

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202290561** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.07.14

(22) Дата подачи заявки
2020.08.27

(51) Int. Cl. *A61K 31/16* (2006.01)
A61K 31/196 (2006.01)
A61K 31/4196 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01)
A61P 31/14 (2006.01)
A61P 31/16 (2006.01)
A61K 31/4458 (2006.01)
A61K 31/519 (2006.01)
A61K 31/53 (2006.01)
A61K 31/18 (2006.01)
A61K 31/353 (2006.01)
A61K 31/4184 (2006.01)
A61K 31/506 (2006.01)
A61K 31/535 (2006.01)

(54) КОМБИНАЦИИ ИНГИБИТОРОВ МЕК С ИНГИБИТОРАМИ КЭП-ЗАВИСИМОЙ ЭНДОНУКЛЕАЗЫ

(31) LU101372

(32) 2019.08.27

(33) LU

(86) PCT/EP2020/073934

(87) WO 2021/037956 2021.03.04

(71) Заявитель:
АТРИВА ТЕРАПЬЮТИКС ГМБХ
(DE)

(72) Изобретатель:

Планц Оливер, Эвесс Хазем (DE)

(74) Представитель:

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

(57) Изобретение относится к ингибиторам МЕК, которые способны проявлять один или более чем один благоприятный терапевтический эффект. Ингибиторы МЕК могут быть использованы в предупреждении и/или лечении вирусной инфекции. Ингибиторы МЕК в комбинации с ингибитором кэп-зависимой эндонуклеазы способны проявлять один или более чем один благоприятный терапевтический эффект в лечении вирусных заболеваний.

A1

202290561

202290561

A1

PCT/EP2020/073934

МПК: *A61K 31/16* (2006.01) *A61K 31/519* (2006.01)*A61K 31/196* (2006.01) *A61K 31/53* (2006.01)*A61K 31/4196* (2006.01) *A61K 31/18* (2006.01)*A61K 45/06* (2006.01) *A61K 31/353* (2006.01)*A61P 31/12* (2006.01) *A61K 31/4184* (2006.01)*A61P 31/14* (2006.01) *A61K 31/506* (2006.01)*A61P 31/16* (2006.01) *A61K 31/535* (2006.01)*A61P 31/4458* (2006.01)

Комбинации ингибиторов МЕК с ингибиторами кэп-зависимой эндонуклеазы

Область изобретения

Настоящее изобретение относится к комбинации ингибиторов МЕК (киназа митоген-активируемой протеинкиназы), которые способны проявлять один или более чем один благоприятный терапевтический эффект, с ингибиторами кэп-зависимой эндонуклеазы (CEN), такими как балоксавир марбоксил. Ингибиторы МЕК могут быть использованы вместе с ингибиторами кэп-зависимой эндонуклеазы в предупреждении и/или лечении вирусной инфекции. Ингибиторы МЕК в комбинации с ингибиторами кэп-зависимой эндонуклеазы способны проявлять один или более чем один улучшенный благоприятный терапевтический эффект в лечении вирусных заболеваний.

Предшествующий уровень техники

Инфекции, вызываемые РНК- или ДНК-содержащими вирусами, представляют собой серьезную угрозу здоровью человека и животных. Например, инфекции, вызываемые вирусами гриппа, по-прежнему относятся к крупным эпидемиям человечества и из года в год приводят к большому числу человеческих жертв. С точки зрения национальных экономик они являются фактором огромных издержек, например, из-за нетрудоспособности. Инфекции, вызываемые вирусом болезни Борна (BDV), который в основном поражает лошадей и овец, но который также был выделен у людей и связан с неврологическими заболеваниями, также имеют огромную экономическую важность.

Проблема контроля, в частности, РНК-содержащих вирусов заключается в способности вирусов к адаптации, обусловленной высокой частотой ошибок у вирусных полимераз, что делает получение подходящих вакцин, а также разработку

противовирусных веществ очень сложным. Кроме того, установлено, что применение противовирусных веществ, направленных непосредственно на функции вируса, демонстрирует хорошее противовирусное действие в начале лечения, но быстро приводит к отбору устойчивых вариантов на основе мутации. Примером является противогриппозное средство амантадин и его производные, направленные на трансмембранный белок вируса. В течение короткого промежутка времени после его применения образуются устойчивые варианты вируса. Другими примерами являются новые терапевтические препараты для лечения гриппозных инфекций, ингибирующие нейраминидазу - поверхностный белок вируса гриппа, такие как реленза. У пациентов уже были обнаружены варианты, устойчивые к релензе (Gubareva et al., J. Infect Dis 178, 1257-1262, 1998).

Недостаток активных противовирусных веществ в соответствии с предшествующим уровнем техники заключается в том, что они или направлены против вирусного компонента и, таким образом, быстро приводят к развитию устойчивости (например амантадин), или действуют слишком широким и не специфическим образом против клеточных факторов (например ингибиторы метилтрансферазы), и следует ожидать значительных побочных действий.

Недавно был идентифицирован новый класс противовирусных средств, а именно, ингибиторы кэп-зависимой эндонуклеазы. Эти ингибиторы нацелены на кэп-зависимую эндонуклеазу (CEN), которая расположена в субъединице РА полимеразы вируса гриппа и опосредует процесс “похищения кэпов” во время биосинтеза вирусной мРНК. S-033188, также называемый балоксавир марбоксил, представляет собой сильный, избирательный, низкомолекулярный ингибитор CEN, одобренный FDA (Управление по контролю за качеством пищевых продуктов и медикаментов США) 18 октября 2018 года под товарным знаком Xofluza® для лечения гриппа. Тем не менее, уже сообщалось о первых случаях вирусной устойчивости в отношении балоксавира марбоксила, и они ожидаются для других ингибиторов CEN.

Из-за очень маленького генома и, таким образом, ограниченной способности к кодированию функций, являющихся необходимыми для репликации, все вирусы являются в высокой степени зависимыми от функций их клеток-хозяев. Оказывая влияние на такие клеточные функции, являющиеся необходимыми для репликации вируса, можно негативным образом воздействовать на репликацию вируса в

инфицированной клетке. При этом сценарии у вируса нет никакой возможности заместить отсутствующую клеточную функцию посредством адаптации, в частности, посредством мутаций, чтобы, таким образом, избежать давления отбора. Последнее уже было показано в отношении вируса гриппа А с относительно неспецифичными ингибиторами клеточных киназ и метилтрансфераз (Scholtissek and Müller, Arch Virol 119, 111-118, 1991).

Из уровня техники известно, что клетки имеют множество путей передачи сигналов, посредством которых сигналы, оказывающие действие на клетки, передаются в ядро клетки. Таким образом, клетка способна реагировать на внешние раздражители и реагировать посредством пролиферации клеток, активации клеток, дифференцировки или контролируемой гибели клеток. Общим у данных путей передачи сигналов является то, что они содержат по меньшей мере одну киназу, активирующую посредством фосфорилирования по меньшей мере один белок, передающий сигнал далее. При обнаружении клеточных процессов, индуцированных после инфицирования вирусами, установлено, что множество ДНК- и РНК-содержащих вирусов преимущественно активируют в инфицированной клетке-хозяине определенный путь передачи сигнала, так называемый Raf/MEK/ERK-киназный путь передачи сигнала (Benn et al., J Virol 70, 4978-4985, 1996; Bruder и Kovetsdi, J Virol 71, 398-404, 1997; Popik и Pitha, Virology 252, 210-217, 1998; Rodems и Spector, J Virol 72, 9173-9180, 1998). Этот путь передачи сигнала является одним из важнейших путей передачи сигнала в клетке и играет значительную роль в процессах пролиферации и дифференцировки. Передача сигналов, индуцированная факторами роста, осуществляется посредством последовательного фосфорилирования от серин/треонин-киназы Raf к киназе MEK, обладающей двойной специфичностью (киназа MAP-киназы/ERK-киназа) и в итоге к ERK-киназе (киназа, регулируемая внеклеточными сигналами). В то время как в качестве киназы-субстрата для Raf известна только MEK, а изоформы ERK были идентифицированы в качестве единственного субстрата для MEK, ERK способна фосфорилировать целый ряд субстратов. К ним относятся, например, транскрипционные факторы, посредством которых осуществляется непосредственное влияние на экспрессию генов в клетке (Cohen, Trends in Cell Biol 7, 353-361, 1997; Robinson и Cobb, Curr. Opin. Cell Biol 9, 180-186, 1997; Treisman, Curr. Opin. Cell Biol 8, 205-215, 1996).

В свете предшествующего уровня техники, ясно, что существует потребность в

других соединениях и композициях, эффективных в лечении вирусных заболеваний, в частности заболеваний, вызванных вирусом гриппа, в частности, для того, чтобы избежать формирования устойчивости.

В этой связи, продолжающееся исследование пригодности ингибиторов МЕК в лечении вирусного заболевания, в частности гриппа, выявило, что этот класс соединений позволяет избежать недостатков стандартных противовирусных способов лечения, поскольку он направлен на клеточные компоненты клеток-хозяев, а не на сам вирус. По этой причине не было обнаружено развития устойчивости к ингибиторам МЕК. В WO2001/076570 предложена концепция лечения или предупреждения инфекций, вызванных (-)РНК вирусами, в частности вирусами гриппа, при помощи ингибиторов МЕК. В WO 2014/056894 предложены специфические ингибиторы МЕК, такие как AZD-6244, AZD-8330, RDEA-119, GSK-1120212 (траметиниб), GDC-0973 (кобиметиниб), CI-1040, PD-0325901, RO-5126766, MSC1936369 (AS-703026) для применения в лечении или предупреждении инфекций вирусом гриппа. В WO 2015/173788 A1 ингибиторы МЕК раскрыты для применения в способе лечения вируса гриппа и бактериальных ассоциированных инфекций. Кроме того, в WO 2019/076947 раскрыт новый ингибитор МЕК, PD-0184264 (также известный как ATR-002) для применения в способе профилактики и/или лечения вирусной инфекции.

Тем не менее, сохраняется потребность в том, чтобы предложить другие композиции и соединения для лечения и предупреждения вирусных инфекций.

Краткое изложение сущности изобретения

Согласно настоящему изобретению обнаружено, что применение ингибитора МЕК в лечении или предупреждении вирусной инфекции в комбинации с ингибитором кЭП-зависимой эндонуклеазы приводит к эффективному лечению вирусной инфекции. В частности, синергический эффект обнаружен тогда, когда ингибитор МЕК PD-0184264 вводили вместе с балоксавирином.

В контексте изобретения ингибитор МЕК может быть выбран из группы, состоящей из CI-1040, PD-0184264, GSK-1120212, GDC-0973, PLX-4032, AZD6244, AZD8330, AS-703026, RDEA-119, RO-5126766, RO-4987655, PD-0325901, TAK-733, AS703026, PD98059 и PD184352 или их фармацевтически приемлемой соли или метаболита. В предпочтительной комбинации ингибитор МЕК представляет собой CI-1040 или PD-0184264, а ингибитор кЭП-зависимой эндонуклеазы представляет собой

балоксавир марбоксил.

Предпочтительное применение представляет собой лечение или предупреждение вирусной инфекции, вызванной вирусом с отрицательной цепью РНК, таким как вирус гриппа. Вирус гриппа может представлять собой вирус гриппа А или вирус гриппа В. В контексте изобретения ингибитор МЕК может быть введен одновременно ингибитором кэп-зависимой эндонуклеазы, до или после него.

Также раскрыта фармацевтическая композиция, содержащая ингибитор МЕК или его фармацевтически приемлемую соль или метаболит и ингибитор кэп-зависимой эндонуклеазы, для применения в качестве лекарственного средства, предпочтительно для лечения или предупреждения вирусного заболевания, такого как грипп.

Графические материалы

Фиг. 1 демонстрирует противовирусную активность осельтамивира и CI-1040 в сравнении с имитационным контролем против вируса гриппа H1N1 дикого типа (белый цвет) и H1N1-H275Y (серый цвет).

Фиг. 2a-b демонстрируют противовирусную активность осельтамивира и балоксавира марбоксила в сравнении с имитационным контролем против вирусов гриппа H1N1 WT (белый цвет) и H11-PA-I38T (серый цвет), а также H3N2-WT (белый цвет) и H3N2-PA-I38T (серый цвет).

Фиг. 3a-d демонстрируют синергический эффект между ATR002 и балоксавира марбоксилем. Комбинации ингибитора МЕК (ATR002) с балоксавира марбоксилем (BLXM) тестировали в матрице 4x4 (D), и все величины нормализовали к псевдозараженному контролю (DMSO (диметилсульфоксид)). Контурные и объемные поверхностные диаграммы строили при помощи Combenefit при обработке данных с использованием трех различных синергических моделей: A) HAS; B) Bliss и C) Loewe. Площади с оценками синергического эффекта выше 25 отмечены.

Фиг. 4a демонстрирует синергизм/антагонизм, представленные в виде Log (CI (комбинаторный индекс)) по оси y против фракции погибших клеток (Fa) по оси x.

Фиг. 4b демонстрирует индекс снижения дозы лекарственного средства (DRI) балоксавира марбоксила (BLXM) и ATR002 против вируса гриппа.

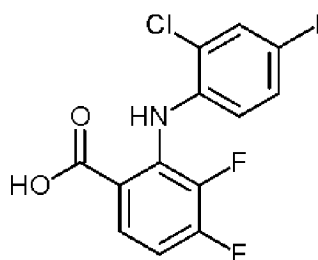
Подробное описание изобретения

Следующее описание включает информацию, которая может быть полезна для понимания настоящего изобретения. Не предполагается, что какая-либо приведенная

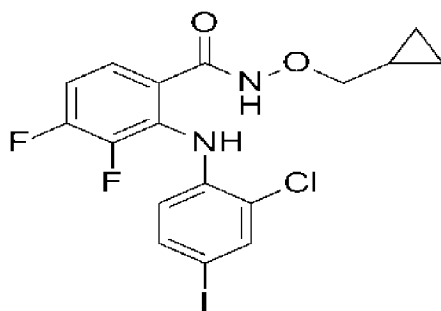
здесь информация является информацией из предшествующего уровня техники или относится к заявленным здесь изобретениям, или что любая публикация, на которую специфически или косвенно ссылаются, представляет собой предшествующий уровень техники.

“Ингибиторы MEK”, как они используются здесь, ингибируют митогенный сигнальный каскад Raf/MEK/ERK в клетках или у субъекта путем ингибирования MEK (киназа митоген-активируемой протеинкиназы). Этот сигнальный каскад используется многими вирусами, в частности вирусами гриппа, для форсирования вирусной репликации. Таким образом, специфическое блокирование пути Raf/MEK/ERK в критической MEK нарушает рост вирусов, в частности вирусов гриппа. Кроме того, ингибиторы MEK демонстрируют низкую токсичность и незначительные отрицательные побочные действия у людей. Также отсутствует тенденция к тому, чтобы вызвать вирусную резистентность (Ludwig, 2009). Особенно предпочтительный ингибитор MEK представляет собой PD-0184264, также известный как ATR-002.

Ингибиторы MEK предпочтительно выбирают из CI-1040, PD-0184264 GSK-1120212, GDC-0973, PLX-4032, AZD6244, AZD8330, AS-703026, RDEA-119, RO-5126766, RO-4987655, PD-0325901, TAK-733, AS703026, PD98059 и PD184352 или их фармацевтически приемлемой соли или метаболита. Эти ингибиторы MEK известны в области техники и, например, описаны в Таблице 1 в Fremin and Meloche (2010), J. Hematol. Oncol. 11;3:8. Далее структурные формулы PD-0184264 и CI-1040 приведены для ссылки:



структурная формула PD-0184264,



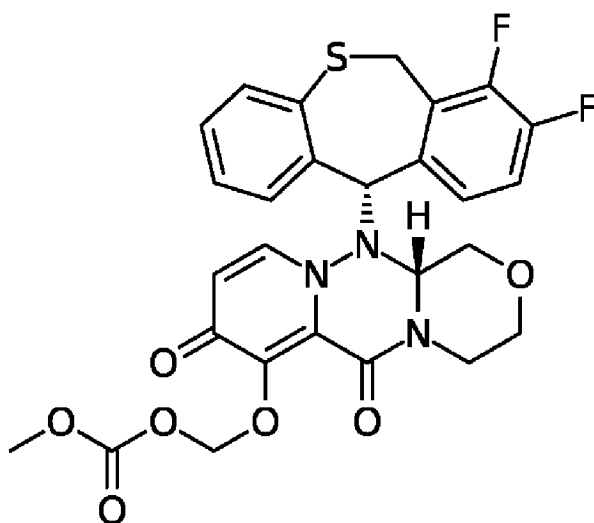
структурная формула CI-1040,

2-(2-хлор-4-йодфениламино)-N-(циклопропилметокси)-3,4-дифторбензамид.

Используемый здесь термин “метаболит” относится к промежуточному/конечному продукту метаболизма ингибитора МЕК, возникающему в процессе деградации ингибитора МЕК у субъекта, например, в печени. В предпочтительном воплощении ингибитор МЕК представляет собой метаболит CI-1040, например, PD-0184264 представляет собой метаболит ингибитора МЕК CI-1040.

“Ингибиторы кэп-зависимой эндонуклеазы (CEN)” ингибируют CEN, локализованную в N-концевом домене субъединицы PA гетеродимерной РНК-зависимой полимеразы вируса гриппа, состоящей из субъединиц PA (кислый полимеразный белок), PB1 (основной полимеразный белок 1) и PB2 (основной полимеразный белок 2). Она важна для вирусной транскрипции и репликации. В процессе ‘похищения кэпа’ синтез вирусной мРНК инициируется связыванием PB2 с кэп-структурой мРНК хозяина с последующим расщеплением коротко-кэппированного олигонуклеотида при помощи CEN. Любопытно то, что CEN является весьма консервативной среди штаммов вируса гриппа и, таким образом, рассматривается в качестве идеальной мишени для лекарственных средств против вируса гриппа.

В предпочтительном воплощении ингибитор CEN представляет собой балоксавир марбоксил (ранее также обозначаемый как S-033188), представляющий собой наилучшее в своем классе противовирусное лекарственное средство для лечения гриппа. После перорального введения балоксавир марбоксил может быть метаболизирован до своей активной формы (балоксавиновая кислота), которая связывается с CEN. Балоксавир марбоксил имеет следующую структурную формулу:



балоксавир марбоксил

Для задачи в соответствии с изобретением определенное выше активное соединение (ингибитор MEK и/или ингибитор CEN) также включает его фармацевтически приемлемую(ые) соль(и). Используемое здесь выражение "фармацевтически или косметически приемлемая(ые) соль(и)" обозначает соли соединений в соответствии с изобретением, которые являются безопасными и эффективными для желаемой вводимой формы. Фармацевтически приемлемые соли включают соли, образованные с анионами, такими как анионы, происходящие из соляной, фосфорной, уксусной, щавелевой, винной кислот и т.п., и соли, образованные с катионами, такими как катионы, происходящие из натрия, калия, аммония, кальция, гидроксидов трехвалентного железа, изопропиламина, триэтиламина, 2-этиламиноэтанола, гистидина, прокаина и т.п.

В соответствии с уже изложенным здесь, инфекция вирусами гриппа (IV) до сих пор остается угрозой здоровью общества по всему миру. В настоящее время все имеющиеся вакцины, а также противовирусные лекарственные средства, которые направлены против самого вируса, подвержены развитию устойчивости к ним. Доказано, что вирусы гриппа способны модулировать и контролировать клеточные пути, вовлеченные в жизненный цикл вируса, такие как сигнальный путь Raf/MEK/ERK, при котором ядерный экспорт vRNP (вирусный рибонуклеопротеиновый комплекс) в значительной степени зависит от вызванной вирусом активации. В соответствии с этим авторы изобретения ранее продемонстрировали противовирусный потенциал ингибитора MEK PD0184264 (ATR002), представляющего собой активный метаболит CI-1040, против вирусов гриппа на уровне *in vitro* и *in vivo* (Пример 1, смотри также WO

2019/076947). Новое получившее лицензию противовирусное лекарственное средство, так называемый балоксавир марбоксил (ксофлюза), которое разработано для ингибирования кэп-зависимого белка эндонуклеазы, продемонстрировало эффективность в отношении широкого диапазона вирусов гриппа, включая штаммы, устойчивые в отношении осельтамивира. Тем не менее, уже сообщается о возникновении вариантов, устойчивых к новому получившему лицензию лекарственному средству.

Как показано в Примере 1 и на Фиг. 1, и осельтамивир, и CI-1040 эффективны против штамма гриппа дикого типа (wt) A/Mississippi/3/2001 (H1N1). Напротив, при исследовании противовирусного потенциала обоих лекарственных средств против мутантного штамма вируса гриппа, несущего мутацию H275Y в гене нейраминидазы (NA), было обнаружено значительное снижение эффективности осельтамивира. В противоположность ему, CI-1040 продемонстрировал противовирусное действие, сравнимое с действием, обнаруженным в отношении штамма дикого типа. Для дальнейшей оценки возможной противовирусной активности ATR002 (активный метаболит CI-1040) авторы изобретения сравнили противовирусную активность ATR002 с новым получившим лицензию лекарственным средством против вируса гриппа балоксавира марбоксилом (BLXM), которое разработано для ингибирования белка кэп-зависимой эндонуклеазы. Как показано на Фиг. 2А, было обнаружено, что BLXM является очень активным против вируса гриппа дикого типа rgA/Giessen/6/09 (H1N1-WT) с ориентировочно полным снижением вирусного титра, тогда как активность ATR002 была ниже на 13%. Напротив, активность BLXM была ниже на 37% при исследовании с использованием мутантного штамма rgA/Giessen/6/09 (H1N1)-PA-I38T, а ATR002 продемонстрировал такое же действие, как было обнаружено в отношении дикого типа. Аналогично, при исследовании противовирусной активности с использованием rgA/Victoria/3/75 (H3N2-WT) и rgA/Victoria/3/75 (H3N2-PA-I38T) (Фиг. 2В) ATR002 продемонстрировал эффективность в отношении обоих вариантов, тогда как BLXM утратил приблизительно 41% своей активности в отношении мутантного варианта.

Учитывая то, что недавно получившее лицензию противогриппозное лекарственное средство балоксавир марбоксил и потенциальный ингибитор МЕК (ATR002) могли бы рассматриваться как терапевтический вариант для лечения гриппа, авторы изобретения исследовали в Примере 2, обладает ли комбинация этих двух

лекарственных средств увеличенной противовирусной активностью. Обнаружено неожиданное увеличение противовирусной активности при различных концентрациях ATR002 (0,4, 2 и 10 мкМ) в комбинации с BLXM (0,008 и 0,04 нМ), о чем свидетельствует снижение титра вируса по сравнению с индивидуальной обработкой каждым из этих лекарственных средств. Кроме того, из модели Chou-Talalay следует, что комбинация более низких концентраций ATR002 и BLXM приводит к сильному синергическому эффекту с низкими значениями CI (комбинаторный индекс) (Фиг. 4). Эти данные согласуются с наиболее широко используемыми моделями (HAS, Bliss и Loewe), которые также показали, что комбинации в более высоких дозах приводят к более сильному аддитивному эффекту, а не к синергическому эффекту (Фиг.3А-С).

Таким образом, авторы изобретения неожиданно обнаружили, что комбинированное введение ингибитора MEK и ингибитора CEN приводит к неожиданному синергизму в предупреждении и/или лечении вирусных заболеваний, в частности комбинирование ингибитора MEK и ингибитора CEN приводит к синергическому эффекту в ингибировании вируса гриппа А и/или вируса В. Действительно, в соответствии с продемонстрированным здесь, ингибиторы MEK CI-1040, PD-0184264 GSK-1120212, GDC-0973, PLX-4032, AZD6244, AZD8330, AS-703026, RDEA-119, RO-5126766, RO-4987655, PD-0325901, TAK-733, AS703026, PD98059 и PD184352, которые являются перорально доступными и которые находятся, по меньшей мере, на фазе I клинических испытаний, причем некоторые даже на фазе II клинических испытаний или даже допущены у маркетингу, такие как PLX-4032, против рака, демонстрируют противовирусную активность против вируса гриппа А и/или вируса гриппа В в комбинации с ингибитором CEN, таким как балоксавир. Комбинированное лечение существенно увеличивало противовирусную активность балоксавира и приводило в результате к синергическому противовирусному эффекту, как определено в описанных здесь способах HAS, Bliss и LOEWE (Фиг. 3). В совокупности эти результаты демонстрируют увеличенную противовирусную активность балоксавира после комбинирования с ингибиторами MEK, в частности, PD-0184264 и CI-1040. Эти данные являются перспективными для дальнейших доклинических испытаний *in vitro* и *in vivo* в процессе разработки новых противовирусных схем лечения гриппа.

Соответственно, авторы настоящего изобретения обнаружили, что комбинированный способ в соответствии с изобретением представляет собой способ,

который обеспечивает синергизм в предупреждении и/или лечении вирусных заболеваний, в частности в предупреждении и/или лечении инфекции, вызванной вирусом с отрицательной цепью РНК, конкретней, вирусных заболеваний, вызванных вирусом гриппа. Еще более конкретно, в предупреждении и/или лечении вируса гриппа А или В.

В соответствии с вышеизложенным, настоящее изобретение относится к ингибитору МЕК для применения в способе профилактики и/или лечения вирусной инфекции в комбинации с ингибитором кэп-зависимой эндонуклеазы. Настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции, содержащей ингибитор МЕК или его фармацевтически приемлемую соль или метаболит и ингибитор кэп-зависимой эндонуклеазы, для применения в качестве лекарственного средства. Как продемонстрировано в примерах, ингибиторы МЕК в комбинации с ингибиторами кэп-зависимой эндонуклеазы демонстрируют неожиданный синергический противовирусный эффект.

Фармацевтическая композиция в соответствии с изобретением может быть введена в синергическом количестве.

"Синергизм" или "синергический эффект" можно определить как действие, превышающее аддитивное (Chou, 2006, *Pharmacolog Reviews*, 58: 621-681). Синергические взаимодействия в комбинациях лекарственных средств являются весьма желательными и востребованными, поскольку они могут обуславливать повышение эффективности, снижение дозировки, ослабление побочного токсического действия и минимизацию развития устойчивости при клиническом применении (Chou, 2006). Двумя наиболее популярными способами оценки взаимодействий лекарственных средств в комбинированной терапии являются анализ изоболограмм и комбинаторный индекс (CI) (Zhao et al., 2004, *Clinical Cancer Res* 10:7994-8004). В многочисленных исследованиях, как в области терапии рака, так и в области противовирусной терапии, где комбинации лекарственных средств используют для противодействия развитию устойчивости к лекарственным средствам и для минимизации доз лекарственных средств, для оценки синергизма применяют CI-индекс. CI основан на подходе Chou и Talaly, описанном в 1984 г. (*Adv. Enzyme Regul.* 22:27-55), исходя из принципа медианного эффекта и уравнения множественного лекарственного эффекта. CI можно легко рассчитать с помощью программы CompuSyn (CompuSyn, Paramus, N.J.). Сам Chou (Chou 2006)

определяет взаимодействие как слабый синергизм, если значение CI составляет 0,85-0,9, умеренный синергизм, если значение CI составляет 0,7-0,85, синергизм, если значение CI составляет 0,3-0,7, сильный синергизм, если значение CI составляет 0,1-0,3, и очень сильный синергизм, если значение CI составляет менее 0,1. В литературе, посвященной лечению рака, величины CI, которые определяют синергизм, могут варьировать, например, в Lin et al., 2007, *Carcinogenesis* 28: 2521-2529, синергизм между лекарственными средствами определен как CI менее 1, а в Fischel et al., 2006, *Preclinical Report* 17: 807-813, синергизм определен как CI менее 0,8. Похожие величины используются в области противовирусной терапии. Например, в Wyles et al., 2008, *Antimicrob Agents Chemotherapy* 52: 1862-1864, синергизм определяется как CI менее 0,9, а в Gantlett et al., 2007, *Antiviral Res* 75:188-197, синергизм определяется как CI менее 0,9. На основе этих ссылок синергизм может быть определен как величины CI не более 0,9. Как показано в Примере 2, модель Chou-Talaly, а также модели на основе наиболее эффективного индивидуального агента (HSA), модель Bliss and Loewe, рассчитанные при помощи программного обеспечения Combenefit, демонстрируют синергизм комбинации PD-0184264 и балоксавира марбоксила. Модели на основе наиболее эффективного индивидуального агента (HSA) и Bliss and Loewe объясняются и описаны в Foucquier and Guedj 2015 (*Pharmacology Research & Perspectives* 3(3):e00149).

Ингибитор MEK и ингибитор CEN в соответствии с изобретением могут обладать синергическим действием в лечении вирусного заболевания, превышающим аддитивное действие каждого из ингибитора MEK и ингибитора CEN, вводимых по отдельности или в комбинации, предполагаемое исходя из простого аддитивного действия двух лекарственных средств. В таком случае синергически эффективное количество ингибитора MEK меньше, чем количество, необходимое для лечения вирусной инфекции, если ингибитор MEK вводят без ингибитора CEN. Аналогично, синергически эффективное количество ингибитора CEN меньше, чем количество, необходимое для лечения вирусной инфекции, или если ингибитор CEN вводят без ингибитора MEK. Синергическое количество ингибитора MEK и ингибитора CEN можно определить по фактору синергизма (величина CI). При определении по индексу синергизма (показателю CI), CI составляет менее чем приблизительно 0,9, в качестве альтернативы, менее чем приблизительно 0,85, в качестве альтернативы, менее чем приблизительно 0,8, в качестве альтернативы, менее чем приблизительно 0,75, в качестве альтернативы,

менее чем приблизительно 0,7, в качестве альтернативы, менее чем приблизительно 0,65, в качестве альтернативы, менее чем приблизительно 0,6, в качестве альтернативы, менее чем приблизительно 0,55, в качестве альтернативы, менее чем приблизительно 0,5, в качестве альтернативы, менее чем приблизительно 0,45, в качестве альтернативы, менее чем приблизительно 0,4, в качестве альтернативы, менее чем приблизительно 0,35, в качестве альтернативы, менее чем приблизительно 0,3, в качестве альтернативы, менее чем приблизительно 0,25, в качестве альтернативы, менее чем приблизительно 0,2, в качестве альтернативы, менее чем приблизительно 0,15, в качестве альтернативы, менее чем приблизительно 0,1.

Комбинированное применение ингибитора MEK и ингибитора CEN в соответствии с изобретением обеспечивает благоприятное терапевтическое действие также в случае вирусного заболевания, когда вирус или вирусный штамм демонстрирует или обладает развившейся устойчивостью, в частности устойчивостью к ингибитору CEN. Кроме того, комбинированное применение может действовать путем поддержания эффективности обоих лекарственных средств с течением времени, поскольку развитие устойчивости вовсе может не обнаруживаться или может замедляться по времени.

Балоксавир марбоксил в качестве ингибитора CEN может быть использован в комбинации с CI-1040 в качестве ингибитора MEK в способе и/или фармацевтической композиции в соответствии с изобретением. Балоксавир марбоксил в качестве ингибитора CEN может быть использован в комбинации с PD-0184264 в качестве ингибитора MEK в применении в лечении и/или в фармацевтической композиции в соответствии с изобретением. Балоксавир марбоксил в качестве ингибитора CEN может быть использован в комбинации с GSK-1120212 в качестве ингибитора MEK в применении в лечении и/или в фармацевтической композиции в соответствии с изобретением. Балоксавир марбоксил в качестве ингибитора CEN может быть использован в комбинации с GDC-0973 в качестве ингибитора MEK в применении в лечении и/или в фармацевтической композиции в соответствии с изобретением. Балоксавир марбоксил в качестве ингибитора CEN может быть использован в комбинации с PLX-4032 в качестве ингибитора MEK в применении в лечении и/или в фармацевтической композиции в соответствии с изобретением. Балоксавир марбоксил в качестве ингибитора CEN может быть использован в комбинации с AZD6244 в качестве ингибитора MEK в применении при лечении и/или в фармацевтической композиции в

соответствии с изобретением. Балоксавир марбоксил в качестве ингибитора CEN может быть использован в комбинации с AZD8330 в качестве ингибитора MEK в применении в лечении и/или в фармацевтической композиции в соответствии с изобретением. Балоксавир марбоксил в качестве ингибитора CEN может быть использован в комбинации с AS-703026 в качестве ингибитора MEK в применении в лечении и/или в фармацевтической композиции в соответствии с изобретением. Балоксавир марбоксил в качестве ингибитора CEN может быть использован в комбинации с RDEA-119 в качестве ингибитора MEK в применении в лечении и/или в фармацевтической композиции в соответствии с изобретением. Балоксавир марбоксил в качестве ингибитора CEN может быть использован в комбинации с RO-5126766 в качестве ингибитора MEK в применении при лечении и/или в фармацевтической композиции в соответствии с изобретением. Балоксавир марбоксил в качестве ингибитора CEN может быть использован в комбинации с RO-4987655 в качестве ингибитора MEK в применении в лечении и/или в фармацевтической композиции в соответствии с изобретением. Балоксавир марбоксил в качестве ингибитора CEN может быть использован в комбинации с PD-0325901 в качестве ингибитора MEK в применении в лечении и/или в фармацевтической композиции в соответствии с изобретением. Балоксавир марбоксил в качестве ингибитора CEN может быть использован в комбинации с TAK-733 в качестве ингибитора MEK в применении в лечении и/или в фармацевтической композиции в соответствии с изобретением. Балоксавир марбоксил в качестве ингибитора CEN может быть использован в комбинации с AS703026 в качестве ингибитора MEK в применении в лечении и/или в фармацевтической композиции в соответствии с изобретением. Балоксавир марбоксил в качестве ингибитора CEN может быть использован в комбинации с PD98059 в качестве ингибитора MEK в применении при лечении и/или в фармацевтической композиции в соответствии с изобретением. Балоксавир марбоксил в качестве ингибитора CEN может быть использован в комбинации с PD184352 в качестве ингибитора MEK в применении при лечении и/или в фармацевтической композиции в соответствии с изобретением. Предпочтительно балоксавир марбоксил комбинируют с PD-0184264 (ATR-002) в применении в лечении в соответствии с изобретением и фармацевтической композиции в соответствии с изобретением.

В применении в соответствии с изобретением ингибитор MEK и ингибитор CEN могут быть введены одновременно, или один до или после другого. Ингибитор MEK и

ингибитор CEN предпочтительно вводят одновременно. Они могут быть введены в виде одной композиции или в отдельных композициях. Единичная композиция также описана здесь как фармацевтическая композиция в соответствии с изобретением.

Вирусная инфекция, которую требуется предупредить или лечить путем комбинированного введения ингибитора МЕК и ингибитора CEN в соответствии с изобретением, предпочтительно представляет собой инфекцию, вызванную вирусом с отрицательной цепью РНК. Более предпочтительно вирусное заболевание вызвано вирусом гриппа, еще более предпочтительно вирусное заболевание вызвано вирусом гриппа А или В. Вирусы гриппа представляют собой, например, H1N1, H5N1, H7N7 и H7N9. В некоторых случаях у вирусов развилась устойчивость в отношении противовирусного агента, такого как ингибитор CEN. Особенно предпочтительны подтипы H1N1, H2N2, H3N2, H5N6, H5N8, H6N1, H7N2, H7N7, H7N9, H9N2, H10N7, N10N8 и/или H5N1 вируса гриппа А.

В применении в лечении в соответствии с изобретением или применении фармацевтической композиции, при котором ингибитор МЕК и ингибитор CEN используют в комбинации, пациент предпочтительно представляет собой млекопитающее или птицу. Примеры подходящих млекопитающих включают без ограничения мышь, крысу, корову, козу, овцу, свинью, собаку, кошку, лошадь, морскую свинку, представителя семейства псовых, хомяка, норку, тюленя, кита, верблюда, шимпанзе, макака-резуса и человека. Примеры подходящих птиц включают без ограничения индейку, курицу, гуся, утку, чирка, крякву, скворца, шилохвость, чайку, лебедя, цесарку или водоплавающую птицу. Пациент-человек представляет собой конкретное воплощение настоящего изобретения. Термины пациент и субъект используются взаимозаменяемо.

Ингибитор МЕК может быть введен перорально, внутривенно, внутривенно, внутримышечно, местно или путем ингаляции. Предпочтительно ингибитор МЕК вводят путем ингаляции или перорально.

Ингибитор CEN может быть введен перорально, внутривенно, внутривенно, внутримышечно, местно или путем ингаляции. Предпочтительно ингибитор CEN вводят путем ингаляции или перорально.

Когда ингибитор МЕК и ингибитор CEN представлены в одной композиции, такой как в фармацевтической композиции в соответствии с изобретением, тогда

композиция может быть введена перорально, внутривенно, внутривентрально, внутримышечно, местно или путем ингаляции. Предпочтительно, композицию вводят перорально или путем ингаляции.

Применение в лечении в соответствии с изобретением может включать лечение пациента, нуждающегося в таком лечении, терапевтически эффективным количеством ингибитора МЕК или его фармацевтически приемлемой соли; и одновременно или последовательно описанного здесь ингибитора СЕН.

В одном из аспектов предложен способ лечения вирусной инфекции у пациента, включающий (1) введение пациенту, нуждающемуся в лечении, терапевтически эффективного количества соединения, которое представляет собой ингибитор МЕК или его метаболит или его фармацевтически приемлемую соль; и одновременно или последовательно (2) введение указанному пациенту терапевтически эффективного количества балоксавира марбоксила или его фармацевтически приемлемой соли. Иными словами, в соответствии с этим аспектом способ включает введение терапевтически эффективного количества ингибитора МЕК или его метаболита или его фармацевтически приемлемой соли пациенту, который уже принимает лечение балоксавира марбоксилом или его фармацевтически приемлемой солью, или введение терапевтически эффективного количества балоксавира марбоксила или его фармацевтически приемлемой соли пациенту, который уже принимает лечение ингибитором МЕК или его метаболитом, или его фармацевтически приемлемой солью.

В одном из воплощений применения в лечении в соответствии с настоящим изобретением соединение - ингибитор МЕК может быть введено перорально или путем ингаляции в эффективной терапевтической дозировке, тогда как ингибитор СЕН может быть введен в дозе и в соответствии со схемой приема лекарственного средства, приведенной в одобренной инструкции по применению лекарственного средства, или меньшей, предпочтительно в меньшей дозе (вследствие синергического эффекта). Например, в соответствии с маркировкой балоксавира марбоксила его вводят в капсулах 40 мг (при массе субъекта от 40 до 80 кг) или 80 мг (масса субъекта больше 80 кг). Дозировка 40 мг или 80 мг в виде разовой дозы представляет собой стандартную дозировку для взрослых и подростков. Меньшая дозировка может быть использована тогда, когда балоксавир марбоксил вводят в комбинации с ингибитором МЕК. В одном из воплощений терапевтически эффективное количество ингибитора МЕК составляет,

например, от 0,1 мг до 2000 мг, от 0,1 мг до 1000 мг, от 0,1 до 500 мг, от 0,1 до 200 мг, от 30 до 300 мг, от 0,1 до 75 мг, от 0,1 до 30 мг.

В обсуждаемых здесь последовательных комбинированных терапиях лекарственные средства предпочтительно вводят в последовательной комбинации в соответствии с их фармакокинетическими профилями таким образом, что второе лекарственное средство вводят после значительного снижения уровня первого лекарственного средства в плазме крови или его выведения. Фармакокинетические профили лекарственных средств, представляющих собой ингибитор МЕК и ингибитор СЕН, в целом известны в уровне техники.

В соответствии с изложенным выше в настоящем изобретении дополнительно предложена фармацевтическая композиция, содержащая ингибитор МЕК или его фармацевтически приемлемую соль или метаболит и ингибитор кэп-зависимой эндонуклеазы, для применения в качестве лекарственного средства. В одном из конкретных воплощений фармацевтическая композиция в соответствии с изобретением предназначена для применения в профилактике и/или лечении вирусной инфекции, предпочтительно инфекции, вызываемой вирусом с отрицательной цепью РНК, более предпочтительно вирусом гриппа, и наиболее предпочтительно вирусом гриппа А или вирусом гриппа В.

Фармацевтическая композиция в соответствии с изобретением может быть представлена в форме перорально вводимых суспензий или таблеток; спреев для носа, стерильных инъеклируемых препаратов (для внутривенного, внутривезикулярного, внутримышечного введения), например, в виде стерильных инъеклируемых водных или масляных суспензий или суппозиториях. При пероральном введении в виде суспензии данные композиции готовят в соответствии со способами, доступными в области приготовления фармацевтических композиций, и они могут содержать микрокристаллическую целлюлозу для придания объема, альгинат натрия или альгинат натрия в качестве суспендирующего средства, метилцеллюлозу в качестве загустителя и подсластители/ароматизаторы, известные в данной области техники. Данные композиции в виде таблеток с немедленным высвобождением могут содержать микрокристаллическую целлюлозу, дикальция фосфат, крахмал, стеарат магния и лактозу и/или другие эксципиенты, связывающие вещества, сухие разбавители, разрыхлители, разбавители и смазывающие агенты, известные в данной области

техники. Инъецируемые растворы или суспензии могут быть приготовлены в соответствии с известными в данной области техники способами с применением нетоксичных, приемлемых для парентерального введения разбавителей или растворителей, таких как маннит, 1,3-бутандиол, вода, раствор Рингера или изотонический раствор хлорида натрия, или подходящих диспергирующих или увлажняющих и суспендирующих агентов, таких как стерильные традиционные нелетучие масла, включая синтетические моно- или диглицериды, и жирные кислоты, включая олеиновую кислоту. Фармацевтические соединения в способе в соответствии с настоящим изобретением можно вводить в любых подходящих стандартных лекарственных формах. Подходящие композиции для перорального введения в контексте фармацевтической композиции в соответствии с изобретением также могут находиться в форме таблеток, капсул, суспензии, сиропа, жевательной резинки, облатки, эликсира и т.п. В фармацевтические композиции для перорального введения могут быть включены фармацевтически приемлемые носители, такие как связующие вещества, эксципиенты, смазывающие средства и подсластители или ароматизаторы. При желании также могут быть включены обычные средства для модификации вкуса, цвета и конфигурации конкретных форм.

В контексте инъекционных составов фармацевтические композиции могут находиться в форме лиофилизированного порошка в смеси с подходящими эксципиентами в подходящем флаконе или пробирке. Перед применением в клинической практике лекарственные средства можно разводить путем растворения лиофилизированного порошка в подходящей системе растворителей с получением композиции, подходящей для внутривенной или внутримышечной инъекции.

В одном из воплощений фармацевтическая композиция может находиться в перорально вводимой форме (например таблетке, или капсуле, или сиропе и т.п.) с терапевтически эффективным количеством (например, от 0,1 мг до 2000 мг, от 0,1 мг до 1000 мг, от 0,1 до 500 мг, от 0,1 до 200 мг, от 30 до 300 мг, от 0,1 до 75 мг, от 0,1 до 30 мг) ингибитора МЕК и терапевтически эффективным количеством ингибитора CEN, как описано выше. Например, в соответствии с маркировкой балоксавира марбоксила его вводят в капсулах по 40 мг (масса субъекта от 40 до 80 кг) или 80 мг (масса субъекта более 80 кг). Дозировка 40 мг или 80 мг в виде однократной дозы представляет собой

стандартную дозировку для взрослых и подростков. Может быть использована меньшая дозировка тогда, когда балоксавир марбоксил вводят в комбинации с ингибитором МЕК.

Терапевтически эффективное количество для каждого активного соединения может варьировать в зависимости от факторов, включающих без ограничения активность применяемого соединения, стабильность активного соединения в организме пациента, тяжесть состояний, которые необходимо облегчить, общую массу тела пациента, подлежащего лечению, пути введения, легкости абсорбции, распределения в организме и выделения из организма активного соединения, возраста и чувствительности пациента, подлежащего лечению, нежелательных явлений и т.п, что будет очевидно специалисту в данной области техники. Вводимое количество можно корректировать, поскольку со временем различные факторы изменяются.

В соответствии с еще одним аспектом настоящего изобретения предложен фармацевтический набор, содержащий в разделенном на отделения контейнере (1) единичную дозированную форму ингибитора МЕК, такого как PD-0184264, PLX-4032, AZD6244, AZD8330, AS-703026, GSK-1120212, RDEA-119, RO-5126766, RO-4987655, CI-1040, PD-0325901, GDC-0973, TAK-733, PD98059 и PD184352, и (2) единичную дозированную форму ингибитора СЕН, такого как балоксавир. Возможно, набор дополнительно содержит инструкции по использованию набора в способе комбинированного лечения в соответствии с настоящим изобретением.

Определения

Во всем данном описании и формуле изобретения, если по контексту не требуется иное, то слово "содержать" и его варианты, такие как "содержит" и "содержащий", следует понимать как подразумевающие включение указанного целого числа или стадии или группы целых чисел или стадий, но не исключение любого другого целого числа или стадии или группы целых чисел или стадий. При использовании в данном описании выражение "содержащий" можно заменить выражением "включающий" или иногда, при использовании здесь, выражением "имеющий".

При использовании здесь "состоящий из" исключает любой элемент, стадию или ингредиент, не указанные в заявленном элементе. При использовании в данном документе "состоящий по существу из" не исключает материалы или стадии, которые фактически не влияют на основные и новые характеристики заявленного в пункте формулы изобретения. В каждом конкретном случае здесь любое из выражений

"содержащий", "состоящий по существу из" и "состоящий из" может быть заменено любым из двух других выражений.

При использовании здесь союз "и/или" между несколькими перечисляемыми элементами понимается как охватывающий как отдельные, так и объединенные варианты. Например, если два элемента объединены с помощью "и/или", то первый вариант относится к применимости первого элемента без второго. Второй вариант относится к применимости второго элемента без первого. Третий вариант относится к применимости первого и второго элементов вместе. Любой из этих вариантов следует понимать как находящийся в пределах значения и, таким образом, удовлетворяющий требованию используемого здесь выражения "и/или". Возможность одновременного применения более чем одного из вариантов также следует понимать как находящуюся в пределах значения и, таким образом, удовлетворяющую требованию используемого здесь выражения "и/или".

Примеры

Пример 1: Сравнение ингибиторов MEK и других стандартных способов лечения

Реактивы

Клетки 549 (ATCC[®] CCL-185[™]), 0,3% тритон x-100, клетки MDCK II (ATCC[®] CRL-2936[™]), 0,1% твин 20, забуференный фосфатом физиологический раствор (PBS, Gibco Cat. No.: 14190144), PBS+10% FCS (фетальная телячья сыворотка) + 0,1% твин 20, инфекционный PBS, Roti[®]-Histofix 10 % (Roth, Cat. No.: A146.1) → Готовят рабочий раствор 4%, ТРСК-трипсин, первичное антитело (анти-NP (нуклеопротеин); AA5H, Cat. No.: MCA400), 2x MEM (минимальная питательная среда Игла), вторичное антитело (меченое пероксидазой анти-мышинное антитело, Cat. No.: 115-035-003), раствор фракции V альбумина, KPL True Blue[™] (Cat. No.: 5510-0049), Avicel 2,5% (RC-581, FMC BioPolymer).

Способ

Сутки 1

1 - Посев в два 24-луночных планшета

а. Тип клеток: A549

б. Плотность посева: $0,5 \times 10^5$ клеток/мл

2 - Инкубирование в течение 24 ч

Сутки 2

3 - Оценка конфлюэнтности в приготовленных 24-луночных планшетах

4 - Удаление среды и промывка (2х) PBS

Разведение вируса

5 - Осуществление десятикратного серийного разведения вируса (титр: $6,0 \times 10^7$ БОЕ (бляшкообразующие единицы)/мл)

6 - Инокулирование каждой лунки 0,001 MOI (множественность инфицирования)

7 - Инкубирование в течение 45 мин

Приготовление концентраций тестируемого вещества

8 - Добавление ТРСК-трипсина до конечной концентрации 2 мкг/мл в инфекционные среды

ATR002

- Тестируемое соединение: ATR002

- Растворитель: DMSO (диметилсульфоксид)

- Концентрация: концентрированный раствор 10 mM, рабочий раствор: 1 mM

- Готовят следующие концентрации: 50, 10, 2 и 0,4 мкМ в инфекционной среде

Балоксавир марбоксил

- Тестируемое соединение: балоксавир марбоксил (BLXM)

- Концентрация: концентрированный раствор 1 mM

- Растворитель: DMSO

- Рабочий раствор: 100 nM

- Готовят следующие концентрации: 1, 0,2, 0,04 и 0,008 nM в инфекционной среде

9 - Приготовление комбинаций в матрице 4×4

10 - Приготовление DMSO контроля в конечной конц. 1% в инфекционной среде

24-луночный планшет и тестируемое вещество

11 - Оценивают конфлюэнтность в планшете после инкубирования

12 - Удаляют инокуляты

13 - Добавляют по 1 мл каждой конц. в каждую лунку

14 - Инкубируют в течение 22 ч

Приготовление 96-луночных планшето

15 - Готовят тринадцать 96-луночных планшето

а. Тип клеток: MDCK II

б. Плотность посева: 3×10^5 клеток/лунку

16 - Инкубируют в течение 24 ч

Сутки 3

24-луночные планшеты и тестируемые вещества

17- Готовят по две аликвоты каждой конц. в пробирке Eppendorf на 1,5 мл, по 300 мкл в каждой пробирке. Хранят при -80°C

Приготовление 96-луночных планшетов (с U-образной формой дна)

18 - Готовят такое же количество, что и ранее приготовленных 96-луночных планшетов путем добавления по 100 мкл инфекционного PBS в каждую лунку, имеющую U-образную форму дна

19 - Добавляют в первую лунку каждой колонки по 50 мкл соответствующей конц.

- Каждый планшет имеет две колонки, соответствующие контролям -ve и +ve

20 - После добавления конц. в каждую первую лунку готовят серийное разведение путем переноса 50 мкл из первой лунки в следующую лунку. В конце удаляют последние 50 мкл

96 -луночные планшеты MDCK II

21- Оценивают конфлюэнтность

22 - Удаляют ростовые среды и промывают (2х) PBS

23 - Переносят разведения, приготовленные в 96-луночных планшетах с U-образной формой дна, в планшеты MDCK II

24 - Инкубируют в течение 1 ч

Приготовление покрытия Avicel

25 - Смешивают 1:1 2х среды MEM и 2х Avicel

26 - Добавляют ТРСК-трипсин до конечной конц. 2 мкг/мл

27 - После периода инкубации удаляют инокуляты и наносят по 100 мкл/лунку покрытия Avicel

28 - Инкубируют в течение 22 ч

Сутки 4

Фиксация и окрашивание

29 - Через 22 ч фиксируют 4%-ным раствором параформальдегида в течение 30 мин при 4°C и промывают (2х) PBS

30 - Добавляют по 100 мкл/лунку 0,3% тритон- X-100, приготовленного в PBS, и инкубируют в течение 10 мин

31 – Ранее добавленное удаляют, затем добавляют по 100 мкл/лунку 10%-ной FCS (свежеприготовленной в PBS)

32 - Инкубируют в шейкере в течение 10 мин

33 - Ранее добавленное удаляют, затем добавляют 50 мкл первичного антитела (анти-NP; AA5H)

34 - Инкубируют в шейкере в течение 60 мин

35 - Промывают (3х) в течение 5 мин (PBS+ 0,1% твин 20)

36 - Добавляют 50 мкл вторичного антитела (меченое пероксидазой анти-мышинное антитело)

37 – Инкубируют в течение 30-60 мин в шейкере

38 - Промывают (3х) в течение 5 мин (PBS+ 0,1% твин 20)

39 - Добавляют 50 мкл True Blue™ в течение 10 мин

40 - Промывают водой, затем оставляют высохнуть

41- Осуществляют анализ данных

Результаты

Как представлено на Фиг. 1, как осельтамивир, так и CI-1040 очень эффективны против штамма дикого типа (wt) A/Mississippi/3/2001 (H1N1). В отличие от этого, при демонстрации противовирусного потенциала обоих лекарственных средств против мутантного штамма, несущего мутацию H275Y в гене NA, было обнаружено существенное снижение эффективности осельтамивира, тогда как CI-1040 продемонстрировал сравнимое противовирусное действие, которое было весьма близким к штамму дикого типа.

Для дальнейшей оценки потенциальной противовирусной активности ATR002 (активный метаболит CI-1040) авторы изобретения сравнивали противовирусную активность ATR002 с новым получившим лицензию лекарственным средством против вируса гриппа балоксавира марбоксилем (BLXM), который был разработан для ингибирования белка кэп-зависимой эндонуклеазы. В соответствии с представленным на Фиг. 2А, BLXM был очень активным против дикого типа rgA/Giessen/6/09 (H1N1-WT) с практически полным снижением титра вируса, тогда как активность ATR002 была ниже на 13%. Напротив, активность BLXM была ниже на 37% при исследовании с использованием мутантного штамма rgA/Giessen/6/09 (H1N1)-PA-I38T, а ATR002 демонстрировал устойчивый эффект, как и в отношении дикого типа. Аналогично, при

демонстрации противовирусной активности с использованием rgA/Victoria/3/75 (H3N2-WT) и rgA/Victoria/3/75 (H3N2-PA-I38T) (Фиг. 2B), ATR002 продемонстрировал свою активность против обоих вариантов, тогда как BLXM утрачивал приблизительно 41% своей активности.

Пример 2: Синергический эффект между ATR002 и балоксавира марбоксилем

Материалы и методы

Лекарственные средства

Ингибитор МЕК ATR-002 (PD0184264) [2-(2-хлор-4-йодфениламино)-N-3,4-дифторбензойная кислота, представляющий собой активный метаболит CI-1040, синтезировали в ChemCon GmbH (Freiburg, Germany).

Балоксавир марбоксил, ингибитор кэп-зависимой эндонуклеазы вируса гриппа, приобретали в Hycultec GmbH (Cat: HY-109025) и готовили 1 мМ рабочий раствор в соответствии с указаниями производителя.

Клетки и вирусы

Клетки человеческой легочной аденокарциномы (A549, ATCC[®] CCL185[™]) и клетки собачьей почки Madin-Darby (MDCK II, ATCC[®] CRL2936[™]) приобретали в ATCC (Американская коллекция типовых культур) и культивировали в среде Дульбекко, модифицированной по способу Исков (IMDM), дополненной 10% FBS и 100 U/мл пенициллина-стрептомицина.

Вирус гриппа H1N1 использовали в экспериментах по ингибированию вируса с 0,001 MOI (множественность заражения).

Анализ ингибирования вируса

Чувствительность вируса гриппа к ATR-002 или другим лекарственным средствам, таким как балоксавир марбоксил, определяли путем измерения уменьшения FFU (бляшкообразующая единица) в присутствии этих лекарственных средств. Различные концентрации (0,4 – 50 мкМ) ATR-002 и (0,008 - 1 нМ) балоксавира марбоксила готовили путем осуществления 5-кратного серийного разведения в инфекционной среде для вируса гриппа (среды DMEM, дополненные 0,2% BSA (бычий сывороточный альбумин), 1 мМ MgCl₂, 0,5 мМ CaCl₂, 100 U/мл пенициллин, 0,1 мг/мл стрептомицин и 2 мкг/мл трипсин, обработанный ТРСК), дополненной 1 мкг/мл трипсина, обработанного L-тозиламидо-2-фенилэтилхлорметилкетонем (ТРСК). Клетки A549 (линия клеток человеческой легочной аденокарциномы (A549, ATCC[®] CCL185[™]))

приобретали в ATCC и выращивали в среде Дульбекко, модифицированной по способу Исков (IMDM), дополненной 10% FBS и 100 U/мл пенициллина-стрептомицина). Клетки поддерживали при 37°C и атмосфере 5% CO₂ и инфицировали H1N1 в 24-луночном планшете и инкубировали в течение 45 мин. После инкубации инокулят удаляли, конфлюэнтные монослои промывали PBS и дополняли инфекционной средой, содержащей тестируемые лекарственные средства. Через 24 ч собирали супернатант клеточной культуры, соответствующий каждой обработке, и подвергали анализу подавления фокусообразования с использованием MDCK II (клетки собачьей почки Madin-Darby (MDCK II, ATCC® CRL2936™), приобретенных в ATCC и выращиваемых в среде Дульбекко, модифицированной по способу Исков (IMDM), дополненной 10% FBS и 100 Е/мл пенициллина-стрептомицина. Клетки поддерживали при 37°C и атмосфере 5% CO₂ в соответствии с описанным ранее (Matrosovich *et al.*, 2006, Virol J. 31(3):63).

Анализ синергизма/антагонизма в соответствии с комбинированными исследованиями

Для определения возможных аддитивных и синергических эффектов при использовании комбинаций PD0184264 с балоксавира марбоксилем данные, полученные в анализе ингибирования вируса, сначала анализировали с использованием программного обеспечения Combenefit (Di Veroli *et al.*, 2016, Bioinformatics 32(18):2866-2868), которое одновременно оценивает синергизм/антагонизм с использованием трех опубликованных моделей (HSA (Highest single agent, наивысший индивидуальный агент), Bliss и Loewe).

Кривые зависимости ответа от дозы также были включены для каждого индивидуального соединения для построения поверхности зависимости ответа от дозы для референсных моделей, в соответствии с которыми затем сравнивали экспериментальную поверхность и смоделированную поверхность. Для каждой комбинации отклонению экспериментальной поверхности от смоделированной поверхности присваивали процентную оценку, указывающую на степень синергизма (увеличенный эффект) или антагонизма (уменьшенный эффект). Графики "контур" и "поверхность" были выбраны в качестве выходных графических данных для распределения синергии.

Данные анализировали в соответствии с моделью Chou-Talalay с использованием

программного обеспечения CompuSyn (Chou, 2010, Cancer Res 70(2):440-446). Это программное обеспечение рассчитывает комбинационный индекс (CI) для каждой комбинации лекарственных средств, где величина CI менее 1 указывает на синергическое действие, CI равное 1 свидетельствует об аддитивности, и CI более 1 указывает на антагонизм.

Результаты

Инфекция, вызываемая вирусами гриппа (IV), представляет собой угрозу здоровью общества по всему миру. В настоящее время все имеющиеся вакцины, а также противовирусные лекарственные средства, которые нацелены на сам вирус, подвержены развитию устойчивости. Доказано, что вирусы гриппа способны модулировать и контролировать клеточные пути, вовлеченные в вирусный клеточный цикл, такой как сигнальный путь Raf/MEK/ERK, при котором ядерный экспорт vRNP сильно зависит от индуцированной вирусом активации. В соответствии с этим авторы изобретения ранее продемонстрировали противовирусный потенциал ингибитора MEK PD0184264 (ATR002), представляющего собой активный метаболит CI-1040, против вирусов гриппа на уровнях *in vitro* и *in vivo* (Пример 1, смотри также WO 2019/076947). Недавно новое получившее лицензию противовирусное лекарственное средство, так называемое балоксавир марбоксил (ксофлюза), разработанное для ингибирования белка кэп-зависимой эндонуклеазы, продемонстрировало эффективность в отношении широкого спектра вирусов гриппа, включая штаммы, устойчивые к осельтамивиру. Тем не менее, уже сообщали о возникновении штаммов, устойчивых к этому новому получившему лицензию лекарственному средству.

Рассматривая недавно получившее лицензию противогриппозное лекарственное средство балоксавир марбоксил и потенциальный ингибитор MEK (ATR002) как терапевтический вариант, авторы изобретения исследовали, будет ли комбинация этих двух лекарственных средств усиливать противовирусную активность. Неожиданно обнаружено увеличение противовирусной активности при различных концентрациях ATR002 (0,4, 2 и 10 мкМ) в комбинации с BLXM (0,008 и 0,04 нМ), о чем свидетельствует снижение титра вируса по сравнению с индивидуальной обработкой каждым лекарственным средством. Кроме того, из модели Chou-Talalay можно сделать вывод, что комбинация при более низких концентрациях ATR002 и BLXM приводит к сильному синергическому эффекту с низкими показателями CI (смотри Фиг. 4А и Таблицу 1).

Таблица 2 и Фиг. 4В также демонстрируют сильный синергический эффект, выраженный в виде индекса снижения дозы лекарственного средства (DRI). Эти данные согласуются с наиболее широко используемыми моделями (HAS, Bliss и Loewe), которые также показали, что комбинации в более высоких дозах вызывают более сильный аддитивный эффект, а не синергический эффект (Фиг. 3).

Таблица 1: Показатели комбинаторного индекса (CI) для комбинаций лекарственных средств

Конц. BLXM (нМ)	Конц. ATR002 (мкМ)	CI
0,008	0,4	0,17469
1	10	0,24757
0,008	10	0,28142
1	50	0,29305
0,2	50	0,35104
0,008	50	0,42303
0,008	2	0,44177
0,2	10	0,63435
0,04	2	0,91172
0,04	0,4	1,18204
1	2	1,31281
0,2	2	1,62481
1	0,4	1,94132
0,2	0,4	2,31597
0,04	10	2,92652
0,04	50	3,32808

Таблица 2: Пример данных о снижении дозы лекарственного средства (DRI) для предсказанных комбинаций BLXM и ATR002

Fa ^b	Доза BLXM (нМ)	Доза ^a ATR002 (мкМ)	DRI BLXM	DRI TR002
0,99	4,23358 ^a	879,684 ^a	4,23358	17,5937
0,97	1,50936 ^a	228,8 ^a	7,54681	4,57599
0,95	0,92466	120,664 ^a	115,583	2,41327
0,9	0,4644	49,0947	2,32201	4,90947
0,88	0,38453	38,3704	48,0652	3,83704
0,6	0,08906	5,68262	11,133	2,84131
0,58	0,08253	5,14432	10,316	12,8608
0,57	0,07947	4,89711	1,98684	2,44855

^a предсказанная доза, которая отклоняется от ее эмпирической оценки

^b фракция неинфицированных/инфицированных клеток или ингибиторный эффект

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Ингибитор MEK (киназа митоген-активируемой протеинкиназы) для применения в лечении или предупреждении вирусной инфекции в комбинации с ингибитором кэп-зависимой эндонуклеазы.

2. Ингибитор MEK для применения по п. 1, где ингибитор MEK выбран из группы, состоящей из CI-1040, PD-0184264, GSK-1120212, GDC-0973, PLX-4032, AZD6244, AZD8330, AS-703026, RDEA-119, RO-5126766, RO-4987655, PD-0325901, TAK-733, AS703026, PD98059 и PD184352, или их фармацевтически приемлемой соли или метаболита.

3. Ингибитор MEK для применения по п. 1 или 2, где ингибитор кэп-зависимой эндонуклеазы представляет собой балоксавир марбоксил.

4. Ингибитор MEK для применения по п. 3, где ингибитор MEK представляет собой CI-1040 или PD-0184264.

5. Ингибитор MEK для применения по любому из пп. 1-4, где вирусная инфекция представляет собой инфекцию, вызванную вирусом с отрицательной цепью РНК.

6. Ингибитор MEK для применения по п. 5, где вирус представляет собой вирус гриппа.

7. Ингибитор MEK для применения по п. 5, где вирус гриппа представляет собой вирус гриппа А или вирус гриппа В.

8. Ингибитор MEK для применения по любому из пп. 1-7, где ингибитор MEK вводят одновременно с ингибитором кэп-зависимой эндонуклеазы, до или после него.

9. Фармацевтическая композиция, содержащая ингибитор MEK или его фармацевтически приемлемую соль или метаболит и ингибитор кэп-зависимой эндонуклеазы, для применения в качестве лекарственного средства.

10. Фармацевтическая композиция для применения по п. 9, где ингибитор MEK выбран из CI-1040, PD-0184264, GSK-1120212, GDC-0973, PLX-4032, AZD6244, AZD8330, AS-703026, RDEA-119, RO-5126766, RO4987655, PD-0325901, TAK-733, AS703026, PD98059 и PD184352 или их фармацевтически приемлемой соли или метаболита.

11. Фармацевтическая композиция для применения по п. 9 или 10, где ингибитор кэп-зависимой эндонуклеазы представляет собой балоксавир марбоксил.

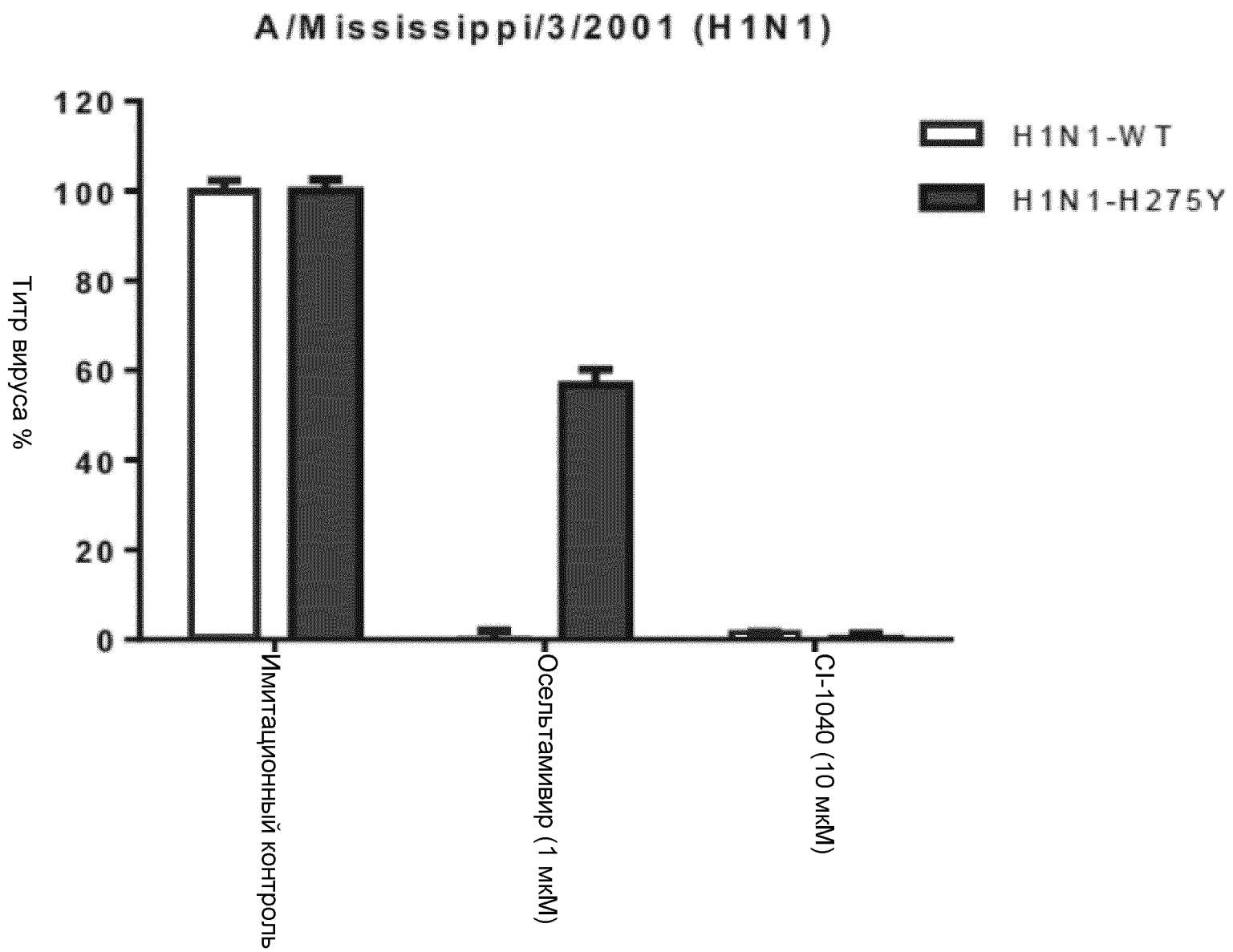
12. Фармацевтическая композиция для применения по п. 11, где ингибитор МЕК представляет собой CI-1040 или PD-0184264.

13. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 9-12 для применения в профилактике и/или лечении вирусной инфекции.

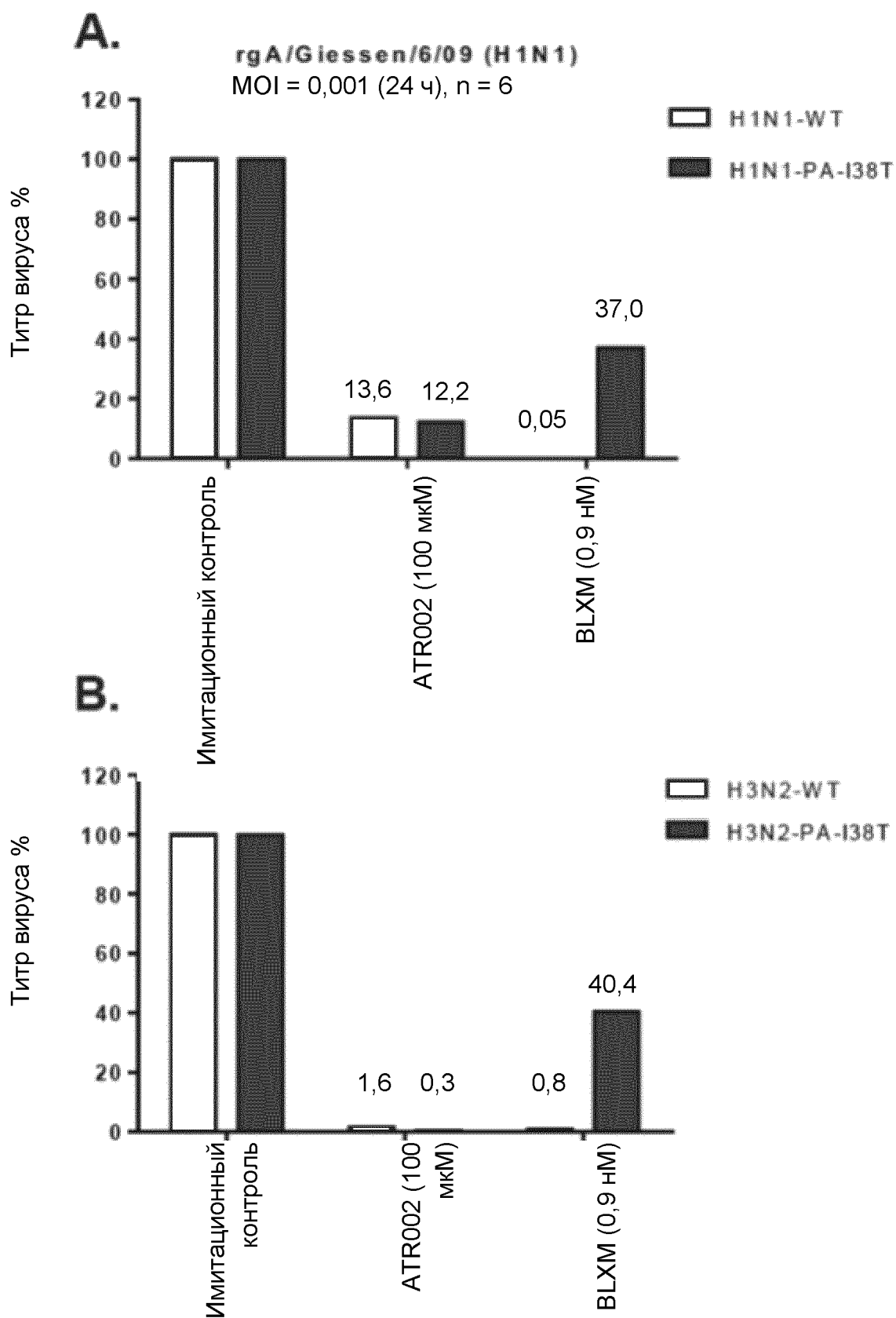
14. Фармацевтическая композиция для применения по п. 13, где вирусная инфекция представляет собой инфекцию, вызванную вирусом с отрицательной цепью РНК.

15. Фармацевтическая композиция для применения по п. 14, где вирус представляет собой вирус гриппа, предпочтительно вирус гриппа А или вирус гриппа В.

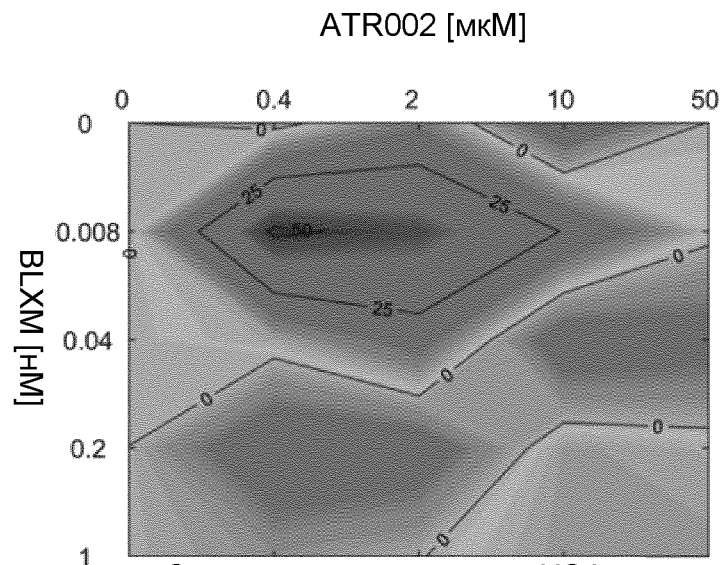
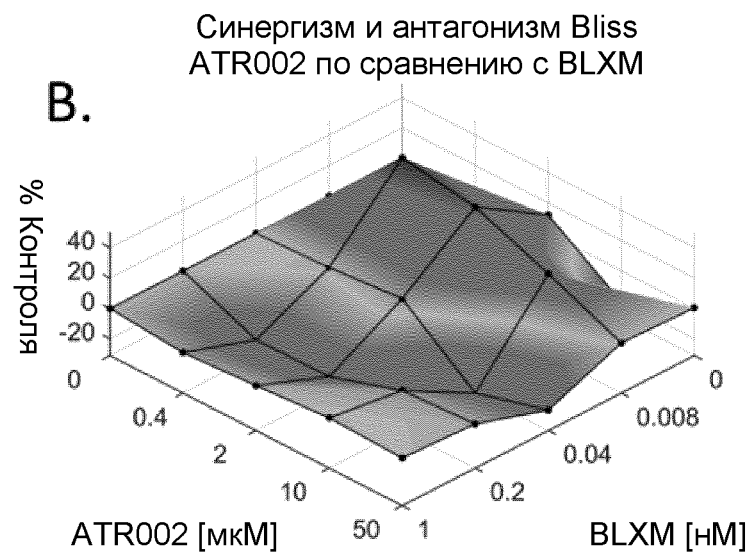
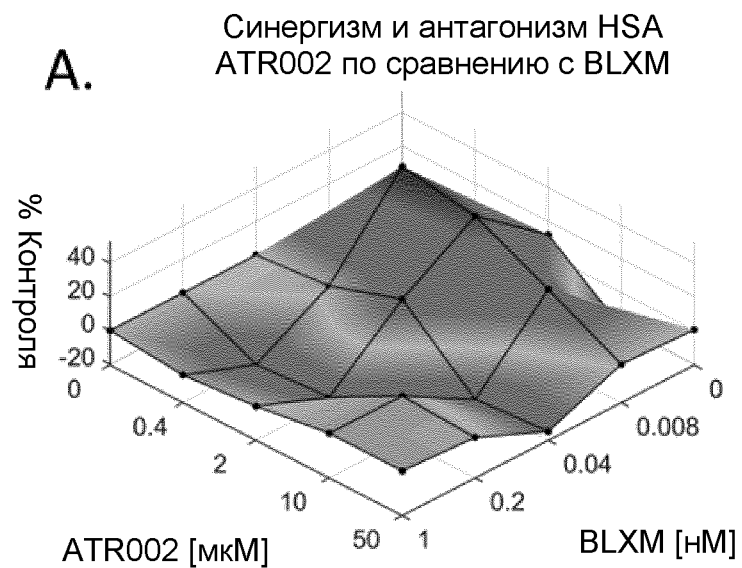
Фиг. 1



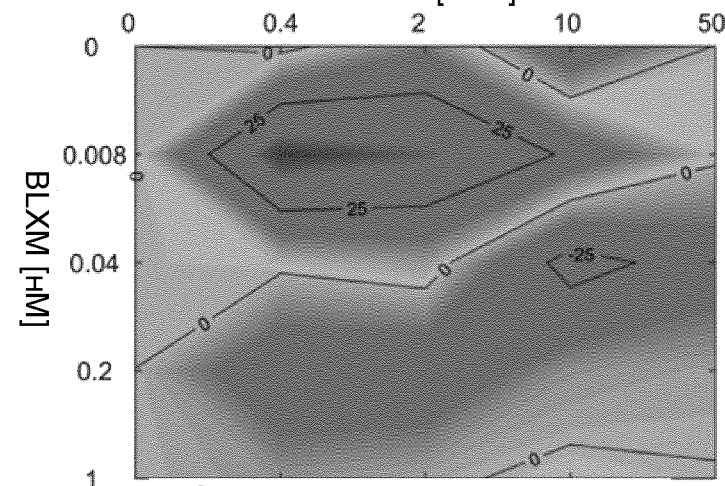
Фиг. 2



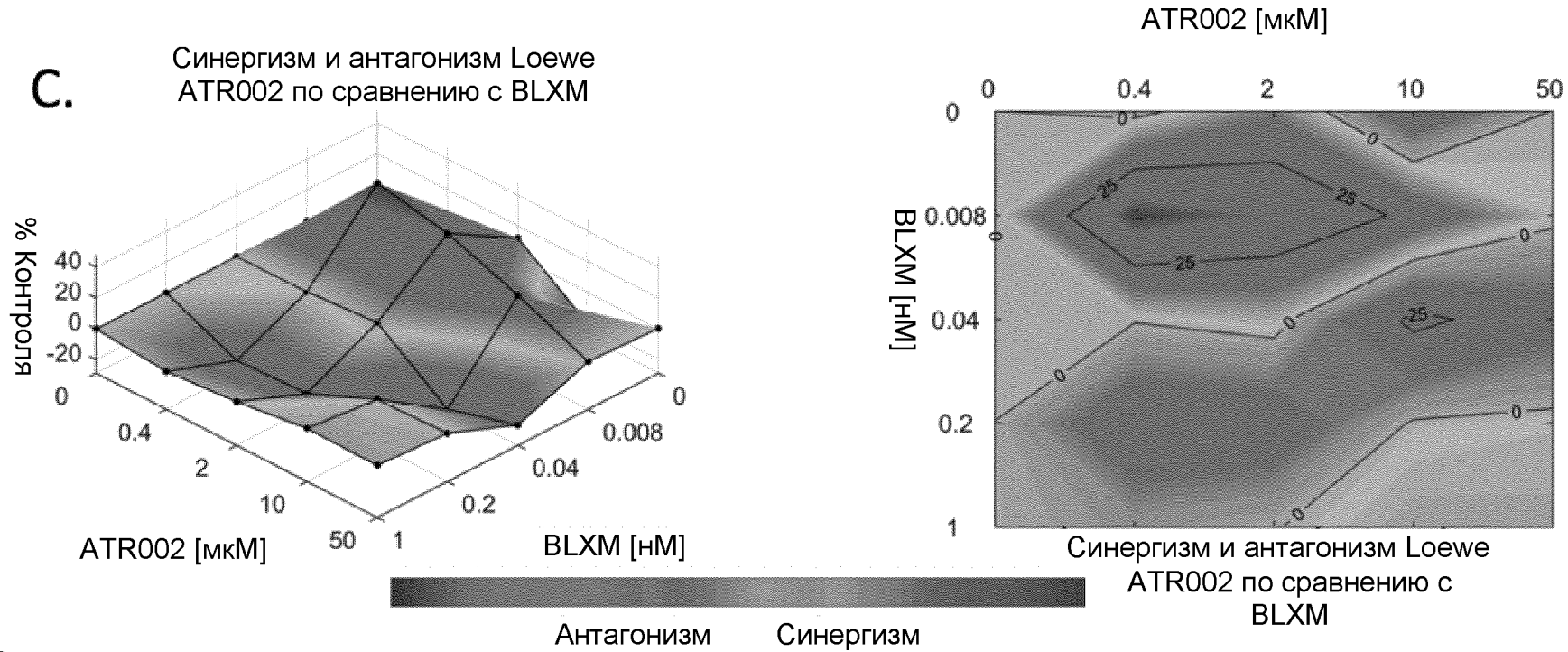
Фиг. 3



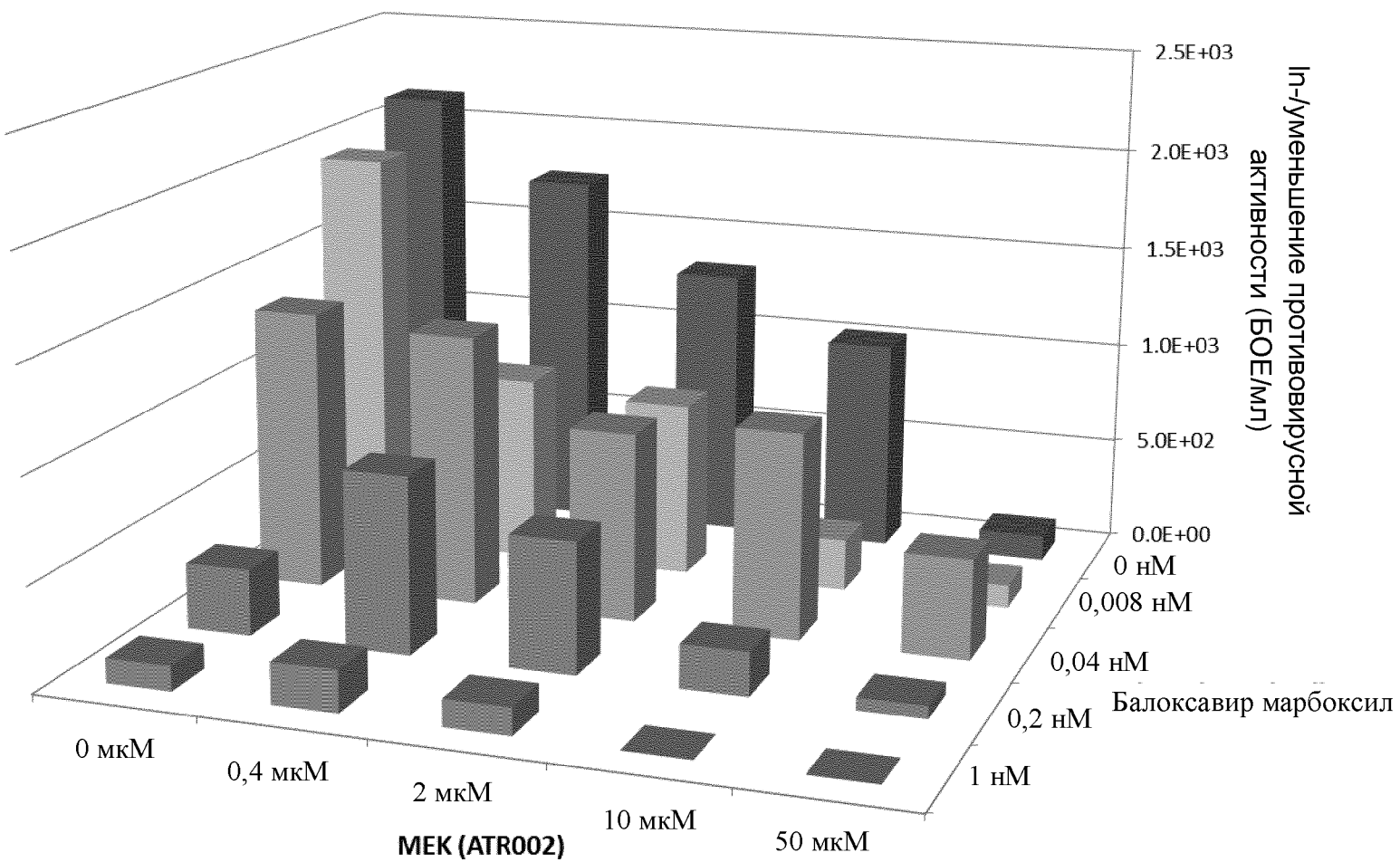
Синергизм и антагонизм HSA
ATR002 по сравнению с BLXM



Синергизм и антагонизм Bliss
ATR002 по сравнению с BLXM



Фиг. 3 (продолжение)



Фиг. 3 (продолжение)

D.

Фиг. 4

