



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.02.19

(21) Номер заявки
201891655

(22) Дата подачи заявки
2017.02.02

(51) Int. Cl. *A61K 31/437* (2006.01)
A61K 31/7056 (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 31/41 (2006.01)
A61K 31/4184 (2006.01)
A61K 31/52 (2006.01)
A61K 31/53 (2006.01)
A61K 31/5377 (2006.01)
A61K 31/55 (2006.01)
A61K 31/5513 (2006.01)
A61K 31/70 (2006.01)
A61K 31/519 (2006.01)

(54) КОМБИНАЦИЯ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ И ОСЛАБЛЕНИЯ RSV ИНФЕКЦИИ И
ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ НА ЕЁ ОСНОВЕ

(31) 16154035.6

(32) 2016.02.03

(33) EP

(43) 2018.12.28

(86) PCT/EP2017/052201

(87) WO 2017/134133 2017.08.10

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЯНССЕН САЙЕНСИЗ АЙРЛЭНД
ЮСи (IE)

(72) Изобретатель:
Исебарт Нина, Гуйваргс Неле Иса Э.,
Ройманс Дирк Андре Э., Коул Анил
(BE)

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

(56) WO-A1-2012080447
WYDE P.R. ET AL.: "Comparison of the inhibition of human metapneumovirus and respiratory syncytial virus by ribavirin and immune serum globulin in vitro", ANTIVIRAL RESEARCH, ELSEVIER BV, NL, vol. 60, no. 1, 1 September 2003 (2003-09-01), pages 51-59, XP002291798, ISSN: 0166-3542, DOI: 10.1016/S0166-3542(03)00153-0, abstract, figure 1, table 1
WHIMBEY E. ET AL.: "COMBINATION THERAPY WITH AEROSOLIZED RIBAVIRIN AND INTRAVENOUS IMMUNOGLOBULIN FOR RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS DISEASE IN ADULT BONE MARROW TRANSPLANT RECIPIENTS", BONE MARROW TRANSPLANTATION, STOCKTON PRESS, GB, vol. 16, no. 3, 1 September 1995 (1995-09-01), pages 393-399, XP009035052, the whole document

MICHEL PERRON ET AL.: "GS-5806 Inhibits a Broad Range of Respiratory Syncytial Virus Clinical Isolates by Blocking the Virus-Cell Fusion Process", ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, vol. 60, no. 3, 14 December 2015 (2015-12-14), pages 1264-1273, XP055384299, ISSN: 0066-4804, DOI: 10.1128/AAC.01497-15, figure 1, table 1, page 1267, column 2

JOHN P. DEVINCENZO ET AL.: "Oral GS-5806 Activity in a Respiratory Syncytial Virus Challenge Study", NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE, THE - NEJM -, vol. 371, no. 8, 21 August 2014 (2014-08-21), pages 711-722, XP055384254, ISSN: 0028-4793, DOI: 10.1056/NEJMoal401184, abstract, tables 1, 2, figure 1, page 721

MEJIAS ASUNCION ET AL.: "New options in the treatment of respiratory syncytial virus disease", JOURNAL OF INFECTION, vol. 71, 25 April 2015 (2015-04-25), XP029231667, ISSN: 0163-4453, DOI: 10.1016/J.JINF.2015.04.025, page 582, column 2, table 1

S. GHOSH: "IDWeek 2015. San Diego, California, USA - October 7-11, 2015", DRUGS OF THE FUTURE, vol. 40, no. 11, 1 January 2015 (2015-01-01), page 765, XP055384274, ES ISSN: 0377-8282, DOI: 10.1358/dof.2015.040.11.2409822, page 765, column 2, paragraph 3 - page 766, column 1, paragraph 1

LEONARD R. KRILOV: "Palivizumab in the prevention of respiratory syncytial virus disease", EXPERT OPINION ON BIOLOGICAL THERAPY, vol. 2, no. 7, 1 October 2002 (2002-10-01), pages 763-769, XP055384374, ASHLEY, LONDON; GB ISSN: 1471-2598, DOI: 10.1517/14712598.2.7.763, abstract, table 1, page 765-766

JIA HU ET AL.: "Treatment of respiratory syncytial virus with palivizumab: a systematic review", WORLD JOURNAL OF PEDIATRICS, vol. 6, no. 4, 1 November 2010 (2010-11-01), pages 296-300, XP055384380, CN, ISSN: 1708-8569, DOI: 10.1007/s12519-010-0230-z, abstract, table 1

WO-A1-2016055791
WO-A1-2014174018

(57) Изобретение направлено на комбинацию, предназначенную для лечения или ослабления RSV инфекции, содержащую 3-({5-хлор-1-[3-(метилсульфонил)пропил]-1H-индол-2-ил}метил)-1-(2,2,2-трифторэтил)-1,3-дигидро-2H-имидазо[4,5-c]пиридин-2-он или его фармацевтически приемлемую соль в качестве соединения А и рибавирин или его фармацевтически приемлемую

соль в качестве соединения В, где количество соединения А соответствует значению концентрации от 0,19 до 139 нМ и количество соединения В соответствует значению концентрации от 206 до 50000 нМ. Кроме того, изобретение относится к фармацевтической композиции, обладающей активностью против RSV, содержащей терапевтически эффективное количество указанной выше комбинации и фармацевтически приемлемый носитель.

037206 B1

037206 B1

Настоящее изобретение направлено на комбинацию, предназначенную для лечения или ослабления RSV инфекции, содержащую 3-(5-хлор-1-[3-(метилсульфонил)пропил]-1H-индол-2-ил)метил)-1-(2,2,2-трифторэтил)-1,3-дигидро-2H-имидазо[4,5-с]пиридин-2-он или его фармацевтически приемлемую соль в качестве соединения А и рибавирин или его фармацевтически приемлемую соль в качестве соединения В, где количество соединения А соответствует значению концентрации от 0,19 до 139 нМ и количество соединения В соответствует значению концентрации от 206 до 50000 нМ.

Кроме того, настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, обладающей активностью против RSV, содержащей терапевтически эффективное количество указанной выше комбинации и фармацевтически приемлемый носитель.

RSV, или респираторно-синцитиальный вирус человека, представляет собой крупный РНК-вирус, входящий в семейство Pneumoviridae рода Orthopneumovirus вместе с RSV-вирусом крупного рогатого скота. RSV человека вызывает ряд заболеваний дыхательных путей у людей всех возрастов во всем мире. Он является основной причиной заболеваний нижних дыхательных путей в младенчестве и детстве. Более половины всех младенцев сталкиваются с RSV в свой первый год жизни и почти все - в течение их первых двух лет. Инфекция у маленьких детей может приводить к повреждению легких, которое сохраняется годами и может способствовать развитию хронического заболевания легких в дальнейшей жизни (хроническая бронхолегочная обструкция, астма). Подростки и взрослые часто страдают от (сильной) простуды при RSV-инфекции. В старости восприимчивость вновь возрастает, и RSV был вовлечен во множество вспышек пневмонии у пожилых людей, что приводило в результате к значительной смертности.

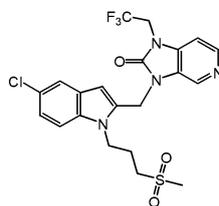
На данный момент было одобрено только три лекарственных средства для применения против RSV-инфекции. Первым таковым является рибавирин, нуклеозидный аналог, который обеспечивает аэрозольное средство для лечения тяжелой RSV-инфекции у госпитализированных детей. Другие два лекарственных средства, RespiGam® (RSV-IG) и Synagis® (паливизумаб), иммуностимуляторы на основе поликлональных и моноклональных антител, предназначены для профилактического применения. Оба являются очень дорогостоящими и требуют парентерального введения. Ряд соединений, предназначенных для лечения RSV-инфекции, находится на стадии клинических испытаний. Одно из таких соединений представляет собой 3-(5-хлор-1-[3-(метилсульфонил)пропил]-1H-индол-2-ил)метил)-1-(2,2,2-трифторэтил)-1,3-дигидро-2H-имидазо[4,5-с]пиридин-2-он, раскрытый в WO-2012/080447 как соединение P55.

В настоящее время было обнаружено, что комбинация 3-(5-хлор-1-[3-(метилсульфонил)пропил]-1H-индол-2-ил)метил)-1-(2,2,2-трифторэтил)-1,3-дигидро-2H-имидазо[4,5-с]пиридин-2-он (далее в настоящем документе называемого соединением А) и соединения В, которое обладает свойствами ингибирования репликации RSV, обеспечивает улучшенную терапию при лечении RSV-инфекции.

Некоторые варианты осуществления, раскрытые в настоящем документе, относятся к комбинации соединения А и соединения В и к применению данной комбинации для лечения или уменьшения интенсивности RSV-инфекции у субъекта, нуждающегося в этом.

Другие варианты осуществления относятся к фармацевтической композиции, содержащей комбинацию соединения А и соединения В, и к применению данной фармацевтической композиции для лечения или уменьшения интенсивности RSV-инфекции.

Соединение А представляет собой 3-(5-хлор-1-[3-(метилсульфонил)пропил]-1H-индол-2-ил)метил)-1-(2,2,2-трифторэтил)-1,3-дигидро-2H-имидазо[4,5-с]пиридин-2-он, раскрытый в WO-2012/080447 как соединение P55, имеющее следующую структуру:



Соединение В представляет собой рибавирин.

Количества соединения В в комбинациях по настоящему изобретению, которые вводят ежедневно, могут варьироваться от приблизительно 10 до приблизительно 2500 мг, от приблизительно 50 до приблизительно 1000 мг или от приблизительно 50 до приблизительно 500 мг.

Все количества, которые упоминаются в данном и следующих абзацах, относятся к свободной форме (т.е. несольевой форме). Приведенные выше значения представляют эквиваленты свободной формы, т.е. величины, соответствующие предполагаемому введению свободной формы. При введении солей количества должны быть рассчитаны в зависимости от соотношения молекулярных масс солевой формы и свободной формы.

Указанные выше суточные дозы рассчитаны для средней массы тела, составляющей приблизительно 70 кг, и должны быть пересчитаны в случае применения в педиатрии или в случае применения у пациентов со значительным отклонением массы тела.

Дозировки могут быть представлены в виде одной, двух, трех или четырех или более частей дозы, вводимых через определенные интервалы в течение суток. Применяемая дозировка предпочтительно соответствует суточному количеству соединения А и соединения В, указанному выше, или его части дозы, такой как его 1/2, 1/3 или 1/4. Лекарственная форма может содержать соединение А и соединение В в количестве, эквивалентном диапазонам или величинам, указанным в предыдущих абзацах, либо в отдельных составах, либо в комбинированном составе. Такой комбинированный состав является предпочтительным.

В случае, если соединение А и соединение В подлежат введению один раз в сутки, оно может быть выполнено посредством введения объединенной комбинации с фиксированной дозой, содержащей соединение А и соединение В. Лекарственные формы, которые можно вводить, описаны далее в настоящем документе, при этом лекарственные формы для перорального применения, в частности, растворы для перорального приема, являются предпочтительными.

Активные ингредиенты могут быть составлены в фармацевтических композициях либо по отдельности, либо в виде объединенной фармацевтической композиции. В последнем случае предусмотрена фармацевтическая композиция, содержащая терапевтически эффективное количество соединения А или его фармацевтически приемлемой соли и соединения В или его фармацевтически приемлемой соли и фармацевтически приемлемый носитель. Терапевтически эффективное количество в данном контексте представляет собой количество, достаточное для стабилизации или снижения интенсивности RSV-инфекции у инфицированных субъектов. Терапевтически эффективные количества могут, в частности, соответствовать количествам, указанным выше, для введения ежедневно или их частям дозы для удобства нескольких ежедневных введений.

Комбинации, представленные в настоящем документе, также можно составлять в виде комбинированного препарата для одновременного или последовательного применения в терапии против RSV. В таком случае соединение А составлено в фармацевтической композиции, содержащей другие фармацевтически приемлемые наполнители, и соединение В составлено отдельно в фармацевтической композиции, содержащей другие фармацевтически приемлемые наполнители. Условно говоря, данные отдельные фармацевтические композиции могут представлять собой часть набора для одновременного или последовательного применения.

Отдельные компоненты комбинации по настоящему изобретению можно вводить одновременно или раздельно в разные моменты времени в ходе терапии или параллельно в разделенных или единых комбинированных формах.

Следовательно, соединение А и соединение В отдельно или в комбинации можно составлять в различные фармацевтические композиции, которые подходят для целей введения. В таких композициях терапевтически эффективное количество каждого из конкретных соединений А и В объединено с фармацевтически приемлемым носителем, причем носитель может принимать широкое разнообразие форм в зависимости от необходимой для введения формы препарата. Фармацевтические композиции можно получать в виде лекарственных препаратов, предназначенных для перорального, парентерального (в том числе подкожного, внутримышечного и внутривенного), ректального, трансбуккального или интраназального введения. Подходящие композиции для перорального введения включают порошки, грануляты, агрегаты, таблетки, прессованные или покрытые пилюли, драже, саше, твердые или желатиновые капсулы, сиропы и суспензии. Подходящие композиции для парентерального введения включают водные или неводные растворы или эмульсии, при этом подходящие композиции для ректального введения включают суппозитории с гидрофильной или гидрофобной средой-носителем. Для интраназальной доставки можно применять подходящие системы аэрозольной доставки.

Например, при получении композиций для перорального введения можно использовать любую обычную фармацевтическую среду, такую как, например, вода, гликоли, масла, спирты и им подобные, в случае жидких композиций для перорального введения, таких как суспензии, сиропы, эликсиры, эмульсии и растворы; или твердые носители, такие как крахмалы, сахара, каолин, смазывающие вещества, связующие, разрыхлители и им подобные, в случае твердых композиций. В случае композиций для парентерального введения носитель будет, как правило, содержать стерильную воду, по меньшей мере, в значительной степени, хотя в носитель могут добавляться другие ингредиенты, такие как солюбилизаторы,

эмульгаторы или дополнительные вспомогательные средства. Могут быть получены инъекционные растворы, в которых носитель содержит физиологический раствор, раствор глюкозы или смесь и первого, и второго. Также можно получать суспензии для инъекций, в случае которых можно использовать соответствующие жидкие носители, суспендирующие средства и т.п. Также включены препараты в твердой форме, которые предназначены для превращения непосредственно перед применением в препараты в жидкой форме, такие как порошки для растворения.

Фармацевтические композиции для удобства могут быть представлены в стандартной лекарственной форме для простоты введения и однородности дозы. Примеры включают таблетки (в том числе делимые или покрытые оболочкой таблетки), капсулы, пилюли, суппозитории, пакеты с порошком, пластинки, растворы или суспензии для инъекций и им подобные, а также их отдельные множества.

Комбинация соединения А и соединения В, указанных в настоящем документе, подходит для лечения теплокровных животных, в частности людей, инфицированных RSV.

Используемые в настоящем документе выражения "лечить", "лечащий", "лечение", "терапевтический" и "терапия" необязательно означают полное излечение или устранение заболевания или состояния. Любое снижение значения вирусной нагрузки или облегчение любых нежелательных признаков или симптомов заболевания или состояния до некоторой степени можно рассматривать как лечение и/или терапию.

Выражения "терапевтически эффективное количество" и "эффективное количество" применяют для обозначения количества активного соединения или фармацевтического средства, которое вызывает отмечаемый биологический или медицинский ответ. Например, терапевтически эффективное количество соединения может представлять собой количество, необходимое для предупреждения, облегчения или уменьшения интенсивности симптомов заболевания, снижения значения вирусной нагрузки или продления продолжительности жизни субъекта, подвергаемого лечению. Данный ответ может возникать в ткани, системе, животном или человеке и включает снижение значения вирусной нагрузки, облегчение признаков или симптомов заболевания, которое лечат. Определение эффективного количества вполне соответствует квалификации специалистов в данной области техники с учетом раскрытия, представленного в настоящем документе. Терапевтически эффективное количество соединений, раскрытых в настоящем документе, требуемое в качестве дозы, будет зависеть от пути введения, вида животного, в том числе человека, подвергаемого лечению, и физических характеристик конкретного рассматриваемого животного. Доза может быть изменена для достижения необходимого эффекта, но будет зависеть от факторов, таких как вес, рацион, параллельное применение лекарственных препаратов и другие факторы, которые будут понятны специалистам в области медицины.

Различные показатели, предназначенные для определения эффективности способа лечения инфекции, вызываемой респираторно-синцитиальным вирусом (RSV), известны специалистам в данной области техники. Пример подходящих показателей включает без ограничения снижение значения вирусной нагрузки, снижение репликации вируса, сокращение времени до сероконверсии (вирус, который невозможно обнаружить в сыворотке пациента), снижение заболеваемости или смертности в клинических исходах и/или другой показатель ответа заболевания.

В некоторых вариантах осуществления комбинация соединения А и соединения В или фармацевтически приемлемых солей вышеуказанных соединений может обеспечивать снижение значений титра вируса до необнаруживаемых уровней, например менее $1,7 \log_{10}$ эквивалента бляшкообразующих единиц (PFUe)/мл или менее $0,3 \log_{10}$ эквивалента бляшкообразующих единиц (PFUe)/мл. В некоторых вариантах осуществления комбинация соединений, описанная в настоящем документе, может обеспечивать снижение значения вирусной нагрузки по сравнению со значением вирусной нагрузки до введения комбинации (например, через 60 ч после получения начальной дозы комбинации). В некоторых вариантах осуществления комбинация соединений, описанная в настоящем документе, может обеспечивать снижение значения вирусной нагрузки до значения менее $1,7 \log_{10}$ (PFUe)/мл или менее $0,3 \log_{10}$ (PFUe)/мл. В некоторых вариантах осуществления комбинация соединений, описанная в настоящем документе, может обеспечивать снижение титра вируса в сыворотке субъекта в диапазоне от приблизительно 1,5-кратного логарифмического до приблизительно 2,5-кратного логарифмического снижения, от приблизительно 3-кратного логарифмического до приблизительно 4-кратного логарифмического снижения или более чем приблизительно 5-кратного логарифмического снижения по сравнению со значением вирусной нагрузки до введения комбинации. Например, значение вирусной нагрузки измеряют перед введением комбинации и через несколько часов после получения начальной дозы комбинации (например, через 60 ч после получения начальной дозы комбинации).

В некоторых вариантах осуществления комбинация соединения А и соединения В или фармацевтически приемлемых солей вышеуказанных соединений может обеспечивать по меньшей мере 1-, 2-, 3-, 4-, 5-, 10-, 15-, 20-, 25-, 50-, 75-, 100-кратное или большее снижение репликации RSV относительно уровней перед осуществлением лечения у субъекта, определенное через несколько часов после получения начальной дозы комбинации (например, через 60 ч после получения начальной дозы комбинации). В некоторых вариантах осуществления комбинация, описанная в настоящем документе, может обеспечивать снижение репликации RSV относительно уровней перед осуществлением лечения в диапазоне от при-

близительно 2- до приблизительно 5-кратного, от приблизительно 10- до приблизительно 20-кратного, от приблизительно 15- до приблизительно 40-кратного или от приблизительно 50- до приблизительно 100-кратного снижения. В некоторых вариантах осуществления комбинация, описанная в настоящем документе, может обеспечивать снижение репликации RSV в диапазоне от 1- до 1,5-кратного логарифмического, от 1,5- логарифмического до 2-кратного логарифмического, от 2- логарифмического до 2,5-кратного логарифмического, от 2,5- до 3-кратного логарифмического, от 3- логарифмического до 3,5-кратного логарифмического или от 3,5- до 4-кратного логарифмического или большего снижения репликации RSV по сравнению со снижением RSV, достигаемым благодаря применению одного средства против RSV, вводимого в виде монотерапии, или может достигаться такое же снижение за более короткий период времени.

Через некоторое время возбудители инфекции могут проявлять устойчивость к одному или нескольким терапевтическим средствам. Выражение "устойчивость", используемое в настоящем документе, относится к вирусному штамму, демонстрирующему отложенный, уменьшенный и/или нулевой ответ на терапевтическое(терапевтические) средство(средства). Например, после лечения противовирусным средством значение вирусной нагрузки субъекта, инфицированного устойчивым вирусом, может быть снижено в меньшей степени по сравнению с величиной, проявляемой при снижении значения вирусной нагрузки субъектом, инфицированным неустойчивым штаммом. В некоторых вариантах осуществления комбинацию соединения А и соединения В или фармацевтически приемлемых солей вышеуказанных соединений можно вводить субъекту, инфицированному RSV, который является устойчивым к одному или нескольким различным средствам против RSV (например, рибавирину). В некоторых вариантах осуществления развитие устойчивых штаммов RSV может быть отложено при лечении субъектов с помощью комбинации соединений, описанной в настоящем документе, по сравнению с развитием штаммов RSV, устойчивых к другим средствам против RSV, вводимым в виде монотерапии.

В некоторых вариантах осуществления комбинация соединения А и соединения В или фармацевтически приемлемых солей вышеуказанных соединений может снижать процент субъектов, которые испытывают осложнения от вирусной инфекции, вызванной RSV, по сравнению с процентом субъектов, которые испытывают осложнение при лечении одним средством против RSV. Например, процент субъектов, подвергаемых лечению комбинацией соединений, описанной в настоящем документе, которые испытывают осложнения, может составлять на 5, 10, 25, 40, 50, 60, 70, 80 и 90% меньше по сравнению со значением для субъектов, подвергаемых лечению лишь одним средством против RSV, вводимым в виде монотерапии.

Потенциальное преимущество использования комбинации соединения А и соединения В или фармацевтически приемлемых солей вышеуказанных соединений может представлять собой снижение требуемого(требуемых) количества(количеств) соединения А или его фармацевтически приемлемой соли и/или соединения В или его фармацевтически приемлемых солей, которое(которые) является(являются) эффективным(эффективными) в лечении RSV-инфекции по сравнению с количеством, требуемым для достижения такого же терапевтического результата при применении одного соединения (В) или его фармацевтически приемлемых солей и/или соединения А или его фармацевтически приемлемой соли. Например, количество соединения А или его фармацевтически приемлемой соли и/или соединения В или его фармацевтически приемлемых солей может быть меньшим по сравнению с количеством вышеуказанных соединений, необходимым для достижения такого же значения снижения вирусной нагрузки при введении в виде монотерапии. Другое потенциальное преимущество использования комбинации, описанной в настоящем документе, заключается в том, что применение двух или более соединений, имеющих различный механизм действия, может создать более высокий барьер для развития устойчивых вирусных штаммов по сравнению с барьером при введении соединения в виде монотерапии. Дополнительные преимущества использования комбинации, описанной в настоящем документе, могут включать перекрестную устойчивость к соединениям комбинации - от незначительной до ее отсутствия; различные пути выведения соединений комбинации; перекрывание профилей токсичности соединений комбинации - от небольшой степени до его отсутствия; эффекты на цитохром Р450 - от небольших до незначительных; и/или фармакокинетические взаимодействия соединений комбинации - от небольших до их отсутствия.

Примеры

Следующие примеры предназначены для иллюстрации настоящего изобретения, а не для его ограничения.

Пример 1. Анализ в отношении RSV.

Черные 384-луночные титрационные микропланшеты с прозрачным дном (Corning, Амстердам, Нидерланды) заполняли путем звукового выталкивания капли с использованием устройства для манипуляций с жидкостями Echo (Labcyte, Саннивейл, Калифорния). 200 нл исходных растворов соединений (100% DMSO) переносили в планшеты для исследования. Соединение (А) или его фармацевтически приемлемую соль серийно разводили (1:3) с получением 12 различных концентраций "в горизонтальном направлении" в 384-луночной планшете и соединение (В) или его фармацевтически приемлемую соль серийно разводили (1:3) с получением 12 различных концентраций "в вертикальном направлении" в 384-

луночном планшете. Также было выделено пространство для титрования каждого из соединений по отдельности для применения в качестве эталонных контролей. Анализ инициировали путем добавления 10 мкл среды для культивирования в каждую лунку (среда RPMI без фенолового красного, 10% FBS, инактивированной нагреванием, 0,04% гентамицина (50 мг/мл). Все дополнительные стадии выполняли с использованием многоканального дозатора (Thermo Scientific, Эрембодегем, Бельгия). Затем вирус rgRSV224 (MOI=1), разведенный в среде для культивирования, вносили в планшеты. Вирус rgRSV224 представляет собой сконструированный вирус, который включает в себя дополнительный ген GFP (Hallak L.K., Spillmann D., Collins P.L., Peeples M.E. Glycosaminoglycan sulfation requirements for respiratory syncytial virus infection; Journal of virology (2000), 74(22), 10508-13), и лицензия на который была приобретена у NIH (Бетесда, Мэриленд, США). В конечном итоге вносили 20 мкл суспензии клеток HeLa (3000 клеток/лунка). Среда, инфицированные вирусом контрольные образцы и контрольные образцы с имитацией инфицирования включали в каждый тест. Лунки содержали 0,05% DMSO на объем. Клетки инкубировали при 37°C в атмосфере 5% CO₂. Через три дня после воздействия вируса количественно оценивали вирусную репликацию путем измерения экспрессии GFP в клетках с помощью собственной разработки - лазерного микроскопа MSM (Tibotec, Берсе, Бельгия). EC₅₀ определяли как 50% ингибирующую концентрацию для экспрессии GFP.

Анализ жизнеспособности клеток.

Параллельно инкубировали соединения в течение трех суток в наборе белых 384-луночных титрационных микропланшетов (Corning) и определяли цитотоксичность соединений в клетках HeLa путем измерения содержания АТФ в клетках с применением набора ATPLite (Perkin Elmer, Завентем, Бельгия) в соответствии с инструкциями изготовителя. CC₅₀ определяли как 50% концентрацию для цитотоксичности.

Анализ данных.

Каждый эксперимент осуществляли при N=3 как в отношении активности против RSV, так и в отношении жизнеспособности клеток. Получали среднее процентное ингибирование величин содержания репликонов из 3 экспериментов и в отношении активности против RSV рассчитывали показатель аддитивности (CI) с помощью программы из пакета программного обеспечения CalCuSyn от Biosoft (Biosoft, Великобритания): $CI = [(D)1/(Dx)1] + [(D)2/(Dx)2]$. Комбинацию определяли как: CI<1: синергия; CI>1: антагонизм; CI=1: аддитивность. Более подробный диапазон CI представлен в таблице ниже.

Диапазон CI	Описание	Символы
< 0,1	Очень сильный синергизм	+++++
0,1-0,3	Сильный синергизм	++++
0,3-0,7	Синергизм	+++
0,7-0,85	Умеренный синергизм	++
0,85-0,90	Легкий синергизм	+
0,90-1,10	Практически аддитивность	+/-
1,10-1,20	Легкий антагонизм	-
1,20-1,45	Умеренный антагонизм	--
1,45-3,3	Антагонизм	---
3,3-10	Сильный антагонизм	----
>10	Очень сильный антагонизм	-----

Пример 2. Исследования комбинации - RSV с репортерным геном Renilla.

RSV, экспрессирующий люциферазу Renilla (A2-RL-line19F), был получен доктором Мартином Муром из Университета Эмори, Атланта, Джорджия, США. In vitro вирусная кинетика A2-RL-line19F подобна таковой RSV дикого типа. Линию HEp-2 клеток-хозяев приобретали у ATCC (№ по кат. CCL-23) и клетки культивировали в 1x 50/50 DMEM/среда Хэма F-12, содержащей L-глутамин и 15 мМ NEPES (Mediatech, № по кат. 10-092-CM). В среду дополнительно добавляли 5% (об./об.) FBS (Mediatech, № по кат. 35-010-CV) и 1% (об./об.) пенициллина/стрептомицина (Mediatech, № по кат. 30-002-CI). Клетки HEp-2 выдерживали при 37°C в увлажненной атмосфере с 5% CO₂.

Обработка лекарственным средством и введение доз вируса.

Для определения эффекта комбинации соединений следовали следующей процедуре. В первые сутки высевали 20000 клеток HEp-2/лунка в 96-луночном планшете. На следующие сутки тестируемые образцы солибилизировали в 100% DMSO до необходимой конечной тестовой концентрации, составляющей 200x. Затем соединение (A) или его фармацевтически приемлемую соль серийно разводили (1:3) с

получением 9 различных концентраций "в горизонтальном направлении" в 96-луночной планшете и соединении (B) или его фармацевтически приемлемую соль серийно разводили (1:3) с получением 7 различных концентраций "в вертикальном направлении" в 96-луночной планшете. Серийно разведенные тестируемые образцы 200× затем разводили 1:10 в питательной среде для клеток с получением тестируемых образцов 20×. Аликвоту, составляющую 5 мкл, тестируемых образцов 20× добавляли в шахматном порядке к клеткам с 90 мкл существующей среды. Также было выделено пространство для титрования каждого из соединений по отдельности для применения в качестве эталонных контролей. После 12-часовой предварительной инкубации тестируемых образцов в планшет добавляли A2-RL-line19F при MOI, составляющей 0,5, и дополнительно инкубировали в течение 2 суток при 37°C в 5% CO₂.

Определение активности против RSV.

Систему анализа с использованием люциферазы Renilla (Promega, № по кат. E2820) применяли для измерения активности против RSV. Анализируемые планшеты подготавливали, как указано выше. Люминесценцию регистрировали с использованием многометочного счетчика Victor3V от Perkin Elmer.

Анализ жизнеспособности клеток.

Люминесцентный анализ жизнеспособности клеток CellTiter-Glo (Promega, № по кат. G7572) применяли для измерения жизнеспособности клеток. Люминесцентный анализ жизнеспособности клеток CellTiter-Glo® представляет собой однофазный способ определения числа жизнеспособных клеток в культуре на основе определения количества присутствующего аденозинтрифосфата (АТФ), который сигнализирует о наличии метаболически активных клеток. Анализируемые планшеты подготавливали при таких же условиях, что и для анализа в отношении RSV, за исключением того, что вирус не добавляли при анализе жизнеспособности клеток. Аликвоту 100 мкл реагента CellTiter-Glo добавляли в каждую лунку и инкубировали при комнатной температуре в течение 8 мин. Люминесценцию регистрировали с использованием многометочного счетчика Victor3V от Perkin Elmer.

Анализ данных.

Каждый эксперимент осуществляли при N=5 как в отношении активности против RSV, так и в отношении жизнеспособности клеток. Получали среднее процентное ингибирование величин содержания репликонов из 5 экспериментов и активность против RSV анализировали с применением двух моделей анализа взаимодействия лекарственных средств, анализа изоболограммы и/или модели Причарда.

Анализ изоболограммы.

Эффекты комбинаций "лекарственное средство-лекарственное средство" оценивали с помощью модели аддитивности Лева, в которой экспериментальные данные анализировали с применением CalcuSyn (Biosoft, Фергюсон, Миссури), компьютерной программы на основе метода Чжоу-Талалэя. Для каждой экспериментальной комбинации рассчитывали величину показателя аддитивности (CI) и изоболограмму. Величины CI, составляющие соответственно <1, 1 и >1, указывают на синергию, аддитивный эффект и антагонизм. В рамках категории синергии: CI<0,1 предусматривает очень сильный синергизм; CI 0,1-0,3 - сильный синергизм; CI 0,3-0,7 - синергизм и CI 0,7- 0,85 - умеренный синергизм. Анализ изоболограммы, который графически представляет аддитивный, синергический и антагонистический эффекты лекарственных средств, также применяли для моделирования взаимодействия противовирусных активностей. В данном представлении величина эффективной концентрации (EC) одного лекарственного средства нанесена на одну ось, а соответствующая величина EC второго лекарственного средства нанесена на вторую ось; при этом линия, соединяющая данные две точки, представляет собой количество каждого лекарственного средства в комбинации, которое может потребоваться для достижения эквивалентной величины EC, при условии, что их эффекты являются аддитивными.

Модель Причарда (Mac Synergy II).

Программное обеспечение MacSynergy II было любезно предоставлено доктором М. Причардом (Мичиганский университет). Данная программа позволяет проводить трехмерное исследование взаимодействия лекарственных средств во всех точках данных, полученных от комбинации в шахматном порядке двух ингибиторов с помощью модели независимого анализа межлекарственных взаимодействий по Блисссу. Доверительные пределы определяли из дублированных данных. Если 95% доверительных пределов (CI) не перекрывают теоретическую аддитивную поверхность, то взаимодействие между двумя лекарственными средствами существенно отличается от аддитивного. Размеры синергии или антагонизма можно определять и графически изображать в трех измерениях и представлять относительную величину синергизма или антагонизма на одно изменение концентраций двух лекарственных средств. Размеры синергии и антагонизма основаны на модели независимого анализа межлекарственных взаимодействий по Блисссу, которая предполагает, что оба соединения действуют независимо друг от друга на разные цели. Набор расчетных фракционных ответов faAB в соответствии с моделью независимого анализа межлекарственных взаимодействий по Блисссу рассчитывают как $faAB=faA+faB-faA \times faB$, при этом faA и faB представляют собой фракцию возможных ответов, например % ингибирования соединений A и B соответственно при количествах dA и dB, и он описывает % ингибирования комбинации соединений A и B при количестве (dA+dB). Если $faAB>faA+faB-faA \times faB$, то получается синергия по Блисссу; если $faAB<faA+faB-faA \times faB$, то получается антагонизм по Блисссу. 95% размеров синергии/антагонизма пред-

ставляет собой суммирование значений разности между наблюдаемым ингибированием и 95% доверительным пределом при прогнозировании faAB в соответствии с моделью независимого анализа межлекарственных взаимодействий по Блисссу. В табл. 1 показаны размеры и соответствующие описания размеров для результатов независимого анализа межлекарственных взаимодействий по Блисссу. Для анализа данных применяли MacSynergy II.

Таблица 1

Описание размеров с помощью MacSynergy II	
Размер (мкМ ² %)	Описание размера
< 25	аддитивность
25-50	незначительный синергизм
50-100	значительный синергизм
> 100	сильный синергизм

Пример 3. Эксперименты в отношении анализируемой комбинации для RSV.

Для оценивания их объединенного противовирусного эффекта в отношении RSV проводили исследования комбинации *in vitro* с JNJ-53718678 ("соединение А") и различными соединениями с различными механизмами действия ("соединение В"). Вкратце, 9 концентраций соединения А объединяли с 6 или 7 концентрациями определенного соединения В. Клетки HeLa инфицировали с помощью rgRSV224, разработанного штамма RSV, который кодирует eGFP (Hallak LK, Spillmann D, Collins PL, Peeples ME. Glycosaminoglycan sulfation requirements for respiratory syncytial virus infection; Journal of Virology (2000), 74(22), 10508-13), в присутствии различных концентраций соединения А и соединения В по отдельности или в комбинации.

Исходные растворы соединений представляли собой 5 мМ в 100% DMSO со следующими исключениями: рибавирин, 20 мМ; А 60444, 10 мМ; CR9501, 141 мкМ в PBS; паливизумаб, 156 мкМ в PBS; MDT 637, 100 мкМ в метаноле. Во-первых, соединения серийно разводили в 3-кратных сериях разведения в DMSO; CR9501 и паливизумаб серийно разводили в клеточной культуральной среде и MDT 637 - в метаноле. Серию концентраций разводили 100-кратно в клеточной культуральной среде с достижением комбинированной матрицы. 10 мкл данных растворов соединения переносили в черные 384-луночные обработанные культурой тканей планшеты с прозрачным дном. Затем добавляли 10 мкл суспензии клеток HeLa с концентрацией 150000 клеток на 1 мл для достижения концентрации 3000 клеток в лунке. Наконец, добавляли 10 мкл разведенного исходного раствора, содержащего вирус, для достижения MOI, составляющей 1. Конечная концентрация DMSO во всех лунках составляла 0,5% DMSO за исключением случая эксперимента с MDT 637, где она составляла 0,25% DMSO+0,25% метанола. Каждую комбинацию концентраций соединений тестировали в 4 повторностях на 3 отдельных планшетах с получением в общей сложности 12 повторностей. Планшеты инкубировали в течение 3 суток при 37°C в увлажненной атмосфере при 5% CO₂. Сигнал GFP измеряли с помощью устройства EnVision от PerkinElmer с применением фильтра 405 нм.

Для статистического анализа наблюдаемый сигнал GFP нормализовали с применением вирусных контролей (VC) и клеточных контролей (CC) на соответствующем планшете: $\text{ответ} = (\text{GFP} - \text{CC}) / (\text{VC} - \text{CC})$, где CC вычисляли как медианное значение GFP для всех холостых лунок (без вируса) и VC вычисляли как медианное значение GFP для всех контрольных лунок (без соединения).

Для оценивания синергии применяли метод Харбрана (Statistics in Medicine, 2010, DOI:10.1002/sim3916). Применяя определение Лева, два соединения определяют как являющиеся аддитивными, синергическими или антагонистическими с помощью выражения:

$$\frac{d_1}{D_{y,1}} + \frac{d_2}{D_{y,2}} \begin{cases} = 1, & \text{аддитивность} \\ < 1, & \text{синергия} \\ > 1, & \text{антагонизм,} \end{cases}$$

где d_1 и d_2 представляют собой дозы двух соединений, которые в комбинации обеспечивают эффект y , и $D_{y,1}$ и $D_{y,2}$ представляют собой дозы двух соединений, которые обеспечивают такой же эффект y при введении в виде монотерапии. ЗРЛ-модель (3-параметрическую логарифмически-логистическую модель) применяли для данных о зависимости "доза-эффект" при монотерапии, где исходный уровень ответа устанавливали на уровне единицы.

В соответствии с подходом Харбрана следующие модели приспособляли к данным:

"аддитивная": исходя из отсутствия взаимодействия между двумя соединениями;

"однородная": исходя из постоянного показателя взаимодействия τ во всех комбинациях доз;

"линейная А": исходя из того, что показатель взаимодействия линейно зависит от \log_{10} дозы соединения А: $\tau = \tau_1 + \tau_2 \log_{10}(d_A)$;

"отдельная А": исходя из того, что показатель взаимодействия τ принимает отдельное значение для каждой дозы соединения А.

Последние две модели также рассматривали для соединения В:

"линейная В": исходя из того, что показатель взаимодействия τ линейно зависит от \log_{10} дозы соединения В: $\tau = \tau_1 + \tau_2 \log_{10}(d_B)$;

"отдельная В": исходя из того, что показатель взаимодействия τ принимает отдельное значение для каждой дозы соединения В.

"Отдельная А" модель была выбрана из всех тестируемых комбинаций на основании информационного критерия Акаике (АИС). Результаты тестов для комбинаций соединения А с различными соединениями В представлены ниже.

Комбинация: соединение А и пумлоцидное соединение (N-(2-фтор-6-метилфенил)-6-(4-(5-метил-2-(7-окса-2-азаспиро[3.5]нонан-2-ил)никотинамидо)бензоил)-5,6-дигидро-4Н-бензо[б]тиено[2,3-d]азепин-2-карбоксамид) в качестве соединения В.

Таблица 2

Нормализованные данные для соединения А в комбинации с пумлоцидным соединением (среднее из 12 повторностей)

	A=0	A=0,19	A=0,57	A=1,7	A=5,1	A=15	A=46	A=139	A=417	A=1250
B=0	0,94	0,96	0,92	0,78	0,56	0,43	0,36	0,20	0,11	0,06
B=0,058	0,99	0,99	0,93	0,81	0,56	0,39	0,28	0,17	0,08	0,04
B=0,17	0,99	0,99	0,91	0,74	0,51	0,37	0,23	0,16	0,08	0,04
B=0,52	1,04	0,96	0,87	0,70	0,45	0,31	0,23	0,14	0,07	0,04
B=1,6	0,91	0,87	0,75	0,46	0,27	0,18	0,11	0,06	0,04	0,02
B=4,7	0,20	0,14	0,12	0,06	0,03	0,01	0,01	-0,00	-0,00	-0,00
B=14	0,02	0,01	-0,00	-0,01	-0,01	-0,01	-0,02	-0,01	-0,01	-0,01
B=42	0,02	0,01	0,01	0,00	-0,00	-0,01	-0,01	-0,00	-0,00	-0,00

В табл. 3 показано, что показатель взаимодействия (τ) оценивается с 95% доверительными интервалами (CI) для "отдельной А" модели. При условии, что степень синергии варьируется в зависимости от доз соединения А, обнаруживается значительная степень синергии при дозах, составляющих 0,57 нМ и выше. В целом степень синергии увеличивается с повышением уровней дозы при плато примерно от 5,1 до 139 нМ.

Таблица 3

Оценочные значения показателей взаимодействия при 95% CI для "отдельной А" модели. Показатель взаимодействия при значении EC_{50} аппроксимировали посредством линейной интерполяции оценок τ у

	Доза (нМ)	Оценка	95% CI
τ_1	0,19	1,013	(0,955, 1,075)
τ_2	0,57	0,93	(0,875, 0,989)
τ_3	1,7	0,636	(0,601, 0,674)
τ_4	5,1	0,479	(0,449, 0,51)
τ_5	15	0,484	(0,443, 0,528)
τ_6	46	0,544	(0,479, 0,618)
τ_7	139	0,51	(0,412, 0,632)
τ_8	417	0,234	(0,198, 0,277)
τ_9	1250	0,073	(0,06, 0,088)
τ_{EC50}	9,79	0,481	(н. д., н. д.)

Комбинация: соединение А и паливизумаб в качестве соединения В.

Таблица 4

Нормализованные данные для соединения А в комбинации с паливизумабом в качестве соединения В (среднее из 12 повторностей)

	A=0	A=0,19	A=0,57	A=1,7	A=5,1	A=15	A=46	A=139	A=417	A=1250
B=0	1,11	1,04	0,98	0,86	0,57	0,38	0,28	0,17	0,09	0,05
B=0,0061	1,05	0,99	0,93	0,77	0,51	0,34	0,26	0,15	0,08	0,04
B=0,018	1,01	0,94	0,88	0,74	0,44	0,30	0,19	0,12	0,06	0,03
B=0,055	0,97	0,90	0,84	0,69	0,42	0,26	0,20	0,12	0,06	0,03
B=0,165	1,01	0,93	0,82	0,64	0,32	0,16	0,11	0,06	0,03	0,02
B=0,494	0,89	0,78	0,61	0,25	0,08	0,04	0,02	0,00	0,00	0,00
B=1,482	0,33	0,13	0,08	0,02	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
B=4,447	0,06	0,03	0,02	0,01	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

В табл. 5 показано, что показатель взаимодействия (τ) оценивается с 95% доверительными интервалами (CI) для "отдельной А" модели. Следует заметить, что модель была подобрана посредством установления наклона в ЗРЛ-модели для соединения В с оценкой, полученной в результате подбора моноте-

рапии. При условии, что степень синергии варьируется в зависимости от доз соединения А, обнаруживается значительная степень синергии для всех рассматриваемых уровней дозы. В целом степень синергии увеличивается с повышением уровней дозы при плато примерно от 5,1 до 139 нМ.

Таблица 5

Оценочные значения показателей взаимодействия при 95% CI для "отдельной А" модели. Показатель взаимодействия при значении EC_{50} аппроксимировали посредством линейной интерполяции оценок τ

	Доза (нМ)	Оценка	95% CI
τ_1	0,19	0,788	(0,726, 0,855)
τ_2	0,57	0,626	(0,579, 0,678)
τ_3	1,7	0,386	(0,357, 0,418)
τ_4	5,1	0,248	(0,224, 0,273)
τ_5	15	0,237	(0,206, 0,273)
τ_6	46	0,31	(0,253, 0,38)
τ_7	139	0,274	(0,185, 0,407)
τ_8	417	0,101	(0,044, 0,232)
τ_9	1250	0,036	(0,018, 0,076)
$\tau_{EC 50}$	7,6	0,245	(н. д., н. д.)

Комбинация: соединение А и AZ-27 в качестве соединения В.

Таблица 6

Нормализованные данные для соединения А в комбинации с AZ-27 в качестве соединения В (среднее из 12 повторностей)

	A=0	A=0,19	A=0,57	A=1,7	A=5,1	A=15	A=46	A=139	A=417	A=1250
B=0	0,99	0,98	0,96	0,89	0,71	0,45	0,25	0,17	0,07	0,04
B=17	1,03	0,98	0,97	0,86	0,60	0,34	0,20	0,12	0,05	0,03
B=51	1,00	0,93	0,90	0,72	0,45	0,23	0,13	0,07	0,03	0,02
B=154	0,53	0,43	0,38	0,22	0,10	0,05	0,03	0,02	0,01	0,01
B=463	0,07	0,05	0,04	0,03	0,00	-0,01	-0,00	-0,01	-0,01	-0,00
B=1389	0,01	0,00	0,00	-0,01	-0,01	-0,01	-0,00	-0,00	-0,00	-0,00
B=4167	0,00	0,00	0,00	-0,00	-0,01	-0,01	-0,00	0,00	-0,00	0,00

В табл. 7 показано, что показатель взаимодействия (τ) оценивается с 95% CI для "отдельной А" модели. При условии, что степень синергии варьируется в зависимости от доз соединения А, обнаруживается значительная степень синергии для всех рассматриваемых уровней дозы. В целом степень синергии увеличивается с повышением уровней дозы при плато примерно от 5,1 до 139 нМ.

Таблица 7

Оценочные значения показателей взаимодействия при 95% CI для "отдельной А" модели. Показатель взаимодействия при значении EC_{50} аппроксимировали посредством линейной интерполяции оценок τ

	Доза (нМ)	Оценка	95% CI
τ_1	0,19	0,922	(0,896, 0,949)
τ_2	0,57	0,894	(0,867, 0,923)
τ_3	1,7	0,755	(0,724, 0,788)
τ_4	5,1	0,609	(0,579, 0,642)
τ_5	15	0,537	(0,499, 0,578)
τ_6	46	0,582	(0,515, 0,658)
τ_7	139	0,57	(0,43, 0,755)
τ_8	417	0,312	(0,171, 0,57)
τ_9	1250	0,126	(0,093, 0,17)
$\tau_{EC 50}$	11,99	0,559	(н. д., н. д.)

Комбинация: соединение А и GS-5806 в качестве соединения В.

Таблица 8

Нормализованные данные для соединения А в комбинации с GS-5806 в качестве соединения В (среднее из 12 повторностей)

	A=0	A=0,19	A=0,57	A=1,7	A=5,1	A=15	A=46	A=139	A=417	A=1250
B=0	1,06	0,99	0,93	0,83	0,47	0,30	0,21	0,11	0,06	0,03
B=0,051	0,99	0,96	0,91	0,71	0,44	0,23	0,17	0,09	0,05	0,03
B=0,15	0,98	0,91	0,87	0,68	0,39	0,22	0,17	0,08	0,05	0,02
B=0,46	0,83	0,82	0,74	0,50	0,32	0,21	0,13	0,08	0,04	0,01
B=1,4	0,36	0,39	0,27	0,21	0,18	0,17	0,13	0,08	0,04	0,01
B=4,2	0,19	0,13	0,09	0,07	0,06	0,08	0,12	0,08	0,04	0,02
B=12,5	0,06	0,05	0,06	0,03	0,03	0,04	0,04	0,04	0,04	0,03
B=37,5	0,05	0,03	0,03	0,03	0,03	0,02	0,02	0,03	0,04	0,03

В табл. 9 показано, что показатель взаимодействия (τ) оценивается с 95% доверительными интервалами (CI) для "отдельной А" модели. При условии, что степень синергии варьируется в зависимости от доз соединения А, обнаруживается значительная степень синергии при дозах, составляющих от 0,57 до 15 нМ. Следует заметить, что показатель взаимодействия при самой высокой концентрации не поддавался оцениванию.

Таблица 9

Оценочные значения показателей взаимодействия при 95% CI для "отдельной А" модели. Показатель взаимодействия при значении EC_{50} аппроксимировали посредством линейной интерполяции оценок τ

	Доза (нМ)	Оценка	95% CI
τ_1	0,19	1,063	(0,985, 1,148)
τ_2	0,57	0,895	(0,832, 0,963)
τ_3	1,7	0,728	(0,678, 0,78)
τ_4	5,1	0,678	(0,621, 0,74)
τ_5	15	0,783	(0,684, 0,897)
τ_6	46	1,321	(1,091, 1,598)
τ_7	139	0,938	(0,469, 1,878)
τ_8	417	0,037	(0,007, 0,204)
τ_9	1250	0	(н. д., н. д.)
τEC_{50}	5,17	0,679	(н. д., н. д.)

Комбинация: соединение А и MDT-637 в качестве соединения В.

Таблица 10

Нормализованные данные для соединения А в комбинации с MDT-637 в качестве соединения В (среднее из 12 повторностей)

	A=0	A=0,19	A=0,57	A=1,7	A=5,1	A=15	A=46	A=139	A=417	A=1250
B=0	1,01	0,98	0,97	0,85	0,43	0,26	0,16	0,06	0,02	-0,00
B=0,038	1,01	0,98	0,90	0,76	0,41	0,22	0,11	0,04	0,01	-0,01
B=0,12	0,99	0,95	0,89	0,72	0,39	0,17	0,09	0,03	-0,00	-0,02
B=0,35	0,95	0,93	0,86	0,65	0,36	0,15	0,09	0,04	-0,01	-0,01
B=1	0,93	0,89	0,80	0,58	0,30	0,16	0,07	0,03	-0,00	-0,02
B=3,1	0,75	0,69	0,59	0,38	0,23	0,12	0,07	0,03	0,00	-0,01
B=9,3	0,14	0,11	0,10	0,10	0,11	0,11	0,08	0,04	0,00	-0,01
B=28	0,01	0,00	-0,00	-0,01	0,04	0,08	0,08	0,05	0,02	0,00

Следует заметить, что для отдельной А модели показатели взаимодействия при двух самых высоких концентрациях не поддавались оцениванию (τ_8 и τ_9), и результаты основаны на значении локального оптимума. В табл. 11 показано, что показатель взаимодействия (τ) оценивается с 95% доверительными интервалами (CI) для "отдельной А" модели. При условии, что степень синергии варьируется в зависимости от доз соединения А, обнаруживается значительная степень синергии при дозах, составляющих от 0,19 до 15 нМ.

Таблица 11

Оценочные значения показателей взаимодействия при 95% CI для "отдельной А" модели. Показатель взаимодействия при значении EC_{50} аппроксимировали посредством линейной интерполяции оценок τ

	Доза (нМ)	Оценка	95% CI
τ_1	0,19	0,93	(0,87, 0,995)
τ_2	0,57	0,865	(0,811, 0,924)
τ_3	1,7	0,756	(0,709, 0,806)
τ_4	5,1	0,668	(0,615, 0,726)
τ_5	15	0,756	(0,665, 0,859)
τ_6	46	1,081	(0,875, 1,334)
τ_7	139	1,111	(0,542, 2,278)
τ_8	417	0,225	(н. д., н. д.)
τ_9	1250	0	(н. д., н. д.)
τEC_{50}	4,85	0,674	(н. д., н. д.)

Комбинация: соединение А и 4-амино-8-[3-[[2-(3,4-диметоксифенил)этил]амино]пропил]-6,6-

диметил-2-(4-метил-3-нитрофенил)-3Н-имидазо[4,5-b]изохинолин-7,9(6Н,8Н)-дион в качестве соединения В.

Таблица 12

Нормализованные данные для соединения А в комбинации с 4-амино-8-[3-[[2-(3,4-диметоксифенил)этил]амино]пропил]-6,6-диметил-2-(4-метил-3-нитрофенил)-3Н-имидазо[4,5-h]изохинолин-7,9(6Н,8Н)-дионом в качестве соединения В (среднее из 12 повторностей)

	A=0	A=0,19	A=0,57	A=1,7	A=5,1	A=15	A=46	A=139	A=417	A=1250
B=0	1,02	0,99	0,96	0,83	0,50	0,31	0,19	0,10	0,06	0,04
B=1,9	0,99	0,96	0,89	0,74	0,47	0,24	0,16	0,09	0,05	0,01
B=5,7	0,97	0,94	0,85	0,73	0,43	0,24	0,13	0,08	0,04	0,02
B=17	0,89	0,84	0,79	0,64	0,35	0,20	0,15	0,05	0,04	0,01
B=51	0,74	0,65	0,60	0,47	0,22	0,18	0,09	0,05	0,02	0,01
B=154	0,38	0,38	0,34	0,22	0,11	0,05	0,03	0,02	0,01	0,01
B=463	0,05	0,03	0,04	0,03	0,01	0,01	0,01	-0,00	-0,00	-0,00
B=1389	0,01	0,01	0,00	0,00	-0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Следует заметить, что в столбце 1 в планшете 3 был обнаружен дефект изготовления, соответствующий данным о монотерапии для соединения В, и что такие данные не учитывались в анализе (этим обусловлено наличие 10 вместо 12 повторностей). В табл. 13 показано, что показатель взаимодействия (τ) оценивается с 95% доверительными интервалами (CI) для "отдельной А" модели. При условии, что степень синергии варьируется в зависимости от доз соединения А, обнаруживается значительная степень синергии при концентрациях, составляющих от 0,57 до 46 нМ.

Таблица 13

Оценочные значения показателей взаимодействия при 95% CI для "отдельной А" модели. Показатель взаимодействия при значении EC_{50} аппроксимировали посредством линейной интерполяции оценок τ

	Доза (нМ)	Оценка	95% CI
τ_1	0,19	0,954	(0,878, 1,037)
τ_2	0,57	0,89	(0,821, 0,964)
τ_3	1,7	0,72	(0,668, 0,776)
τ_4	5,1	0,49	(0,449, 0,534)
τ_5	15	0,512	(0,453, 0,579)
τ_6	46	0,682	(0,57, 0,816)
τ_7	139	0,762	(0,548, 1,061)
τ_8	417	0,847	(0,454, 1,583)
τ_9	1250	0,85	(0,34, 2,129)
$\tau_{EC 50}$	5,39	0,49	(н. д., н. д.)

Комбинация: соединение А и моноклональное антитело CR9501 в качестве соединения В.

Таблица 14

Нормализованные данные для соединения А в комбинации с CR9501 в качестве соединения В (среднее из 12 повторностей)

	A=0	A=0,19	A=0,57	A=1,7	A=5,1	A=15	A=46	A=139	A=417	A=1250
B=0	1,06	1,05	1,01	0,89	0,64	0,41	0,28	0,21	0,10	0,06
B=0,002	1,06	0,98	0,94	0,80	0,51	0,37	0,26	0,17	0,06	0,04
B=0,0061	0,99	0,94	0,89	0,73	0,43	0,30	0,21	0,13	0,05	0,04
B=0,018	0,93	0,88	0,79	0,67	0,39	0,26	0,18	0,10	0,04	0,02
B=0,055	0,99	0,92	0,80	0,52	0,24	0,15	0,07	0,04	0,02	0,01
B=0,164	0,77	0,66	0,49	0,26	0,07	0,03	0,01	0,00	0,00	0,00
B=0,493	0,28	0,18	0,09	0,03	0,01	-0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
B=1,48	0,04	0,02	0,01	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

В табл. 15 показано, что показатель взаимодействия (τ) оценивается с 95% доверительными интервалами (CI) для "отдельной А" модели. При условии, что степень синергии варьируется в зависимости от доз соединения А, обнаруживается значительная степень синергии для всех значений концентрации.

Таблица 15

Оценочные значения показателей взаимодействия при 95% CI для "отдельной А" модели. Показатель взаимодействия при значении EC₅₀ аппроксимировали посредством линейной интерполяции оценок тау

	Доза (нМ)	Оценка	95% CI
τ_1	0,19	0,844	(0,772, 0,921)
τ_2	0,57	0,599	(0,55, 0,652)
τ_3	1,7	0,375	(0,343, 0,41)
τ_4	5,1	0,21	(0,187, 0,235)
τ_5	15	0,217	(0,186, 0,253)
τ_6	46	0,245	(0,195, 0,308)
τ_7	139	0,243	(0,161, 0,367)
τ_8	417	0,059	(0,009, 0,407)
τ_9	1250	0,023	(0,003, 0,176)
τ EC 50	8,93	0,212	(н. д., н. д.)

Комбинация: соединение А и рибавирин в качестве соединения В.

Таблица 16

Нормализованные данные для соединения А в комбинации с рибавирином в качестве соединения В (среднее из 12 повторностей)

	A=0	A=0,19	A=0,57	A=1,7	A=5,1	A=15	A=46	A=139	A=417	A=1250
B=0	1,01	0,97	0,95	0,87	0,63	0,39	0,25	0,15	0,08	0,04
B=69	1,00	0,99	0,93	0,81	0,54	0,33	0,23	0,15	0,07	0,05
B=206	0,98	0,95	0,85	0,77	0,51	0,34	0,23	0,14	0,07	0,04
B=617	0,98	0,88	0,86	0,72	0,49	0,29	0,20	0,13	0,06	0,04
B=1852	0,97	0,91	0,83	0,69	0,46	0,22	0,16	0,11	0,05	0,03
B=5556	0,94	0,91	0,83	0,63	0,34	0,16	0,13	0,07	0,04	0,03
B=16667	0,83	0,72	0,62	0,39	0,17	0,08	0,06	0,04	0,03	0,02
B=50000	0,13	0,12	0,09	0,05	0,02	0,01	0,02	0,02	0,01	0,01

В табл. 17 показано, что показатель взаимодействия (τ) оценивается с 95% доверительными интервалами (CI) для "отдельной А" модели. Следует заметить, что 2PL-модель с нижней границей, установленной на нуле, была подобрана для данных о монотерапии для соединения В. При условии, что степень синергии варьируется в зависимости от доз соединения А, обнаруживается значительная степень синергии для значений концентрации от 0,19 до 139 нМ.

Таблица 17

Оценочные значения показателей взаимодействия при 95% CI для "отдельной А" модели. Показатель взаимодействия при значении EC₅₀ аппроксимировали посредством линейной интерполяции оценок тау

	Доза (нМ)	Оценка	95% CI
τ_1	0,19	0,911	(0,852, 0,974)
τ_2	0,57	0,812	(0,761, 0,867)
τ_3	1,7	0,61	(0,572, 0,651)
τ_4	5,1	0,407	(0,377, 0,44)
τ_5	15	0,338	(0,303, 0,376)
τ_6	46	0,486	(0,419, 0,563)
τ_7	139	0,648	(0,511, 0,822)
τ_8	417	0,652	(0,378, 1,126)
τ_9	1250	0,934	(0,347, 2,52)
τ EC 50	9,04	0,379	(н. д., н. д.)

Комбинация: соединение А и А-60444 в качестве соединения В.

Таблица 18

Нормализованные данные для соединения А в комбинации с А-60444 в качестве соединения В (среднее из 12 повторностей)

	A=0	A=0,19	A=0,57	A=1,7	A=5,1	A=15	A=46	A=139	A=417	A=1250
B=0	0,97	0,96	0,95	0,83	0,55	0,38	0,28	0,14	0,07	0,04
B=34	1,00	0,97	0,92	0,82	0,59	0,36	0,23	0,15	0,09	0,04
B=103	1,00	0,96	0,87	0,82	0,58	0,34	0,23	0,14	0,07	0,04
B=309	0,96	0,93	0,88	0,75	0,52	0,30	0,22	0,16	0,07	0,04
B=926	0,93	0,92	0,86	0,73	0,55	0,30	0,22	0,16	0,08	0,03
B=2778	0,93	0,92	0,83	0,71	0,52	0,27	0,17	0,12	0,07	0,03
B=8333	0,75	0,72	0,62	0,45	0,16	0,08	0,05	0,03	0,02	0,01
B=25000	0,39	0,31	0,24	0,12	0,04	0,01	0,01	0,01	0,00	0,00

В табл. 19 показано, что показатель взаимодействия (τ) оценивается с 95% доверительными интервалами (CI) для "отдельной А" модели. Следует заметить, что 2PL-модель с нижней границей, установленной на нуле, была подобрана для данных о монотерапии для соединения В. При условии, что степень синергии варьируется в зависимости от доз соединения А, обнаруживается значительная степень синергии для значений концентрации от 0,57 до 139 нМ.

Таблица 19

Оценочные значения показателей взаимодействия при 95% CI для "отдельной А" модели. Показатель взаимодействия при значении EC_{50} аппроксимировали посредством линейной интерполяции оценок τ

	Доза (нМ)	Оценка	95% CI
τ_1	0,19	1,072	(0,976, 1,177)
τ_2	0,57	0,844	(0,769, 0,926)
τ_3	1,7	0,635	(0,579, 0,696)
τ_4	5,1	0,407	(0,368, 0,45)
τ_5	15	0,308	(0,27, 0,351)
τ_6	46	0,409	(0,346, 0,484)
τ_7	139	0,631	(0,502, 0,792)
τ_8	417	0,858	(0,585, 1,257)
τ_9	1250	1,403	(0,768, 2,562)
$\tau_{EC 50}$	7,89	0,379	(н. д., н. д.)

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Комбинация, предназначенная для лечения или ослабления инфекции, вызванной респираторно-синцитиальным вирусом (RSV), содержащая 3-({5-хлор-1-[3-(метилсульфонил)пропил]-1H-индол-2-ил}метил)-1-(2,2,2-трифторэтил)-1,3-дигидро-2H-имидазо[4,5-с]пиридин-2-он или его фармацевтически приемлемую соль в качестве соединения А и рибавирин или его фармацевтически приемлемую соль в качестве соединения В, где количество соединения А соответствует значению концентрации от 0,19 до 139 нМ и количество соединения В соответствует значению концентрации от 206 до 50000 нМ.

2. Фармацевтическая композиция, обладающая активностью против RSV, содержащая терапевтически эффективное количество комбинации по п. 1 и фармацевтически приемлемый носитель.



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2