

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **042391**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.02.09

(21) Номер заявки
202090693

(22) Дата подачи заявки
2018.10.17

(51) Int. Cl. **A61K 31/196** (2006.01)
A61P 31/00 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
A61P 31/16 (2006.01)
A61K 31/7012 (2006.01)

(54) НОВЫЙ ИНГИБИТОР MEK ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ВИРУСНЫХ И БАКТЕРИАЛЬНЫХ ИНФЕКЦИЙ

(31) LU100487

(32) 2017.10.17

(33) LU

(43) 2020.10.19

(86) PCT/EP2018/078335

(87) WO 2019/076947 2019.04.25

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**АТРИВА ТЕРАПЬЮТИКС ГМБХ
(DE)**

(72) Изобретатель:
Людвиг Штефан, Планц Оливер (DE)

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(56) WO-A1-2014056894
US-A1-2017080045

HAASBACH EMANUEL ET AL.: "The MEK-inhibitor CI-1040 displays a broad anti-influenza virus activity in vitro and provides a prolonged treatment window compared to standard of care in vivo", *ANTIVIRAL RESEARCH, ELSEVIER BV, NL*, vol. 142, 2 April 2017 (2017-04-02), pages 178-184, XP029985433, ISSN: 0166-3542, DOI: 10.1016/J.ANTIVIRAL.2017.03.024, page 183, left-hand column, lines 11-50

PLESCHKA S ET AL.: "INFLUENZA VIRUS PROPAGATION IS IMPAIRED BY INHIBITION OF

THE RAF/MEK/ERK SIGNALLING CASCADE", *NATURE CELL BIOLOGY, MACMILLAN MAGAZINES LTD, GB*, vol. 3, no. 3, 1 March 2001 (2001-03-01), pages 301-305, XP001172412, ISSN: 1465-7392, DOI: 10.1038/35060098, results, discussion

KAROLINE DROEBNER ET AL.: "Antiviral activity of the MEK-inhibitor U0126 against pandemic H1N1v and highly pathogenic avian influenza virus and", *ANTIVIRAL RESEARCH, ELSEVIER BV, NL*, vol. 92, no. 2, 3 August 2011 (2011-08-03), pages 195-203, XP028325598, ISSN: 0166-3542, DOI: 10.1016/J.ANTIVIRAL.2011.08.002 [retrieved on 2011-08-11] discussion

PAUL A. WABNITZ ET AL.: "In Vitro and in Vivo Metabolism of the Anti-Cancer Agent CI-1040, a MEK Inhibitor, in Rat, Monkey, and Human", *PHARMACEUTICAL RESEARCH*, vol. 21, no. 9, 1 September 2004 (2004-09-01), pages 1670-1679, XP55540385, US, ISSN: 0724-8741, DOI: 10.1023/B:PHAM.0000041464.27579.d0, cited in the application, discussion; table 3

PATRICIA M. LORUSSO ET AL.: "Phase I and Pharmacodynamic Study of the Oral MEK Inhibitor CI-1040 in Patients With Advanced Malignancies", *JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY*, vol. 23, no. 23, 10 August 2005 (2005-08-10), pages 5281-5293, XP055540372, US, ISSN: 0732-183X, DOI: 10.1200/JCO.2005.14.415, cited in the application, table 4

(57) Настоящее изобретение относится к PD-0184264 для применения в способе профилактики и/или лечения коинфекции, включающей бактериальную инфекцию и вирусную инфекцию гриппа или только вирусную или бактериальную инфекцию. Также предложены композиции, содержащие такие ингибиторы, для применения в профилактике и/или лечении коинфекции, включающей бактериальную инфекцию и вирусную инфекцию гриппа или только бактериальную или вирусную инфекцию.

B1

042391

042391

B1

Уровень техники

Вирусы гриппа А являются возбудителями тяжелых респираторных заболеваний, приводящих к значительной заболеваемости и смертности. Большинство смертельных случаев в ходе вирусной инфекции гриппа фактически являются результатом вторичной пневмонии, вызванной различными бактериями, такими как *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Streptococcus pneumoniae* и *Haemophilus influenzae* (Morens et al., 2008, Chertow et al., 2013). Наиболее значительными проблемами бактериальной коинфекции являются внезапно возросшая патогенность (Iwao et al., 2012, Paddock et al., 2012, Parker et al., 2012) и ограниченный арсенал мощных противоинфекционных средств против различных патогенов. Высокая вариабельность вирусов гриппа и постоянное появление новых штаммов (Neumann et al., 2009, Taubenberger et al., 2010, Parry, 2013), специфические характеристики бактериальных штаммов (Grundmann et al. 2006, Moran et al., 2006, Gillet et al., 2007, Shilo et al., 2011), а также быстрое развитие резистентности как вирусов гриппа (Hayden et al., 1992, Bright et al., 2006, Pinto et al., 2006, De Clercq et al., 2007, Pinto et al., 2007), так и бактерий (Grundmann et al., 2006, Moran et al., 2006, Shilo et al. 2011) в отношении доступных лекарственных средств/антибиотиков являются основными причинами недостаточности вариантов лечения.

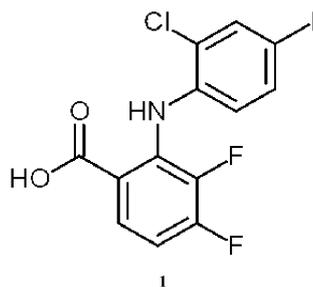
В WO 2001/076570 предложена концепция лечения или предупреждения инфекций, вызванных (-)РНК-вирусами, в частности вирусами гриппа, с помощью ингибиторов MEK. В WO 2014/056894 предложены конкретные ингибиторы MEK, такие как AZD-6244, AZD-8330, RDEA-119, GSK-1120212 (траметиниб), GDC-0973 (кобиметиниб), CI-1040, PD-0325901, RO-5126766, MSC1936369 (AS-703026) для применения в лечении или предупреждении вирусной инфекции гриппа. В WO 2015/173788 A1 раскрыты ингибиторы MEK для применения в способе лечения вируса гриппа и бактериальных коинфекции.

Однако, хотя некоторые потенциальные ингибиторы MEK уже известны и предназначены для применения в лечении или предупреждении вирусных инфекций, в частности вирусной инфекции гриппа, а также бактериальных коинфекции, сопровождающих вирусные инфекции, в частности инфекции гриппа, все еще существует необходимость в обеспечении дополнительных идеально улучшенных ингибиторов MEK для такого применения, а также, особенно, для лечения бактериальных инфекций. Следовательно, техническая проблема настоящей заявки состоит в том, чтобы удовлетворить указанную потребность.

Краткое описание изобретения

Решением технической задачи является предоставление PD-0184264, метаболита CI-1040, для применения в лечении или профилактике вирусных заболеваний, таких как вирусная инфекция гриппа, бактериальные инфекции или коинфекция, включающая бактериальную инфекцию и вирусное заболевание. Это решение также отражено в вариантах реализации, описанных ниже и в формуле изобретения, и проиллюстрировано в примерах и фигурах. Авторы настоящей заявки неожиданно обнаружили, что метаболит PD-0184264 ингибитора MEK CI-1040 имеет более высокую противовирусную и антибактериальную активность, чем сам CI-1040. Следовательно, применение PD-0184264 позволяет решить техническую задачу, лежащую в основе настоящей заявки, предоставляя более эффективный вариант лечения вирусных инфекций, в частности вирусных инфекций гриппа, а также вирусных, в частности вируса гриппа, бактериальных коинфекций и бактериальных инфекций.

Хотя ингибитор MEK CI-1040 уже эффективен в лечении или предупреждении вирусной инфекции гриппа и коинфекций, вызванной вирусом гриппа, или бактериальной коинфекции, авторы изобретения обнаружили, что метаболит (PD-0184264, формула 1) CI-1040 является более эффективным в борьбе с вирусом гриппа и/или бактериальными инфекциями или коинфекциями, включающими вирус гриппа и бактериальную инфекцию, чем сам CI-1040. PD-0184264 представляет собой один из нескольких метаболитов CI-1040 (Wabnitz et al., 2004, LoRusso et al., 2005), но было невозможно ни знать, ни предположить, что метаболит является более сильным, чем CI-1040. К большому удивлению авторов изобретения, они действительно обнаружили, что один метаболит (PD-0184264, структура 1 ниже) более эффективен и обладает более высоким терапевтическим потенциалом, чем CI-1040, как показано в примерах. Указанное свойство PD-0184264 нельзя было ожидать, так как PD-0184264 в действительности демонстрирует более слабое ингибирующее действие на киназы MEK *in vitro*, чем CI-1040 (см. пример 9). Кроме того, анализы *in vitro* продемонстрировали более слабый противовирусный эффект PD-0184264 по сравнению с CI-1040 (см. пример 10), тогда как анализы *in vivo* неожиданно продемонстрировали гораздо более сильный противовирусный эффект PD-0184264 по сравнению с CI-1040 (см. пример 11).



Соответственно, настоящее изобретение относится к PD-0184264 или его фармацевтически прием-

лемой соли для применения в способе профилактики и/или лечения бактериальной инфекции и/или вирусного заболевания. Предпочтительно вирус, вызывающий вирусное заболевание, представляет собой РНК-вирус с негативной цепью, предпочтительно вирус гриппа и более предпочтительно вирус гриппа А или гриппа В.

Настоящее изобретение также относится к PD-0184264 или его фармацевтически приемлемой соли для применения в способе профилактики и/или лечения бактериальной инфекции. Бактериальная инфекция, предпочтительно, опосредована бактерией, выбранной из группы, состоящей из Staphylococcaceae, Streptococcaceae, Legionellaceae, Pseudomonadaceae, Bacillaceae, Chlamydiaceae, Mycoplasmataceae, Enterobacteriaceae, Pseudomonadales и/или Pasteurellaceae.

Настоящее изобретение также относится к PD-0184264 или его фармацевтически приемлемой соли для применения в способе профилактики и/или лечения коинфекции, включающей бактериальную инфекцию и вирусное заболевание.

Предпочтительно PD-0184264 или его фармацевтически приемлемая соль предназначены для применения в способе профилактики и/или лечения коинфекции, включающей бактериальную инфекцию и вирусное заболевание, при этом бактериальная инфекция опосредована бактерией, выбранной из группы, состоящей из Staphylococcaceae, Streptococcaceae, Legionellaceae, Pseudomonadaceae, Bacillaceae, Chlamydiaceae, Mycoplasmataceae, Enterobacteriaceae, Pseudomonadales и/или Pasteurellaceae.

Предпочтительно PD-0184264 или его фармацевтически приемлемая соль предназначены для применения в способе профилактики и/или лечения коинфекции, включающей бактериальную инфекцию и вирусное заболевание, при этом вирус представляет собой РНК-вирус с негативной цепью, предпочтительно вирус гриппа, более предпочтительно вирус гриппа А или вирус гриппа В.

Предпочтительно PD-0184264 или его фармацевтически приемлемая соль предназначены для применения в способе профилактики и/или лечения вирусного заболевания, при этом PD-0184264 или его фармацевтически приемлемую соль вводят в комбинации с ингибитором нейраминидазы или его фармацевтически приемлемой солью.

Предпочтительно PD-0184264 или его фармацевтически приемлемая соль предназначены для применения в способе профилактики и/или лечения коинфекции, включающей бактериальную инфекцию и вирусное заболевание, при этом PD-0184264 или его фармацевтически приемлемую соль вводят в комбинации с ингибитором нейраминидазы или его фармацевтически приемлемой солью.

В альтернативном варианте реализации PD-0184264 или его фармацевтически приемлемая соль предназначены для применения в способе профилактики и/или лечения вирусного заболевания или в способе профилактики и/или лечения коинфекции, включающей бактериальную инфекцию и вирусное заболевание, при этом ингибитор нейраминидазы выбран из осельтамивира, фосфата осельтамивира, занамивира, ланинамивира или перамивира или их фармацевтически приемлемой соли.

Также в настоящем изобретении предложена фармацевтическая композиция, содержащая PD-0184264 или его фармацевтически приемлемую соль и ингибитор нейраминидазы или его фармацевтически приемлемую соль.

Предпочтительно PD-0184264 предназначен для применения в способе профилактики и/или лечения вирусного заболевания и/или в способе профилактики и/или лечения бактериальных заболеваний, и/или в способе профилактики и/или лечения коинфекции, включающей бактериальную инфекцию и вирусное заболевание, при этом PD-0184264 комбинируют с одним или несколькими ингибиторами МЕК.

Предпочтительно PD-0184264 или его фармацевтически приемлемая соль предназначены для применения в профилактике и/или лечении бактериальной инфекции, вирусной инфекции или коинфекции у субъекта, предпочтительно позвоночного, более предпочтительно птицы или млекопитающего, наиболее предпочтительно человека.

Настоящее изобретение также относится к способу лечения бактериальной инфекции у субъекта, включающему введение терапевтически эффективного количества PD-0184264 или его фармацевтически приемлемой соли нуждающемуся в этом субъекту.

Кроме того, настоящее изобретение относится к способу лечения вирусного заболевания у субъекта, включающему введение терапевтически эффективного количества PD-0184264 или его фармацевтически приемлемой соли нуждающемуся в этом субъекту.

В дополнительном варианте реализации настоящее изобретение относится к способу лечения коинфекции, включающей бактериальную инфекцию и вирусное заболевание у субъекта, причем способ включает введение терапевтически эффективного количества PD-0184264 или его фармацевтически приемлемой соли нуждающемуся в этом субъекту.

Предпочтительно, вирус представляет собой РНК-вирус с негативной цепью, более предпочтительно, вирус представляет собой вирус гриппа и, наиболее предпочтительно, вирус гриппа представляет собой вирус гриппа А или вирус гриппа В.

Предпочтительно бактериальная инфекция опосредована бактерией, выбранной из группы, состоящей из Staphylococcaceae, Streptococcaceae, Legionellaceae, Pseudomonadaceae, Bacillaceae, Chlamydiaceae, Mycoplasmataceae, Enterobacteriaceae, Pseudomonadales и Pasteurellaceae.

Краткое описание чертежей

На фигурах продемонстрировано следующее.

Фиг. 1. Лечение мышей, инфицированных вирусом гриппа А, с помощью PD-0184264 или CI-1040.

Результаты эксперимента из примера 1 представлены в виде титра вируса (\log_{10} БОЕ/мл (слева) или % титра вируса (справа).

Фиг. 2. График, демонстрирующий влияние PD-0184264 и CI-1040 на бактериальный рост MRSA.

В разные моменты времени, как указано на горизонтальной оси графика, оптические плотности бесклеточных бактериальных культур измеряли как показатель роста бактерий, показанный на вертикальной оси графика в % (OD600). Данные представляют собой среднее значение трех биологических повторностей, описанных в примере 2.

Фиг. 3. Ингибирование бактериального роста MRSA с различными концентрациями PD-0184264.

PD-0184264 вводили в различных концентрациях (как указано) в ночную культуру *S. aureus* USA300 (MRSA). Через 6 ч измеряли оптическую плотность. Данные, показанные на фигуре, представляют собой один эксперимент из трех биологических повторностей, описанных в примере 2.

Фиг. 4. Влияние CI-1040 и PD-0184264 на рост бактерий.

(А) Влияние CI-1040 на рост бактерий при различных концентрациях. (В, С) Влияние PD-0184264 на штамм 6850 (В) *S. aureus* или штамм USA300 (С) при различных концентрациях PD-184264.

Фиг. 5. Введение PD-0184264 в единично-инфицированные или коинфицированные клетки защищает клетки.

Эпителиальные клетки легкого человека (A549) предварительно обрабатывали PD-0184264 (в указанных концентрациях) или растворителем (диметилсульфоксид (ДМСО)) и инфицировали штаммом вируса гриппа человека А/Puerto Rico/8/34 (H1N1). Учитывая противовирусный и сильный антибактериальный эффект PD-0184264 (фиг. 2-4), проанализировали, может ли указанный признак соединения также наблюдаться макроскопически в отношении разрушающих клетки цитопатических эффектов (CPE), вызываемых IAV (вирусом гриппа А) и/или инфекции *S. aureus*. Небольшое разрушение клеточного монослоя наблюдали после единичного инфицирования IAV (H1N1) (средняя панель) или штаммом *S. aureus* 6850 (верхняя панель). Указанный CPE был сильно увеличен при коинфекции обоими патогенами (нижняя панель), но был ингибирован в присутствии возрастающих концентраций PD-0184264.

Фиг. 6. Сравнение антибактериального действия PD-0184264 с общеизвестными антибиотиками.

Чтобы сопоставить антибактериальные свойства МЕК-ингибитора PD0184164 с действием общеизвестного антибиотика, бактерии обрабатывали в течение ночи растворителем, МЕК-ингибиторами U0126 и PD-0184264 или различными концентрациями антибиотика гентамицина. По сравнению с бактериями, обработанными растворителем, инкубация с МЕК-ингибитором первого поколения U0126 привела лишь к незначительному снижению титров бактерий, тогда как обработка PD-0184264 привела к очень сильному снижению бактериальной нагрузки. Это происходило с обоими бактериальными штаммами.

Фиг. 7. (А) Результаты анализов времени добавления, сравнения антибактериального действия PD-0184264 с другими МЕК-ингибирующими соединениями или антибиотиком гентамицином.

(В) Результаты теста на устойчивость к ингибитору МЕК PD0184264 в *S. aureus* по сравнению с обработкой гентамицином, эритромицином или без обработки.

Фиг. 8. Структура домена бактериальной киназы PknB (вверху) (Rakette et al. 2012) и гомологии последовательностей сайта аутофосфорилирования PknB с сайтами активации MAP-киназ млекопитающих p38, JNK и прямой МЕК-мишенью ERK (Miller et al. 2010).

Фиг. 9. Определение влияния лечения ингибитором на минимальную ингибирующую концентрацию (MIC) различных антибиотиков.

Фиг. 10. Стрессоустойчивость штамма *S. aureus* 6850 и штамма MRSA USA300 при обработке PD-0184264.

Фиг. 11. Лечение PD-0184264 ухудшает рост различных серотипов *Streptococcus pneumoniae*.

(А) Влияние PD-0184264 на культуры штаммов *Streptococcus pneumoniae* TIGR4 (серотип 4) и D39 wt (серотип 2), как измерено OD600; (В) Влияние PD-0184264 на культуры штаммов *Streptococcus pneumoniae* TIGR4 (серотип 4) и D39 wt (серотип 2) показано в КОЕ/мл; (С) влияние PD-0184264 на культуры *Bacillus subtilis* показано в КОЕ/мл.

Фиг. 12. Табл. 1: антибиотики.

Фиг. 13. Изображения, демонстрирующие, что обработка клеток PD-0184264 сильно снижает вызванный патогеном CPE (цитопатический эффект) при единичной бактериальной (*S. aureus*) или вирусной (грипп IV) инфекции и коинфекции.

Фиг. 14. График, демонстрирующий изменения внутриклеточной бактериальной нагрузки при обработке CI-1040 (а) или PD-0184264 (б).

Получали сопоставимые результаты, когда CI-1040 или PD-0184264 вводили в более поздние периоды времени во время продолжающейся инфекции (с).

Фиг. 15. График, демонстрирующий жизнеспособность клеток (а, б) и разрыв мембраны (с, д).

(а, б) демонстрируют жизнеспособность клеток 5A549 в присутствии возрастающих концентраций PD-0184264. В (с) и (д) проводили LDH-анализ для определения разрыва мембраны вследствие обработ-

ки ингибитором.

Фиг. 16. Анализ бесклеточной киназы, демонстрирующий ингибирующее действие CI-1040 и PD-0184264 на путь MEK.

Активность киназ измеряют путем определения количества фосфорилированного белка-мишени ERK с помощью анализа ELISA. Три независимых экспериментальных серии выполняли с аналогичными результатами. Один типичный эксперимент представлен в настоящей заявке.

Фиг. 17. Противовирусная активность PD-0184264 против вируса гриппа H1N1pdm09 в анализе *in vitro*.

(А) Клетки A549 инфицировали вирусом (MOI=0,001) для определения снижения титра вируса. (В) Клетки A549 инфицировали вирусом RВ1 (MOI=0,001) и обрабатывали различными концентрациями PD-0184264 (100 мкМ, 50 мкМ, 10 мкМ, 5 мкМ, 1 мкМ, 0,5 мкМ и 0,1 мкМ) для определения значения EC₅₀. (С) Клетки A549 обрабатывали различными концентрациями PD-0184264 (100 мкМ, 50 мкМ, 10 мкМ, 5 мкМ, 1 мкМ, 0,5 мкМ и 0,1 мкМ) в течение 24 ч с последующим четырехчасовым окрашиванием WST для определения значения CC₅₀.

Фиг. 18. *In vivo* снижение титра вируса в легких мышей с помощью PD-0184264.

После инфицирования вирусом H1N1pdm09 самок мышей C57BL/6 лечили пероральным путем 2,8, 8,4 или 25 мг/кг PD-0184264 (левая панель) или 25, 75 или 150 мг/кг CI-1400 (правая панель). Через 24 ч после заражения животных умерщвляли и определяли титр вируса стандартным способом.

Фиг. 19. PD-0184264 обладает лучшей биодоступностью, чем CI-1040.

(А) Самцов мышей NMRI лечили с помощью либо 75 мг/кг CI-1040 (темно-серая область), либо 75 мг/кг PD-0184264 внутривенным путем. Кровь собирали через 15 мин, 30 мин, 1 ч, 2 ч, 4 ч, 6 ч, 8 ч и 24 ч (день испытания 2) после введения, и плазму анализировали на наличие лекарственного средства. (В) Самцов мышей NMRI лечили с помощью либо 150 мг/кг CI-1040 (темно-серая область), либо 150 мг/кг PD-0184264 перорально (*per os*), используя желудочный зонд. Кровь собирали через 15 мин, 30 мин, 1 ч, 2 ч, 4 ч, 6 ч, 8 ч и 24 ч (день испытания 2) после введения, и плазму анализировали на наличие лекарственного средства.

Подробное описание изобретения

Следующее описание включает информацию, которая может быть полезна для понимания настоящего изобретения. Любая информация, представленная в настоящей заявке, не является предшествующим уровнем техники или не является релевантной к настоящим изобретениям, или любая публикация, на которую ссылаются прямо или косвенно, не является предшествующим уровнем техники.

Как указано выше, настоящее изобретение относится к PD-0184264 для применения в способе профилактики и/или лечения вирусного заболевания, бактериальной инфекции или коинфекции, включающей бактериальную инфекцию и вирусную инфекцию. Как показано в примерах, PD-0184264, по видимому, действует на бактериальную киназу PknB и, таким образом, по меньшей мере частично может оказывать бактериостатическое действие.

Кроме того, как показано в прилагаемых примерах, PD-0184264 эффективен в сценариях вирусной и бактериальной инфекции, а также в сценариях бактериальной и вирусной коинфекции. Этот эффект на удивление сильнее, чем у CI-1040, ингибитора MEK, уже известного в уровне техники для лечения бактериальных и вирусных инфекций. При сравнении ингибирующего действия CI-1040 и PD-0184264 на киназу MEK, как показано в примере 9, можно было бы ожидать обратного, так как ингибиторы MEK использовались в предшествующем уровне техники для достижения указанных эффектов.

То же самое верно при сравнении противовирусного эффекта PD-0184264 и CI-1040 в анализах *in vitro*. В настоящей заявке CI-1040 более эффективен, чем PD-0184264, как видно из примера 10. В частности, в анализе *in vitro* необходима в 10 раз более высокая концентрация PD-0184264 для достижения такого же ингибирующего эффекта. Неожиданно было обнаружено, что, несмотря на слабое ингибирование *in vitro*, PD-0184264 превосходит CI-1040 *in vivo*, как видно из примера 11. Как показано на фиг. 18, уже 2,8 мг/кг PD-0184264 демонстрируют снижение титра вируса, тогда как 25 мг/кг PD-0184264 показывают снижение титра вируса в легком по меньшей мере на 90%. Напротив, CI-1040 демонстрирует аналогичное снижение только при 150 мкМ. Кроме того, в примере 1 продемонстрировано снижение титра вируса в легких с помощью PD-0184264. В примере 1 мышей подвергали заражению вирусом гриппа и лечили 150 мг/кг, 75 мг/кг или 25 мг/кг CI-1040 или PD-0184264 соответственно. Как показано на фиг. 1, уже 25 мг/кг PD-0184264 имеют тот же эффект, что и 150 мг/кг CI-1040. Таким образом, к большому удивлению авторов изобретения, PD-0184264 демонстрирует сильный противовирусный эффект *in vivo*, хотя предыдущие данные *in vitro* не давали никакого стимула для продолжения работы с PD-0184264. Этот неожиданный эффект может быть основан на более высокой биодоступности PD-0184264 по сравнению с CI-1040, который показан в примере 12.

Примеры 2, 4 и 6-8 дополнительно демонстрируют сильный антибактериальный эффект PD-0184264, также по сравнению с CI-1040 и другими ингибиторами MEK. В примере 2 анализируют влияние PD-0184264 на рост бактерий. На фиг. 2 показано, что PD-0184264 ингибирует рост бактерий, тогда как CI-1040 не влияет на рост бактерий. На фиг. 3 показано, что бактериальный рост ингибируется PD-0184264 зависимым от концентрации образом, демонстрируя почти полное ингибирование роста, начиная с 50 мкМ PD-0184264. Аналогично, также на фиг. 4 показано, что бактериальный рост ингибируется

PD-0184264 зависимым от концентрации образом - уже 10 мкМ PD-0184264 демонстрирует значительное снижение роста - тогда как CI-1040 не влияет на бактериальный рост. в примере 4 антибактериальный эффект PD-0184264 сравнивают с ингибитором MEK U0126 или антибиотиком гентамицином. На фиг. 6 показано, что PD-184264 обладает антибиотическим действием, сходным с гентамицином, тогда как ингибитор MEK U0126, известный из уровня техники, не влияет на рост бактерий. То же самое верно и для фиг. 7 А, на которой отслеживается ход роста бактерий. На фиг. 7В дополнительно показано, что PD-0184264 не вызывает резистентности к PD-0184264, тогда как бактерии легко развивают резистентность к гентамицину и эритромицину. Таким образом, PD-0184264 не вызывает резистентность у бактерий. в примере 6 анализировали влияние PD-0184264 на чувствительность бактерий к антибиотику. Как показано на фиг. 9 и в табл.2, лечение PD-0184264 действительно привело к увеличению восприимчивости бактерий к различным антибиотикам, что было наиболее заметно в случае пенициллина и гентамицина. Кроме того, на фиг. 10 показано, что PD-0184264 снижает устойчивость бактерий к стрессу. в примере 7 приведены доказательства того, что действие PD-0184264 не ограничено *S. aureus*, но также оказывает влияние на другие бактерии, такие как *Streptococcus pneumoniae* (см. фиг. 11 А и В) и *Bacillus subtilis* (см. фиг. 11С).

Примеры 3 и 8 подчеркивают эффективность PD-0184264 в контексте бактериальной и вирусной коинфекции. в примере 3 анализировали, может ли эффективность PD-0184264 также наблюдаться макроскопически в отношении разрушающих клетки цитопатических эффектов (CPE), вызываемых вирусной и/или бактериальной инфекцией. На фиг. 5 показано, что PD-0184264 уменьшает цитопатический эффект, вызываемый, в частности, бактериальной и вирусной коинфекцией, зависимым от концентрации образом, демонстрируя эффект уже при 15 мкМ PD-0184264. То же самое было также анализировано в примере 8, который снова демонстрирует на фиг. 13 положительный эффект PD-0184264 в сценарии бактериальной и вирусной коинфекции. в примере 8 дополнительно анализировали влияние PD-0184264 на внутриклеточный титр бактерий в сценарии коинфекции. На фиг. 14 показано, что PD-0184264 снижает внутриклеточный титр бактерий, тогда как CI-1040 не оказывает влияния. Кроме того, пример 8 и фиг. 15 демонстрируют, что PD-0184264 не оказывает цитотоксического эффекта.

PD-0184264 может быть использован в способе лечения и/или профилактики заболеваний, описанном в настоящей заявке. Таким образом, термин "осуществление лечения" или "лечение" включает введение PD-0184264, предпочтительно в форме лекарственного средства, субъекту, страдающему от коинфекции, включающей бактериальную инфекцию и вирусное заболевание, с целью ослабления или улучшения симптомов, сопровождающих такие инфекции. Аналогично, включает введение PD-0184264, предпочтительно в форме лекарственного средства, субъекту, страдающему бактериальной инфекцией, или с целью ослабления или улучшения симптомов, сопровождающих такие инфекции. Дополнительно включает введение PD-0184264, предпочтительно в форме лекарственного средства, субъекту, страдающему вирусной инфекцией или с целью ослабления или улучшения симптомов, сопровождающих такие инфекции. Коинфекция, включающая бактериальную инфекцию и вирусное заболевание, при этом вирусное заболевание и бактериальная инфекция представляют собой медицинское состояние, которое лечат или предупреждают с помощью PD-0184264 или его фармацевтически приемлемой соли.

Кроме того, в настоящей заявке термин "профилактика" относится к любой медицинской процедуре или процедуре общественного здравоохранения, целью которой является предупреждение медицинского состояния, описанного в настоящей заявке. В настоящей заявке термины "предупреждать", "предупреждение" и "осуществление предупреждения" относятся к снижению риска приобретения или развития данного состояния, а именно коинфекции, включающей вирусную инфекцию и бактериальную инфекцию, только бактериальную инфекцию или только вирусную инфекцию, как описано в настоящей заявке. Термин "профилактика" также означает уменьшение или ингибирование рецидива коинфекции, включающей вирусную инфекцию гриппа и бактериальную инфекцию, только бактериальную инфекцию или только вирусную инфекцию у субъекта.

PD-0184264 по настоящему изобретению эффективен в лечении коинфекции, как показано в примерах 3 и 8. В настоящей заявке термин "коинфекция" включает вирусное заболевание, предпочтительно вирусную инфекцию гриппа, и бактериальную инфекцию. Такая коинфекция может иметь место при одновременной инфекции хозяина, например субъекта и/или отдельной клетки, бактерией и вирусом гриппа. Также может быть, что хозяин, например, субъект и/или клетка одновременно инфицируется одной или несколькими вирусными частицами и одной или несколькими бактериями. Однако такая коинфекция также может происходить последовательно. В таком случае субъект и/или клетка сначала инфицируется одной или несколькими вирусными частицами, а позже тот же субъект и/или клетка инфицируется одной или несколькими бактериями или наоборот. Период времени между двумя инфекциями может представлять собой период времени, составляющий самое большее 14 дней, 13 дней, 12 дней, 11 дней, 10 дней, 9 дней, 8 дней, 7 дней, 6 дней, 5 дней, 4 дня, 3 дня, 2 дня, 1 день, 12 ч, 6 ч, 3 ч, 1,5 ч или минимум 30 мин.

Такая ситуация также может представлять собой суперинфекцию, при которой вторая инфекция накладывается на более раннюю инфекцию, в частности другим микробным агентом экзогенного или эндогенного происхождения, который устойчив к лечению, используемому против первой инфекции.

В составе коинфекции вирусная инфекция гриппа может быть опосредована вирусом гриппа А или

вирусом гриппа В, предпочтительно вирус гриппа А представляет собой H1N1, H2N2, H3N2, H5N6, H5N8, H6N1, H7N2, H7N7, H7N9, H9N2, H10N7, N10N8 или H5N1. В одном варианте реализации вирус гриппа А представляет собой H1N1. В других вариантах реализации вирус гриппа А представляет собой H3N2, H5N1 и H7N9. В дополнительных вариантах реализации вирус гриппа А представляет собой H3N2, H5N1, H1N1, H5N6, H7N2 и H7N9.

Настоящее изобретение также относится к "бактериальной инфекции", которая может иметь место в условиях коинфекции, описанной выше, или может возникать как единственная инфекция, присутствующая у хозяина, например, субъекта и/или клетки. Бактериальная инфекция может быть опосредована любой бактерией; предпочтительно опосредована бактерией, выбранной из группы, состоящей из Staphylococcaceae, Streptococcaceae, Legionellaceae, Pseudomonadaceae, Bacillaceae, Chlamydiaceae, Mycoplasmataceae, Enterobacteriaceae, Pseudomonadales и/или Pasteurellaceae.

Бактериальная инфекция может быть опосредована бактерией, выбранной из группы, состоящей из Staphylococcus, предпочтительно Staphylococcus aureus, метициллин-чувствительного и метициллин-резистентного Staphylococcus aureus, лейкоцидин Пантона-Валентайна (PVL) -экспрессирующего Staphylococcus aureus и/или Streptococcaceae, предпочтительно Streptococcus mitis, Streptococcus pyogenes или Streptococcus pneumoniae, Legionella, предпочтительно Legionella pneumophila, Pseudomonas, предпочтительно Pseudomonas aeruginosa, Bacillus, предпочтительно Bacillus subtilis, Chlamydomphila, предпочтительно Chlamydomphila pneumoniae, Mycoplasma, предпочтительно Mycoplasma pneumoniae, Klebsiella, предпочтительно Klebsiella pneumoniae, Moraxella, предпочтительно Moraxella catarrhalis и/или Haemophilus, предпочтительно Haemophilus influenzae. Предпочтительно бактерия выбрана из группы, состоящей из Staphylococcus aureus, Streptococcus pneumoniae или Haemophilus influenzae. Наиболее предпочтительно бактерия представляет собой Staphylococcus aureus.

"Вирусное заболевание" или "вирусная инфекция", к которым также относится настоящее изобретение, может иметь место в условиях описанной выше коинфекции или может возникать как единственная инфекция, присутствующая у хозяина, например, субъекта и/или клетки. Вирусное заболевание или вирусная инфекция могут быть опосредованы любым вирусом; предпочтительно они опосредованы вирусом гриппа. Более предпочтительно, вирусная инфекция гриппа опосредована вирусом гриппа А или вируса гриппа В, при этом вирусы гриппа А являются предпочтительными. Особенно предпочтительными являются подтипы вируса гриппа А H1N1, H2N2, H3N2, H5N6, H5N8, H6N1, H7N2, H7N7, H7N9, H9N2, H10N7, N10N8 и/или H5N1.

В альтернативном варианте реализации PD-0184264 вводят в комбинации с одним или более ингибиторами MEK. Ингибиторы MEK включают, например, U0126, PLX-4032, AZD6244, AZD8330, AS-703026, GSK-1120212, RDEA-119, RO-5126766, RO-4987655, CI-1040, PD-0325901, GDC-0973, TAK-733, PD98059, ARRY-438162, ARRY-162, ARRY-300, PF-3644022 и PD184352. Дополнительный ингибитор MEK может быть введен одновременно, до или после PD-0184264.

Предпочтительно, PD-0184264 предназначен для применения в способах профилактики и/или лечения коинфекции по настоящему изобретению, при этом PD-0184264 комбинируют с одним или более ингибиторами, нацеленными на вирус гриппа или бактерию. PD-0184264 может быть введен одновременно, до или после одного или более ингибиторов, нацеленных на вирус гриппа.

Как правило, ингибитор, нацеленный на вирус гриппа, представляет собой любой ингибитор или лекарственное средство, эффективное в терапии гриппа. Известно, что различные вещества эффективны в снижении вирусной инфекции гриппа. Среди них, например, ингибиторы вирусной нейраминидазы, соединения, нацеленные на белок ионного канала вируса (M2), и соединения, нацеленные на вирусную полимеразную или эндонуклеазную активность посредством вмешательства в компонент комплекса вирусной полимеразы: PB1, PB2, PA или NP. В соответствии с изобретением предусмотрены также фармацевтически приемлемые соли ингибиторов. Однако в настоящей заявке предпочтительный ингибитор представляет собой ингибитор MEK, особенно предпочтительный PD-0184264.

"Ингибиторы MEK" ингибируют митогенный сигнальный каскад Raf/MEK/ERK в клетках или у субъекта путем ингибирования ME (киназа митоген-активируемой протеинкиназы). Этот сигнальный каскад захватывается многими вирусами, в частности вирусами гриппа, для усиления репликации вируса. Поэтому специфическая блокада пути Raf/MEK/ERK на узком участке MEK препятствует росту вирусов, в частности вирусов гриппа. Кроме того, ингибиторы MEK проявляют низкую токсичность и незначительные побочные эффекты у людей. Также не существует тенденции возникновения вирусной резистентности (Ludwig, 2009). Особенно предпочтительным ингибитором является PD-0184264.

"Ингибитор нейраминидазы" представляет собой противовирусное лекарственное средство, нацеленное на вирус гриппа, которое работает, блокируя функцию вирусного белка нейраминидазы, таким образом предотвращая высвобождение вируса из инфицированных клеток-хозяев, так как вновь продуцируемые вирусы не могут выделяться из клетки в которой они реплицированы. Также включены фармацевтически приемлемые соли ингибитора нейраминидазы. Предпочтительные ингибиторы нейраминидазы представляют собой осельтамивир, занамивир, перамивир или фармацевтически приемлемая соль любого из этих веществ, такие как фосфат осельтамивира, карбоксилат осельтамивира и т.д. Наиболее предпочтительные ингибиторы нейраминидазы представляют собой фосфат осельтами-

вира, занамивир, осельтамивир или перамивир.

Соединения, нацеленные на белок ионного канала вируса (M2), представляют собой, например, амантадин и/или римантадин, в то время как соединения, нацеленные на активность полимеразы или эндонуклазы посредством воздействия на компонент комплекса вирусной полимеразы, PB1, PB2, PA или NP, представляют собой, например, NP-блокатор нуклеозина или ингибитор полимеразы T-705 (фавипиравир).

Кроме того, PD-0184264 можно комбинировать с одним или более ингибиторами, нацеленными на бактерию. Пример 6 показывает, что PD-0184264 повышает чувствительность бактерий к антибиотикам. Ингибитором, нацеленным на бактерию, может быть любой ингибитор, эффективный в снижении бактериальной инфекции. В настоящем изобретении PD-0184264 является строго предпочтительным в качестве ингибитора, нацеленного на бактерию, но другим ингибитором, нацеленным на бактерию, известным специалисту в области техники, является антибиотик. Предпочтительные антибиотики могут быть выбраны из табл.1 (фиг. 12). Таким образом, в одном варианте реализации антибиотик выбран из группы, состоящей из антибиотиков, перечисленных в табл.1 (фиг. 12). В другом варианте реализации антибиотик выбран из группы, состоящей из класса антибиотиков, перечисленных в табл.1 (фиг. 12). В другом варианте реализации антибиотик выбран из группы, состоящей из родового названия антибиотиков, перечисленных в табл.1 (фиг. 12). Более предпочтительными являются антибиотики, выбранные из гентамицина, рифампицина, лизостафина, эритромицина, левофлоксацина, ванкомицина, тейкопланина, пенициллина и оксациллина.

"Субъект", которого могут лечить ингибиторами, в частности ингибиторами МЕК или комбинацией ингибиторов по настоящему изобретению, предпочтительно представляет собой позвоночное животное. В контексте настоящего изобретения термин "субъект" включает индивидуума, нуждающегося в лечении коинфекции, как описано в настоящей заявке, или только бактериальной или вирусной инфекции. Предпочтительно, субъект представляет собой пациента, страдающего от коинфекции или только бактериальной или вирусной инфекции, или находится в риске ее возникновения. Предпочтительно пациент представляет собой позвоночное, более предпочтительно млекопитающее. Млекопитающие включают сельскохозяйственных животных, спортивных животных, домашних животных, приматов, мышей и крыс, но не ограничиваются указанными. Предпочтительно млекопитающее представляет собой человека, лошадь, собаку, кошку, корову, свинью, мышшь, крысу и т.д., особенно предпочтительно представляет собой человека. В некоторых вариантах реализации субъект представляет собой человека, которому необязательно более 1 года и менее 14 лет, в возрасте от 50 до 65, в возрасте от 18 или 50 или старше 65 лет. В других вариантах реализации субъект представляет собой субъекта-человека, который выбран из группы, состоящей из субъектов, которым по меньшей мере 50 лет, субъектов, которые проживают в учреждениях постоянной помощи, субъектов, имеющих хронические нарушения легочной или сердечно-сосудистой системы, субъектов, которым требуется регулярное медицинское наблюдение или госпитализация в течение предыдущего года из-за хронических заболеваний обмена веществ, почечной дисфункции, гемоглобинопатии или иммуносупрессии, субъектов в возрасте до 14 лет, субъектов в возрасте от 6 месяцев до 18 лет, которые получают долгосрочную аспиринную терапию, и женщины, которые будут во втором или третьем триместре беременности во время сезона гриппа.

В способе согласно изобретению PD-0184264 может быть введен перорально, внутривенно, интравенно, интравенно, внутримышечно, местно или путем ингаляции. Предпочтительно PD-0184264 вводят путем ингаляции, местно или перорально.

Настоящее изобретение также предусматривает различные композиции, предпочтительно фармацевтические композиции. Настоящее изобретение относится к композиции, содержащей PD-0184264 для применения в способе профилактики и/или лечения коинфекции, включающей бактериальную инфекцию и вирусное заболевание. Настоящее изобретение также относится к композиции, содержащей PD-0184264 для применения в способе профилактики и/или лечения бактериальной инфекции и/или вирусного заболевания. В настоящем изобретении также предложена композиция, содержащая PD-0184264 и один или более ингибиторов, нацеленных на вирус, в частности вирус гриппа и/или бактерию, для применения в способе профилактики и/или лечения коинфекции, включающей бактериальную инфекцию и вирусную инфекцию, в частности вирусную инфекцию гриппа. Кроме того, настоящее изобретение относится к композиции, содержащей PD-0184264 и один или более ингибиторов, нацеленных на бактерию, для применения в способе профилактики и/или лечения бактериальной инфекции или вирусной инфекции.

Как упомянуто выше, композиция, содержащая PD-0184264 и, в конечном итоге, один или более ингибиторов, нацеленных на бактерию, и/или один или несколько ингибиторов, нацеленных на вирус, в частности вирус гриппа, может представлять собой фармацевтическую композицию. Предпочтительный вариант реализации фармацевтической композиции содержит PD-0184264 и ингибитор, нацеленный на вирус гриппа, в частности ингибитор нейраминидазы. В другом варианте реализации фармацевтическая композиция содержит PD-0184264 и дополнительный ингибитор МЕК. Предпочтительно такие композиции дополнительно содержат носитель, предпочтительно фармацевтически приемлемый носитель. Композиция может быть в форме перорально вводимых суспензий или таблеток, назальных спреев, препара-

тов для ингаляционных устройств, стерильных инъекционных препаратов (внутривенно, внутривенно, внутримышечно), например, в виде стерильных инъеклируемых водных или масляных суспензий или суппозиторий.

Фармацевтическую композицию для применения по изобретению, содержащую PD-0184264 и, необязательно, один или более ингибиторов, нацеленных на вирус гриппа, и/или один или более ингибиторов, нацеленных на бактерию, вводят пациенту, который представляет собой млекопитающего или птицу. Примеры подходящих млекопитающих включают мышь, крысу, корову, козу, овцу, свинью, собаку, кошку, лошадь, морскую свинку, собаку, хомяка, норку, тюленя, кита, верблюда, шимпанзе, макаку-резус и человека, предпочтительно человека, но не ограничиваются указанными. Примеры подходящих птиц включают индейку, курицу, гуся, утку, чирка, крякву, скворца, северную шилохвость, чайку, лебедя, цесарку или некоторых водоплавающих птиц, но не ограничиваются указанными. Пациенты, представляющие собой человека, являются конкретным вариантом реализации настоящего изобретения.

Ингибитор или ингибиторы предпочтительно вводят в терапевтически эффективном количестве. "Терапевтически эффективное количество" для PD-0184264 или каждого активного соединения/ингибитора может варьироваться в зависимости от факторов, включающими активностью используемого соединения, стабильность активного соединения в организме пациента, тяжесть состояний, которые необходимо облегчить, общая масса пациента, которого лечат, путь введения, легкость абсорбции, распределения и выведения соединения организмом, возраст и чувствительность пациента, которого нужно лечить, побочные эффекты и тому подобное, что будет очевидным для специалиста в данной области техники. Количество введения может быть скорректировано, так как различные факторы меняются со временем.

Ингибиторы, способы и применения, описанные в настоящей заявке, применимы как для терапии человека, так и для применения в ветеринарии. Описанные в настоящей заявке соединения, в частности PD-0184264 и, необязательно, один или несколько ингибиторов, нацеленных на вирус гриппа, и/или один или несколько ингибиторов, нацеленных на бактерию, обладающую желаемой терапевтической активностью, могут вводиться субъекту в физиологически приемлемом носителе, как описано в настоящей заявке. В зависимости от способа введения соединения могут быть составлены различными способами, как обсуждается ниже. Концентрация терапевтически активного соединения в композиции может варьироваться примерно от 0,1 до 100 мас.%. Агенты могут быть введены отдельно или в комбинации с другими видами лечения. Пример 1 показывает, что 25 и 75 мг/кг PD-0184264 эффективны *in vivo* при пероральном введении. Соответственно, PD-0184264 может быть введен в дозировке в диапазоне от 10 до 100 мг/кг PD-0184264, предпочтительно в диапазоне от 25 до 75 мг/кг PD-0184264.

Фармацевтические соединения в способе по настоящему изобретению могут быть введены в любой подходящей единичной дозированной форме. Подходящие пероральные составы могут быть в форме таблеток, капсул, суспензии, сиропа, жевательной резинки, облаток, эликсира и тому подобного. Фармацевтически приемлемые носители, такие как связывающие вещества, эксципиенты, смазывающие вещества и подсластители или ароматизаторы, могут быть включены в пероральные фармацевтические композиции. При желании также могут быть включены обычные агенты для изменения вкуса, цвета и формы специальных форм.

Для инъеклируемых составов фармацевтические композиции могут быть в лиофилизированном порошке в смеси с подходящими эксципиентами в подходящем флаконе или пробирке. Перед использованием в медицинском учреждении лекарственные средства могут быть восстановлены путем растворения лиофилизированного порошка в подходящей системе растворителей для образования композиции, подходящей для внутривенной или внутримышечной инъекции.

Комбинация PD-0184264 с противовирусным агентом, таким как ингибитор нейраминидазы, такой как осельтамивир, приводит к синергетическому эффекту. Этот синергетический эффект может представлять собой повышенный противовирусный эффект, приводящий, например, к уменьшенному титру вируса или пролонгированному терапевтическому окну. Соответственно, настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции, содержащей терапевтически эффективное количество PD-0184264, а также терапевтически эффективное количество ингибитора нейраминидазы, выбранного из группы осельтамивира, фосфата осельтамивира, ланинамивира, занамивира и перамивира.

В одном варианте реализации композиция может быть в форме для перорального введения (например, таблетка или капсула, или сироп и т.д.) с терапевтически эффективным количеством (например, от 0,1 мг до 2000 мг, от 0,1 мг до 1000 мг, от 0,1 мг до 500 мг, от 0,1 мг до 500 мг, от 0,1 мг до 200 мг, от 30 мг до 300 мг, от 0,1 мг до 75 мг, от 0,1 мг до 30 мг) ингибитора нейраминидазы, как описано выше.

В других вариантах реализации PD-0184264 предназначен для применения в способах профилактики и/или лечения коинфекции по настоящему изобретению, при этом PD-0184264 уменьшает как вирусную, так и бактериальную инфекцию при контакте с тест-системой *in vitro*, при этом тест-система содержит культивируемые клетки, инфицированные

- a) вирусом гриппа
- b) бактерией

по сравнению с тест-системой *in vitro* перед контактом. В другом варианте реализации PD-0184264

предназначен для применения в способах профилактики и/или лечения коинфекции по настоящему изобретению, при этом PD-0184264 уменьшает бактериальную инфекцию при контакте с тест-системой *in vitro*, при этом тест-система содержит культивируемые клетки, инфицированные бактерией по сравнению с тест-системой *in vitro* перед контактом.

Таким образом, настоящее изобретение также относится к тест-системе *in vitro*, при этом тест-система содержит культивируемые клетки, инфицированные

- a) вирусом гриппа и
- b) бактерией.

Кроме того, в настоящем изобретении также предложена тест-система *in vitro*, при этом тест-система *in vitro* содержит культивируемые клетки, инфицированные бактерией.

В случаях, когда тест-система *in vitro* включает вирусную и бактериальную инфекцию, эти инфекции могут происходить последовательно или одновременно.

"Культивируемая клетка" или "культивируемые клетки" представляет/представляют собой клетки, которых нет в их естественной среде, например в растении или животном. Скорее, культивируемая клетка может представлять собой первичную клеточную культуру, которая содержит клетки, выделенные из их естественной среды, или клеточную линию. Предпочтительно культивируемые клетки представляют собой эпителиальные клетки легкого человека. Предпочтительно культивируемые клетки высевают с плотностью приблизительно 1×10^5 , 2×10^5 , 3×10^5 , 4×10^5 , 5×10^5 , 6×10^5 , 7×10^5 , 8×10^5 , 9×10^5 , 10×10^5 , 11×10^5 , наиболее предпочтительно 8×10^5 клеток в 0,5 мл, 1 мл, 1,5 мл, 2 мл, 2,5 мл, 3 мл, 3,5 мл, 4 мл среды, такой как DMEM. Наиболее предпочтительной является плотность 8×10^5 в 2 мл DMEM.

Такие культивируемые клетки инфицируют вирусом и бактерией или в других вариантах реализации только бактерией. Как уже описано выше, коинфекция может быть последовательной или одновременной. Например, культивируемые клетки могут быть инфицированы сначала вирусом гриппа, а спустя 30 мин бактерией/бактериями. Также возможно дополнительно добавить антибиотик в культуру через 3 ч, чтобы удалить внеклеточные бактерии. При таком сценарии антибиотик затем снова смывают. В других вариантах реализации клетки инфицируют только бактерией.

В настоящей заявке термин "приведение в контакт" относится к пространственному приближению клетки, содержащей вирус гриппа и бактерию, к PD-0184264. Это может, например, означать, что ингибитор наносят через шприц на среду, в которой находятся культивируемые клетки.

В одном варианте реализации уменьшение вирусной инфекции представляет собой уменьшение бляшкообразующих единиц (БОЕ)/мл, и уменьшение бактериальной инфекции представляет собой уменьшение колониеобразующих единиц (КОЕ)/мл. "Бляшкообразующие единицы" - это мера количества частиц, способных образовывать бляшки на единицу объема, таких как вирусные частицы. Это скорее функциональное измерение, чем измерение абсолютного количества частиц: вирусные частицы, которые являются дефектными или не могут инфицировать клетку-мишень, не будут образовывать бляшку и, следовательно, не будут учитываться. Например, раствор вируса гриппа с концентрацией 1000 БОЕ/мкл указывает на то, что 1 мкл раствора содержит достаточно вирусных частиц, чтобы получить 1000 инфекционных бляшек в клеточном монослое. В случае настоящего изобретения культура клеток, обработанная ингибитором, демонстрирует уменьшенное количество бляшкообразующих единиц в культуре после обработки по сравнению с культурой до обработки PD-0184264.

Возможное "уменьшение количества бляшкообразующих единиц (БОЕ)/мл" анализируют следующим образом. Сначала культивируемые клетки, которые инфицированы вирусом гриппа и бактерией, анализируют на их способность генерировать бляшкообразующие единицы (БОЕ)/мл, например, отбирают несколько клеток из чашки Петри и высевают их для подсчета бактериальных бляшек, которые будут образовываться. Этот результат затем сравнивают с количеством бляшкообразующих единиц (БОЕ)/мл, генерируемых клетками той же культуры после применения ингибитора. Если количество бляшкообразующих единиц (БОЕ)/мл уменьшается после обработки ингибитором, по сравнению с количеством, образованным до применения ингибитора, происходит уменьшение бляшкообразующих единиц.

"Колониеобразующие единицы (КОЕ)/мл" оценивают количество жизнеспособных бактерий в образце. Существуют разные способы. Например, для создания колониеобразующих единиц образец (например, культивируемые клетки в небольшом объеме) распределяют по поверхности чашки с питательным агаром и дают возможность высохнуть перед инкубацией для подсчета. Жизнеспособную бактерию определяют как способность размножиться посредством бинарного деления в контролируемых условиях. Внешний вид колонии в клеточной культуре требует значительного роста - при подсчете колоний неясно, возникла ли колония из одной клетки или 1000 клеток. Следовательно, результаты отражаются как КОЕ/мл (колониеобразующие единицы на миллилитр) для жидкостей и КОЕ/г (колониеобразующие единицы на грамм) для твердых веществ, чтобы отразить эту неопределенность (а не клетки/мл или клетки/г).

"Колониеобразующие единицы (КОЕ)/мл" можно анализировать следующим образом. Сначала культивируемые клетки, инфицированные вирусом гриппа и бактерией или только одной бактерией, анализируют на их способность создавать колониеобразующие единицы (КОЕ)/мл, например, отбирая

несколько клеток из чашки Петри и высевая их для подсчета. Этот результат затем сравнивают с количеством колониеобразующих единиц (КОЕ)/мл, генерируемых клетками той же культуры после применения ингибитора. Если количество колониеобразующих единиц (КОЕ)/мл уменьшается до количества, генерируемого до применения ингибитора, происходит уменьшение.

В общем, специалист в данной области техники знает эти широко известные методики анализа бактериальных и вирусных инфекций. Как можно измерить бляшкообразующие единицы (БОЕ)/мл и колониеобразующие единицы (КОЕ)/мл, также описано в литературе (Tuchscherr et al. 2011, Hrinčius et al. 2010).

Для цели изобретения активное соединение, как определено выше, также включает его фармацевтически приемлемую (приемлемые) соль(и). В настоящей заявке фраза "фармацевтически или косметически приемлемая (приемлемые) соль(и)" означает те соли соединений по изобретению, которые безопасны и эффективны для желательной формы введения. Фармацевтически приемлемые соли включают соли, образованные с анионами, такими как соли, полученные из соляной, фосфорной, уксусной, щавелевой, винной кислот и т.д., и соли, образованные с катионами, такими как соли, полученные из натрия, калия, аммония, кальция, гидроксидов железа, изопропиламина, триэтиламина, 2-этиламиноэтанола, гистидина, прокаина и т.д.

Изобретение также охарактеризовано следующими пунктами.

1. PD-0184264 или его фармацевтически приемлемая соль для применения в способе профилактики и/или лечения вирусного заболевания.

2. PD-0184264 или его фармацевтически приемлемая соль для применения по п.1, отличающийся тем, что указанный вирус представляет собой РНК-вирус с негативной цепью.

3. PD-0184264 или его фармацевтически приемлемая соль для применения по п.1 или 2, отличающийся тем, что указанный вирус представляет собой вирус гриппа.

4. PD-0184264 или его фармацевтически приемлемая соль для применения по любому из пп.1-3, отличающийся тем, что указанный вирус гриппа представляет собой вирус гриппа А или вирус гриппа В.

5. PD-0184264 или его фармацевтически приемлемая соль для применения в способе профилактики и/или лечения бактериальной инфекции.

6. PD-0184264 или его фармацевтически приемлемая соль для применения по п.5, отличающийся тем, что указанная бактериальная инфекция опосредована бактерией, выбранной из группы, состоящей из Staphylococcaceae, Streptococcaceae, Legionellaceae, Pseudomonadaceae, Bacillaceae, Chlamydiaceae, Mycoplasmataceae, Enterobacteriaceae, Pseudomonadales и/или Pasteurellaceae.

7. PD-0184264 или его фармацевтически приемлемая соль для применения в способе профилактики и/или лечения коинфекции, включающей бактериальную инфекцию и вирусное заболевание.

8. PD-0184264 или его фармацевтически приемлемая соль для применения по п.7, отличающийся тем, что указанная бактериальная инфекция опосредована бактерией, выбранной из группы, состоящей из Staphylococcaceae, Streptococcaceae, Legionellaceae, Pseudomonadaceae, Bacillaceae, Chlamydiaceae, Mycoplasmataceae, Enterobacteriaceae, Pseudomonadales и/или Pasteurellaceae.

9. PD-0184264 или его фармацевтически приемлемая соль для применения по п.7 или 8, отличающийся тем, что указанный вирус представляет собой РНК-вирус с негативной цепью.

10. PD-0184264 или его фармацевтически приемлемая соль для применения по любому из пп.7-9, отличающийся тем, что указанная вирусная инфекция вызвана вирусом гриппа.

11. PD-0184264 или его фармацевтически приемлемая соль для применения по любому из пп.7-10, отличающийся тем, что указанная вирусная инфекция вызвана вирусом гриппа А или вирусом гриппа В.

12. PD-0184264 или его фармацевтически приемлемая соль для применения по любому из пп.1-4 и 7-11, отличающийся тем, что PD-0184264 или его фармацевтически приемлемую соль вводят в комбинации с ингибитором нейраминидазы или его фармацевтически приемлемой солью.

13. PD-0184264 или его фармацевтически приемлемая соль для применения по п.12, отличающийся тем, что указанный ингибитор нейраминидазы выбран из осельтамивира, фосфата осельтамивира, занамивира, ланинамивира или перамивира или их фармацевтически приемлемой соли.

14. Фармацевтическая композиция, содержащая PD-0184264 или его фармацевтически приемлемую соль.

15. Фармацевтическая композиция, содержащая PD-0184264 или его фармацевтически приемлемую соль и ингибитор нейраминидазы или его фармацевтически приемлемую соль.

16. Применение по любому из предшествующих пунктов, включающее дополнительный ингибитор МЕК.

17. PD-0184264 или его фармацевтически приемлемая соль для применения по любому из предшествующих пунктов у субъекта, предпочтительно у позвоночного.

Следует отметить, что используемые в настоящей заявке и в прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа также включают формы множественного числа, если не указано иное. Таким образом, например, упоминание термина "реагент" включает в себя один или более различных реагентов, а упоминание термина "способ" включает эквивалентные стадии и способы, известные специалистам в данной области техники, которые могут быть изменены или заменены на способы, описанные в

настоящей заявке.

Все публикации и патенты, цитируемые в настоящем описании, полностью включены посредством ссылки. В той степени, в которой материал, включенный посредством ссылки, противоречит или не согласуется с настоящим описанием, описание заменяет любой такой материал.

Если не указано иное, термин "по меньшей мере", предшествующий ряду элементов, следует понимать как относящийся к каждому элементу в ряду. Специалисты в данной области техники распознают или смогут установить, используя не более чем обычные эксперименты, множество эквивалентов конкретных вариантов реализации изобретения, описанных в настоящей заявке. Такие эквиваленты предназначены для охвата настоящим изобретением.

Во всем описании и в формуле изобретения, которая следует ниже, подразумевается, что слово "содержать" и такие варианты, как "содержит" и "содержащий", включает указание 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, если контекст не требует иного. При использовании в настоящей заявке термина "содержащий" может быть заменен термином "состоящий" или иногда при использовании в настоящей заявке термином "имеющий".

При использовании в настоящей заявке термина "состоящий из" исключает любой элемент, стадию или ингредиент, не указанный в пункте формулы изобретения. При использовании в настоящей заявке выражения "состоящий по существу из" не исключает материалы или стадии, которые не оказывают существенного влияния на основные и новые характеристики формулы изобретения.

В настоящей заявке в каждом конкретном случае любой из терминов "содержащий", "состоящий по существу из" и "состоящий из" может быть заменен любым из двух других терминов.

Несколько документов процитированы по всему тексту данного описания. Каждый из документов, процитированных в настоящей заявке (включая все патенты, патентные заявки, научные публикации, спецификации изготовителя, инструкции и т.д.) выше или ниже, полностью включен посредством ссылки. Ничто в настоящей заявке не должно быть истолковано как признание того, что такие публикации составляют предшествующий уровень техники.

Примеры

Настоящее изобретение проиллюстрировано следующими примерами. Указанные примеры не следует истолковывать как ограничивающие объем изобретения. Примеры включены в целях иллюстрации, и настоящее изобретение ограничено только формулой изобретения.

Пример 1. Лечение мышей PD-0184264 приводит к снижению титра вируса в легком.

8-недельных мышей C57BL/6 (по пять в группе) инфицировали с помощью $1,5 \times 10^5$ БОЕ ($5 \times \text{MLD}_{50}$) штамма вируса гриппа A/Regensburg/D6/2009 (RB1, H1N1pdm09). Начиная с одного часа до заражения, мышам осуществляли лечение либо 150 мг/кг CI-1040; 75 мг/кг CI-1040, 25 мг/кг CI-1040, 75 мг/кг PD0184264, 25 мг/кг PD0184264 или растворителем (контроль): 50 мкл ДМСО/150 мкл Cremophor/800 мкл PBS с интервалом 8 ч. Все животные получали объем 200 мкл перорально (per os). Мышей умерщвляли через 24 ч после инфицирования и легкие взвешивали, переносили в пробирку Lysing Matrix D (MP Bio) и BSS (забуференный солевой раствор) в количестве 10-кратного объема легкого, используемого в образцах. Органы измельчали с использованием FastPrep FP 120 (Savant). Для удаления клеточного дебриса гомогенаты центрифугировали в течение 15 мин при 2000 об/мин и супернатант собирали. Определение титра вируса в гомогенатах проводили с использованием анализа блюшек AVICEL®. Результаты представлены на фиг. 1 в виде титра вируса (\log_{10}) БОЕ/мл (слева) или % титра вируса (справа). Титр вируса определяли два исследователя независимо друг от друга. Средние значения из всех титрований были представлены.

Пример 2. Введение CI-1040 или PD-0184264 оказывает ингибирующее действие на рост бактерий, включая MRSA *in vitro*.

Для исследования влияния CI-1040 или PD-0184264 на рост бактерий в целом в бесклеточную ночную культуру штамма MRSA *S. aureus* (USA300) добавляли 50 мкМ либо CI-1040, либо PD-0184264, либо тот же объем (40 мкл) ДМСО, служащего растворителем (фиг. 2). Рост бактерий контролировали в течение 360 мин. PD-0184264 оказал сильное влияние на рост бактерий, который почти полностью отсутствовал в течение всего периода наблюдения. CI-1040 незначительно ингибировал рост MRSA, начинающийся через 120 мин после начала эксперимента, по сравнению с контролем с растворителем, как видно из фиг. 2. Это указывает на то, что PD-0184264, а также CI-1040 в дополнение к блокированию MEK в клетках также блокирует бактериальный компонент, ответственный за рост бактерий.

Для исследования концентраций PD-0184264, необходимых для ингибирования роста бактерий, PD-0184264 вводили в различных концентрациях (как показано на фиг. 3) в ночную культуру *S. aureus* USA300 (MRSA). Бактерии MRSA инкубировали с различными концентрациями ингибитора MEK в диапазоне от 0 до 100 мкМ, и рост бактерий контролировали через шесть часов после культивирования. Концентрация, необходимая для ингибирования 50% роста бактерий, находилась в диапазоне 15-25 мкМ.

Эти данные могут быть проверены в незначительно отличающихся экспериментальных условиях, определяя фактические бактериальные титры вместо OD в более поздние моменты времени после обра-

ботки. В течение дня культуру *S. aureus* 6850 устанавливали на 20 КОЕ/мл и обрабатывали различными концентрациями CI-1040, как указано в течение ночи при 37°C и 5% CO₂. Затем измеряли оптическую плотность (OD₆₀₀). Оставшуюся культуру промывали PBS и серийные разведения помещали в чашки с агаром ВНИ. Титры бактерий показаны в виде колониеобразующих единиц на мл (КОЕ/мл). Результаты представляют собой среднее значение + SD трех независимых биологических экспериментов с двумя техническими повторностями, показанными на фиг. 4А. Кроме того, в течение суток культуры *S. aureus* 6850 (фиг. 4В) или штамма MRSA USA300 (фиг. 4С) устанавливали на 20 КОЕ/мл и обрабатывали различными концентрациями PD-0184264, как указано в течение ночи при 37°C и 5% CO₂. Утром измеряли оптическую плотность (OD₆₀₀). Оставшиеся культуры промывали один раз PBS и затем серийные разведения помещали в чашки с агаром ВНИ. Титры бактерий определяли с использованием счетчика колоний "protocol3" и отображали в виде колониеобразующих единиц на мл (КОЕ/мл) на логарифмической шкале. Результаты представляют собой среднее значение ± SD трех независимых биологических экспериментов с двумя техническими повторностями. Статистическую значимость анализировали с помощью одностороннего анализа ANOVA с последующим тестом множественных сравнений Даннета. И CI-1040 (фиг. 4А), и PD-0184264 (фиг. 4В, С) также были эффективны в этих анализах против штамма *S. aureus* 6850 (фиг. 4А, В) и штамма MRSA USA 300 (фиг. 4С). Очень сильное снижение титров до 1,5-2 порядков можно было обнаружить с помощью 20 мкМ PD-0184264 (фиг. 4В, С).

Пример 3. Введение PD-0184264 в единично-инфицированные или коинфицированные клетки защищает клетки от цитопатического действия IAV и/или *S. aureus*.

Учитывая противовирусный и сильный антибактериальный эффект PD-0184264 (фиг. 2-4 в приведенном выше примере 2), анализировали, можно ли также макроскопически наблюдать указанный признак соединения в отношении разрушающих клетки цитопатических эффектов (CPE), вызванных IAV (вирус гриппа А) и/или инфекцией *S. aureus*. Эпителиальные клетки легкого человека (A549) предварительно обрабатывали PD-0184264 (в указанных концентрациях) или растворителем (ДМСО) и инфицировали штаммом вируса гриппа человека А/Puerto Rico/8/34 (H1N1) при множественной инфекции (MOI=0,001) при 37°C. Через 30 мин разбавление вируса удаляли, клетки промывали PBS и добавляли инвазивную среду DMEM/INV (содержащую 1% сывороточного альбумина человека, 25 нМ NEPES) с или без *S. aureus* 6850 (MOI = 0,1) в присутствии указанной концентрации ингибитора или растворителя контроля. Через 3 ч после бактериальной инфекции клетки обрабатывали DMEM/FBS, содержащим 10% FBS, 2 мкг/мл лизостафина, в течение 20 мин для удаления внеклеточных бактерий. После дополнительной промывки PBS в клетки добавляли инфекционную среду DMEM/BA (0,2% BA, 1 мМ MgCl₂, 0,9 мМ CaCl₂, 100 ед/мл пенициллина, 0,1 мг/мл стрептомицина), содержащую ингибитор или растворитель. После 24-часового инкубационного периода при 37°C морфологию клеток исследовали с помощью световой микроскопии. Как показано на фиг. 5, после единичного инфицирования IAV (H1N1) или штаммом *S. aureus* 6850 наблюдалось незначительное разрушение клеточного монослоя. Этот CPE был сильно увеличен при коинфекции обоими патогенами (нижняя панель). Однако с увеличением количества MEK-ингибитора этот фенотип может быть обращен в зависимости от концентрации, поскольку клеточный монослой остается интактным, а клетки имеют менее круглую форму. Этот защитный эффект клеток PD-0184264 прекрасно отражает его противовирусные и антибактериальные свойства (фиг. 5).

Пример 4. Сравнение антибактериального действия PD-0184264 с общеизвестными антибиотиками.

Чтобы сопоставить антибактериальные свойства MEK-ингибитора PD0184164 с действием общеизвестного антибиотика, бактерии обрабатывали в течение ночи растворителем, MEK-ингибиторами U0126 и PD-0184264 или различными концентрациями антибиотика гентамицина. В течение суток культуры *S. aureus* 6850 или штамма MRSA USA300 устанавливали на 20 КОЕ/мл и обрабатывали, как указано в течение ночи, либо ингибиторами MEK U0126 и PD-0184264, либо антибиотиком гентамицином при 37°C и 5% CO₂. Утром измеряли оптическую плотность (OD₆₀₀). Оставшиеся культуры однократно промывали PBS и затем серийные разведения помещали в чашки с агаром ВНИ. Титры бактерий определяли, используя счетчик колоний "protocol3", и они представлены в виде колониеобразующих единиц на мл (КОЕ/мл). Результаты, показанные на фиг. 6, представляют собой среднее значение ± SD трех независимых биологических экспериментов с двумя техническими повторностями. Статистическую значимость анализировали с помощью одностороннего анализа ANOVA с последующим тестом множественных сравнений Даннета. По сравнению с бактериями, обработанными растворителем, инкубация с MEK-ингибитором первого поколения U0126 привела лишь к незначительному снижению титров бактерий, тогда как обработка PD-0184264 привела к очень сильному снижению бактериальной нагрузки, как показано ранее на фиг. 4. Это происходило с обоими бактериальными штаммами. Как и ожидалось, рост обоих бактериальных штаммов был сильно ингибирован из-за обработки гентамицином, концентрациями, превышающими 1 мкг/мл, хотя антибактериальное действие антибиотика было выше в случае *S. aureus* 6850. При 0,5 мкг/мл гентамицина не было обнаружено снижения титров бактерий для обоих штаммов. Таким образом, влияние MEK-ингибитора PD-0184264 на рост бактерий было почти таким же эффективным, как и низкие концентрации антибиотика гентамицина.

Для дальнейшего сравнения антибактериального действия PD-0184264 с другими MEK-

ингибирующими соединениями или антибиотиком гентамицином проводили анализы времени добавления (фиг. 7а). Ночную культуру *S. aureus* 6850 делили на шесть субкультур, содержащих 15 мл среды ВНИ вместе с растворителем ДМСО отдельно или с одним из ингибиторов МЕК U0126 и PD-0184264 или двумя различными концентрациями антибиотика гентамицина (0,5 или 2 мкг/мл). Сразу после добавления различных соединений измеряли OD₆₀₀, и серийные разведения помещали в чашки с агаром ВНИ для расчета титров бактерий. Оставшиеся культуры дополнительно инкубировали при 37°C с 5% CO₂ в присутствии только веществ или растворителя. Эту процедуру повторяли дважды через 3 и 6 ч после инокуляции. Титры бактерий определяли, используя счетчик колоний "protocol3", и они представлены в виде колониеобразующих единиц на мл (КОЕ/мл). Обработка МЕК-ингибитором PD-0184264 показала самое сильное ингибирование роста бактерий по сравнению со всеми другими соединениями. Затем проводили обмен среды и культуры дополнительно инкубировали без добавления каких-либо веществ. Все культуры достигли мутности предварительно обработанной растворителем культуры, что указывает на то, что ингибитор МЕК PD-0184264 проявляет скорее бактериостатическое, чем бактерицидное действие.

Развитие резистентности к различным обычно используемым антибиотикам происходит регулярно и представляет собой серьезную проблему в медицинских учреждениях. Чтобы проверить, вызывает ли ингибитор МЕК PD0184264 развитие резистентности у *S. aureus*, культуры постоянно обрабатывали в течение почти трех недель в присутствии ингибитора, гентамицина, эритромицина или оставляли без лечения. В частности, культуры выращивали в течение 24 ч в присутствии или в отсутствие веществ, измеряли OD₆₀₀, а затем для культур устанавливали 20 КОЕ/мл и снова выращивали в течение 24 ч. Эту процедуру повторяли в течение 17 дней. Данные представляют собой средства + SD трех независимых экспериментов. Статистическую значимость анализировали с помощью одностороннего анализа ANOVA с последующим тестом множественных сравнений Даннета (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001). Как видно для гентамицина, развитие резистентности происходило в течение первой недели лечения в отличие от макролидного антибиотика эритромицина. Примечательно, что лечение ингибитором МЕК не вызывало резистентности (см. результаты, показанные на фиг. 7b).

Пример 5. Бактериальная киназа PknВ может быть мишенью для PD-0184264 у бактерий.

Предполагается, что ингибитор PD-0184264 специфичен для киназы МЕК, существующей у млекопитающих. Его прямой антибактериальный эффект поднимает вопрос о способе действия у прокариот, то есть существует ли МЕК-подобный бактериальный компонент, который также может быть специфически нацелен на PD-0184264. На данном этапе бактериальная серин/треонинкиназа PknВ попала в фокус исследования. Эта киназа демонстрирует высокое структурное и функциональное сходство с клеточными серин/треонинкиназами, точнее с MAP-киназами, такими как p38, JNK и ERK (Miller et al., 2010, Rakette et al. 2012) (фиг. 8), которые являются МЕК-мишенями в клетках млекопитающих. Интересно, что киназа, как было показано, активируется аутофосфорилированием, таким образом, это дает веские основания предполагать, что она проявляет МЕК-подобную активность.

Пример 6. PD-0184264 повышает чувствительность *Staphylococcus aureus* к антибиотикам и снижает устойчивость к бактериальному стрессу.

Благодаря экспрессии трех доменов, связывающих пенициллин (PASTA) (см. фиг. 8, верхняя панель), PknВ вовлечен в регуляцию чувствительности к антибиотикам. Можно показать, что недостаток киназы приводит к повышенной восприимчивости к различным антибиотикам, особенно к различным β-лактамам (Tamber et al. 2010). Чтобы выяснить, может ли обработка бактерий МЕК-ингибитором PD-0184264 влиять на бактериальную киназу и приводить к фенотипу, сходному с нокаутом киназы, бактериальные культуры обрабатывали в течение ночи растворителем (ДМСО) или 20 мкМ PD-0184264 и затем использовали для определения минимальной ингибирующей концентрации (МИС) различных антибиотиков. В течение дня культуру *S. aureus* 6850 устанавливали на 20 КОЕ/мл и обрабатывали либо растворителем (ДМСО), либо МЕК-ингибитором PD-0184264 в течение ночи при 37°C и 5% CO₂. Утром измеряли оптическую плотность (OD₆₀₀). Вкратце, обработанные растворителем и ингибитором культуры однократно промывали PBS и разведения 1:1 помещали в чашки с агаром ВНИ. Вскоре после инокуляции МИС тест-полоски для различных антибиотиков (Thermo Fischer Scientific) помещали посередине чашки и затем инкубировали в течение 18-24 часов при 37°C. После 18 ч инкубации при 37°C концентрации МИС определяли визуальным анализом чашек. Концентрация, при которой ингибирование роста больше не было видно, была обозначена как МИС для каждого отдельного антибиотика. Лечение PD-0184264 действительно привело к увеличению восприимчивости бактерий к различным антибиотикам, что было наиболее заметно в случае пенициллина и гентамицина (фиг. 9, табл.2). Этот результат полностью согласуется с опубликованными данными, полученными с использованием мутантного штамма, в котором отсутствует киназа (Tamber et al. 2010).

Таблица 2

Определение МИС после обработки PD0184264 в течение ночи

	Минимальная ингибирующая концентрация (МИС) [мг/л]			
	<i>S. aureus</i> 6850		<i>S. aureus</i> USA300	
	не подвергнутые обработке	PD0184264	не подвергнутые обработке	PD0184264
Пенициллин	16	0,25 - 0,5	> 256	8
Меропенем	0,06	0,03	0,12 - 0,25	0,06
Линезолид	2	1	2	1
Ципрофлоксацин	0,25	0,12 - 0,25	8	4 - 8
Гентамицин	2	0,12	1	0,12

Наблюдаемое увеличение восприимчивости к антибиотикам при лечении PD-0184264, которое соответствует фенотипу бактерий, в которых отсутствует киназа (Tamber et al. 2010), убедительно свидетельствует о том, что ингибитор может непосредственно воздействовать на PknB. Поскольку известно, что киназа играет важную роль в устойчивости к бактериальному стрессу, рост бактерий в условиях теплового стресса контролировали после обработки бактерий ингибитором PD-0184264. Штамм *S. aureus* 6850 и штамм MRSA USA300 обрабатывали в течение ночи либо растворителем, либо 20 мкМ PD-0184264. На следующий день готовили субкультуры с таким же количеством бактерий (подтверждено OD₆₀₀ и посевом на агаре ВНИ) и дополнительно инкубировали при 42°C в течение 6 часов. Титры бактерий затем рассчитывали путем посева серийных разведений на чашки с агаром ВНИ. Как показано на фиг. 10, бактерии, обработанные PD-0184264, были сильно повреждены в этих условиях по сравнению с патогенами, обработанными растворителем. Это наблюдается как для чувствительного к метициллину штамма 6850 (черные столбцы), так и для штамма MRSA USA300 (серые столбцы). Нарушение толерантности к стрессу в присутствии ингибитора является еще одним показателем того, что PD-0184264 непосредственно нацелен на киназу PknB, которая является важным медиатором устойчивости к стрессу. Таким образом, данные предоставляют убедительные косвенные доказательства того, что PD-0184264 проявляет свое антибактериальное действие путем ингибирования бактериальной киназы PknB.

Пример 7. Введение PD-0184264 оказывает ингибирующее действие на рост *Streptococcus pneumoniae* и *Bacillus subtilis*.

Помимо *S. aureus*, существуют другие бактерии, которые, как известно, вызывают вторичную бактериальную пневмонию после заражения вирусом гриппа (IV) у пациентов. В этом контексте наиболее распространенным патогеном является *Streptococcus pneumoniae*. Эти бактерии представляют собой наиболее распространенную причину внебольничной пневмонии. В отличие от *S. aureus*, вторичные инфекции, вызванные *Streptococcus pneumoniae*, возникают на поздней стадии после IV и, следовательно, соответствуют конечной стадии постгриппозной пневмонии.

Подобно *S. aureus*, большинство штаммов *Streptococcus pneumoniae* экспрессируют эукариотоподобные серин/треонинкиназы, такие как PknB, которые высоко консервативны между различными родами. Кроме того, эти киназы имеют высокую гомологию с клеточными MAP-киназами (например, ERK, JNK, p38). Результаты, показанные в примерах 2-6, полученные с различными штаммами *S. aureus*, уже продемонстрировали ингибирующий эффект обработки PD-0184264 на рост бактерий, что указывает на участие бактериальных киназ, таких как PknB, в наблюдаемом фенотипе. Поразительно, что гомолог *S. aureus* PknB также существует в *Streptococcus pneumoniae*, что позволяет предположить, что эти бактерии также могут быть чувствительными к PD-0184264. Таким образом, было проанализировано влияние PD-0184264 на разные штаммы *Streptococcus pneumoniae*. Штаммы *Streptococcus pneumoniae* можно разделить на различные серотипы, которые отличаются своей вирулентностью и общей патогенностью. Чтобы проверить наличие серотип- или штамм-независимого действия, использовали инкапсулированные штаммы D39 и TIGR4, которые оба вирулентны, но относятся к разным серотипам. Было обнаружено, что лечение PD-0184264 нарушает рост различных серотипов *Streptococcus pneumoniae*. В частности, в течение суток культуры штаммов *Streptococcus pneumoniae* TIGR4 (серотип 4) и D39 wt (серотип 2) устанавливали на оптическую плотность (OD₆₀₀) 1, разбавляли 1:2000 в среде ВНИ и обрабатывали в течение ночи растворителем (DMCO) или различными концентрациями специфического ингибитора MEK PD0184264 (PD; активный метаболит CI-1040), как указано. Затем снова измеряли OD₆₀₀ (результаты показаны на фиг. 11А) и серии разведений помещали в чашки с агаром ВНИ для определения титров бактерий (результаты показаны на фиг. 11В). В результате можно было продемонстрировать, что оба серотипа чувствительны к PD-0184264 (фиг. 11 а, b).

То же самое верно и для *Bacillus subtilis*, для которого также наблюдалось сильное снижение количества жизнеспособных бактерий в присутствии 10 мкМ PD-0184264 и полная отмена при более высоких концентрациях (см. результаты на фиг. 11 с). В частности, для проверки потенциального антибактериального эффекта на *B. subtilis* инкубировали культуры *B. subtilis* либо с растворителем, либо с различными концентрациями ингибитора MEK PD-0184264 (как указано) в течение 18 ч. Затем определяли бактериальную нагрузку путем измерения OD600 и посева серийных разведений на чашки с агаром ВНИ. Данные, показанные на фиг. 11, представляют собой среднее значение + SD трех независимых экспериментов.

В целом, эти данные указывают на широкую применимость PD-0184264 при антибактериальном лечении.

Пример 8. PD-0184264, но не CI-1040, снижает внутриклеточные титры бактерий.

Инфекция вирусом гриппа (IV) приводит к увеличению экспрессии противовирусных цитокинов, наиболее важным является то, что IFN типа I, которые активируют критические последующие противовирусные ответы, могут также усиливать последующие бактериальные инфекции. Чтобы увидеть, будет ли обработка CI-1040 или PD-0184264 сенсibilизировать клетки для вторичной инфекции *S. aureus*, клеточные культуры иммортализованных альвеолярных базальных эпителиальных клеток человека (A549) инфицировали гриппом IV и *S. aureus* в присутствии или отсутствии ингибиторов. В частности, клетки A549 предварительно обрабатывали в течение 1 ч 10 мкМ специфического ингибитора MEK PD-0184264 или ДМСО в качестве контроля растворителя. После этого клетки промывали PBS и инфицировали вирусом гриппа (IV) (MOI, как указано) в течение 30 мин при 37°C, 5% CO₂. Далее клетки промывали PBS и инфицировали *S. aureus* 6850 (MOI, как указано) в присутствии или отсутствии ингибитора в течение 3 ч. Чтобы избежать избыточного роста бактерий, проводили стадию промывки антибиотиком лизостафином (2 мкг/мл) в течение 20 мин при 37°C для удаления неинтернализованных бактерий. Затем клетки однократно промывали и дополнительно инкубировали до 24 ч в день в присутствии ингибитора или растворителя. В конце инкубационного периода клеточный монослой анализировали с помощью световой микроскопии. Микроскопическое исследование показало, что суперинфекция обоими патогенами привела к значительному увеличению цитопатического эффекта (CPE) по сравнению с единичными инфекциями (фиг. 13, верхняя панель). CPE полностью исчез в присутствии PD-0184264 (фиг. 13, нижняя панель), что указывает на снижение репликации вируса.

Чтобы проверить, было ли сопоставимо лечение PD-0184264 и CI-1040, клетки A549 предварительно обрабатывали 10 мкМ CI-1040, PD-0184264 или растворителем (ДМСО) в течение 60 мин, и затем инфицировали гриппом IV (H7N7) при MOI 0,001 при 37°C. Результаты показаны на фиг. 14А и 14В соответственно. Альтернативно, клетки оставляли необработанными (DMSO) и инфицировали IV (H1N1) при MOI 0,01 при 37°C. Через 30 мин разбавление вируса удаляли, клетки промывали PBS и добавляли инвазионную среду с или без *S. aureus* 6850 (6850) (MOI 0,1) в присутствии 10 мкМ CI-1040, PD-0184264 или растворителя-контроля. Через 3 ч после бактериальной инфекции клетки обрабатывали лизостафином (2 мкг/мл) в течение 20 мин для удаления внеклеточных бактерий. Затем клетки промывали и добавляли инфекционную среду, содержащую ингибитор или растворитель. После общего периода инкубации 24 ч (после вирусной инфекции) анализировали титры внутриклеточных бактерий. Результаты представляют средние значения + SD трех отдельных экспериментов. Статистическую значимость оценивали с помощью одностороннего анализа ANOVA с последующим тестом множественных сравнений Тьюки (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001). Как видно из фиг. 14А, обработка CI-1040 не сенсibilизировала клетки к вторичной инфекции *S. aureus*, так как не было обнаружено изменений внутриклеточной бактериальной нагрузки. Удивительно, что введение PD-0184264 приводило к снижению внутриклеточных титров бактерий, как можно видеть на фиг. 14В. Получали сопоставимые результаты, когда CI-1040 или PD-0184264 вводили в более поздние периоды времени во время продолжающейся инфекции, как показано на фиг. 14С.

Чтобы исключить, что снижение вирусной и внутриклеточной бактериальной репликации было результатом цитотоксического эффекта PD-0184264 на клетки A549, жизнеспособность клеток в присутствии возрастающих концентраций контролировали в течение 24 и 48 ч. Кроме того, проводили LDH-анализ для определения разрыва мембраны вследствие обработки ингибитором. Было показано, что обработка клеток A549 PD-0184264 не вызывает токсичность клеток. Клетки A549 обрабатывали в течение 24 ч (как показано на фиг. 15 А и С) или 48 ч (как показано на фиг. 15 В и D) с повышением концентрации PD-0184264 (1, 5, 10, 20, 50 или 100 мкМ). По истечении времени инкубации супернатанты отбирали для измерения высвобождения LDH (как показано на фиг. 15 С, D) с использованием набора для анализа цитотоксичности CytoSelect LDH в соответствии с инструкциями производителя. Кроме того, жизнеспособные клетки подсчитывали путем окрашивания трипановым синим. Жизнеспособность клеток была нормализована для клеток, обработанных ДМСО, и показана как % жизнеспособности. Данные представляют собой среднее значение + SD трех независимых экспериментов. Статистическую значимость рассчитывали с помощью одностороннего анализа ANOVA с последующим тестом множественных сравнений Даннета (*p<0,05; **p<0,01; 27***p<0,001).

Пример 9. Определение значений IC_{50} для CI-1040 и PD-0184264.

Аликвоты ингибитора растворяли в 100% ДМСО (маточный раствор 10 мМ). Для анализа значений IC_{50} в планшете для микротитрования готовили следующие серийные разведения: 50 мкМ, 25 мкМ, 5 мкМ, 2,5 мкМ, 0,5 мкМ, 0,25 мкМ, 0,05 мкМ, 0,025 мкМ, 0,005 мкМ. 1 мкл каждого разведения добавляли к 49 мкл реакционной смеси киназы, получая следующие тестовые концентрации: 1 мкМ, 500 нМ, 100 нМ, 50 нМ, 10 нМ, 5 нМ, 1 нМ, 0,5 нМ, 0,1 нМ.

3 мкл активного c-Raf1, 2 мкл MEK1wt и 3 мкл ERK2wt очищенных белковых растворов смешивали с киназным буфером и 1 мкл ДМСО или ДМСО/ингибитор (конечный объем 45 мкл). Смесь инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре в темноте. После этой предварительной инкубации, обеспечивающей связывание ингибитора с белком MEK, киназную реакцию запускали добавлением 5 мкл 10 мМ АТФ и перемешиванием пипеткой. Образцы инкубировали в течение 30 мин при 26°C в термосмесителе (Eppendorf) при 500 об/мин. Чтобы остановить реакцию киназы, добавляли 5,5 мкл 20% раствора SDS, и эту смесь затем инкубировали в течение 10 мин при 50°C. Затем каждый образец разбавляли 190 мкл блокирующего буфера (1% BSA в TBST). 100 мкл каждого образца добавляли в лунки 96-луночного планшета для микротитрования, покрытые антителами против ERK.

Образцы киназной реакции (100 мкл/лунку) инкубировали в течение 60 мин при комнатной температуре в лунках 96-луночного планшета для микротитрования, покрытых антителом против ERK и блокирующим BSA. Затем чашки промывали 3×5 мин 100 мкл промывочного буфера TBST. Для обнаружения фосфорилированного ERK добавляли антитело к фосфо-ERK (p44/p42) (1:3000, 100 мкл/лунка в блокирующем буфере) и инкубировали в течение ночи при 4°C.

После трех стадий промывки (3×100 мкл/лунку) добавляли конъюгированное с HRP антитело к мышиному IgG (1:1000 в TBST) и инкубировали в течение 60 мин при комнатной температуре. Добавляли 100 мкл/лунку субстрата пероксидазы ABTS после трех дополнительных стадий промывки (3×100 мкл/лунку TBST) и инкубировали в течение 30 мин при 30°C. Реакцию субстрата останавливали добавлением 2,5 мкл 20% SDS. Оптическую плотность (OD) смеси измеряют при длине волны 405 нм в ELISA-ридере.

Бесклеточный анализ киназы выявил, что для ингибирования 50% активности MEK необходимо в 12,5 раз меньше CI-1040 (фиг. 16) по сравнению с PD-0184264, который фактически является более слабым ингибитором киназы MEK. Таким образом, никто не ожидал сильного противовирусного и антибактериального действия PD-0184264. Однако как показано в приведенных выше примерах, PD-0184264 проявляет более сильную противовирусную и антибактериальную активность по сравнению с CI-1040 *in vivo*.

Пример 10. Противовирусная активность PD-0184264 в анализе *in vitro*.

Лекарственные средства.

CI-1040 [2-(2-хлор-4-йодфениламино)-N-(циклопропилметокси)-3,4-дифторбензамид; Lot:CC-5395.0-16] и PD-0184264 (PD0184264) [2-(2-хлор-4-йодфениламино)-N-3,4-дифторбензойная кислота; Lot: CC-5595.4-10] были синтезированы в ChemCon GmbH (Freiburg, Germany). Для экспериментов по культивированию клеток готовили 10 мМ исходный раствор CI-1040 ($M=478,66$ г/моль) и PD-0184264 ($M=409,55$ г/моль) в ДМСО (Merck-Millipore; Germany).

Вирус и клетки.

Эксперименты ингибирования вируса проводили со штаммом вируса гриппа А RB1 [A/Regensburg/D6/09 (H1N1pdm09)] с MOI 0,001.

Анализ ингибирования потомства вируса.

Клетки A549 инфицировали RB1 в течение 30 мин при 37°C в атмосфере 5% CO₂. После инкубации разведение вируса отбирали, а клетки промывали PBS и добавляли 500 мкл IMDM (среда Дульбекко в модификации Искова)/BA (бычий альбумин) - среда (0,2% BA, 1 мМ MgCl₂, 0,9 мМ CaCl₂, 100 Ед/мл пенициллина, 0,1 мг/мл стрептомицина) и 0,6 мкл трипсина, обработанного TPCK, в присутствии 10 мкМ CI-1040 или различных концентраций PD-0184264 (100 мкМ, 50 мкМ, 10 мкМ, 5 мкМ, 1 мкМ, 0,5 мкМ и 0,1 мкМ, конечная концентрация ДМСО составляла 1%) в течение 24 ч при 37°C в 5% CO₂. Контролем растворителя была среда IMDM/BA с 1% ДМСО. Супернатанты клеточных культур собирали для определения титров потомства вируса на клетках MDCK II с использованием анализа бляшек AVICEL®, как описано ранее (Haasbach et al. 2011, Matrosovich et al. 2006).

WST-анализ.

Клетки A549 высевали в 96-луночный планшет с плоским дном (Greiner, Germany) и выращивали в течение ночи. После этого клетки обрабатывали различными концентрациями PD-0184264 (100 мкМ, 50 мкМ, 10 мкМ, 5 мкМ, 1 мкМ, 0,5 мкМ и 0,1 мкМ), растворенного в 100 мкл IMDM (ThermoFisher, Germany) с добавлением 5% фетальной телячьей сыворотки (Sigma-Aldrich; Germany), конечная концентрация ДМСО в сыворотке составляла 1%, и культивирование проводили при 37°C и 5% CO₂ в течение 24 ч. После этого в культуральную среду добавляли 10 мкл реагента WST-1 (Roche, Germany) и инкубировали в течение четырех часов. В течение этого времени стабильная тетразолиевая соль WST-1 расщеплялась до растворимого формазана метаболически активными клетками в культуре. После этого периода инкубации образовавшийся краситель формазан количественно определяли с помощью ELISA-ридера

при 405 нм. Измеренная оптическая плотность напрямую коррелирует с количеством жизнеспособных клеток.

Результаты.

Противовирусную активность PD-0184264 против RB1 исследовали в стандартном анализе ингибирования вируса (фиг. 17А). Обнаружили снижение титра вируса на $98,87 \pm 0,03\%$ при обработке клеток 100 мкМ PD-0184264 ($P > 0,0001$). Аналогичное снижение обнаружили с 50 мкМ PD-0184264 ($91,50 \pm 2,08\%$; $P > 0,0001$). Напротив, обнаружили только слабое снижение титра вируса при использовании 10 мкМ PD-0184264 ($58,97 \pm 4,45\%$). 1 мкМ PD-0184264 почти не приводил к уменьшению количества потомства вируса. Таким образом, по сравнению со снижением содержания вируса с помощью 10 мкМ CI-1040 ($96,78 \pm 0,65\%$; $P > 0,0001$), необходима почти в 10 раз более высокая концентрация PD-0184264 для достижения аналогичного снижения уровня потомства вируса гриппа. Это также соответствует значению EC₅₀ для PD-0184264 по сравнению с CI-1040. Для PD-0184264 значение EC₅₀ составляет 0,804 мкМ (фиг. 17В). В другом исследовании значение EC₅₀ для CI-1040 против RB1 может быть определено как 0,026 мкМ (Haasbach et al. 2017). Значение CC₅₀ для PD-0184264 более 1576 (фиг. 17С), что является более высоким по сравнению с CI-1040 ($> 312,3$ мкМ; Haasbach et al. 2017). Таким образом, PD-0184264 имеет S.I., равный 1960 (индекс селективности).

Вывод/обсуждение.

Результаты демонстрируют пониженную противовирусную активность PD-0184264 в клеточной культуре, т.е. *in vitro*, по сравнению с CI-1040. Необходима почти в 10 раз более высокая концентрация PD-0184264 для достижения такого же снижения содержания вируса, как и для CI-1040 в анализе *in vitro*. Разница значений EC₅₀ между этими двумя соединениями еще более выражена. Значение EC₅₀ для PD-0184264 в 31 раз выше, чем значение EC₅₀ для CI-1040 (Haasbach et al. 2017). S.I. PD-0184264 против RB1 на клетках A549 также снижается по сравнению с развитием CI-1040.

Пример 11. Снижение титра вируса в легком мышей с помощью PD-0184264 *in vivo*.

(А) После инфицирования H1N1pdm09 самок мышей C57BL/6 лечили пероральным путем либо 2,8, 8,4 или 25 мг/кг PD-0184264 (левая сторона), либо 25, 75 или 150 мг/кг CI-1400 (левая сторона). Через 24 ч после инфицирования животных умерщвляли и брали легкое для приготовления 10% суспензии. Титр вируса определяли стандартным способом. Титр вируса мышей, обработанных двумя МЕК-ингибиторами, сравнивали с титром вируса мышей, обработанных одним растворителем (контроль). Уровень вируса в легких контрольных мышей был установлен на 100% (черная полоса). Для иллюстрации обеих фигур использовали программное обеспечение Graphpad Prism 7.

Лекарственные средства.

CI-1040 [2-(2-хлор-4-йодфениламино)-N-(циклопропилметокси)-3,4-дифторбензамид; Lot: CC-5395.0-16] и PD-0184264 (PD0184264) [2-(2-хлор-4-йодфениламино)-N-3,4-дифторбензойная кислота; Lot: CC-5595.4-10] были синтезированы в ChemCon GmbH (Freiburg, Germany).

Для перорального применения 25 мг/кг 2,5 мг PD-0184264 растворяли в 50 мкл ДМСО (Sigma-Aldrich, Germany) и дополнительно разбавляли 0,15 мл Cremophor EL (Merck-Millipore, Germany) и 0,8 мл PBS (Gibco, Germany). Для применения 8,4 мг/кг и 2,8 мг/кг 0,84 мг или 0,28 мг PD-0184264 растворяли в 50 мкл ДМСО (Sigma-Aldrich, Germany) и дополнительно разбавляли 0,15 мл Cremophor EL/0,8 мл PBS. 202,5 мг CI-1040 растворяли в 0,5 мл ДМСО/0,15 мл Cremophor EL/0,8 мл PBS и дополнительно разбавляли Cremophor EL и PBS.

Животные.

Для антивирусных исследований использовали самок мышей C57BL/6 в возрасте восьми недель (Charles River Laboratories, Germany) с массой тела 21,0-24,0 г при введении. Животных кормили как обычно. Питьевая вода была доступна *ad libitum*.

Применение лекарственных средств.

Лекарственные средства вводили однократным введением в день испытания 1 через желудочный зонд. Скорость нанесения составляла 15 с на дозу при объеме введения 200 мкл.

Анализ титрования вируса легкого.

Мышей умерщвляли через 24 ч после инфицирования, легкие взвешивали, переносили в пробирку Lysing Matrix D (MP Bio) и наносили BSS в количестве 10-кратного объема легкого. Органы измельчали с использованием FastPrep FP 120 (Savant). Для удаления клеточного дебриса гомогенаты центрифугировали в течение 15 мин при 2000 об/мин и супернатант собирали. Определение титра вируса в гомогенатах проводили с использованием анализа бляшек AVICEL®, как описано ранее (Haasbach et al. 2011, Mastrovich et al. 2006).

Вывод/обсуждение.

На фиг. 18 показаны результаты экспериментов. По сравнению с контрольным экспериментом, только концентрации 75 мг/кг или выше CI-1040 показали какой-либо эффект в снижении титра вируса. Напротив, PD-0184264 показал снижение титра вируса в легких уже при концентрации от 2,8 мг/кг до приблизительно 70%. При концентрации 8,4 мг/кг титр вируса снижается до приблизительно 20%, тогда как при 25 мг/кг титр вируса снижается до приблизительно 10%. Таким образом, для достижения эффек-

та, подобного 150 мг/кг CI-1040, требуется в 6 раз более низкая концентрация PD-0184264, что подчеркивает высокий потенциал PD-0184264 для противовирусных эффектов.

Пример 12. PD-0184264 имеет более высокую биодоступность, по сравнению с CI-1040.

(А) Самцов мышей NMRI лечили либо 75 мг/кг CI-1040 (темно-серая область), либо 75 мг/кг PD-0184264 внутривенным путем. Кровь собирали через 15 мин, 30 мин, 1 ч, 2 ч, 4 ч, 6 ч, 8 ч и 24 ч (день испытания 2) после введения, и плазму анализировали на наличие лекарственного средства. (В) Самцов мышей NMRI лечили либо 150 мг/кг CI-1040 (темно-серая область), либо 150 мг/кг PD-0184264 перорально (per os), используя желудочный зонд. Кровь собирали через 15 мин, 30 мин, 1 ч, 2 ч, 4 ч, 6 ч, 8 ч и 24 ч (день испытания 2) после введения, и плазму анализировали на наличие лекарственного средства. Каждая точка данных представляет среднее значение трех образцов плазмы. Для иллюстрации обеих фигур использовали программное обеспечение Graphpad Prism 7.

Лекарственные средства.

CI-1040 [2-(2-хлор-4-йодфениламино)-N-(циклопропилметокси)-3,4-дифторбензамид; Lot: CC-5395.0-15] и PD-0184264 (PD0184264) [2-(2-хлор-4-йодфениламино)-N-3,4-дифторбензойная кислота; Lot: CC-5595.4-10] были синтезированы в ChemCon GmbH (Freiburg, Germany). Для внутривенного введения (в.в.) 30,65 мг CI-1040 растворяли в 0,075 мл ДМСО (Sigma-Aldrich, Switzerland) и дополнительно разбавляли 0,225 мл Cremophor EL (Merck-Millipore, Germany) и 2,7 мл PBS (Gibco, Germany). 34,88 мг PD-0184264 растворяли в 0,075 мл ДМСО и дополнительно разбавляли 0,225 мл Cremophor EL/2,7 мл PBS. Для перорального применения 202,5 мг CI-1040 растворяли в 0,5 мл ДМСО/1,5 мл Cremophor EL/8,0 мл PBS. 81,0 мг PD-0184264 растворяли в 0,2 мл ДМСО/0,6 мл Cremophor EL/3,2 мл PBS.

Животные.

Для фармакокинетических исследований использовали самцов мышей NMRI в возрасте восьми недель (Charles River Laboratories, Germany) с массой тела 23,9-36,5 г при введении. Животных кормили как обычно. Питьевая вода была доступна ad libitum.

Забор крови и подготовка плазмы.

Эксперименты проводили в LPT GmbH (Hamburg, Germany). Собирали достаточное количество цельной крови, взятой под анестезией изофлураном, для получения по меньшей мере 2×100 мкл плазмы с Li-гепарином 3 животных на группу, и в следующие моменты времени: 0 (до введения), 15 мин, 30 мин, 1 ч, 2 ч, 4 ч, 6 ч, 8 ч и 24 ч (день испытания 2) после введения. Образцы цельной крови мгновенно охлаждали с использованием системы Iso-Therm-Rack (Eppendorf AG, Germany) до центрифугирования в течение 0,5 ч после извлечения. Сразу после центрифугирования образцы хранили при -20°C до дальнейшего анализа. Анализ плазмы проводили с использованием стандартных процедур в Prolytic GmbH (Frankfurt, Germany).

Применение лекарственных средств.

Лекарственные средства вводили либо однократным введением в день испытания 1 через желудочный зонд, либо путем внутривенного болюсного введения в хвостовую вену. Скорость введения составляла 15 с/доза при объеме введения 200 мкл.

Результаты.

Фармакокинетические эксперименты показали, что более высокое воздействие PD-0184264 было обнаружено после в/в (фиг. 19А) и перорального (per os) (фиг. 19В) применения в плазме мышей по сравнению с CI-1040 со значениями AUC 1953,68 мкг*ч/мл PD-0184264, которые намного выше, чем значения для CI-1040. Следует отметить, что через восемь часов после в/в применения и после перорального (per os) применения CI-1040 в плазме почти не было обнаружено лекарственных средств. Напротив, после перорального (per os) применения PD-0184264 2 в моменте времени 8 ч все еще была обнаружена высокая концентрация.

Вывод/обсуждение.

Резкое различие в содержании веществ в плазме для PD-0184264 и CI-1040 после однократного в/в применения уже дает основания предполагать, что CI-1040 может быстро распадаться. Авторы изобретения предположили, что уменьшение лекарственного средства происходит моноэкспоненциальным образом. В общем, это предположение верно. При низких концентрациях лекарственное средство обычно уменьшается моноэкспоненциальным образом. И константа скорости терминальной элиминации не изменяется во времени или при разных концентрациях циркулирующего лекарственного средства. Тем не менее, на данный момент неизвестно, какую роль играют другие процессы, такие как энтерогепатический круг, в терминальной фазе фармакокинетического профиля.

В общем итоге, PD-0184264 демонстрирует более высокую противовирусную активность, чем CI-1040 in vivo, что может быть основано на более высокой биодоступности лекарственного средства.

Источники.

Bright, R.A., Shay, D.K., Shu, B., Cox, N.J. and Klimov, A.I. (2006). Adamantane resistance among influenza A viruses isolated early during the 2005-2006 influenza season in the United States. JAMA: The Journal of the American Medical Association 295, 891-894.

- Chertow, D.S. and Memoli, M.J. (2013). Bacterial coinfection in influenza: a grand rounds review. *JAMA: The Journal of the American Medical Association* 309, 275-282.
- De Clercq, E. and Neyts, J. (2007). Avian influenza A (H5N1) infection: targets and strategies for chemotherapeutic intervention. *Trends in pharmacological sciences* 28, 280-285.
- Gillet, Y., Vanhems, P., Lina, G., Bes, M., Vandenesch, F., Floret, D. and Etienne, J. (2007). Factors predicting mortality in necrotizing community acquired pneumonia caused by *Staphylococcus aureus* containing Panton-Valentine leukocidin. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 45, 315-321.
- Grundmann, H., Aires-de-Sousa, M., Boyce, J. and Tiemersma, E. (2006). Emergence and resurgence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a public-health threat. *Lancet* 368, 874-885.
- Haasbach, E. et al (2017). The MEK-inhibitor CI-1040 displays a broad anti-influenza virus activity in vitro and provides a prolonged treatment window compared to standard of care in vivo. *Antiviral research* 142, 178-184.
- Hayden, F.G. and Hay, A.J. (1992). Emergence and transmission of influenza A viruses resistant to amantadine and rimantadine. *Current topics in microbiology and immunology* 176, 119-130.
- Hrincius, E. et al. (2010): CRK adaptor protein expression is required for efficient replication of avian influenza A viruses and controls JNK mediated apoptotic responses. *Cellular microbiology* 12, 831-843.
- Iwao, Y., Ishii, R., Tomita, Y., Shibuya, Y., Takano, T., Hung, W.C., et al. (2012). The emerging ST8 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone in the community in Japan: associated infections, genetic diversity, and comparative genomics. *J Infect Chemother* 18, 228-240.
- LoRusso, P., Adjei, A., Varterasian, M., Gadgeel, S., Reid, J., Mitchell, D., et al. (2005). Phase I and Pharmacodynamic Study of the Oral MEK Inhibitor CI-1040 in Patients With Advanced Malignancies. *Journal of Clinical Oncology* 23(23), 5281-5293.
- Ludwig, S. (2009). Targeting cell signaling pathways to fight the flu: towards a paradigm change in anti-influenza therapy. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 64, 1-4.
- Matrosovich M, Matrosovich T, Garten W, Klenk HD (2006). New low-viscosity overlay medium for viral plaque assays. *Virol J.* 3:63.
- Miller, M., Donat, S., Raketle, S., Stehle, T., Kouwen, T.R., Diks, S.H., Dreisbach, A., Reilman, E., Gronau, K., Becher, D., Peppelenbosch, M.P., van Dijk, J.M., Ohlsen, K. (2010). *Staphylococcal PknB as the first prokaryotic representative of the proline-directed kinases. PLoS One*, 5, e9057.

- Moran, G.J., Krishnadasan, A., Gorwitz, R.J., Fosheim, G.E., McDougal, L.K., Carey, R.B., et al. (2006). Methicillin-resistant *S. aureus* infections among patients in the emergency department. *The New England Journal of medicine* 355, 666-674.
- Morens, D.M., Taubenberger, J.K. and Fauci, A.S. (2008). Predominant role of bacterial pneumonia as a cause of death in pandemic influenza: implications for pandemic influenza preparedness. *The Journal of infectious diseases* 198, 962-970.
- Neumann, G., Noda, T. and Kawaoka, Y. (2009). Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus. *Nature* 459, 931-939.
- Paddock, C.D., Liu, L., Denison, A.M., Bartlett, J.H., Holman, R.C., DeLeon-Carnes, M., et al. (2012). Myocardial injury and bacterial pneumonia contribute to the pathogenesis of fatal Influenza B Virus infection. *The Journal of infectious diseases* 205, 895-905.
- Parker, D. and Prince, A. (2012). Immunopathogenesis of *Staphylococcus aureus* pulmonary infection. *Seminars in immunopathology* 34, 281-297.
- Parry, J. (2013). H7N9 avian flu infects humans for the first time. *Bmj* 346, f2151.
- Pinto, L.H. and Lamb, R.A. (2006). The M2 proton channels of influenza A and B viruses. *The Journal of biological chemistry* 281, 8997-9000.
- Pinto, L.H. and Lamb, R.A. (2007). Controlling influenza virus replication by inhibiting its proton channel. *Molecular bioSystems* 3, 18-23.
- Rakette, S., Donat, S., Ohlsen, K and Stehle, T (2012). Structural analysis of *Staphylococcus aureus* serine/threonine kinase PknB. *PLoS One* 7(6), e39136.
- Shilo, N. and Quach, C. (2011). Pulmonary infections and community associated methicillin resistant *Staphylococcus aureus*: a dangerous mix? *Paediatric respiratory reviews* 12, 182-189.
- Tamber, S., Schwartzman, J. and Cheung, A.L. (2010). Role of PknB kinase in antibiotic resistance and virulence in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain USA300. *Infection and Immunity* 78, 3637-3646.
- Taubenberger, J.K. and Kash, J.C. (2010). Influenza virus evolution, host adaptation, and pandemic formation. *Cell host & microbe* 7, 440-451.
- Wabnitz, A., Mitchell, D. and Wabnitz, D. (2004). In Vitro and in Vivo Metabolism of the Anti-Cancer Agent CI-1040, a MEK Inhibitor, in Rat, Monkey, and Human. *Pharmaceutical Research* 21(9), 1670-1679.
- Tuchscher, L. et al. (2011). *Staphylococcus aureus* phenotype switching: an effective bacterial strategy to escape host immune response and establish a chronic infection. *EMBO molecular medicine* 3, 129-141.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение PD-0184264 или его фармацевтически приемлемой соли для профилактики и/или лечения бактериальной инфекции.
2. Применение PD-0184264 или его фармацевтически приемлемой соли для профилактики и/или лечения вирусного заболевания.
3. Применение PD-0184264 или его фармацевтически приемлемой соли для профилактики и/или лечения коинфекции, включающей бактериальную инфекцию и вирусное заболевание.
4. Применение PD-0184264 или его фармацевтически приемлемой соли по п.2 или 3, где указанный вирус представляет собой РНК-вирус с негативной цепью.
5. Применение PD-0184264 или его фармацевтически приемлемой соли по п.4, где указанный вирус представляет собой вирус гриппа.
6. Применение PD-0184264 или его фармацевтически приемлемой соли по п.5, где указанный вирус гриппа представляет собой вирус гриппа А или вирус гриппа В.

7. Применение PD-0184264 или его фармацевтически приемлемой соли по п.1 или 3, где указанная бактериальная инфекция опосредована бактерией, выбранной из группы, состоящей из Staphylococcaceae, Streptococcaceae, Legionellaceae, Pseudomonadaceae, Bacillaceae, Chlamydiaceae, Mycoplasmataceae, Enterobacteriaceae, Pseudomonadales и Pasteurellaceae.

8. Применение PD-0184264 или его фармацевтически приемлемой соли по любому из пп.2-6, где PD-0184264 или его фармацевтически приемлемую соль вводят в комбинации с ингибитором нейраминидазы или его фармацевтически приемлемой солью.

9. Применение PD-0184264 или его фармацевтически приемлемой соли по п.8, где указанный ингибитор нейраминидазы выбран из осельтамивира, фосфата осельтамивира, занамивира, ланинамивира или перамивира или их фармацевтически приемлемой соли.

10. Фармацевтическая композиция, содержащая PD-0184264 или его фармацевтически приемлемую соль.

11. Фармацевтическая композиция по п.10, дополнительно содержащая ингибитор нейраминидазы или его фармацевтически приемлемую соль.

12. Применение PD-0184264 или его фармацевтически приемлемой соли по любому из пп.1-9, включающее дополнительный ингибитор МЕК.

13. Применение фармацевтической композиции, содержащей PD-0184264 или его фармацевтически приемлемую соль по п.10 или 11, включающее дополнительный ингибитор МЕК.

14. Применение PD-0184264 или его фармацевтически приемлемой соли по любому из пп.1-9 и 12 у субъекта, предпочтительно у позвоночного.

15. Способ лечения бактериальной инфекции у субъекта, включающий введение терапевтически эффективного количества PD-0184264 или его фармацевтически приемлемой соли нуждающемуся в этом субъекту.

16. Способ лечения вирусного заболевания у субъекта, включающий введение терапевтически эффективного количества PD-0184264 или его фармацевтически приемлемой соли нуждающемуся в этом субъекту.

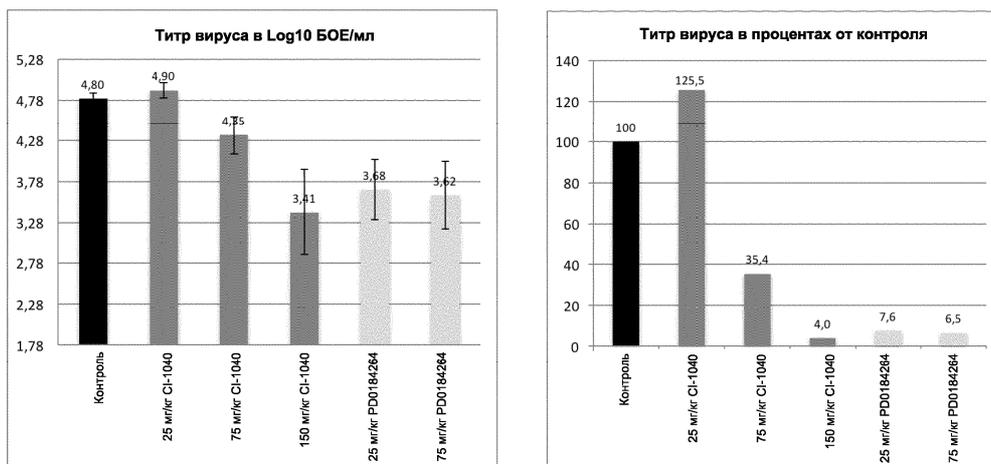
17. Способ лечения коинфекции у субъекта, включающей бактериальную инфекцию и вирусное заболевание, при этом указанный способ включает введение терапевтически эффективного количества PD-0184264 или его фармацевтически приемлемой соли нуждающемуся в этом субъекту.

18. Способ по п.16 или 17, отличающийся тем, что указанный вирус представляет собой РНК-вирус с негативной цепью.

19. Способ по п.18, отличающийся тем, что указанный вирус представляет собой вирус гриппа.

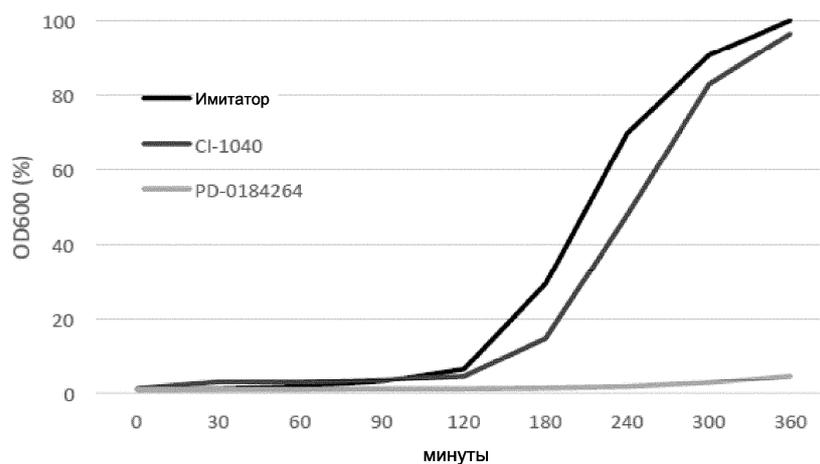
20. Способ по п.19, отличающийся тем, что указанный вирус гриппа представляет собой вирус гриппа А или вирус гриппа В.

21. Способ по п.15 или 17, отличающийся тем, что указанная бактериальная инфекция опосредована бактерией, выбранной из группы, состоящей из Staphylococcaceae, Streptococcaceae, Legionellaceae, Pseudomonadaceae, Bacillaceae, Chlamydiaceae, Mycoplasmataceae, Enterobacteriaceae, Pseudomonadales и Pasteurellaceae.

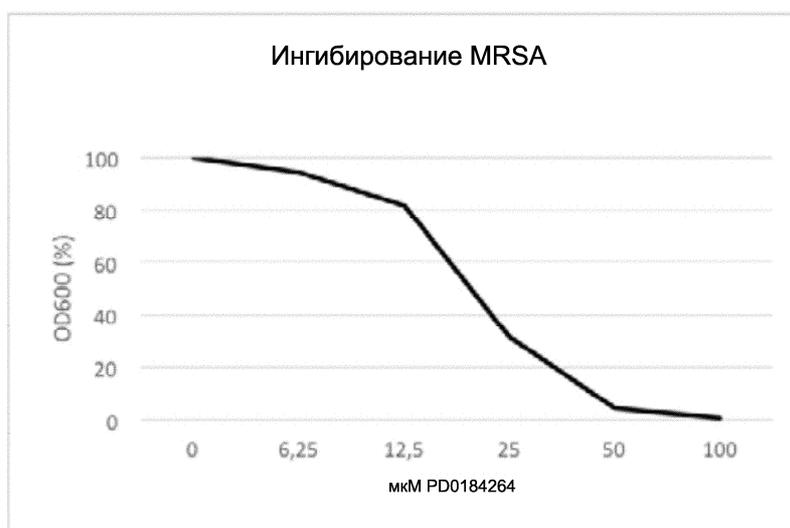


Фиг. 1

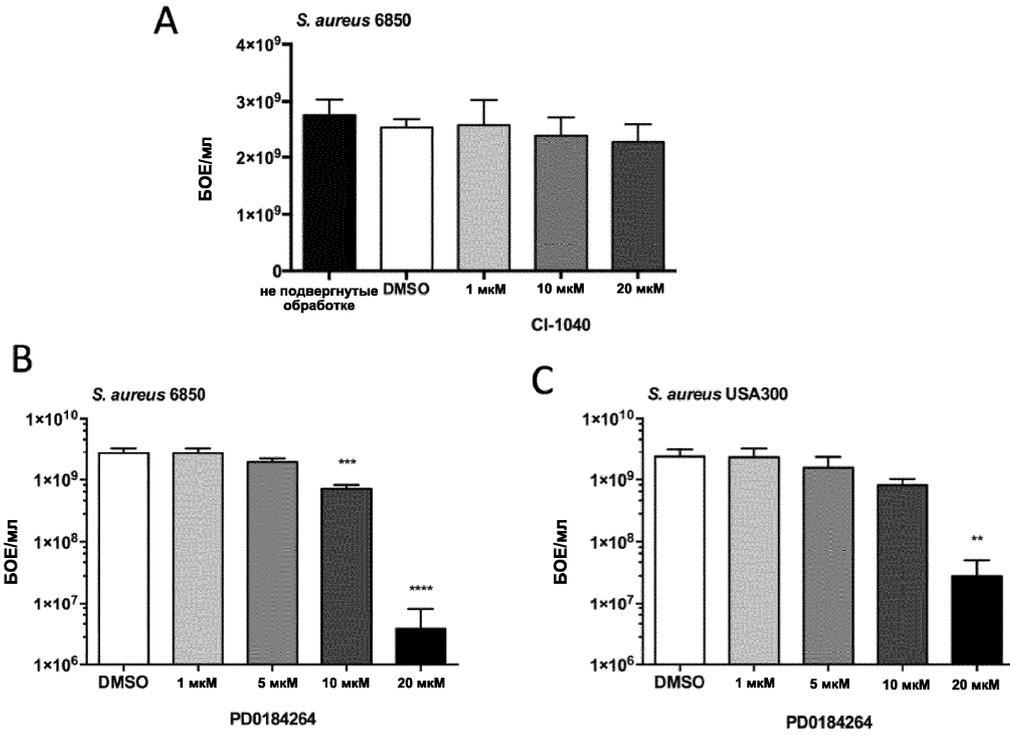
Рост MRSA во время лечения



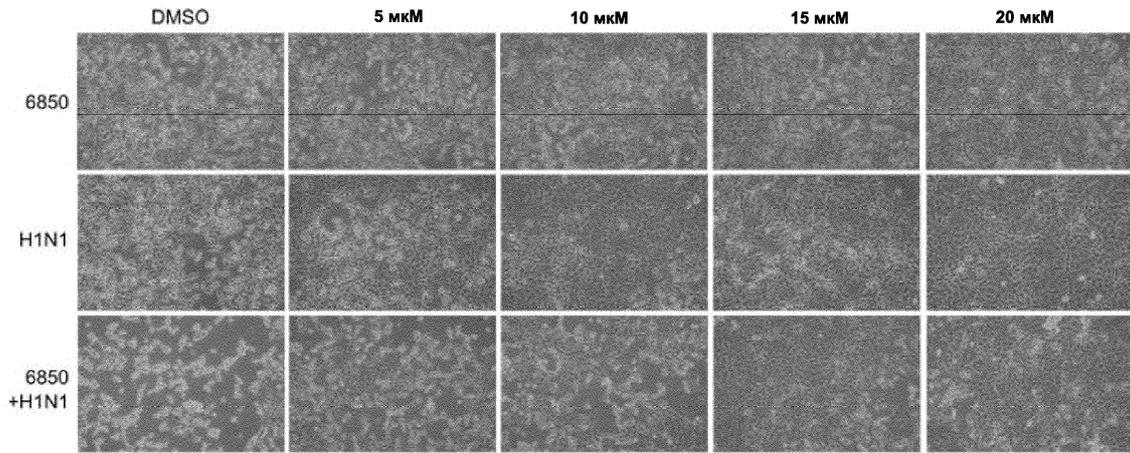
Фиг. 2



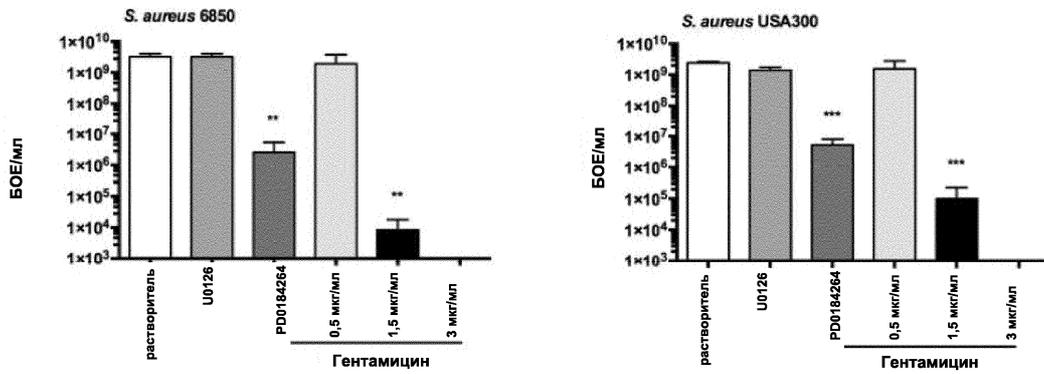
Фиг. 3



Фиг. 4

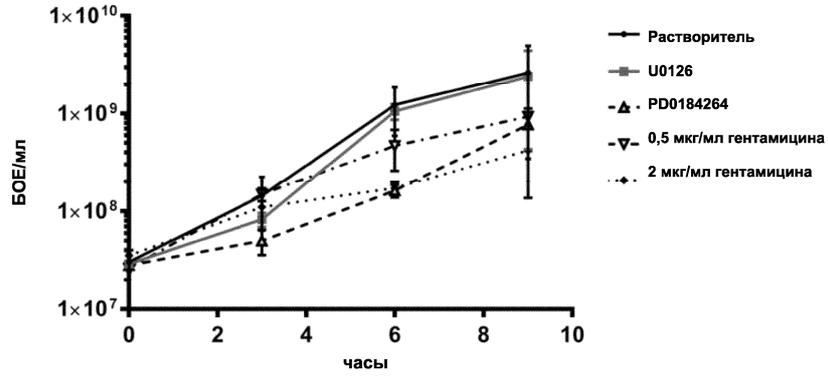


Фиг. 5

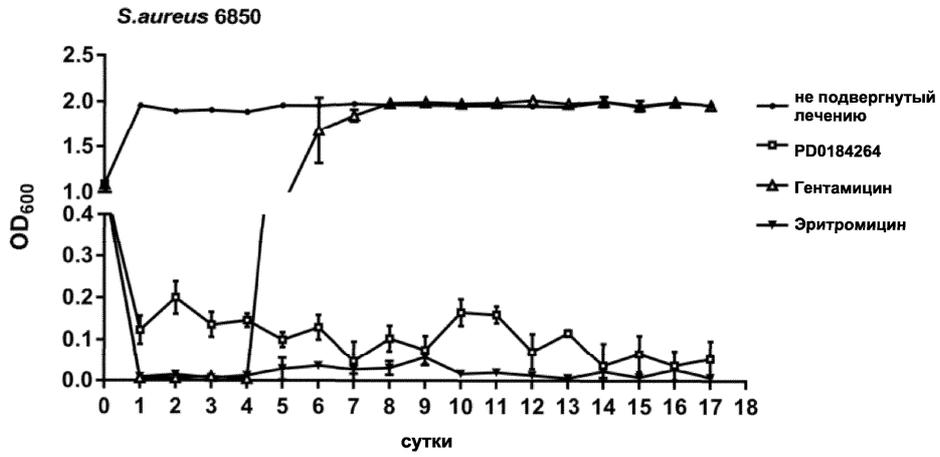


Фиг. 6

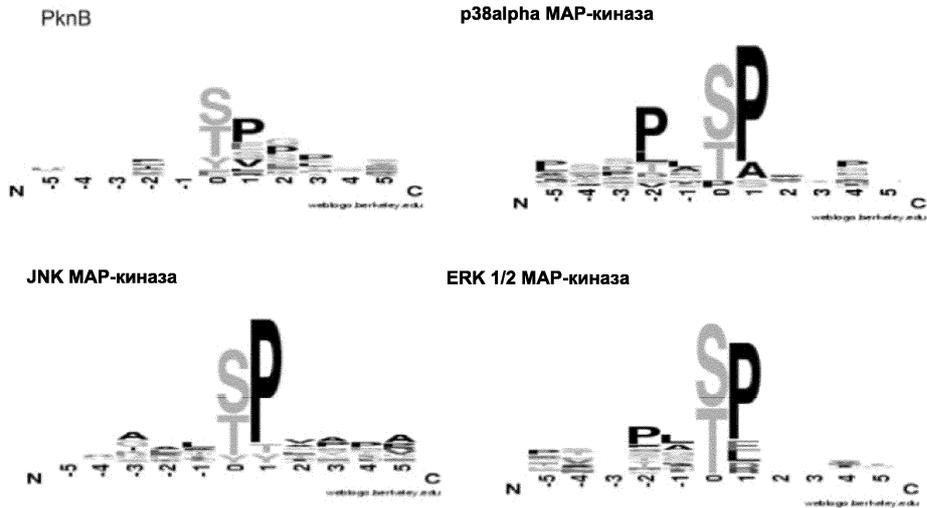
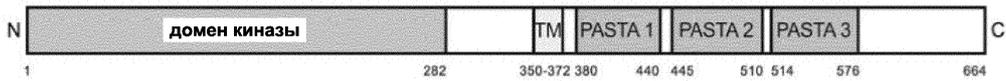
A



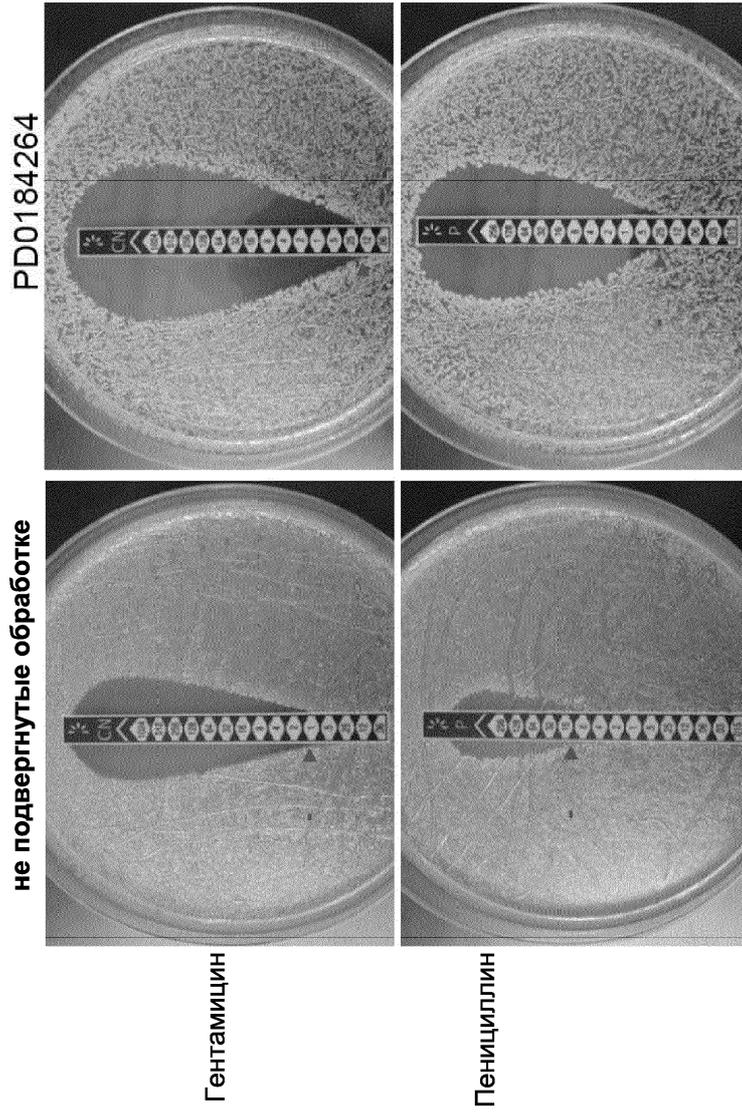
B



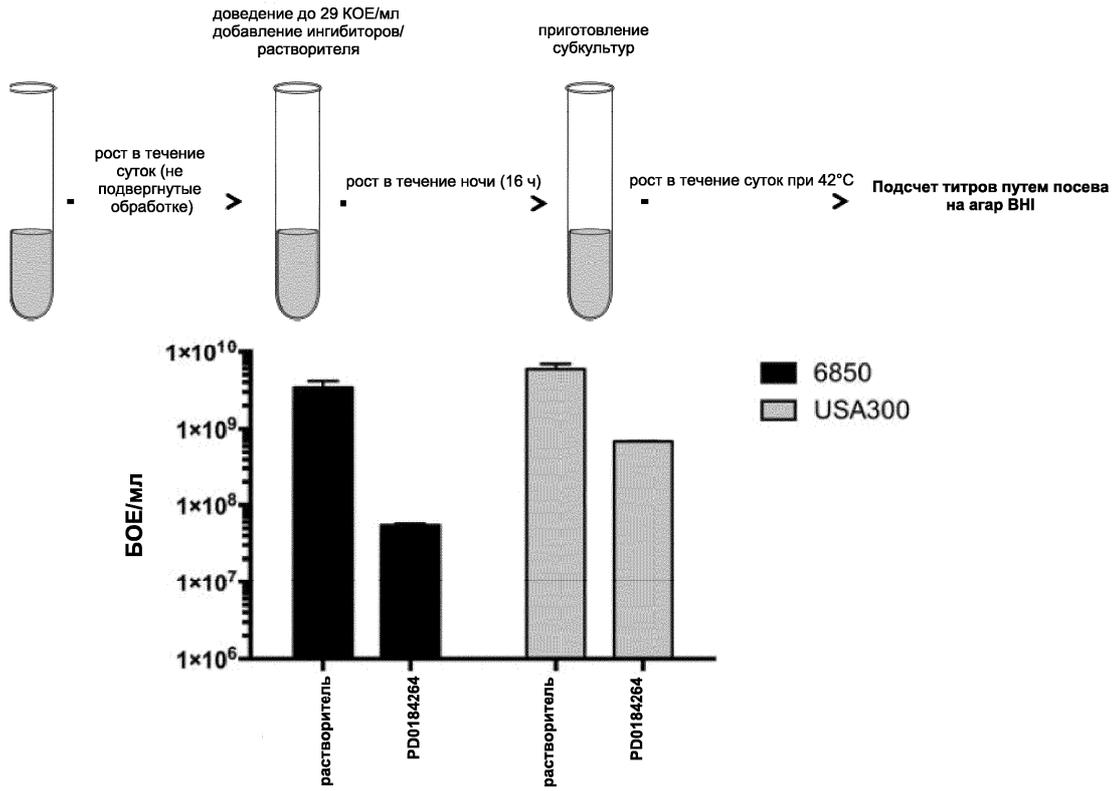
Фиг. 7



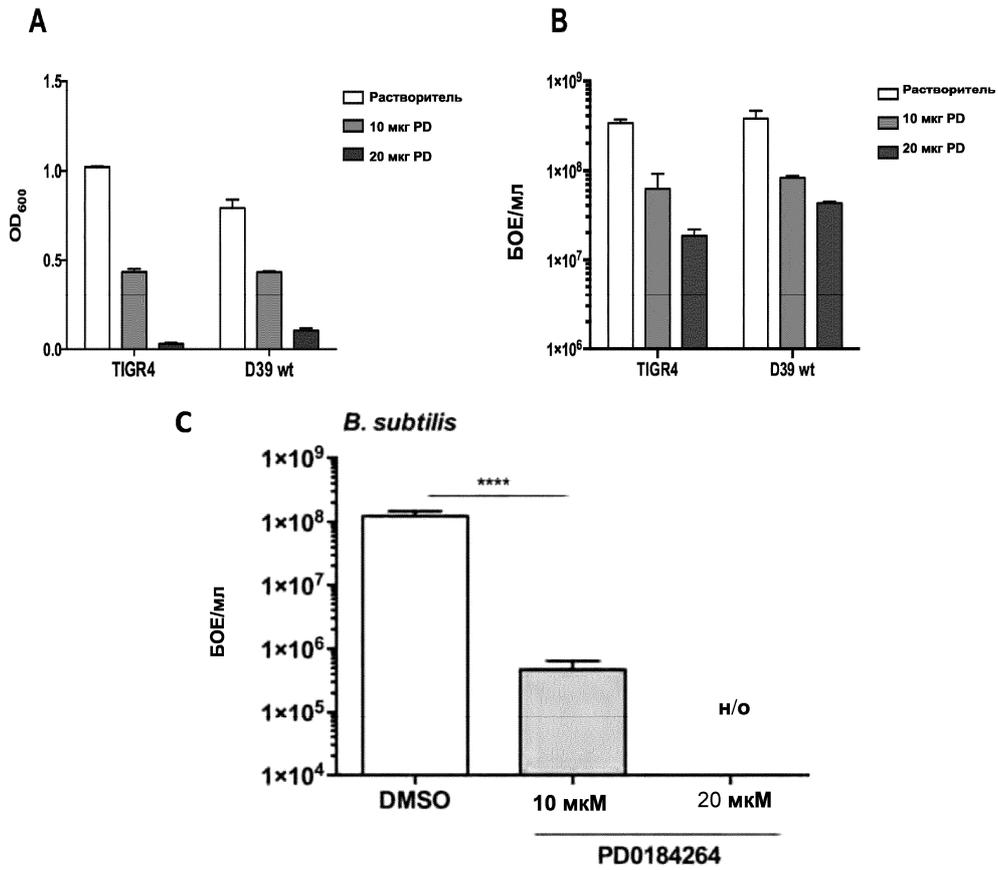
Фиг. 8



Фиг. 9



Фиг. 10



Фиг. 11

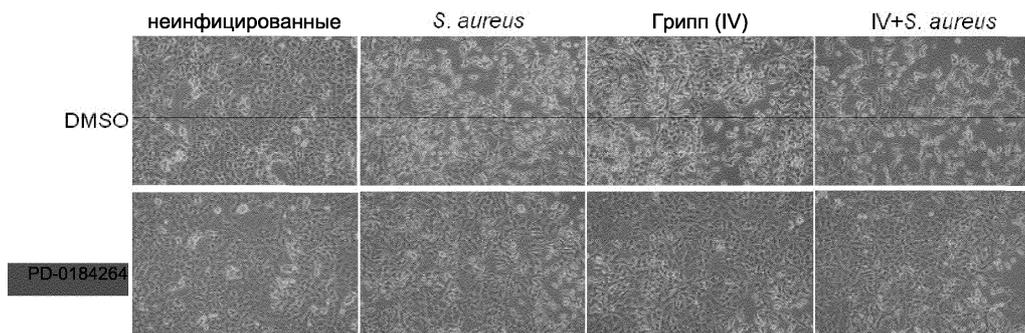
Таблица 1

Класс антибиотиков	Родовые названия
Аминогликозиды	Амикацин, Гентамицин, Канамицин, Неомицин, Нетилмицин, Тобрамицин, Паромомицин, Спектиномицин
Ансамицины	Гелданамицин, Гербимицин, Рификсимицин, Стрептомицин
Карбацефемы	Лоракарбеф
Карбапенемы	Эртапенем, Дорипенем, Имипенем/Циластатин, Меропенем
Цефалоспорины (Первого Поколения)	Цефадроксил, Цефазолин, Цефалотин, Цефалексин
Цефалоспорины (Второго Поколения)	Цефаклор, Цефамандол, Цефокситин, Цефпрозил, Цефуроксим
Цефалоспорины (Третьего Поколения)	Цефиксим, Цефдинир, Цефдиторен, Цефоперазон, Цефотаксим, Цефподоксим, Цефтазидим, Цефтибутен, Цефтизоксим, Цефтриаксон
Цефалоспорины (Четвертого Поколения)	Цефипим
Цефалоспорины (Пятого Поколения)	Цефтаромил Фосамил, Цефтобипрол
Гликопептиды	Тейкопланин, Ванкомицин, Телаванцин
Линкозамиды	Клиндамицин, Линкомицин
Липопептиды	Даптомицин
Макролиды	Азитромицин, Кларитромицин, Диритромицин, Эритромицин, Рокситромицин, Тролеандомицин, Телитромицин, Спирамицин
Монобактамы	Азтреонам
Нитрофураны	Фуразолидон, Нитрофурантоин
Оксазолидиноны	Линезолид, Позизолид, Радезолид, Торезолид
Пенициллины	Амоксициллин, Ампициллин, Азлоциллин, Карбенициллин, Клоксациллин, Диклоксациллин, Флуклоксациллин, Мезлоциллин, Метициллин, Нафциллин, Оксациллин, Пенициллин G, Пенициллин V, Пиперациллин, Пенициллин G, Темоциллин, Тикарциллин
Комбинации Пенициллина	Амоксициллин/Клавуланат, Ампициллин/Сульбактам, Пиперациллин/Тазобактам, Тикарциллин/Клавуланат

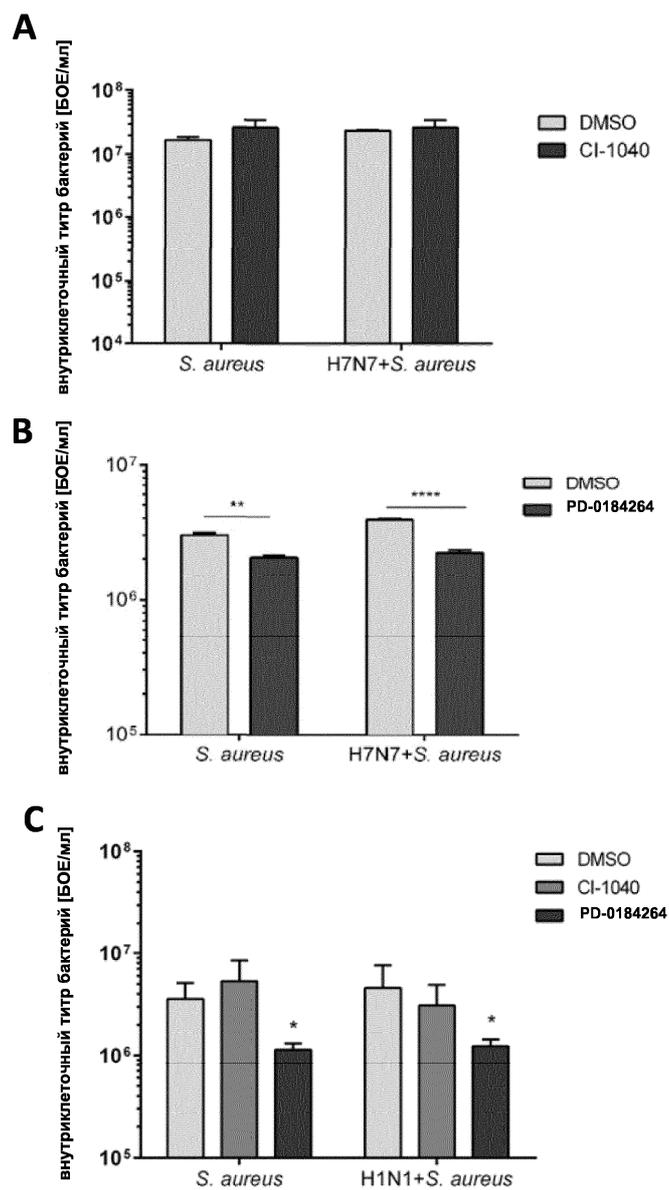
Полипептиды	Бацитрацин, Колистин, Полимиксин В
Хинолоны/ Фторхинолоны	Ципрофлоксацин, Эноксацин, Гатифлоксацин, Гемифлоксацин, Левофлоксацин, Ломефлоксацин, Моксифлоксацин, Налидиксовая Кислота, Норфлоксацин, Офлоксацин, Тровафлоксацин, Грепафлоксацин, Спарфлоксацин, Темафлоксацин
Сульфонамиды	Мафенид, Сульфацетамид, Сульфадиазин, Сульфадиазин Серебра, Сульфадиметоксин, Сульфаметизол, Сульфаметоксазол, Сульфанилимид (Архаичный), Сульфасалазин, Сульфизоксазол, Триметоприм-Сульфаметоксазол (Котримоксазол) (TMP-SMX), Сульфонамидокризоидин (Архаичный)
Тетрациклины	Демеклоциклин, Доксциклин, Миноциклин, Окситетрациклин, Тетрациклин

Лизостафин	представляет собой металлоэндопептидазу <i>Staphylococcus simulans</i> . Может действовать в качестве антимикробного средства против <i>Staphylococcus aureus</i> .
------------	---

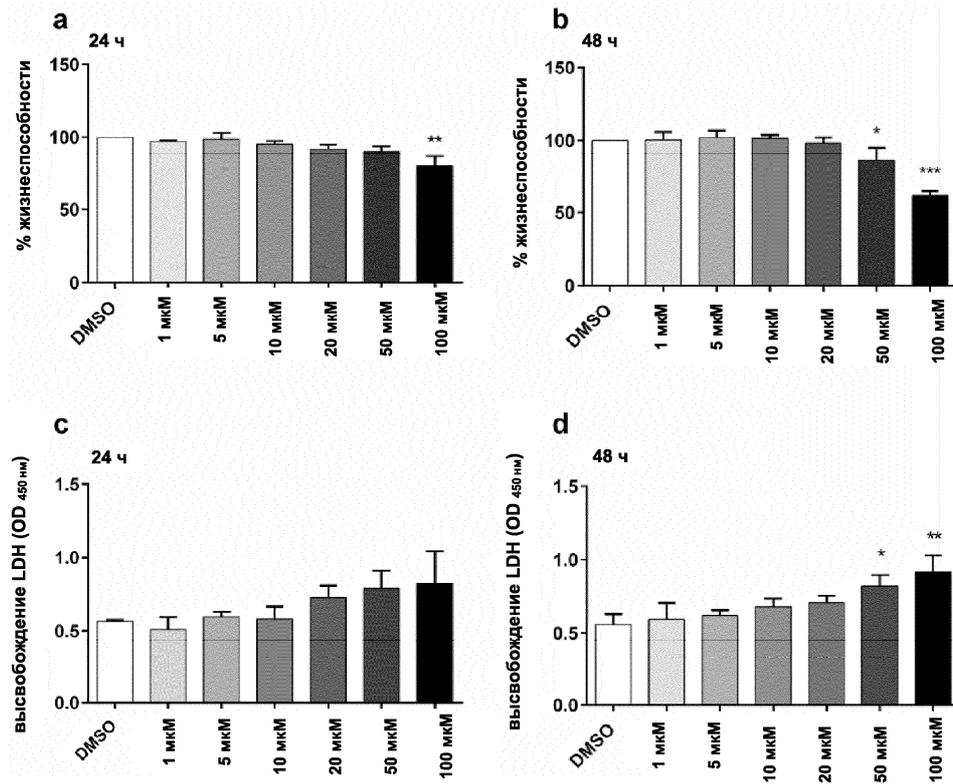
Фиг. 12



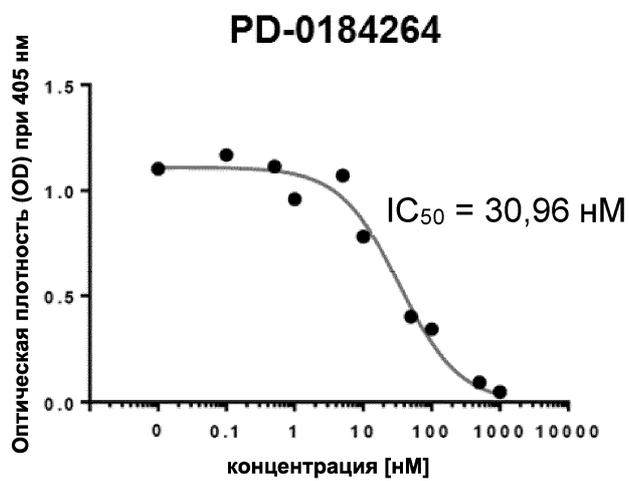
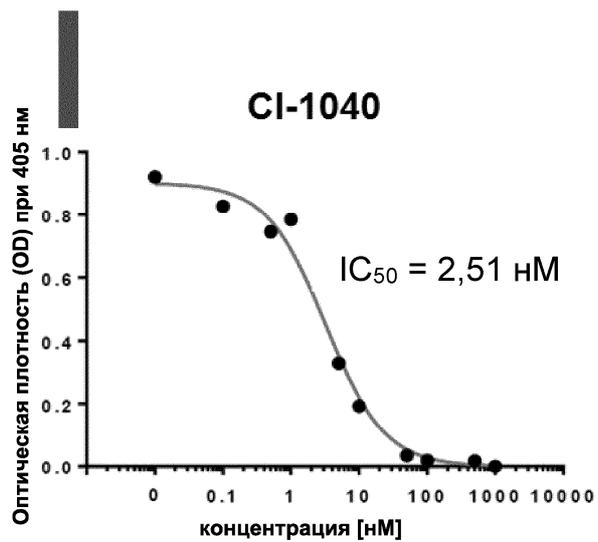
Фиг. 13



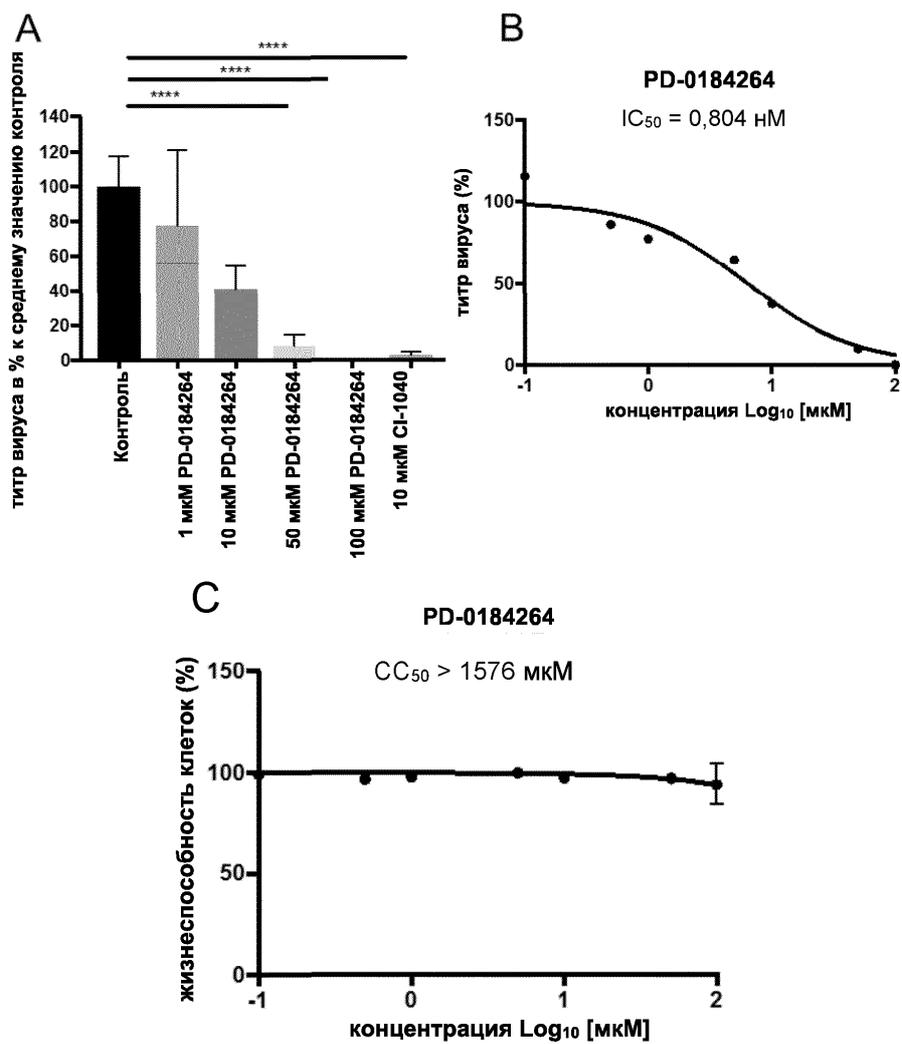
Фиг. 14



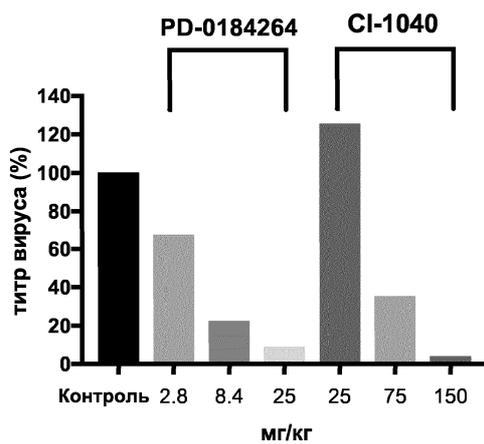
Фиг. 15



Фиг. 16



Фиг. 17



Фиг. 18

А



В



Фиг. 19

