

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202290717** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2022.08.08

(51) Int. Cl. *A61K 31/166* (2006.01)
A61K 31/196 (2006.01)
A61P 31/14 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2020.10.07

(54) **ИНГИБИТОРЫ МЕК ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ХАНТАВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ**

(31) **LU101430; 19203601.0**

(72) Изобретатель:

(32) **2019.10.08; 2019.10.16**

Планц Оливер (DE)

(33) **LU; EP**

(74) Представитель:

(86) **PCT/EP2020/078104**

**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)**

(87) **WO 2021/069486 2021.04.15**

(71) Заявитель:

**АТРИВА ТЕРАПЬЮТИКС ГМБХ
(DE)**

(57) Изобретение относится к ингибиторам МЕК, которые способны демонстрировать одно или более чем одно благоприятное терапевтическое действие. Ингибиторы МЕК можно применять для предупреждения и/или лечения хантавирусной инфекции.

202290717

A1

A1

202290717

Ингибиторы МЕК для лечения хантавирусных инфекций

Предшествующий уровень техники

Хантавирусы (или ортохантавирус) представляют собой одноцепочечные оболочечные вирусы с отрицательной РНК в семействе *Hantaviridae* порядка *Bunyavirales*. На сегодняшний день известно 28 патогенных видов хантавирусов. Виды хантавирусов различаются в зависимости от географического положения. В Европе преобладающий хантавирус представляет собой вирус Пуумала, в то время как в странах Америки преобладают вирус Андес и вирус Син Номбре. В Азии обнаружены вирус Сеул и вирус Хантаан. Природными хозяевами хантавируса являются грызуны, землеройки и летучие мыши, однако никаких клинических симптомов у природных хозяев не обнаружено. Передача видов хантавирусов происходит главным образом через аэролизированные выделения грызунов (моча, слюна, экскременты), однако в 2005 и 2019 годах сообщили о передаче вируса Андес от человека к человеку в Южной Америке (Martinez VP, Bellomo C, San Juan J, Pinna D, Forlenza R, Elder M, Padula PJ (2005). "Person-to-person transmission of Andes virus". *Emerging Infectious Diseases*; 11 (12): 1848–1853). Для видов хантавирусов инкубационный период у людей продолжается до нескольких недель.

Хантавирусные инфекции представляют глобальную угрозу, поскольку эти инфекции ассоциированы с высоким уровнем смертности и доступно очень ограниченное лечение. У людей хантавирусные инфекции проявляются в двух клинических картинах. Первая представляет собой хантавирусную геморрагическую лихорадку с почечным синдромом (HFRS), при которой уровень смертности составляет 12%, а вторая представляет собой хантавирусный легочный синдром (HPS), при котором уровень смертности составляет 40%. Тяжесть заболевания зависит от вида хантавируса, вызывающего заболевание, и вирусной нагрузки. Например, тяжелое течение заболевания, как известно, вызывается вирусом Хантаан, вирусом Добрава-Белград, вирусом Син Номбре и вирусом Андес, в то время как более умеренное течение заболевания более вероятно, например, при вирусе Пуумала или вирусе Сааремаа. В год регистрируется по меньшей мере 100000 случаев HFRS. В 2004 году только в Китае было зарегистрировано от 40000 до 60000 случаев в год (Zhang et al. 2004, Lee et al. 1996, Lee

et al. 1998) по сравнению с приблизительно 9000 в Европе (Vapalahti et al. 2003, Heyman et al. 2009, Heyman et al. 2011).

В настоящее время не доступны какие-либо одобренные FDA (Управление по контролю за качеством пищевых продуктов и медикаментов США) или WHO (Всемирная Организация Здравоохранения) вакцины или противовирусные средства для лечения или предупреждения хантавирусных инфекций. Вакцина, известная как Hantavax, изучается с 1990 года и используется в Корее, но еще не одобрена в целом и имеет ограниченную эффективность. Вакцина на основе убитого вируса не рассматривается из-за опасностей, ассоциированных с массовым производством в условиях высокой защищенности, а также нерешенных вопросов об эффективности вакцины. Множество лабораторий работают над созданием вакцины, которая доставляла бы вирусные антигены посредством ДНК-векторов или в виде рекомбинантных белков, но до сих пор ни для одной из этих вакцин не была продемонстрирована эффективность.

Кроме того, отсутствует одобренное лечение HPS или HFRS, кроме облегчения симптомов заболеваний. Единственным возможно применяемым лекарственным средством является рибавирин, но его эффективность остается неизвестной. Одна из проблем контроля над, в частности, РНК-вирусами, такими как хантавирусы, заключается в адаптируемости вирусов, вызванной высоким уровнем ошибок вирусных полимераз, что делает производство подходящих вакцин, а также разработку противовирусных веществ весьма затруднительной. Поэтому известно, что большинство известных противовирусных лекарственных средств приводит к устойчивости у отдельных видов РНК-вирусов.

Из-за очень маленького генома и, таким образом, ограниченной способности к кодированию функций, необходимых для репликации, все вирусы в высокой степени зависимы от функций их клеток-хозяев. Оказывая влияние на такие клеточные функции, необходимые для репликации вируса, можно отрицательно 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. Это уже было продемонстрировано 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. Тем самым клетка способна реагировать на внешние стимулы и реагировать посредством пролиферации клеток, активации клеток, дифференцировки или контролируемой гибели клеток. Общим у этих 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 наблюдении клеточных процессов, индуцированных после инфицирования вирусами, было установлено, что множество ДНК- и РНК-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; Brader и Kovesdi, *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. Индуцированные факторами роста сигналы передаются посредством последовательного фосфорилирования от серин/треониновой киназы Raf к киназе MEK (киназа митоген-активируемой протеинкиназы) с двойной специфичностью (киназа киназы MAP (митоген-активируемая протеинкиназа)/киназа ERK (регулируемая внеклеточными сигналами киназа)) и в итоге к киназе ERK (регулируемой внеклеточными сигналами киназе). Притом, что 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 принадлежат, например, транскрипционные факторы, посредством которых осуществляется непосредственное влияние на экспрессию генов в клетке (Cohen, *Trends in Cell Biol* 7, 353-361, 1997; Robinson and 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 для предупреждения и лечения вирусных заболеваний, в частности заболеваний, вызванных видами хантавирусов.

В этой связи, продолжающееся исследование применимости ингибиторов MEK при лечении других вирусных заболеваний, в частности гриппа, выявило, что этот класс соединений позволяет избежать недостатков стандартных противовирусных лечений,

поскольку он направлен на клеточные компоненты клеток-хозяев, а не на сам вирус. По этой причине не наблюдали устойчивость к ингибиторам МЕК. В WO 2001/076570 предложена концепция лечения или предупреждения инфекций, вызванных (-)РНК вирусами, в частности вирусами гриппа, посредством 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 инфекции вирусом гриппа.

Однако ни в одном из этих документов не продемонстрировано, что ингибиторы МЕК могут быть использованы для хантавирусных инфекций, и сохраняется существенная потребность в предложении композиций и соединений для лечения и предупреждения хантавирусных инфекций.

Краткое изложение сущности изобретения

В настоящем изобретении обнаружено, что применение ингибитора МЕК в лечении или предупреждении хантавирусной инфекции приводит к эффективному лечению вирусной инфекции. В частности, значительное уменьшение вирусной нагрузки было обнаружено тогда, когда ингибитор МЕК CI-1040 или PD-0184264 вводили мышам, инфицированным хантавирусом.

Таким образом, настоящее изобретение относится к ингибитору МЕК для применения в лечении или предупреждении хантавирусной инфекции у млекопитающего, предпочтительно человека или грызуна.

В контексте настоящего 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 предпочтительном аспекте ингибитор МЕК представляет собой CI-1040 или PD-0184264.

У пациентов-людей ингибитор МЕК можно вводить для лечения хантавирусной инфекции, когда пациент демонстрирует симптомы хантавирусной геморрагической

лихорадки с почечным синдромом (HFRS) или хантавирусного легочного синдрома (HPS). В этих случаях ингибитор МЕК можно вводить до 12 часов, до 24 часов, до 48 часов, до 72 часов или от 4 и 10 суток после обнаружения первых симптомов HFRS или HPS.

Ингибитор МЕК также можно вводить для предупреждения хантавирусной инфекции субъектам-людям, которые находились в контакте с грызунами или экскрементами грызунов либо находятся в области, для которой обычна вспышка хантавируса.

Введение ингибитора МЕК для лечения или предупреждения хантавирусной инфекции особенно показано, когда субъект-человек живет в области, для которой известно наличие хантавирусных инфекций, приводящих в результате к HFRS или HPS, или посещает ее.

Такая хантавирусная инфекция может представлять собой инфекцию, вызванную вирусом Хантаан или вирусом Добрава, или хантавирусную инфекцию, вызванную американскими видами, такими как вирус канала Блэк Крик (BCCV), Нью-Йоркский ортохантавирус (NYV), вирус Мононгахела (MGLV), *ортохантавирус Син Номбре* (SNV) или вирус Андес.

Ингибитор МЕК для применения в соответствии с настоящим изобретением можно предпочтительно вводить перорально или путем ингаляции.

В еще одном аспекте рассматривается обработка популяции грызунов ингибитором МЕК для предупреждения инфекции у людей, находящихся в контакте с этими грызунами. При таких применениях ингибитор МЕК можно вводить путем ингаляции, например при помощи спрея для окружающей среды.

Графические материалы

Фиг. 1 демонстрирует, что в присутствии CI-1040 достигается существенное уменьшение титра вируса в порядках $> 2\log_{10}$ по сравнению с контролем - растворителем. Это эквивалентно уменьшению титра вируса $> 99\%$.

Фиг. 2 демонстрирует, что в присутствии ATR-002 достигается уменьшение титра вируса в порядках $> 1,5\log_{10}$ по сравнению с контролем - растворителем. Это эквивалентно уменьшению титра вируса $> 90\%$.

Фиг. 3 демонстрирует, что в легком животных, обработанных 75 мг/кг/сутки ATR-002, вирус не обнаруживается в 7 и 10 сутки после инфекции.

Фиг. 4 демонстрирует, что в почках животных, обработанных 75 мг/кг/сутки

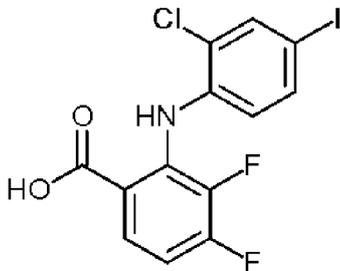
ATR-002, вирус не обнаруживается в 7 и 10 сутки после инфекции.

Подробное описание изобретения

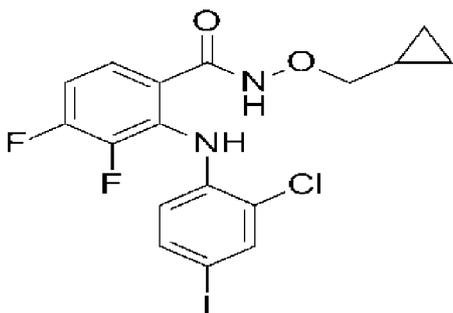
Следующее описание включает информацию, которая может быть полезна для понимания настоящего изобретения. Не предполагается, что любая приведенная здесь информация является информацией из предшествующего уровня техники или относится к заявленным здесь изобретениям, или что любая публикация, на которую конкретно или косвенно ссылаются, представляет собой предшествующий уровень техники.

Используемые здесь “ингибиторы MEK” 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 узком месте MEK нарушает рост вирусов, в частности вирусов гриппа. Кроме того, ингибиторы MEK демонстрируют низкую токсичность и небольшие отрицательные побочные эффекты у людей. Также отсутствует тенденция индуцированию вирусной резистентности (Ludwig, 2009). Особенно предпочтительный ингибитор MEK представляет собой PD-0184264, также известный как ATR-002.

Ингибиторы MEK предпочтительно выбраны 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. Nematol. 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.

Для задачи в соответствии с изобретением определенный выше ингибитор МЕК также включает его фармацевтически приемлемую(ые) соль(и). Используемая здесь фраза “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, образующиеся с анионами, такими как анионы, имеющие происхождение из соляной, ортофосфорной, уксусной, щавелевой, винной кислот и т.п., и соли, образующиеся с катионами, такими как катионы, представляющие собой производные натрия, калия, аммония, кальция, гидроксидов железа, изопропиламина, триэтиламина, 2-этиламиноэтанола, гистидина, прокаина и т.п.

В соответствии с изложенным выше, хантавирусные инфекции представляют собой угрозу здоровью общества по всему миру. В настоящее время отсутствуют одобренные WHO или FDA вакцины или противовирусные лекарственные средства, которые нацелены на хантавирусы. Тем не менее, в контексте лечения гриппа авторы изобретения ранее продемонстрировали противовирусный потенциал ингибиторов МЕК, таких как CI-140 и PD0184264 (ATR002), активного метаболита CI-1040 против вирусов гриппа на уровнях *in vitro* и *in vivo*. В соответствии с приведенными ниже результатами, в экспериментах *in vitro* продемонстрировано, что размножение хантавирусов может быть успешно уменьшено в клетках Vero, обработанных 40 мкМ CI-

1040 или 40 мкМ ATR-002. В Примере 1 обнаружено уменьшение титра вируса на >90% по сравнению с контролем - растворителем, см. Фиг. 1 и 2. Кроме того, в экспериментах *in vivo* продемонстрировано, что обработка мышей 75 мг/кг/сутки ATR-002 в течение периода 5 суток приводила к полному уменьшению титра вируса по сравнению с животными, которых обрабатывали исключительно растворителем, как описано в Примере 2 и на Фиг. 3 и 4.

Хотя хантавирусы реплицируются в цитоплазме и для них не известно наличие ядерной фазы, размножение PUUV (вирус Пуумала) успешно нарушается посредством ингибирования пути Raf/MEK/ERK при помощи ингибитора MEK ATR-002 или CI-1040.

Вирусная инфекция, которую предупреждают или лечат путем введения ингибитора MEK в соответствии с изобретением, представляет собой инфекцию, вызванную хантавирусом. Известные хантавирусы включают вирус Пуумала, вирус Син Номбре, вирус Сеул, вирус Хантаан, вирус Добрава-Белград, вирус Сааремаа и вирус Андес.

Как уже упоминалось выше, хантавирусные инфекции представлены в двух клинических картинах. Первая представляет собой хантавирусную геморрагическую лихорадку с почечным синдромом (HFRS), при которой уровень смертности составляет 12%, а вторая представляет собой хантавирусный легочный синдром (HPS), при котором уровень смертности составляет 40%. Тяжесть заболевания зависит от вида хантавируса, вызывающего заболевание, и вирусной нагрузки. Например, известно, что вирус Хантаан, вирус Добрава-Белград, вирус Син Номбре и вирус Андес вызывают тяжелое течение заболевания, в то время как более умеренное течение заболевания более вероятно, например при вирусе Пуумала или вирусе Сааремаа.

Хантавирусная геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (HFRS) также известна как Корейская геморрагическая лихорадка, эпидемическая геморрагическая лихорадка и эпидемическая нефропатия. Виды, вызывающие HFRS, включают *ортохантавирус Хантаан*, *ортохантавирус Добрава-Белград*, вирус Сааремаа, *ортохантавирус Сеул*, *ортохантавирус Пуумала* и другие Евразийские ортохантавирусы. Симптомы HFRS обычно развиваются в течение от 1 до 2 недель после контакта с инфекционным материалом, но в редких случаях их развитие может занимать до 8 недель. Исходные симптомы возникают внезапно и включают интенсивные головные боли, боли в спине и животе, лихорадку, озноб, тошноту и размытое зрение. У индивидов может быть покраснение лица, воспаление или покраснение глаз, или сыпь.

Более поздние симптомы могут включать низкое кровяное давление, острый шок, транссудацию и острую почечную недостаточность, которые могут вызвать тяжелую гиперволемию.

Тяжесть заболевания варьирует в зависимости от вируса, вызывающего инфекцию. Инфекции, вызванные вирусами Хантаан и Добрава, обычно приводят к тяжелым симптомам, тогда как инфекции, вызванные вирусами Сеул, Сааремаа и Пуумала, обычно являются более умеренными.

Этот синдром также может привести к летальному исходу. В некоторых случаях известно, что он вызывает постоянную почечную недостаточность. HFRS трудно диагностировать только по клиническим признакам, и часто необходимы серологические данные. Четырехкратное увеличение титра антител IgG в течение 1-недельного интервала и присутствие антител типа IgM против хантавирусов являются хорошим доказательством острой хантавирусной инфекции. HFRS следует подозревать у пациентов с острым лихорадочным гриппоподобным заболеванием, почечной недостаточностью неизвестного происхождения и иногда дисфункцией печени.

Хантавирусный легочный синдром (HPS), как правило, вызывают американские виды хантавируса. Они включают вирус канала Блэк-Крик (BCCV), Нью-Йоркский ортохантавирус (NYV), вирус Мононгахела (MGLV), *ортохантавирус Син Номбре* (SNV) и некоторые другие члены родов хантавирусов, которые являются нативными для Соединенных Штатов Америки и Канады. Конкретные грызуны являются основными хозяевами хантавирусов, включая щетинистого хлопкового хомяка (*Sigmodon hispidus*) на юге Флориды, который является основным хозяином вируса канала Блэк-Крик, оленью мышь (*Peromyscus maniculatus*) в Канаде и на западе Соединенных Штатов Америки, которая является основным хозяином вируса Син Номбре, и белоногая мышь (*Peromyscus leucopus*) на востоке Соединенных Штатов Америки, которая является основным хозяином Нью-Йоркского вируса. В Южной Америке *Oligoryzomys longicaudatus* и другие виды рода *Oligoryzomys* были документированы в качестве резервуара для вируса Андес.

Симптомы HPS являются гриппоподобными, такими как лихорадка, кашель, миалгия, головная боль, вялость и одышка, которая быстро ухудшается до острой дыхательной недостаточности. Он характеризуется внезапным появлением одышки с быстро развивающимся отеком легких; это часто смертельно, несмотря на искусственную вентиляцию легких и вмешательство с использованием сильных

диуретиков. Коэффициент смертности составляет 36%. HPS может быть легко не замечен, потому что его ранние симптомы очень похожи на грипп. Инфицированные пациенты страдают от усталости, лихорадки и мышечных болей, часто сопровождающихся головными болями, головокружением и желудочно-кишечными проблемами в течение недель после контакта. Приблизительно через неделю после того, как первоначальные симптомы стихают, наступает вторая фаза заболевания, и пациенты испытывают сильный кашель и одышку по мере того, как легкие наполняются жидкостью. На более поздних стадиях HPS легкие сильно поражаются, что приводит к высокому коэффициенту смертности.

При применении в лечении или предупреждении в соответствии с настоящим изобретением пациент предпочтительно представляет собой млекопитающее, в предпочтительном воплощении примата, наиболее предпочтительно пациента-человека. При альтернативном введении обработку млекопитающих, которые, как известно, являются перевозчиками хантавируса, таких как грызуны и летучие мыши, в частности крысы, мыши и оленьи мыши, рассматривают для предупреждения инфицирования людей через этих хозяев. В этом контексте обширное введение путем ингаляции (композиции спреев для окружающей среды) может рассматриваться в областях с высокой хантавирусной зараженностью. Поскольку передача от человека к человеку является редкой для хантавирусных инфекций, такое широкое применение в отношении отличных от людей хозяев-млекопитающих, таких как грызуны, может выступать в качестве профилактической меры.

Кроме того, введение ингибитора МЕК для предупреждения хантавирусной инфекции субъектам-людям, которые были в контакте с грызунами или экскрементами грызунов, или живут или путешествуют в регионе, для которого обычна вспышка хантавирусной инфекции, может быть полезным, особенно в случаях, когда субъект-человек живет в регионе, в котором, как известно, присутствуют хантавирусные инфекции, приводящие в результате к HFRS или HPS, или посещает его.

В частности, когда пациент-человек путешествует или живет в Корее, Сербии или в Америке в областях, для которых известно наличие инфекции вирусом Хантаан или Добрава или хантавирусной инфекции, вызванной американскими видами, такими как вирус канала Блэк-Крик (BCCV), Нью-Йоркский ортохантавирус (NYV), вирус Мононгахела (MGLV), *ортохантавирус Син-Номбре* (SNV) или вирус Андес, тогда такое предупреждающее или профилактическое лечение может быть полезно. Поскольку

передача видов хантавирусов происходит в основном через аэролизированные выделения грызунов (моча, слюна, экскременты), профилактическое лечение может быть начато непосредственно после контакта с выделениями грызунов по 10 сутки после контакта без симптомов инфекции.

Ингибитор МЕК можно вводить перорально, внутривенно, внутривезикулярно, внутримышечно, местно или путем ингаляции. Предпочтительно, ингибитор МЕК вводят путем ингаляции или перорально.

Кроме того, ингибитор МЕК можно вводить до 12 часов, до 24 часов, до 48 часов, до 72 часов или от 4 до 10 суток после обнаружения первых симптомов HFRS или HPS или после того, как пациент-человек вступил в контакт с выделениями грызунов.

В одном из воплощений применения в лечении или предупреждении по настоящему изобретению соединение ингибитор МЕК можно вводить перорально или путем ингаляции в эффективной терапевтической дозе. 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.

Как изложено выше, в настоящем изобретении дополнительно предложена фармацевтическая композиция, содержащая ингибитор МЕК или его фармацевтически приемлемую соль или метаболит, для применения в качестве лекарственного средства для профилактики и/или лечения вирусной инфекции, предпочтительно инфекции, вызванной хантавирусом.

Фармацевтическая композиция в соответствии с настоящим изобретением может быть представлена в форме перорально вводимых суспензий или таблеток; спреев для носа, стерильных инъекционных препаратов (для внутривенного, внутривезикулярного, внутримышечного введения), например в виде стерильных инъекционных 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, альгиновую кислоту или альгинат натрия в качестве суспендирующего агента, метилцеллюлозу в качестве загустителя и подсластители/корригенты, известные в данной области техники. Данные композиции в виде таблеток с немедленным высвобождением могут содержать микрокристаллическую целлюлозу, фосфат дикальция, крахмал, стеарат магния и

лактозу и/или другие эксципиенты, связующие вещества, сухие разбавители, разрыхлители, разбавители и смазывающие вещества, 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.

Определения

Во всем настоящем описании и следующей за ним 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 этапа или группы целых чисел или этапов, но не исключение любого другого целого числа или стадии или группы целых чисел или стадий. При использовании в настоящем документе выражение “содержащий” можно заменить выражением “включающий” или иногда, при использовании в данном документе, выражением “имеющий”.

При использовании здесь “состоящий из” исключает любой элемент, стадию или ингредиент, не указанные в заявленном элементе. При использовании в настоящем 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

Материалы:

вирус Пуумала (PUUV) штамм Соткамо

- Основной вид хантавирусов в Европе
- С ними можно работать в лаборатории S2

Линия клеток Vero

- Линия клеток, полученных из клеток почки Африканской зеленой мартышки

- Стандартно используется для выращивания вирусов

- Дефицит по интерферону I типа

Культуральные среды для клеток:

- Основная среда: IMDM (среда Дульбекко, модифицированная по способу Исков), 1% P/S, 1% L-Gln, 10% FCS (фетальная телячья сыворотка)
- Среда для обработки ATR-002/CI-1040: основная среда без FCS
- Среда для инфицирования вирусом: Base medium w/o FCS

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

Ингибитор МЕК CI-1040 [2-(2-хлор-4-йодфениламино)-N-(циклопропилметокси)-3,4-дифторбензамид] синтезировали в ChemCon GmbH (Freiburg, Germany).

Пример 1: Анализ уменьшения вирусной нагрузки

Способы:

Клетки Vero высевали в 24-луночные планшеты (1×10^6 клеток/луночку), инкубирование при 37°C, 5% CO₂.

Через сутки после высевания клетки инфицировали частицами вируса PUU (МОИ (множественность заражения) 0,3).

Через 1 ч после инфицирования клетки обрабатывали 40 мкМ CI-1040, 40 мкМ ATR-002 или DMSO (диметилсульфоксид) (контроль - растворитель).

Супернатанты собирали через 72 ч после инфицирования и титр вируса определяли посредством приведенного ниже анализа TCID₅₀ (полуинфицирующая доза в культуре ткани).

Анализ TCID₅₀ (SOP-ATR-0119)

Титрование вируса осуществляли с использованием стандартной операционной процедуры SOP-ATR-0119. Кратко, 10% гомогенатов легких и почек/супернатантов из анализа VYR разбавляли в серийных разведениях 1:10. Клетки Vero инфицировали различными 10-кратными разведениями вируса и инкубировали в течение 60 мин при 37°C в атмосфере 5% CO₂. После инкубации клетки промывали PBS и дополняли 200 мкл IMDM (среда Дульбекко, модифицированная по способу Исков)/ВА (бычий альбумин) - среда (0,2% ВА, 1 мМ MgCl₂, 0,9 мМ CaCl₂, 100 Е/мл пенициллин, 0,1 мг/мл стрептомицин) и инкубировали в течение 7 суток при 37°C в 5% CO₂. Затем клетки Vero

промывали и фиксировали с использованием Roti[®]-Histofix в течение 30 мин при 4°C. После промывания PBS клетки делали проницаемыми при помощи Тритон-Х-100 и FCS. Инкубирование с первичным антителом (антитело против PUUV-NP-AB) осуществляли в течение одного часа. После промывания вторичное антитело добавляли к клеткам на 30 мин. После этого клетки промывали и окрашивали субстратом TrueBlue в течение 10 мин. Анализ осуществляли при помощи световой микроскопии.

Результаты:

Как можно видеть на Фиг. 1, в присутствии CI-1040 было достигнуто значительное уменьшение титра вируса с шагом $>2\log_{10}$ по сравнению с контролем - растворителем. Это эквивалентно уменьшению титра вируса $>99\%$.

Аналогичные результаты представлены на Фиг. 2 в присутствии ATR-002, когда уменьшение титра вируса с шагом $>1,5\log_{10}$ было достигнуто по сравнению с контролем - растворителем. Это эквивалентно уменьшению титра вируса $>90\%$.

Вывод:

Обработка клеток Vero, инфицированных PUUV (MOI 0,3), с использованием 40 мкМ CI-1040 или 40 мкМ ATR-002 приводит к значительному уменьшению титра вируса по сравнению с контролем - растворителем.

Ингибирование пути Raf/MEK/ERK нарушало размножение вирус Пуумала *in vitro*.

Пример 2: Противовирусное действие ATR-002 против хантавируса *in vivo*

Материалы и способы

Мыши

Надежная признанная животная модель для исследования хантавирусных инфекций отсутствовала. Было доказано, что дефицитные по интерферону I типа клетки Vero представляют собой хорошую модель *in vitro*, он мыши, дефицитные по интерферону I типа, не были доступны. Таким образом, мыши, нокаутированные по интерфероновому рецептору (мыши IFN $\alpha/\beta/\gamma$ R-/- (AG129)) были выбраны для исследований *in vivo*. Мышей AG129 использовали в следующих экспериментах.

Способы

Мышей AG129 интраназально инфицировали PUUV (5×10^5 /КОЕ (колониеобразующая единица) в 50 мкл PBS, инокуляция по 25 мкл в каждую ноздрю).

Обработка 75 мг/кг/сутки ATR-002 (в DMSO/Кремофор EL/PBS), начиная с 5 ч после инфицирования в течение 5 последующих суток. Путь введения: при помощи

перорального зонда, 37,5 мг/кг дважды в сутки (9 часов утра и 6 часов вечера). Обработка контрольной группы только растворителем, соответственно.

Мышей умерщвляли в 7 и 10 сутки после инфицирования для определения титра вируса в легких и почках (анализ TCID₅₀).

Результаты

Ни одно из животных не теряло в массе, ни у одного из животных не развивались клинические симптомы, ни одно из животных не погибло после инфицирования PUUV.

PUUV обнаруживали у контрольных животных, обработанных растворителем, в легком и в почках в 7 и 10 сутки после инфицирования. Титр вируса был выше в 10 сутки.

В легких и почках животных, обработанных 75 мг/кг/сутки ATR-002, не могли обнаружить вирус в 7 и 10 сутки после инфицирования (предел обнаружения: легкое: 3,4 log₁₀ (TCID₅₀/г органа) Почка: 3,2 log₁₀ (TCID₅₀/г органа)), как можно видеть на Фиг. 3 и 4, соответственно.

Уменьшение количества вируса (сравнение между гомогенатами, обработанными контролем - растворителем, и обработанными ATR-002) было в высокой степени значимым (двухфакторный дисперсионный анализ, $P < 0,0001$).

Заключение

Исследование продемонстрировало, что обработка мышей 75 мг/кг/сутки ATR-002 (в DMSO/Кремофор EL/PBS) в течение пяти суток, начиная через 5 часов после инфицирования PUUV, значительно уменьшала количество вируса в легком и почках.

Формула изобретения

1. Ингибитор МЕК (киназа митоген-активируемой протеинкиназы) для применения в лечении или предупреждении хантавирусной инфекции у млекопитающего.

2. Ингибитор МЕК для применения по п. 1, где ингибитор МЕК 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 МЕК для применения по п. 2, где ингибитор МЕК представляет собой CI-1040 или PD-0184264.

4. Ингибитор МЕК для применения по любому из пп. 1-3, где млекопитающее представляет собой грызуна или человека.

5. Ингибитор МЕК для применения по п. 4, где млекопитающее представляет собой человека, и этот человек демонстрирует симптомы хантавирусной геморрагической лихорадки с почечным синдромом (HFRS) или хантавирусного легочного синдрома (HPS).

6. Ингибитор МЕК для применения по п. 5, где ингибитор МЕК вводят до 12 часов, до 24 часов, до 48 часов, до 72 часов или от 4 до 10 суток после обнаружения первых симптомов HFRS или HPS.

7. Ингибитор МЕК для применения по любому из пп. 1-6, где ингибитор МЕК вводят для предупреждения хантавирусной инфекции субъектам-людям, которые находились в контакте с грызунами или экскрементами грызунов либо находятся в области, для которой обычна вспышка хантавируса.

8. Ингибитор МЕК для применения по любому из пп. 4-7, где субъект-человек живет в области, для которой известно наличие хантавирусных инфекций, приводящих в результате к HFRS или HPS, или посещает ее.

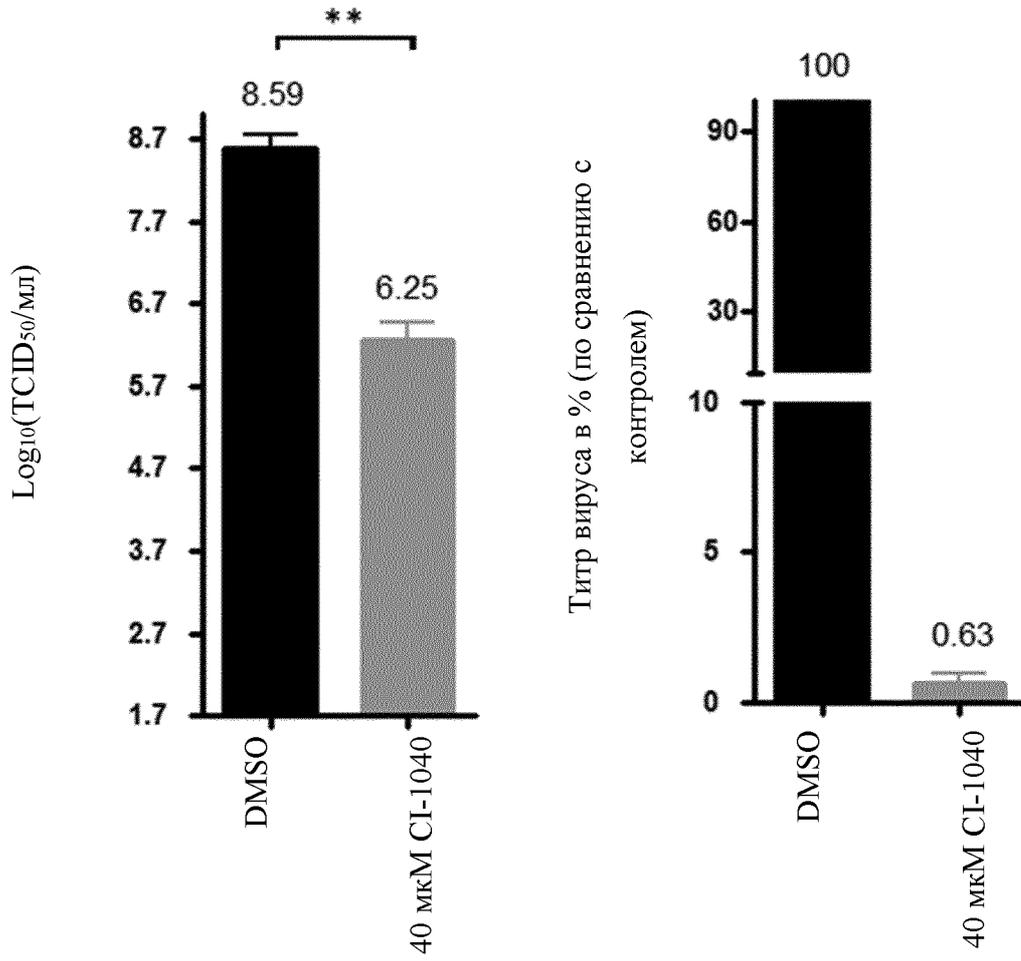
9. Ингибитор МЕК для применения по п. 8, где хантавирус представляет собой инфекцию вирусом Хантаан или Добрава или хантавирусную инфекцию, вызванную Американскими видами, такими как вирус канала Блэк-Крик (BCCV), Нью-Йоркский ортохантавирус (NYV), вирус Мононгахела (MGLV), *ортохантавирус Син Номбре* (SNV) или вирус Андес.

10. Ингибитор МЕК для применения по любому из пп. 1-9, где ингибитор МЕК вводят перорально или путем ингаляции.

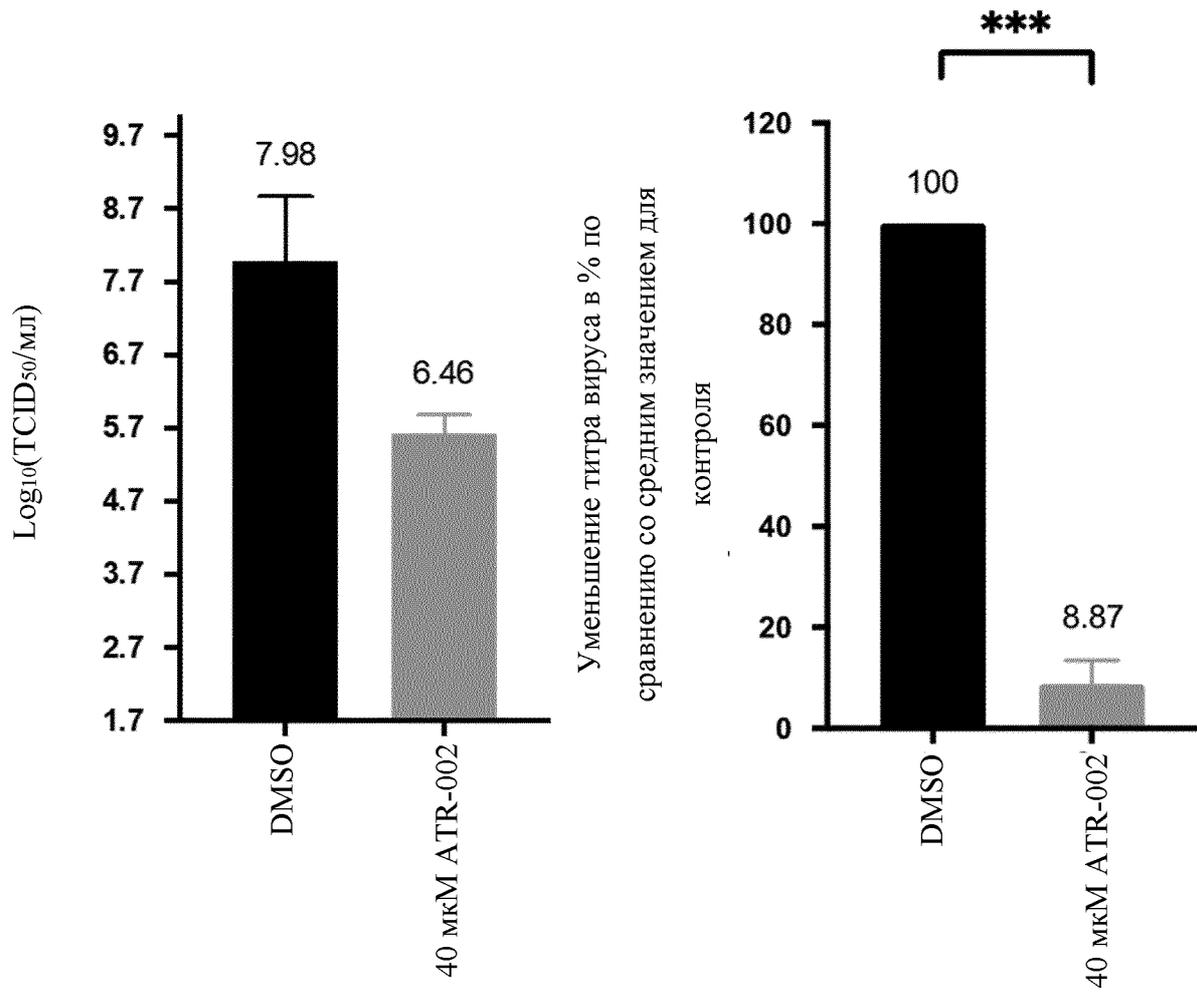
11. Ингибитор МЕК для применения по п. 4, где млекопитающее представляет собой грызуна, и ингибитор МЕК вводят в популяции грызунов для предупреждения инфицирования людей, находящихся в контакте с указанными грызунами.

12. Ингибитор МЕК для применения по п. 11, где ингибитор МЕК вводят путем ингаляции.

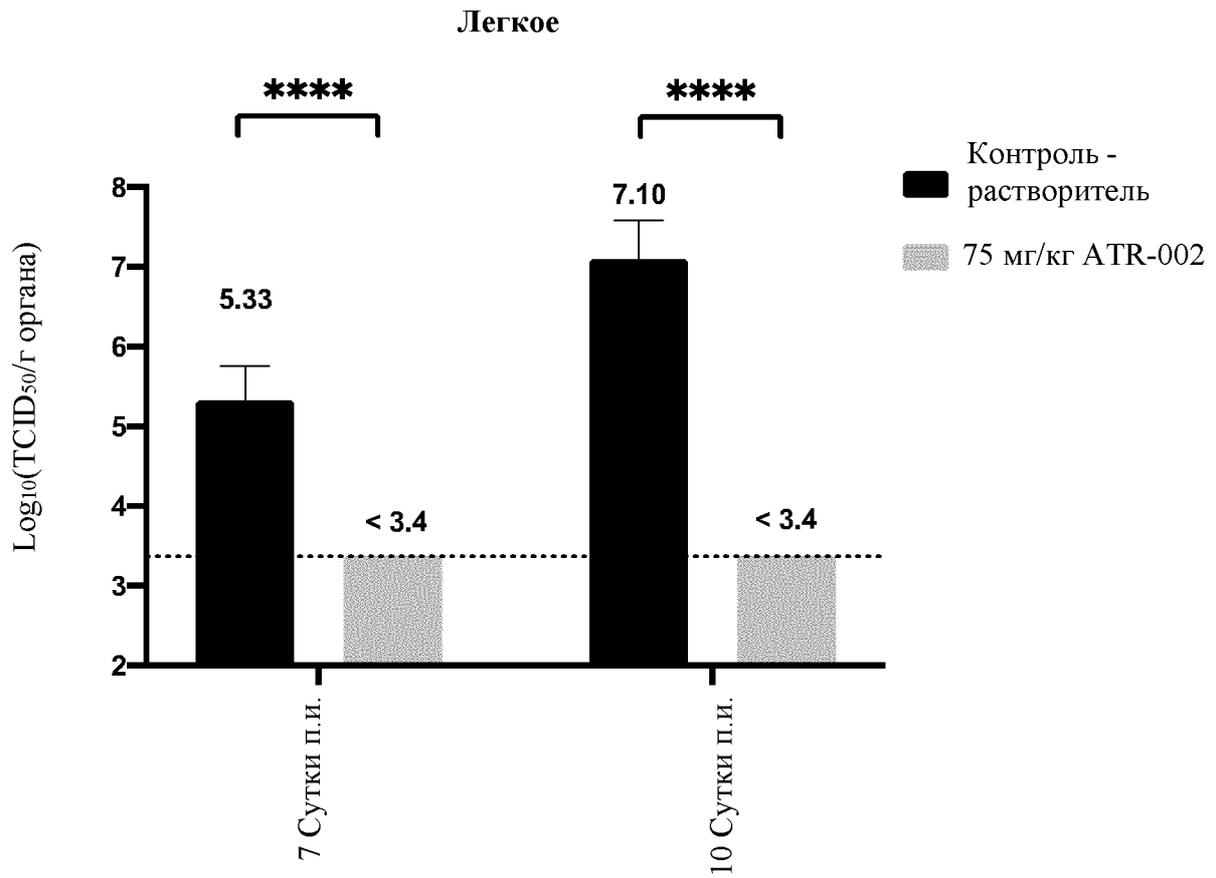
Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4

