

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202293206** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2023.03.07

(22) Дата подачи заявки
2021.05.20

(51) Int. Cl. *A61K 31/166* (2006.01)
A61K 31/18 (2006.01)
A61K 31/4184 (2006.01)
A61K 31/44 (2006.01)
A61K 31/4523 (2006.01)
A61K 31/519 (2006.01)
A61P 31/14 (2006.01)

(54) **ИНГИБИТОРЫ МЕК ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ИЛИ ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ
КОРОНАВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ И/ИЛИ ЦИТОКИНОВОГО ШТОРМА ПРИ
COVID-19**

(31) **20175739.0**

(32) **2020.05.20**

(33) **EP**

(86) **PCT/EP2021/063485**

(87) **WO 2021/234097 2021.11.25**

(71) Заявитель:
**АТРИВА ТЕРАПЬЮТИКС ГМБХ
(DE)**

(72) Изобретатель:

**Людвиг Стефан, Планц Оливер,
Хоффманн Хелен Элиза, Кох-Хайер
Юлиа, Шиндлер Михель (DE)**

(74) Представитель:

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

(57) Изобретение относится к ингибиторам МЕК для применения в способе лечения коронавирусной инфекции и/или лечения или предупреждения цитокинового шторма при COVID-19. Также предложены композиции, содержащие указанные ингибиторы, для применения в лечении коронавирусной инфекции, такой как COVID-19.

A1

202293206

202293206

A1

PCT/EP2021/063485

МПК: *A61K 31/166* (2006.01) *A61K 31/4523* (2006.01)
A61K 31/18 (2006.01) *A61K 31/519* (2006.01)
A61K 31/4184 (2006.01) *A61P 31/14* (2006.01)
A61K 31/44 (2006.01)

ИНГИБИТОРЫ МЕК ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ИЛИ ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ
КОРОНАВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ И/ИЛИ ЦИТОКИНОВОГО ШТОРМА
ПРИ COVID-19

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к применению ингибиторов МЕК (киназа митоген-активируемой протеинкиназы) для лечения или предупреждения коронавирусных инфекций и/или лечения или предупреждения цитокинового шторма при COVID-19.

ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Группа коронавирусов состоит из покрытых оболочкой вирусов с цепью (+)РНК, относящихся к семейству *Coronaviridae*, и содержит подтипы коронавирусов, обозначаемые альфа, бета, гамма и дельта. Альфа и бета поражают животных, тогда как гамма поражает птиц, а дельта может поражать и тех, и других. Семейство коронавирусов содержит несколько хорошо известных представителей, вызывающих заболевания. Семейство бетакоронавирусов до настоящего времени представляло наибольший риск для человека и сейчас включает большинство хорошо известных вирусных мишеней, включая коронавирус, вызывающий тяжелый острый респираторный синдром (SARS-CoV), ответственный за гибель 774 человек в 2003, коронавирус, вызывающий Ближневосточный респираторный синдром (MERS-CoV), предположительно убивший 858 человек в 2012, и недавно возникшую форму, новый коронавирус (SARS-CoV-2), который на начало мая 2020 стал причиной гибели более 250000 человек во всем мире. В целом, коронавирусы представляют непрерывную и даже нарастающую угрозу для человеческой жизни.

При том, что различные подтипы коронавирусов могут инфицировать хозяев различных типов, общая биохимическая структура вируса схожа. У коронавирусов часто происходит рекомбинация. Как упоминалось выше, SARS-CoV-2 является

представителем подрода *Sarbecovirus* (бета-CoV линия В). Его последовательность РНК имеет длину приблизительно 30000 оснований, относительно большую для коронавирусов. Его геном состоит почти полностью из кодирующих белок последовательностей, признак общий для других коронавирусов. SARS-CoV-2 уникален среди известных бетакоронавирусов тем, что включает многоосновной сайт, расщепляемый фурином, признак, как известно, повышающий патогенность и трансмиссивность у других вирусов. На 12 января 2020 в г. Ухань было выделено пять геномов SARS-CoV-2 и описано Китайским центром по контролю и предупреждению заболеваний (CCDC) и другими учреждениями; к 30 января 2020 число геномов увеличилось до 42. Филогенетический анализ этих образцов показал, что они были «близкородственными и имели самое большее семь мутаций по отношению к общему предшественнику», что означает, что первое инфицирование человека произошло в ноябре или декабре 2019. На 7 мая 2020 в открытом доступе было 4690 геномов SARS-CoV-2, образцы которых были получены на шести континентах. Первый геном SARS-CoV-2, секвенированный из изолята Wuhan-Hu-1, получил регистрационный номер NCBI 86693, и считается, что он представляет SARS-CoV-2 дикого типа. В июле 2020 ученые сообщили, что в ходе пандемии более заразный вариант SARS-CoV-2 с вариантом белка шипа G614 вытеснил D614 как доминантную форму. Существует множество тысяч вариантов SARS-CoV-2, из которых несколько считаются все более доминирующими в различных регионах, такие как Британский вариант В.1.1.7, Южно-Африканский вариант В.1.351, Бразильские варианты Р.1 и Р.2 или Индийский вариант В.1.617.

Несмотря на текущие попытки разработать вакцины против патогенной для человека коронавирусной инфекции и, в частности, против SARS-CoV-2, остается потребность в альтернативных или улучшенных композициях и способах лечения и/или предупреждения заболеваний, вызванных патогенными для человека коронавирусами, в особенности с учетом возникновения вариантов вируса.

Пандемия COVID-19 в 2019/2021, вызванная SARS-CoV-2, ясно показывает, что коронавирусы оказывают сильное влияние на системы здравоохранения во всем мире. Профилактическая вакцинация была недоступна, и только одно противовирусное лекарственное средство, ремдесивир, было предварительно одобрено для COVID-19,

однако в настоящее время считается лишь умеренно эффективным. К маю 2021 было разработано несколько вакцин, ставших доступными с конца 2020. Ожидается, что к концу 2021 во всем мире будет вакцинирован определенный процент популяции, однако остается непонятным, насколько вакцины, одобренные в 2021, эффективны против существующих и возникающих вариантов SARS-CoV-2, таких как Британский вариант B.1.1.7, Южно-Африканский вариант B.1.351, Бразильские варианты P.1 и P.2 или Индийский вариант B.1.617. Таким образом, вероятно, что варианты SARS-CoV-2 продолжают появляться и вызывать COVID-19. Предпринимались различные попытки лечения COVID-19 доступными лекарственными средствами, однако на данный момент ни одно не оказалось очень эффективным. Это подчеркивает острую необходимость в дополнительных эффективных противовирусных средствах для лучшего контроля инфекции, вызванных коронавирусами в целом и SARS-CoV-2 в частности. Примечательно, что на ранней фазе пандемии, когда не была доступна вакцина, противовирусные средства являются единственным в своем роде лечением. Это же касается и вариантов вируса, против которых вакцины не эффективны.

В случае COVID-19 клинический спектр инфекции SARS-CoV-2 широкий, охватывающий бессимптомную инфекцию, легкую форму заболевания верхних дыхательных путей и тяжелую вирусную пневмонию с дыхательной недостаточностью и даже летальным исходом, с госпитализацией большого количества пациентов. Широко принято использование 3-уровневой системы классификации, с признанием того, что при заболевании COVID-19 наблюдаются три степени увеличения тяжести, соответствующие определенной клинической картине, ответу на терапию и клиническому исходу. Несмотря на большое число инфицированных исходным вирусом Sars-CoV-2, 80% всех пациентов с положительными результатами тестирования испытывали только легкие симптомы, 20% демонстрировали признаки гипоксемии, приводящие к госпитализации, и только 5% нуждались в лечении в отделениях интенсивной терапии (ICU). Однако такая статистика не обязательно будет справедлива для возникающих вариантов вируса, в частности, Индийский вариант, по-видимому, приводит к большему числу пациентов с клиническими проявлениями, имеющих тяжелую гипоксемию, требующую госпитализации и интенсивной терапии. Для лечения COVID-19 важно понимать стадии инфекции. Эти стадии описаны Hasan et al.

в публикации, озаглавленной “COVID-19 Illness in Native and Immunosuppressed States: A Clinical-Therapeutic Staging Proposal”, и в кратком виде изложены ниже.

Начальная стадия, обозначаемая как стадия I, представляет собой легкую инфекцию и возникает во время инокуляции и в начале развития заболевания. Для большинства людей это включает инкубационный период, ассоциированный с легкими и зачастую неспецифическими симптомами в течение нескольких суток, такими как слабость, жар и сухой кашель. У пациентов, которым удается сдержать вирус на этой стадии COVID-19, прогноз и выздоровление очень хорошие. Лечение на данной стадии прежде всего нацелено на облегчение симптомов. В случае, если будет доказана польза противовирусной терапии, отбор отдельных пациентов на этой стадии может сократить продолжительность симптомов, минимизировать контагиозность и предотвратить прогрессирование тяжести. Кроме того, противовирусное средство раннего действия может оказаться эффективным для предупреждения прогрессирования заболевания у бессимптомных или находящихся на Стадии I COVID-19 пациентов. Благодаря увеличению общего количества тестирований, выявлено больше бессимптомных пациентов, которым может быть полезно профилактическое лечение во избежание прогрессирования заболевания. В настоящее время не существует лечения для бессимптомных или находящихся на Стадии I COVID-19 пациентов. Кроме того, не известно профилактического или превентивного лечения, которое можно применять в случаях, когда имел место тесный контакт с индивидуумом, заведомо положительным в отношении SARS-CoV-2.

На второй стадии установленного заболевания легких, обозначаемой как стадия II, обычно имеет место размножение вируса и локализованное в легких воспаление. Стадия II включает вовлечение легких, обозначаемое как стадия IIa при отсутствии и как стадия IIb при наличии гипоксии. На этой стадии у пациентов развивается вирусная пневмония с кашлем, жаром и возможно гипоксией. В ходе заболевания возникает затруднение дыхания в среднем через 13 суток после первого появления симптомов (диапазон 9-16,5 суток). Затруднение дыхания является признаком тяжелого заболевания дыхательных путей, легких или сердца и характеризуется затрудненным или стесненным дыханием и нехваткой воздуха. В случае COVID-19 визуализация при помощи рентгена органов грудной клетки или компьютерной томографии выявляет

двусторонние инфильтраты или затемнения по типу матового стекла. На этой стадии большинству пациентов с COVID-19 необходима госпитализация для тщательного наблюдения и оказания медицинской помощи. Лечение преимущественно заключается в поддерживающих мероприятиях и противовирусных терапиях, при их доступности. Возможно, что тем не менее у пациентов произойдет прогрессирование в стадию III, требующую механической вентиляции в отделении интенсивной терапии (ICU).

На стадии II COVID-19 могут быть повышены маркеры системного воспаления, но не так значительно. В ходе первых исследований, проведенных на первой группе пациентов в г. Ухань, Китай, было обнаружено, что при поступлении в больницу концентрации IL1бета (интерлейкин-1 бета), IL1Ральфа, IL7, IL8, IL9, IL10, основного FGF (фактор роста фибробластов), GCSF (гранулоцитарный колониестимулирующий фактор), GMCSF (гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор), IFNгамма (интерферон гамма), IP10 (интерферон-индуцибельный белок 10), MCP1 (моноцитарный хемотаксический белок 1), MIP1 α (макрофагальный воспалительный белок-1 альфа), MIP1 β , PDGF (тромбоцитарный фактор роста), TNF α (фактор некроза опухоли альфа) и VEGF (фактор роста эндотелия сосудов) в плазме были выше, чем у здоровых взрослых. Кроме того, обнаружили, что у пациентов в ICU концентрации IL2, IL7, IL10, GCSF, IP10, MCP1, MIP1 α и TNF α в плазме были выше, чем у пациентов при поступлении в больницу (Huang et al.; The Lancet; Vol 395; pp.: 497-506 February 15, 2020), что означало, что повышение этих цитокинов является маркером перехода COVID-19 со стадии II в стадию III.

У меньшей части пациентов с COVID-19 заболевание переходит в третью и наиболее тяжелую стадию, обозначаемую как стадия III, которая проявляется синдромом внелегочного системного избыточного воспаления. На этой стадии повышены маркеры системного воспаления. В целом, прогноз и выздоровление на этой критической стадии заболевания неблагоприятны.

Таким образом, существует потребность в соединениях, которые могут предотвратить прогрессирование COVID-19 со стадии II в стадию III и уменьшить тяжесть инфекции COVID-19 и летальность. Проводится несколько международных исследований, предметом которых являются композиции, уже одобренные или прошедшие клинические исследования по поводу другого заболевания. Большинство

соединений, которые рассматриваются для лечения COVID-19, относятся к одной из двух групп:

1. Противовирусные средства, которые первоначально разрабатывались против HIV (вирус иммунодефицита человека), вируса Эбола, гепатита С или гриппа. Идея заключается в том, что они блокируют репродукцию вируса или предотвращают проникновение в клетки легких. Среди прочих они включают старые лекарственные средства против малярии, которые, как известно, эффективны против вирусов. Эти противовирусные средства могут быть эффективны на стадии I и в начале стадии II Covid-19, поскольку они действуют на ранних стадиях жизненного цикла вируса.

2. Супрессорные иммуномодуляторы, разработанные для лечения ревматоидного артрита или воспалительного заболевания кишечника. Идея заключается в том, что они будут сдерживать иммунную систему, так чтобы не вызывать большее повреждение, нежели сам вирус. Они могут быть эффективны на поздней Стадии II и Стадии III Covid-19, поскольку они подавляют образование цитокинов.

В 2020 было начато несколько международных исследований для проверки эффективности ремдесивира (ингибитор РНК-полимеразы), ритонавира или лопинавира (лекарственные средства против HIV), интерферонов бета и/или хлорохина или гидроксихлорохина (лекарственные средства против малярии). Однако к настоящему времени ни один из них не оказался особо эффективным, поэтому остается острая необходимость в эффективном альтернативном лечении для пациентов с COVID-19.

В начале мая 2020 FDA (Управление по надзору в сфере пищевых продуктов и лекарственных средств) США выдало экстренное разрешение на применение противовирусного средства ремдесивир в лечении госпитализированных пациентов с COVID-19. Ремдесивир представляет собой ингибитор РНК-полимеразы, который первоначально разрабатывался для лечения Эбола, при котором он оказался неэффективным. Ремдесивир был одобрен только для лечения госпитализированных пациентов с тяжелыми симптомами, которые можно классифицировать как стадию III COVID-19. Однако, несмотря на то, что в клинических исследованиях было обнаружено, что ремдесивир сокращает длительность госпитализации пациентов,

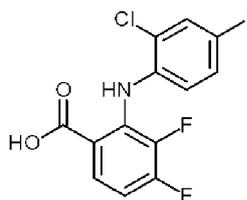
существенного влияния на летальность выявлено не было.

С учетом сведений, известных в уровне техники, и множества текущих исследований, очевидно, что существует потребность в новых соединениях и композициях, эффективных в лечении и предупреждении заболеваний, вызванных коронавирусами, в особенности заболеваний дыхательных путей, таких как COVID-19. В частности, существует потребность в лекарственных средствах для предупреждения ранней коронавирусной инфекции, в особенности SARS-CoV-2, и для лечения пациентов с COVID-19 Стадии II и Стадии III, для предупреждения прогрессирования заболевания и снижения летальности.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Решением вышеупомянутой задачи, предложенным в данном документе, является предоставление ингибиторов МЕК для лечения коронавирусной инфекции. В частности, ингибиторы МЕК оказались полезными в лечении стадии II COVID-19, поскольку они предотвращают как размножение вируса, так и выход из клеток-хозяев за счет блокирования МЕК киназы, а также снижают иммунные ответы, в конечном счете приводящие к стадии III COVID-19. Благодаря такому двойному механизму ингибиторы МЕК, и, в частности, ATR-002, также обозначаемый как PD-0184264, являются особенно перспективными в лечении стадии II COVID-19. Кроме того, ингибиторы МЕК могут оказаться полезными в предупреждении прогрессирования заболевания от стадии II в стадию III и в лечении стадии III COVID-19.

Ингибиторы МЕК уже известны как химиотерапевтические средства и разрабатывались авторами настоящего изобретения для применения в лечении или предупреждении вирусных инфекций, в частности вируса гриппа и хантавируса. ATR-002, также обозначаемый как PD-0184264, является метаболитом CI-1040, изначально описанным среди химиотерапевтических средств в 2004 (Wabnitz et al.), находящийся в предупреждении вирусных заболеваний, таких как коронавирусная инфекция. ATR-002 имеет химическую структуру, показанную ниже:



PD-0184264 является одним из нескольких метаболитов CI-1040 (Wabnitz et al., 2004, LoRusso et al., 2005). Однако механизмы, изученные на PD-0184264, касающиеся роли МЕК в коронавирусных инфекциях, в равной мере относятся и к другим ингибиторам МЕК.

По этой причине настоящее изобретение относится к ингибитору МЕК для применения в способе лечения заболевания, вызванного коронавирусом у субъекта-человека, где субъект-человек госпитализирован. В некоторых аспектах заболевание представляет собой острое респираторное заболевание, такое как вызванное SARS-CoV-1, SARS-CoV-2 или MERS. В контексте настоящего изобретения коронавирус может представлять собой SARS-CoV-2, а соответствующий пациент, подлежащий лечению, страдает COVID-19. Применение ингибитора МЕК по изобретению особенно полезно, когда COVID-19 представляет собой COVID-19 стадии II.

Как упоминалось выше, ингибитор МЕК может быть выбран из группы, состоящей из PD-0184264, CI-1040, GSK-1120212, GDC-0973, биниметиниба, селуметиниба, PLX-4032, AZD6244, AZD8330, AS-703026, RDEA-119, RO-5126766, RO-4987655, PD-0325901, TAK-733, AS703026, PD98059 и PD184352 или их фармацевтически приемлемой соли или метаболита. Предпочтительно, ингибитор МЕК представляет собой PD-0184264 или его фармацевтически приемлемую соль.

В предпочтительной лекарственной форме PD-0184264 или его фармацевтически приемлемую соль вводят субъекту-человеку один раз в сутки в дозе от 100 до 1000 мг, предпочтительно от 300 до 900 мг, наиболее предпочтительно 300, 600 или 900 мг.

В частности, PD-0184264 применяют для лечения госпитализированного пациента-человека, страдающего COVID-19, вызванным SARS-CoV-2. Предпочтительно, COVID-19 представляет собой COVID-19 стадии II. PD-0184264 можно вводить субъекту-человеку от 1 до 21 суток подряд, предпочтительно, от 5 до 18 или от 7 до 14 суток подряд после госпитализации. Предпочтительно, PD-0184264 вводят субъекту-человеку в пероральной лекарственной форме.

В еще одном аспекте ингибитор МЕК по изобретению применяют для лечения госпитализированного пациента-человека, где коронавирус устойчив к предшествующему противовирусному лечению, такому как ремдесивир. Кроме того,

ингибитор MEK можно применять для лечения госпитализированного субъекта-человека в возрасте старше 60 лет или относящегося к группе очень высокого риска по коронавирусной инфекции.

Изобретение также направлено на применение ингибитора MEK в лечении или предупреждении цитокинового шторма при COVID-19 у субъекта, инфицированного коронавирусом человека. Ингибитор MEK предпочтительно выбран из группы, состоящей из PD-0184264, CI-1040, GSK-1120212, GDC-0973, биниметиниба, селуметиниба, PLX-4032, AZD6244, AZD8330, AS-703026, RDEA-119, RO-5126766, RO-4987655, PD-0325901, TAK-733, AS703026, PD98059 и PD184352 или их фармацевтически приемлемой соли или метаболита.

Применение ингибитора MEK в лечении или предупреждении у субъекта цитокинового шторма при COVID-19 может включать снижение уровня IL-1 β и/или TNF- α у субъекта, предпочтительно снижение у субъекта уровня одного или более, двух или более, трех или более, четырех или более, пяти или более или всех шести из TNF- α , IL-1 β , IP-10, IL-6, IL-8, MCP-1, MIP-1 α и MIP-1 β .

В соответствии с вышеизложенным, изобретение также направлено на способ лечения или предупреждения цитокинового шторма при COVID-19 у субъекта, страдающего от инфекции SARS-CoV-2, где способ включает введение субъекту ингибитора MEK. Этот способ может включать снижение уровня IL-1 β и/или TNF- α у субъекта (в крови или плазме), предпочтительно снижение у субъекта уровня (в крови или плазме) одного или более, двух или более, трех или более, четырех или более, пяти или более или всех шести из TNF- α , IL-1 β , IP-10, IL-6, IL-8, MCP-1, MIP-1 α и MIP-1 β .

SARS-CoV-2, подлежащий лечению, может представлять собой исходный штамм дикого типа и/или один или более вариантов. Примеры вариантов SARS-CoV-2, которые можно лечить, включают, но без ограничения ими, варианты D614G, B.1.351, B.1.1.7, P1, P2, B.1.617, B.1.427, B.1.429, B.1.525 и B.1.526.

В еще одном аспекте изобретение относится к ингибитору MEK, применяемому в предупреждении развития симптомов, вызванных коронавирусной инфекцией человека у бессимптомного субъекта, инфицированного коронавирусом человека, или для предупреждения коронавирусной инфекции человека у субъекта, бывшего в тесном контакте с лицом, инфицированным коронавирусом человека, где ингибитор MEK

предпочтительно выбран из группы, состоящей из PD-0184264, CI-1040, GSK-1120212, GDC-0973, биниметиниба, селуметиниба, PLX-4032, AZD6244, AZD8330, AS-703026, RDEA-119, RO-5126766, RO-4987655, PD-0325901, TAK-733, AS703026, PD98059 и PD184352 или их фармацевтически приемлемой соли или метаболита. В свою очередь, коронавирус может представлять собой SARS-CoV, SARS-CoV-2 или MERS или вариант SARS-CoV-2, предпочтительно выбранный из группы, состоящей из D614G, B.1.351, B.1.1.7, P1, P2, B.1.617, B.1.427, B.1.429, B.1.525 или B.1.526.

Наконец, частью изобретения являются фармацевтические композиции, содержащие ингибиторы MEK для применения и медицинского лечения, описанные в л

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Фиг. 1. На **Фиг. 1(A)** показаны результаты анализа методом вестерн-блоттинг клеток CaCo-2, инфицированных SARS-CoV-2 и обработанных ATR-002

В клетках CaCo-2, инфицированных SARS-CoV-2 и обработанных ATR-002, определяли pERK1/2 (фосфорилированная внеклеточная сигнал-регулируемая киназа 1/2), ERK1/2 (внеклеточная сигнал-регулируемая киназа 1/2) и белок нуклеокапсида. Неинфицированные клетки (ложноинфицированные) использовали в качестве контроля.

На **Фиг. 1(B)-(D)** показаны сравнение фосфорилирования ERK и корреляция с белком нуклеокапсида в инфицированных SARS-CoV-2 клетках CaCo-2, обработанных ATR-002

На **Фиг. 1(B)** показано фосфорилирование ERK. Площадь под пиком использовали для нормализации pERK1/2 к ERK1/2 и расчета значений фосфорилирования ERK в %.

На **Фиг. 1(C)** показана концентрация белка нуклеокапсида клеток CaCo-2, обработанных ATR-002 в различных концентрациях, в сравнении с контролем DMSO (диметилсульфоксид).

На **Фиг. 1(D)** показан вирусный титр (БОЕ(бляшкообразующие единицы)/мл) клеток CaCo-2, обработанных ATR-002 в различных концентрациях, в сравнении с контролем DMSO.

Фиг. 2. (A) показано заражение SARS-CoV-2 клеток Vero после ингибирования MEK.

(B) показано определение вирусного гена RdRP при заражении SARS-CoV-2 после ингибирования MEK.

Фиг. 3. Способность SARS-CoV-2 к репликации в клетках Calu-3 и возможная активация ERK в присутствии SARS-CoV-2

Фиг. 4. Нокдаун ERK приводит к снижению титров образующихся вирусных потомков.

Фиг. 5. Обработка ATR-002 эффективна в отношении SARS-CoV-2 в различных системах клеток-хозяев.

Фиг. 6. Ингибирование MEK посредством ATR-002 приводит к снижению вирусных титров.

Фиг. 7. Обработка ATR-002 эффективна в отношении Южно-Африканского варианта SARS-CoV-2

Фиг. 8. ATR-002 снижает экспрессию генов цитокинов и хемокинов на модели острого повреждения легких (ALI) у мышей.

Фиг. 9. ATR-002 снижает провоспалительный цитокиновый/хемокиновый ответ после инфицирования SARS-CoV-2 клеток CaCo2.

Фиг. 10. Ингибирование MEK при помощи ATR-002 приводит к снижению экспрессии провоспалительных цитокинов.

Фиг. 11 Ингибирование MEK при помощи ATR-002 не вызывает ответ IFN, но снижает экспрессию провоспалительного IL-8 после стимуляции поли (I:C).

Фиг. 12 ATR-002 снижает провоспалительный цитокиновый/хемокиновый ответ в PMBC (моноклеарные клетки периферической крови).

Фиг. 13. Схематическое изображение модуляции чрезмерного цитокинового ответа после обработки ATR-002.

Фиг. 14. Обнаружили, что ATR-002 существенно подавляет дозозависимым образом стимуляцию цитокинов/хемокинов при стимуляции анти-CD3, стимуляции ConA и стимуляции РНА

Фиг. 15. Стадии COVID-19 согласно Hasan et al.

Фиг. 16. Эффективность ATR-002 в отношении SARS-CoV-2 на модели заражения хомячков. (A-E) Представлены индивидуальные данные и медианные значения. (F) Потеря массы тела на 4 сутки после инфицирования в процентах по

сравнению с массой тела на момент заражения. Данные анализировали посредством однофакторного ANOVA (дисперсионный анализ) с множественными сравнениями. Представлены значения P.

Фиг. 17. ATR-002 блокирует образование частиц вирусных потомков в культурах на границе раздела воздух-жидкость.

Фиг. 18. Активация ERK при инфицировании SARS-CoV-2 зависит от экспрессии hACE2

Фиг. 19. Снижение ACE2 в клетках Calu-3 после обработки ATR-002

Фиг. 20. ATR-002 способен блокировать репликацию SARS-CoV-2 в клетках со сверхэкспрессией ACE2.

Фиг. 21 и 22. Ингибиторы MEK способны предупреждать инфицирование псевдотипированным VSV (вирус везикулярного стоматита), несущим белок шипа SARS-CoV-2, после предварительной инкубации.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Описание, следующее ниже, содержит информацию, которая может быть полезна для понимания настоящего изобретения. Это не является допущением, что какая-либо представленная здесь информация является предшествующим уровнем техники или релевантна в отношении заявленных в настоящей заявке изобретений, или что любая публикация, цитируемая прямо или косвенно, является предшествующим уровнем техники.

Как указано выше, настоящее изобретение относится к ингибиторам MEK для применения в способе лечения вирусного заболевания, вызванного коронавирусом, у госпитализированного пациента-человека. Как показано в Примерах, авторы изобретения продемонстрировали, что ингибиторы MEK имеют неожиданный двойной эффект в лечении заболеваний, вызванных коронавирусами, таких как COVID-19. Настоящее изобретение также относится к лечению или предупреждению цитокинового шторма при COVID-19 у пациента, инфицированного SARS-CoV-2. Кроме того, обнаружили, что ингибиторы MEK эффективны в блокировании экспрессии рецепторов ACE-2 (ангиотензинпревращающий фермент 2) и, следовательно, могут быть полезны в предупреждении развития симптомов, вызванных коронавирусной инфекцией человека у бессимптомного субъекта, инфицированного коронавирусом

человека, или для предупреждения коронавирусной инфекции человека у субъекта, бывшего в тесном контакте с лицом, инфицированным коронавирусом человека. В данном контексте «тесный контакт» в общем определяется как пребывание в течение 10 минут или более на расстоянии менее 1,5 метров, либо на открытом воздухе, либо в замкнутом пространстве рядом с человеком, имеющим положительные результаты тестирования. Институт Роберта Коха (RKI) в Германии на 19 мая 2021 определяет лиц, находившихся в тесном контакте с лицом, заведомо инфицированным коронавирусом человека, как имеющих повышенный риск инфицирования, если они имели:

1. Тесный контакт (менее 1,5 метров) в течение более 10 минут без надлежащей защиты, такой как маска FFP2,
2. Разговор лицом-к-лицу (ближе 1,5 метров), независимо от продолжительности разговора, без надлежащей защиты, такой как маска FFP2, или при непосредственном попадании выделений из дыхательных путей (кашля, чихания) и/или
3. Одновременное присутствие контактных лиц и инфицированных лиц в одной комнате с вероятной высокой концентрацией инфекционных аэрозолей, независимо от расстояния, в течение более чем 10 минут даже при ношении надлежащей защиты.

Примерами лиц, находящихся в тесном контакте, являются

- домочадцы,
- лица, непосредственно контактирующие с выделениями или биологическими жидкостями инфицированного человека, в частности, с выделениями из дыхательных путей, например, при поцелуях, кашле, чихании и так далее,
- лица, находившиеся в помещении с инфекционными аэрозолями без надлежащей циркуляции воздуха (например, при пении, занятии спортом, вечеринках, собраниях, школьных занятиях, религиозных церемониях),
- лица, имевшие контакт с инфицированным лицом на самолете, независимо от ношения маски FFP-2, и лица, сидевшие в том же ряду или в двух рядах спереди или сзади от инфицированного лица на самолете, члены экипажа или другие пассажиры, бывшие в тесном контакте, см. пункт 2 выше.

Определение «тесного контакта» несомненно может изменяться в зависимости от варианта вируса. Было показано, что некоторые варианты вируса обладают

большими скоростями передачи, что может влиять на расстояние и время, необходимые для инфицирования. По этой причине противовирусные средства, обладающие как профилактическим влиянием, так и влиянием на размножение вируса, будут особенно полезны в контексте появляющихся вариантов SARS-CoV-2.

В частности, как показано в приведенных Примерах, ATR-002 демонстрирует непосредственный эффект на размножение вируса SARS-CoV-2, а также иммуномодулирующий эффект, приводящий к снижению высвобождения цитокинов. Этот двойной эффект является неожиданным и делает ингибиторы MEK особенно подходящими для лечения пациентов со стадией II COVID-19. Как описано в разделе «Предшествующий уровень техники» выше и объясняется далее, такие пациенты являются госпитализированными, но еще не находятся на интенсивной терапии. У таких пациентов ингибирование MEK оказывает двойное влияние, выражающееся в предупреждении цитокинового шторма, который затем приводит к стадии III COVID-19, одновременно подавляя размножение вируса с остановкой прогрессирования заболевания и снижением летальности.

В первые дни после инфицирования SARS-CoV-2 наблюдается экстравазация макрофагов, нейтрофилов и NK клеток (клеток-натуральных киллеров) в инфицированную ткань легких. COVID-19 затем вызывается высвобождением воспалительных медиаторов инфицированным эпителием легких, моноцитами, дендритными клетками и альвеолярными макрофагами после заражения вирусом SARS-CoV-2. Продуцирование и секреция цитокинов и хемокинов (например, TNF- α , IL-1 β , IP-10, IL6, IL-8, MCP-1, MIP-1 β) приводит к местному и системному острому воспалению и нарушениям адаптивного иммунного ответа, носящему название «цитокинового шторма при COVID-19» (что взаимозаменяемо также обозначается в данном документе как «цитокиновый шторм») и ознаменует переход стадии II в стадию III COVID-19. Термин «цитокиновый шторм при COVID-19» здесь употребляется в обычном значении, используемом в области техники (в этой связи см. Jamilloux et al, 2020) для обозначения цитокинового шторма, который может возникнуть у субъекта, инфицированного патогенным для человека коронавирусом, в частности SARS-CoV-2. Из предварительных исследований, приведенных в Примерах, становится понятно, что ингибиторы MEK в целом и ATR-002 в частности будут способны одновременно

уменьшать размножение вируса и предупреждать цитокиновый шторм, подавляя высвобождение цитокинов (в этой связи см. **Фиг. 13**). Такой двойной эффект является неожиданным и отличается от других противовирусных средств, изучаемых в настоящее время в отношении эффективности в лечении COVID-19, таких как ремдесивир.

В связи с пандемией COVID-19 авторы изобретения заинтересовались тем, использует ли SARS-CoV-2 путь MEK для размножения вирусов. Для этого было необходимо вначале получить изолят SARS-CoV-2 (изолят «FI»), а затем определить, какие из имеющихся в наличии клеток можно инфицировать вирусом. Мишенью ингибиторов MEK в целом и ATR-002 в частности является фактор MEK клеток-хозяев, дозозависимый ответ на ATR-002 зависит не от вируса, а от ингибирования киназы. В экспериментах *in vitro* противовирусная эффективность ATR-002 сильно зависит от статуса активации MEK в линии клеток, использующихся в эксперименте. Линия клеток CaCo2, использовавшихся для изучения SARS-CoV-2, демонстрирует высокую конститутивную активность MEK. Для сравнения также проводили эксперименты с клетками Vero. Описание использовавшихся конкретных способов можно найти в **Примере 1**, а результаты показаны на **Фиг. 1** и **2**. В частности, на **Фиг. 1** показано, что когда клетки CaCo-2, инфицированные SARS-CoV-2 (MOI 0,1), обрабатывали ATR-002 в различных концентрациях, при концентрациях ATR-002 50 и 100 мкмоль наблюдалось ингибирование фосфорилирования ERK, а также SARS-CoV-2 и белка нуклеокапсида, являющегося вирусным маркером. Такое большое количество ATR-002, необходимое для ингибирования, не связано с вирусным титром, но скорее является следствием выбора клеток CaCo2, которые имеют конститутивно активную MEK, так что требуются большие количества ингибитора MEK. Эти эксперименты показывают, что SARS-CoV-2 использует путь MEK для выхода вируса. Кроме того, на **Фиг. 2А** показано, что клетки Vero, инфицированные SARS-CoV-2 и обработанные 50 мкмоль ATR-002, имеют более низкую вирусную нагрузку по сравнению с контрольными клетками на протяжении всего периода наблюдения, и измерение гена RdRP вируса SARS-CoV-2, показанное на **Фиг. 2В**, подтверждает это. Это указывает, что ингибитор не только вызывал задержку репликации, но и существенно подавлял размножение вируса. На основании **Эксперимента 1** авторы изобретения пришли к выводу, что

SARS-CoV-2 использует путь MEK для размножения вируса.

Для проверки эффектов, обнаруженных на клетках CaCo2 и Vero, дальнейшие исследования проводили на клетках эпителия бронхов человека линии Calu-3. Вначале проверили способность SARS-CoV-2 инфицировать клетки Calu-3. После этого проверили, вызывает ли SARS CoV-2 активацию ERK в клетках Calu-3 и когда. Кроме того, проверили способность ATR-002 ингибировать репликацию SARS-CoV-2 в клетках Calu-3.

Эксперименты, описанные в **Примере 2**, показали, что клетки Calu-3 также могут быть инфицированы вирусом SARS-CoV-2. Calu-3 представляют собой линию клеток рака легкого человека, широко используемые в исследованиях рака легкого и разработке лекарственных средств против респираторных заболеваний. Клетки Calu-3 являются эпителиальными и могут служить респираторными моделями в доклинических исследованиях. Клетки Calu-3 широко используются в качестве моделей как *in vitro*, так и *in vivo* при разработке лекарственных средств против рака легкого. Клетки использовались в исследованиях доставки лекарственных средств в легкие, демонстрируя способность поглощать вещества с низкой молекулярной массой. Клетки Calu-3 служили респираторными моделями поступления воздуха и повреждения легких благодаря их способности отвечать на чужеродные вещества. В **Примере 2** удалось показать, что клетки Calu-3 могут быть инфицированы SARS-CoV-2. Для исследования способности ATR-002 ингибировать SARS-CoV-2 в клетках Calu-3 повторяли эксперименты, проведенные ранее на клетках CaCo2 и Vero, и ATR-002 был способен ингибировать SARS-CoV-2 в клетках Calu-3 дозозависимым образом. Репликация SARS-CoV-2 в клетках Calu-3 и активация ERK в жизненном цикле SARS CoV-2, а также ингибирование ATR-002. Как следует из **Фиг. 3**, SARS-CoV-2 способен реплицироваться в клетках Calu-3. Кроме того, можно видеть, что инфекция SARS-CoV-2 приводит к активации ERK на очень ранней стадии жизненного цикла вируса. Активацию ERK наблюдали через 1 ч после инфицирования. На более поздних стадиях жизненного цикла вируса дополнительной активации ERK не наблюдали, что указывало на возможную роль активации пути на ранних стадиях вирусной инфекции.

Для проверки того, что противовирусная активация ATR-002 в ходе жизненного цикла SARS-CoV-2 не является нецелевым эффектом, авторы изобретения блокировали

путь Raf/MEK/ERK генетическими способами. Так, в клетках Calu-3 осуществляли нокдаун экспрессии киназы ERK, которая является непосредственной мишенью MEK по ходу пути, при помощи специфической siRNA (малая интерферирующая РНК), как описано в Примере 28. Обнаружили, что нокдаун ERK приводит к снижению титров образующегося вирусного потомства, как можно видеть на **Фиг. 4**. Таким образом, было показано, что нокдаун ERK приводил к снижению экспрессии белка шипа и образования частиц вирусного потомства, подтверждая роль MEK/ERK в ходе жизненного цикла вируса.

Затем проверили, способен ли ингибитор MEK снизить титры SARS-CoV-2 в клетках Calu-3 сопоставимым образом, как в случае снижения, наблюдавшегося в клетках CaCo2 и Vero в **Примере 1**. В частности, для теста на снижение вирусного титра готовили 24-луночные планшеты с клетками CaCo-2, Vero E6 и Calu-3 с конфлюэнтностью 95%. Лунки однократно промывали средой для инфицирования, а затем осуществляли инфицирование SARS-CoV-2 (MOI (множественность заражения) 0,01) в течение 1 часа в 200 мкл среды для инфицирования на лунку. После того, как вирусный инокулят полностью удаляли, лунки однократно промывали средой для инфицирования и затем обрабатывали ATR-002 в различных концентрациях (100 мкмоль, 75 мкмоль, 50 мкмоль, 0 мкмоль) в количестве 1 мл на лунку в среде для инфицирования с 1% DMSO в течение 24 часов при 37°C, 5% CO₂. Супернатанты собирали через 24 часа после инфицирования и центрифугировали при максимальной скорости в течение 5 минут при 4°C для удаления клеточного дебриса. Готовили аликвоты супернатантов 140 мкл и хранили при -80°C. Титр вируса в образцах определяли при помощи RT-qPCR (количественной полимеразной цепной реакции в реальном времени). Зонд, использовавшийся для определения копий вирусной РНК, был направлен против гена N SARS-CoV-2, и результаты приведены. Как следует из **Фиг. 5**, на всех типах клеток наблюдался сопоставимый эффект.

На следующей стадии клетки Calu-3 инкубировали с увеличивающимися количествами ATR-002 в течение 24, 48 или 72 часов. Как показано на **Фиг. 6**, наблюдалось зависящее от концентрации снижение образования частиц вирусного потомства в диапазоне концентраций, не являющихся токсичными. Данный эффект поддерживался в течение всего времени инфицирования 72 часа, что указывало, что

ингибирование пути ATR-002 имело продолжительное влияние на жизненный цикл вируса. Кроме того, Фиг. 6D представляет интерес, поскольку показывает, что клетки, обработанные ATR-002, не демонстрируют характерного повреждения клеток, инфицированных SARS-CoV-2, указывая, что ATR-002 предупреждает повреждение легких.

Для проверки того, является ли ингибирование MEK эффективным лечением коронавируса человека независимо от видов или варианта, в **Примере 3** проверяли эффективность ATR-002 *in vitro* против варианта SARS-CoV-2 SA B.1351. Для проверки того, эффективен ли ATR-002 против Южно-Африканского варианта SARS-CoV-2 B.1351, использовали такую же схему эксперимента, как в Примерах 1 и 2. Как следует из **Фиг. 7**, клетки Vero и клетки Calu-3 инфицировали SARS-CoV-2 SA при MOI 0,1, 1 и 10 ATR-002. Эти эксперименты показали, что ингибиторы MEK, в частности, ATR-002, способны ингибировать коронавирусы, и в частности, варианты SARS-CoV-2.

На следующей стадии авторы изобретения пересмотрели данные, полученные ранее на модели острого повреждения легких (ALI) у мышей, представленные в **Примере 4**. В частности, на модели ALI у мышей индуцированная LPS (липополисахарид) экспрессия цитокинов и хемокинов позволяла исследовать иммуномодуляторную эффективность ATR-002 в отсутствие вирусной инфекции. На **Фиг. 9** показано, что лечение ATR-002 мышей с ALI приводит к снижению цитокинов TNF- α , IL-1 β , IP-10, IL-8, MCP-1 и MIP-1 β . Как обсуждалось в разделе «Предшествующий уровень техники» выше, согласно Huang et al., все указанные цитокины повышены у пациентов с COVID-19, а TNF- α , IP-10 и MIP-1 β повышены у пациентов со стадией III COVID-19 по сравнению с уровнями на стадии II COVID-19 при госпитализации. Это указывает, что независимо от инфицирования SARS-CoV-2, ATR-002 способен снижать экспрессию генов цитокинов и хемокинов у млекопитающих.

Для подтверждения того, что ATR-002 снижает провоспалительный цитокиновый/хемокиновый ответ после заражения SARS-CoV-2, проводили дополнительные эксперименты *in vitro* на клетках CaCo2, как описано в **Примере 5**. Клетки CaCo2 инфицировали SARS-CoV-2 и обрабатывали ATR-002. Измеряли

количества MCP-1, результаты показаны на **Фиг. 9**. В частности, обнаружили, что ATR-002 способен снижать экспрессию MCP-1 в инфицированных SARS-CoV-2 клетках. Однако для этого необходимо большое количество ATR-002, как обсуждалось в **Примере 1**, что обусловлено конститутивной активацией пути MEK в клетках CaCo2. Вследствие соматической драйверной мутации для ингибирования экспрессии MCP-1 в инфицированных SARS-CoV-2 клетках CaCo-2 требуются большие количества ATR-002. Далее авторы изобретения задались вопросом, способен ли ATR-002 снижать экспрессию провоспалительных цитокинов в клетках Calu-3. Для этого инфицировали клетки Calu-3 при помощи SARS-CoV-2 и обрабатывали ATR-002 в увеличивающихся количествах, как описано в **Примере 2**. Анализировали экспрессию мРНК IL-6, IL-8, MCP-1, IP-10 и CCL5 при помощи количественной PCR в реальном времени. Результаты представлены на **Фиг. 10** как n-кратная экспрессия мРНК по сравнению с ложноинфицированными клетками. Результаты подтверждают, что ATR-002 не только снижает образование частиц вирусного потомства, как показано в предыдущих **Примерах**, но более того, снижает экспрессию провоспалительных цитокинов. Это является дополнительным преимуществом обработки ATR-002, которая снижает возможность цитокинового шторма при вирусной инфекции. На втором этапе для исследования общего влияния обработки ATR-002 на экспрессию антивирусного интерферона и провоспалительных цитокинов клетки A549 в течение 24 ч трансфицировали полиI:C, синтетическим аналогом, широко применяющимся для имитации действия вирусной РНК. Параллельно клетки обрабатывали ATR-002 в нарастающих количествах. Обнаружили, что ингибирование MEK при помощи ATR-002 не влияет на ответ IFN I типа, но снижает экспрессию провоспалительного IL-8 после стимуляции поли (I:C). Результаты данных экспериментов показаны на **Фиг. 11**. Обнаружили, что обработка ATR-002 не влияла на стимуляцию антивирусной системы интерферонов I типа, как показано на примере постоянной экспрессии мРНК гена MxA, строго зависящей от IFN I типа. Наоборот, обнаружили сильное снижение экспрессии провоспалительного IL8, даже при низких концентрациях ATR-002.

Для того, чтобы узнать, наблюдается ли данный эффект и на клетках других типов, исследовали эффект ингибирования MEK на первичных мононуклеарных клетках периферической крови человека (PMBC) после индуцирования LPS, как

описано в **Примере 6**. И вновь обнаружили, что ATR-002 снижает провоспалительный цитокиновый/хемокиновый ответ в РМВС. В частности, изучали количественную экспрессию IP10, TNF- α и MCP-1 и, как можно видеть на **Фиг. 12**, все три снижались после обработки ATR-002, что указывало, что 10 мкг/мл ATR-002 достаточно для ингибирования LPS-индуцированного MCP-1 в человеческих РМВС более чем на 90%. Дальнейшие исследования на РМВС подтвердили, что ATR-002 существенно подавляет дозозависимым образом стимуляцию цитокинов/хемокинов при стимуляции анти-CD3, стимуляции ConA и стимуляции РНА, как можно видеть на **Фиг. 14**.

Наконец, из-за срочной необходимости обеспечения лечения при пандемии COVID-19 и ввиду многообещающих данных, полученных в **Примерах**, описанных в данном документе, а также положительных результатов I фазы исследования безопасности ATR-002, проводится исследование II фазы. Это исследование II фазы описано в **Примере 7**. Исследование получило название **RESPIRE** - рандомизированное двойное слепое плацебо-контролируемое клиническое исследование для оценки безопасности и эффективности ATR-002 у взрослых госпитализированных пациентов с коронавирусным заболеванием (COVID-19) средней тяжести. Главной задачей исследования является демонстрация эффективности ATR-002 по сравнению с плацебо при лечении пациентов с COVID-19, получающих стандартное лечение, при оценке статуса клинической тяжести в 15 суток. Как установили в **Примерах 1 - 6**, ATR-002 является перспективным в лечении COVID-19 благодаря своему механизму действия с двумя положительными свойствами (эффектами), являясь (1) противовирусным средством и (2) иммуномодулятором (препятствующим цитокиновому шторму). В данное клиническое исследование всего будет включено 200 взрослых госпитализированных пациентов, страдающих коронавирусным заболеванием стадии II средней тяжести. Непосредственно перед рандомизацией будут брать мазок из носоглотки для последующего подтверждения наличия SARS-CoV-2.

Все рандомизированные пациенты будут получать стандартное лечение согласно местным стандартам. 100 пациентов будут рандомизированы для перорального приема ATR-002 по 900 мг в сутки, 100 пациентов будут получать соответствующее плацебо. ATR-002 или плацебо будут давать в контролируемом

двойном слепом режиме в течение 5 суток.

Главной задачей исследования является оценка эффективности ATR-002 по сравнению с плацебо при измерении статуса клинической тяжести по порядковой 7-ступенчатой шкале: [1] не госпитализированный, без ограничений [2] не госпитализированный, с ограничениями, [3] госпитализированный, не требующий дополнительного кислорода, [4] госпитализированный, требующий дополнительного кислорода, [5] госпитализированный, на неинвазивной вентиляции или высокопоточной оксигенотерапии, [6] госпитализированный, на инвазивной механической вентиляции или ЕСМО (экстракорпоральной мембранной оксигенации), [7] летальный исход.

Вторичные критерии эффективности будут определяться по клиническим проявлениям и симптомам, сообщаемым пациентами результатам, нежелательным явлениям, возникшим в ходе лечения, серьезным нежелательным явлениям, полученным клиническим показателям, баллам и событиям в ходе исследования, изменениям лабораторных показателей и уровням ATR-002 в плазме, а также количественным изменениям SARS-CoV-2 в образцах.

В целях безопасности и для определения статуса выживаемости после окончания лечения исследуемым лекарственным средством за всеми пациентами будут осуществлять наблюдение вплоть до 90 суток.

Для участия в исследовании отбирают взрослых пациентов в возрасте 18 лет или старше на момент скрининга, нуждающихся в госпитализации, демонстрирующих клинические признаки инфекции COVID-19, устанавливаемой как наличие жара, характеризующегося температурой $\geq 37,3^{\circ}\text{C}$ (в подмышечной впадине), $\geq 38,0^{\circ}\text{C}$ (при пероральном измерении) или $\geq 38,6^{\circ}\text{C}$ (при ректальном измерении или измерении на барабанной перепонке), и $\text{SpO}_2 \leq 94\%$ на воздухе без кислорода или необходимость в дополнительном кислороде для поддержания $\text{SpO}_2 > 94\%$. На основании исследований противовирусного эффекта и цитокинов/хемокинов, приведенных в Примерах, и дополнительных данных из клинического исследования I фазы, для снижения вирусной нагрузки и экспрессии цитокинов/хемокинов более чем на 50% требуется $>50\%$ – 90% ингибирование активности МЕК. В запланированном исследовании RESPIRE, описанном выше и в **Примере 5**, лечение будут получать пациенты, страдающие

стадией II COVID-19.

Перед началом клинического исследования RESPIRE, описанного в **Примере 7**, будут проведены эксперименты на модели с сирийскими хомячками, которые являются предпочтительным модельным организмом для изучения инфекций SARS-CoV-2, как описано в **Примере 8**. Противовирусную эффективность дозы ATR-002, эквивалентной человеческой, исследовали на модели с хомячками после заражения SARS-CoV-2. В сутки инфицирования или через 24 часа после инфицирования животным вводили исследуемое вещество и на 3-4 сутки после заражения анализировали такие показатели, как процент поражения легких и вирусная нагрузка в мазках из зева и ткани носовых раковин. Как свидетельствует **Фиг. 16**, обработка ATR-002 приводила к существенному снижению вирусного титра и поражения легких на модели инфицирования SARS-CoV-2 сирийских хомячков. Выбранная для хомячков доза 100 мг/кг в качестве первоначального воздействия с последующим введением 75 мг/кг один раз в сутки представляет собой дозу, эквивалентную 900 мг с последующим введением 600 мг человеку, применявшуюся во 2 фазе клинического исследования ATR-002. Таким образом, данные результаты полностью обосновывают выбор дозы ATR-002 в клиническом исследовании и подтверждают влияние ATR-002 *in vivo* при лечении SARS-CoV-2.

Кроме того, для изучения эффекта ATR-002 в отношении репликации вируса непосредственно в клетках дыхательных путей человека применяли первичные культуры клеток на границе раздела воздух-жидкость (ALI), которые получали из мазков из зева у четырех здоровых взрослых добровольцев. Три из четырех культур ALI, которые удалось инфицировать SARS-CoV-2, обрабатывали ATR-002, используя две различные концентрации, как описано в **Примере 9**. На **Фиг. 17** показаны результаты одного эксперимента. Обе использованные концентрации (50 мкмоль и 100 мкмоль) полностью блокировали образование частиц вирусного потомства в этих трех культурах, что указывало на высокую эффективность ATR-002 в отношении инфекции SARS-CoV-2 в первичных культурах ALI человека. Это является хорошим указанием на то, что будет подтверждена эффективность ATR-002 в лечении коронавирусной инфекции человека и, в частности, стадии II SARS-CoV-2.

Как можно видеть на **Фиг. 15**, взятой из публикации Hasan et al., озаглавленной

“COVID-19 Illness in Native and Immunosuppressed States: A Clinical-Therapeutic Staging Proposal”, краткое содержание которой изложено ниже, на стадии II COVID-19 имеют место как фаза вирусного ответа, так и фаза ответа хозяина, так что это является стадией, на которой применение ингибитора МЭК будет наиболее эффективно. Ниже приведено обобщенное описание стадий COVID-19 согласно Hasan et al.

Начальная стадия, обозначаемая как стадия I, представляет собой легкую инфекцию и возникает во время инокуляции и в начале развития заболевания. Для большинства людей это включает инкубационный период, ассоциированный с легкими и зачастую неспецифическими симптомами в течение нескольких суток, такими как слабость, жар и сухой кашель. У пациентов, которым удастся сдержать вирус на этой стадии COVID-19, прогноз и выздоровление очень хорошие. Лечение на данной стадии прежде всего нацелено на облегчение симптомов. В случае, если будет доказана польза противовирусной терапии, отбор отдельных пациентов на этой стадии может сократить продолжительность симптомов, минимизировать контагиозность и предотвратить прогрессирование тяжести.

На второй стадии установленного заболевания легких, обозначаемой как стадия II, обычно имеет место размножение вируса и локализованное в легких воспаление. Стадия II включает вовлечение легких, обозначаемое как стадия IIa при отсутствии и как стадия IIb при наличии гипоксии. На этой стадии у пациентов развивается вирусная пневмония с кашлем, жаром и возможно гипоксией. В ходе заболевания возникает затруднение дыхания в среднем через 13 суток после первого появления симптомов (диапазон 9-16,5 суток). Затруднение дыхания является признаком тяжелого заболевания дыхательных путей, легких или сердца и характеризуется затрудненным или стесненным дыханием и нехваткой воздуха. В случае COVID-19 визуализация при помощи рентгена органов грудной клетки или компьютерной томографии выявляет двусторонние инфильтраты или затемнения по типу матового стекла. На этой стадии большинству пациентов с COVID-19 необходима госпитализация для тщательного наблюдения и оказания медицинской помощи. Лечение преимущественно заключается в поддерживающих мероприятиях и противовирусных терапиях, при их доступности. Возможно, что тем не менее у пациентов произойдет прогрессирование в стадию III, требующую механической вентиляции в отделении интенсивной терапии (ICU).

На стадии II COVID-19 могут быть повышены маркеры системного воспаления, но не так значительно. В ходе первых исследований, проведенных на первой группе пациентов в г. Ухань, Китай, было обнаружено, что при поступлении в больницу концентрации IL1 β , IL1RA, IL7, IL8, IL9, IL10, основного FGF, GCSF, GMCSF, IFN γ , IP10, MCP1, MIP1 α , MIP1 β , PDGF, TNF α и VEGF в плазме были выше, чем у здоровых взрослых. Кроме того, обнаружили, что у пациентов в ICU плазменные концентрации IL2, IL7, IL10, GCSF, IP10, MCP1, MIP1 α и TNF- α были выше, чем у пациентов при поступлении в больницу (Huang et al.; *The Lancet*; Vol 395; pp.: 497-506 February 15, 2020), что означало, что повышение этих цитокинов ознаменует переход COVID-19 со стадии II в стадию III. Такой переход ознаменовался неожиданным и быстро прогрессирующим клиническим ухудшением, обозначаемым как «цитокиновый шторм при COVID-19» (в данном документе также обозначается как «цитокиновый шторм»). Как подробно описано Jamilloux et al. (*Autoimmunity Reviews* 2020), при этом повышаются маркеры системного воспаления такие как IL-1 β , IL-R α , IL-6, TNF- α и sIL2R α . Это соответствует тому, что было продемонстрировано Huang et al., как обсуждалось выше.

У меньшей части пациентов с COVID-19 развивается цитокиновый шторм при COVID-19 и происходит переход в третью и наиболее тяжелую стадию заболевания, обозначаемую как стадия III, которая проявляется синдромом внелегочного системного избыточного воспаления. В целом, прогноз и выздоровление на этой критической стадии заболевания неблагоприятны.

По этой причине двойной механизм, обеспечиваемый ингибированием MEK, будет ключевым для предупреждения прогрессирования в стадию III и, следовательно, снижения летальности.

Для лучшего понимания механизмов инфекции SARS-CoV2 проводили дальнейшие исследования роли ингибиторов MEK в предупреждении инфекции SARS-CoV2, как описано в Примере 10. В частности, известно, что SARS-CoV2 может проникать в клетку через ACE2/TMPRSS2 (ангиотензинпревращающий фермент 2/ трансмембранная сериновая протеаза 2). Таким образом, исследовали возможное влияние экспрессии ACE2 и TMPRSS2 на активацию сигнального пути Raf/MEK/ERK. Клетки A549, сверхэкспрессирующие ACE2 и TMRPSS2, инфицировали SARS-CoV-2 и

анализировали состояние фосфорилирования ERK через 1 час после инфицирования. На **Фиг. 18** показаны результаты одного из трех независимых экспериментов. Обнаружили, что сверхэкспрессия ACE2 в клетках A549 приводит к активации ERK при инфекции SARS-CoV-2.

После этого проверяли, снижается ли экспрессия ACE2 в клетках после ингибирования MEK посредством обработки ATR-002. Клетки Calu-3 обрабатывали ATR-002 в течение 24 часов и анализировали результаты при помощи флуоресцентной микроскопии и технологи WES. Результаты показаны на **Фиг. 19**, где очевидно, что ATR-002 приводит к снижению ACE2 на клетках Calu-3.

На следующей стадии проверяли, способен ли ATR-002 блокировать репликацию SARS-CoV-2 в клетках A549, сверхэкспрессирующих ACE2. Так, клетки A549-ACE2, A549-ACE2/TMPRSS2 или Calu-3 инфицировали SARS-CoV-2 и обрабатывали ATR-002, как описано выше.

ATR-002 снижал образование частиц вирусного потомства в клетках Calu-3 и A549-ACE2/TMPRSS2, если клетки были инфицированы при MOI 0,001. Неожиданно, обработка ATR-002 не влияла на образование частиц вирусных потомков в клетках A549-ACE2/TMPRSS2, когда концентрация вирусного инокулята была в десять раз выше (MOI: 0,01). SARS-CoV2 может проникать в клетку двумя различными путями. Либо при непосредственной активации белка шипа TMPRSS2, приводящей к слиянию вирусной и клеточной мембраны, либо при интернализации эндосом и активации белка шипа катепсином L.

Наконец, чтобы проанализировать способна ли обработка ингибитором MEK снижать экспрессию ACE2, клетки Vero предварительно инкубировали с ингибитором MEK CI-1040 или ATR-002 и инфицировали псевдотипированным вирусом VSV, несущим на своей поверхности белок шипа SARS-CoV-2 и экспрессирующим репортерный ген GFP (зеленый флуоресцентный белок) после успешного инфицирования и интернализации. Положительные клетки анализировали при помощи световой микроскопии. Данные, показанные на **Фиг. 21** и **22**, представляют средние \pm SD (стандартное отклонение) трех независимых экспериментов и показывают, что предварительная инкубация с CI-1040 или ATR-002 приводит к уменьшению интернализации псевдотипированного вируса VSV-S. Данный эффект был зависимым

от времени. Чем дольше была предварительная инкубация с CI-1040 или ATR-002, тем меньше количество положительных по GFP клеток, являющихся результатом инфицирования. Эти результаты указывают, что ингибиторы MEK, такие как CI-1040 и ATR-002, снижают клеточную экспрессию ACE2 и, следовательно, могут быть полезны для предотвращения проникновения вирусов в клетки.

Описанные выше эксперименты указывают, что ингибирование MEK может играть роль в предупреждении инфекции SARS-CoV-2 путем блокирования рецепторов ACE2 и предупреждении прогрессирования SARS-CoV-2 у бессимптомных пациентов с положительными результатами тестирования на коронавирус человека. Это имеет важное значение, поскольку может обеспечивать превентивный или профилактический эффект ингибирования MEK в контексте раннего инфицирования коронавирусом человека.

Ингибиторы MEK по настоящему изобретению можно применять в способе лечения и/или предупреждения. Таким образом, термин «лечить» или «лечение» включает введение ингибитора MEK предпочтительно в форме фармацевтической композиции субъекту, страдающему коронавирусной инфекцией, для облегчения или улучшения симптомов. Сюда входит и введение ингибитора MEK, предпочтительно в форме фармацевтической композиции, субъекту, страдающему цитокиновым штормом при COVID-19, для облегчения или улучшения симптомов.

Кроме того, термин «предупреждать» в данном документе относится к медицинской процедуре, задачей которой является предупреждение заболевания. В данном описании термины «предупреждать», «предупреждение» и «профилактика» относятся к снижению риска приобретения или развития заданного состояния у пациента с диагностированной коронавирусной инфекцией, такой как цитокиновый шторм при COVID-19. Под «предупреждением» также понимают снижение или ингибирование маркеров системного гипервоспаления, таких как TNF- α , IL-1 β , IP-10, IL-8, MCP-1 и/или MIP-1 β , у субъекта с диагностированной коронавирусной инфекцией, такой как SARS-CoV-2, для снижения у субъекта риска системного гипервоспаления, такого как цитокиновый шторм при COVID-19.

«Ингибиторы MEK» ингибируют митогенный сигнальный каскад Raf/MEK/ERK в клетках или у субъекта путем ингибирования MEK (киназа митоген-активируемой

протеинкиназы). Этот сигнальный каскад используется многими вирусами, в частности, вирусами гриппа и коронавирусами, для усиления вирусной репликации. Таким образом, специфическое блокирование пути Raf/MEK/ERK на критическом участке MEK нарушает рост вирусов, и, в частности, коронавирусов. Кроме того, ингибиторы MEK демонстрируют низкую токсичность и незначительные побочные эффекты у человека. Также отсутствует склонность к развитию устойчивости вируса (Ludwig, 2009). В контексте изобретения ингибитор MEK выбран из группы, состоящей из PD-0184264, CI-1040, GSK-1120212, GDC-0973, биниметиниба, селуметиниба, PLX-4032, AZD6244, AZD8330, AS-703026, RDEA-119, RO-5126766, RO-4987655, PD-0325901, TAK-733, AS703026, PD98059 и PD184352 или их фармацевтически приемлемой соли или метаболита. Особенно предпочтительным ингибитором является PD-0184264.

«Заболевание», вызванное коронавирусом, может представлять собой острое респираторное заболевание, вызванное SARS-CoV, SARS-CoV-2 или MERS. В частности, в предпочтительном воплощении коронавирус представляет собой SARS-CoV-2, а пациент страдает от COVID-19. В наиболее предпочтительном варианте заболевание представляет собой стадию II COVID-19.

«Коронавирус» может представлять собой SARS-CoV, SARS-CoV-2 или MERS или родственный новый зоонозный или мутантный коронавирус. В одном частном воплощении коронавирус устойчив к предшествующему противовирусному лечению, такому как ремдесивир.

«Субъект», которого можно лечить ингибиторами, в частности, ингибиторами MEK по данному изобретению, представляет собой субъекта-человека, у которого диагностирована коронавирусная инфекция. В одном воплощении субъект является госпитализированным. Субъект может иметь любой возраст и может быть ребенком в возрасте от 0 до 10 лет, подростком в возрасте от 10 до 18 лет или взрослым в возрасте 18 лет или старше. Возможно, субъект может быть в возрасте от 50 до 65 лет, в возрасте 18 или 50 лет или старше 65 лет. В других воплощениях субъект выбран из группы, состоящей из субъектов в возрасте по меньшей мере 60 лет, субъектов, которые живут в учреждениях, предоставляющих постоянный уход, субъектов, имеющих хронические заболевания легких или сердечно-сосудистой системы,

субъектов, нуждавшихся в регулярном медицинском наблюдении или госпитализации на протяжении последнего года из-за хронических метаболических заболеваний, почечной дисфункции, гемоглобинопатий или иммуносуппрессии.

В одном частном аспекте субъект может получать лечение ингибитором МЕК для предупреждения или лечения «цитокинового шторма при COVID-19». Как упоминалось выше, данный термин употребляется в обычном значении, используемом в области техники (в этой связи см. Jamilloux et al, 2020) для обозначения цитокинового шторма, который может возникнуть у субъектов, инфицированных патогенным для человека коронавирусом, в частности, SARS-CoV-2. Такой цитокиновый шторм ознаменовывается быстрым клиническим ухудшением, а повышение провоспалительных цитокинов ознаменует переход COVID-19 со стадии II в стадию III. В частности, и Huang et al., и Jamilloux et al. отмечают, что наблюдалось неожиданное повышение IL-1 β и/или TNF- α , возможно вместе с увеличением двух, трех или более, четырех или более, пяти или более или всех шести из TNF- α , IL-1 β , IP-10, IL-8, MCP-1 и MIP-1 β . В одном аспекте ингибитор МЕК применяется для снижения уровня IL-1 β и/или TNF- α у субъекта, предпочтительно, снижение у субъекта уровня одного или более, двух или более, трех или более, четырех или более, пяти или более или всех шести из TNF- α , IL-1 β , IP-10, IL-6, IL-8, MCP-1, MIP-1 α и MIP-1 β .

Воспалительные цитокины и хемокины, упомянутые выше, хорошо известны в области техники. В частности, термины, TNF- α , IL-1 β , IP-10, IL-8, MCP-1 и MIP-1 β относятся к последовательностям белка человека, известным в UNIPROT и GENE BANK под следующими регистрационными номерами:

Ген	Рег. номер в GeneBank	Рег. номер в Uniprot	Биол. вид
TNF- α	NM_000594	P01375	человек
IL-1 β	NM_000576	P01584	
IP-10	NM_001565	P02778	
IL-8	NM_000584	P10145	
MCP-1	NM_002982	P13500	
MIP-1 β	NM_002984	P13236	

Фармацевтическую композицию для применения по изобретению и содержащую ингибитор МЕК, такой как PD-0184264, вводят пациенту-человеку, который

госпитализирован и страдает заболеванием, вызванным коронавирусом. В одном аспекте пациент-человек имеет возраст 60 лет или старше или относится к группе высокого риска или к группе очень высокого риска по коронавирусной инфекции. В случае COVID-19 группа очень высокого риска включает пациентов, которые:

- имеют возраст старше 70 лет
- имеют пересаженный орган
- проходят активную химиотерапию
- и проходят радикальную лучевую терапию по поводу рака легкого
- имеют злокачественное заболевание крови или костного мозга, такое как лейкоз, лимфома или миелома, которые находятся на любой стадии лечения
- проходят иммунотерапию или другое непрерывное лечение антителами по поводу рака
- проходят иное таргетное лечение рака, способное повлиять на иммунную систему
- прошли трансплантацию костного мозга или стволовых клеток в последние 6 месяцев или продолжают принимать иммуносупрессивные лекарственные средства
- имеют тяжелые респираторные заболевания, включая кистозный фиброз, тяжелую астму, легочный фиброз, фиброз легких, интерстициальное заболевание легких и тяжелую COPD (хроническая обструктивная болезнь легких)
- имеют состояние, обуславливающее очень высокий риск инфекций (такое как SCID (тяжелая комбинированная иммунная недостаточность), гомозиготная серповидноклеточная анемия)
- принимают лекарственные средства, которые повышают вероятность получения инфекций (такие как стероиды в высоких дозах или иммуносупрессивная терапия)
- имеют тяжелое заболевание сердца и беременность.

Группа высокого риска включает лиц, которые:

- старше 60 лет
- имеют нарушение обучаемости
- имеют заболевание легких, не являющееся тяжелым (такое как астма,

COPD, эмфизема или бронхит)

- имеют заболевание сердца (такое как сердечная недостаточность)
- имеют высокое кровяное давление (гипертензия)
- имеют диабет
- имеют хроническое заболевание почек
- имеют заболевание печени (такое как гепатит)
- имеют патологическое состояние, которое может повлиять на дыхание
- имеют рак
- имеют слабую иммунную систему (иммуносуппрессия)
- имеют цереброваскулярное заболевание
- имеют заболевание, влияющее на мозг или нервы (такое как болезнь

Паркинсона, заболевание двигательных нейронов, рассеянный склероз или церебральный паралич)

- имеют проблемы с селезенкой или удаленную селезенку
- имеют заболевание, означающее очень высокий риск получения инфекций (такое как HIV, волчанка или склеродермия)
- принимают лекарственное средство, влияющее на иммунную систему (такое как стероиды в низких дозах)
- имеют ожирение.

В способе по изобретению PD-0184264 можно вводить перорально, внутривенно, внутривнеплеврально, внутримышечно, местно или посредством ингаляции. Предпочтительно, PD-0184264 вводят посредством ингаляции или перорально. В предпочтительном воплощении PD-0184264 вводят однократно перорально в дозе от 100 мг до 1000 мг, предпочтительно 300 мг, 600 мг или 900 мг, от 1 до 21 суток подряд, предпочтительно от 5 до 18 или от 7 до 14 суток подряд после госпитализации.

В частности, как описано ранее, в клинических исследованиях I фазы PD-0184264 вводили в начальной дозе 100 мг с повышением дозы в три этапа в семи группах по схеме с однократным введением с повышением дозы / с многократным введением с повышением дозы (SAD / MAD). Схема введения представляла собой одну дозу PD-0184264, повышающуюся от 100 мг до 900 мг (SAD), с последующими семью дозами PD-0184264, повышающимися от 100 мг до 600 мг QD (ежедневно) в течение

семи суток (MAD). Безопасность дозы в каждой когорте оценивал Комитет по рассмотрению вопросов безопасности (SRC) с выдачей разрешения на следующее повышение дозы (до 900 мг в схеме SAD и 600 мг в схеме MAD, соответственно). Наблюдаемые фармакокинетические профили обосновывают целесообразность дальнейших клинических исследований с предполагаемой схемой введения один раз в сутки и предполагаемой дозировкой 900 мг.

В ходе исследования наблюдали всего несколько нежелательных явлений и ни одного серьезного нежелательного явления. Таким образом, PD-0184264 считается безопасным и хорошо переносимым. Фармакокинетическое воздействие и определение ингибирования MEK проверяли в исследовании I фазы, и подтвердили, что клинически значимые уровни в крови сохраняются.

В настоящем изобретении также предусмотрены различные композиции, предпочтительно фармацевтические композиции. Настоящее изобретение относится к композиции, содержащей PD-0184264, для применения в способе лечения заболевания, вызванного коронавирусом, таким как SARS-CoV-2.

Как упоминалось выше, композиция, содержащая ингибитор MEK, может представлять собой фармацевтическую композицию. Предпочтительное воплощение фармацевтической композиции содержит PD-0184264. Предпочтительно, такие композиции дополнительно содержат носитель, предпочтительно фармацевтически приемлемый носитель. Композиция может находиться в форме суспензий или таблеток для перорального введения, назальных спреев, препаратов для ингаляторов, стерильных препаратов для инъекций (внутривенных, внутривенных, внутримышечных), например в виде стерильных водных или масляных суспензий для инъекций, или суппозиториев.

Ингибитор MEK предпочтительно вводят в терапевтически эффективном количестве. «Терапевтически эффективное количество» для PD-0184264 или каждого активного соединения/ингибитора может варьировать в зависимости от факторов, очевидных специалисту в области техники, включающих, без ограничения, активность используемого соединения, стабильность активного соединения в организме человека, тяжесть состояний, которые требуется облегчить, общую массу тела пациента, получающего лечение, путь введения, легкость всасывания, распределение и выведение

соединения организмом, возраст и чувствительность пациента, подлежащего лечению, нежелательные явления, и тому подобных. При изменении со временем различных факторов вводимое количество можно корректировать.

Ингибиторы, способы и применения, описанные в данном документе, относятся к терапии человека. Описанные в данном документе соединения, в частности, PD-0184264, можно вводить субъекту в физиологически приемлемом носителе, как описано в данном документе. В зависимости от способа введения соединения могут быть приготовлены различными способами, как обсуждается ниже. Концентрация терапевтически активного соединения в композиции может варьировать от приблизительно 0,1 до 100% по массе. Агенты можно вводить в отдельности или в комбинации с другой терапией. Например, для лечения стадии II COVID-19 можно вводить PD-0184264 в дозе в диапазоне от 10 до 100 мг/кг PD-0184264, предпочтительно в диапазоне от 25 до 75 мг/кг PD-0184264. Предпочтительное введение представляет собой введение один раз в сутки в дозе от 100 до 1000 мг, включая любую величину дозы в указанном интервале, такую как 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800 и 900 мг. В предпочтительном воплощении введение осуществляют перорально один раз в сутки, а доза составляет 600 мг или 900 мг. PD-0184264 можно вводить в течение периода времени от 1 до 21 суток подряд или более, предпочтительно, от 5 до 18 и, наиболее предпочтительно, от 7 до 14 суток после госпитализации.

Фармацевтические соединения в способе по данному изобретению можно вводить в любой подходящей лекарственной форме. Подходящие пероральные композиции могут быть в форме таблеток, капсул, суспензии, сиропа, жевательной резинки, облатки, эликсира и тому подобного. В фармацевтические композиции для перорального применения можно включать фармацевтически приемлемые носители, такие как связывающие агенты, эксципиенты, смазывающие агенты и подсластители или корригенты. При желании также можно включать стандартные агенты для изменения вкуса, цвета и придавать форму определенного вида.

В случае инъекционных составов фармацевтические композиции могут находиться в форме лиофилизированного порошка в смеси с подходящими эксципиентами в подходящем флаконе или тубике. Перед применением в клинике

лекарства можно восстанавливать путем растворения лиофилизированного порошка в подходящей системе растворителей для получения композиции, подходящей для внутривенной или внутримышечной инъекции.

В одном воплощении уменьшение вирусной инфекции представляет собой уменьшение бляшкообразующих единиц (БОЕ)/мл. «Бляшкообразующие единицы» это мера количества частиц, способных образовывать бляшки в единице объема, таких как вирусные частицы. Это скорее функциональный показатель, нежели показатель абсолютного количества частиц: вирусные частицы, которые дефектны или которые не взаимодействуют со своей клеткой-мишенью, не будут образовывать бляшку и поэтому не подлежат подсчету. Например, раствор коронавируса с концентрацией 1000 БОЕ/мкл означает, что 1 мкл раствора несет достаточно вирусных частиц для образования 1000 инфекционных частиц в клеточном монослое. В случае настоящего изобретения клеточная культура, которую обрабатывали ингибитором, демонстрирует меньшее количество бляшкообразующих единиц в культуре после обработки по сравнению с культурой до обработки ингибитором МЕК, таким как PD-0184264.

Для задач настоящего изобретения активное соединение, определенное выше, также включает его фармацевтически приемлемую(ые) соль(и). Выражение «фармацевтически приемлемая(ые) соль(и)» в данном документе означает такие соли соединений по изобретению, которые безопасны и эффективны для желаемой формы введения. Фармацевтически приемлемые соли включают соли, образованные такими анионами, которые являются производными соляной, фосфорной, уксусной, щавелевой, винной кислот и так далее, и образованные такими катионами, которые являются производными натрия, калия, аммония, кальция, гидроксидов железа, изопропиламина, триэтиламина, 2-этиламиноэтанола, гистидина, прокаина и так далее.

Следует отметить, что в данном документе все термины в единственном числе охватывают термины во множественном числе, за исключением случаев, когда из контекста явным образом не следует противоположное. Так, например, упоминание «реагента» включает один или более таких различных реагентов, а упоминание «способа» включает упоминание различных стадий и способов, известных специалисту в области техники, которые можно модифицировать или заменить способами,

описанными в данном документе.

Все публикации и патенты, процитированные в данном документе, включены во всей полноте путем ссылки. В случае если материалы, включенные путем ссылки, противоречат или не совпадают с описанием настоящего изобретения, описание настоящего изобретения является приоритетным по отношению к любым подобным материалам.

Если не указано иное, термин «по меньшей мере», предшествующий ряду элементов, следует понимать как относящийся к каждому элементу ряда. Специалисты в данной области поймут или смогут найти, проведя рутинные эксперименты, множество эквивалентов частных воплощений изобретения, описанных в данном документе. Предполагается, что такие эквиваленты входят в объем настоящего изобретения.

Во всем этом описании и в приведенной далее формуле изобретения, если из контекста не следует иное, слово «содержать» и такие варианты, как «содержит» и «содержащий», подразумевают включение указанного целого числа или стадии или группы целых чисел или стадий, но не исключение любого другого целого числа или стадии или группы целых чисел или стадий. При использовании в данном документе термин «содержащий» может быть заменен термином «включающий» или иногда при использовании в данном документе термином «имеющий».

«Состоящий из» при использовании в данном документе исключает любой элемент, стадию или ингредиент, не указанный в пункте формулы изобретения. При использовании в данном документе термин «по существу состоящий из» не исключает материалы или стадии, которые не оказывают существенного влияния на основные и новые характеристики» пункта формулы изобретения.

В каждом случае любой из терминов «содержащий», «по существу содержащий из» и «состоящий из» может быть заменен любым из двух других терминов.

В тексте данного описания процитированы несколько документов. Каждый из документов, процитированных в данном описании (включая все патенты, патентные заявки, научные публикации, спецификации производителя, инструкции и так далее), будь то выше или ниже, включен во всей полноте путем ссылки. Ничто в настоящем документе не должно быть истолковано как признание того, что изобретение не может

лежать в основе данного изложения в свете предшествующего изобретения.

ПРИМЕРЫ

Настоящее изобретение проиллюстрировано следующими примерами. Указанные Примеры не следует считать ограничивающими объем изобретения. Примеры служат в качестве иллюстрации, а настоящее изобретение ограничено только формулой изобретения.

МАТЕРИАЛЫ

1. КЛЕТОЧНЫЕ ЛИНИИ

Описание	Вид	Происхождение	Источник
Caco-2	<i>Homo sapiens</i>	Эпителиальные клетки, Толстая кишка, Колоректальная аденокарцинома	Университетская больница г. Тюбинген, институт медицинской вирусологии и эпидемиологии
Vero E6	<i>Cercopithecus aethiops</i> , почки	Эпителиальные клетки, почки, здоровые	ATCC (Американская коллекция типовых культур) кат. номер CRL-1586
A549	<i>Homo sapiens</i>	Эпителиальные клетки, базальные эпителиальные клетки альвеолярной карциномы	ATCC (Американская коллекция типовых культур) кат. номер CCL-185
Calu-3	<i>Homo sapiens</i>	Эпителиальные клетки, клетки аденокарциномы легкого	ATCC (Американская коллекция типовых культур) кат. номер HTB-55;

2. ВИРУС

Описание	Вид	Источник
SARS-CoV-2	Коронавирус, вызывающий острый тяжелый респираторный синдром	SARS-CoV-2 изолят hCoV-19/Германия/FI1103201/2020 (GSAID EPI-ISL_463008) "FI"
SARS-CoV-2 вариант SA	Коронавирус, вызывающий острый тяжелый респираторный синдром	SARS-CoV-2 изолят hCoV-19/Германия B.1351 Южно-Африканский вариант "SA" (210211_SAv) выделен в феврале 2021 и относится к линии B.1351 SARS-CoV-2. Изолят был секвенирован посредством NGS (секвенирования нового поколения), и посредством rtPCR были обнаружены мутации N501Y, K417N и E484K

3. ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО

ATR-002 (PD0184264) [2-(2-хлоро-4-иодофениламино)-N-3,4-дифторбензойную кислоту], ($M = 409,55$ г/моль) синтезировали в ChemCon GmbH (Фрайбург, Германия). Для всех экспериментов с клеточными культурами готовили 10 мМ маточный раствор ATR-002 в DMSO (Merck-Millipore, Дармштадт, Германия) и затем разводили в соответствующих средах.

Пример 1. SARS-CoV-2 использует путь MEK

В этом первом эксперименте авторов изобретения интересовал ответ на вопрос, приводит ли ингибирование пути MEK к ингибированию размножения вируса. Мишенью ATR-002 является фактор MEK клеток-хозяев, однако дозозависимый ответ на ATR-002 связан не с вирусом, а с ингибированием киназы. В экспериментах *in vitro* противовирусная эффективность ATR-002 сильно зависит от статуса активации MEK в линии клеток, используемых в эксперименте. Линии клеток CaCo2, использовавшихся для изучения SARS-CoV-2, как описано ниже, демонстрируют высокую конститутивную активность MEK. Для сравнения также проводили эксперименты с клетками Vero.

Методы:

А. Тест на снижение вирусного титра (VYR)

Для теста на снижение вирусного титра готовили 24-луночный планшет (Greiner Bio-One, кат. номер 662-160) с клетками Caco-2 в конфлюэнтности 95%. Лунки промывали однократно средой DMEM для инфицирования Caco-2 (Gibco, кат. номер 41965-039) с добавлением 5% FCS (эмбриональной телячьей сыворотки) (Capricorn, кат. номер FBS-12A), 1% пенициллина/стрептомицина (Sigma Aldrich, кат. номер P4333) и 1% заменимых аминокислот (NEAA) (Merck, кат. номер K 0293). Клетки Caco-2 инфицировали SARS-CoV-2 (MOI 0,1) в течение 1 часа в 200 мкл среды для инфицирования на лунку. Затем вирусный инокулят полностью удаляли, а клетки обрабатывали ATR-002 в различных концентрациях (100 мкмоль, 50 мкмоль, 25 мкмоль, 12,5 мкмоль, 6,25 мкмоль, 3,125 мкмоль, 1,56 мкмоль, 0,78 мкмоль, 0,39 мкмоль, 0,195 мкмоль, 0,098 мкмоль, 0 мкмоль) в 1 мл на лунку среды для инфицирования Caco-2 с 1% DMSO в течение 24 часов при 37°C, 5% CO₂. Супернатанты собирали через 24 часа после инфицирования и центрифугировали при

максимальной скорости в течение 5 минут при 4°C для удаления клеточного дебриса. Готовили аликвоты по 200 мкл и хранили при 80°C. Слои клеток в каждой лунке лизировали добавлением 50 мкл модифицированного буфера RIPA с добавлением коктейлей ингибиторов фосфатаз и протеаз, инкубации в течение 15 минут при 4°C. Лизаты центрифугировали при максимальной скорости в течение 5 минут при 4°C для удаления клеточного дебриса. Лизаты хранили при -80°C.

Б. Анализ бляшкообразования при инфицировании SARS-CoV-2 клеток Vero после ингибирования МЕК

Для определения вирусного титра выполняли стандартный тест бляшкообразования. Клетки Vero инфицировали штаммом FI SARS-CoV-2 (MOI 0,01). Через 1 час после инфицирования клетки обрабатывали 50 мкмоль ATR-002 или соответствующим количеством DMSO в качестве контроля. Соединения находились в культуральной среде на протяжении всего времени инфицирования. Через 24, 36 и 48 часов после инфицирования супернатанты собирали и определяли вирусные титры при помощи теста бляшкообразования, как описано ниже. Данные одного эксперимента с тремя биологическими повторами показаны на **Фиг. 2А**.

Клетки Vero E6 высаживали в 100% конfluence в 6-луночные планшеты (Greiner Bio-One, кат. номер 657-160). Готовили 6-кратные разведения образцов вируса в среде для инфицирования Vero E6 (IMDM, Gibco, кат. номер 12440-053) с добавлением 5% FCS (Capricorn, кат. номер FBS-12A) и 1% пенициллина/стрептомицина (Sigma Aldrich, кат. номер P4333). Клетки Vero однократно промывали средой для инфицирования E6 перед инфицированием разведениями вируса в количестве 1 мл на лунку в течение 1 ч при 37°C, 5% CO₂. Затем полностью удаляли вирусный инокулят и на клетки наслаивали среду Avicel (1,25% Avicel (FMC BioPolymer, кат. номер RC581), 10% MEM (Gibco, кат. номер 21430-20), 0,01% DEAE-Dextran (Sigma Aldrich, кат. номер D9885), 2,8% NaHCO₃ (Merck, кат. номер 1.06329.1000), 1% пенициллин/стрептомицин (Sigma Aldrich, кат. номер P4333), 0,2% бычий сывороточный альбумин (BSA) (Carl Roth, кат. номер 9163.4), 1% L-глутамин (Sigma Aldrich, кат. номер G7513). Осуществляли инкубацию при 37°C, 5% CO₂. Через 72 ч среду Avicel удаляли. Клетки дважды промывали PBS (Gibco, кат. номер 14190-094), фиксировали 4% Roti-Histofix (Carl Roth, кат. номер A146.1) в PBS

(Lonza, кат. номер 17515Q) в течение 30 мин при 4°C и окрашивали раствором кристаллического фиолетового (1% кристаллический фиолетовый (Merck, кат. номер 1408), 10% этанол (SAV-IP, кат. номер ЕТО-5000-99-1) в бидистиллированной воде (ddH₂O)). Вирусный титр рассчитывали по количеству бляшек на лунку и соответствующему фактору разведения.

В. Определение вирусного гена RdRP при инфекции SARS-CoV-2 после ингибирования МЕК. Клетки Vero инфицировали FI (MOI 0,01). Через 1 час после инфицирования клетки обрабатывали 50 мкмоль ATR-002 или соответствующим количеством DMSO в качестве контроля. Соединения находились в культуральной среде на протяжении всего времени инфицирования. Через 24, 36 и 48 часов после инфицирования супернатанты собирали и использовали для выделения РНК. При помощи стандартной кривой экстраполировали геномное число копий гена RdRP на мл через 24, 36 и 48 часов после инфицирования. Данные одного эксперимента с тремя биологическими повторами показаны на **Фиг. 2В**.

Г. Анализ Wes

Для качественного и количественного определения pERK1/2, ERK1/2 и нуклеопротеина SARS-CoV-2 использовали капиллярный электрофорез Wes™ от ProteinSimple®. Клеточные лизаты разводили 0,1X буфером для образцов (ProteinSimple, Абингтон, Оксфорд, Великобритания) приблизительно до 50 нг общего белка на дорожку и анализировали с применением специфических антител. Первичные антитела к pERK1/2 (кроличье mAb (моноклональное антитело) к фосфо-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) (D13.14.4E) XP®, кат. номер 43702) и к ERK1/2 (кроличье mAb к p44/42 MAPK (Erk1/2) (137F5), кат. номер 4695) приобретали в компании Cell Signaling Technology (Cell Signaling Technology, Данверс, Массачуссетс, США) и использовали в разведениях 1:50 (для pERK1/2) и 1:100 (для ERK1/2) в разбавителе для антител (ProteinSimple, Абингтон, Оксфорд, Великобритания). Антитело к нуклеопротеину SARS-CoV-2, мышинное моноклональное антитело, приобретали в компании ProSci (кат. номер 35.580) и использовали в концентрации 1 мкг/мл в разбавителе для антител (ProteinSimple, Абингтон, Оксфорд, Великобритания). Вторичное антитело к иммуноглобулинам кролика (ProteinSimple, кат. номер DM-001) и вторичное антитело к иммуноглобулинам мыши (ProteinSimple, кат. номер DM-002) и

все другие реагенты для анализа WES также приобретали в компании ProteinSimple готовыми к применению.

Результаты:

Результаты, полученные способами, описанными выше, представлены на **Фиг. 1** и **2**. На **Фиг. 1** показано, что когда клетки CaCo-2, инфицированные SARS-CoV-2 (MOI 0,1), обрабатывали ATR-002 в различных концентрациях, при концентрациях ATR-002 50 и 100 мкмоль наблюдалось ингибирование ERK, а также SARS-CoV-2 и белка нуклеокапсида, являющегося вирусным маркером. Большое количество ATR-002, необходимое для ингибирования, не связано с вирусным титром, но скорее является следствием выбора клеток CaCo2, которые имеют конститутивно активную MEK, так что требуются большие количества ингибитора MEK. Эти эксперименты показывают, что SARS-CoV-2 использует путь MEK для выхода вируса.

Кроме того, на **Фиг. 2** показано, что клетки Vero, инфицированные SARS-CoV-2 и обработанные 50 мкмоль ATR-002, имеют более низкую вирусную нагрузку по сравнению с контрольными клетками на протяжении всего периода наблюдения 24 ч, 36 ч и 48 ч, указывая на то, что ингибитор не только вызывал задержку репликации вируса, но и устойчиво подавлял размножение вируса. Это подтверждалось измерением гена RdRP вируса SARS-CoV-2.

Пример 2. Репликация SARS-CoV-2 в клетках Calu-3 и активация ERK в жизненном цикле SARS CoV-2, а также ингибирование ATR-002

Для проверки влияния, обнаруженного на клетках CaCo2 и Vero, дальнейшие исследования проводили на клетках эпителия бронхов человека линии Calu-3. Вначале проверяли, способен ли SARS-CoV-2 заражать клетки Calu-3 (A), и приведет ли инфекция к активации (фосфорилированию) ERK в клетках Calu-3 (B). Кроме того, проверяли способность ATR-002 ингибировать SARS-CoV-2 в клетках Calu-3 (C).

A. Инфицирование клеток Calu-3 SARS-CoV-2

Клетки эпителия бронхов человека линии Calu-3 культивировали в среде Игла в модификации Дюльбекко (DMEM) с добавлением 10% стандартизированной эмбриональной телячьей сыворотки (FBS Advance; Capricorne), 2 mM L-глутамина, 100 Ед/мл пенициллина и 0,1 мг/мл стрептомицина. Все клетки выращивали при 37°C в инкубаторе с влажной атмосферой в присутствии 5% CO₂. Клетки Calu-3

инфицировали изолятом SARS-CoV-2 hCoV-19/Германия/FI1103201/2020 (EPI-ISL_463008) в PBS для инфицирования (содержащем 0,2% BSA, 1% CaCl₂, 1% MgCl₂, 100 Ед/мл пенициллина и 0,1 мг/мл стрептомицина) при MOI 2 или инфицировали ложно. Титры вновь образованных частиц вируса SARS-CoV-2 и супернатанты анализировали, начиная с 4 ч после инфицирования. На Фиг. 3А показаны результаты трех независимых экспериментов. На Фиг. 3В показаны результаты вестерн-блоттинга лизатов, полученных после указанных моментов времени. На Фиг. 3С и D показано количественное определение экспрессии белков N и S SARS-CoV-2 и фосфорилирования киназы в ходе инфицирования. Показаны средние значения \pm SD из трех независимых экспериментов. Данные анализировали с применением однофакторного ANOVA с апостериорным критерием множественных сравнений Даннетта (* $p \leq 0,0332$; **** $p \leq 0,0001$). Пунктирные линии показывают уровень на момент 0 ч после инфицирования. (В) Количественный анализ результатов, полученных методом вестерн-блоттинг (С, D), приведенный в качестве примера. В следующем эксперименте, показанном на Фиг. 3(Е), клетки Calu-3 инфицировали SARS-CoV-2 (FI), используя различные MOI. Активацию ERK анализировали через 1 час после инфицирования.

Как следует из Фиг. 3, SARS-CoV-2 был способен реплицироваться в клетках Calu-3. Кроме того, можно видеть, что инфекция SARS-CoV-2 приводит к активации ERK на очень ранней стадии жизненного цикла вируса. Активацию ERK наблюдали через 1 ч после инфицирования. На более поздних стадиях жизненного цикла вируса дополнительной активации ERK не наблюдали, что указывало на возможную роль активации пути на ранних стадиях вирусной инфекции.

В. Активация ERK в клетках Calu-3 под воздействием SARS CoV-2

Для анализа важности ERK, непосредственной мишени MEK в пути Raf/MEK/ERK, в ходе жизненного цикла SARS-CoV-2 осуществляли нокдаун ERK1/2 в клетках Calu-3. Через 72 ч после трансфекции клетки инфицировали SARS-CoV-2 и оценивали экспрессию белка шипа вируса и продуцирование частиц вирусного потомства. Обнаружили, что нокдаун ERK приводит к снижению титров образующегося вирусного потомства, как можно видеть на Фиг. 4 (А-С: MOI: 1,0; D: MOI: 0,1). На Фиг. 4А показана экспрессия вирусного белка S₀, которую анализировали

через 8 часов после инфицирования. Готовили иммуноблоты и анализировали с применением антител к S-белку, ERK1/2 и тубулину. Показаны результаты одного из трех независимых экспериментов. На Фиг. 4B показано количественное определение экспрессии белка S₀ и эффективности нокдауна. Показаны средние значения ± SD из трех независимых экспериментов. Данные анализировали с применением непарного двустороннего t-критерия (* p≤0,0332; **** p≤0,0001). На Фиг. 4C показаны титры, соответствующие (A). Показаны средние значения ± SD из трех независимых экспериментов, каждый из которых выполняли в двух повторностях. БОЕ/мл: Данные анализировали с применением непарного двустороннего t-критерия с поправкой Уэлча. Проценты: Данные анализировали с применением парного двустороннего t-критерия (* p≤0,0332; *** p≤0,0002). На Фиг. 4D показан анализ титров через 24 часа после инфицирования. Показаны средние значения ± SD из трех независимых экспериментов, каждый из которых выполняли в двух повторностях. БОЕ/мл: Данные анализировали с применением непарного двустороннего t-критерия с поправкой Уэлча. Проценты: Данные анализировали с применением парного двустороннего t-критерия (* p≤0,0332; **** p≤0,0001).

Таким образом, показали, что нокдаун ERK приводил к снижению экспрессии белка шипа и образования частиц вирусного потомства, не только подтвердив роль ERK в ходе жизненного цикла вируса, но также и подтвердив генетическими методами функцию системы киназ MEK/ERK в распространении SARS-CoV-2.

С. ATR-002 способен ингибировать SARS-CoV-2 в клетках Calu-3

Затем проверяли, способен ли ингибитор MEK снижать титры SARS-CoV-2 в клетках Calu-3 сопоставимым образом, как в случае снижения, наблюдавшегося в клетках CaCo2 и Vero в **Примере 1**. Клетки CaCo2 инфицировали SARS-CoV-2 и обрабатывали 100 мкмоль, 75 мкмоль или 50 мкмоль ATR-002 с применением такого же протокола для определения вирусного титра, как в **Примере 1**. В частности, для теста на снижение вирусного титра готовили 24-луночные планшеты с клетками Vero E6, CaCo2 и Calu-3 с конфлюэнтностью 95%. Лунки однократно промывали средой для инфицирования, а затем осуществляли инфицирование SARS-CoV-2 SA (MOI 0,1, 1 и 10) в течение 1 часа в 200 мкл среды для инфицирования на лунку. После этого вирусный инокулят полностью удаляли, лунки однократно промывали средой для

инфицирования и затем обрабатывали ATR-002 в различных концентрациях (100 мкмоль, 75 мкмоль, 50 мкмоль, 0 мкмоль) в 1 мл на лунку среды для инфицирования с 1% DMSO в течение 24 часов при 37°C, 5% CO₂. Для каждого условия готовили три лунки. Супернатанты из трех лунок с одинаковыми условиями собирали через 24 часа после инфицирования и центрифугировали при максимальной скорости в течение 5 минут при 4°C для удаления клеточного дебриса. Готовили аликвоты супернатантов по 140 мкл и хранили при -80°C. Вирусный титр в образцах определяли при помощи RT-qPCR (количественной полимеразной цепной реакции в реальном времени) в технических трипликатах. Для этого выделяли вирусную РНК и для определения копий вирусной РНК использовали зонд, направленный против гена N SARS-CoV-2.

Как следует из **Фиг. 5**, на всех типах клеток наблюдался сопоставимый эффект.

На следующей стадии клетки Calu-3 инкубировали с увеличивающимися количествами ATR-002 в течение 24, 48 или 72 часов. В частности, клетки Calu-3 инфицировали SARS-CoV-2 (FI), используя MOI 0,01. Через 1 час после инфицирования клетки обрабатывали ATR-002. Ложное инфицирование, SARS-CoV-2 и DMSO служили контролями. На **Фиг. 6А** показано снижение титра SARS-CoV-2 в клетках Calu-3 после обработки ATR-002 (10 – 150 мкмоль). Необработанные (SARS-CoV-2) и обработанные DMSO (0,1%) клетки служили отрицательными контролями. Данные приведены в виде средних значений \pm SD из трех независимых экспериментов, каждый из которых выполняли в трех повторностях. Данные анализировали с применением однофакторного ANOVA с апостериорным критерием множественных сравнений Даннетта (** $p \leq 0,0021$; *** $p \leq 0,0002$; **** $p \leq 0,0001$) отдельно для каждого момента времени. DMSO использовали в качестве референсной величины. На **Фиг. 6В** показаны расчеты EC₅₀ по значениям из (А). Данные в комбинации с (С) использовали для расчета значения CC₅₀ и индекса селективности (SI). На **Фиг. 6С** показана оценка цитотоксичности ATR-002 в отношении клеток Calu-3 через 72 ч после обработки. Данные приведены в виде средних значений \pm SD из трех независимых экспериментов. На **Фиг. 6D** показаны результаты световой микроскопии в одном из трех независимых экспериментов, соответствующих (А). Наблюдали зависящее от концентрации снижение образования частиц вирусного потомства в диапазоне концентраций, не являющихся токсичными. Данный эффект сохранялся в течение всего времени

инфицирования 72 часа, что указывало, что ингибирование пути при помощи ATR-002 оказывало продолжительное влияние на жизненный цикл вируса.

Пример 3. Эффективность ATR-002 в отношении варианта SARS-CoV-2 SA B.1351

Для проверки эффективности ATR-002 против Южно-Африканского варианта SARS-CoV-2 B.1351 использовали такую же схему эксперимента, как в Примерах 1 и 2. Клетки Vero и клетки Calu-3 инфицировали SARS-CoV-2 SA при MOI 0,1, 1 и 10 и обрабатывали 20,48, 30,72 и 40,96 мкг/мл (соответствующими 50, 75 и 100 мкмоль) ATR-002, как следует из **Фиг. 7** в сравнении с **Фиг. 5**.

В частности, для теста на снижение вирусного титра готовили 24-луночные планшеты с клетками Vero E6 и Calu-3 в конфлюэнтности 95%. Лунки однократно промывали средой для инфицирования, а затем осуществляли инфицирование SARS-CoV-2 SA (MOI 0,1, 1 и 10) в течение 1 часа в 200 мкл среды для инфицирования на лунку. После этого вирусный инокулят полностью удаляли, лунки однократно промывали средой для инфицирования и затем обрабатывали ATR-002 в различных концентрациях (100 мкмоль, 75 мкмоль, 50 мкмоль, 0 мкмоль) в 1 мл на лунку среды для инфицирования с 1% DMSO в течение 24 часов при 37°C, 5% CO₂. Для каждого условия готовили три лунки. Супернатанты из трех лунок с одинаковыми условиями собирали через 24 часа после инфицирования и центрифугировали при максимальной скорости в течение 5 минут при 4°C для удаления клеточного дебриса. Готовили аликвоты супернатантов по 140 мкл и хранили при -80°C. Вирусный титр в образцах определяли при помощи RT-qPCR (количественной полимеразной цепной реакции в реальном времени) в технических трипликатах. Для этого выделяли вирусную РНК и для определения копий вирусной РНК использовали зонд, направленный против гена N SARS-CoV-2.

Как следует из **Фиг. 7**, снижение вирусного титра варианта SARS-CoV-2 SA под воздействием ATR-002 могло наблюдаться как в клетках Vero, так и в клетках Calu-3.

Пример 4. ATR-002 снижает экспрессию генов цитокинов и хемокинов на модели острого повреждения легких (ALI) у мышей

Модель ALI у мышей с индуцированной LPS экспрессией цитокинов и хемокинов позволяет исследовать иммуномодуляторную эффективность ATR-002 в

отсутствие вирусной инфекции *in vivo*.

Методы:

Мышам осуществляли анестезию при помощи внутривентриальной инъекции раствора кетамина (10 мг/кг). Обе группы воздействия стимулировали 5 мг/кг LPS, приготовленным в PBS, внутривентриальным путем. Через один час после стимуляции группа воздействия получала 25 мг/кг ATR-002 внутривентриально. Мышей подвергали эвтаназии через 6 ч после воздействия и хранили легкие непосредственно в RNeasy lysis buffer. Из легких выделяли РНК с применением универсального набора RNeasy plus Midi (Qiagen, Хильден, Германия) согласно инструкциям производителя. РНК элюировали в двух раундах при помощи не содержащей РНКаз воды и хранили при -20°C для дальнейшего анализа. Качество РНК определяли при помощи спектрофотометра NanoDrop (ThermoFisher scientific) и осуществляли обратную транскрипцию с использованием набора для синтеза первой цепи RT² First Strand (Qiagen, Хильден, Германия). Затем кДНК (комплементарная ДНК) исследовали с применением наборов для PCR RT² Profiler в комбинации с общей реакционной смесью RT² SYBR[®] Green qPCR Mastermix. Для обеспечения оптимальных характеристик, адаптированные под требования пользователей наборы включали: 84 гена и 5 генов домашнего хозяйства, которые использовали для нормализации данных. Для контроля качества наборы включали тест на контаминацию геномной ДНК мыши, 3 теста на эффективность обратной транскрипции и 3 теста на воспроизводимость PCR. Представлены результаты экспрессии генов, кодирующих цитокины и хемокины, задействованные при среднетяжелом и тяжелом COVID-19.

Использовали следующие последовательности:

Ген	Рег. номер в GeneBank	Рег. номер в Uniprot	Биол. вид
TNF	NM_013693	P06804	
IL-1b	NM_008361	P10749	
IP-10	NM_021274	P17515	
CXCL1 (KC)(IL8)	NM_008176	P12850	МЫШЬ
MCP-1	NM_011333	P10148	
MIP-1b	NM_013652	P14097	

Результаты:

На **Фиг. 8** показано, что введение ATR-002 мышам с ALI приводит к снижению

цитокинов TNF-альфа, IL-1бета, IP-10, IL-8, MCP-1 и MIP-1бета. Как обсуждалось в разделе «Предшествующий уровень техники» выше, согласно Huang et al., все указанные цитокины повышены у пациентов с COVID-19, а TNF- α , IP-10 и MIP-1 β повышены у пациентов со стадией III COVID-19 по сравнению с уровнями на стадии II COVID-19 при госпитализации. Это указывает, что независимо от инфицирования SARS-CoV-2, ATR-002 способен снижать экспрессию генов цитокинов и хемокинов у млекопитающих.

Пример 5. ATR-002 снижает провоспалительный цитокиновый/хемокиновый ответ в клетках CaCo2 и в клетках Calu-3 после инфицирования SARS-CoV-2

Клетки CaCo2 инфицировали SARS-CoV-2 и обрабатывали ATR-002, как описано в Примере 1. Измеряли количество MCP-1, результаты показаны на **Фиг. 9**. В частности, ATR-002 способен снижать экспрессию MCP-1 в инфицированных SARS-CoV-2 клетках. Однако, как обсуждалось в **Примере 1**, для этого необходимо большое количество ATR-002, что обусловлено конститутивной активацией пути MEK в клетках CaCo2. Вследствие соматической драйверной мутации для ингибирования экспрессии MCP-1 в инфицированных SARS-CoV-2 клетках CaCo-2 требуются большие количества ATR-002. Далее авторы изобретения задались вопросом, способен ли ATR-002 снижать экспрессию провоспалительных цитокинов в клетках Calu-3. Для этого инфицировали клетки Calu-3 при помощи SARS-CoV-2 и обрабатывали ATR-002 в увеличивающихся количествах, как описано в **Примере 2**. Клетки Calu-3 инфицировали SARS-CoV-2 (FI), используя MOI 0,01. Через 1 час после инфицирования клетки обрабатывали ATR-002. Ложное инфицирование, SARS-CoV-2 и DMSO служили контролями. Анализировали экспрессию мРНК IL-6, IL-8, MCP-1, IP-10 и CCL5 при помощи количественной PCR в реальном времени. Результаты представлены на **Фиг. 10** как n-кратная экспрессия мРНК по сравнению с ложноинфицированными клетками. Данные приведены в виде средних значений \pm SD из трех независимых экспериментов, каждый из которых выполняли в трех повторностях. Данные анализировали с применением однофакторного ANOVA с апостериорным критерием множественных сравнений Даннетта (* $p \leq 0,0332$; ** $p \leq 0,0021$; *** $p \leq 0,0002$; **** $p \leq 0,0001$) отдельно для каждого момента времени. DMSO

использовали в качестве референсной величины. Результаты подтверждают, что ATR-002 не только снижает образование частиц вирусного потомства, как показано в предыдущих Примерах, но более того, снижает экспрессию провоспалительных цитокинов. Это является дополнительным преимуществом обработки ATR-002, которая снижает возможность цитокинового шторма при вирусной инфекции.

На второй стадии для исследования общего влияния обработки ATR-002 на экспрессию противовирусного интерферона и провоспалительных цитокинов клетки A549 трансфицировали полиI:C в течение 24 ч. Параллельно клетки обрабатывали ATR-002 в нарастающих количествах. DMSO служил контролем. Обнаружили, что ингибирование MEK под воздействием ATR-002 не влияет на ответ IFN, но снижает экспрессию провоспалительного IL-8 после стимуляции поли (I:C).

В частности, клетки эпителия легких человека A549 (2×10^5 /мл) трансфицировали 100 нг/мл поли(I:C) с применением липофектамина 2000 и обрабатывали ингибитором MEK ATR-002 в указанных концентрациях в течение 24 часов. Среду для трансфекции заменяли через 6 ч после трансфекции. Нестимулированные контроли также подвергали воздействию среды для трансфекции, содержащей липофектамин в концентрациях, эквивалентных для стимулированных клеток. Результаты данных экспериментов показаны на **Фиг. 11**. На **Фиг. 11А** показано исследование методом вестерн-блоттинг клеточных лизатов, которые получали через 24 часа обработки ингибитором и анализировали методом иммуноблоттинга с применением первичных антител против pERK/ERK, pSTAT/STAT и тубулина. Экспрессию белков определяли с применением вторичных антител, конъюгированных с пероксидазой хрена (HRP), и усиленной хемилюминесценции. На **Фиг. 11В** РНК выделяли после 24 часов обработки ингибитором с применением набора Qiagen Rneasy mini согласно прилагаемому протоколу. Осуществляли RT-qPCR с применением синтезированной кДНК, SYBR Green и соответствующей пары праймеров на устройстве LightCycler 480 (Roche) для определения уровней экспрессии мРНК MxA и IL8. Данные приведены в виде средних значений \pm SD из трех независимых экспериментов, каждый из которых выполняли в трех повторностях. Данные анализировали с применением однофакторного ANOVA с апостериорным критерием множественных сравнений Даннетта (** $p \leq 0,0021$; *** $p \leq 0,0002$) отдельно для каждого

момента времени. Ложное инфицирование использовали в качестве референсной величины.

Обнаружили, что обработка ATR-002 не влияла на стимуляцию антивирусной системы интерферонов, о чем свидетельствует постоянная экспрессия мРНК МхА. В то же время, обнаружили сильное снижение экспрессии провоспалительного IL8, даже при низких концентрациях ATR-002.

Пример 6. ATR-002 снижает провоспалительный цитокиновый/хемокиновый ответ в мононуклеарных клетках периферической крови (PMBC)

Для проверки какая концентрация ATR-002 будет необходима для снижения цитокинов, проводили количественное определение экспрессии IP10, TNF-альфа и MCP-1 в стимулированных LPS клетках PMBC после обработки ATR-002. Как можно видеть на **Фиг. 12**, все трое снижались после обработки 10 мкг/мл ATR-002, что указывало, что 10 мкг/мл ATR-002 достаточно для ингибирования LPS-индуцированного MCP-1 в человеческих PMBC более чем на 90%.

В дальнейших исследованиях изучали способность соединения ATR-002 ингибировать воспаление, опосредованное человеческими Т-клетками, что определяли по высвобождению специфических цитокинов. Соединение исследовали в трех (3) концентрациях (100, 50 и 25 мкмоль) в биологических трипликатах, используя мононуклеарные клетки периферической крови (PMBC) от трех (3) доноров-людей при времени воздействия 24 часа. В качестве стимуляторов Т-клеток использовали анти-CD3, ConA и PНА.

Методы:

Протокол исследования ингибирования воспаления, опосредованного Т-клетками (стимуляция анти-CD3)

Сутки 1:

- На поверхности планшетов с высокой степенью связывания иммобилизовали анти-CD3 (клон UCНТ-1, 100 нг/лунку) и IgG1 в качестве изотипического контроля, используя 1x PBS, и инкубировали в течение ночи при 4°C.

Сутки 2:

- Замороженные PMBC размораживали на водяной бане и разводили до

нужной плотности и высевали и круглодонные 96-луночные полистироловые планшеты ($1,2 \times 10^5$ клеток на лунку) с 228 мкл на лунку культуральной среды (RPMI 1640, 10% инактивированная нагреванием FBS, 1% пенициллин/стрептомицин, 2 mM L-глутамин).

- Перед добавлением исследуемых соединений клетки инкубировали при 37°C , 5% CO_2 в течение 1 часа.

- Исследуемое соединение растворяли в PBS и дополнительно разводили в 20 раз культуральной средой. Исследуемое соединение добавляли к PBMC в объемах 12 мкл (1X) в трипликатах и инкубировали в течение 1 часа при 37°C , 5% CO_2 .

- В качестве референсного соединения в контрольные лунки добавляли 12 мкл дексаметазона (100 нМ) согласно раскладке планшета и инкубировали в течение 1 часа при 37°C , 5% CO_2 .

- После 1 часа инкубации в присутствии исследуемого соединения или контролей переносили 200 мкл клеток (1×10^5) в планшеты с иммобилизованным анти-CD3 и инкубировали в течение 24 часов при 37°C , 5% CO_2 .

- В качестве положительного и отрицательного контролей переносили 200 мкл (1×10^5) клеток в планшеты с иммобилизованным анти-CD3 или IgG1, служившим изотипическим контролем.

- Планшеты центрифугировали при $200 \times g$ в течение 10 минут. Собирали супернатанты и хранили при -80°C до использования в анализе.

Протокол исследования ингибирования воспаления, опосредованного T-клетками (стимуляция ConA и PNA)

- Замороженные PBMC размораживали на водяной бане и разводили до нужной плотности и высевали и круглодонные 96-луночные полистироловые планшеты ($1,2 \times 10^5$ клеток на лунку) с 150 мкл на лунку культуральной среды (RPMI 1640, 10% инактивированная нагреванием FBS, 1% пенициллин/стрептомицин, 2 mM L-глутамин).

- Перед добавлением исследуемого соединения клетки инкубировали при 37°C , 5% CO_2 в течение 1 часа.

- Исследуемое соединение растворяли в DMSO и дополнительно разводили в 20 раз культуральной средой. Соединение добавляли к PBMC в объемах 10 мкл (1X) в трипликатах и инкубировали в течение 1 часа при 37°C , 5% CO_2 .

- В качестве референсного соединения в контрольные лунки добавляли 10

мкл дексаметазона (100 нМ) согласно раскладке планшета и инкубировали в течение 1 часа при 37°C, 5% CO₂.

- Через 1 час инкубации в лунки с исследуемым соединением или контролями добавляли 40 мкл ConA, (30 мкг/мл) и РНА (10 мкг/мл) до достижения конечного объема 200 мкл. Планшеты инкубировали в течение 24 часов при 37°C, 5% CO₂.

- К РВМС добавляли контроли в виде разведенного до рабочей концентрации маточного раствора в объемах 10 мкл с последующим добавлением 10 мкл соответствующим образом разведенного разбавителя, имитирующего добавление соединения с достижением конечного объема 200 мкл. Конечная концентрация разбавителя DMSO в анализе составляла 0,1%.

- После 24 часовой инкубации планшеты центрифугировали при 200 x g в течение 10 минут. Собирали супернатанты и хранили при -80°C до использования в анализе.

Анализ данных и пределы обнаружения аналитов

Измеренные цитокины/хемокины

Стимуляция анти-CD3

GM-CSF, IFN γ , IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17A, MIP-1 α и TNF α

Стимуляция ConA

GM-CSF, IFN γ , IL-1 β , IL-1RA, IL-6, MIP-1 α и TNF α

Стимуляция РНА

IFN γ , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, MIP-1 α и TNF α

Определение уровней цитокинов в культуральных супернатантах, разведенных 1:20 в буфере для анализа Luminex, осуществляли на платформе Luminex согласно протоколу производителя с применением панели на основе магнитных частиц «Цитокины/Хемокины Человека» от Millipore Sigma (кат. номер HCYTOMAG-60K) со стандартами в диапазоне 3,2, 16, 80, 400, 2000, 10000 пг/мл.

Уровни индуцирования каждого цитокина определяли по стандартной кривой, используя анализ методом нелинейной регрессии по 5 переменным, где $y = (A + ((B - A) / (1 + (((B - E) / (E - A)) * ((x / C)^D))))$). Экспериментальные данные в виде медианных значений в единицах флуоресценции переводили в концентрации исследуемых

веществ (пг/мл).

Результаты:

Значения P при сравнении со стимуляцией (сведенные вместе)

	РНА			ConA			анти-CD3					
	Дексаме-тазон	40 мкг/мл	20 мкг/мл	10 мкг/мл	Дексаме-тазон	40 мкг/мл	20 мкг/мл	10 мкг/мл	Дексаме-тазон	40 мкг/мл	20 мкг/мл	10 мкг/мл
GM-CSF				0,0002	0,0001	0,0001	0,0028	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
IFNg	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
IL-10	0,0151	0,0195	0,709	0,946				0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
IL-13	0,0008	0,0001	0,0181	0,4586								
IL-17								0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
IL-1RA				0,0001	0,0001	0,7069	0,999					
IL-1β	0,0023	0,0001	0,0151	0,466	0,003	0,0001	0,0001	0,0012	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
IL-2	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001					0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
IL-4	0,0001	0,0001	0,0194	0,5395								
IL-5	0,0001	0,0001	0,0023	0,3291								
IL-6	0,0302	0,002	0,0031	0,0588	0,0002	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
IL-8	0,002	0,0003	0,0027	0,0745					0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
MIP-1a	0,001	0,0001	0,007	0,2204	0,0001	0,0001	0,0001	0,687	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
TNFα	0,0002	0,0001	0,0001	0,0028	0,0012	0,0001	0,0004	0,0336	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001

Выводы:

Обнаружили, что ATR-002 существенно подавляет дозозависимым образом активацию цитокинов/хемокинов при стимуляции анти-CD3, стимуляции ConA и стимуляции РНА, как показано на **Фиг. 14**. В контролях, где в качестве ингибитора использовали дексаметазон, секреция цитокинов/хемокинов снижалась, что подтверждало правильность анализа.

Пример 7.

RESPIRE - рандомизированное двойное слепое плацебо-контролируемое клиническое исследование для оценки безопасности и эффективности ATR-002 у взрослых госпитализированных пациентов с коронавирусным заболеванием (COVID-19) средней тяжести. Главной задачей исследования является демонстрация эффективности ATR-002 по сравнению с плацебо при лечении пациентов с COVID-19,

получающих стандартное лечение, при оценке статуса клинической тяжести на 15 сутки. ATR-002 является перспективным в лечении COVID-19 благодаря своему механизму действия с двойным положительным свойством (эффектом), являясь (1) противовирусным средством и (2) иммуномодулятором (препятствующим цитокиновому шторму). В данное клиническое исследование всего будет включено 200 взрослых госпитализированных пациентов, страдающих коронавирусным заболеванием стадии II средней тяжести. Непосредственно перед рандомизацией будет браться мазок из носоглотки для последующего подтверждения наличия SARS-CoV-2.

Все рандомизированные пациенты будут получать стандартное лечение согласно местным стандартам. 100 пациентов будут рандомизированы для перорального приема ATR-002 по 900 мг в сутки, 100 пациентов будут получать соответствующее плацебо. ATR-002 или плацебо будут давать в контролируемом двойном слепом режиме в течение 5 суток.

Главной задачей исследования является оценка эффективности ATR-002 по сравнению с плацебо при измерении статуса клинической тяжести по порядковой 7-ступенчатой шкале: [1] не госпитализированный, без ограничений [2] не госпитализированный, с ограничениями, [3] госпитализированный, не требующий дополнительного кислорода, [4] госпитализированный, требующий дополнительного кислорода, [5] госпитализированный, на неинвазивной вентиляции или высокопоточной оксигенотерапии, [6] госпитализированный, на инвазивной механической вентиляции или ЕСМО, [7] летальный исход.

Вторичные критерии эффективности будут определяться по клиническим проявлениям и симптомам, сообщаемым пациентами результатам, нежелательным явлениям, возникшим в ходе лечения, серьезным нежелательным явлениям, полученным клиническим показателям, баллам и событиям в ходе исследования, изменениям лабораторных показателей и уровням ATR-002 в плазме, а также количественным изменениям SARS-CoV-2 в образцах.

В целях безопасности и для определения статуса выживаемости после окончания лечения исследуемым лекарственным средством за всеми пациентами будут осуществлять наблюдение вплоть до 90 суток.

Для участия в исследовании отбирают взрослых пациентов в возрасте 18 лет или

старше на момент скрининга, нуждающихся в госпитализации, демонстрирующих клинические признаки инфекции COVID-19, устанавливаемой как наличие жара, характеризующегося температурой $\geq 37,3^{\circ}\text{C}$ (в подмышечной впадине), $\geq 38,0^{\circ}\text{C}$ (при пероральном измерении) или $\geq 38,6^{\circ}\text{C}$ (при ректальном измерении или измерении на барабанной перепонке), и $\text{SpO}_2 \leq 94\%$ на воздухе без кислорода или необходимость в дополнительном кислороде для поддержания $\text{SpO}_2 > 94\%$. Первый пациент получил лечение 14 апреля 2021, однако результаты лечения еще не доступны. Тем не менее, авторы изобретения убеждены, что ATR-002 окажется эффективным в лечении пациентов со стадией II COVID-19 и предупреждении цитокинового шторма, связанного с переходом COVID-19 со стадии II в стадию III.

Пример 8.

Эффективность ATR-002 в отношении SARS-CoV-2 на модели с инфицированием сирийских хомячков

Задачей данного исследования было изучение терапевтической эффективности соединения ATR-002 после заражения SARS-CoV-2 на модели с хомячками. Животные получали ударную дозу 100 мг/кг и затем 75 мг/кг один раз в сутки. Это соответствует дозе для людей, эквивалентной 900 мг в виде ударной дозы и затем 600 мг один раз в сутки, применявшейся в Примере 7 выше.

Методы

Перед исследованием эффективности ATR-002 в лечении SARS-CoV-2 на модели с хомячками протестировали три различные дозы, вводимые перорально, при которых предположительно должны были достигаться уровни в циркуляции, ингибирующие сигнальный путь Raf/MEK/ERK более чем на 80% и, следовательно, эффективные в отношении инфекции SARS-CoV-2 *in vivo*. Результаты данного исследования использовали для определения уровня доз и схемы лечения в исследовании эффективности. Животных инфицировали интраназально 1×10^3 TCID₅₀ SARS-CoV-2 (количество способного к репликации вируса). Схема лечения была следующей:

Группа	Количество животных в группе	Схема введения	Схема введения и дозы			
			Сутки 0	Сутки 1	Сутки 2	Сутки 3
1	6	Терапевтическое соединение через 4 часа после инфицирования	100 мг/кг до полудня	75 мг/кг до полудня	75 мг/кг до полудня	75 мг/кг до полудня
2	6*	Терапевтическое соединение через 24 часа после инфицирования	Нет	100 мг/кг до полудня	75 мг/кг до полудня	75 мг/кг до полудня
3	6	Носитель терапевтического соединения через 4 часа после инфицирования	Носитель до полудня	Носитель до полудня	Носитель до полудня	Носитель до полудня

* одно животное погибло вследствие аспирационной пневмонии, поэтому показаны результаты только для 5 животных

Лечение инфицированных SARS-CoV-2 хомячков начинали либо через четыре, либо через 24 часа после инфицирования (p.i.) в виде ударной дозы ATR-002 100 мг/кг с последующим введением 75 мг/кг ATR-002 ежедневно до 3 суток после инфицирования. В 3 сутки брали мазки из зева для определения количества способного к репликации вируса (TCID₅₀). В 4 сутки после инфицирования животных подвергали эвтаназии и забирали носовые раковины для количественного определения титров патогенного вируса и исследовали пораженные зоны в долях легких.

Животные

Вид	Сирийские хомячки (<i>Mesocricetus auratus</i>)
Поставщик	Janvier
Микробиологический статус	Свободные от патогенной флоры (SPF)
Количество	36
Пол	Самцы

Возраст	~7-9 недель на начало эксперимента
Масса тела, диапазон	Приблизительно 100-150 гр
Маркировка	Перед началом эксперимента животным наносили индивидуальную маркировку маркерами для животных

Содержание животных

Анестезия

Все процедуры с животными проводили при анестезии изофлураном (3-4%/O₂).

Пероральное введение

Пероральное введение исследуемых соединений осуществляли через желудочный зонд в описанных дозах, в объеме 500 мкл/150 г. Для этого животных взвешивали и корректировали объем используемой дозы в зависимости от зарегистрированной массы тела. После этого животные находились под наблюдением в процессе восстановления.

Интраназальное введение

Для интраназального введения животных фиксировали в положении лежа на спине и при помощи пипетки вводили инокулят (100 мкл), поровну разделяя его между обеими ноздрями. Животных оставляли в фиксированном положении лежа на спине до полного вдыхания инокулята, после чего их возвращали в клетку для восстановления.

Клинические наблюдения

Ежедневные наблюдения и их регистрацию осуществляли сотрудники вивария, а ежедневные наблюдения после заражения осуществляли лаборанты (содержание животных и клинические наблюдения). В ходе наблюдений регистрировали взъерошенность шерсти, сгорбленное положение, учащенное дыхание и вялость.

На протяжении исследования животных регулярно взвешивали при помощи электронных весов (внутренний индивидуальный номер весов и качество их работы будут регистрироваться в соответствующих формах). Массу тела регистрировали в соответствующих формах.

Меры предосторожности

Соблюдались меры предосторожности при работе с животными, при обращении с острыми предметами, и работы проводились в условиях биологической безопасности

3 уровня (BSL(DM)3) (внешнее руководство для помещений для проведения доклинических исследований).

Отбор образцов после инокуляции

На протяжении исследования осуществляли регулярный забор образцов из дыхательных путей. Вкратце, мазки из зева забирали в среду для транспортировки вируса, делили на аликвоты и хранили. При аутопсии забирали образцы ткани и хранили в 10% формалине для гистопатологических исследований и замораживали для вирусологического исследования. Для вирусологического исследования образцы ткани взвешивали, гомогенизировали в среде для инфицирования и быстро центрифугировали перед титрованием.

Способы маскировки/уменьшения систематических погрешностей

Персонал, осуществляющий клинические наблюдения и лабораторный анализ, при котором требовалась интерпретация данных, не имел доступа к рандомизационным кодам на протяжении всего времени до завершения исследования, и данные обезличивали присвоением уникального номера образца каждому забранному образцу.

Определение способного к репликации вируса

Для определения вирусных титров в конфлюэнтных слоях клеток Vero E6 использовали 10-кратные последовательные разведения в четырех повторностях, как описано выше (титрование SARS-CoV-2 на клетках Vero E6). Для этого делали последовательные разведения образцов (мазки из зева и гомогенаты ткани) и инкубировали на монослоях Vero E6 в течение 1 часа при 37 градусах. Монослои Vero E6 промывали и инкубировали 4-6 суток при 37 градусах, после чего планшеты оценивали при помощи WST8 (колориметрическая оценка). Проводили измерение оптической плотности в планшетах при 450 нм (ОП450) с применением считывающего устройства для микропланшетов. Рассчитывали вирусные титры (TCID₅₀) по методу Спирмана-Карбера.

Определение вирусной РНК

Для определения вирусной РНК использовали мазки из зева и гомогенизированные образцы ткани. Для этого выделяли РНК и проводили PCR по технологии Taqman с использованием специфических праймеров (E_Sarbeco_F: ACAGGTACGTTAATAG TTAATAGCGT и E_Sarbeco_R:

ATATTGCAGCAGTACGCACACA) и зондом (E_Sarbeco_P1: ACACTAGCCATCCTTACTGCGCTTCG), как описано Corman et al (Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. Euro Surveill. 2020;25(3). Подсчитывали число копий вируса в различных образцах.

Макропатология

Во время аутопсии у всех животных (либо найденных павшими после инфицирования, подвергнутых эвтаназии по соображениям гуманности, либо по достижении конечной точки в ходе эксперимента), регистрировали все макропатологические изменения у каждого животного и описывали все отклонения от нормы. Проводили осмотр долей легких, оценивали процент пораженной ткани легких (вид сзади), кроме того, регистрировали любые другие макроскопические отклонения в других органах в ходе осмотра всего тела.

Левосторонние доли легкого и носовые раковины хранили в 10% нейтральном забуференном формалине для гистопатологических исследований, правосторонние впоследствии гомогенизировали и выполняли PCR по технологии Taqman и титрование вируса.

Результаты:

Мазки из зева брали в 3 сутки после инфицирования и анализировали вирусную нагрузку в анализе TCID₅₀ на клетках Vero E6 и, кроме этого, при помощи qPCR. Воздействие ATR-002 приводило к снижению вирусного потомства в мазках из зева. В группах, получавших воздействие через 4 часа после инфицирования и 24 часа после инфицирования, снижение составляло 1,1 log₁₀ (P=0,0134) и 1,3 log₁₀ (P=0,0191), соответственно. (Фиг. 16А). Эти результаты подтверждались PCR, демонстрирующей снижение 1,1 log₁₀ (P=0,0089) и 1,2 log₁₀ (P=0,0090) (Фиг. 16В).

Схожий паттерн наблюдали в случае патологической вирусной нагрузки в носовых раковинах на 4 сутки инфицирования, при этом лечение, начинавшееся через 4 часа после инфицирования (Фиг. 16С), но не лечение, начинавшееся через 24 часа после инфицирования, существенно снижало патологические вирусные титры (Фиг. 16С). Снижение патологических вирусных титров (TCID₅₀/г ткани) в носовых раковинах хомячков с началом лечения через 4 часа после инфицирования составляло 1,3 log₁₀ (P=0,0335) (Фиг. 16С). И вновь, эти данные подтверждались PCR. При начале

лечения через 4 часа после инфицирования наблюдалось снижение $1,1 \log_{10}$ ($P=0,0145$) (Фиг. 16D; красные точки).

В 4 сутки после инфицирования осматривали поражения легких инфицированных животных и оценивали процент пораженной области легких. Оба варианта лечения приводили к существенному уменьшению пораженной ткани легкого ($P=0,0282$, $P=0,0314$, соответственно) (Фиг. 16E).

Лечение в обеих группах хорошо переносилось, существенной потери массы тела (Фиг. 16F) или каких-либо заметных побочных эффектов по сравнению с группой, получавшей носитель, не наблюдалось.

Выводы

Противовирусную эффективность дозы ATR-002, эквивалентной человеческой, исследовали на модели с хомячками после заражения SARS-CoV-2. Животные получали лечение в сутки инфицирования или через 24 часа после инфицирования, и на 3-4 сутки после заражения у них анализировали такие показатели, как процент поражения легких и вирусная нагрузка в мазках из зева и ткани носовых раковин. Воздействие ATR-002 приводило к существенному снижению вирусных титров и поражения легких на модели инфицирования SARS-CoV-2 сирийских хомячков. Выбранная для хомячков первоначальная доза 100 мг/кг с последующим введением 75 мг/кг один раз в сутки представляет дозу, эквивалентную 900 мг с последующим введением 600 мг человеку, применявшуюся во 2 фазе клинического исследования ATR-002, как описано в Примере 7. Таким образом, данные результаты полностью обосновывают выбор дозы ATR-002 в клиническом исследовании.

Пример 9. Влияние ATR-002 на репликацию вируса в первичных культурах клеток на границе раздела воздух-жидкость (ALI)

Культуры клеток ALI получали из мазков из зева у четырех здоровых взрослых добровольцев. Клетки из мазков размножали и затем культивировали на апикальной стороне пористой мембраны внутренней камеры transwell. После глубинного роста практически до конфлюэнтности удаляли среду из апикального отсека, позволяя клеткам дифференцироваться при контакте с воздухом. Три из четырех культур ALI удалось инфицировать SARS-CoV-2, и их обрабатывали ATR-002, используя две различные концентрации. Клетки ALI инфицировали SARS-CoV-2 (FI), используя MOI

1,0. Через 1 час после инфицирования клетки обрабатывали ATR-002 (50 мкМ, 100 мкМ). Необработанные (SARS-CoV-2) и обработанные DMSO (0,1%) клетки служили отрицательными контролями. На **Фиг. 17** показаны результаты одного эксперимента. Обе концентрации (50 мкмоль и 100 мкмоль) полностью блокировали образование частиц вирусного потомства в этих трех культурах, что указывало на высокую эффективность ATR-002 в отношении инфекции SARS-COV-2 в культурах ALI.

Пример 10. Дальнейшие исследования роли ингибиторов MEK в предупреждении инфекции SARS-CoV2

Известно, что SARS-CoV2 может проникать в клетку через ACE2/TMPRSS2. В следующей серии экспериментов исследовали возможное влияние экспрессии ACE2 и TMPRSS2 на активацию сигнального пути Raf/MEK/ERK. Клетки A549, сверхэкспрессирующие ACE2 и TMPRSS2, инфицировали SARS-CoV-2 и анализировали состояние фосфорилирования ERK через 1 час после инфицирования. Клетки A549 и клетки Calu-3 служили отрицательным и положительным контролем, соответственно.

В частности, клетки Calu-3 инфицировали SARS-CoV-2 (FI), используя MOI 2,0. Через 1 час после инфицирования готовили иммуноблоты и анализировали с применением антител к pERK1/2, ERK1/2 и тубулину. На **Фиг. 18** показаны результаты одного из трех независимых экспериментов. Ложноинфицированные клетки служили отрицательными контролем. Сверхэкспрессия ACE2 в клетках A549 приводит к активации ERK при инфекции SARS-CoV-2.

После этого проверяли, снижается ли экспрессия ACE2 в клетках после обработки ATR-002. Клетки Calu-3 обрабатывали ATR-002 в течение 24 часов и анализировали результаты при помощи иммунофлуоресцентной микроскопии и технологии WES. В частности, клетки Calu-3 высевали на покровные стекла в 24-луночных планшетах по 1×10^5 клеток на лунку и инкубировали в течение 48 ч при 37°C, 5% CO₂. После промывания клеток средой (IMDM с 10% FBS и 1% P/S) в лунки добавляли по 1 мл 100 мкМ ATR-002 в среде или 1 мл 1% DMSO в среде (растворитель, служивший контролем) и инкубировали в течение 24 ч при 37°C, 5% CO₂.

Затем лунки однократно промывали PBS и фиксировали 4% PFA в PBS по 300 мкл/лунку в течение 10 минут при комнатной температуре. После еще одной стадии

промывания PBS клетки блокировали в течение 1 часа при помощи 1% BSA в PBS при комнатной температуре перед инкубацией с 200 мкл/лунку первичного антитела (козье антитело к ACE2 (R&D systems; кат. номер AF933; серия: НОК0320061) (1:20) в 1% BSA в PBS в течение 1 ч при комнатной температуре на качалке (100 об/мин). После этого клетки три раза промывали PBS перед инкубацией с 200 мкл/лунку вторичного антитела (очищенное предварительной адсорбцией вторичное антитело осла против IgG козы (H+L), конъюгированное с Alexa Fluor Plus 647, Invitrogen; кат. номер A32849TR; серия: VE306231)) (1:200) в 1% BSA в PBS в течение 45 ч при комнатной температуре на качалке. После еще трех стадий промывания PBS в каждую лунку добавляли по 200 мкл конъюгированного с родамином фаллоидина (Invitrogen; кат. номер R415; серия: 2157163) (1:40 в 1% BSA в PBS) и инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре на качалке. После двух финальных стадий промывания PBS покровные стекла удаляли из лунок и помещали на предметные стекла с применением заключающей среды Roti®-Mount FluorCare DAPI (Roth; кат. номер HP20.1; серия: 080293945). Стекла высушивали при 4°C в темноте и затем анализировали при помощи конфокального лазерного сканирующего микроскопа (LSM800, Zeiss).

Результаты показаны на **Фиг. 19**, где очевидно, что ATR-002 приводит к снижению ACE2 на клетках Calu-3.

На следующей стадии проверяли, способен ли ATR-002 блокировать репликацию SARS-CoV-2 в клетках A549, сверхэкспрессирующих ACE2. Так, клетки A549-ACE2, A549-ACE2/TMPRSS2 или Calu-3 инфицировали SARS-CoV-2 и обрабатывали ATR-002, как описано выше.

Клеточные линии инфицировали SARS-CoV-2 (FI), используя MOI 0,001 или 0,01. Через 1 час после инфицирования клетки обрабатывали ATR-002. Необработанные и обработанные DMSO клетки служили контролями. Титры определяли через 8, 24, 48 и 72 ч после инфицирования. Снижение титра SARS-CoV-2 в клетках различных линий после обработки ATR-002 (100 мкмоль). Необработанные (SARS-CoV-2) и обработанные DMSO (0,1%) клетки служили отрицательными контролями.

ATR-002 снижал образование частиц вирусного потомства в клетках Calu-3 и

A549-ACE2/TMPRSS2, если клетки были инфицированы при MOI 0,001. Неожиданно, обработка ATR-002 не влияла на образование частиц вирусных потомков в клетках A549-ACE2/TMPRSS2, когда концентрация вирусного инокулята была в десять раз выше (MOI: 0,01). SARS-CoV2 может проникать в клетку двумя различными путями. Либо при непосредственной активации белка шипа за счет TMPRSS2, приводящей к слиянию вирусной и клеточной мембраны, либо при интернализации эндосом и активации белка шипа катепсином L.

Наконец, чтобы проанализировать способна ли обработка ингибитором MEK снижать экспрессию ACE2, клетки Vero предварительно инкубировали с ингибитором MEK CI-1040 или ATR-002 и инфицировали системой псевдотипированного вируса VSV, несущего на своей поверхности белок шипа SARS-CoV-2. Положительные клетки анализировали при помощи световой микроскопии. В частности, клетки Vero инкубировали с 20 мкмоль CI-1040 или 100 мкмоль ATR-002 в течение 1 ч, 2 ч, 4 ч и 24 ч перед инфицированием VSV Δ G/GFP-Luc+S Δ 21 (MOI 0,01) в течение 1 ч. Положительные по GFP клетки анализировали через 24 ч после инфицирования. DMSO служил отрицательным контролем, который принимали за 100%. Данные, показанные на Фиг. 21 и 22, представляют средние значения \pm SD из трех независимых экспериментов с предварительной инкубацией с CI-1040 и ATR-002, соответственно. Данные анализировали при помощи двухфакторного дисперсионного анализа с поправкой Шидака (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,001$).

Обнаружили, что предварительная инкубация с CI-1040 или ATR-002 приводит к уменьшению интернализации псевдотипированного вируса VSV. Данный эффект был зависимым от времени. Чем дольше предварительная инкубация с CI-1040 или ATR-002, тем меньше количество положительных по GFP клеток, являющихся результатом инфицирования. Эти результаты указывают, что ингибиторы MEK, такие как CI-1040 и ATR-002, снижают клеточную экспрессию ACE2.

ЛИТЕРАТУРА

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.

Hasan et al (2020). COVID-19 Illness in Native and Immunosuppressed States: A Clinical-Therapeutic Staging Proposal. *J Heart Lung Transplant*. 2020 Mar 20

Huang et al.; *The Lancet*; Vol 395; pp.: 497-506 February 15, 2020

Jamilloux et al.; Should we stimulate or suppress immune response in COVID-19? Cytokine and anti-cytokine interventions, *Autoimmunity Reviews*, AUTREV 102567 accepted 28 April 2020.

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.

Mackey, T.K., Liang, B.A., 2012. Lessons from SARS and H1N1/A: employing a WHO-WTO forum to promote optimal economic-public health pandemic response. *J Public Health Policy* 33, 119-130.

Pleschka, S., Wolff, T., Ehrhardt, C., Hobom, G., Planz, O., Rapp, U.R., Ludwig, S., 2001. Influenza virus propagation is impaired by inhibition of the Raf/MEK/ERK signalling cascade. *Nat Cell Biol* 3, 301-305.

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

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Ингибитор MEK (киназа митоген-активируемой протеинкиназы) для применения в способе лечения заболевания, вызванного коронавирусом у субъекта-человека, где указанный субъект-человек госпитализирован.

2. Ингибитор MEK для применения по п. 1, где заболевание представляет собой острое респираторное заболевание.

3. Ингибитор MEK для применения по п. 1 или п. 2, где коронавирус представляет собой SARS-CoV (коронавирус, вызывающий тяжелый острый респираторный синдром), SARS-CoV-2 или MERS (коронавирус Ближневосточного респираторного синдрома).

4. Ингибитор MEK для применения по п. 3, где коронавирус представляет собой SARS-CoV-2, а пациент страдает COVID-19.

5. Ингибитор MEK для применения по п. 4, где COVID-19 представляет собой COVID-19 стадии II.

6. Ингибитор MEK для применения по любому из пп. 1-5, где ингибитор MEK выбран из группы, состоящей из PD-0184264, CI-1040, GSK-1120212, GDC-0973, биниметиниба, селуметиниба, PLX-4032, AZD6244, AZD8330, AS-703026, RDEA-119, RO-5126766, RO-4987655, PD-0325901, TAK-733, AS703026, PD98059 и PD184352 или их фармацевтически приемлемой соли или метаболита.

7. Ингибитор MEK для применения по п. 6, где ингибитор MEK представляет собой PD-0184264 или его фармацевтически приемлемую соль, где PD-0184264 или его фармацевтически приемлемую соль предпочтительно вводят субъекту-человеку один раз в сутки в дозе от 100 до 1000 мг, предпочтительно от 300 до 900 мг, наиболее предпочтительно 300, 600 или 900 мг.

8. Ингибитор MEK для применения по любому из пп. 1-7, где пациент страдает COVID-19, вызванным SARS-CoV-2.

9. Ингибитор MEK для применения по п. 8, где SARS-CoV-2 представляет собой вариант, предпочтительно выбранный из группы, состоящей из D614G, B.1.1.7, B.1.351, P1, P2, B.1.617, B.1.427, B.1.429, B.1.525 или B.1.526.

10. Ингибитор MEK для применения по п. 8 или п. 9, где COVID-19 представляет собой COVID-19 стадии II.

11. Ингибитор МЕК для применения по п. 10, где ингибитор МЕК PD-0184264 вводят субъекту-человеку от 1 до 21 суток подряд, предпочтительно, от 5 до 18 или от 7 до 14 суток подряд после госпитализации.

12. Ингибитор МЕК для применения по любому из пп. 7-11, где ингибитор МЕК PD-0184264 вводят субъекту-человеку в пероральной лекарственной форме.

13. Ингибитор МЕК для применения по любому из пп. 1-12, где коронавирус является устойчивым к предшествующему противовирусному лечению, где предшествующее противовирусное лечение предпочтительно представляет собой введение ремдесивира.

14. Ингибитор МЕК для применения по любому из пп. 1-13, где госпитализированный субъект-человек имеет возраст старше 60 лет или относится к группе очень высокого риска или к группе высокого риска по коронавирусу.

15. Ингибитор МЕК для применения в лечении или предупреждении цитокинового шторма при COVID-19 у субъекта, инфицированного SARS-CoV-2, где ингибитор МЕК предпочтительно выбран из группы, состоящей из PD-0184264, CI-1040, GSK-1120212, GDC-0973, биниметиниба, селуметиниба, PLX-4032, AZD6244, AZD8330, AS-703026, RDEA-119, RO-5126766, RO-4987655, PD-0325901, TAK-733, AS703026, PD98059 и PD184352 или их фармацевтически приемлемой соли или метаболита.

16. Ингибитор МЕК для применения по п. 15, где применение включает снижение уровня IL-1 β (интерлейкин-1 бета) и/или TNF- α (фактор некроза опухоли альфа) у субъекта, предпочтительно снижение у субъекта уровня одного или более, двух или более, трех или более, четырех или более, пяти или более или всех шести из TNF- α , IL-1 β , IP-10 (интерферон-индуцибельный белок 10), IL-6, IL-8, MCP-1 (моноцитарный хемотаксический белок 1), MIP-1 α (макрофагальный воспалительный белок-1 альфа) и MIP-1 β .

17. Ингибитор МЕК для применения по п. 15 или п. 16, где SARS-CoV-2 представляет собой вариант, предпочтительно выбранный из группы, состоящей из D614G, B.1.351, B.1.1.7, P1, P2, B.1.617, B.1.427, B.1.429, B.1.525 и B.1.526.

18. Ингибитор МЕК для применения в предупреждении развития симптомов, вызванных коронавирусной инфекцией человека у бессимптомного субъекта,

инфицированного коронавирусом человека, или в предупреждении коронавирусной инфекции человека у субъекта, бывшего в тесном контакте с лицом, инфицированным коронавирусом человека, где ингибитор МЕК предпочтительно выбран из группы, состоящей из PD-0184264, CI-1040, GSK-1120212, GDC-0973, биниметиниба, селуметиниба, PLX-4032, AZD6244, AZD8330, AS-703026, RDEA-119, RO-5126766, RO-4987655, PD-0325901, TAK-733, AS703026, PD98059 и PD184352 или их фармацевтически приемлемой соли или метаболита.

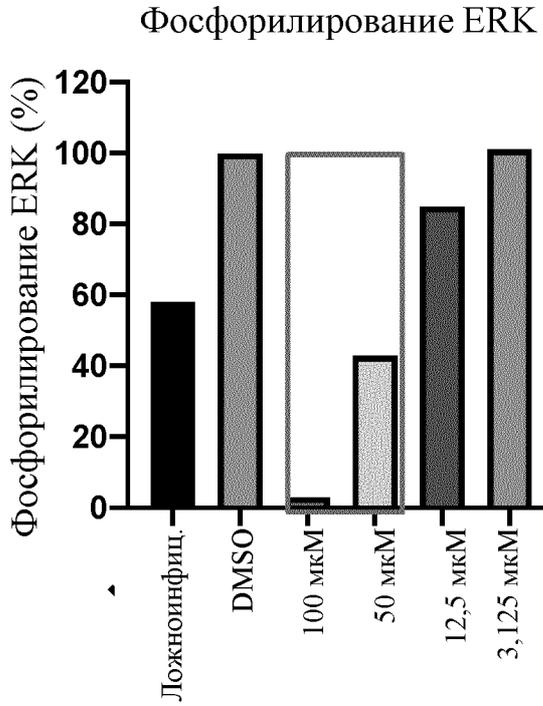
19. Ингибитор МЕК для применения по п. 18, где коронавирус человека представляет собой SARS-CoV, SARS-CoV-2 или MERS.

20. Ингибитор МЕК для применения по п. 19, где SARS-CoV-2 представляет собой вариант, предпочтительно выбранный из группы, состоящей из D614G, B.1.351, B.1.1.7, P1, P2, B.1.617, B.1.427, B.1.429, B.1.525 или B.1.526.

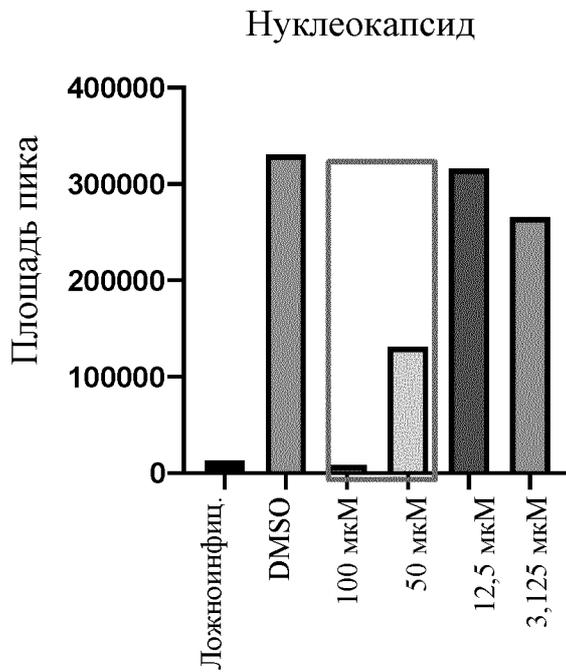
21. Фармацевтическая композиция, содержащая ингибитор МЕК для применения по любому из пп. 1-20.

Фиг. 1 продолжение

В

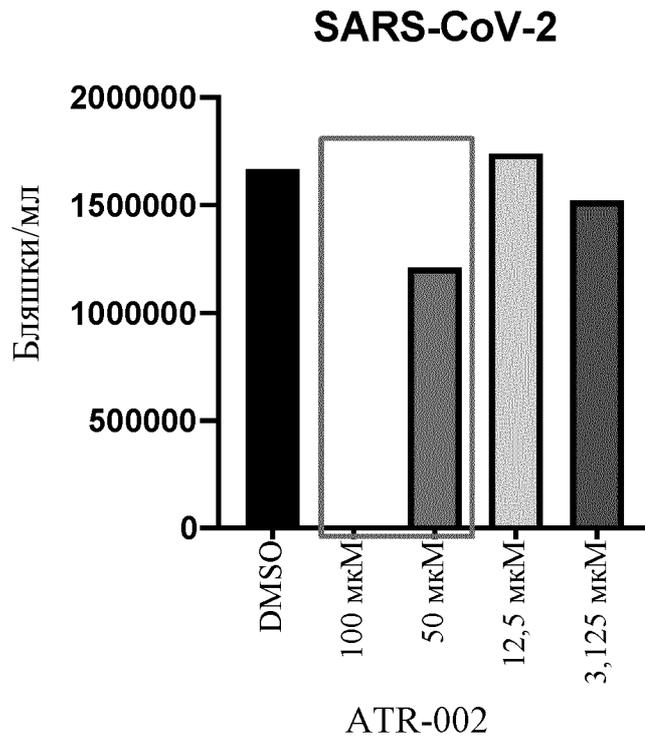


С

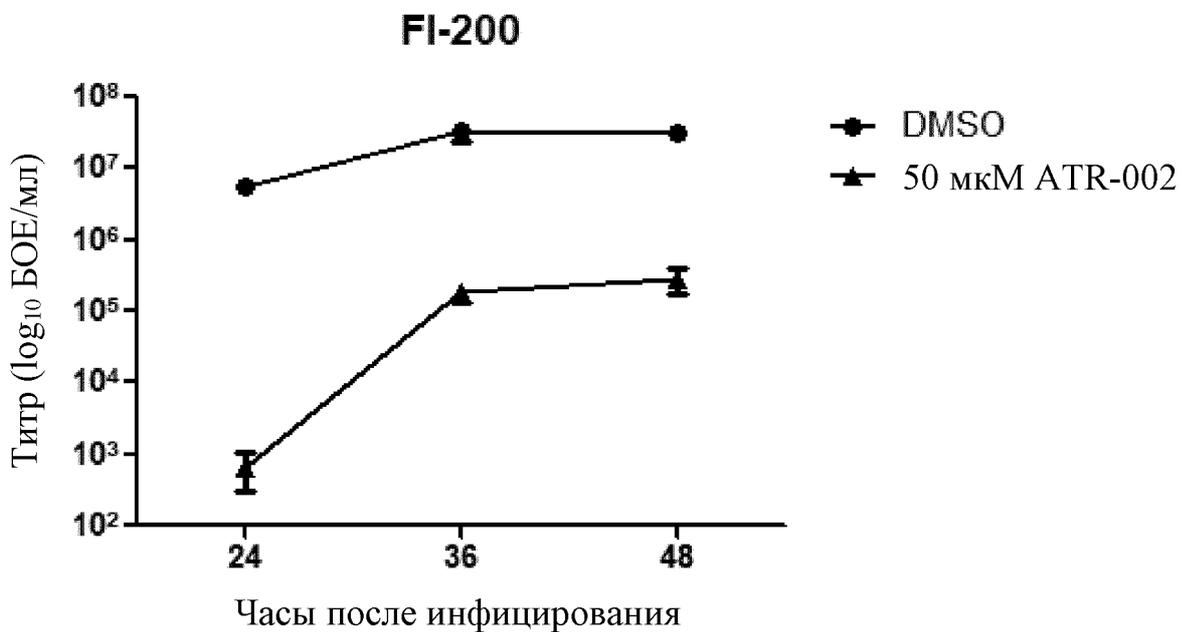


Фиг. 1 продолжение

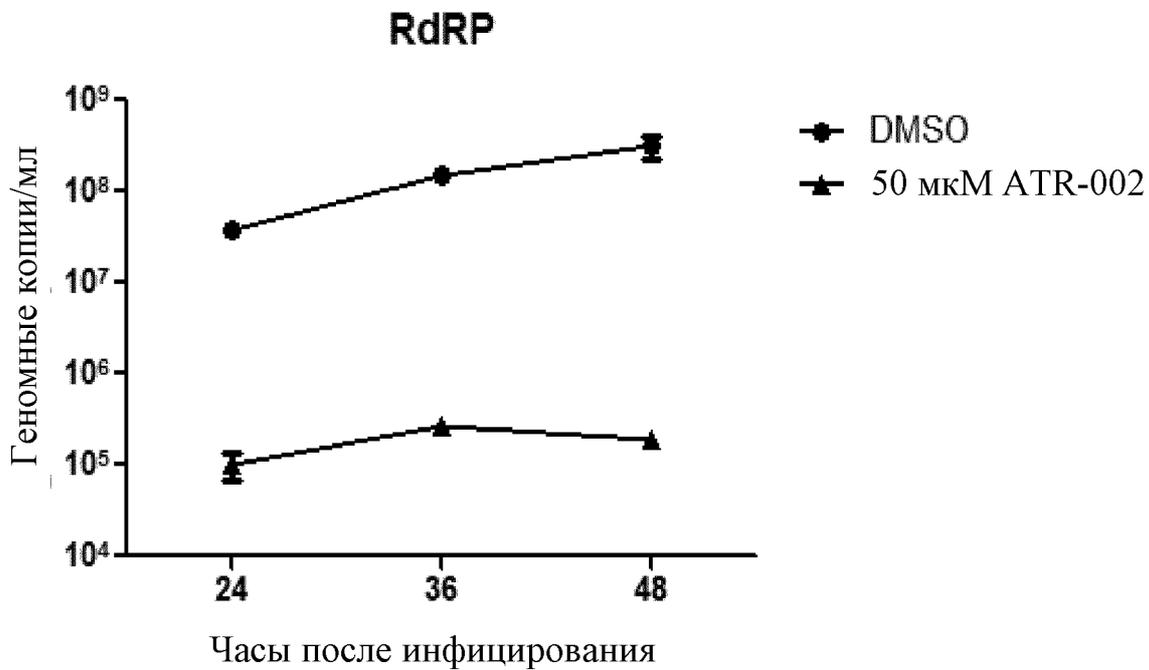
D

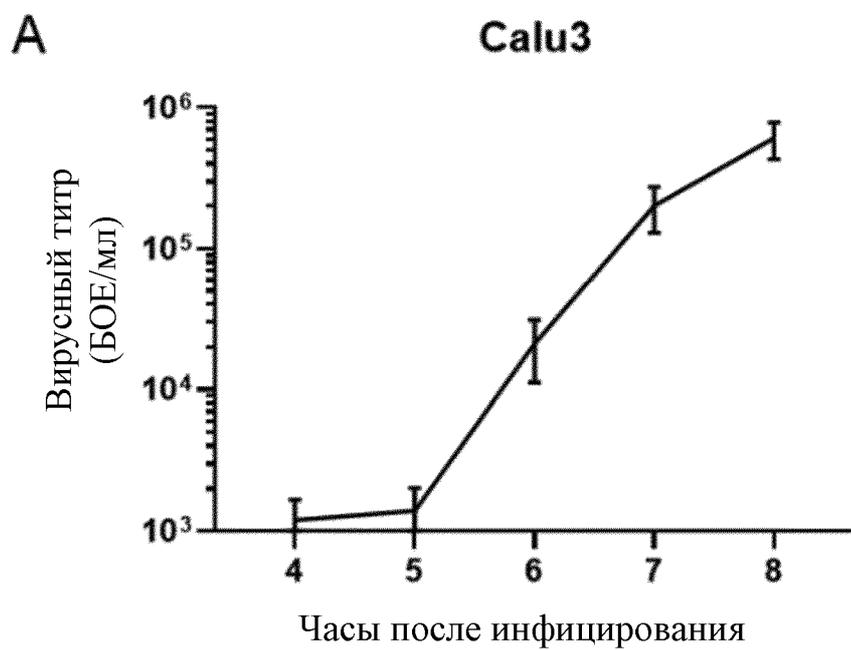


А

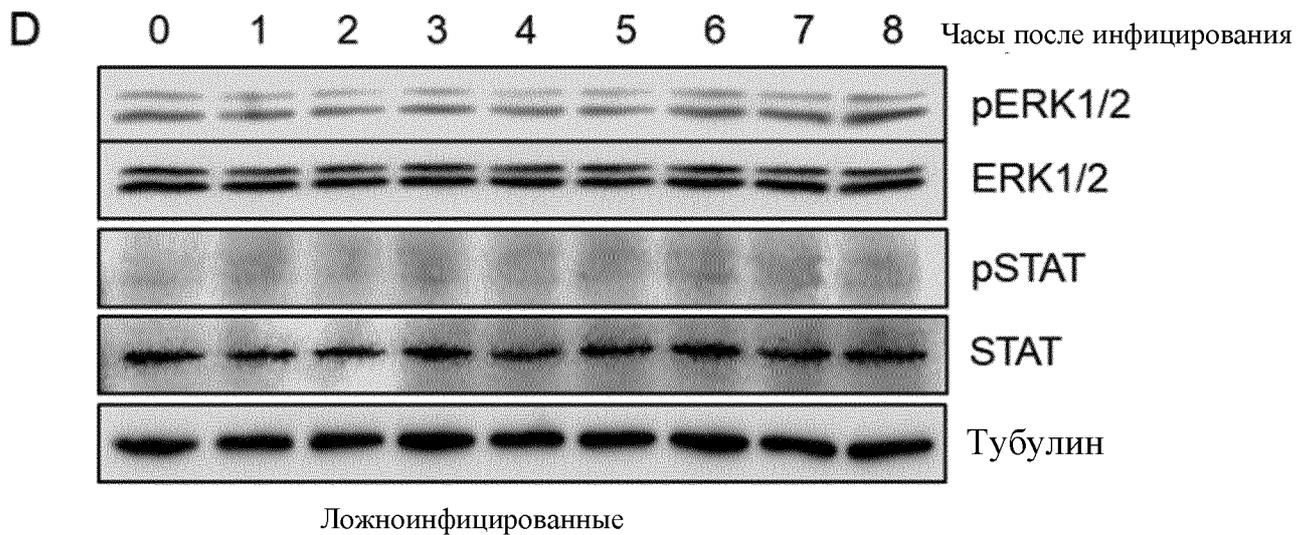
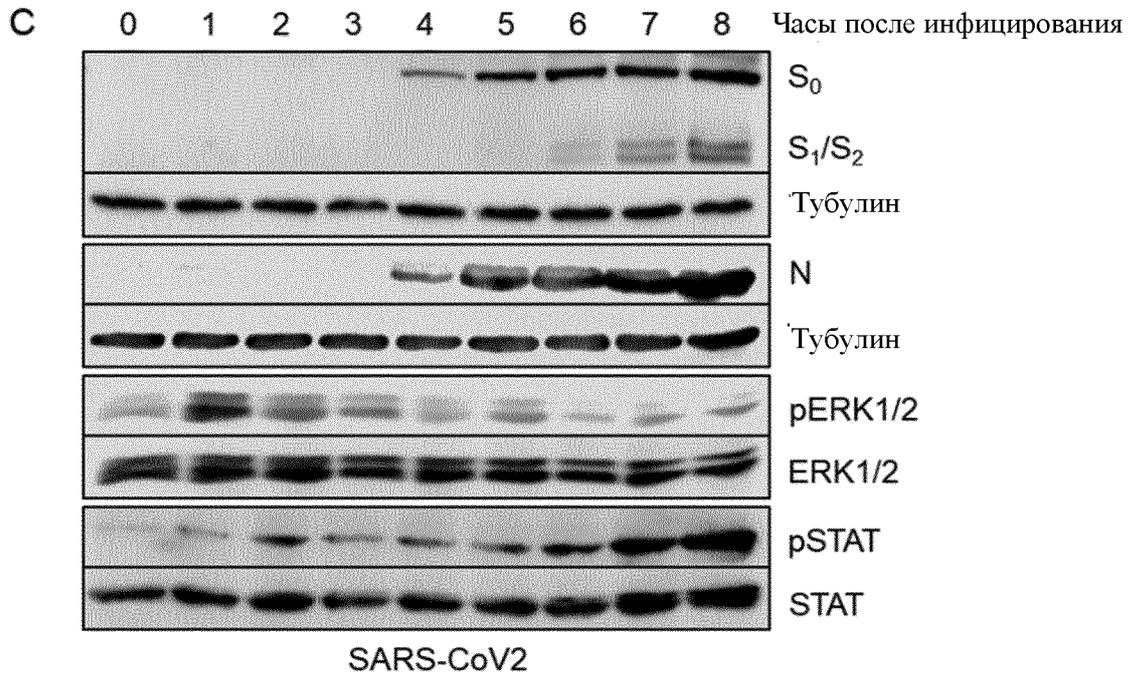


В



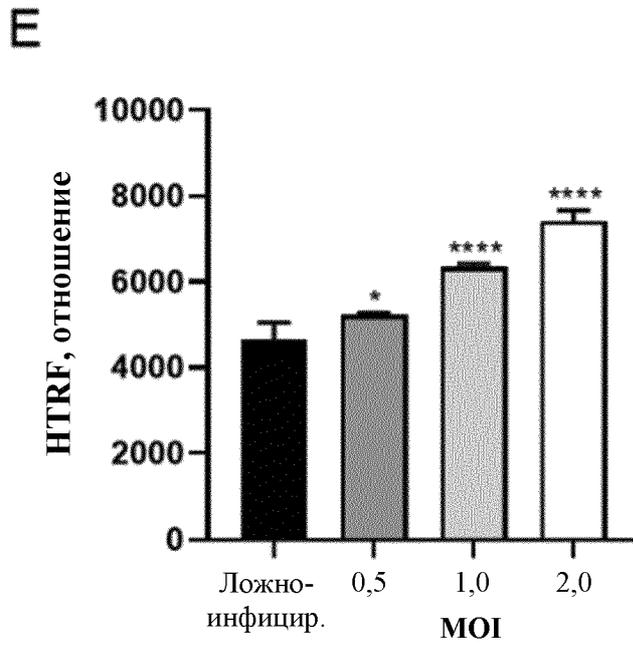


Фиг. 3 продолжение

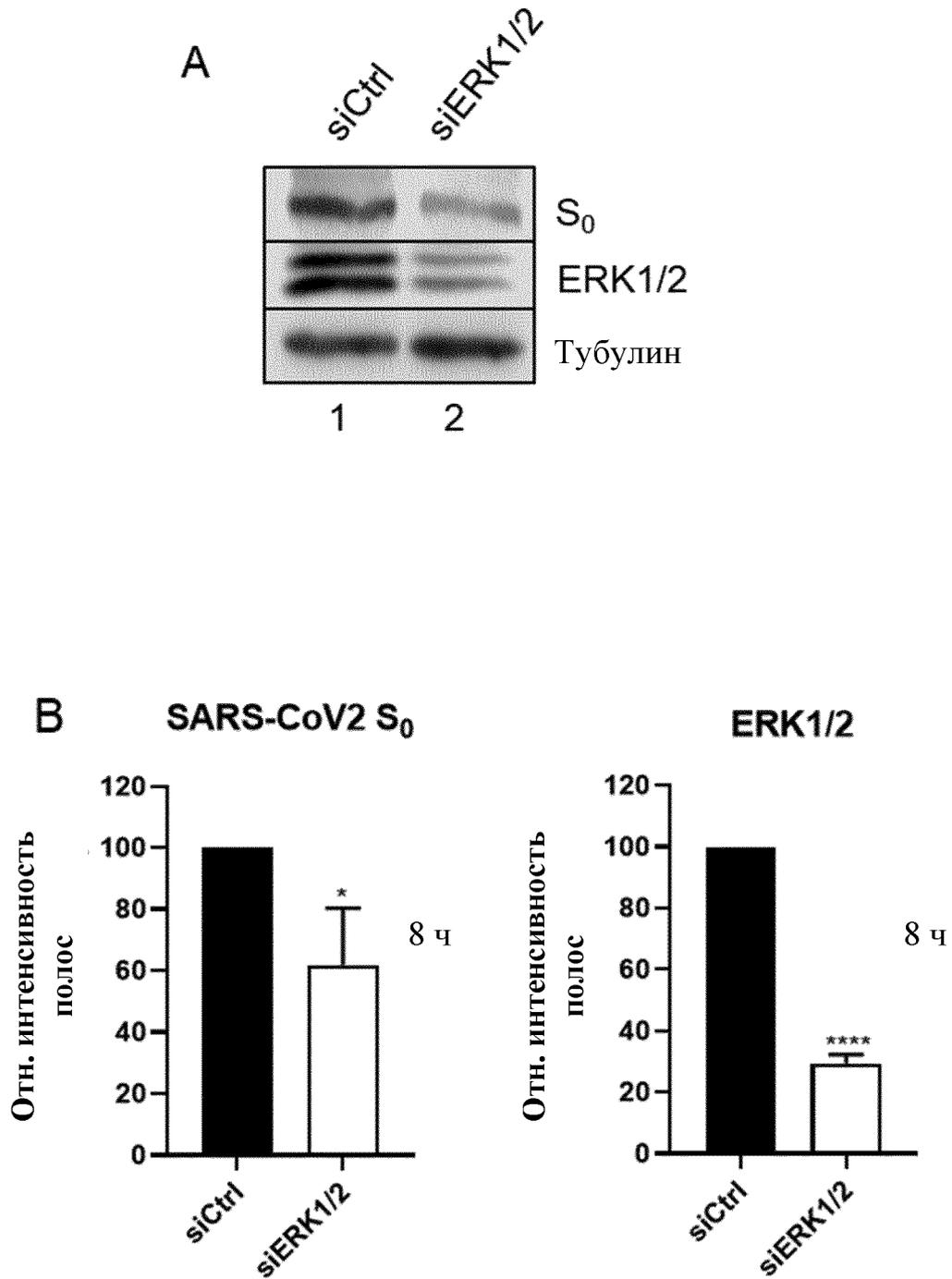


Фиг. 3 продолжение

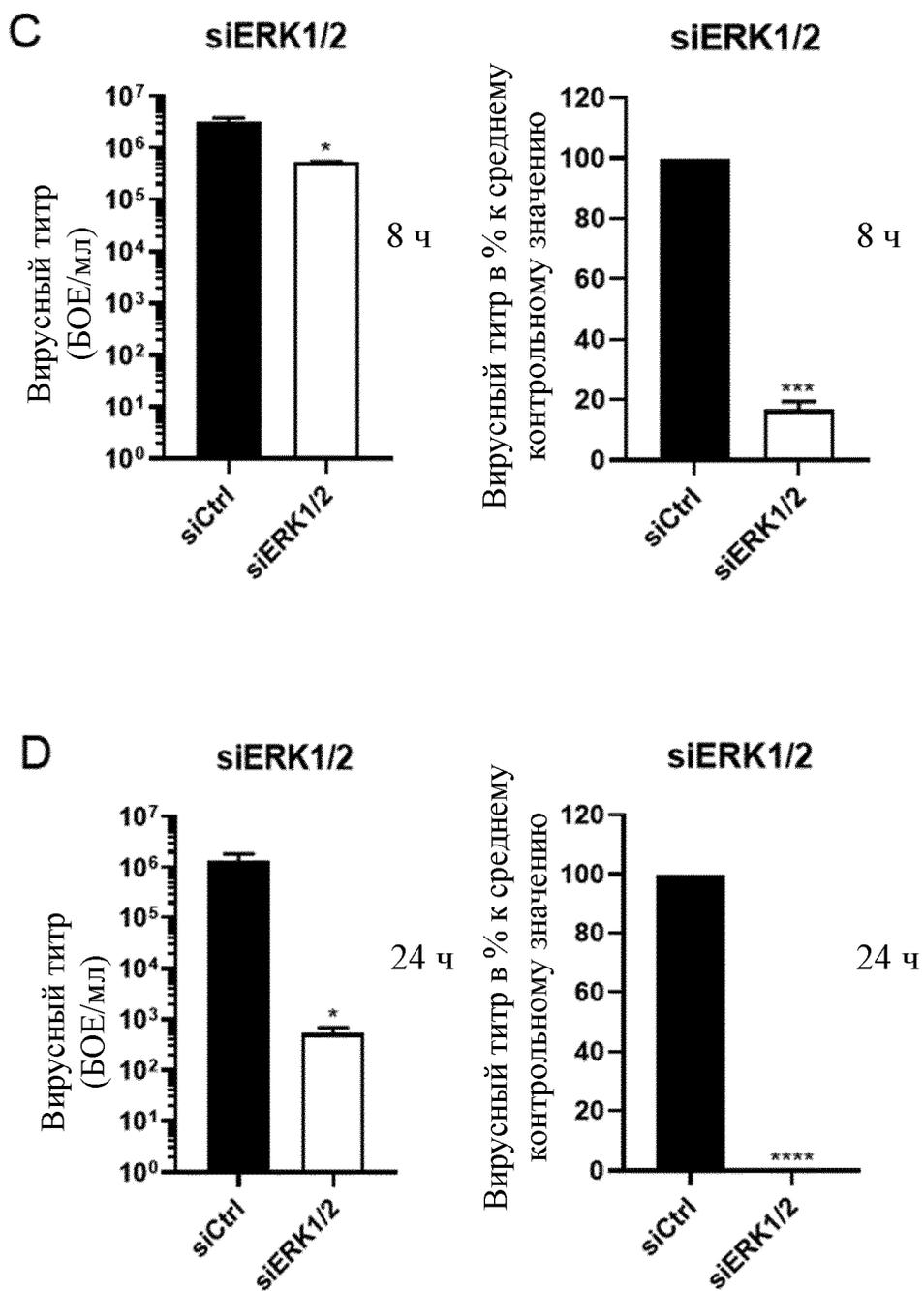
Активация ERK, HTRF



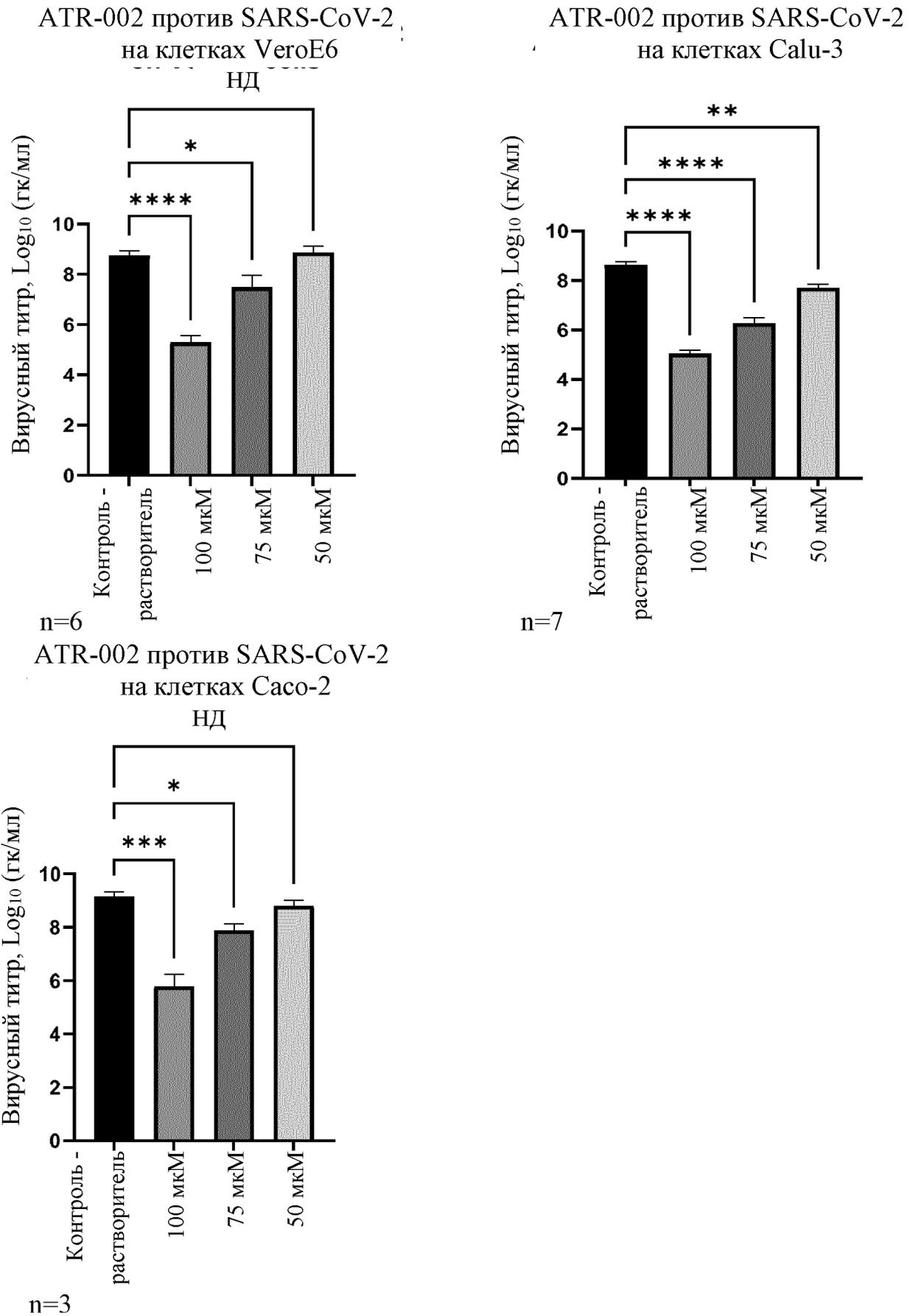
Фиг. 4



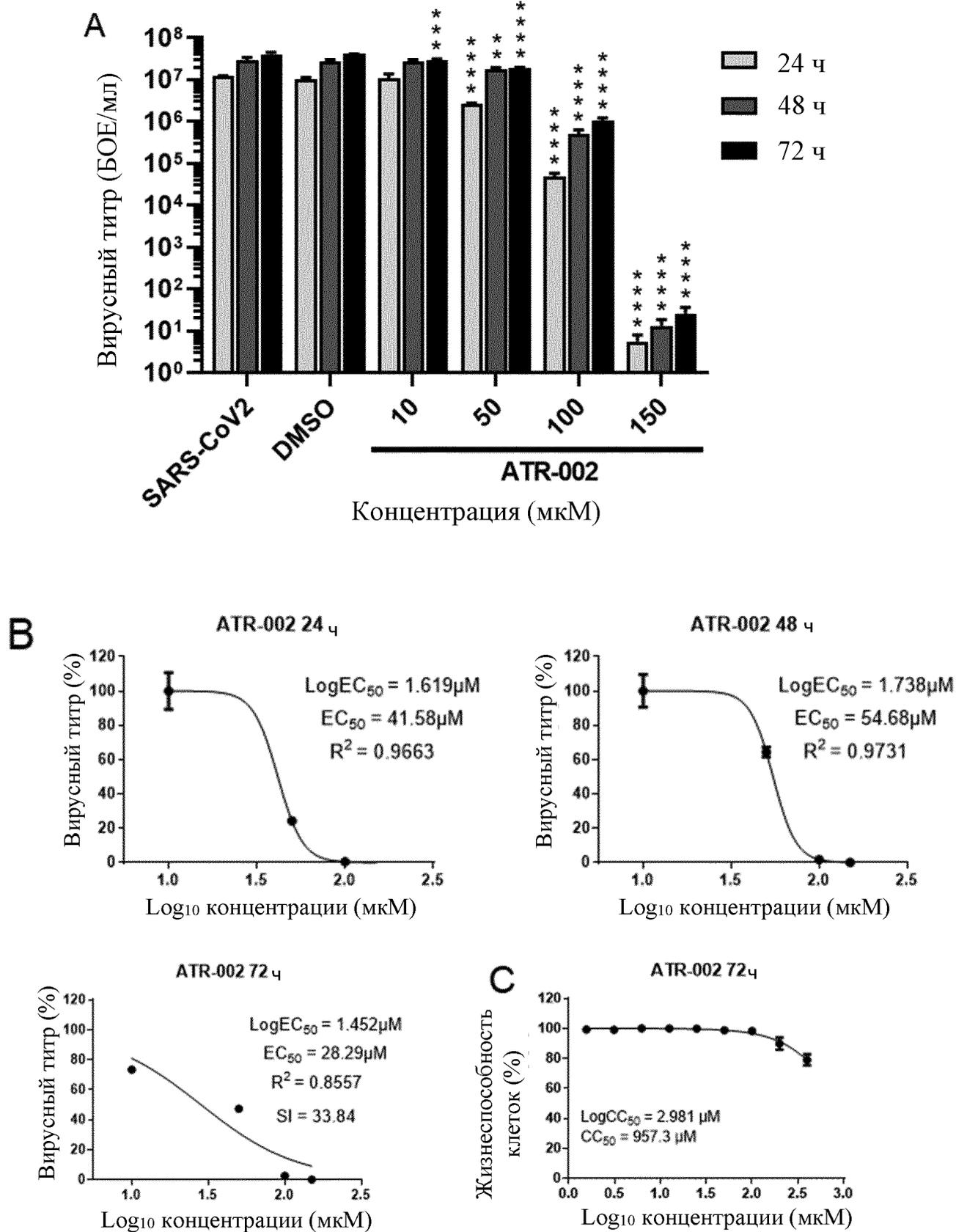
Фиг. 4 продолжение



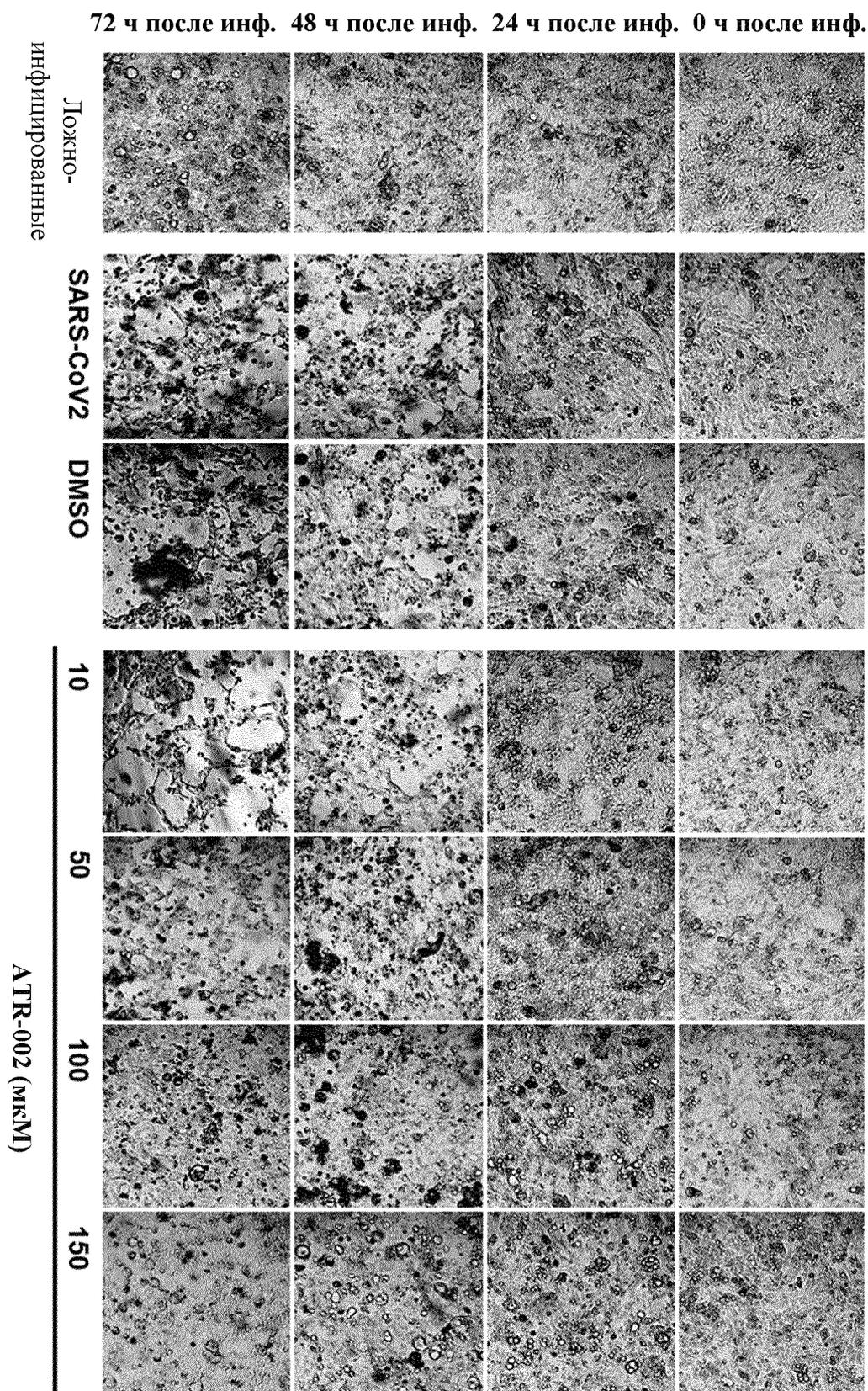
Фиг. 5



Фиг. 6

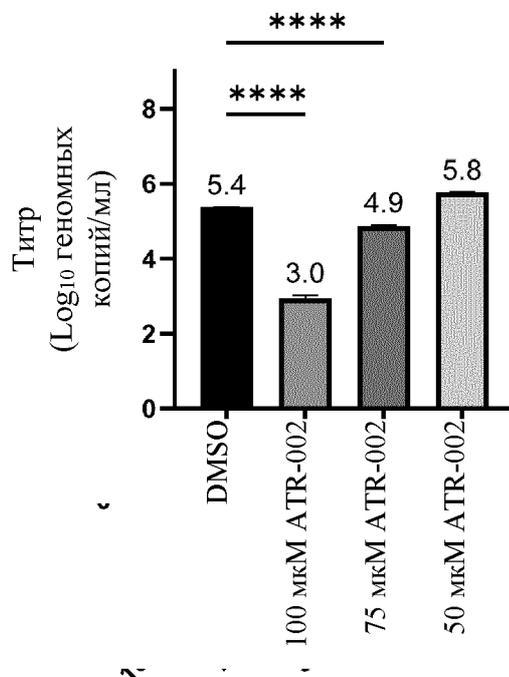


Фиг. 6 D

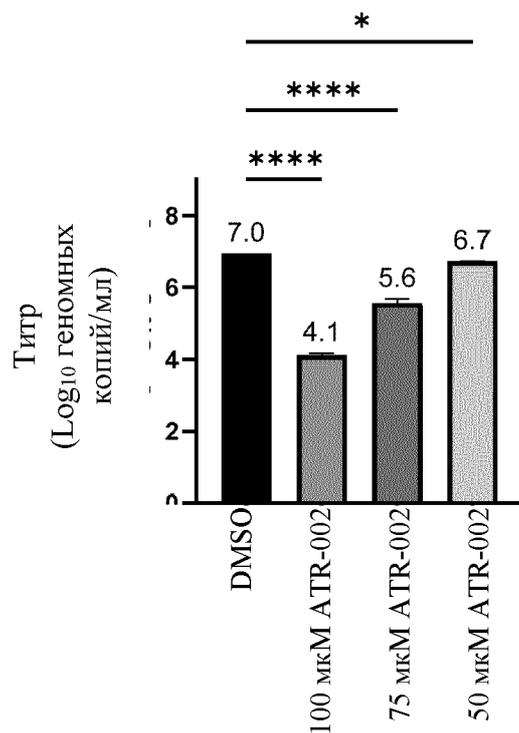


Фиг. 7

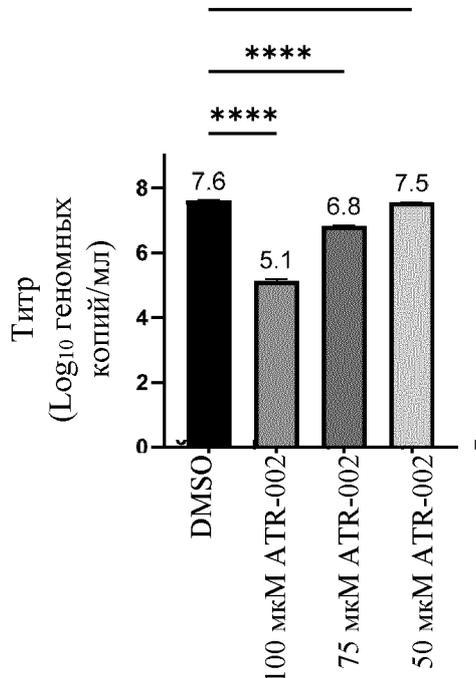
Обработка ATR-002 клеток VeroE6, инфицированных SARS-CoV-2 SA при MOI 0,1



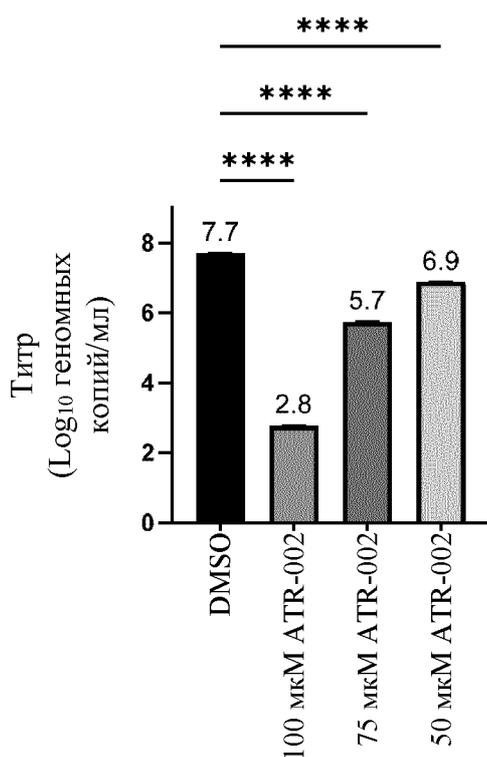
Обработка ATR-002 клеток VeroE6, инфицированных SARS-CoV-2 SA при MOI 1



Фиг. 7 продолжение
Обработка ATR-002 клеток VeroE6,
инфицированных SARS-CoV-2 SA при
MOI 10
НД

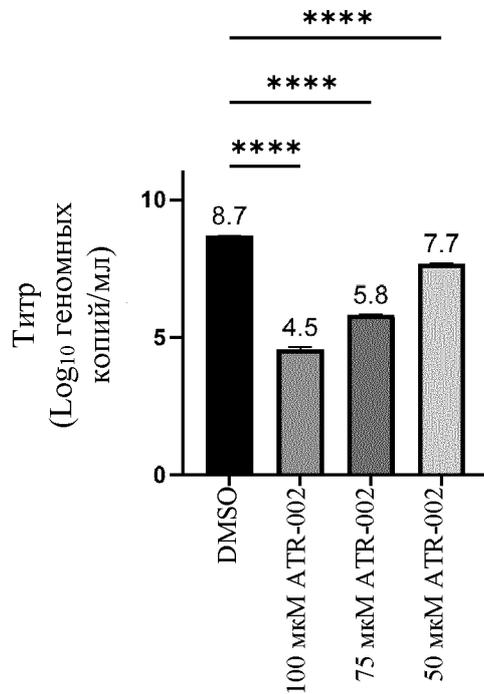


Обработка ATR-002 клеток Calu-3,
инфицированных SARS-CoV-2 SA при
MOI 0,1

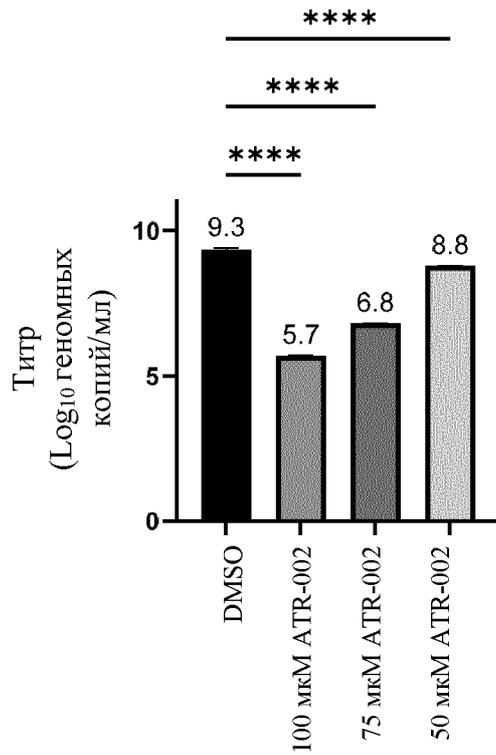


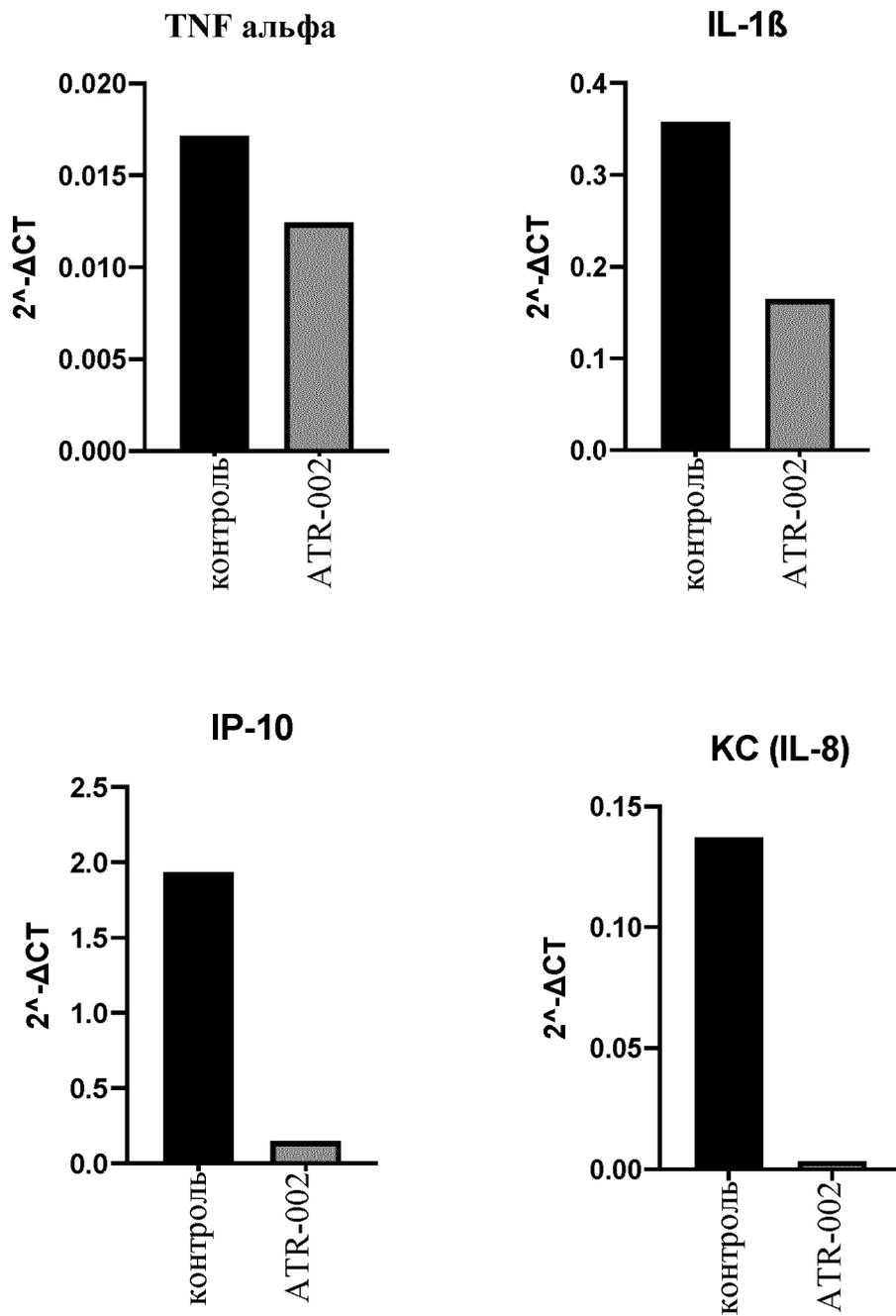
Фиг. 7 продолжение

Обработка ATR-002 клеток Calu-3,
инфицированных SARS-CoV-2 SA при
MOI 1

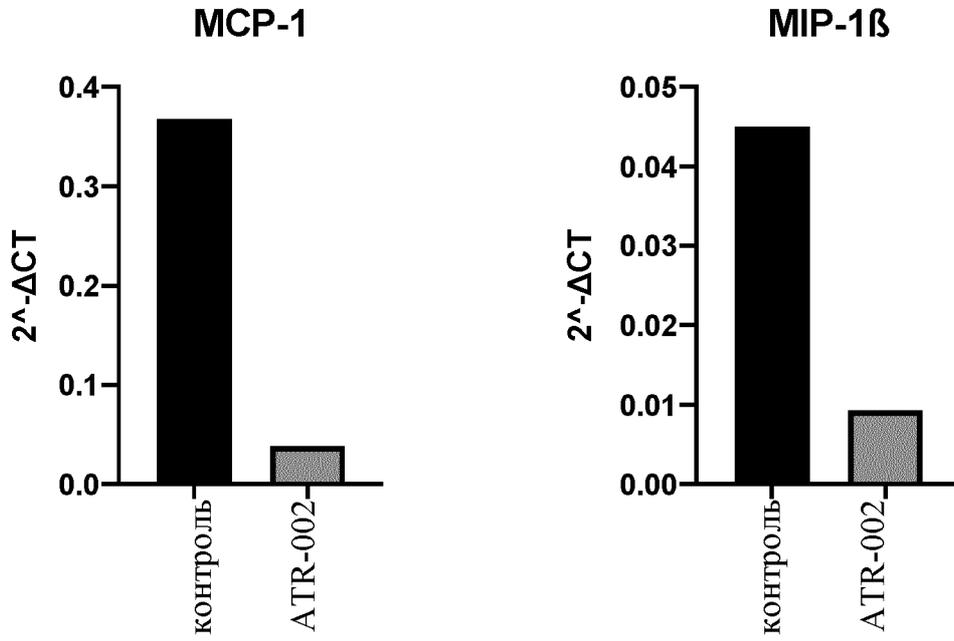


Обработка ATR-002 клеток Calu-3,
инфицированных SARS-CoV-2 SA при
MOI 10

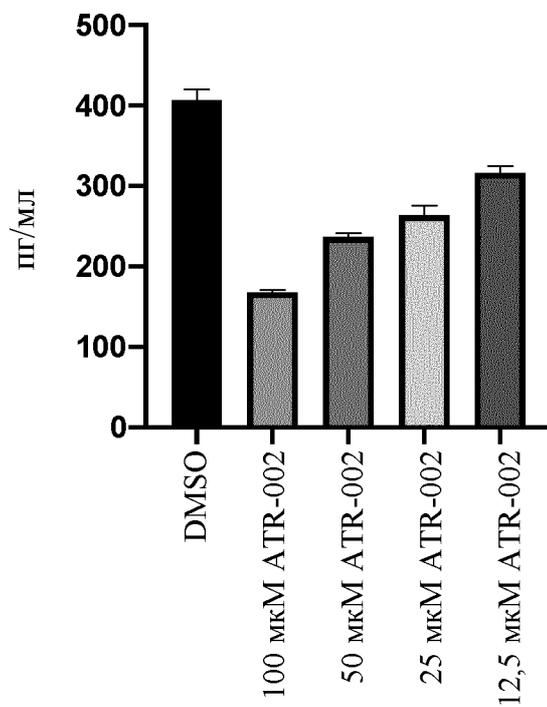




Фиг. 8 продолжение

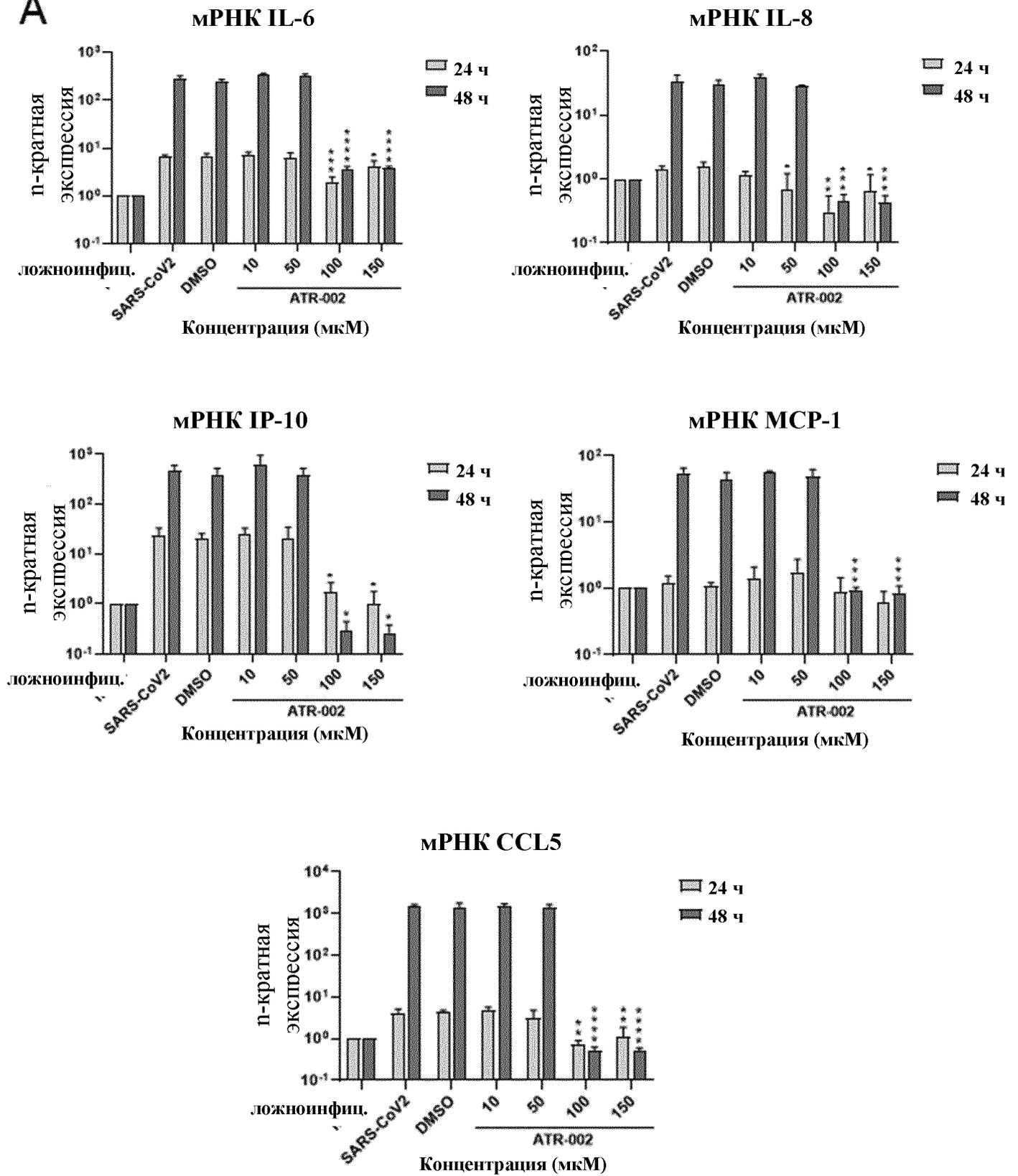


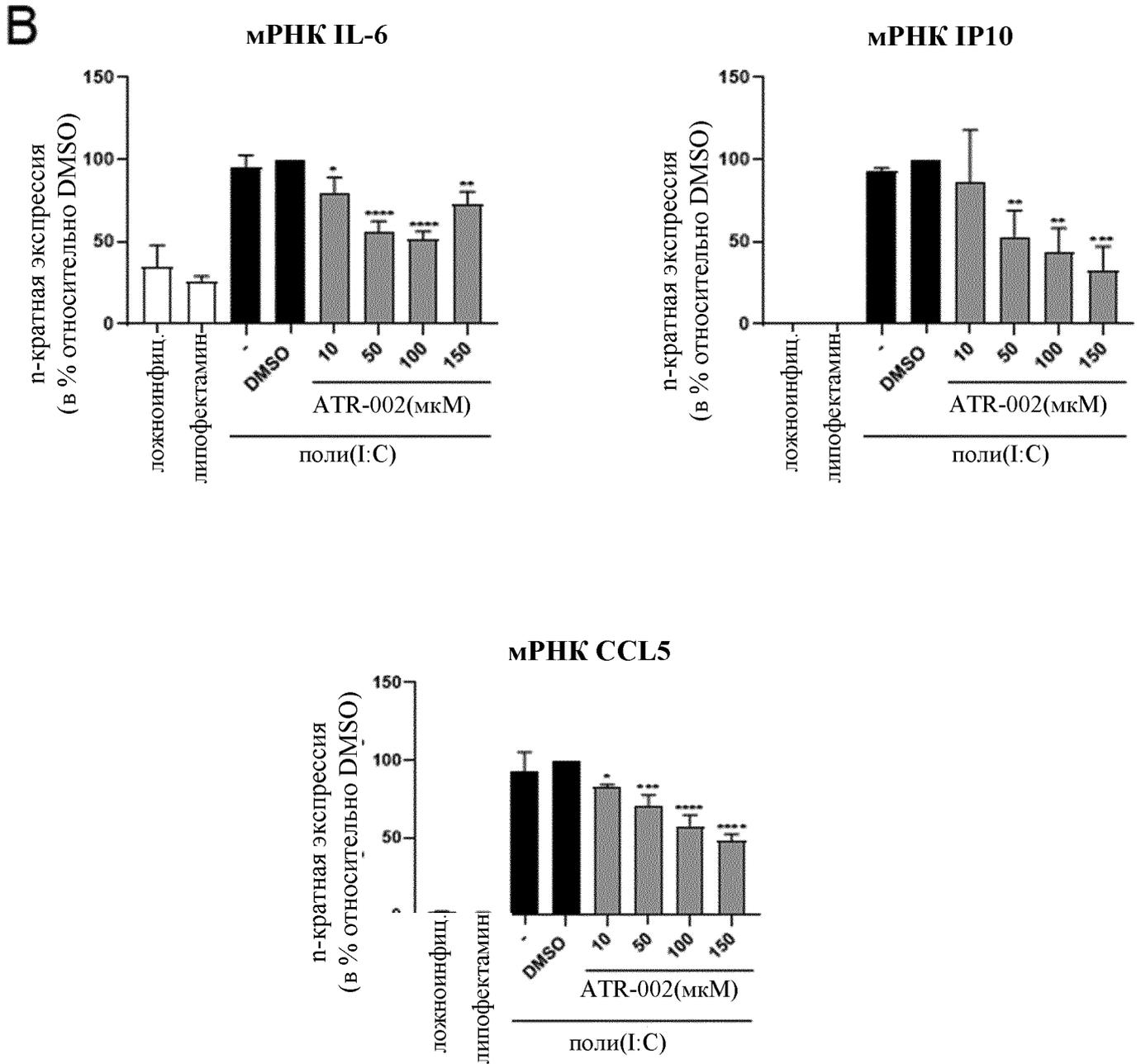
Снижение MCP-1 после обработки ATR-002 клеток Сасо-2, инфицированных SARS-CoV-2



Фиг. 10

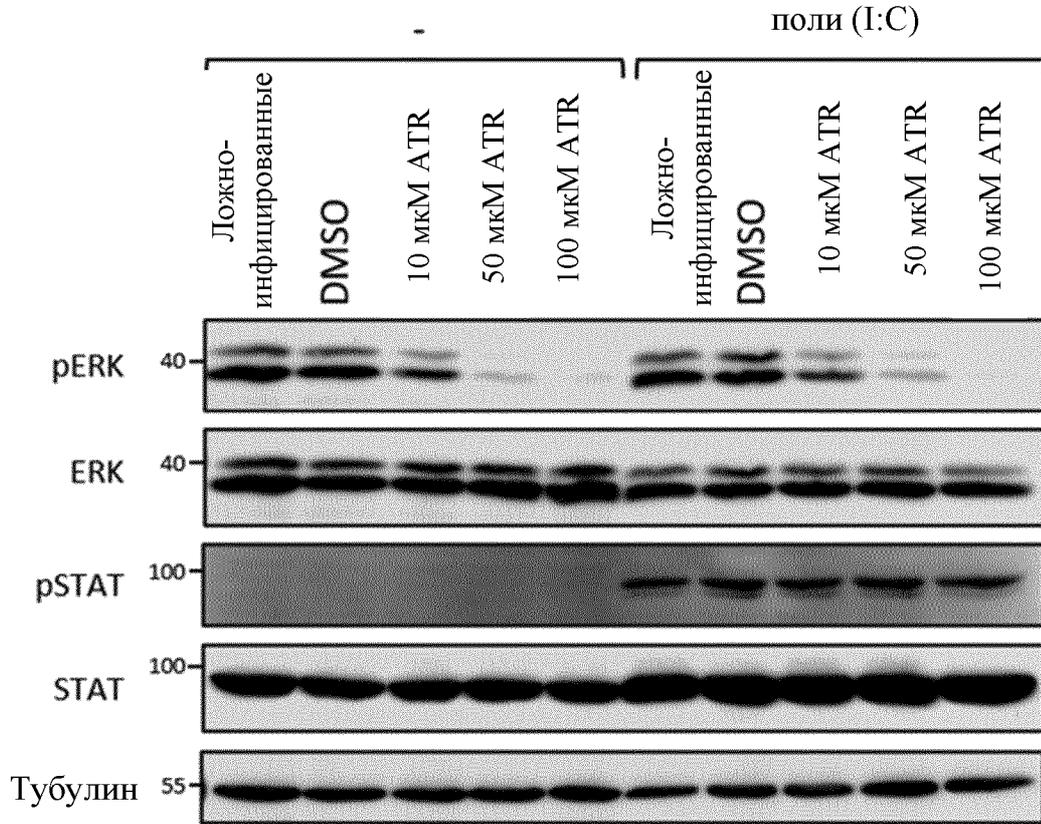
A





Фиг. 11

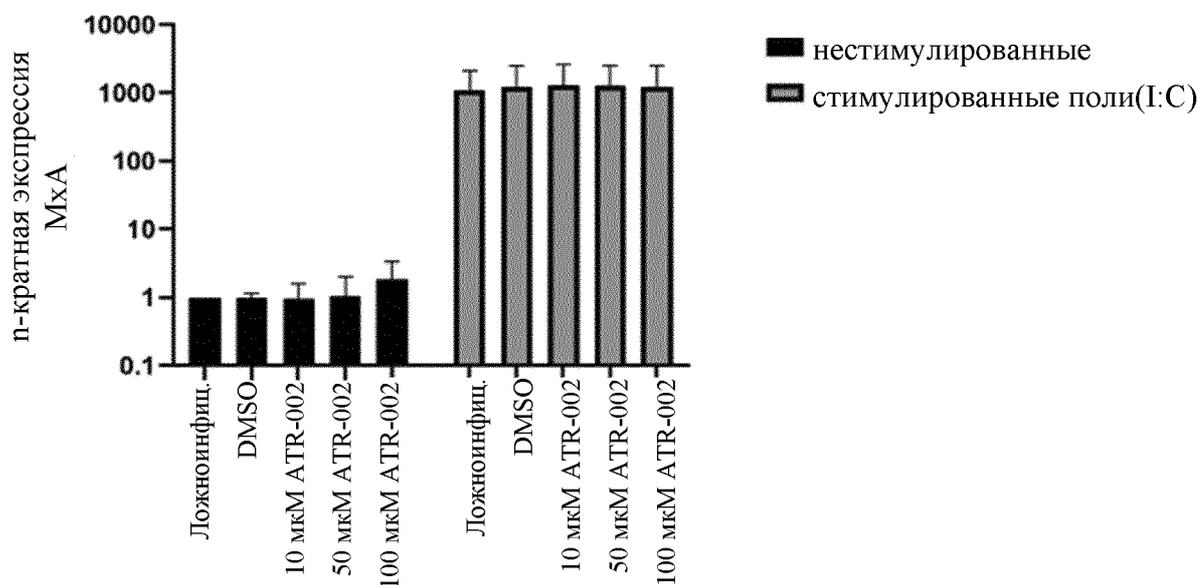
A



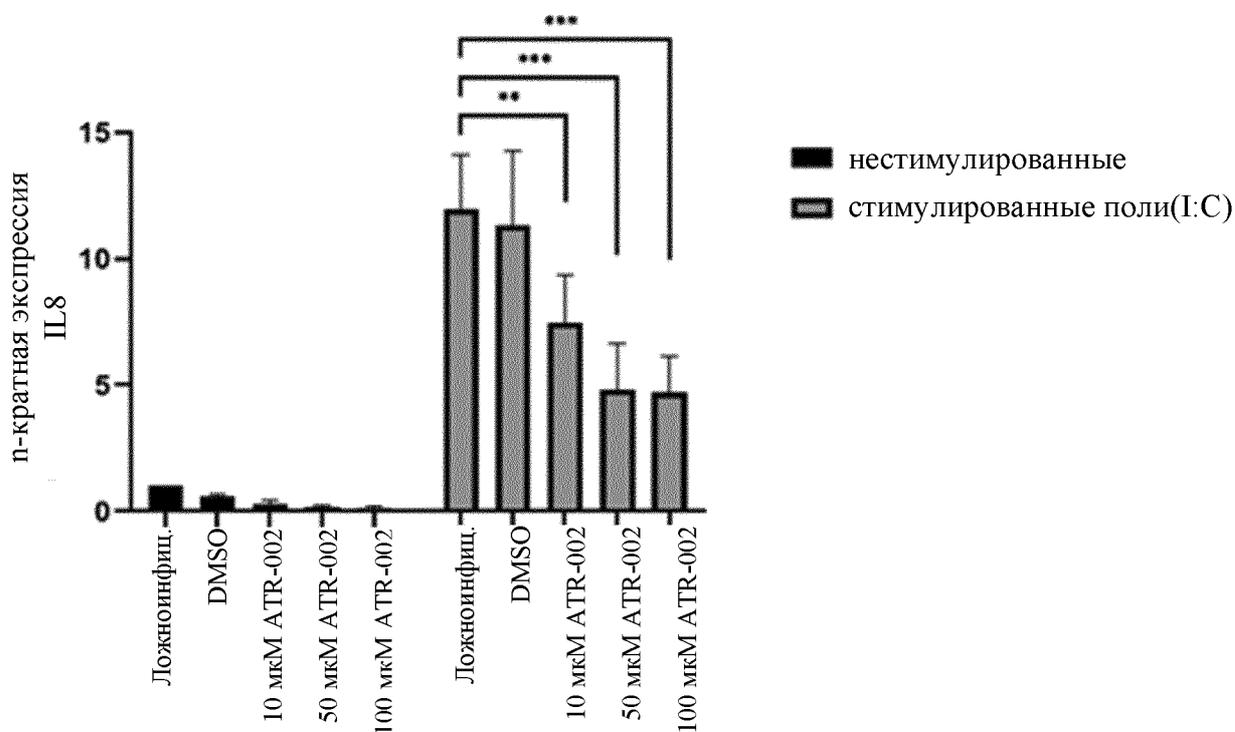
Фиг. 11 продолжение

В

мРНК МхА после 24 ч обработки АТР

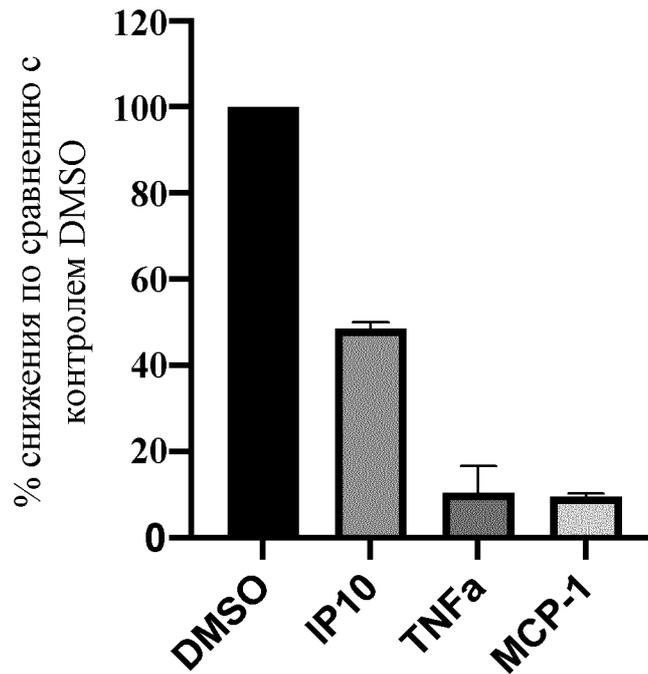


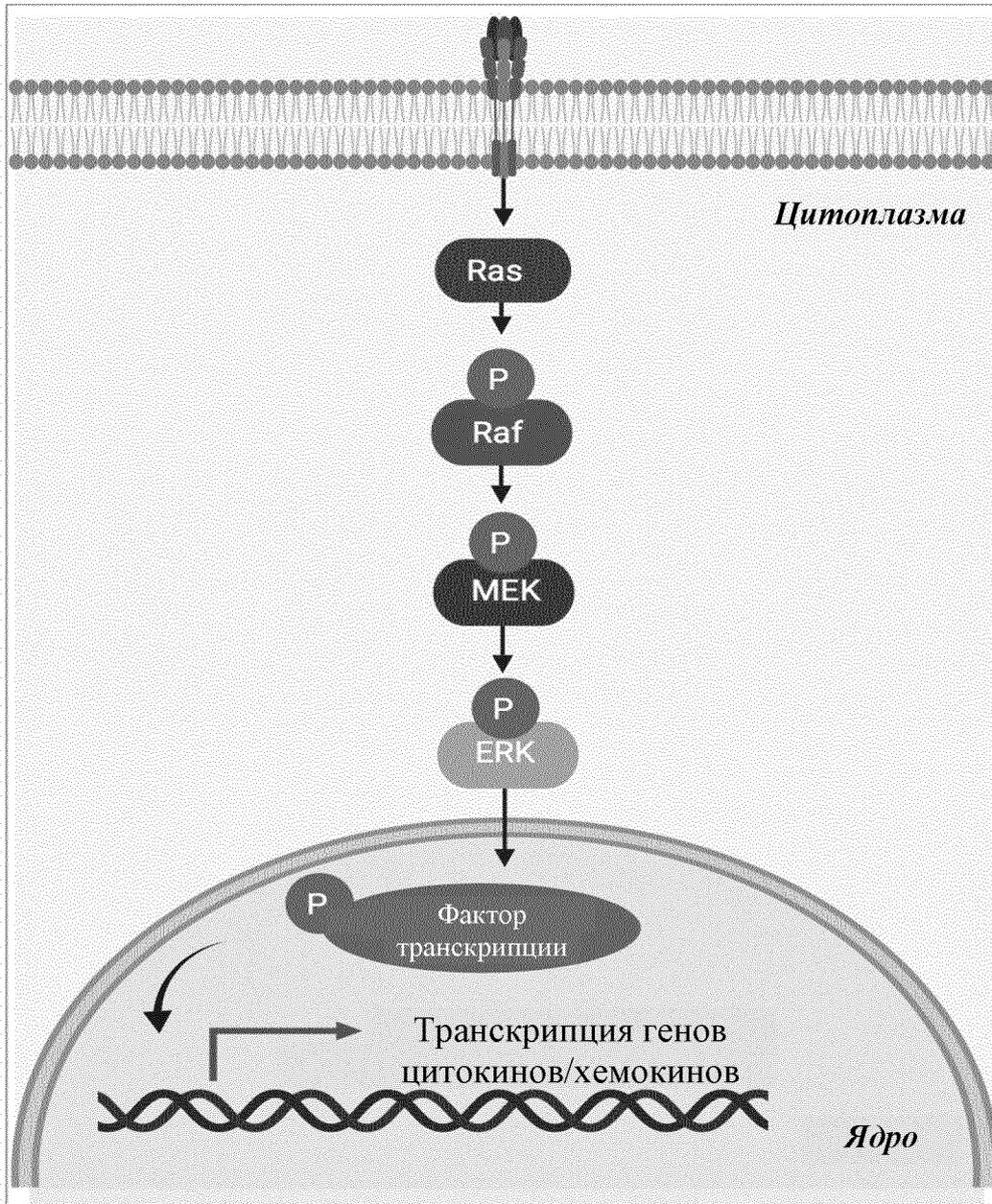
мРНК IL8 после 24 ч обработки АТР



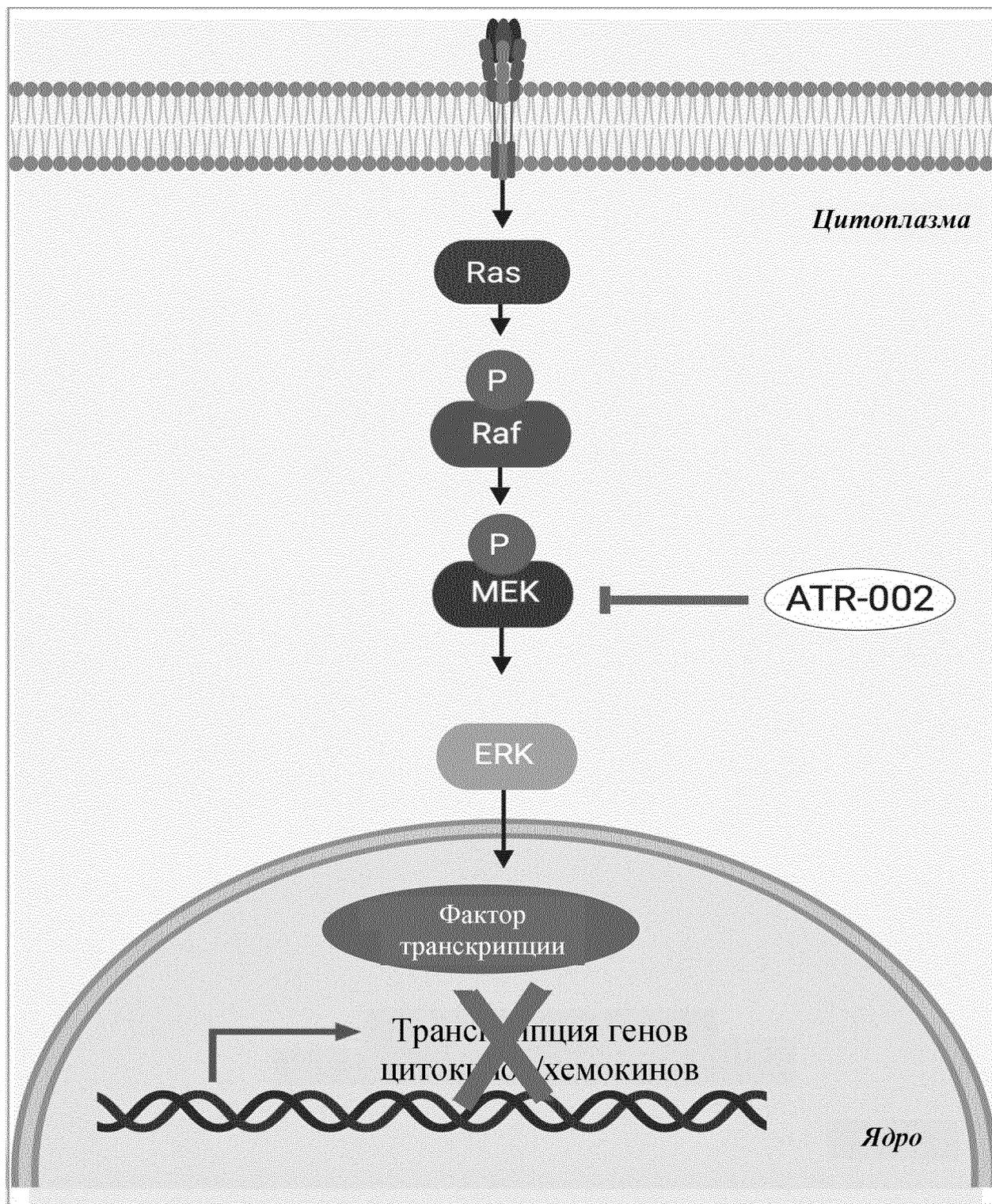
Фиг. 12

РВМС человека
10 мкг/мл ATR-002

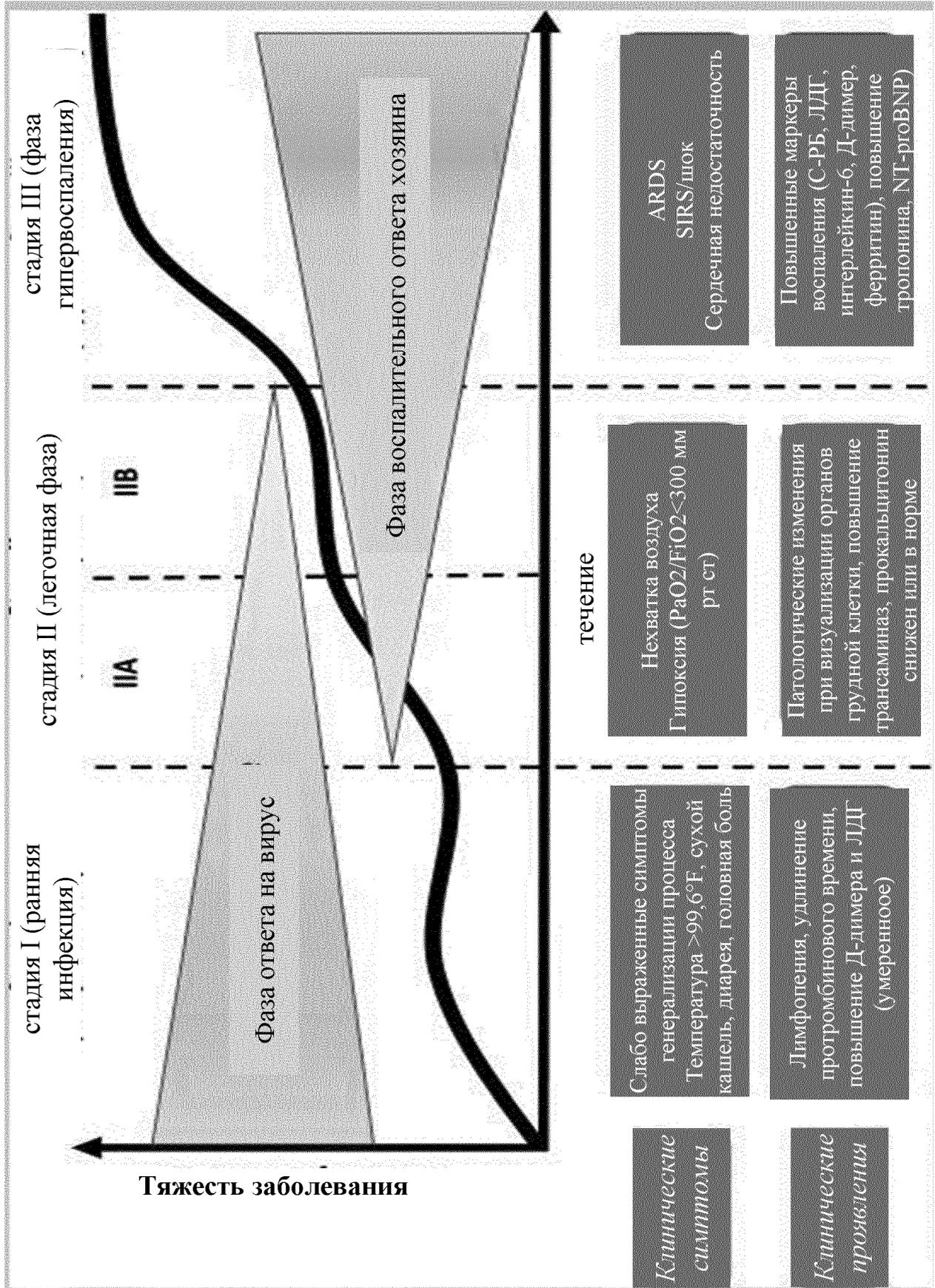




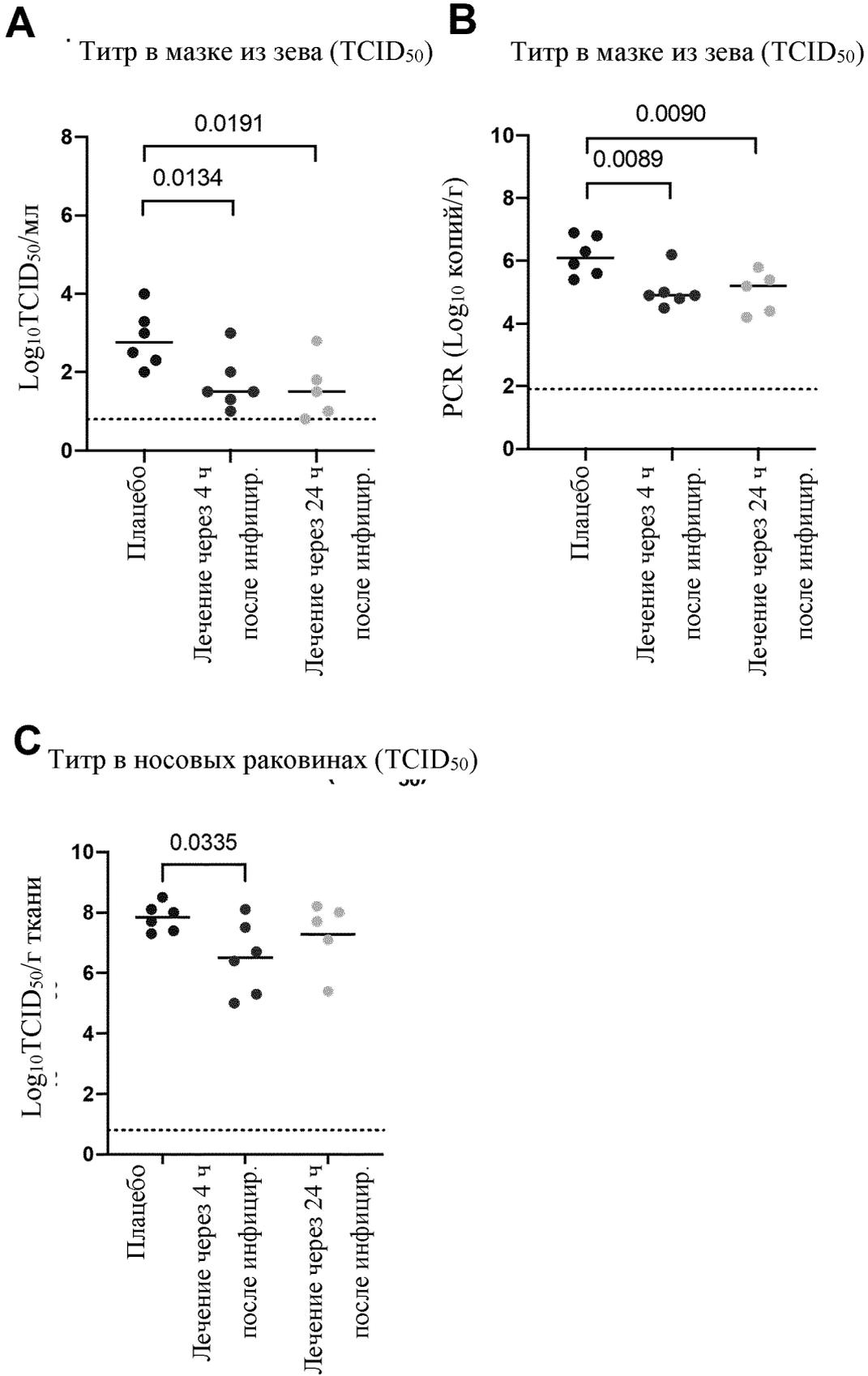
Фиг. 13 продолжение



Фиг. 15



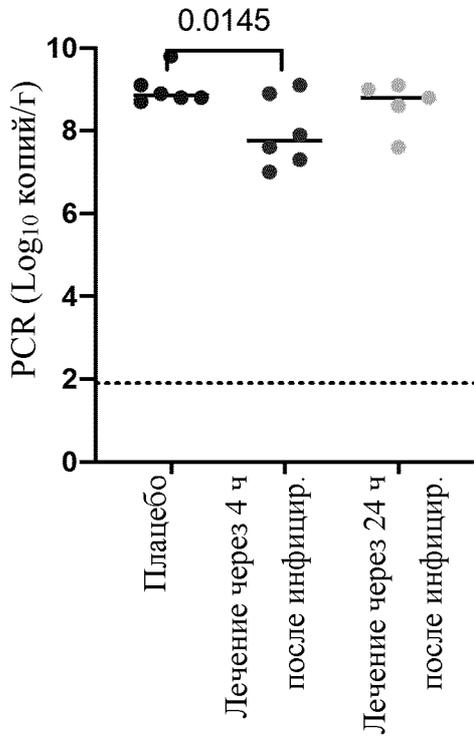
Фиг. 16



Фиг. 16 продолжение

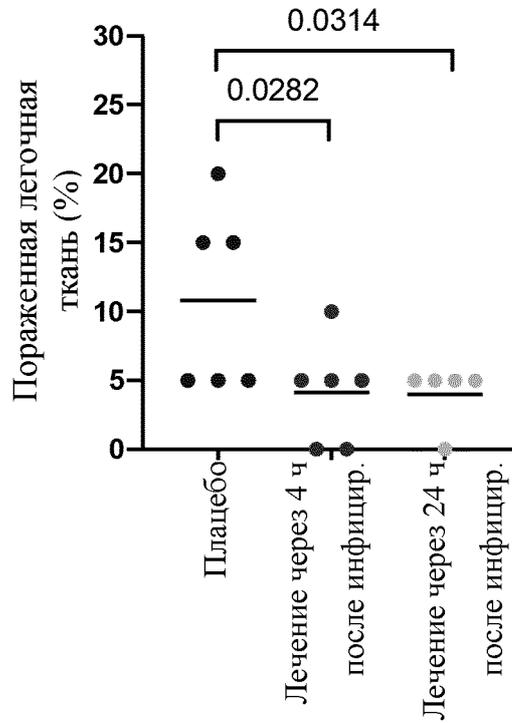
D

Титр в носовых раковинах (PCR)



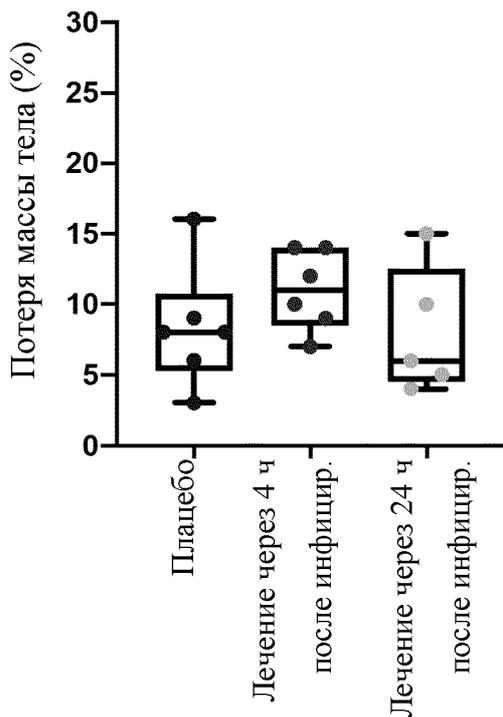
E

Повреждение легких

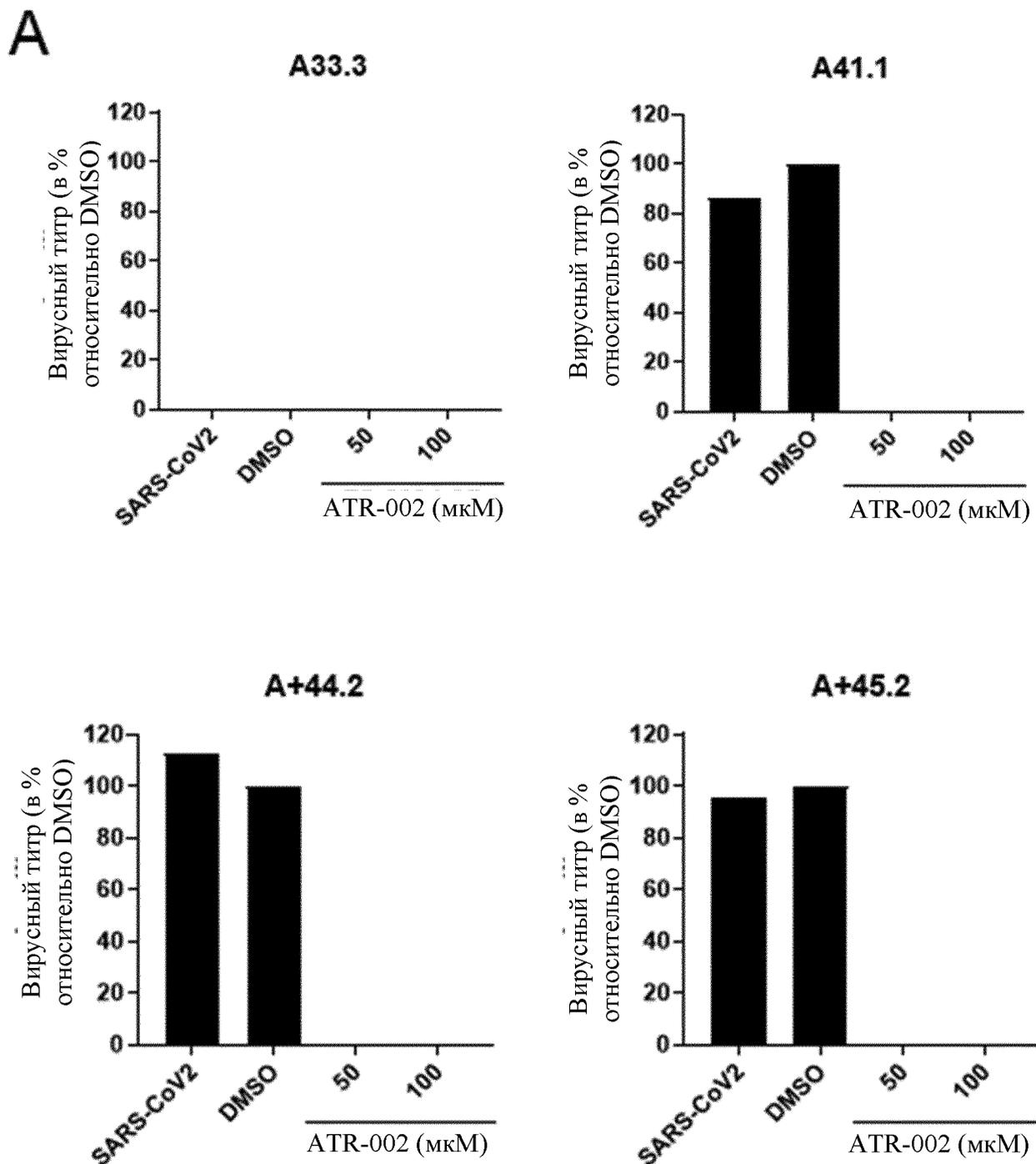


F

Потеря массы тела (%)

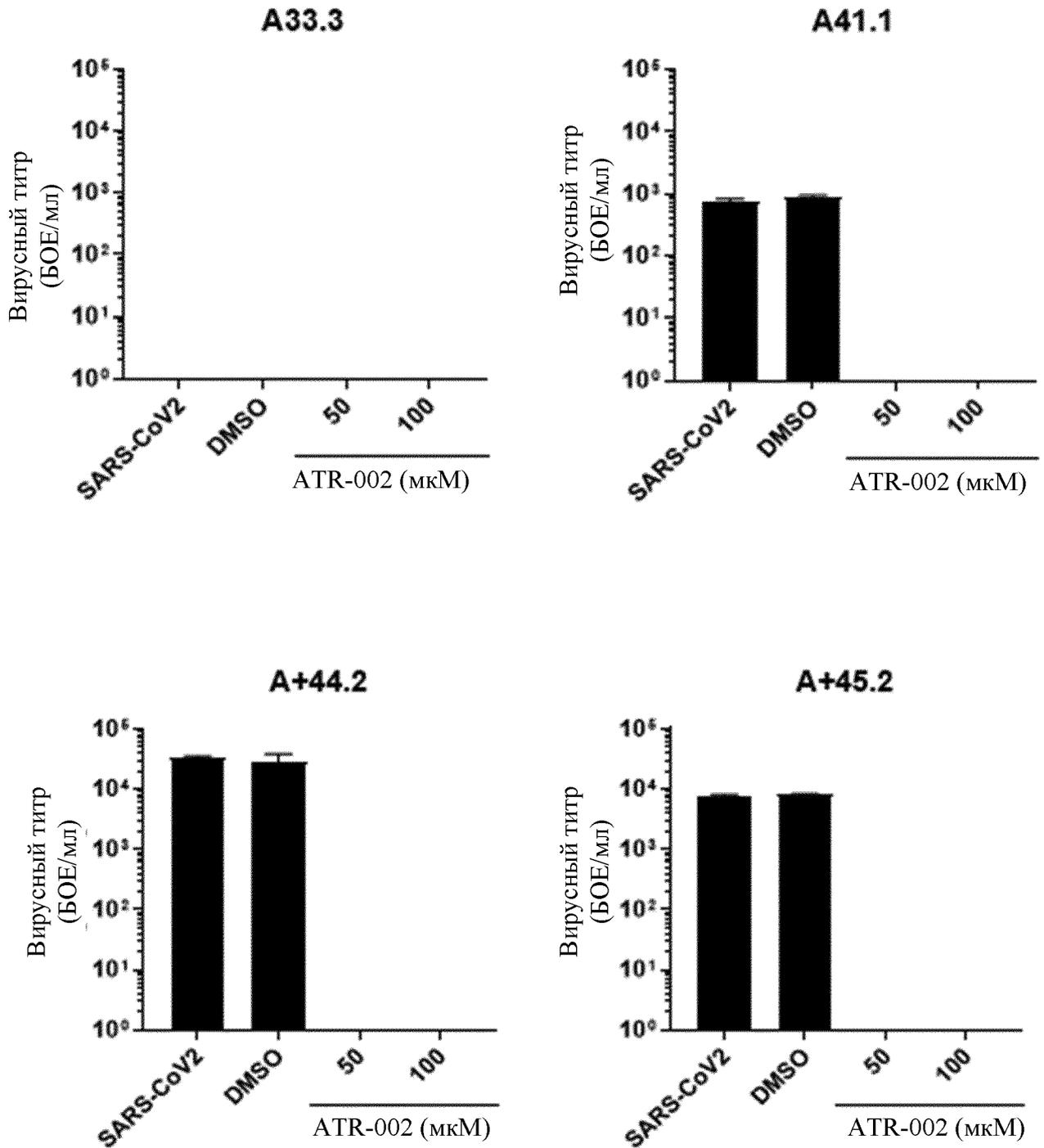


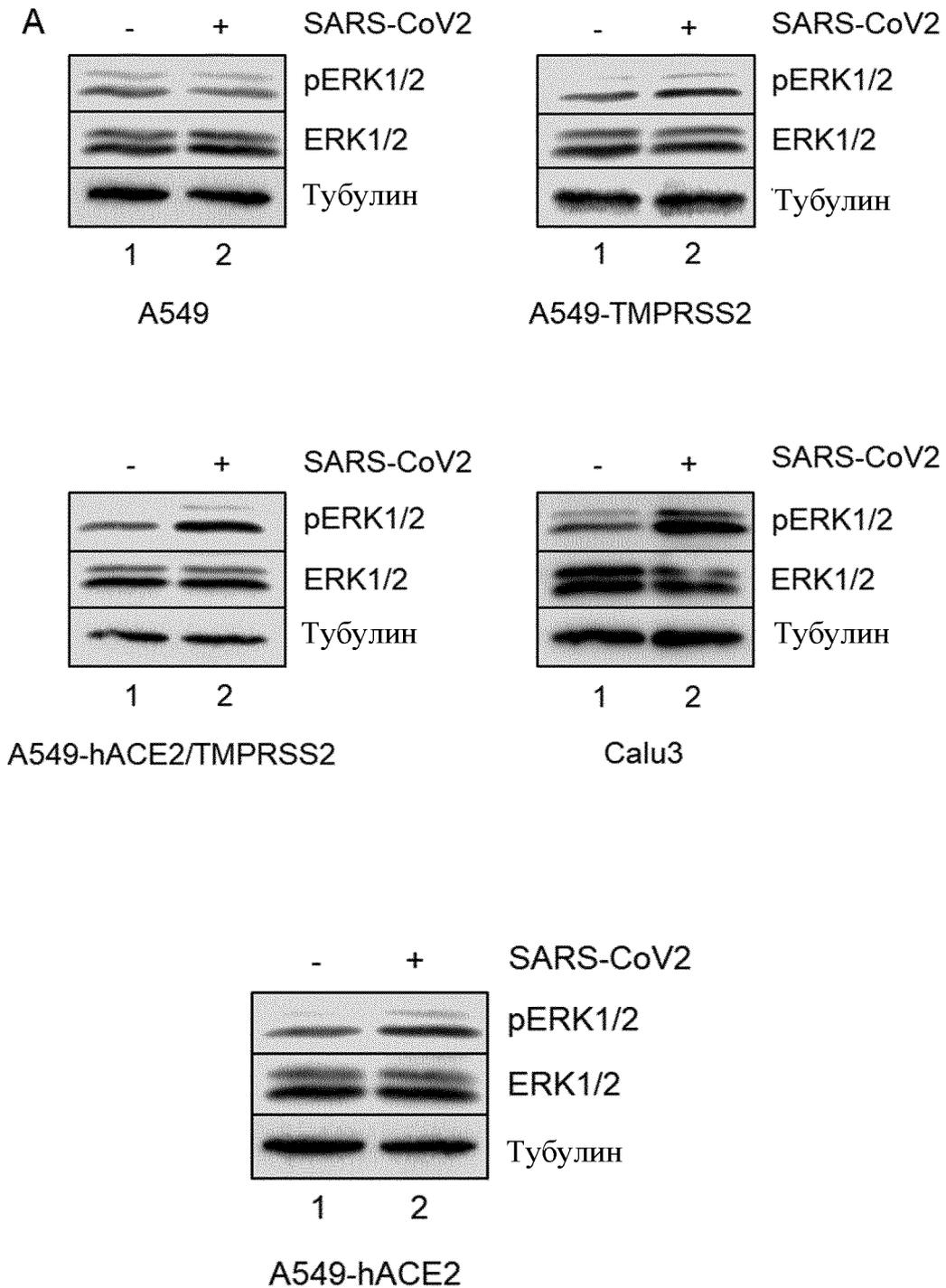
Фиг. 17



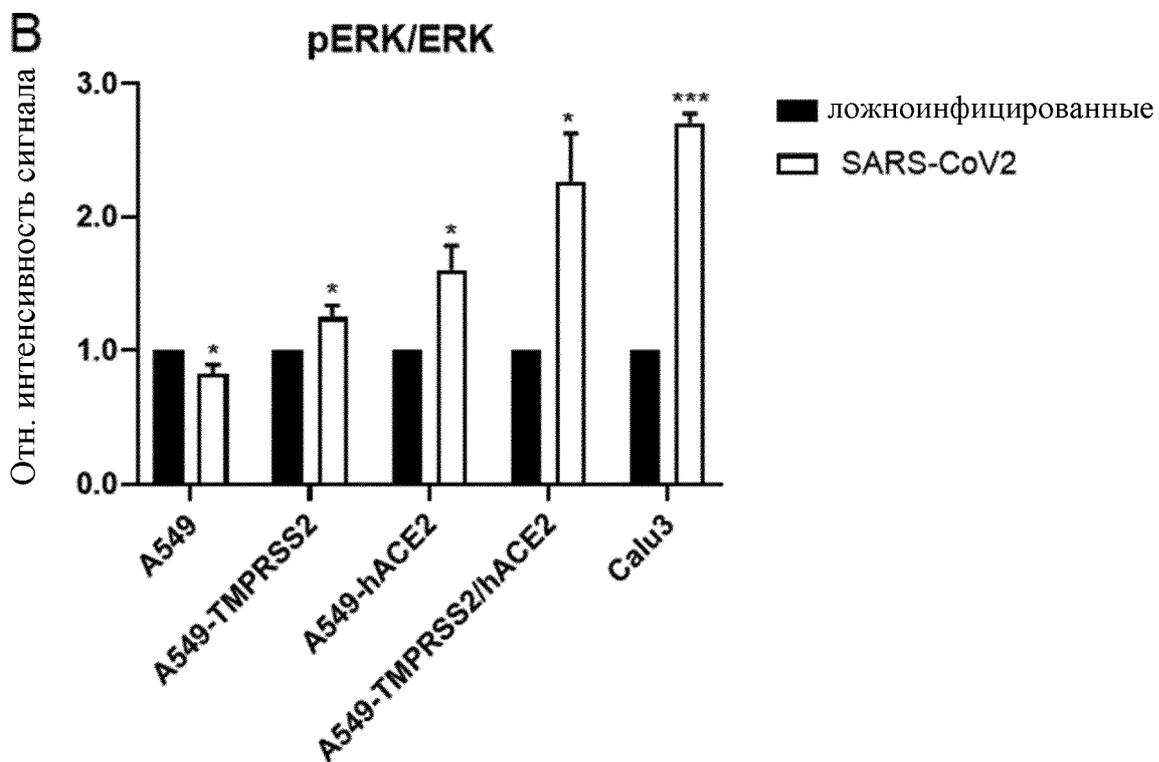
Фиг. 17 продолжение

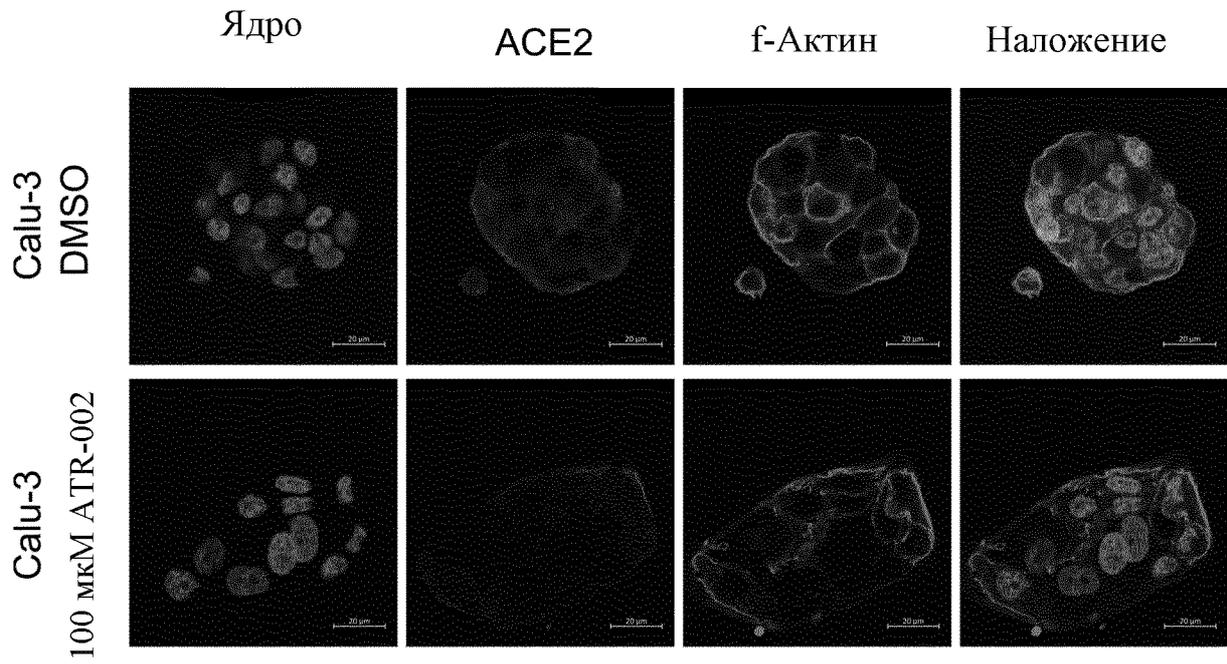
В





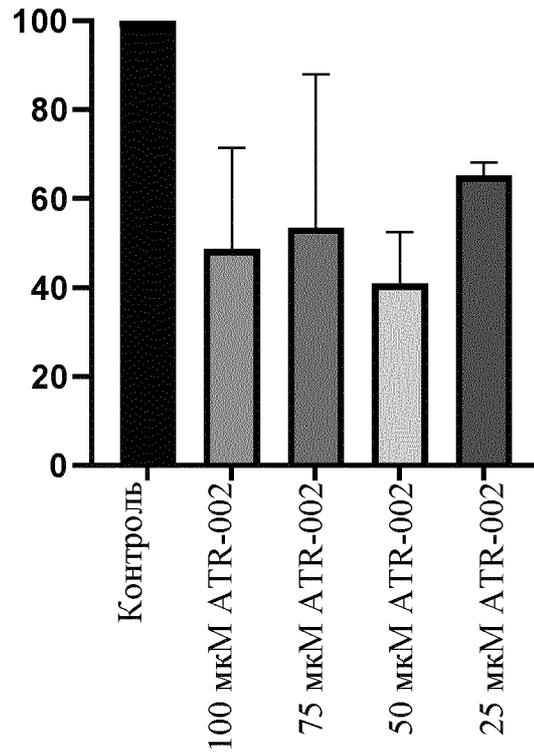
Фиг. 18 продолжение

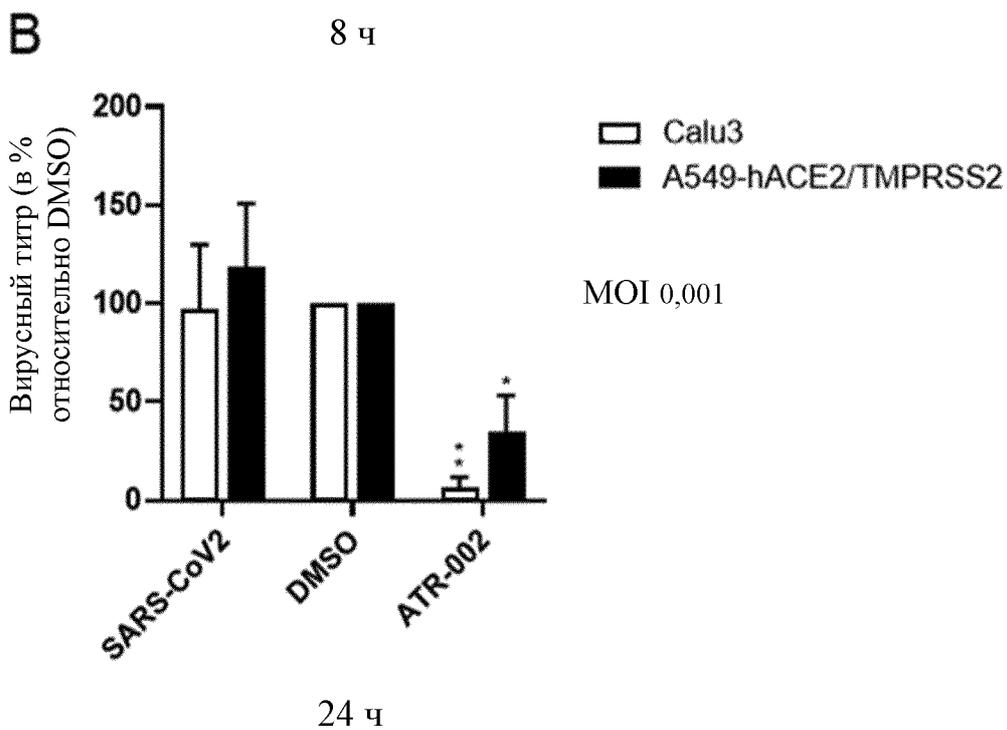
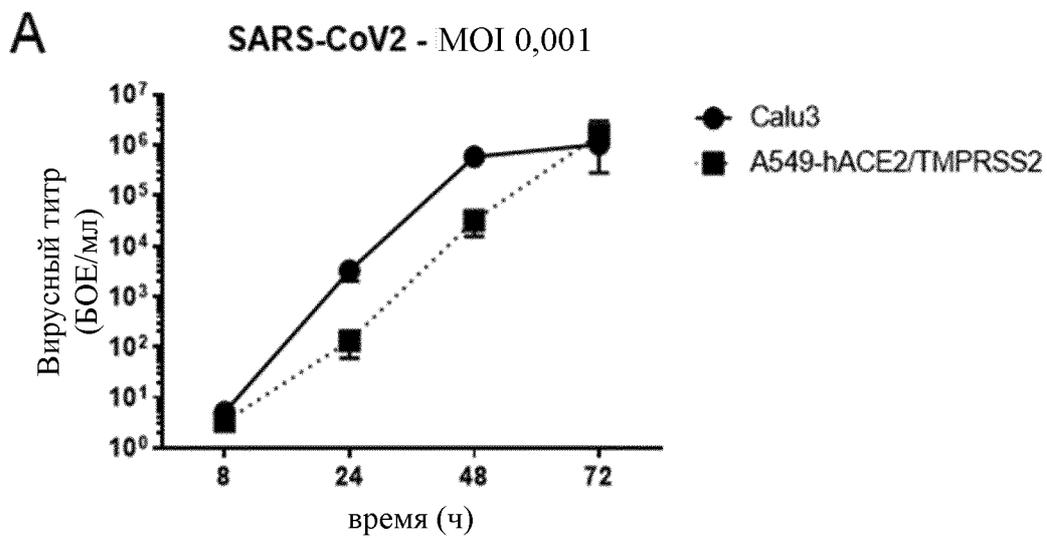




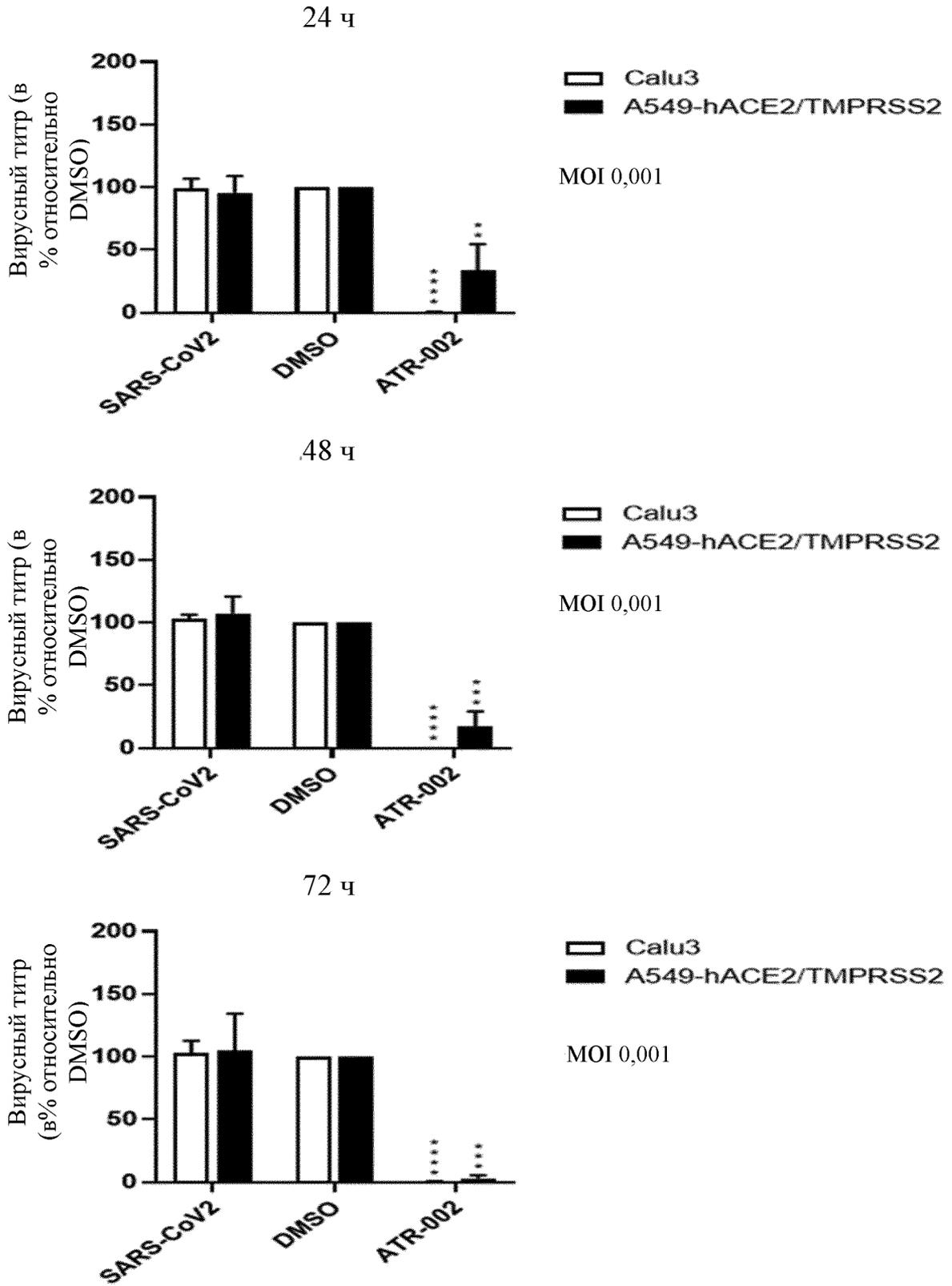
Снижение ACE2 после обработки ATR-002

Экспрессия ACE2 в %, нормализованная к β-актину, в сравнении с контролем

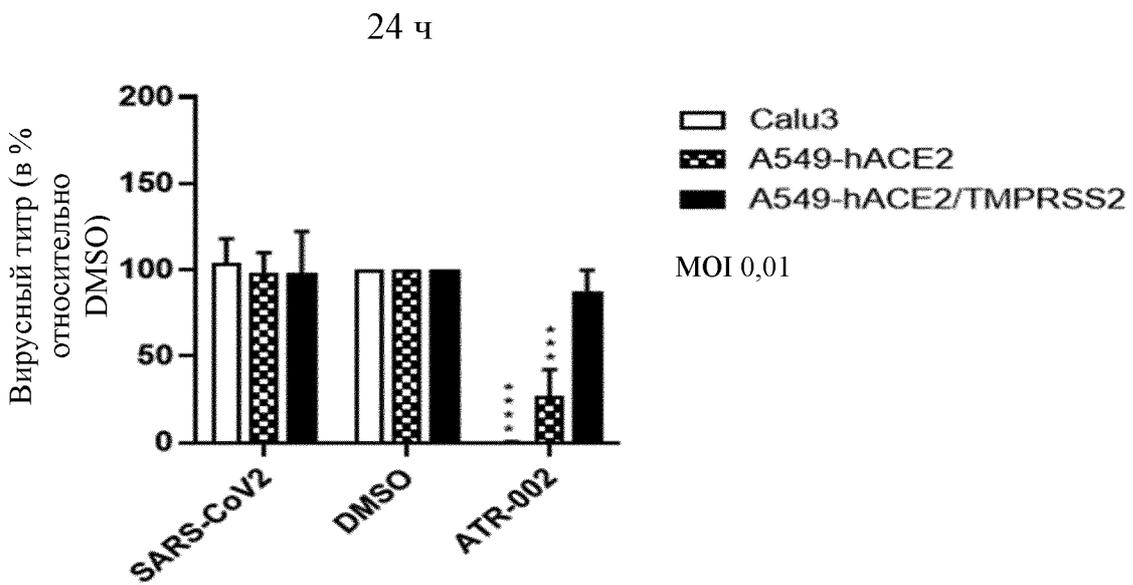
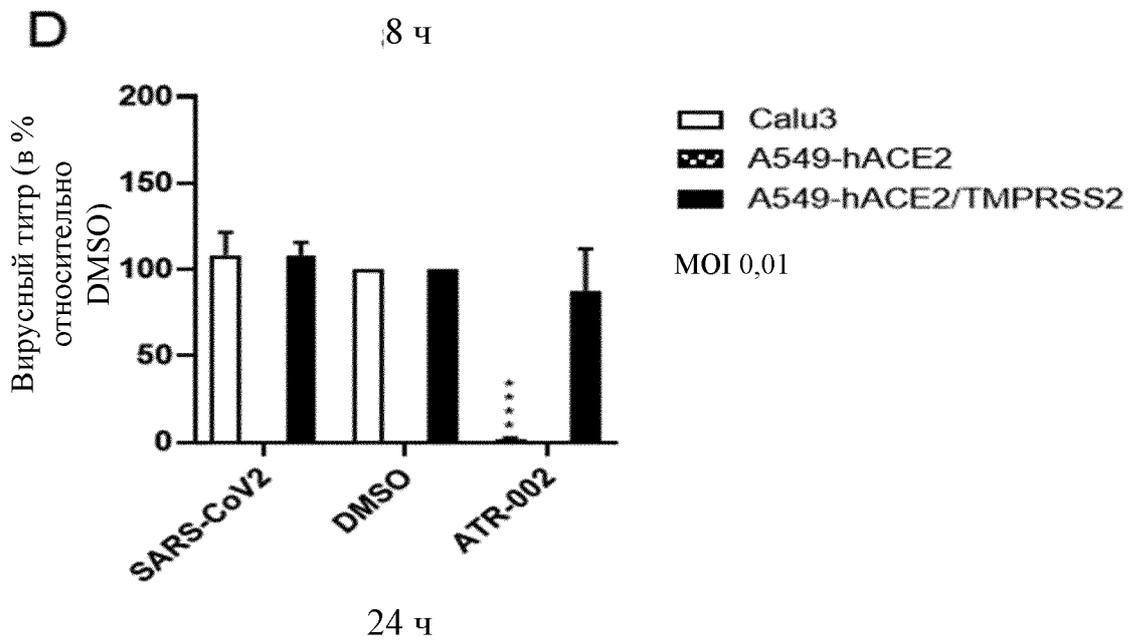
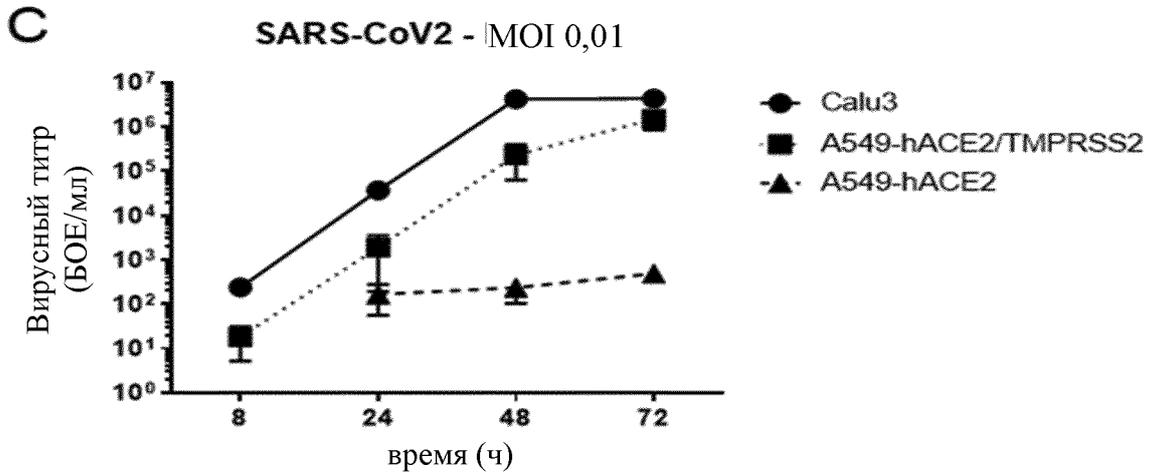




Фиг. 20В продолжение



Фиг. 21 продолжение



Фиг. 21D продолжение

