образования терапевтически приемлемых солей присоединения, включают неорганические кислоты, такие как соляная, бромистоводородная, серная и фосфорная, и органические кислоты, такие как щавелевая, малеиновая, янтарная и лимонная. Соли также можно получать координированием соединений с щелочным металлом или щелочноземельным ионом. Таким образом, настоящее изобретение подразумевает под собой натриевые, калиевые, магниевые и кальциевые соли соединений по настоящему изобретению и т.п.

Основные соли присоединения можно получать при конечном выделении и очистке соединений посредством реакции карбоксильной, фенольной или схожей группы с подходящим основанием, таким как гидроксид, карбонат или бикарбонат металла, или с аммиаком или органическим первичным, вторичным или третичным амином. Катионы терапевтически приемлемых солей включают литий, натрий, калий, кальций, магний и алюминий, а также нетоксичные катионы четвертичных аминов, такие как аммоний, тетраметиламмоний, тетраэтиламмоний, метиламин, диметиламин, триметиламин, триэтиламин, диэтиламин, этиламин, трибутиламин, пиридин, N,N-диметиланилин, N-метилпиперидин, N-метилморфолин, дициклогексиламин, прокаин, дибензиламин, N,N-дибензилфенэтиламин, 1-эфенамин и N,N'-дибензилэтилендиамин. Другие общепринятые органические амины, применимые для образования основных солей присоединения, включают этилендиамин, этаноламин, диэтанолламин, пиперидин и пиперазин.

Термин "сольваты" применяют в его широчайшем смысле. Например, термин "сольваты" включает гидраты, образующиеся, когда соединение по настоящему изобретению содержит одну или несколько связанных молекул воды.

Термин "носитель" применяют в его широчайшем смысле. Например, термин "носитель" относится к любым носителям, разбавителям, эксципиентам, увлажнителям, буферным средствам, суспендирующим средствам, смазкам, адъювантам, средствам, системам доставки, эмульгаторам, разрыхлителям, абсорбентам, консервантам, поверхностно-активным веществам, красителям, ароматизаторам и подсластителям. В некоторых вариантах осуществления носитель может являться фармацевтически приемлемым носителем, термин - более узкий, чем носитель, т.к. термин "фармацевтически приемлемый носитель" означает нетоксичный, являющийся пригодным для применения в фармацевтической композиции.

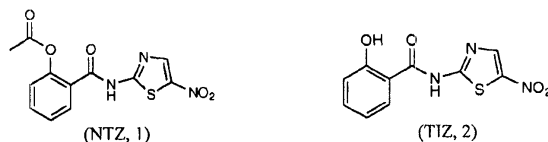
Настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции, содержащей в фармацевтически приемлемом носителе эффективное количество по меньшей мере одного соединения по изобретению.

Термин "эффективное количество" применяют в его широчайшем смысле. Например, термин относится к количеству, необходимому для получения желаемого эффекта.

#### **Подробное описание изобретения**

В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение воздействует на созревание вирусного гемагглютинина и дает возможность нарушать продукцию инфекционных вирусных частиц на стадии, отличающейся от таковой, предусмотренной доступными в настоящее время противогриппозными лекарственными средствами. В другом варианте осуществления изобретение относится к способам лечения

и предотвращения вирусной инфекции у людей и других млекопитающих посредством введения эффективных количеств соединения по изобретению или позволяют предполагать таковые. Одним таким соединением является нитазоксанид (1), лицензированный в США препарат для лечения инфекционного гастроэнтерита, в настоящее время проходящий фазу II клинических испытаний для лечения хронического гепатита С в США и за их пределами. Показано, что лекарственное средство является безопасным и эффективным даже при применении в течении года, и в любое время в будущем можно начинать фазу II клинических испытаний для лечения гриппа. В последнее время в клинических испытаниях продемонстрировали коммерчески доступные фармацевтические составы нитазоксанида для лечения ротавирусного гастроэнтерита и хронического гепатита В и С.



### Экспериментальные способы

#### Материалы и способы

##### Материалы

Нитазоксанид (NTZ, 1), тизоксанид (TIZ, 2) и аналоги тиазолида и контрольное соединение свайнсонин (SW) (Sigma-Aldrich) растворяли в диметилсульфоксиде (DMSO). Туникамицин (TM) и 1-дезоксиманноджиримицин (DMJ) (Sigma-Aldrich) растворяли в водном растворе.

##### Способы для исследований гриппа

Культура клеток, обработка и трансфекция - клетки Мадин-Дарби почек собаки (MDCK) и альвеолярные типа II-подобные эпителиальные клетки человека A549, Т-лимфобластные клетки Jurkat и моноцитарные лейкозные клетки U937 выращивали при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> в RPMI 1640 (Invitrogen), дополненной 10% эмбриональной телячьей сывороткой (FCS), 2 мМ глутамином и антибиотиками.

Тестируемые соединения добавляли непосредственно после 1-часового периода адсорбции и хранили в среде для культивирования в течение всего времени эксперимента, если не указано иначе. Контроли получали эквивалентные количества средства, не влияющие на жизнеспособность клетки или репликацию вируса. Жизнеспособность клетки определяли посредством анализа превращения 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид (MTT) в MTT формазан (Sigma-Aldrich), как описано ранее. Микроскопическое исследование инфицированных имитацией или инфицированных вирусом клеток осуществляли с применением микроскопа Leica DM-IL, и изображения записывали на камеру Leica DC 300 с применением программного обеспечения Leica Image-Manager500.

Для экспериментов с трансфекцией клетки MDCK, высеваемые на камеры с покровными стеклами LabTekII (Nunch-Thermo Fisher Scientific Inc.), временно трансфицировали плазмидой с меченным зеленым флуоресцентным белком (GFP) дефектным по интернализации мутантом рецептора липопротеинов низкой плотности человека (hLDLR) (плазида LDLR-A18-GFP, любезно предоставленная E. Rodriguez-Boulan, Cornell University New York, NY) с применением липофектамина 2000 (Invitrogen) по инструкциям производителя.

Получение вируса, инфицирование и титрование - для данного исследования применяли четыре различных вируса гриппа А, H1N1 A/PR/8/34 (PR8) и A/WSN/33 (WSN), и H3N2 A/Firenze/7/03 (A/FI) млекопитающих и низкопатогенный птичий штамм H5N9 A/Ck/It/9097/97 (A/Ck), а также вирус гриппа В, клинический изолят В/Parma/3/04. Вирусы гриппа А/Firenze/7/03, A/Ck/It/9097/97 и В/Parma/3/04 любезно предоставлены Dr. Isabella Donatelli, Istituto Superiore di Sanita', Rome, Italy. Птичий штамм A/Ck/It/90 97/97 выделяли после исходного пассажа гомогенатов органов курицы в 10-дневные несодержащие специфических патогенов (SPF) яйца курицы с зародышем. Вирусы гриппа А выращивали в аллантоисной полости 8-дневных яиц с зародышем. После 48 ч при 37°C собирали аллактоисную жидкость и центрифугировали при 5000 об/мин в течение 30 мин для удаления продуктов распада клеток, и титры вируса определяли титрованием гемагглютининов и анализом розеткообразования в соответствии со стандартными способами. Конфлюэнтные клеточные монослои инфицировали вирусом гриппа в течение 1 ч при 37°C при множественности заражения (m.o.i.) 5 клеток HAU/105, если не указано иначе. После периода абсорбции (время 0) удаляли вирусный инокулят, и клеточные монослои три раза промывали фосфатно-солевым буфером (PBS). Клетки хранили при 37°C в среде для культивирования RPMI 1640, содержащей 2% эмбриональную телячью сыворотку. Для получения многоступенчатых кривых роста вируса инфицированные клетки инкубировали в той же среде, содержащей 1 мкг/мл трипсина IX (Sigma-Aldrich). Урожай вируса определяли титрованием гемагглютининов через 2:4 или 48 ч после инфицирования (p.i.). Для анализа инфективности вируса PR8 выращиваемые в 96-луночных планшетах клетки MDCK инокулировали серийными разведениями суспензии вируса в присутствии 1 мкг/мл трипсина в течение 48 ч при 37°C и определяли TCID<sub>50</sub> (50% инфицирующую дозу в культуре ткани), как описано. Альтернативно, титры вируса определяли на клетках MDCK, подсчитывая количества флуоресцентных клеток после инфицирования и непрямого иммуофлуоресцентного окрашивания с антителами против

гриппа A/PR/8/34 (анти-PRS, любезно предоставленные E. Rodriguez - Boulan, Cornell University New York, NY). Титры соответствующим образом выражали как ffu (вызывающие флуоресценцию единицы)/мл.

Метаболическое мечение, анализ синтеза белка и зестерн-блоттинг - инфицированные имитацией или инфицированные вирусом гриппа клетки метили 10 мкКи/мл [35S]-метионин-цистеина ([35S]-Met/Cys, смесь для *in vitro* мечения клеток Redivue Pro-Mix 35S; GE Healthcare) в течение указанного времени после 30 мин выращивания на среде без метионина/цистеина. Для экспериментов по вытеснению метки клетки метили [35S]-Met/Cys (100 мкКи/мл) в течение 15 мин после 30 мин выращивания на среде без метионина/цистеина. В конце мечения клетки высевали в полную среду, содержащую 10 мМ холодного метионина и 1 мМ циклогексимида в течение различного времени в отсутствие или присутствии TIZ. Вытеснение метки прекращали, помещая клетки на лед. После лизиса клеток в буфере RIPA (150 мМ NaCl, 10 мМ Tris-HCl pH 7,5, 4 мМ ЭДТА, 1% Тритон X-100, 600 мМ KCl), содержащем 1 мМ фенилметилсульфонилфторида (PMSF) и смесь ингибиторов протеаз (PIC; Roche Diagnostics GmbH), образцы, обладающие одинаковой радиоактивностью, разделяли электрофорезом в ПААГ в присутствии SDS (3% концентрирующий гель, 10% разделяющий гель) и обрабатывали для автордиографии, как описано. Автордиографические паттерны визуализировали и количественно оценивали на Typhoon-8600 Imager (Molecular Dynamics, Amersham Pharmacia Biotech) и получали изображения с применением программного обеспечения ImageQuant (Amersham Pharmacia Biotech) (анализ MDP).

Для анализа встраиваемых в вирусные частицы белков инфицированные PR8 или инфицированные имитацией клетки MDCK, обработанные TIZ, TM или средством после адсорбции вируса метили, [35S]-Met/Cys (25 мкКи/мл, 21-часовое мечение) через 3 ч p.i. в присутствии лекарственных средств. Через 24 ч p.i. собирали супернатанты культур клеток и подвергали центрифугированию при 13000 об/мин в течение 10 мин для удаления продуктов распада клеток и затем ультрацентрифугированию при 45000 об/мин (ультрацентрифуга Beckman XL-100K, ротор 70.1Ti; Beckman Coulter Inc.) в течение 2 ч. Содержащие вирусные частицы осадки ресуспендировали в буфере для образцов Лемли, и радиоактивно меченые белки разделяли электрофорезом в 10% ПААГ в присутствии SDS, и исследовали посредством автордиографии после воздействия флюорографического реагента Amplify™ (GE Healthcare).

Автордиографические паттерны визуализировали, как описано выше.

Для анализ вестерн-блоттингом клетки лизировали холодным солевым буфером для экстракции (HSB), содержащим 2 мМ дитиотреитола (DTT), 1 мМ PMSF, 1 мМ ортованданата, 20 мМ β-глицерофосфата, 1 мМ п-нитрофенилфосфата (pNPP) и PIC, или буфером RIPA, содержащим 1 мМ PMSF и PIC. Экстракты из целых клеток (30 мкг) разделяли электрофорезом в ПААГ в присутствии SDS, проводили блоттинг с нитроцеллюлозой и инкубировали фильтры с поликлональными антителами против фосфо Ser51-eIF2α (p-eIF2α, Calbiochem), против eIF2α (FL-315, Santa Cruz Biotechnology) и антителами против гриппа A/PR/8/34 или моноклональными анти-НА (IVC102; Biondesign Inc.) и анти-Grp78/BiP (Stressgene) антителами с последующим добавлением меченных пероксидазой антител IgG против кролика или IgG против мыши (Super Signal detection kit; Pierce). Количественное определение белков проводили анализом Versadoc-1000 с применением программного обеспечения Quantity One, доступного в BIO-RAD Laboratories.

Иммунопреципитация HA0 - инфицированные PR3 или инфицированные имитацией клетки MDCK, обработанные 10 мкг/мл TIZ или контрольным разбавителем после адсорбции вируса, метили через 5 или 6 ч p.i. [35S]-Met/Cys (70 мкКи/мл, 4-часовое мечение) после 30 мин выращивания в среде без метионина/цистеина. После лизиса в буфере RIPA в присутствии PIC и 1 мМ PMSF продукты распада клеток удаляли центрифугированием на холоде при 13000 об/мин в течение 10 мин. Радиоактивно меченые лизаты (50 мкл) инкубировали с моноклональными антителами против НА (IVC102; Biondesign Inc.) в буфере RIPA, содержащем 1 мМ PMSF, PIC и протеин-A-сефарозу (Sigma-Aldrich), при 4°C в течение 16 ч. После центрифугирования осадки 3 раза промывали буфером RIPA и элюировали в буфер для образцов Лемли (20) при 95°C в течение 5 мин. Иммунопреципитированные образцы подвергали расщеплению Endo-H (как описано ниже) и/или обрабатывали для электрофореза в ПААГ в присутствии SDS (3% концентрирующий гель, 10% разделяющий гель) и автордиографии после воздействия флюорографического реагента Amplify™. Автордиографические паттерны визуализировали на Typhoon-8600 Imager и получали изображения, как описано выше.

Анализ гликозилирования, тримеризации и процессинга гемагглютинина - инфицированные имитацией или инфицированные вирусом гриппа клетки метили 20 мкКи/мл [3H]-маннозы или [3H]-глюкозамина гидрохлорида (GE Healthcare) в течение 4 ч через 6 ч p.i. и затем обрабатывали для электрофореза в ПААГ в присутствии SDS (3% концентрирующий гель, 10% разделяющий гель) и автордиографии, как описано выше. Для экспериментов по расщеплению эндогликозидазой клетки MDCK инфицировали вирусом гриппа PR8, промывали от несвязанного вируса и инкубировали в присутствии или отсутствие 10 мкг/мл TIZ. Через 5 ч p.i. клетки метили [35S]-Met/Cys (50 мкКи/мл, 4-часовое мечение) после 30 мин выращивания в среде без метионина/цистеина. В конце мечения удаляли радиоактивную среду и клетки помещали на лед. После лизиса в буфере L (100 мМ NaCl, 10 мМ Tris-HCl pH 7,5, 5

мМ ЭДТА, 1% Тритон X-100, 0,1% SDS) в присутствии PIC и 1 мМ PMSF и центрифугирования на холоде при 13000 об./мин в течение 10 мин образцы, обладающие одинаковой радиоактивностью, обрабатывали для расщепления эндогликозидазой H (Endo-H) или пептид-N-гликозидазой F (PNGase-F). Для расщепления Endo-H иммунопреципитированные с моноклональными антителами против HA (как описано выше) образцы или неиммунопреципитированные образцы инкубировали в 100 мкл 0,1% SDS и 140 мМ β-меркаптоэтанола в 100 мМ цитрата натрия (pH 5,5) и нагревали в течение 5 мин при 95°C. После добавления 1 мМ PMSF и PIC образцы делили на две эквивалентные аликвоты, и одну аликвоту инкубировали с 5 мЕ Endo-H (Roche Diagnostics GmbH) в течение 16 ч при 37°C. Расщепление пептид-N-гликозидазой осуществляли с 500 Е PNGase-F по протоколу производителя (New England BioLabs Inc.). Расщепление прекращали добавлением буфера для образцов Лемли. Образцы нагревали при 95°C в течение 5 мин до нанесения на гели для электрофореза в 10% ПААГ в присутствии SDS. Для анализа образования тримеров осуществляли поперечную сшивку HA посредством добавления 1:10 объема DMSO, содержащего 0,2 мМ EGS [этиленгликоль-бис(сукцинимидилсукцинат); Pierce], к экстрактам целых клеток из инфицированных имитацией или инфицированных PR8 клеток MDCK. После 15 мин при 22°C реакции прекращали добавлением глицина при конечной концентрации 75 мМ, и образцы подвергали электрофорезу в ПААГ в присутствии SDS (6% разделяющий гель). Поперечно-сшитые продукты HA визуализировали исследованием с моноклональными антителами против HA или поликлональными антителами против PR8.

Иммунофлуоресцентная микроскопия - Инфицированные PR8 клетки MDCK и инфицированные WSN клетки A549, выращиваемые на покровных стеклах, фиксировали 4% параформальдегидом в фосфатно-солевом буфере в течение 20 мин при комнатной температуре через 16 или 24 ч p.i, соответственно. Инфицированные имитацией клетки обрабатывали схожим образом. Фиксированные клетки инкубировали с моноклональными антителами против HA (IVC102; Biodesign Inc.) в течение 1 ч при 37°C для окрашивания цитоплазматической мембраны или пермеабилizировали 0,1% Тритон X100-PBS в течение 10 мин при комнатной температуре и затем инкубировали с моноклональными антителами против HA и против p230 транс-Гольджи (клон 15; BD Biosciences) или поликлональными антителами против α-тубулина (11H10; Cell Signaling, Technology Inc.) в течение 1 ч при 37°C с последующим добавлением конъюгированных с Alexa Fluor488 (Molecular Probes-Invitrogen) или конъюгированных с родамином (Pierce) IgG козла против мыши, и конъюгированных с родамином IgG козла против кролика (Pierce). Ядра окрашивали 4',6-диамидино-2-фенилиндолом (DAPI) или Хехст 33342 (Molecular Probes, Invitrogen). Изображения получали и восстанавливали из свертки на микроскопе Delta Vision (Applied-Precision) с применением программного обеспечения Soft WoRx-2,50 (Applied-Precision). Контрольные инкубации не демонстрировали перекрестной реактивности между антииммуноглобулиновыми конъюгатами или между антииммуноглобулиновым конъюгатом и неродственным первичным антителом. Представлены изображения типичного эксперимента из трех со схожими результатами.

Для определения направленности рецептора липопротеинов низкой плотности человека (hLDLR) к цитоплазматической мембране помещенные в камеры с покровными стеклами клетки MDCK временно трансфицировали меченным GFP дефектным по интернализации мутантом hLDLR (плазмида LDLR-A 18-GFP) и через 8 ч обрабатывали TIZ (10 мкг/мл) или средством в течение следующих 16 ч. После блокирования синтеза белка 100 мкг/мл циклогексимида (Sigma-Aldrich) в течение 1 ч цитоплазматические мембраны окрашивали с применением красителя для цитоплазматической мембраны CellMask™ Orange (Molecular Probes, Invitrogen). После окрашивания клетки исследовали с применением флуоресцентного микроскопа Leica DM-IL, оборудованного УФ-фильтрами возбуждения. Изображения получали на камере Leica DC-300 с применением программного обеспечения Leica Image-Manager500.

Анализ гемадсорбции - монослои инфицированных имитацией или PR8 клеток MDCK обрабатывали TIZ, TM или средством после адсорбции вируса. Для ингибирования активности нейраминидазы через 5 часов p.i. клетки три раза промывали PBS и инкубировали с 0,1% эритроцитами человека (RBC) в PBS в течение 20 мин при 4°C. После удаления несвязанных эритроцитов трехкратным промыванием PBS RBC, адсорбированные на поверхности клеток MDCK, определяли фазово-контрастной микроскопией. Изображения получали на микроскопе Leica DMLB, оборудованном камерой Leica DC300, с применением программного обеспечения Leica Image-Manager500. Прикрепленные эритроциты лизировали в 150 мМ буфере NH<sub>4</sub>Cl в течение 2 ч при комнатной температуре и количественно оценивали посредством измерения абсорбции гемоглобина при λ=540 нм.

Статистический анализ - статистический анализ осуществляли с применением критерия Стьюдента для непарных данных. Данные выражали как среднее + S.D. для параллельных образцов. P<0,05 считали значимыми.

### Результаты

Противовирусная активность тиазolidов против различных штаммов вируса гриппа А. Исследовали эффект обработки тиазolidами на клетках человека и собаки после инфицирования четырьмя различными штаммами вируса гриппа А: вирусы млекопитающих H1N1 A/PR/8/34 (PR8), и A/WSN/33 (WSN), и H3N2 A/Firenze/7/03 (A/FT), и низкопатогенный птичий штамм H5N9 A/Ck/It/9097/97 (AJCK). Клетки



Мадин-Дарби почек собаки (MDCK), инфицированные вирусами гриппа PR8, WSN или A/Ck, обрабатывали различными концентрациями NTZ, TIZ или средства непосредственно после периода адсорбции вируса и определяли урожай вируса, через 24 ч после инфицирования (p.i.). Обработка NTZ вызывала дозозависимое ингибирование репликации вируса с EC<sub>50</sub> 1, 0,5 и 1 мкг/мл для вирусов PR8, WSN и A/Ck, соответственно (фиг. 1B). TIZ являлся столь же активным против всех штаммов гриппа А с EC<sub>50</sub> 1 мкг/мл (PR8) и 0,5 мкг/мл (WSN и A/Ck) (фиг. 1B). TIZ также являлся очень эффективным в ингибировании репликации вирусов гриппа А H3N2 A/FI и гриппа В В/Parma/3/04 (фиг. 10 и 11). Ни NTZ, ни TIZ не являлись цитотоксичными в эффективной противовирусной концентрации для неинфицированных клеток (CC<sub>50</sub>>50 мкг/мл). В дополнение к клеткам MDCK собаки, как правило, применяемым для исследований вируса гриппа, TIZ являлся эффективным в ингибировании репликации вируса гриппа А в субмикромольных (EC<sub>50</sub>=0,3 мкг/мл) нетоксичных концентрациях в различных типах клеток человека, включая моноцитарные U937, Т-лимфоцитарные клетки Jurkat и альвеолярные тип II-подобные клетки A549 (фиг. 1C). Противогриппозная активность TIZ не зависела от m.o.i. инфекции, и значительное блокирование репликации вируса H1N1 PR8 в равной степени определяли в условиях много- и одноступенчатого роста вируса (фиг. 10 C,D). Противовирусная активность некоторых тиазолидов против вируса гриппа А PR8 приведена в табл. 1. Обнаруживали, что среди исследуемых тиазолидов эффективными и селективными являются NTZ (1), TIZ (2), натриевая соль тизоксанида (3), соединения 14-16, 27, 28, 36 и 37. Соединения 27 и 28 являлись высокоселективными и в 10 раз более эффективными, чем NTZ и TIZ, каждый с EC<sub>50</sub>=0,1 мкг/мл и CC<sub>50</sub>>50 мкг/мл.

В табл. 1 представлены данные клеточного анализа, гриппа А для тиазолидов. Примеры 3, 17, 29-35 и 38, 39, 51-44, 59 и 63-66 в табл. 1 являются ссылочными и не включены в объем настоящего изобретения.

Таблица 1. Результаты клеточного анализа гриппа А (PR8, клетки MDCK)

№	Урожай вируса		Токсичность	
	EC <sub>50</sub>	EC <sub>90</sub>	LD <sub>50</sub> (MTT)	S. I.
	мкг/мл	мкг/мл	мкг/мл	LD <sub>50</sub> /EC <sub>50</sub>
1	1	7	>50	>50
2	1	9	>50	>50
3	0.4	2.5	>50	>125
14	1	8	20	20
15	1	7	30	30
16	1	8	20	20
17	3	9	>50	>16.7
27	0.1	0.8	>50	>500
28	0.1	0.7	>50	>500
29	10	>50	>50	>5
30	10	>50	>50	>5
31	>50	>50	>50	ND
32	>50	>50	>50	ND
33	>50	>50	>50	ND
34	>50	>50	>50	ND
35	>50	>50	>50	ND
36	1	8	>50	>50
37	0.6	15	>50	>83.3
38	25	>50	>50	>2
39	10	30	>50	>5
51	3.5	9	30	9
52	30	>50	>50	>1.6
53	10	>50	>50	>5
54	10	>50	>50	>5
59	5	30	>50	>10
63	10	>50	>50	>5
64	>50	>50	>50	ND
65	>50	>50	>50	ND
66	>50	>50	>50	ND

Тиазолиды действуют на уровне после проникновения. Для исследования того, может ли обработка тиазолидами до адсорбции вируса защищать клетки-хозяев от вирусной инфекции, клетки MDCK обрабатывали 10 мкг/мл TIZ в течение 12, 6 или 3 ч. В указанное время лекарственное средство удаляли и до инфицирования вирусом PR8 промывали монослои клеток три раза.

Как показано на фиг. 1D (pre), предварительная обработка клеток тизоксанидом (2) в течение до 12 часов до инфицирования вирусом не оказывает эффект на репликацию вируса гриппа. Кроме того, обработка вирусного инокулята (данные не приводят) или обработка клеток только в течение периода адсорбции не ингибирует репликацию вируса (фиг. 1D), свидетельствуя о том, что лекарственное средство не действует непосредственно ни на инфективность вируса, ни на его связывание или проникновение в клетки-мишени. Обработка TIZ, производимая между 0 и 3 ч p.i., являлась наиболее эффективной в ингибировании репликации вируса (фиг. 1D, post). Обработка, начатая в 6 часов p.i., являлась менее эффективной, но все еще способной ингибировать репликацию вируса, в то время как лекарственное средство являлось неэффективным при введении через 12 ч p.i. Однократное введение лекарственного средства после адсорбции вируса являлось эффективным в ингибировании репликации вируса в течени, по меньшей мере 48 ч после инфицирования (фиг. 1E).

Тиазолиды селективно изменяют созревание вирусного гемагглютинина. Для исследования того, вызвана ли противогриппозная активность тиазолидов изменениями синтеза белков, инфицированные имитацией или инфицированные PR8 клетки, обработанные TIZ вскоре после адсорбции вируса, метили [35S]-метионин-цистеином ([35S]-Met/Cys) в различное время p.i. и анализировали белки электрофорезом в ПААГ в присутствии SDS и автордиографией или анализом вестерн-блоттинга. Как показано на фиг. 2A, TIZ не ингибирует синтез белка хозяина (внизу), не вызывает определяемые изменения электрофоретического паттерна синтезируемых полипептидов (вверху); кроме того, TIZ не влияет на фосфорилирование эукариотического фактора инициации  $2\alpha$  (eIF2- $\alpha$ ) (в середине) в неинфицированных или инфицированных PR8 клетках. Обнаруживали, что основные белки вируса гриппа синтезируются в больших количествах в необработанных клетках, начиная с 4 ч p.i.; но основные изменения в синтезе белков вируса определяли в обработанных клетках, за исключением исчезновения полосы, соответствующей молярной массе приблизительно 79 кДа, впоследствии идентифицированной как зрелая изоформа предшественника гемагглютинина, и одновременного появления движущейся быстрее полосы 74 кДа (фиг. 2A).

Для определения того, изменяет ли селективно обработка TIZ синтез HA, обработанные TIZ (10 мкг/мл) инфицированные имитацией или инфицированные PR8 клетки MDCK метаболически метили через 5 ч p.i. (4-часовое мечение), и радиоактивно меченые белки иммунопреципитировали моноклональными антителами против гемагглютинина, и затем обрабатывали для электрофореза в ПААГ в присутствии SDS и автордиографии. Представленные на фиг. 2B данные указывают на белок, чью электрофоретическую подвижность изменяет TIZ, как на предшественник вирусного HA0. Для определения того, являлась ли TIZ-индуцируемая модификация HA0 временной, инфицированные имитацией или инфицированные PR8 клетки MDCK, обработанные TIZ (10 мкг/мл) или ингибитором N-гликозилирования туникамицином, (TM, 5 мкг/мл) метаболически метили через 3 часа p.i. в течение следующих 15 часов и анализировали белки электрофорезом в ПААГ в присутствии SDS и автордиографией. Альтернативно, инфицированные PR8 клетки метили через 5 ч p.i. и затем вытесняли в присутствии 10 mM холодного метионина и 1 mM циклогексимида в течение следующих 3 ч p.i. Как показано на фиг. 2C, TIZ-индуцируемая посттрансляционная модификация HA0 все еще являлась очевидной через 18 ч p.i., и, по-видимому, отличалась от TM-индуцируемого изменения, на что указывает отличающийся паттерн электрофоретической подвижности двух форм HA0; кроме того, в то время как TM вызывал снижение накопления HA0, как описано выше, продолжительная обработка TIZ не снижала внутриклеточные уровни в инфицированных клетках. В отличие от TM, TIZ не индуцирует экспрессию регулируемого глюкозой белка шока Grp78/BiP, маркера ответа на свернутый белок, в клетках MDCK (фиг. 2C). Результаты экспериментов с вытеснением свидетельствовали о том, что в необработанных клетках HA0 достигает зрелой формы массой 79 кДа между 10 и 20 мин после синтеза, в то время как в присутствии TIZ движущаяся медленнее форма HA0 массой 74 кДа начинает появляться позднее (30 мин) после синтеза (фиг. 2D), и не определяли дальнейшего изменения в ее электрофоретической подвижности в следующие 2,5 часа (данные не представлены).

Для определения того, ингибирует ли TIZ гликозилирование HA0, инфицированные PR8 клетки обрабатывали TIZ или туникамицином после адсорбции вируса и через 6 ч p.i. метили [35S]-Met/Cys, [3H]-глюкозамином или [3H]-маннозой. Как показано на фиг. 3A, в то время как TM полностью предотвращал гликозилирование HA0, обработка TIZ не снижала глюкозамин и фактически повышала встраивание маннозы в незрелую форму HA0. Однако тиазолид, по-видимому, действует иначе, чем ингибиторы  $\alpha$ -маннозидазы I 1-дезоксиманноджирмицин и  $\alpha$ -маннозидазы II свайнсонин, на что указывает различная электрофоретическая подвижность TIZ-индуцированного незрелого HA0 по сравнению с формами HA0, присутствующими в обработанных двумя ингибиторами клетках (фиг. 3B).

Известно, что на созревание HA влияют механизм гликозилирования в клетке-хозяине и штамм ви-

руса. Для определения того, является ли изменение HA0 специфичным для вируса PR8 или клеточнозависимым, клетки эпителия легкого человека A549 инфицировали штаммом WSN гриппа А человека, в то время как клетки MDCK инфицировали птичьим штаммом A/Ck. В обоих случаях определяли изменения в созревании HA0, аналогичные описываемым для штамма PR8 (фиг. 3, С и D), что свидетельствует о том, что TIZ способен ингибировать созревание HA0 независимо от типа клетки-хозяина и штамма гриппа А. В конечном итоге, как показано на фиг. 3Е и F, нитазоксанид вызывал сходные изменения в гемагглютиниине вирусов гриппа человека (Е) и птиц (F).

Тизоксанид ингибирует транспорт HA к клеточной мембране и предотвращает выход вируса из клеток-хозяев. Гликозилирование HA, также как и других поверхностных гликопротеинов клетки, ингибируют в ER, добавляя "высокоманнозные" олигосахариды. Богатый маннозой сахарный компонент подвергается процессингу в аппарате Гольджи во время транспортировки к поверхности клетки, и конечное гликозилирование происходит в транс-цистернах аппарата Гольджи. Для исследования того, может ли TIZ влиять на прохождение HA0 через аппарат Гольджи, авторы подвергали аликвоты радиоактивно меченых белков и иммунопреципитированные образцы HA0 расщеплению ферментом эндо- $\beta$ -N-ацетилглюкозаминидазой H (Endo-H), удаляющим N-связанные углеводные цепи, не подвергнутые конечному гликозилированию, или пептид-N-гликозидазой F (PNGase-F), ферментом, удаляющим все N-гликаны. Как и ожидалось, обе формы белка являлись чувствительными к расщеплению PNGase-F; однако, в то время как HA0 контрольных клеток подвергался конечному гликозилированию, становясь устойчивым к Endo-H, HA0 из обработанных TIZ клеток оставался чувствительным к расщеплению протеазами до 4 ч после синтеза (фиг. 4, А и В). Как показано на фиг. 4С, TIZ-индуцируемые изменения не предотвращают способности HA0 образовывать тримеры.

Т.к. приобретение устойчивости к Endo-H является маркером транспорта в цис- и средний компартменты Гольджи, данные результаты свидетельствуют о том, что индуцируемое TIZ изменение может блокировать транспорт HA0 между ER и комплексом Гольджи, предотвращая его транспорт к цитоплазматической мембране. Ингибирование транспорта к компартменту транс-Гольджи, в основном, определяли иммунофлуоресценцией с применением специфических к транс-Гольджи антител (фиг. 4D). Для подтверждения того, что обработка TIZ ингибировала транспорт HA к цитоплазматической мембране клетки-хозяина, предотвращая выход зрелых вирусных частиц, инфицированные имитацией и инфицированные PR8 клетки MDCK обрабатывали TIZ (10 мкг/мл) или туникамицином (5 мкг/мл) после адсорбции вируса и определяли уровни вирусного гемагглютиниана в цитоплазме (фиг. 5А) и цитоплазматической мембране (фиг. 5В) посредством иммунофлуоресценции через 16 ч p.i. Данные исследования подтверждали, что, в то время как цитоплазматические уровни HA0 в обработанных TIZ клетках являлись схожими с контролем (фиг. 5А), уровни вирусного белка в цитоплазматической мембране значительно повышались в обработанных TIZ клетках (фиг. 5В, вверху). Значительное повышение уровней HA в цитоплазматической мембране после обработки TIZ дополнительно подтверждали определением биологической функции встроенного в цитоплазматическую мембрану HA посредством анализа связывания рецептора (гемадсорбции эритроцитов) (фиг. 5В, внизу). В параллельных исследованиях после временной трансфекции клеток MDCK меченным GFP дефектным по интернализации мутантом рецептора липопroteинов низкой плотности человека (плазмиды LDLR-A18-GFP) обнаруживали, что TIZ не ингибирует направленность LDLR к цитоплазматической мембране, позволяя предполагать селективный эффект тиазолидов (фиг. 11). Схожие результаты получали после временной трансфекции клеток MDCK и клеток HEK-293 другим клеточным гликопротеином цитоплазматической мембраны, Toll-подобным рецептором человека 4 (данные не приведены).

В параллельных образцах инфицированные имитацией и инфицированные PR8 клетки метаболически метили [35S]-Met/Cys через 3 ч p.i. в течение следующего 21 ч и очищали радиоактивно меченые вирионы от супернатанта инфицированных клеток. Встроенные в вирусные частицы белки анализировали электрофорезом в ПААГ в присутствии SDS и автордиографией. Как показано на фиг. 5С, вирусные белки нельзя определить в супернатанте обработанных TIZ клеток. Значительное снижение вирусных частиц подтверждали определением урожаев вируса из параллельных немеченых образцов посредством анализа инфективности TCID50 (фиг. 5D, вверху) или анализа HAU (фиг. 5D, внизу) через 24 ч p.i.

Исследования комбинаций с нитазоксанидом и ингибиторами нейраминидазы занамивиром и осельтамивиром против вируса гриппа А PR8 демонстрируют синергичную активность. Для определения противовирусной активности NTZ в комбинации с клиническими ингибиторами гриппа авторы тестировали комбинации NTZ с занамивиром и комбинации NTZ с осельтамивиром в различных концентрациях. Занамивир и осельтамивир являются ингибиторами нейраминидазы (NA), нарушающими эффективное высвобождение вирусов из инфицированной клетки-хозяина, и действуют по механизму, четко отличающемуся от такового тиазолидов.

Эффект обработки комбинацией NTZ и занамивира исследовали на клетках собаки после инфицирования вирусом млекопитающих H1N1 A/PR/8/34 (PR8). Клетки Мадин-Дарби почек собаки (MDCK), инфицированные вирусами гриппа PR8, обрабатывали различными концентрациями NTZ, занамивира или средства непосредственно после периода адсорбции вируса и определяли урожай вируса через 24 ч после инфицирования (p.i.).

В отдельных исследованиях обработка NTZ вызывала дозозависимое ингибирование репликации вируса с EC50 1 мкг/мл (3,3 мМ) для вируса PR8 (фиг. 1В). В табл. 2, ниже, суммируют данные о противовирусной активности из исследований комбинаций. Активность выражают как снижение HAU/мл относительно необработанного контроля. В экспериментах с занамивиром, NTZ, по-видимому, являлся немного более эффективным, чем в предыдущем исследовании, и обладал EC50 ~0,66 мкг/мл (~2,2 мМ). Занамивир в отдельности демонстрировал 50% снижение (ингибирование) урожая вируса только в наиболее высокой тестовой концентрации 1 мМ, таким образом, мы определяли, что занамивир обладает EC50 1 мМ в данных экспериментальных условиях (фиг. 6 и 7, левая сторона). Комбинация занамивира при 1 мМ с NTZ при 0,1 мкг/мл (0,33 мМ) приводила к 83% снижению репликации вируса относительно необработанного контроля, что соответствовало приблизительно 3-кратному повышению эффективности относительно обработки только занамивиром (фиг. 6, правая сторона).

Таблица 2. Противогриппозная активность комбинаций NTZ и занамивира  
Урожай PR8: HAU/мл

Нитазоксанид мкг/мл	Контроль	Занамивир (мМ)		
		0.01	0.1	1
0	48	48	48	24
0.1	48	48	48	8
1	16	16	8	1

Обработка занамивиром в отдельности при 0,1 мМ не оказывала эффект на репликацию вируса (фиг. 7, левая сторона). Однако комбинация занамивира при 0,1 мМ и NTZ при 1,0 мкг/мл (3,3 мМ) приводила к на 50% большему снижению репликации вируса относительно обработки только NTZ (фиг. 7, правая сторона). Данные результаты соответствуют приблизительно 6-кратному повышению эффективности относительно обработки только занамивиром и 2-кратному повышению эффективности относительно обработки только NTZ. Комбинация занамивира при 1,0 мМ и NTZ при 1,0 мкг/мл (3,3 мМ) приводила к 94% снижению репликации вируса относительно обработки только NTZ (фиг. 7, правая сторона). Данные результаты соответствуют приблизительно 24-кратному повышению эффективности относительно обработки только занамивиром и 16-кратному повышению эффективности относительно обработки только NTZ. Взятые в совокупности данные результаты позволяют предполагать, что противовирусная активность комбинаций занамивира и NTZ является синергичной против вируса гриппа А PR8.

Аналогично, эффект обработки комбинацией NTZ и осельтамивира исследовали на клетках собаки после инфицирования вирусом млекопитающих H1N1 A/PR/8/34 (PR8). Клетки Мадин-Дарби почек собаки (MDCK), инфицированные вирусами гриппа PR8, обрабатывали различными концентрациями NTZ, осельтамивира или средства непосредственно после периода адсорбции вируса и определяли урожай вируса через 24 часа после инфицирования (p.i.).

В данных экспериментах NTZ демонстрировал EC50 1 мкг/мл (3,3 мМ). Авторы не наблюдали снижения (ингибирования) урожая вируса только с осельтамивиром при тестовых концентрациях до 1 мМ, таким образом, не определяли EC50 для осельтамивира (фиг. 8 и 9, левая сторона). Комбинация осельтамивира при 1 мМ с NTZ при 0,1 мкг/мл (0,33 мМ) приводила к 33% повышению снижения репликации вируса, что соответствует приблизительно 1,5-кратному повышению эффективности относительно обработки только осельтамивиром или NTZ (фиг. 8, правая сторона). Необходимо отметить, что доза NTZ составляла одну десятую от его установленной EC50.

Комбинация осельтамивира при 1,0 мМ и NTZ при 1,0 мкг/мл (3,3 мМ) приводила к 67% повышению снижения репликации вируса относительно обработки только осельтамивиром и 33% повышению снижения репликации вируса относительно обработки только NTZ (фиг. 9, правая сторона). Данные результаты соответствуют приблизительно 3-кратному повышению эффективности относительно обработки только осельтамивиром и 1,5-кратному повышению эффективности относительно обработки только NTZ. Взятые в совокупности данные результаты позволяют предполагать, что противовирусная активность комбинаций осельтамивира и NTZ находится где-то между аддитивной и синергичной против вируса гриппа А PR8.

Результаты от нескольких биохимических подходов демонстрируют, что TIZ блокирует концевое гликозилирование НА на стадии, предшествующей достижению устойчивости к расщеплению эндогликозидазой-Н, являющейся маркером транспорта в цис- и средний компартменты Гольджи. Исследования иммуномикроскопии и анализ вирусных частиц, продуцируемых инфицированными клетками, подтверждают, что TIZ-индуцируемые изменения нарушают транспорт HA0 между ER и комплексом Гольджи, предотвращая его транспорт и встраивание в цитоплазматическую мембрану клетки-хозяина и блокируя выход зрелых вирионов из клеток-хозяев. Остается исследовать, вызвано ли изменение созревания НА непосредственным связыванием TIZ с вирусным гликопротеином, или оно является следствием клеточно-опосредованного эффекта.

Ранее было показано, что тиазолиды обладают противовирусной активностью против двух различных РНК-вирусов, гепатита С (HCV), РНК-вируса с положительной цепью, и ротавируса, двучепочного РНК-вируса, и ДНК-вируса, вируса гепатита В (HBV). Противовирусная активность широкого спектра

позволяет предполагать скорее клеточно-опосредованный эффект, чем специфическую вирусную мишень. Возможность того, что созревание вирусных гликопротеинов может вовлекаться в противовирусную активность против HBV и HCV, в настоящее время находится на стадии исследования. В случае ротавируса недавно показана индуцируемая TIZ модификация структурного вирусного гликопротеина VP7 (Santoro MG и Rossignol JF, неопубликованные результаты), подтверждающая гипотезу о том, что созревание и транспорт ключевых вирусных гликопротеинов может являться основным механизмом противовирусной активности данного нового класса лекарственных средств. Данные о том, что тиазолиды не влияют значительно на репликацию риновируса человека, пикорнавируса, чье созревание не требует транспорта вирусного гликопротеина к мембране клетки, дополнительно подтверждают данную гипотезу.

Применяемыми сокращениями являются: NTZ, нитазоксанид; TIZ, тизоксанид; EC<sub>50</sub>, 50% эффективная концентрация; CC<sub>50</sub>, 50% цитотоксическая концентрация; HA, гемагглютинин; TM, туникамицин; Endo-H, эндо-β-N-ацетилглюкозаминидаза H; PNG-ase F, пептид-N-гликозидаза F; TCID<sub>50</sub>, 50% инфицирующая доза в культуре ткани; SW, свайнсонин; DMJ, 1-дезоксиманноджирмицин; HAU/мл, гемагглютинирующие единицы/мл, EGS, этиленгликоль-бис(сукцинимидилсукцинат).

Введение тиазолидов, таких как NTZ, в низких дозах для лечения вирусной инфекции. NTZ можно вводить перорально в дозе от 300 мг или 600 мг дважды в день в течение 5 дней для лечения гриппа. Клинические испытания показали, что данный режим дозирования обладает способностью лечить грипп.

Предпочтительно, дозировка нитазоксанида составляет 300 мг дважды в день в течение 5 дней, являясь меньшей, чем дозировка NTZ, необходимая для лечения кишечных инфекций, таким образом, делая возможным снижение побочных эффектов, связанных с более высокими дозами. Тиазолиды также можно вводить в качестве двухслойной таблетки с модифицированным высвобождением. В связи с этим, тиазолиды можно вводить в дозах 100, 200, 300, 400, 500 или 600 мг дважды в день в течение 5 дней для лечения вирусной инфекции.

Обнаруживали, что тиазолиды, такие как нитазоксанид, обладают активностью против других респираторных вирусов. Данные *in vivo* представлены в табл. 3.

Таблица 3. Активность против других респираторных вирусов

Вирус	EC <sub>50</sub> (мкг/мл)	CC <sub>50</sub> (мкг/мл)
Парагрипп	0.5	>50
Коронавирус	1.0	>50
Аденовирус	0.2	>50
Респираторный синцитиальный вирус	0.5	>50
Риновирус	>10	>50

Любопытно, что тиазолиды, такие как NTZ, также обладают способностью лечить пациентов с гриппоподобным заболеванием (ILI). Гриппоподобное заболевание представляет собой симптомы гриппа, которые может вызывать другой вирус или патоген.

Проводили оценку эффекта двукратного ежедневного введения нитазоксанида в течение 5 дней на длительность симптомов у детей и взрослых с гриппоподобным заболеванием. Проводили два двойных слепых плацебо-контролируемых исследования. Детям возрастом 12 месяцев - 11 лет давали суспензию NTZ (n=100, 50 на группу) и пациентам возрастом >12 лет давали таблетки NTZ 500 мг (n=86, 43 на группу). Проводили одноцентровые исследования. Исследования основывались на исследованиях TAMIFLU®. Исследования следовали конкретным критериям включения/исключения. Критериями включения являлись возраст детей 1-11 лет или возраст пациентов >12 лет с лихорадкой >100°F, с >1 респираторным симптомом (включая кашель, выделения из носа, чихание, боль в горле и т.д.) и/или с >1 системным симптомом (миалгией, недомоганием, слабостью, головной болью, ознобом/потоотделением и т.д.). Основные критерии исключения включали длительность наличия симптома. >72 ч, беременность или грудное вскармливание, конкурентное лечение антибиотиками/противовирусными средствами, или астму или другое легочное заболевание в анамнезе.

Пациентов рандомизировали для получения NTZ или плацебо b.i.d. в течение 5 дней. На исходном уровне получали мазок из носоглотки для быстрого прямого иммунофлуоресцентного анализа (SimulFluor respiratory Screen) на 7 вирусов (RSV, грипп A и B, парагрипп 1-3 и аденовирус). Пациент (или родитель) ежедневно записывал симптомы в дневник, классифицируя каждый симптом по шкале от 0 до 3: отсутствие, мягкий, умеренный, тяжелый. Ткань хранили в гриппере, и персонал исследования ежедневно собирал ее для взвешивания. Следующий медицинский осмотр проводили на 7 день. Первичной конечной точкой являлось время от исходного уровня до возврата каждого симптома к отсутствию или мягкой степени (<2). Вторичные конечные точки включают применение антибиотика, респираторные симптомы на 7 день, ежедневную массу ткани/слизи.

Результаты дополнительных биохимических подходов демонстрируют то, что нитазоксанид оказывает эффект на дополнительные респираторные вирусы. Смотри состав пациентов в табл. 4 и определение вирусов в табл. 5. В табл. 5 показано, что тест большинства пациентов не являлся положительным на наличие аденовируса, RSV, гриппа А, парагриппа 1. Однако на фиг. 12-15 показано, что NTZ обладает способностью лечить пациентов, обладающих гриппоподобным заболеванием. Эти данные неожиданно показывают, что пациентов, проявляющих симптомы гриппа, но тест которых не являлся положительным на аденовирус, RSV, грипп А, парагрипп 1 можно лечить тиазолидами, такими как NTZ.

Таблица 4. Пациенты

	Дети (возраст <12 лет)		Взрослые (возраст ≥ 12 лет)	
	NTZ	Плацебо	NTZ	Плацебо
Пол (М/Ж)	24/26	29	10/33	17/26
Возраст, лет (Среднее ± S.D.)	4.0 ± 2.8	3.5 ± 2.3	28.9 ± 13.3	31.4 ± 12.7
Возраст, лет (диапазон)	1-9	1-11	12-61	12-61
Вес, кг (Среднее ± S.D.)	15.4 ± 6.0	14.8 ± 4.8	56.2 ± 11.2	58.9 ± 10.5
Симптомы (%)				
Назальная секреция	100%	100%	100%	98%
Заложенность носа	80%	76%	79%	86%
Чихание	92%	96%	91%	98%
Боль в горле	84%	80%	93%	81%
Лихорадка	84%	80%	86%	81%
Кашель	94%	92%	94%	86%
Недомогание	92%	88%	91%	88%
Головная боль	70%	66%	70%	79%
Озноб	60%	50%	65%	60%

Таблица 5. Определенные быстрым анализом вирусы

	Дети (возраст <12 лет)		Взрослые (возраст ≥ 12 лет)	
	NTZ	Плацебо	NTZ	Плацебо
Аденовирус(п,%)	4 (8%)	8 (16%)	2 (5%)	2 (5%)
RSV (п, %)	-	1 (2%)	1 (2%)	3 (7%)
Грипп А (п, %)	2 (4%)	-	1 (2%)	-
Парагрипп (п, %)	1 (2%)	-	-	-
Нет (п, %)	43 (86%)	41 (82%)	39 (91%)	38 (88%)

### Описание чертежей

Фиг. 1. Тиазолиды ингибируют репликацию вируса гриппа А, действуя на уровне после проникновения. А, структура нитазоксанида (NTZ) и тизоксанида (TIZ). В, NTZ (синие круги) и TIZ (красные круги) ингибируют репликацию штаммов вируса гриппа А человека (PR8, WSN) и птиц (A/Ck) в клетках MDCK. Урожай вируса определяли через 24 ч p.i. С, противовирусная активность TIZ против вируса гриппа А PR8 в моноцитарных U937(●) и Т-лимфобластных Jurkat (▲) клетках человека и вируса WSN в клетках эпителия легкого человека A549 (■). D, клетки MDCK обрабатывали 10 мкг/мл TIZ (закрашенные столбцы) в указанное время до инфицирования (Pre), непосредственно после периода адсорбции (Post) или только в течение периода адсорбции (Ad, заштрихованный столбец). Пустой столбец представляет собой необработанный инфицированный контроль (C). E, долговременная противовирусная активность TIZ в инфицированных PR8 клетках MDCK, обработанных 10 мкг/мл TIZ (закрашенные круги) или средством (пустые круги) после адсорбции вируса. В-Е, урожай вируса, выраженный в HAU/мл (В и Е) или как процент необработанного контроля (С и D), представляет собой среднее ± SD для параллельных образцов из типичного эксперимента из трех со схожими результатами. \*= $P < 0,01$ ; \*\*= $P < 0,05$ .

Фиг. 2. Тизоксанид селективно изменяет созревание гемагглютиниона гриппа А, эффект TIZ на кинетику синтеза белка вируса PR8. Авторадиография меченных [35S]-Met/Cys белков (1,5-часовое мечение) через различное время p.i. из инфицированных имитацией (U) или инфицированных PR8 клеток, обработанных 10 мкг/мл TIZ после адсорбции вируса (вверху). Указывают вирусные белки. В том же

эксперименте синтез белка определяли по встраиванию [35S]-Met/Cys в белки клеток, обработанных TIZ (●) или средством (○) (внизу), и определяли уровни белка фосфо-eIF-2 $\alpha$  посредством иммуноблотинга с применением панспецифических антител против фосфо Ser-51-eIF2 $\alpha$  (p-eIF2 $\alpha$ ) или eIF2 $\alpha$  (в середине). В, определение гемагглютинаина иммунопреципитацией с антителами против HA после мечения [35S]-Met/Cys через 5 ч p.i. (4-часовое мечение). Представлены иммунопреципитированные белки (+ $\alpha$ HA, IP) и радиоактивно меченные белки из одних и тех же образцов до добавления антител (- $\alpha$ HA). Указывают положение нерасщепленного предшественника HA (HA0). С, автордиография меченных [35S]-Met/Cys белков (15-часовое мечение) из инфицированных имитацией (U) или инфицированных PR8 клеток, обработанных 10 мкг/мл TIZ, 5 мкг/мл туникамицина (TM) или средством (C) после адсорбции вируса. Белым треугольником и черной стрелкой указывают TM-индуцируемый GRP78/BiP и негликозилированный HA0 [идентифицированный иммуноблотингом (не показано)], соответственно. D, автордиография меченных [35S]-Met/Cys белков (15-минутное мечение через 5 ч p.i. с последующим вытеснением в течение указанного времени) из инфицированных PR8 клеток, обработанных как в А. А-D, медленнее и быстрее движущиеся формы HA0 в необработанных или обработанных TIZ клетках указывают звездочкой и черным треугольником, соответственно.

Фиг. 3. Тиазолиды препятствуют N-гликозилированию вирусного гемагглютинаина. А, инфицированные имитацией (U) или инфицированные PR8 (PR8) клетки MDCK обрабатывали 10 мкг/мл TIZ, 5 мкг/мл TM или средства (C) после адсорбции вируса. Через 6 часов p.i. клетки метили в течение 4 ч [35S]-Met/Cys (вверху), [3H]-глюкозамином (в середине) или [3H]-маннозой (внизу). Радиоактивно меченные образцы обрабатывали для электрофореза в ПААГ в присутствии SDS и автордиографии. Показаны секции флюорограмм из гелей для электрофореза в ПААГ в присутствии SDS. Белыми стрелками указывают TM-индуцируемое Grp78/BiP. В, инфицированные имитацией (U) или инфицированные PR8 клетки MDCK обрабатывали 10 мкг/мл TIZ, 10 мкг/мл свайнсоина (SW), 15 мкг/мл 1-дезоксиманноджирмицина (DMJ) или средством (C) после адсорбции вируса. Через 6 ч p.i. клетки метили [35S]-Met/Cys (4-часовое мечение) и радиоактивно меченные образцы обрабатывали для электрофореза в ПААГ в присутствии SDS и автордиографии. С-D, автордиография радиоактивно меченных белков из инфицированных имитацией (U) или инфицированных WSN (WSN) клеток A549 (C) и инфицированных имитацией или инфицированных птичьим вирусом гриппа А (A/Ck) клеток MDCK (D), обработанных 5 мкг/мл TIZ, 5 мкг/мл туникамицина (TM) или средством (C) после адсорбции вируса. Через 3 ч (WSN) или 6 часов (A/Ck) p.i. клетки метили [35S]-Met/Cys в течение 15 ч (WSN) или 4 ч (A/Ck). Е-F, автордиография радиоактивно меченных белков из инфицированных имитацией (U), инфицированных PR8 (PR8) (E) или инфицированных птичьим вирусом гриппа А (A/Ck) (F) клеток MDCK, обработанных 10 мкг/мл TIZ, 10 мкг/мл нитазоксанида (NTZ) или средством (C) после адсорбции вируса. Через 6 ч p.i. клетки метили [35S]-Met/Cys в течение 4 ч. А-F, указаны вирусные белки HA0, NP, M1 и NS1. Медленнее и быстрее движущиеся формы HA0 в необработанных или обработанных тиазолидом клетках указывают звездочкой и треугольником, соответственно.

Фиг. 4. Тизоксанид блокирует созревание HA на Endo-H-чувствительной стадии. А, инфицированные имитацией (U) или инфицированные PR8 (PR8) клетки MDCK, обработанные 10 мкг/мл TIZ (+) или средством (-) после адсорбции вируса, метили [35S]-Met/Cys (4-часовое мечение) через 5 ч p.i. Радиоактивно меченные белки расщепляли (+) или не расщепляли (-) PNGase-F или Endo-H и обрабатывали для электрофореза в ПААГ в присутствии SDS и автордиографии. Указывают нерасщепленную гликозилированную (HA0) и негликозилированную (HAp) формы предшественника гемагглютинаина. В, клетки MDCK, обработанные как в А, метили [35S]-Met/Cys (4-часовое мечение) через 6 ч p.i. Радиоактивно меченные белки иммунопреципитировали с антителами против HA ( $\alpha$ -HA), расщепляли (+) или не расщепляли (-) Endo-H и обрабатывали для электрофореза в ПААГ в присутствии SDS. Показаны секции флюорограмм. С, экстракты целых клеток из инфицированных имитацией (U) и инфицированных PR8 (PR8) клеток MDCK, обработанных TIZ (+) или средством (-), инкубировали с реагентом для поперечного сшивания EGS (0,2 мМ) (+) или без него (-) и обрабатывали для вестерн-блоттинга с применением антител против HA. Указаны мономеры (1), димеры (2) и тримеры (3) HA. А-С, медленнее и быстрее движущиеся формы HA0 в необработанных или обработанных TIZ клетках указаны звездочкой и треугольником, соответственно. D, иммунофлуоресценция инфицированных имитацией (U) и инфицированных WSN клеток A549, обработанных TIZ (5 мкг/мл) или средством в течение 24 ч, меченных антителами против p230 транс-Гольджи (красный) и против HA (зеленый). Ядра окрашивали DAPI (синий). Показано наложение трех флуорохромов (наложение). Увеличенными областями (врезками) выделяют локализацию HA в необработанных и обработанных TIZ клетках. Изображения получали и восстанавливали из свертки на микроскопе Delta Vision с применением программного обеспечения SoftWoRx-2,50. Столбец=5 мкм.

Фиг. 5. Тизоксанид ингибирует транспорт гемагглютинаина гриппа к поверхности клетки. А, уровни общего гемагглютинаина (зеленый) и  $\alpha$ -тубулина (красный) определяли в инфицированных имитацией (U) и необработанных или обработанных TIZ (10 мкг/мл) инфицированных PR8 клетках MDCK через 16 ч p.i. посредством непрямой иммунофлуоресценции (столбец-10 мкм). Ядра окрашивали DAPI (синий).

Показано наложение трех флуорохромов (наложение). Изображения получали и восстанавливали из свертки на микроскопе Delta Vision с применением программного обеспечения SoftWoRx-2. В, уровни гемагглютинина в цитоплазматической мембране (зеленый) определяли через 16 ч p.i. посредством непрямой иммуофлуоресценции (вверху) в инфицированных имитацией или инфицированных PR8 клетках, обработанных 10 мкг/мл TIZ или 5 мкг/мл ТМ. Ядра окрашивали хехстом 33342 (синий). Изображения обрабатывали как в А (столбец=10 мкм). Показано наложение двух флуорохромов. Гемадсорбция эритроцитов на цитоплазматической мембране через 5 ч p.i. показана на параллельных образцах (внизу) (столбец=35 мкм). Уровни гемоглобина в связанных эритроцитах количественно определяли спектрофотометрией ( $A=540$  нм). Данные, выраженные в оптической плотности (C. D.), представляют собой среднее  $\pm$  SD параллельных образцов из типичного эксперимента из двух со схожими результатами.  $*=P<0,05$  при сравнении с инфицированным контролем. С, автордиография меченных  $[^{35}\text{S}]\text{-Met/Cys}$  белков, встроенных в вирусные частицы, очищенные через 24 ч p.i. из супернатантов инфицированных имитацией или инфицированных PR8 клеток, обработанных как в В. Указаны вирусные белки (HA, NP, M1). D, параллельно, урожай вируса в необработанных (пустые столбцы) или обработанных TIZ (закрашенные столбцы) инфицированных PR8 клетках определяли через 24 ч p.i. посредством анализа инфективности (вверху) и анализа гемагглютинации (внизу). Данные, выраженные в TCID<sub>50</sub>/мл и HAU/мл, соответственно, представляют собой среднее  $\pm$  SD параллельных образцов из типичного эксперимента из двух со схожими результатами.  $*=P<0,05$  при сравнении с инфицированным контролем.

Фиг. 6. Противовирусная активность занамивира в трех концентрациях и занамивира в комбинации с нитазоксанидом при 0,1 мкг/мл против гриппа А. Занамивир тестировали против гриппа А (MDCK/PR8) в отдельности в дозах 0,01, 0,1 и 1,0 мкМ и в присутствии NTZ при 0,1 мкг/мл.

Фиг. 7. Противовирусная активность занамивира в трех концентрациях и занамивира в комбинации с нитазоксанидом при 1,0 мкг/мл против гриппа А. Занамивир тестировали против гриппа А (MDCK/PR8) в отдельности в дозах 0,01, 0,1 и 1,0 мкМ и в присутствии NTZ при 1,0 мкг/мл.

Фиг. 8. Противовирусная активность осельтамивира в трех концентрациях и осельтамивира с нитазоксанидом при 0,1 мкг/мл против гриппа А. Осельтамивир тестировали против гриппа А (MDCK/PR8) в отдельности в дозах 0,01, 0,1 и 1,0 мкМ и в присутствии NTZ при 0,1 мкг/мл.

Фиг. 9. Противовирусная активность осельтамивира в трех концентрациях и осельтамивира с нитазоксанидом при 1,0 мкг/мл против гриппа А. Осельтамивир тестировали против гриппа А (MDCK/PR8) в отдельности в дозах 0,01, 0,1 и 1,0 мкМ и в присутствии NTZ при 1,0 мкг/мл.

Фиг. 10. Противовирусная активность тизоксанида против вирусов гриппа А и В. А, клетки MDCK инфицировали четырьмя различными штаммами вируса гриппа А, H1N1 PR8, и WSN, и H3N2 A/FI млекопитающих и птичьим штаммом H5N9 A/Ck при m.o.i. 10 HAU/105 клеток, и обработанные 10 мкг/мл TIZ (закрашенные столбцы) или средством (пустые столбцы) непосредственно после периода адсорбции. Урожай вируса определяли через 24 ч p.i. В, длительная противовирусная активность TIZ в клетках MDCK, инфицированных вирусом гриппа В (B/Panama/3/04) и обработанных 10 мкг/мл TIZ (●) или средством (★) после адсорбции вируса. C-D, одноступенчатую (C) и многоступенчатую (D) кривые роста вируса PR8 получали на клетках MDCK, инфицированных при m.o.i. 10 (C) или 0,001 (D) ffu/клетку и обработанных 10 мкг/мл TIZ (●) или средством (★) как в А. Урожай вируса определяли через указанные периоды времени p. i. (A-D) Урожай вируса, выраженный как процент необработанного контроля (А) или в HAU/мл (B-D), представляет собой среднее  $\pm$  SD параллельных образцов из типичного эксперимента из трех со схожими результатами.  $*=P<0,01$ ;  $**=P<0,05$ .

Фиг. 11. Тизоксанид не влияет на направленность рецептора липопротеинов низкой плотности человека (LDLR) к цитоплазматической мембране. Клетки MDCK временно трансфицировали с меченным зеленым флуоресцентным белком (GFP) дефектным по интернализации мутантом рецептора липопротеинов низкой плотности человека (плазмида LDLR-A18-GFP) (40) и после 8 ч обрабатывали TIZ (10 мкг/мл) или средством в течение следующих 16 часов. После блокирования синтеза белка циклогексимидом в течение 1 ч цитоплазматические мембраны окрашивали красителем для цитоплазматической мембраны (PM) CellMask™ Orange и визуализировали с применением флуоресцентного микроскопа Leica DM-IL, оборудованного УФ-фильтрами возбуждения. Изображения получали на камере Leica DC-300 с применением программного обеспечения Leica Image-Manager500. Уровни LDLR-GFP (зеленый) и PM (красный) определяли в необработанных (верхние панели) или обработанных TIZ (нижние панели) трансфицированных клетках MDCK. Показано наложение двух флуорохромов (наложение). Показаны секции одинаковых изображений (столбец = 10 мкм) из типичного эксперимента.

Фиг. 12. Нитазоксанид может разрешать симптомы, связанные с гриппоподобным заболеванием.

Фиг. 13. Данные медицинского осмотра на 7 день Нитазоксанид снижает респираторные симптомы, связанные с гриппоподобным заболеванием.

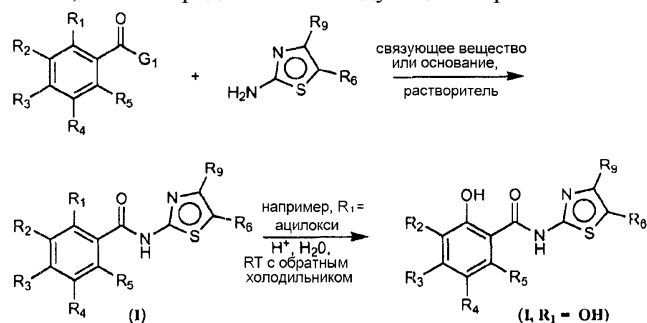
Фиг. 14. Применение антибиотиков после исследования.

Фиг. 15. Масса ежедневного сбора ткани.

Соединения по настоящему изобретению можно синтезировать по общей схеме ниже, где R<sub>6</sub> и R<sub>9</sub> можно выбирать из нитро (NO<sub>2</sub>) и SO<sub>2</sub>R<sub>12</sub>, посредством реакции ароильного производного, где G<sub>1</sub> являет-



ся гидроксигруппой, хлором, фтором, бромом, алкоксигруппой и т.п., с аминотиазольным производным, как определено в настоящем документе, в подходящих условиях реакции. В некоторых вариантах осуществления реакцию, в основном, можно представлять следующим образом:



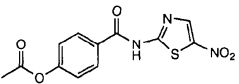
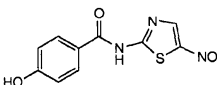
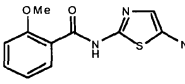
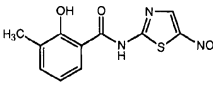
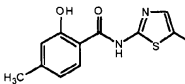
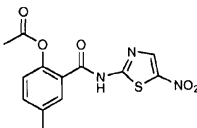
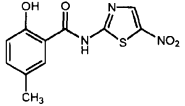
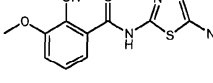
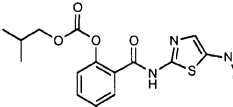
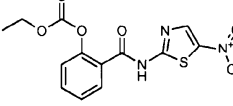
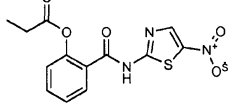
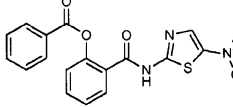
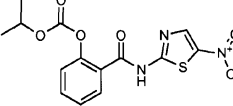
Соединения по настоящему изобретению также можно синтезировать по опубликованным способам US3950351, US6020353, PCT WO2006042195A1 и US2009/0036467A.

Примеры соединений по настоящему изобретению могут включать, в качестве неограничивающих примеров, следующие соединения, приведенные в табл. 6. Данный набор примеров не предназначен для ограничения изобретения.

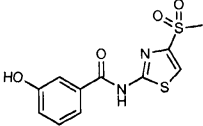
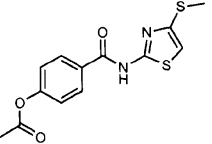
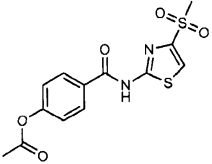
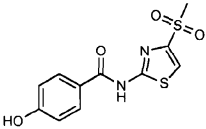
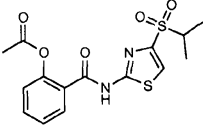
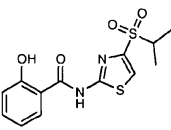
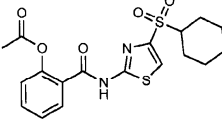
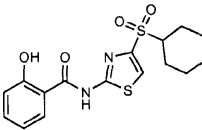
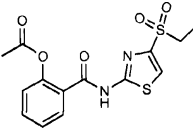
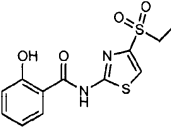
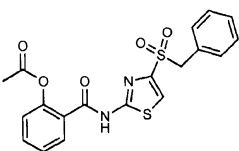
Примеры 3-13, 17-26, 29-35 и 38-66 в табл. 6 являются ссылочными и не включены в объем настоящего изобретения.

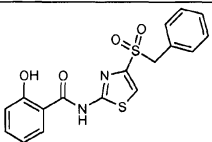
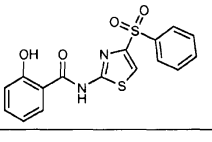
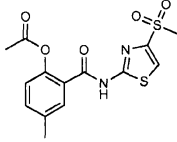
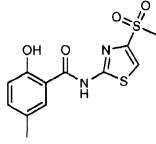
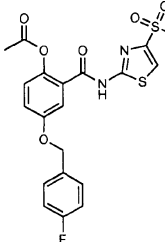
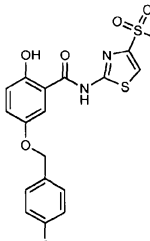
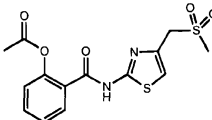
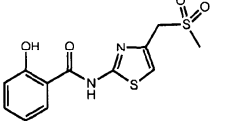
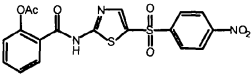
Таблица 6. Примеры по изобретению

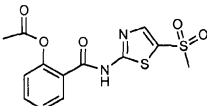
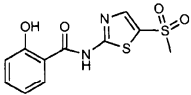
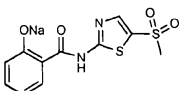
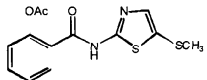
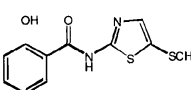
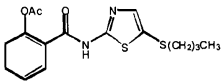
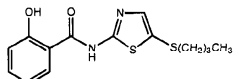
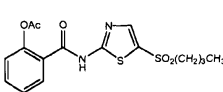
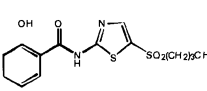
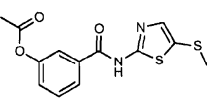
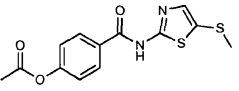
№	Соединение	точка плавления (°C)
1		202
2		254
3		>300
4		203-205
5		259-260

6		246-248 (dce)
7		263-265
8		230-232 (dec)
9		208-210
10		246-248 (dec)
11		187.5- 189.5
12		237.5- 238.0
13		не определена
14		125.3- 132.3
15		159.4- 161.4
16		158.5- 160.5
17		229.4- 230.4
18		180.3- 182.3

19		166.2-167.0
20	ХЛОРИД 	230 (dsc)
21	ХЛОРИД 	244-245
22	ХЛОРИД 	138.5-140
23		168-172 (dsc)
24		233-235 (dsc)
25		177-180
26		236-240 (dsc)
27		175.6-178.8
28		231-235
29		167.3-169.3
30		260-261
31		209.0-212.0

32		258.0- 259.0 (dec)
33		185.7- 188.7
34		242.0- 246.0 (dec)
35		253.0- 255.0 (dec)
36		141-145
37		201-203 (
38		152-155
39		247-250
40		181.0- 186.5
41		234.7- 240.0
42		158.7- 160.8

43		192-197
44		235-238
45		190-192
46		216-221 (dec)
47		211-215
48		231-232 (dec)
49		166.9- 169.0
50		229-230
51		не определена

52		173-175
53		282-283
54		не определена
55		145-147
56		225-226
57		100-101
58		180-181
59		138-140
60		235-236
61		135.2- 136.2
62		193.5- 195.5

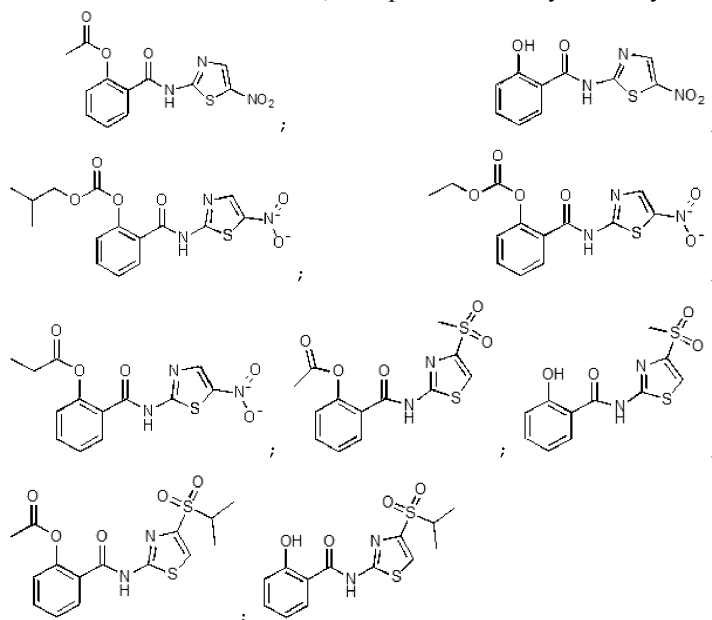
63		279.6- 280.6
64		252.5- 255.5
65		186.5 (dec)
66		271.1- 272.3

Хотя изложенное выше относится к конкретным предпочтительным вариантам осуществления, следует понимать, что настоящее изобретение не является ограниченным таким образом. Специалистам в данной области будет понятно, что можно осуществлять различные модификации описываемых вариантов осуществления, и что такие модификации предназначены для включения в объем настоящего изобретения.

Все публикации, патентные заявки и патенты, цитируемые в данном описании, включены в настоящий документ в качестве ссылки в полном объеме.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения или предотвращения вирусной инфекции, вызванной вирусом гриппа, посредством блокирования созревания вирусного гемагглютинина на стадии предшествующей достижению устойчивости к расщеплению эндогликозидазой, включающий введение нуждающемуся в этом пациенту терапевтически эффективного количества соединения, которое имеет одну из следующих формул:



или его фармацевтически приемлемой соли.

2. Способ по п.1, где вирусная инфекция представляет собой вирус гриппа А.
3. Способ по п.1, где вирусная инфекция представляет собой вирус гриппа В.
4. Способ по п.1, где вирусная инфекция вызвана вирусом, выбранным из H1N1, H2N2, H3N2, H5N1, H7N7, H1N2, H9N2, H7N2, H7N3 и H10N7.
5. Способ по п.1, где вирусная инфекция представляет собой вирус гриппа H1N1.
6. Способ по п.1, где соединение представляет собой нитазоксанид, тизоксанид или их соль.

7. Способ по п.6, где вирусная инфекция выбрана из H1N1 вируса гриппа А, H3N2 вируса гриппа А, H5N9 вируса гриппа А и вируса гриппа В.

8. Способ по п.1, где соединение представляет собой нитазоксанид или его соль.

9. Способ по п.1, где вирусная инфекция выбрана из H1N1 вируса гриппа А и H5N9 вируса гриппа А.

10. Способ по п.1, где соединение вводят в комбинации с ингибитором нейраминидазы.

11. Способ по п.10, где комбинацию вводят одновременно.

12. Способ по п.10, где комбинацию вводят последовательно.

13. Способ по п.1, где указанное соединение вводят перорально.

14. Способ по п.1, где указанное соединение вводят в дозе, выбранной из группы, состоящей из 100, 200, 300, 400, 500 и 600 мг.

15. Способ по п.1, где указанное соединение вводят в дозе, выбранной из группы, состоящей из 300 и 600 мг.

16. Способ по п.1, где указанное соединение вводят дважды в день в дозе, выбранной из группы, состоящей из 300 и 600 мг.

17. Способ по п.1, где указанное соединение вводят дважды в день в выбранной дозе 300 мг.

18. Способ по п.17, где указанное введение продолжают в течение не более пяти дней.

19. Способ по п.1, где указанное соединение является нитазоксанидом, и где нитазоксанид вводят дважды в день в выбранной дозе 300 мг.

20. Способ по п.19, где нитазоксанид вводят в качестве двухслойной таблетки с модифицированным высвобождением.

21. Способ по п.1, где индивидуум является человеком.

22. Комбинация, содержащая (а) соединение по п.1 и (б) ингибитор нейраминидазы при применении в комбинированном лечении, для лечения вирусной инфекции, вызванной вирусом гриппа.

23. Комбинация по п.22, где ингибитор нейраминидазы выбран из группы, состоящей из осельтамивира, занамивира, пермивира, RWJ-270201, DANA и CS-8958.

24. Комбинация по п.22, где комбинацию вводят последовательно.

25. Комбинация по п.22, где комбинацию вводят одновременно.

26. Способ прекращения или предотвращения продукции инфекционных вирусных частиц у человека или другого млекопитающего, включающий введение указанному человеку или другому млекопитающему терапевтически эффективного количества соединения формулы, определенной в п.1, или его фармацевтически приемлемой соли.

27. Способ лечения гриппоподобного заболевания у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение указанному индивидууму терапевтически эффективного количества соединения формулы, определенной в п.1; или его фармацевтически приемлемой соли.

28. Способ лечения вирусной инфекции, вызванной вирусом гриппа, включающий введение нуждающемуся в этом пациенту терапевтически эффективного количества соединения, выбранного из группы, состоящей из нитазоксанида, тизоксанида и их смесей, или его фармацевтически приемлемой соли.

29. Способ по п.28, где вирусная инфекция вызвана вирусом, выбранным из H1N1, H2N2, H3N2, H5N1, H7N7, H1N2, H9N2, H7N2, H7N3 и H10N7.

30. Способ лечения гриппоподобного заболевания у нуждающегося в этом субъекта, тест которого на наличие аденовируса, RSV, гриппа А, парагриппа 1 не являлся положительным, включающий введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества соединения, выбранного из группы, состоящей из нитазоксанида, тизоксанида и их смесей, или его фармацевтически приемлемой соли, где гриппоподобное заболевание включает один или несколько симптомов, выбранных из группы, состоящей из назальной секреции, заложенности носа, чихания, боли в горле, лихорадки, кашля, недомогания, головной боли и озноба.

31. Способ по п.30, где соединение выбрано из группы, состоящей из нитазоксанида или его фармацевтически приемлемой соли.

32. Способ по п.30, где гриппоподобное заболевание включает два или более симптома, выбранных из группы, состоящей из назальной секреции, заложенности носа, чихания, боли в горле, лихорадки, кашля, недомогания, головной боли и озноба.

33. Способ по п.30, где гриппоподобное заболевание включает три или более симптома, выбранных из группы, состоящей из назальной секреции, заложенности носа, чихания, боли в горле, лихорадки, кашля, недомогания, головной боли и озноба.

34. Способ по п.28, где соединение вводят в комбинации с ингибитором нейраминидазы.

35. Способ по п.34, где ингибитор нейраминидазы выбран из группы, состоящей из осельтамивира, занамивира, пермивира, RWJ-270201, DANA и CS-8958.

36. Способ по п.35, где ингибитор нейраминидазы представляет собой осельтамивир.

37. Способ по п.36, где соединение представляет собой нитазоксанид или его фармацевтически приемлемую соль.

38. Применение терапевтически эффективного количества соединения, выбранного из группы, со-



стоящей из нитазоксанида, тизоксанида и их смесей, или его фармацевтически приемлемой соли для лечения субъекта, страдающего гриппоподобным заболеванием, в котором гриппоподобное заболевание включает один или более респираторных симптомов, выбранных из группы, состоящей из эритематозной ротоглотки, гипертрофированных миндалин, заложенности носа, хрипов и аденомегалии.

39. Применение по п.38, где тест субъекта на наличие аденовируса, RSV, гриппа А, парагриппа 1 не являлся положительным.

40. Применение по п.38, где соединение представляет собой нитазоксанид, или его фармацевтически приемлемую соль.

41. Применение по п.38, где гриппоподобное заболевание включает два или более респираторных симптома, выбранных из группы, состоящей из эритематозной ротоглотки, гипертрофированных миндалин, заложенности носа, хрипов и аденомегалии.

42. Применение по п.38, где гриппоподобное заболевание включает три или более респираторных симптома, выбранных из группы, состоящей из эритематозной ротоглотки, гипертрофированных миндалин, заложенности носа, хрипов и аденомегалии.

43. Способ лечения вирусной инфекции, вызванной вирусом, выбранным из вируса парагриппа, вируса коронавируса, аденовируса и респираторного синцитиального вируса, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества нитазоксанида или его фармацевтически приемлемой соли.

44. Способ по п.43, где вирусная инфекция вызвана вирусом парагриппа.

45. Способ по п.43, где вирусная инфекция вызвана коронавирусом.

46. Способ по п.43, где вирусная инфекция вызвана аденовирусом.

47. Способ по п.43, где вирусная инфекция вызвана респираторно-синцитиальным вирусом.

48. Способ по п.43, где у субъекта есть гриппоподобные симптомы.

49. Способ по п.43, где указанное введение осуществляют перорально.

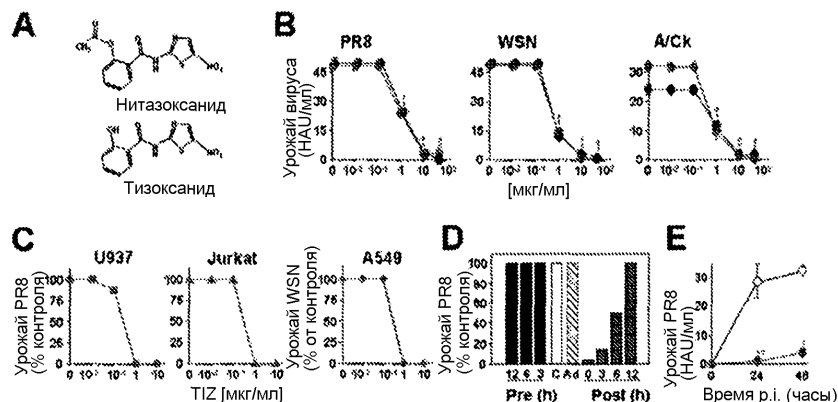
50. Способ по п.49, где указанное введение включает введение нитазоксанида или его фармацевтически приемлемой соли в дозе 300 мг или 600 мг дважды в день.

51. Способ по п.50, где указанное введение осуществляют в течение 5 дней.

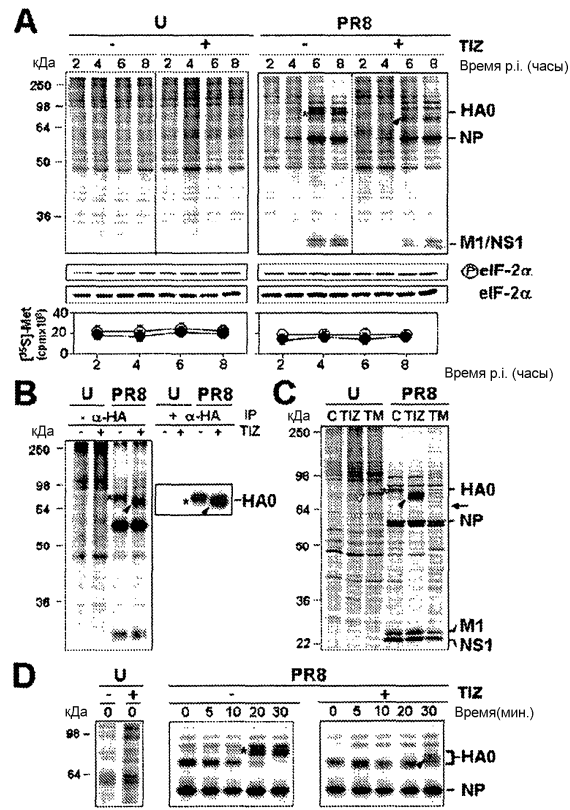
52. Способ по п.43, где нитазоксанид или его фармацевтически приемлемую соль вводят в виде двухслойной таблетки с модифицированным высвобождением.

53. Способ по п.52, где нитазоксанид или его фармацевтически приемлемую соль вводят в дозах 100, 200, 300, 400, 500 или 600 мг дважды в день.

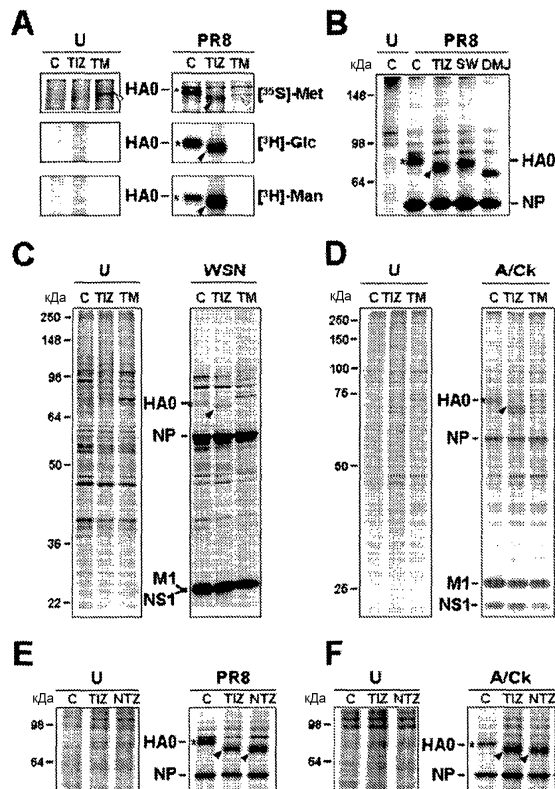
54. Способ по п.53, где указанное введение осуществляют в течение 5 дней.



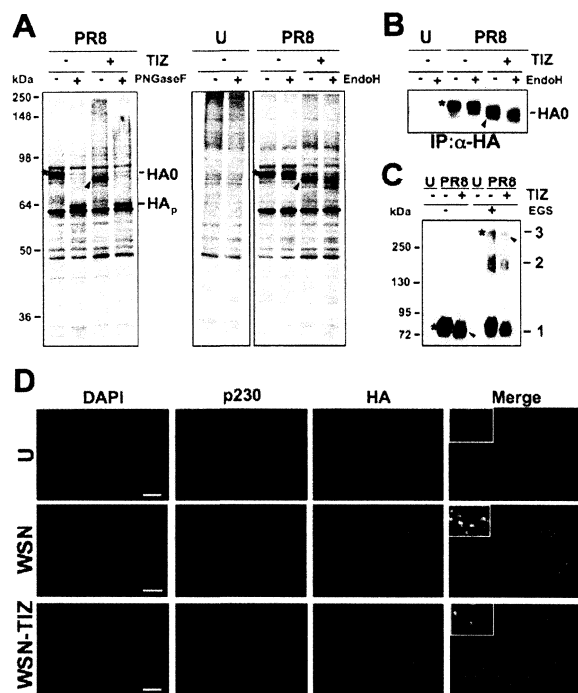
Фиг. 1



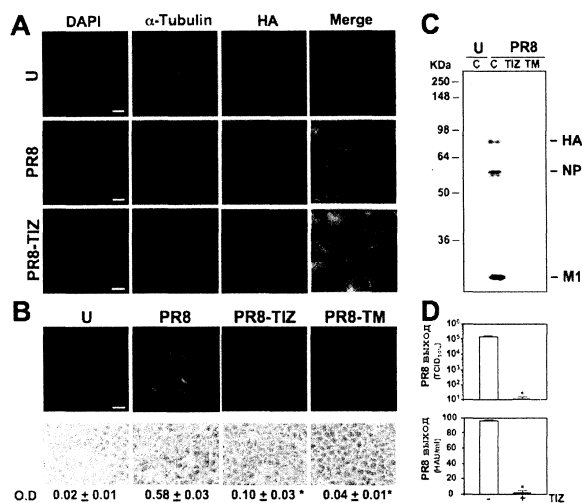
Фиг. 2



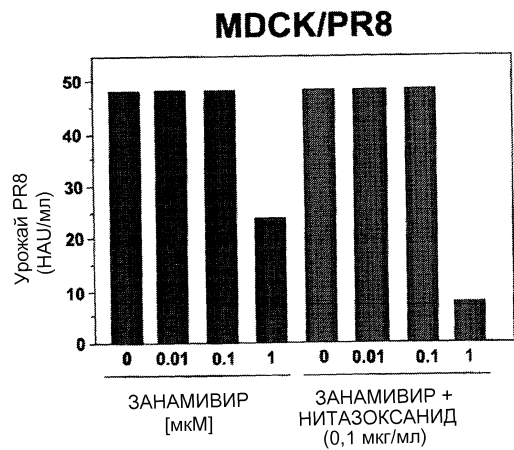
Фиг. 3



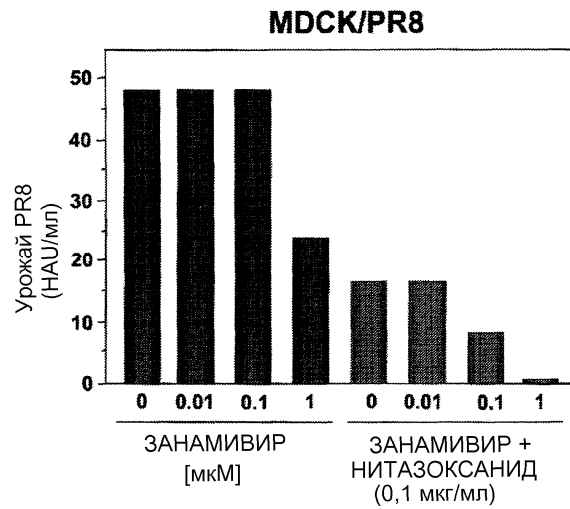
Фиг. 4



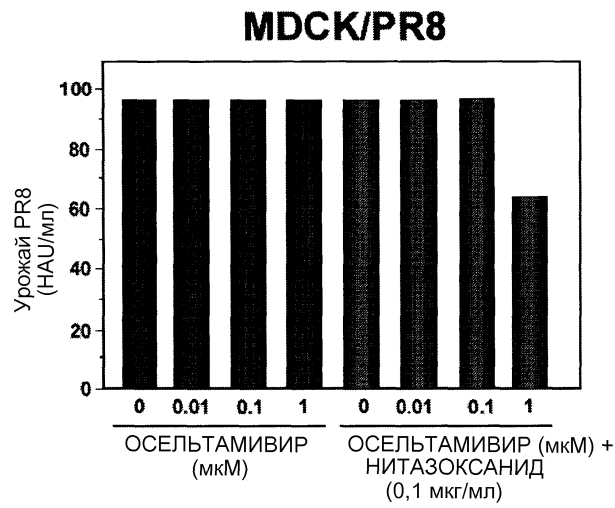
Фиг. 5



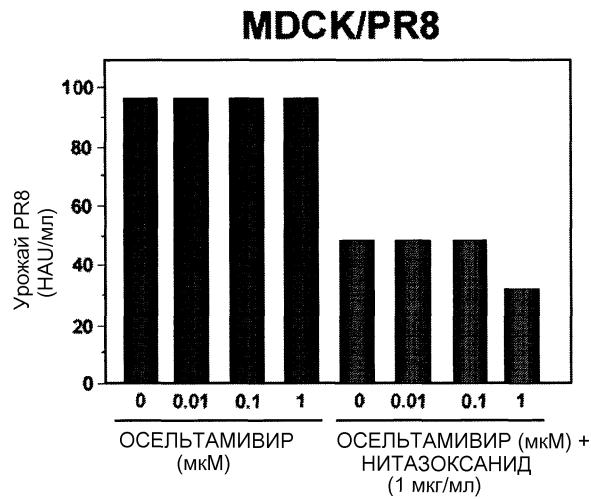
Фиг. 6



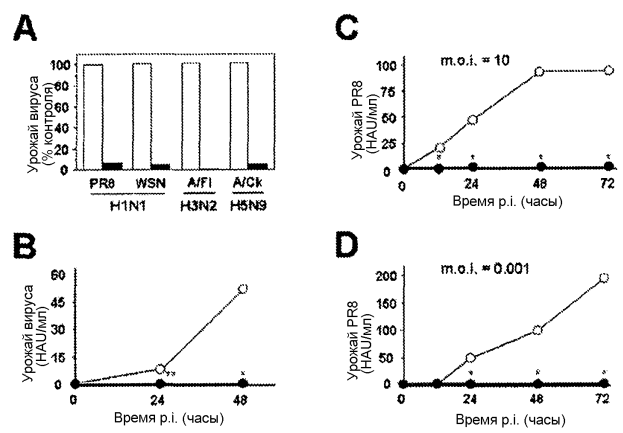
Фиг. 7



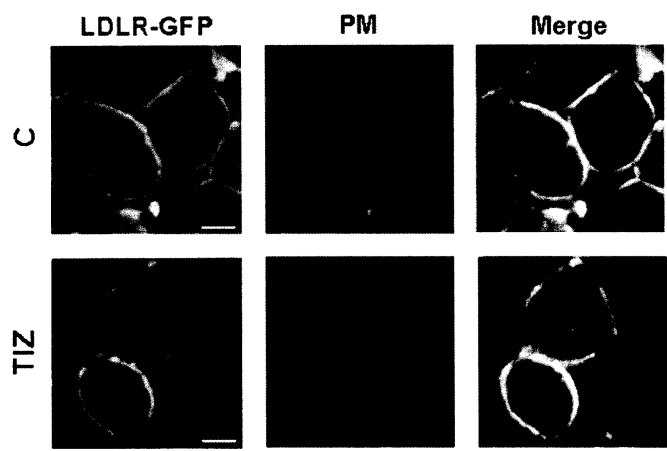
Фиг. 8



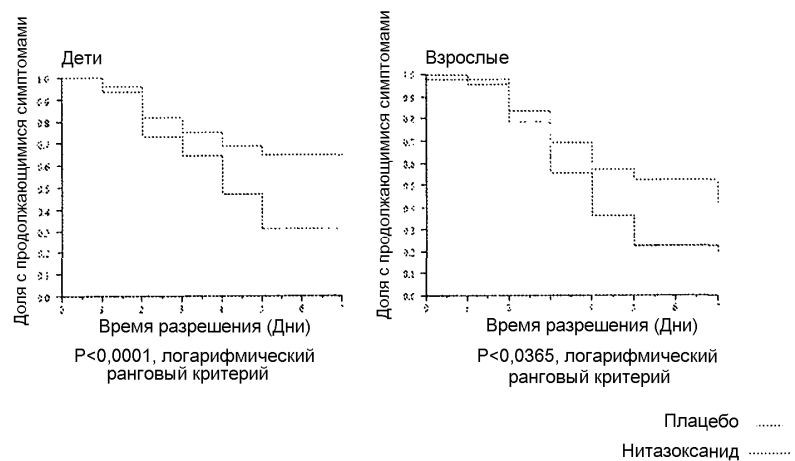
Фиг. 9



Фиг. 10

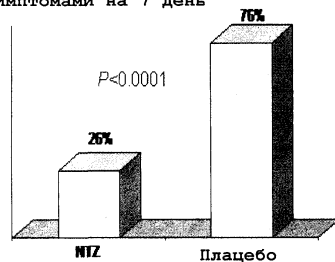


Фиг. 11

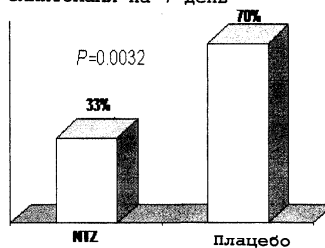


Фиг. 12

Доля детей с  
респираторными  
симптомами на 7 день



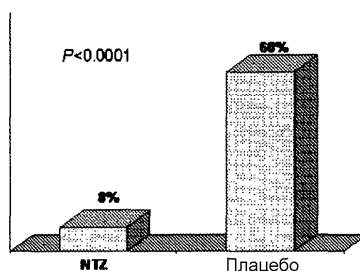
Доля взрослых с  
респираторными  
симптомами на 7 день



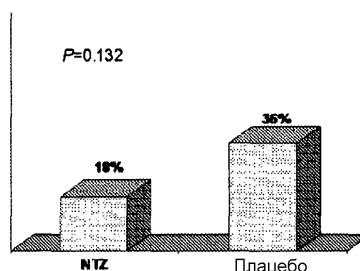
	дети (возраст < 12 лет)		Взрослые (≥ 12 лет)	
	NTZ	Плацебо	NTZ	Плацебо
Эритематозная ротоглотка	18%	68%	23%	67%
Гипертрофированные миндалины	16%	70%	19%	49%
Заложенность носа	8%	46%	2%	5%
Хрипы	6%	38%	7%	12%
Аденомегалия	6%	24%	5%	5%

Фиг. 13

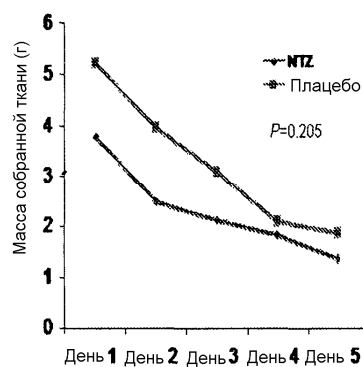
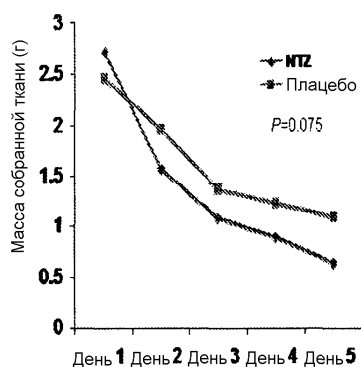
Доли детей, которым  
после исследования  
прописывали антибиотики



Доли взрослых, которым  
после исследования  
прописывали антибиотики



Фиг. 14



Фиг. 15

