



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(51) МПК

C07K 14/005 (2006.01)

C12N 7/00 (2006.01)

C12N 9/12 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

C12Q 1/6876 (2018.01)

G01N 33/50 (2006.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

C07K 14/005 (2021.01); C12N 7/00 (2021.01); C12N 9/1241 (2021.01); C12N 15/63 (2021.01); C12Q 1/6876 (2021.01); G01N 33/50 (2021.01)

(21)(22) Заявка: 2017114675, 01.10.2015

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
01.10.2015

Дата регистрации:
28.05.2021

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
02.10.2014 US 62/058,961

(43) Дата публикации заявки: 07.11.2018 Бюл. № 31

(45) Опубликовано: 28.05.2021 Бюл. № 16

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 02.05.2017

(86) Заявка РСТ:
US 2015/053385 (01.10.2015)

(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2016/054309 (07.04.2016)

Адрес для переписки:
129090, Москва, ул. Б. Спасская, 25, стр. 3, ООО
"Юридическая фирма Городисский и
Партнеры"

(72) Автор(ы):

ЛИМАН Джошуа Роберт (US),
БИРН Рэндал (US),
БЕННЕТТ Хэмилтон Барлоу (US),
БАРТЕЛС Дуглас Джон (US)

(73) Патентообладатель(и):

ВЕРТЕКС ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ
ИНКОРПОРЕЙТЕД (US)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: база данных Dbfetch,
ID:NRP_DI610775, 24.03.2006. WO 2006111616
A1, 26.10.2006. WO 2009125395 A1, 15.10.2009.
SUBBARAO E.K. et al. Sequential Addition of
Temperature-Sensitive Missense Mutations into
the PB2 Gene of Influenza A Transfectant
Viruses Can Effect an Increase in Temperature
Sensitivity and Attenuation and Permits the
Rational Design (см. прод.)

(54) ВАРИАНТЫ ВИРУСА ГРИППА А

(57) Реферат:

Изобретение относится к выделенному полинуклеотиду вируса гриппа А. Предложен выделенный полинуклеотид вируса гриппа А, кодирующий мутант PB2 полимеразы вируса гриппа А, причем мутант PB2 полимеразы содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 с замещением одной аминокислоты, выбранным из группы, состоящей из: Q306H, Q306L, F323S, F323Y, S324G, S324I, S324N, S324R, S337L, S337P, F363L, K376N, K376Q, K376R, F404Y, M431I, M431T, N510K и N510T. Также предложены

нуклеотидный зонд, способный к гибридизации в жестких условиях с указанным полинуклеотидом, система экспрессии, включающая плазмиду, которая содержит указанный полинуклеотид вируса или которая содержит вектор, включающий указанный полинуклеотид, функционально связанный с промотором. Также предложена клетка хозяина, трансфицированная, трансформированная или трансдуцированная указанным вектором. Указанный полинуклеотид используют для

применения в получении иммуногенной композиции для профилактики или лечения инфекции вируса гриппа А. Также указанный полинуклеотид может быть использован в способе оценки устойчивости к лекарственному средству вируса гриппа А, содержащему мутант РВ2 полимеразы, способе идентификации in vitro соединения-кандидата для лечения инфекции, вызванной вирусом гриппа А у пациента, и

способе идентификации in vitro соединения-кандидата для лечения или профилактики инфекции, вызванной вирусом гриппа А у пациента. Изобретение может быть использовано в создании новых противовирусных терапевтических средств, эффективных против указанных мутировавших вирусов гриппа А. 11 н. и 13 з.п. ф-лы, 5 табл., 9 пр.

(56) (продолжение):

of a Genetically Engineered Live Influenza A Virus Vaccine. JOURNAL OF VIROLOGY, Oct. 1995, Vol. 69, No. 10, p. 5969-5977. ПЕТРОВ Р.В. Иммунология. - М.: Медицина, 1987. - 416 с.: ил. - (Учебная литература. Для студентов медицинских институтов), стр.70.

RU 2 7 4 8 6 1 8 C 2

RU 2 7 4 8 6 1 8 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

C07K 14/005 (2006.01)*C12N 7/00* (2006.01)*C12N 9/12* (2006.01)*C12N 15/63* (2006.01)*C12Q 1/6876* (2018.01)*G01N 33/50* (2006.01)**(12) ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

C07K 14/005 (2021.01); *C12N 7/00* (2021.01); *C12N 9/1241* (2021.01); *C12N 15/63* (2021.01); *C12Q 1/6876* (2021.01); *G01N 33/50* (2021.01)

(21)(22) Application: **2017114675, 01.10.2015**

(24) Effective date for property rights:
01.10.2015

Registration date:
28.05.2021

Priority:

(30) Convention priority:
02.10.2014 US 62/058,961

(43) Application published: **07.11.2018 Bull. № 31**(45) Date of publication: **28.05.2021 Bull. № 16**(85) Commencement of national phase: **02.05.2017**

(86) PCT application:
US 2015/053385 (01.10.2015)

(87) PCT publication:
WO 2016/054309 (07.04.2016)

Mail address:
**129090, Moskva, ul. B. Spasskaya, 25, str. 3, OOO
"Yuridicheskaya firma Gorodisskij i Partnery"**

(72) Inventor(s):

**LEEMAN, Joshua, Robert (US),
BYRN, Randal (US),
BENNETT, Hamilton, Barlow (US),
BARTELS, Douglas, John (US)**

(73) Proprietor(s):

**VERTEX PHARMACEUTICALS
INCORPORATED (US)**

(54) INFLUENZA A VIRUS VARIANTS

(57) Abstract:

FIELD: virology.

SUBSTANCE: invention relates to the isolated polynucleotide of the influenza A virus. The isolated influenza A virus polynucleotide encoding the PB2 polymerase mutant of influenza A virus is proposed, wherein the PB2 polymerase mutant contains the amino acid sequence SEQ ID NO: 1 with the substitution of one amino acid selected from the group consisting of: Q306H, Q306L, F323S, F323Y, S324G, S324I, S324N, S324R, S337L, S337P, F363L, K376N, K376Q, K376R, F404Y, M431I, M431T, N510K and N510T. Also proposed is a nucleotide probe capable of hybridization under severe conditions with the specified

polynucleotide, an expression system including a plasmid that contains the specified virus polynucleotide, or that contains a vector including the specified polynucleotide functionally associated with the promoter. A host cell transfected, transformed, or transduced by the specified vector is also proposed. The specified polynucleotide is used for obtaining an immunogenic composition for prevention or treatment of influenza A virus infection. Also, the specified polynucleotide can be used in a method for assessing resistance to a drug of the influenza A virus containing a PB2 polymerase mutant, a method for identifying in vitro a candidate compound for treating an infection

caused by the influenza A virus in a patient, and a method for identifying in vitro a candidate compound for treating or preventing an infection caused by the influenza A virus in a patient.

EFFECT: invention can be used to create new antiviral therapeutic agents effective against the specified mutated influenza A viruses.
24 cl, 5 tbl, 9 ex

R U 2 7 4 8 6 1 8 C 2

R U 2 7 4 8 6 1 8 C 2

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННУЮ ЗАЯВКУ

[0001] По этой заявке РСТ испрашивается приоритет временной заявки США серийный №62/058961, поданной 2 октября 2014. Этот документ полностью включен в настоящее описание путем ссылки.

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[0002] Эта заявка полностью включает путем ссылки список последовательностей, озаглавленный "355615_ST25.txt" (8,06 килобайт), который создан 2 октября 2014 и подан в электронном виде с описанием.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0003] Грипп распространяется по всему миру в виде сезонных эпидемий, приводящих ежегодно к гибели сотен тысяч-миллионов людей в пандемичные годы. Например, три пандемии гриппа, наблюдались в двадцатом веке и привели к смерти десятки миллионов людей, причем каждая из указанных пандемий вызывалась появлением нового штамма вируса у людей. Часто такие новые штаммы возникают из-за распространения на людей существующего вируса гриппа от других видов животных.

[0004] Грипп преимущественно передается от индивидуума к индивидууму за счет крупных содержащих вирусы капель, которые образуются при кашле или насморке инфицированных индивидуумов; причем такие крупные капельки могут затем осаждаться на поверхностях слизистых оболочек верхних дыхательных путей восприимчивых индивидуумов, которые находятся вблизи (например, на расстоянии около 2 метров) от инфицированных лиц. Передача может также происходить в результате прямого контакта или косвенного контакта с респираторными секретами, таким как дотрагивание до поверхностей, зараженных вирусом гриппа, и с последующим троганием глаз, носа или рта. Взрослые могут передавать грипп другим, начиная с 1 дня до появления симптомов до примерно 5 дней после появления симптомов. Дети и индивидуумы с ослабленной иммунной системой могут быть заразными в течение 10 или более дней после появления симптомов.

[0005] Вирусы гриппа представляют собой РНК вирусы семейства Orthomyxoviridae, которое включает пять родов: вирус гриппа А, вирус гриппа В, вирус гриппа С, Изавирус и Тогото вирус.

[0006] Род вируса гриппа А содержит один вид, вирус гриппа А. Дикие водоплавающие птицы являются природными хозяевами большого разнообразия вирусов гриппа А. Иногда вирусы переносятся на другие виды, что может вызвать опустошительные вспышки болезни у домашней птицы, или может стать источником пандемий гриппа у людей. Вирусы гриппа типа А представляют собой наиболее вирулентные человеческие патогены среди трех типов гриппа и являются причиной наиболее тяжелых заболеваний. Вирус гриппа А можно подразделить на различные серотипы на основании реакции антител на указанные вирусы. Серотипы, которые были подтверждены для людей, в порядке известного числа гибели людей в пандемии представляют собой: H1N1 (который вызвал испанский грипп в 1918), H2N2 (который вызвал Азиатский грипп в 1957), H3N2 (который вызвал Гон-Конгский грипп в 1968), H5N1 (пандемия в сезоне гриппа 2007-08), H7N7 (который обладает необычным зоонозным потенциалом), H1N2 (эндемический у людей и свиней), H9N2, H7N2, H7N3 и H10N7.

[0007] Род вируса гриппа В содержит один вид, вирус гриппа В. Грипп В инфицирует почти исключительно людей и проявляется гораздо реже, чем вирус гриппа А. Единственным другим животным, которое, как известно, подвержено инфицированию вирусом гриппа В, является тюлень. Такой тип вируса гриппа мутирует в 2-3 раза медленнее, чем вирус гриппа типа А и соответственно, является менее генетически

разнообразным, и имеет только один серотип вируса гриппа В. В результате такого отсутствия антигенного разнообразия, степень иммунитета к вирусу гриппа В обычно приобретается в раннем возрасте. Однако вирус гриппа В мутирует достаточно для того, чтобы был невозможен длительный иммунитет к нему. Такая пониженная скорость антигенных изменений вместе с ограниченным кругом хозяев (ингибирование перекрестного антигенного сдвига видов) приводит к тому, что пандемии гриппа В не происходит.

[0008] Род вируса гриппа С содержит один вид, вирус гриппа С, который инфицирует людей и свиней и может вызвать тяжелые заболевания и локальные эпидемии. Однако вирус гриппа С встречается менее часто, чем другие типы, и обычно, по-видимому, вызывает заболевания умеренной тяжести у детей.

[0009] Вирусы гриппа А, В и С имеют очень схожую структуру. Диаметр вирусной частицы составляет 80-120 нанометров, и обычно они имеют примерно сферическую форму, хотя могут встречаться нитевидные формы. Необычно для вируса то, что его геном не просто является фрагментом нуклеиновой кислоты; вместо этого, он содержит семь или восемь фрагментов сегментированной отрицательно-полярной РНК. Геном вируса А кодирует 11 белков: гемагглютинин (НА), нейраминидазу (НА), нуклеопротеин (NP), М1, М2, NS1, NS2(NEP), PA, PB1, PB1-F2 и PB2.

[0010] НА и NA представляют собой крупные гликопротеины на внешней поверхности вирусных частиц. НА представляет собой лектин, который опосредует связывание вируса с мишеневыми клетками и проникновение вирусного генома внутрь мишени клетки, тогда как NA участвует в высвобождении вирусного потомства из инфицированных клеток, путем расщепления сахаров, которые связывают зрелые вирусные частицы. Таким образом, указанные белки служат мишенями для противовирусных лекарственных средств. Кроме того, они представляют собой антигены, к которым могут вырабатываться антитела. Вирусы гриппа А подразделяют на подтипы на основании реакций антител на НА и NA, формируя основу различий Н и N (см. выше), например, в H5N1.

[0011] Грипп вызывает прямые расходы, связанные с потерей производительности и связанные с медицинскими расходами на лечение, также как косвенные расходы, связанные с профилактическими мерами. В Соединенных Штатах грипп отвечает за общие потери в более чем 10 миллиардов долларов в год, хотя было установлено, что будущие пандемии могут привести к сотням миллиардов долларов за счет прямых и косвенных расходов. Расходы на профилактику также велики. Правительства во всем мире тратят миллиарды долларов США, на подготовку и планирование потенциальной пандемии птичьего гриппа H5N1, причем траты, связанные с закупкой лекарственных средств и вакцин, также как проведение обучения поведению в условиях пандемии и выработку стратегии для усовершенствования пограничных контролей.

[0012] Современные варианты лечения гриппа включают вакцинацию и химиотерапию или химиопрофилактику с использованием противовирусных лекарственных средств. Вакцинацию против гриппа с использованием вакцин часто рекомендуют для групп населения с высоким риском, таких как дети и пожилые, или для людей, у которых есть астма, диабет или сердечные заболевания. Однако существует возможность провести вакцинацию и все-таки заболеть гриппом. Составы таких вакцин изменяют каждый сезон для немногих конкретных штаммов гриппа, но они не могут, возможно, включать все штаммы, активно инфицирующие людей во всем мире по этой причине. Изготовителям требуется около шести месяцев для создания и производства миллионов доз, необходимых для борьбы с сезонными эпидемиями. Иногда новый или не

выявленный штамм становится за это время главенствующим и инфицирует людей, хотя они были вакцинированы (например, как H3N2 Fujian flu в сезоне гриппа 2003-2004). Также существует возможность инфицирования непосредственно перЕд.

вакцинацией и возможность заболеть тем же самым штаммом, который, как предполагают, вакцина должна предотвратить, так как вакцине требуется около двух недель, чтобы проявить эффективность.

[0013] Кроме того, эффективность таких вакцин против гриппа переменна. Из-за высокой скорости мутации вируса, конкретная вакцина против гриппа обычно обеспечивает защиту не более чем на несколько лет. Вакцина, приготовленная для одного года, может оказаться неэффективной в следующем году, так как вирус гриппа быстро изменяется со временем, и доминантными становятся отличающиеся штаммы.

[0014] Также, из-за отсутствия ферментов коррекции РНК, РНК-зависимая РНК полимеразы в РНК гриппа совершает ошибку встраивания одного нуклеотида примерно каждые 10 тысяч нуклеотидов, что составляет приблизительно длину РНК гриппа.

Поэтому, почти каждый полученный вновь вирус гриппа представляет собой мутант-антигенный дрейф. Разделение генома на восемь отдельных сегментов РНК обеспечивает смешивание или рекомбинацию РНК, если более чем одна вирусная линия инфицировала отдельную клетку. Возникающее быстрое изменение вирусной генетики приводит к антигенным сдвигам и позволяет вирусу инфицировать новые виды хозяев и быстро преодолевать защитный иммунитет.

[0015] Противовирусные лекарственные средства также можно использовать для лечения гриппа, причем наиболее эффективными являются ингибиторы нейраминидазы, но вирусы могут вырабатывать устойчивость к стандартными противовирусным лекарственным средствам.

[0016] Таким образом, все еще существует необходимость в лекарственных средствах для лечения инфекции гриппа, таких как лекарственные средства с расширенным терапевтическим окном и/или пониженной восприимчивостью к вирусному титру.

[0017] Соответственно, существует необходимость в идентификации мутированных вирусов гриппа А или других вирусов, которые демонстрируют устойчивость к лекарственным средствам или к другим способам лечения, и в создании новых противовирусных терапевтических средств, эффективных против указанных мутировавших вирусов.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0018] Соответственно, настоящее изобретение относится к вариантам вируса гриппа А и соответствующим способам и композициям. В частности, изобретение относится к вариантам вируса гриппа А и вариантам полимеразы вируса гриппа А, которые обладают пониженной восприимчивостью к одному или более из ингибиторов полимеразы.

[0019] В одном аспекте, это изобретение относится к выделенному полинуклеотиду вируса гриппа А, его биологически активному аналогу или его биологически активному фрагменту, включающему мутацию в гене, кодирующем полимеразу вируса гриппа А, где указанная мутация приводит к замещению по меньшей мере одной аминокислоты, соответствующей аминокислотным остаткам, выбранным из группы, состоящей из аминокислот 306, 323, 324, 337, 363, 376, 404, 431 и 510 вируса гриппа А дикого типа.

[0020] В некоторых вариантах, выделенный полинуклеотид вируса гриппа А включает нуклеотид, соответствующий аминокислоте 306 полинуклеотида вируса гриппа А дикого типа, который не кодирует Q. В некоторых вариантах, указанный нуклеотид кодирует Н или L.

[0021] В некоторых вариантах, выделенный полинуклеотид вируса гриппа А включает нуклеотид, соответствующий аминокислоте 323 полинуклеотида вируса гриппа А дикого типа, который не кодирует F. В некоторых вариантах, указанный нуклеотид кодирует S или Y.

5 [0022] В некоторых вариантах, выделенный полинуклеотид вируса гриппа А включает нуклеотид, соответствующий аминокислоте 324 полинуклеотида вируса гриппа А дикого типа, который не кодирует S. В некоторых вариантах, указанный нуклеотид кодирует G, I, N или R.

[0023] В некоторых вариантах, выделенный полинуклеотид вируса гриппа А включает
10 нуклеотид, соответствующий аминокислоте 337 полинуклеотида вируса гриппа А дикого типа, который не кодирует S. В некоторых вариантах, указанный нуклеотид кодирует L или P.

[0024] В некоторых вариантах, выделенный полинуклеотид вируса гриппа А включает нуклеотид, соответствующий аминокислоте 363 полинуклеотида вируса гриппа А дикого
15 типа, который не кодирует F. В некоторых вариантах, указанный нуклеотид кодирует L.

[0025] В некоторых вариантах, выделенный полинуклеотид вируса гриппа А включает нуклеотид, соответствующий аминокислоте 376 полинуклеотида вируса гриппа А дикого
20 типа, который не кодирует K. В некоторых вариантах, указанный нуклеотид кодирует N, Q или R.

[0026] В некоторых вариантах, выделенный полинуклеотид вируса гриппа А включает нуклеотид, соответствующий аминокислоте 404 полинуклеотида вируса гриппа А дикого
типа, который не кодирует F. В некоторых вариантах, указанный нуклеотид кодирует Y.

25 [0027] В некоторых вариантах, выделенный полинуклеотид вируса гриппа А включает нуклеотид, соответствующий аминокислоте 431 полинуклеотида вируса гриппа А дикого типа, который не кодирует M. В некоторых вариантах, указанный нуклеотид кодирует I или T.

[0028] В некоторых вариантах, выделенный полинуклеотид вируса гриппа А включает
30 нуклеотид, соответствующий аминокислоте 510 полинуклеотида вируса гриппа А дикого типа, который не кодирует N. В некоторых вариантах, указанный нуклеотид кодирует K или T.

[0029] В некоторых вариантах, нуклеотиды, которые соответствуют любым 2 аминокислотам, выбранным из группы, состоящей из аминокислот 306, 323, 324, 337,
35 363, 376, 404, 431 и 510, мутированы таким образом, что указанные нуклеотиды кодируют аминокислоту, отличающуюся от аминокислоты, кодируемой соответствующим полинуклеотидом вируса гриппа А дикого типа. В некоторых вариантах, нуклеотиды, которые соответствуют любым 3 аминокислотам, выбранным из группы, состоящей из аминокислот 306, 323, 324, 337, 363, 376, 404, 431 и 510 мутированы таким образом,
40 что указанные нуклеотиды кодируют аминокислоту, отличающуюся от аминокислоты, кодируемой соответствующим полинуклеотидом вируса гриппа А дикого типа.

[0030] В следующих вариантах это изобретение относится к способам и композициям, включающим вирус гриппа А согласно настоящему изобретению. Например, изобретение относится к системе экспрессии, включающей вирус гриппа А, и такая система экспрессии
45 может включать вектор, который включает вирус гриппа А, операбельно связанный с промотором; также предложена клетка хозяина трансфектированная, трансформированная или мутированная указанным вектором. Альтернативно, система экспрессии согласно настоящему изобретению основана на технологии дисплея мРНК,

например, технологии слияния РНК-белка, как раскрыто в патенте США №6258558 или технологии *in vitro* "вирус", как раскрыто в патенте США №6361943.

[0031] В другом аспекте это изобретение относится к выделенному варианту вируса гриппа А, включающему полинуклеотид, кодирующий полимеразу вируса гриппа А, где по меньшей мере одна аминокислота в по меньшей мере одном положении, выбранном из группы, состоящей из 306, 323, 324, 337, 363, 376, 404, 431 и 510, мутирована таким образом, что кодирует аминокислоту, отличающуюся от соответствующей аминокислоты полинуклеотида вируса гриппа А дикого типа. Другие варианты настоящего изобретения относятся к способам и композициям, включающим указанные варианты вируса гриппа А. Например, изобретение относится к способу идентификации соединения, которое может ингибировать репликацию варианта вируса гриппа А настоящего изобретения; предложена клетка, которая инфицирована вариантом вируса гриппа А согласно настоящему изобретению.

[0032] В другом аспекте это изобретение относится к выделенной полимеразе вируса гриппа А, включающей аминокислотную последовательность, в которой аминокислота в по меньшей мере одном положении, выбранном из группы, состоящей из 306, 323, 324, 337, 363, 376, 404, 431 и 510, отличается от аминокислоты в соответствующем положении полимеразы вируса гриппа А дикого типа. В некоторых вариантах, полимеразы вируса гриппа А включает биологически активный аналог полимеразы вируса гриппа А. В некоторых вариантах, полимеразы вируса гриппа А включает биологически активный фрагмент полимеразы вируса гриппа А.

[0033] В следующем аспекте это изобретение относится к антителу к полимеразе вируса гриппа А, которое распознает полимеразу вируса гриппа А, включающую аминокислотную последовательность, в которой аминокислота в по меньшей мере одном положении, выбранном из группы, состоящей из 306, 323, 324, 337, 363, 376, 404, 431 и 510 отличается от аминокислоты, расположенной в соответствующем положении полимеразы вируса гриппа А дикого типа. Другие варианты изобретения относятся к способам и композициям, включающим антитело к полимеразе вируса гриппа А согласно настоящему изобретению. Например, изобретение относится к диагностическому набору, включающему антитело согласно настоящему изобретению, и фармацевтической композиции, включающей антитело согласно настоящему изобретению и фармацевтически приемлемый носитель.

[0034] В другом аспекте это изобретение относится к нуклеотидному зонду или праймеру, способному к гибридизации в жестких условиях с последовательностью нуклеиновой кислоты полинуклеотида вируса гриппа А согласно настоящему изобретению. Другие варианты изобретения относятся к способам и композициям, включающим зонд или праймер. Например, изобретение относится к диагностическому или детектирующему набору, включающему зонд или праймер согласно настоящему изобретению, и такой набор можно использовать, например, для определения присутствия или отсутствия в образце варианта вируса гриппа А или полимеразы вируса гриппа А согласно настоящему изобретению.

[0035] В следующем аспекте это изобретение относится к способу оценки устойчивости или восприимчивости лекарственного средства в отношении ингибитора полимеразы вируса гриппа А у пациента, включающему: а) отбор биологического образца у пациента, инфицированного вирусом гриппа А; и б) оценку вероятности включения в образец нуклеиновой кислоты, кодирующей полимеразу вируса гриппа А, которая включает аминокислотную последовательность, в которой указанная аминокислота в по меньшей мере одном положении, выбранном из группы, состоящей из 306, 323, 324, 337, 363, 376,

404, 431 и 510, отличается от аминокислоты в каждом из положений, соответствующих положению полимеразы вируса гриппа А дикого типа.

[0036] Изобретение также относится к способу проведения лечения инфекции, вызванной вирусом гриппа А у пациента, включающему: а) оценку лекарственной устойчивости или восприимчивости к ингибитору полимеразы пациента в соответствии со способом по п. 23; и б) оптимизацию схемы лечения пациента на основании оценки устойчивости или восприимчивости лекарственного средства, проведенной в а).
 Например, если устойчивость лекарственного средства предсказана или определена (например, пониженная восприимчивость к ингибитору полимеразы), один или более из других соединений или агентов можно включить в схему лечения пациента или в терапевтический режим. Способ может включать любую комбинацию определения последовательности (например, генотипирование) полимеразы вируса гриппа А у пациента, определения восприимчивости к ингибитору полимеразы (например, фенотипирование), или определение уровня репликативной способности вируса гриппа А у пациента. Такое фенотипирование можно осуществить в не содержащей клеток системе (например, в *in vitro* протеазном анализе), также как в системе, основанной на клетках (например, в анализах репликонов, или вирусной инфекции или в анализах репликации).

[0037] В другом аспекте это изобретение относится к способу идентификации соединения-кандидата для лечения инфекции, вызванной вирусом гриппа А у пациента, включающему: а) получение образца, инфицированного вариантом вируса гриппа А; и б) оценку способности соединения-кандидата ингибировать активность варианта вируса гриппа А в указанном образце. Такой образец можно получить из клеток или плазмы пациента. Образец, инфицированный вариантом вируса гриппа А также может быть культивируемыми клетками. Активность варианта вируса гриппа А можно определить по его способности инфицировать, реплицировать и/или быть выведенным.

[0038] Альтернативно, такой способ может включать получение репликона РНК, включающего полинуклеотид вируса гриппа А согласно настоящему изобретению, и определение того, ингибируют ли соединения-кандидаты репликацию репликона РНК в подходящем анализе.

[0039] Другой альтернативный способ может включать получение выделенной полимеразы вируса гриппа А согласно настоящему изобретению и полимеразного субстрата, и определение того, снижается ли активность полимеразы вируса гриппа А в присутствии соединения-кандидата; полимеразы вируса гриппа А и/или полимеразы субстрата могут находиться в содержащей клетки системе, например, будучи экспрессированными в культивируемые клетки, или полимеразы вируса гриппа А и/или полимеразы субстрата могут находиться в системе без клеток, например, в реакционной смеси, включающей полимеразу вируса гриппа А и пептидный субстрат.

[0040] Дополнительный альтернативный способ оценки соединения-кандидата для лечения инфекции, вызванной вирусом гриппа А, у пациента включает введение вектора, включающего полинуклеотид вируса гриппа А согласно настоящему изобретению и индикаторный ген, кодирующий индикатор, в клетку хозяина и измерение индикатора в присутствии соединения-кандидата и в отсутствие соединения-кандидата.

[0041] Другой аспект настоящего изобретения относится к способу лечения инфекции, вызванной вирусом гриппа А, у пациента. Способ может включать введение пациенту фармацевтически или терапевтически эффективного количества соединения, идентифицированного по способу настоящего изобретения, отдельно или в комбинации с другим противовирусным средством.

[0042] Другой аспект настоящего изобретения относится к вычислительным средствам, которые обеспечивают устройство для сохранения информации в машиночитаемом представлении, включающее, запоминающее устройство для хранения данных, кодируемое данными в машиночитаемом представлении, где данные в машиночитаемом представлении включают значения индексов для по меньшей мере двух характеристик, связанных с вариантом вируса гриппа А или биологическим образцом.

[0043] Указанные характеристики выбирают из: а) способности проявлять устойчивость для снижения восприимчивости к ингибитору полимеразы; b) полимеразы вируса гриппа А, включающего аминокислотную последовательность, в которой аминокислота в по меньшей мере одном положении, выбранном из группы, состоящей из: 306, 323, 324, 337, 363, 376, 404, 431 и 510 вируса гриппа А дикого типа, отличается от аминокислоты в соответствующем положении полимеразы вируса гриппа А дикого типа; с) потенциала смертности или выздоровления пациента; и d) измененной репликативной способности (повышенной или пониженной) варианта вируса гриппа А.

[0044] Другой аспект настоящего изобретения относится к способу получения профиля вариантов вируса гриппа А у инфицированного вирусом гриппа А пациента. Способ может включать получение образца (например, образца плазмы) от пациента и генотипирование и/или фенотипирование полимеразы вируса гриппа А из по меньшей мере 2, 20, 50, 100, 200, 500 или более вирионов вируса гриппа А из полученного образца. Например, такое генотипирование может включать определение нуклеотидной последовательности полимеразы вируса гриппа А из по меньшей мере 2, 20, 50, 100, 200, 500 или более вирионов вируса гриппа А из образца плазмы.

[0045] В некоторых вариантах, пациента, подвергнутого такому профилированию, можно лечить или отобрать для лечения ингибитором полимеразы.

[0046] В некоторых вариантах, образцы плазмы получают от пациента, подвергнутого такому профилированию в два или более различных момента времени.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ПРЕДПОЧТИТЕЛЬНОГО ВАРИАНТА ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ НАСТОЯЩЕГО ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0047] Настоящее изобретение относится к вариантам вируса гриппа А. В частности, изобретение относится к вариантам вируса гриппа А, которые демонстрируют устойчивость в отношении ингибитора полимеразы. Изобретение также относится к способам и композициям, относящимся к вариантам вируса гриппа А. Такие способы и композиции можно использовать для идентификации вариантов вируса, включая варианты вируса гриппа А и других вирусов, для оценки и идентификации противовирусных соединений, и создания и оптимизации терапевтических средств против вирусных инфекций.

[0048] Варианты вируса гриппа А и соответствующие полинуклеотиды и полимеразы

[0049] Настоящее изобретение относится к вариантам вируса гриппа А. В некоторых вариантах, вариант вируса гриппа А включает полинуклеотидную последовательность, которая кодирует полимеразу вируса гриппа А с пониженной восприимчивостью к ингибитору полимеразы (также именуемой "полимеразой варианта вируса гриппа А"), такую как соединение 1. В том смысле, как использован в описании, вирус гриппа А дикого типа относится к вирусу гриппа А, включающему полинуклеотид (также именуемый "полинуклеотидом дикого типа"), который кодирует полимеразу вируса гриппа А с нормальной или необходимой восприимчивостью к ингибитору полимеразы, и, в частности, варианты, где ингибитором полимеразы является соединение 1.

Аналогично, полимеразы вируса гриппа А дикого типа относятся к полимеразе вируса гриппа А с нормальной или необходимой восприимчивостью к ингибитору полимеразы, и в частности к вариантам, где ингибитором полимеразы является соединение 1.

[0050] В некоторых вариантах, вирус гриппа А дикого типа включает аминокислотную последовательность SEQ ID №: 1. В некоторых вариантах, вирус гриппа А дикого типа включает аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 70, 75, 80, 85, 90, 95, 97 или 99% гомологичности с SEQ ID №: 1.

[0051] Термины "состояние, опосредованное вирусом гриппа", "инфекция гриппа", "грипп" или "инфлюенца" в том смысле, как использованы в описании, используют взаимозаменяемо для обозначения заболевания, вызванного инфицированием вирусом гриппа.

[0052] Грипп представляет собой инфекционное заболевание, которое поражает птиц и млекопитающих, и вызывается вирусами гриппа. Вирусы гриппа представляют собой РНК вирусы семейства Orthomyxoviridae, которое включает пять родов: вирус гриппа А, вирус гриппа В, вирус гриппа С, Изавирус и Тогото вирус. Род вируса гриппа А включает один вид, вирус гриппа А, который можно подразделить на различные серотипы на основании реакции антител на указанные вирусы: H1N1, H2N2, H3N2, H5N1, H7N7, H1N2, H9N2, H7N2, H7N3 и H10N7. Род вируса гриппа В включает один вид, вирус гриппа В. Грипп В почти исключительно инфицирует людей, и встречается обычно реже, чем грипп А. Род вируса гриппа С включает один вид, вирус гриппа С, который инфицирует людей и свиней, и может вызывать тяжелые заболевания и локальные эпидемии. Однако, вирус гриппа С обычно встречается реже, чем другие типы, и по-видимому, обычно вызывает умеренные заболевания у детей.

[0053] В некоторых вариантах настоящего изобретения, грипп или вирусы гриппа ассоциируются с вирусами гриппа А или В. В некоторых вариантах настоящего изобретения, грипп или вирусы гриппа ассоциируются с вирусом гриппа А. В некоторых конкретных вариантах настоящего изобретения, вирус гриппа А представляет собой H1N1, H2N2, H3N2 или H5N1.

[0054] У людей, обычными симптомами гриппа являются озноб, лихорадка, фарингит, мышечные боли, сильная головная боль, кашель, слабость и общий дискомфорт. В более тяжелых случаях грипп вызывает пневмонию, которая может быть фатальной, особенно у маленьких детей и у пожилых. Хотя грипп часто путают с обычной простудой, грипп представляет собой гораздо более тяжелое заболевание и вызывается различного типа вирусами. Грипп может вызывать тошноту и рвоту, особенно у детей, но такие симптомы более характерны для несвязанных с гриппом гастроэнтеритами, которые иногда называют "желудочным гриппом" или "24-часовым гриппом".

[0055] Симптомы гриппа могут начинаться совершенно неожиданно через один или два дня после инфицирования. Обычно первыми симптомами являются озноб или ощущение озноба, но лихорадка также обычно проявляется в начале заболевания, причем температура тела составляет интервал 38-39°C (приблизительно 100-103°F). Многие люди оказываются настолько больными, что им прописывают постельный режим в течение нескольких дней, с ломотой и болью во всем теле, наиболее сильными в спине и ногах. Симптомы гриппа могут включать: ломоту тела, особенно суставов и горла, очень сильный озноб и лихорадку, усталость, головную боль, раздраженные слезящиеся глаза, покраснение глаз, кожи (особенно лица), рта, горла и носа, абдоминальную боль (у детей с гриппом В). Симптомы гриппа являются неспецифичными, перекрывающимися со многими патогенами, ("подобная гриппу болезнь"). Обычно, для подтверждения диагноза необходимы лабораторные результаты.

[0056] Термины, "болезнь", "нарушение" и "состояние" можно использовать в описании взаимозаменяемо при ссылке на медицинский диагноз вируса гриппа или патологическое состояние

5 [0057] В том смысле, как использованы в описании, термины "субъект" и "пациент" используют взаимозаменяемо. Термины "субъект" и "пациент" относятся к животным (например, птицам, таким как куры, перепелки или индюшки, или к млекопитающим), причем термин "млекопитающее" включает не приматов (например, коров, свиней, лошадей, овец, кроликов, морских свинок, крыс, кошек, собак и мышей) и приматов (например, макак, шимпанзе и людей), и особенно людей. В одном варианте, субъектами 10 являются нечеловеческие животные, такие как фермерские животные (например, лошади, коровы, свиньи или овцы), или домашние животные (например, собаки, кошки, морские свинки или кролики). В предпочтительном варианте субъектом является "человек".

[0058] Термин "биологический образец", в том смысле, как использован в описании, включает, без ограничений, клеточные культуры или их экстракты; материалы биопсии, 15 полученные от млекопитающих, или их экстракты; кровь, слюну, урину, фекалии, семя, слезы или другие жидкости организма или их экстракты.

[0059] В том смысле, как использован в описании, термин "множественность заражения" или "МОИ", он представляет собой отношение инфицирующих агентов (например, фагов или вирусов) к инфицированной мишени (например, клетке). Например, 20 если используемый термин относится к группе клеток, инокулированных частицами инфекционного вируса, тогда множественность заражения или МОИ представляет собой отношение, определяемое числом частиц инфицирующего вируса, находящихся в лунке, деленное на число мишеневых клеток, присутствующих в указанной лунке.

[0060] В том смысле, как использован в описании, термин "ингибирование репликации 25 вирусов гриппа " включает как уменьшение количества репликаций вируса (например, по меньшей мере на 10%), так и полное прекращение репликации вирусов (т.е. 100% уменьшение количества репликаций вируса). В некоторых вариантах, репликацию вирусов гриппа ингибируют по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90% или по меньшей 30 мере на 95%.

[0061] Репликацию вируса гриппа можно измерить, используя любой подходящий способ, известный специалистам в данной области. Например, можно измерить титры вируса гриппа в биологическом образце (например, в культуре инфицированных клеток) или у людей (например, титр вируса в легких пациента). Более конкретно в анализах, 35 основанных на клетках, в каждом случае клетки культивируют *in vitro*, вирус добавляют к культуре в присутствии или в отсутствии тестируемого агента, и после подходящего промежутка времени оценивают зависящее от вируса конечное значение. В типичных анализах, можно использовать клетки почки собаки Madin-Darby (MDCK) и стандартную тканевую культуру, с адаптированным штаммом гриппа, A/Puerto Rico/8/34. Первый 40 тип клеточного анализа, который можно использовать в настоящем изобретении, зависит от гибели инфицированных мишеневых клеток, в процессе, называемым цитопатическим эффектом (CPE), где вирусная инфекция вызывает истощение клеточных ресурсов и последующий лизис клеток. В первом типе клеточного анализа небольшие фракции клеток в лунках микротитровального планшета инфицируют (обычно от 1/10 45 до 1/1000), вирусу дают размножиться в течение нескольких раундов репликации в течение 48-72 часов, затем измеряют количество погибших клеток, используя снижение содержания клеточного АТФ по сравнению с неинфицированным контролем. Второй тип клеточного анализа, который можно использовать в настоящем изобретении,

зависит от увеличения количества вирус-специфических РНК молекул в инфицированных клетках, где уровни РНК непосредственно измеряют, используя способ гибридизации ДНК разветвленных цепей (бДНК). Во втором типе клеточного анализа небольшое число клеток вначале инфицируют в лунках микротитровального планшета, вирус оставляют реплицироваться в инфицированных клетках, и распространяться в дополнительные раунды клеток, затем осуществляют лизис клеток и измеряют содержание вирусных РНК. Такой анализ обычно останавливают раньше, обычно после 18-36 часов, хотя все мишеневые клетки все еще живы. Вирусные РНК количественно определяют, используя гибридизацию со специфическими олигонуклеотидными зондами, фиксированными на лунках аналитического планшета, с последующей амплификацией сигнала путем гибридизации с дополнительными зондами, связанными с репортерным ферментом.

[0062] В том смысле, как использован в описании термин "вирусный титр" (или титр) представляет собой меру вирусной концентрации. Тестирование титра может использовать сериальное разбавление, чтобы получить приблизительную количественную информацию из аналитической процедуры, которая по существу только дает оценку как позитивную или негативную. Титр соответствует наивысшему коэффициенту разбавления, который все еще дает позитивные значения; например, позитивные значения в первых 8 сериальных двукратных разбавлениях дают титр 1: 256. Конкретный пример дает вирусный титр. Для определения титра приготавливают несколько разбавлений, таких как 10-1, 10-2, 10-3, ..., 10-8. Наинизшая концентрация вируса, которая все еще инфицирует клетки, представляет собой вирусный титр.

[0063] В том смысле, как использованы в описании, термины "лечить", "лечение" и "лечащий" относятся как к терапевтическому, так и профилактическому лечению.

Например, терапевтическое лечение включает уменьшение или облегчение развития, тяжести и/или длительности состояний, опосредованных вирусом гриппа, или облегчение одного или более из симптомов (особенно, одного или более из видимых симптомов) состояний, опосредованных вирусами гриппа, которое обусловлено введением одного или более из терапевтических средств (например, одного или более из терапевтических средств, таких как соединение или композиция настоящего изобретения). В конкретных вариантах, терапевтическое лечение включает облегчение по меньшей мере одного измеряемого физического параметра состояния, опосредованного вирусом гриппа. В других вариантах терапевтическое лечение включает ингибирование прогресса состояния, опосредованного вирусом гриппа, или физически, например, за счет стабилизации видимых симптомов, физиологически, например, за счет стабилизации физических параметров, или и того и другого. В других вариантах терапевтическое лечение включает уменьшение или стабилизацию инфекций, опосредованных вирусом гриппа. Противовирусные средства можно использовать в амбулаторных условиях для лечения людей, которые уже больны гриппом, для уменьшения тяжести симптомов и уменьшения количества дней болезни.

[0064] Термин "химиотерапия" относится к использованию лекарственных средств, например, небольших молекул лекарственных средств (скорее, чем "вакцин") для лечения расстройства или заболевания.

[0065] Термины "профилактика" или "профилактическое использование" и "профилактическое лечение" в том смысле, как использованы в описании, относятся к любой медицинской или публичной оздоровительной процедуре, целью которой является предотвращение, скорее, чем лечение или излечение заболевания. В том смысле, как использованы в описании, термины "предотвратить", "предотвращение" и

"профилактика" относятся к снижению риска приобретения или развития данного состояния, или к уменьшению или ингибированию рецидива или указанного состояния у субъекта, который не болен, но который был болен или мог находиться вблизи индивидуумов с указанным заболеванием. Термин "химиопрофилактика" относится к использованию лекарственных средств, например, небольших молекул лекарственных средств (скорее чем "вакцин") для профилактики нарушения или заболевания.

[0066] В том смысле, как использовано в описании, профилактическое использование включает использование в ситуациях, в которых зафиксирована вспышка заболевания, для предотвращения заражения или распространения инфекции в местах, в которых множество людей с высоким риском серьезных осложнений после гриппа живут в тесном контакте друг с другом (например, в больничной палате, в дневном профилактории, в тюрьме, в доме инвалидов и т.д.). Оно также включает использование среди людей, которым необходима защита от гриппа, но которые не получили защиты после вакцинации (например, из-за ослабленной иммунной системы), или если для них недоступна вакцина, или если им нельзя вводить вакцину из-за побочных эффектов. Оно также включает использование в течение двух недель после вакцинации, так как в течение указанного промежутка времени вакцина еще неэффективна.

Профилактическое использование может также включать лечение индивидуума, который не болен гриппом или не подвержен высокому риску осложнений, для снижения шансов быть инфицированным гриппом и заразить им индивидуума с высоким риском осложнений, находящегося с ним в тесном контакте (например, медицинские работники, работники домов инвалидов и т.д.).

[0067] В соответствии с US CDC (Центр профилактики и борьбы с заболеваниями США) "вспышку" гриппа определяют как неожиданное увеличение острых фебрильных респираторных заболеваний (AFRI), наблюдаемое в течение промежутка времени от 48 до 72 часов, в группе людей, которые находятся в тесной близости друг с другом (например, в одном и том же помещении дома для престарелых, в одном жилом помещении и т.д.), превышающее нормальные фоновые значения, или если у какого-нибудь субъекта в популяции тест на грипп оказывается положительным. Один случай подтвержденного гриппа, подтвержденный любым способом тестирования, рассматривают как вспышку заболевания.

[0068] Термин "кластер" определяют как группу из трех или более случаев AFRI, наблюдающуюся в течение промежутка времени от 48 до 72 часов, в группе людей, которые находятся в тесной близости друг с другом (например, в одном и том же помещении дома для престарелых, в одном жилом помещении и т.д.).

[0069] В том смысле, как использованы в описании, термины "источник заболевания", "первичный случай" или "пациент зеро" они относятся к начальному пациенту образца популяции эпидемиологического исследования. При использовании в общем отношении к таким пациентам в эпидемиологических исследованиях, такой термин не используют. Если указанный термин используют в отношении конкретного индивидуума, то вместо фамилии отчета о конкретном исследовании такой термин используют как пациент зеро. Часто ученые ищут такой "первичный случай" для определения того, как заболевание распространяется и какой резервуар хранит заболевание между вспышками. Заметьте, что "источником заболевания" является первый пациент, что указывает на существование вспышки заболевания. Можно найти более ранние случаи и их называют первичными, вторичными, третичными и т.д..

[0070] В одном варианте, способы настоящего изобретения являются профилактической или "превентивной" мерой для пациента, конкретно человека,

имеющего предрасположенность к осложнениям, возникающим в результате инфицирования вирусом гриппа. Термин "превентивный" в том смысле, как использован в описании, как например, в превентивном использовании, "превентивно" и т.д., является профилактическое использование в ситуациях, в которых "источник заболевания" или "вспышка" были подтверждены, для предотвращения распространения инфекции в остальных общественных группах или в популяции.

[0071] В другом варианте, способы настоящего изобретения применяют как "превентивную" меру для членов сообщества или популяции, особенно людей, для предотвращения распространения инфекции.

[0072] В том смысле, как использован в описании, термин "эффективное количество" относится к количеству, которого достаточно для выработки необходимой биологической реакции. В настоящем изобретении необходимая биологическая реакция должна ингибировать репликацию вируса гриппа, уменьшить количество вирусов гриппа или должна ослабить, уменьшить тяжесть, длительность, развитие или возникновение инфекции, вызванной вирусом гриппа, предотвратить распространение инфекции, вызванной вирусом гриппа, предотвратить возможность рецидива, развития, возникновения или обострения симптомов, связанных с инфекцией, вызванной вирусом гриппа, или повысить или улучшить профилактический или терапевтический эффект (эффекты) другой терапии, использованной против инфекции, вызванной вирусом гриппа. Точное количество соединения, которое вводят субъекту, зависит от способа введения, типа и тяжести инфекции и от характеристик субъекта, таких как, общее состояние здоровья, возраст, пол, масса тела и толерантность к лекарственным средствам. Специалисты в данной области смогут определить соответствующие дозы в зависимости от перечисленных и других факторов. При совместном введении с другими противовирусными средствами, например, при совместном введении с противогриппозными средствами, "эффективное количество" второго средства зависит от типа используемого лекарственного средства. Подходящие дозы известны для признанных средств и их могут подобрать специалисты в данной области в соответствии с состоянием субъекта, типом подлежащего лечению состояния (состояний) и количеством используемых соединений, раскрытых в описании. В случаях, когда количество точно не определено, эффективное количество должно предполагаться. Например, раскрытые в описании соединения можно вводить субъекту в дозовом интервале от приблизительно 0,01 до 100 мг/кг массы тела/в день для терапевтического или профилактического лечения.

[0073] В общем, режим дозирования можно выбрать в соответствии с различными факторами, включая подлежащее лечению заболевание и тяжесть указанного заболевания; активность конкретно используемого соединения; конкретно используемые композиции; возраст, массу тела, общее состояние здоровья, пол и пищевой рацион пациента; времена введения, способ введения и скорость выведения конкретно используемого соединения; функции почек и печени субъекта; и конкретно используемое соединение или его соль, длительность лечения; лекарственные средства, используемые в комбинации или совместно с конкретно используемым соединением, и аналогичные факторы, хорошо известные специалистам-медикам. Специалисты в данной области смогут легко определить и прописать эффективное количество соединений, раскрытых в описании и требуемых для лечения, для профилактики, для ингибирования (полностью или частично) или для прекращения прогресса заболевания.

[0074] Раскрытые в описании дозы соединений могут находиться в интервале от около 0,01 до около 100 мг/кг массы тела/день, от около 0,01 до около 50 мг/кг массы

тела/день, от около 0,1 до около 50 мг/кг массы тела/день или от около 1 до около 25 мг/кг массы тела/день. Следует понимать, что полное количество соединения в день можно вводить в одной дозе или во множественных дозах, например, дважды в день (например, каждые 12 часов), трижды в день (например, каждые 8 часов) или четыре

5 раза в день (например, каждые 6 часов).

[0075] Для терапевтического лечения раскрытые в описании соединения можно вводить пациенту, например, в течение 48 часов (или в течение 40 часов, или менее чем 2 дня, или менее, чем 1,5 дня, или в течение 24 часов) от возникновения симптомов (например, заложенности носа, боли в горле, кашля, ломоты, слабости, головной боли

10 и лихорадки/пота). Такое терапевтическое лечение может длиться в течение любого подходящего промежутка времени, например, в течение 5 дней, 7 дней, 10 дней, 14 дней и т.д. Для профилактического лечения во время вспышки в обществе, раскрытые в описании соединения можно вводить пациенту в течение, например, 2 дней после возникновения симптомов у источника заболевания, и можно продолжать в течение

15 любого подходящего промежутка времени, например, в течение 7 дней, 10 дней, 14 дней, 20 дней, 28 дней, 35 дней, 42 дней и т.д.

[0076] Различные типы способов введения можно использовать в настоящем изобретении, и они раскрыты в деталях ниже в разделе, озаглавленном "способы введения".

[0077] В настоящем изобретении также предложены выделенный вариант вируса гриппа А, выделенная полимераза варианта вируса гриппа А и выделенный полинуклеотид, который кодирует полимеразу варианта вируса гриппа А. Термин "выделенный" в общем означает отделенный и/или выделенный из компонент

20 природного окружения рассматриваемого вируса, протеазы или полинуклеотида.

[0078] В некоторых вариантах, полимераза варианта вируса гриппа А может быть полимеразой варианта вируса гриппа А, которая включает аминокислотную последовательность, в которой аминокислота (аминокислоты) в одном или более из

25 положений 306, 323, 324, 337, 363, 376, 404, 431 и 510 полимеразы вируса гриппа А дикого типа отличается (отличаются) от аминокислоты в каждом соответствующем положении

30 полимеразы вируса гриппа А дикого типа.

[0079] Предложены экспрессионные системы, например, для создания полимераз варианта вируса гриппа А согласно настоящему изобретению. Система экспрессии может включать экспрессионный вектор, который включает полинуклеотид вируса гриппа А согласно настоящему изобретению. Подходящие прокариотные или

35 эукариотные векторы (например, экспрессионные векторы), включающие полинуклеотид вируса гриппа А (или "нуклеиновую кислоту" используемую в описании взаимозаменяемо) настоящего изобретения можно вводить в клетки подходящего хозяина подходящим способом (например, трансформацией, трансфекцией, электропорацией, инфицированием), таким, чтобы полинуклеотид был операбельно

40 связан с одним или более из элементов контроля экспрессии (например, в вектор или интегрирован в геноме клетки хозяина). Для получения, клетки хозяина можно поддерживать в условиях, подходящих для экспрессии (например, в присутствии индуктора, подходящей среды, дополненной подходящими солями, факторами роста, антибиотиками, питательными добавками и т.д.), в результате чего получают

45 кодируемый полипептид. При желании, такой кодируемый белок можно извлечь и/или выделить (например, из клетки хозяина или среды). Признано, что способ получения включает экспрессию в клетки хозяина, трансгенного животного (см., например, WO 92103918). Система экспрессии может быть основана на системе не содержащей клеток,

такой как технология слияния РНК-белок, раскрытой в патенте США №6258558, или такой как *in vitro* "вирус", раскрытой в патенте США №6361943. Можно также использовать способы дисплея рибосом, такие как способ, раскрытый в патенте США №5843701.

5 [0080] Предложены различные анализы, например, анализы, подходящие для фенотипирования вирусов гриппа А. Такие анализы можно использовать для измерения вирусной активности (например, инфицирования, репликации, и/или высвобождения вирусных частиц) или ферментативной активности (например, полимеразной активности). В анализах вирусной активности можно использовать клетки или образцы, 10 инфицированные вирусом или вирусным вариантом, активность которых необходимо измерить. Такие клетки или образцы можно получить у пациента, такого как пациент-человек. Альтернативно, клетки или образцы можно культивировать и инфицировать вирусом или вирусным вариантом *in vitro*. Анализы вирусной активности можно использовать в системе на основе репликонов.

15 [0081] Ферментативную активность можно определить в не содержащей клеток системе или в системе на основе клеток, которые обычно включают представляющий интерес фермент или его биологически активный фрагмент или аналог и субстрат для представляющего интерес фермента.

[0082] В некоторых вариантах, идентифицированное соединение вводят в композицию, 20 включающую соединение и фармацевтически приемлемый носитель, адъювант или переносчик. Предпочтительно, если указанная композиция содержит указанное соединение в количестве, эффективном для снижения активности полимеразы вируса гриппа А. Еще более предпочтительно, приготавливать композицию для введения ее пациенту. Такие композиции также могут включать дополнительное средство, выбранное 25 из иммуномодулирующего средства; противовирусного средства; второго ингибитора полимеразы вируса гриппа А; ингибитора другой мишени в жизненном цикле вируса гриппа А; или их комбинаций. Различные композиции более подробно раскрыты далее.

[0083] В другом аспекте, в настоящем изобретении предложены антитела, которые специфичны к полимеразе вируса гриппа А, в частности, к полимеразе вируса гриппа 30 А, в которой одна или более из аминокислот, изменена по сравнению с аминокислотами полимеразы вируса гриппа А дикого типа. Термин "антитело" используют в широком смысле и специфически охватывает, без ограничений, интактные моноклональные антитела, поликлональные антитела, гибридные антитела, мультиспецифические антитела (например, биспецифические антитела), образованные из по меньшей мере 35 двух интактных антител и фрагментов антител, если только они проявляют необходимую биологическую активность. Термин "иммуноглобулин" включает разнообразные структурно родственные белки, которые необязательно являются антителами.

[0084] "Фрагменты антител" включают часть интактных антител, предпочтительно, антиген-связывающий или вариабельный участок интактного антитела. Примеры 40 фрагментов антител включают Fab, Fab', F(ab')₂ и Fv фрагменты; диатела; линейные антитела молекулы; одноцепочечные антитела; и мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител. "Одноцепочечные Fv" или фрагменты "scFv" антител включают VH и VL домены антител, где указанные домены присутствуют в одной полипептидной цепи. Предпочтительно, если Fv полипептид дополнительно 45 включает полипептидный линкер между доменами VH и VL, который позволяет scFv формировать необходимые структуры для связывания антигена.

[0085] Термин "диатело" относится к маленьким фрагментам антител с двумя сайтами связывания антигена, причем указанные фрагменты включают вариабельный домен

тяжелой цепи (VH), соединенный с вариабельным доменом легкой цепи (VL) в той же самой полипептидной цепи (VHVL). Используя линкер, который слишком короток, чтобы обеспечить спаривание между двумя доменами одной и той же цепи, причем указанные домены вынуждают спариваться с комплементарными доменами другой цепи и создавать два связывающих антиген сайта.

[0086] Антитело против полимеразы варианта вируса гриппа А можно создать из известного антитела против белка вируса гриппа А, например в результате молекулярной эволюции. Варианты аминокислотной последовательности получают путем введения соответствующих нуклеотидных изменений в ДНК известного антитела, или путем пептидного синтеза. Такие варианты включают, например, делеции из и/или вставки в, и/или замещения остатков в аминокислотные последовательности известного антитела. Любые комбинации делеций, вставок и замещений осуществляют для получения конечной конструкции, при условии, что конечная конструкция обладает необходимыми характеристиками. Аминокислотные изменения также могут изменить пост-трансляционные процессы антитела, такие как изменения количества или положения сайтов гликозилирования.

[0087] Антитела настоящего изобретения могут применяться как в диагностических, так и в терапевтических целях. В некоторых вариантах, антитело согласно настоящему изобретению является меченым. Различные антитела настоящего изобретения можно использовать для детектирования или измерения экспрессии полимеразы варианта вируса гриппа А, и поэтому их также можно использовать в таких применениях, как клеточный сортинг и получение изображений (например, цитометрия в потоке и сортинг клеток, активированных флуоресценцией), для диагностических или исследовательских целей. В том смысле, как использованы в описании, термины "метка" или "меченый" относятся к включению другой молекулы в антитело. В одном варианте, метка представляет собой детектируемый маркер, например, включение радиомеченой аминокислоты или присоединение к полипептиду биотинильных фрагментов, которые можно детектировать по маркеру авидину (например, по стрептавидину, содержащему флуоресцентный маркер, или по ферментативной активности, которую можно детектировать оптическим или колориметрическим способами). В другом варианте, указанные метка или маркер могут быть терапевтическими, например, лекарственным средством, конъюгатом или токсином. Различные способы введения меток в полипептиды и гликопротеины известны специалистам в данной области, и их можно использовать. Примеры меток для полипептидов включают, но ими не ограничиваются, следующие: радиоизотопы или радионуклиды (например, ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I), флуоресцентные метки (например, FITC, родамин, люминофоры на основе комплексов лантанидов), ферментные метки (например, пероксидаза хрена, бета-галактозидаза, люцифераза, щелочная фосфатаза), хемилюминесцентные маркеры, биотинильные группы, ранее определенные полипептидные эпитопы, распознаваемые вторичными репортерами (например, последовательности лейциновой молнии, сайты связывания вторичных антител, домены связывания металла, эпитопные тэги), магнитные агенты, такие как хелаты гадолиния, токсины, такие как коклюшный токсин, таксол, цитохалазин В, грамицидин D, этидийбромид, эметин, митомицин, этопозид, тенопозид, винкристин, винбластин, колхицин, доксорубицин, даунорубицин, дигидроксиантрацидинон, метоксантрон, митрамицин, актиномицин D, 1-дегидротестостерон, глюкокортикоиды, прокаин, тетракаин, лидокаин, пропранолол и пиромидин, и их аналоги или гомологи. В некоторых вариантах, метки присоединяют спейсерными группами различной длины для уменьшения потенциальных

пространственных затруднений.

[0088] В некоторых аспектах можно приготовить наборы для использования при детектировании присутствия вируса гриппа А, полинуклеотида варианта вируса гриппа А, или полимеразы варианта вируса гриппа А в биологическом образце. Такие наборы могут включать антитело, которое распознает полимеразу варианта вируса гриппа А согласно настоящему изобретению, также как одного или более из вспомогательных реагентов, подходящих для детектирования присутствия комплекса между антителом и полимеразой варианта или его частью. Альтернативно, такие наборы могут включать зонд или праймер настоящего изобретения, причем такой зонд или праймер могут гибридизоваться с полинуклеотидом варианта вируса гриппа А согласно настоящему изобретению в жестких условиях. Зонд или праймер настоящего изобретения можно использовать в ПЦР или ОТ-ПЦР, которые можно использовать для детектирования интересующего объекта. Альтернативно, такие наборы могут базироваться на коммерчески доступных диагностических наборах для ПЦР или не-ПЦР вируса гриппа А.

[0089] В другом аспекте настоящего изобретения предложены фармацевтические композиции или лекарственные формы, включающие соединение настоящего изобретения, например, второе соединение, которое идентифицируют как способное сохранить активность ингибитора полимеразы, или соединение, которое идентифицировано как эффективное против варианта вируса гриппа А (например, способное уменьшить репликацию варианта вируса) и/или полимеразы варианта вируса гриппа А (например, способное уменьшить ферментативную активность полимеразы указанного варианта).

[0090] В другом аспекте настоящего изобретения предложено использование соединения настоящего изобретения при изготовлении лекарственного средства, такого как лекарственное средство для лечения инфекции, вызванной вирусом гриппа А у пациента.

[0091] В другом аспекте настоящего изобретения предложены способы лечения инфекции, вызванной вирусом гриппа А у пациента. Такие способы обычно включают введение пациенту фармацевтически или терапевтически эффективного количества соединения настоящего изобретения отдельно или в комбинации (последовательно или одновременно) с другим противовирусным средством. "Эффективное количество" соединения или средства обычно относится к таким количествам, которые эффективно воспроизводимо снижают экспрессию или активность полимеразы вируса гриппа А, продуцирование вируса гриппа А, репликацию или вирулентность, инфекцию вируса гриппа А, или вызывают облегчение или ослабление одного или более из симптомов инфекции, вызванной вирусом гриппа А, по сравнению с уровнями таких параметров в отсутствии такового соединения или средства.

[0092] В другом аспекте способы и композиции настоящего изобретения включают ингибитор полимеразы и другое противовирусное средство, предпочтительно, средство против вируса гриппа А. Комбинационная терапия против вируса гриппа А также раскрыта в WO 2010/148197.

[0093] В том смысле, как использованы в описании, термины "в комбинации" или "совместное введение" можно использовать взаимозаменяемо в отношении использования более чем одного способа лечения (например, использования одного или более из профилактических и/или терапевтических средств). Использование указанных терминов не ограничивает порядок, в котором лекарственные средства (например, профилактические и/или терапевтические средства) вводят субъекту.

[0094] Совместное введение включает введение первого и второго количества соединений совместного введения практически одновременно, как в одной фармацевтической композиции, например, капсуле или таблетке, содержащей фиксированное отношение первого и второго количеств, так и во множестве отдельных капсул или таблеток для каждого. Кроме того, такое совместное введение также включает использование каждого соединения последовательно в любом порядке.

[0095] В том смысле, как использован в описании, термин "синергичный" относится к комбинации соединения настоящего изобретения и другого лекарственного средства (например, профилактического или терапевтического средства), которая более эффективна, чем аддитивные эффекты указанных лекарственных средств. Синергический эффект комбинации лекарственных средств (например, комбинации профилактического или терапевтического средства) может позволить использовать более низкие дозы одного или более из лекарственных средств и/или обеспечить более редкое введение указанных лекарственных средств субъекту. Возможность использования более низких доз лекарственного средства (например, профилактического или терапевтического средства) и/или более редкое введение указанного лекарственного средства может уменьшить токсичность, связанную с введением указанного лекарственного средства субъекту, при этом, не снижая эффективности указанного лекарственного средства в отношении профилактики, коррекции или лечения расстройства. Кроме того, синергический эффект может привести к повышению эффективности средств в отношении профилактики, коррекции или лечения расстройства. И, наконец, синергический эффект комбинации лекарственных средств (например, комбинации профилактических или терапевтических средств) позволяет избежать или уменьшить вредные или нежелательные побочные эффекты, связанные с использованием только одного лекарственного средства.

[0096] Наличие синергического эффекта можно определить, используя подходящие способы оценки взаимодействия лекарственных средств. Подходящие способы включают, например, уравнение Sigmoid-Emax (Holford, N.H.G. and Scheiner, L.B., Clin. Pharmacokinet. 6: 429-453 (1981)), уравнение аддитивности Loewe (Loewe, S. and Muischnek, H., Arch. Exp. Pathol Pharmacol. 114: 313-326 (1926)) и уравнение среднего эффекта (Chou, T.C. и Talalay, P., Adv. Enzyme Regul. 22: 27-55 (1984)). Каждое из упомянутых выше уравнений можно применить к экспериментальным результатам для создания соответствующего графика с целью оценки эффектов комбинаций лекарственного средства. Соответствующие графики, связанные с упомянутыми выше уравнениями, представляют собой кривую концентрация-эффект, кривую изоболограммы и кривую индекса комбинации, соответственно.

[0097] Конкретные примеры средств, которые можно вводить совместно с раскрытыми в описании соединениями, включают ингибиторы нейраминидазы, такие как озелтамивир (Tamiflu®) и занамивир (Rlenza®), блокаторы вирусных ионных каналов (M2 белок), такие как амантадин (Symmetrel®) и римантадин (Flumadine®), и противовирусные лекарственные средства, раскрытые в WO 2003/015798, включая T-705, который находится в доработке в Toyama Chemical of Japan. (См. также Ruruta et al., Anti-virus Research, 82: 95-102 (2009), "T-705 (флавипиравир) и родственные соединения:

[0098] Новые широкого спектра действия ингибиторы РНК вирусных инфекций"). В некоторых вариантах, раскрытые в описании соединения можно вводить совместно с традиционными вакцинами гриппа.

[0099] Ничто не ограничивает способы или комбинации настоящего изобретения какими-либо конкретными дозовыми формами и схемами. Так, каждый из компонентов

комбинаций настоящего изобретения можно вводить отдельно, вместе, последовательно или одновременно, или в любой их комбинации.

5 [00100] Лекарственные препараты, дозы и способы введения раскрытых ранее молекул хорошо известны специалистам в данной области. Альтернативно, после того, как идентифицировано соединение, которое проявляет противовирусную активность в отношении вируса гриппа А, в частности противовирусную активность против устойчивого к лекарственным средствам штамма вируса гриппа А, фармацевтически эффективное количество указанного соединения можно определить, используя способы, которые хорошо известны специалистам в данной области. Так, соответствующие
10 лекарственные препараты, интервалы доз, и схемы введения доз, таких соединений можно легко определить рутинными способами.

[0100] Композиции, относящиеся к комбинациям лекарственных средств настоящего изобретения можно вводить в клетку или клетки, или пациенту-человеку, или в виде отдельных фармацевтически приемлемых лекарственных средств, вводимых
15 одновременно или последовательно, лекарственных форм, содержащих более одного терапевтического средства, или в виде набора из одного лекарственного средства и лекарственной формы из множества лекарственных средств. Независимо от способа введения такие комбинированные формы лекарственных средств образуют эффективные количества компонентов фармацевтически приемлемого лекарственного препарата
20 против вируса гриппа А.

[0101] В случае повышенной противовирусной эффективности ингибиторов полимеразы вируса гриппа А согласно настоящему изобретению в присутствии иммуномодуляторов и иммуностимуляторов, пониженные количества ингибиторов полимеразы вируса гриппа А можно использовать в способах и композициях
25 представленных в описании. Такие пониженные количества можно определить путем рутинного мониторинга титров вируса гриппа А в организмах проходящих лечение инфицированных пациентов. Это можно осуществить, например, контролируя РНК вируса гриппа А в сыворотке пациентов методами слот-блот и дот-блот анализов, или методами ОТ-ПЦР, или измерением антигенов поверхности вируса гриппа А или других
30 антигенов. Пациентов можно аналогичным образом контролировать во время комбинированной терапии, используя ингибиторы полимеразы вируса гриппа А, раскрытые в описании, и другие соединения, обладающие противовирусной активностью, для определения наименьшей эффективной дозы каждого из них в случае использования их в комбинации.

35 [0102] После улучшения состояния пациента ему можно вводить поддерживающую дозу соединения, композиции или комбинации настоящего изобретения, при необходимости. После этого дозировку или частоту введения, или и то и другое, можно уменьшить, как функцию симптомов, до уровня, при котором сохраняется улучшенное состояние, и, если указанные симптомы были улучшены до необходимого уровня,
40 лечение следует закончить. Пациентам, однако, может потребоваться периодическое лечение на длительной основе после любого рецидива симптомов заболевания.

[0103] Конкретные дозы и схемы лечения для каждого конкретного пациента будут зависеть от различных факторов, включая активность конкретного используемого соединения, возраста, массы тела, общего состояния здоровья, пола, рациона, времени
45 введения, скорости выведения, комбинации лекарственных средств и суждения лечащего врача и тяжести подлежащего лечению конкретного заболевания. Количество активных ингредиентов также будет зависеть от конкретного раскрытого соединения и присутствия или отсутствия и природы дополнительного противовирусного средства

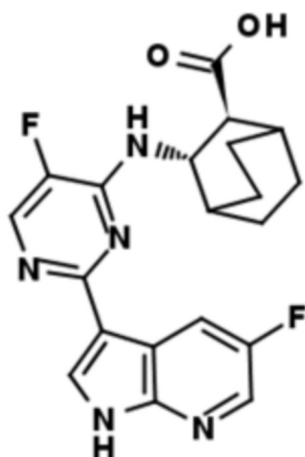
в указанной композиции.

[0104] В соответствии с другим вариантом, в настоящем изобретении предложен способ лечения инфицированного пациента, или способ профилактики инфицирования вирусом, характеризующимся кодируемой вирусом полимеразой гриппа, что необходимо для жизненного цикла вируса, путем введения указанному пациенту фармацевтически приемлемой композиции настоящего изобретения. Предпочтительно, если способы настоящего изобретения используют для лечения пациента, инфицированного вирусом гриппа А. Такое лечение может полностью уничтожить вирусную инфекцию или уменьшить тяжесть заболевания.

[0105] В другом варианте, соединения настоящего изобретения можно использовать в качестве лабораторных инструментов, чтобы помочь выделению вирусом кодируемой полимеразы вируса гриппа А. Такой способ включает стадии получения соединения настоящего изобретения, присоединенного к твердому носителю; осуществление контактирования указанного твердого носителя с образцом, содержащим полимеразу вируса гриппа А, в условиях, которые вызывают связывание указанной полимеразы с указанным твердым носителем; и удаление указанной полимеразы вируса гриппа А из указанного твердого носителя. Предпочтительно, если выделенная таким способом указанная вирусная полимеразы представляет собой PB2 полимеразу. Более конкретно, она представляет собой мутант PB2 полимеразы, которая устойчива в отношении обработки ингибитором полимеразы. Примеры такой полимеразы включают те, что раскрыты в описании, как содержащие мутантные (т.е., не дикого типа) остатки в положениях 306, 323, 324, 337, 363, 376, 404, 431 и/или 510.

[0106] Соединения настоящего изобретения

[0107] В некоторых вариантах ингибитор полимеразы вируса гриппа А представляет собой соединение 1, или его фармацевтически приемлемую соль для использования в любом из конкретизированных выше применений



Соединение 1

[0108] В еще одном варианте раскрытые в описании соединения или их фармацевтически приемлемые соли можно использовать для уменьшения вирусного титра в биологическом образце (например, в культуре инфицированных клеток) или у человека (например, в вирусном титре легких пациента).

[0109] Фармацевтически приемлемые соли, сольваты, клатраты, пролекарственные средства и другие производные

[0110] Раскрытые в описании соединения могут существовать в свободной форме,

или, при необходимости, в виде солей. Те соли, которые являются фармацевтически приемлемыми, представляют особый интерес, так как их можно использовать при введении раскрытых далее соединений с медицинскими целями. Соли, которые не являются фармацевтически приемлемыми, можно использовать в процессах получения, в процессах выделения или очистки и в некоторых случаях, для использования при разделении стереоизомерных форм соединений настоящего изобретения или их промежуточных соединений.

[0111] В том смысле, как использован в описании, термин "фармацевтически приемлемая соль" относится к солям соединения, которые, в объеме суждений медиков, пригодны для использования в контакте с тканями человека или низших животных без нежелательных побочных эффектов, таких как, токсичность, раздражение, аллергические реакции и т.п., и которые соразмерны с разумным соотношением выгода/риск.

[0112] Фармацевтически приемлемые соли хорошо известны специалистам в данной области. Например, S. M. Berge et al., подробно раскрывают фармацевтически приемлемые соли в J. Pharmaceutical Sciences, 1977, 66, 1-19, что включено в описание по ссылке. Фармацевтически приемлемые соли раскрытых в описании соединений включают те, которые получены с подходящими неорганическими и органическими кислотами и основаниями. Такие соли можно получить *in situ* во время окончательного выделения и очистки соединений.

[0113] Если раскрытое в описании соединение содержит основную группу, или достаточно основное биоизостерное соединение, соли присоединения кислот можно получить 1) осуществляя взаимодействие очищенного соединения в форме его свободного основания с подходящей органической или неорганической кислотой и 2) выделяя полученную таким образом соль. На практике, соли присоединения кислоты могут быть более удобной формой для использования, чем использование в форме свободного основания.

[0114] Примерами фармацевтически приемлемых, нетоксичных солей присоединения кислоты являются соли аминогрупп, образованные с неорганическими кислотами, такими как хлористоводородная кислота, бромистоводородная кислота, фосфорная кислота, серная кислота и перхлорная кислота, или с органическими кислотами, такими как уксусная кислота, щавелевая кислота, малеиновая кислота, виннокаменная кислота, лимонная кислота, янтарная кислота или малоновая кислота, или с использованием других применяемых специалистами способов, таких как ионообмен. Другие фармацевтически приемлемые соли включают адипат, альгинат, аскорбат, аспартат, бензолсульфонат, бензоат, бисульфат, борат, бутират, камфорат, камфорсульфонат, цитрат, циклопентанпропионат, диглюконат, додецилсульфат, этансульфонат, формиат, фумарат, глюкогептанат, глицерофосфат, гликолат, глюконат, гемисульфат, гептаноат, гексаноат, гидрохлорид, гидробромид, гидроиодид, 2-гидрокси-этансульфонат, лактобионат, лактат, лаурат, лаурилсульфат, малат, малеат, малонат, метансульфонат, 2-нафталинсульфонат, никотинат, нитрат, олеат, оксалат, пальмитат, памоат, пектинат, персульфат, 3-фенилпропионат, фосфат, пикрат, пивалат, пропионат, салицилат, стеарат, сукцинат, сульфат, тартрат, тиоцианат, *p*-толуолсульфонат, ундеканоат, валерат и т.п.

[0115] Если раскрытые в описании соединения содержат карбоксигруппу или достаточно кислотное биоизостерическое соединение, соли присоединения оснований можно получить 1) осуществляя взаимодействие очищенного соединения в его кислотной форме с подходящим органическим или неорганическим основанием и 2) выделяя полученную таким образом соль. На практике, использование солей присоединения оснований может быть более удобным, чем использование в форме свободной кислоты.

Соли, полученные с соответствующими основаниями включают соли щелочных металлов (например, натрий, литий и калий), щелочноземельных металлов (например, магний и кальций), соли аммония и $N+(C_{1-4} \text{ алкил})_4$. Настоящее изобретение также предусматривает кватернизацию любого из раскрытых в описании основных, азот-содержащих групп соединений. В результате такой кватернизации можно получить водо- или масло- растворимые или диспергируемые продукты.

[0116] Соли присоединения оснований включают фармацевтически приемлемые соли металла и амина. Подходящие соли металлов включают соли натрия, калия, кальция, бария, цинка, магния и алюминия. Соли натрия и калия обычно предпочтительны.

Дополнительные фармацевтически приемлемые соли включают, при необходимости, катионы нетоксичного аммония, четвертичного аммония и амина, образованные с использованием противоионов, таких как галогенид, гидроксид, карбоксилат, сульфат, фосфат, нитрат, низший алкилсульфонат и арилсульфонат. Подходящие неорганические соли присоединения оснований получают из металлических оснований, которые включают гидрид натрия, гидроксид натрия, гидроксид калия, гидроксид кальция, гидроксид алюминия, гидроксид лития, гидроксид магния, гидроксид цинка и т.п. Подходящие аминные соли присоединения оснований получают из аминов, которые часто используют в медицинской химии из-за их низкой токсичности и доступности для использования в медицине. Аммиак, этилендиамин, N-метил-глюкамин, лизин, аргинин, орнитин, холин, N,N'-дибензилэтилендиамин, хлоропрокаин, диэтаноламин, прокаин, N-бензилфенэтиламин, диэтиламин, пиперазин, трис(гидроксиметил)-аминометан, гидроксид тетраметиламмония, триэтиламин, дибензиламин, эфенамин, дегидроабетиамин, N-этилпиперидин, бензиламин, тетраметиламмоний, тетраэтиламмоний, метиламин, диметиламин, триметиламин, этиламин, основные аминокислоты, дициклогексиламин и т.п.

[0117] Другие кислоты и основания, хотя сами и не являются фармацевтически приемлемыми, можно использовать при получении солей, которые можно использовать в качестве промежуточных соединений при получении раскрытых в описании соединений и их фармацевтически приемлемых солей присоединения кислот или оснований.

[0118] Следует понимать, что настоящее изобретение включает смеси/комбинации различных фармацевтически приемлемых солей и также смеси/комбинации соединений в свободной форме и в форме фармацевтически приемлемых солей.

[0119] Кроме раскрытых в описании соединений, фармацевтически приемлемые сольваты (например, гидраты) и клатраты указанных соединений можно также использовать в композициях для лечения или профилактики указанных в описании заболеваний.

[0120] В том смысле, как использован в описании, термин "фармацевтически приемлемый сольват" представляет собой сольват, полученный в результате ассоциации одной или более из молекул фармацевтически приемлемого растворителя с одним из раскрытых в описании соединений. Сольваты включают гидраты (например, гемигидрат, моногидрат, дигидрат, тригидрат, тетрагидрат и т.п.).

[0121] В том смысле, как использован в описании, термин "гидрат" означает раскрытые в описании соединения или их соли, которые дополнительно включают стехиометрическое или нестехиометрическое количество воды, связанной нековалентными межмолекулярными силами.

[0122] В том смысле, как использован в описании, термин "клатрат" означает раскрытое в описании соединение или его соль в форме кристаллической решетки, в которой существуют пространства (например, каналы), в которых содержатся

заклученные в них "гостевые"(молекулы (например, молекулы растворителя или воды).

[0123] В дополнении к раскрытым в описании соединениям, можно также использовать их фармацевтически приемлемые производные или пролекарства указанных соединений в композициях для лечения или профилактики указанных в описании расстройств.

[0124] Термин "фармацевтически приемлемое производное или пролекарство" включает любой фармацевтически приемлемый сложный эфир, соль эфира или другие его производные или его соли раскрытых в описании соединений, которые, после введения реципиенту, способны привести к образованию, или прямо или косвенно, раскрытых в описании соединений или их ингибиторно активных метаболитов или их остатков. Наиболее предпочтительными производными или пролекарствами являются такие, которые повышают биодоступность соединений, когда такие соединения вводят пациенту (например, обеспечивают перорально введенному соединению более быстрое абсорбирование в кровь), или которые повышают доставку исходных соединений в биологический орган (например, мозг или лимфатическую систему) по сравнению с исходными видами.

[0125] В том смысле, как использован в описании и, если не указано иначе, термин "пролекарство" означает производное соединения, которое может гидролизовать, окислять, или каким-либо другим образом реагировать в биологических условиях (*in vitro* или *in vivo*) до получения раскрытых в описании соединений. Пролекарственные средства могут становиться активными после таких реакций в биологических условиях, или они могут становиться активными в своей непрореагировавшей форме. Примеры пролекарственных средств, рассматриваемые в настоящем изобретении, включают, но ими не ограничиваются, аналоги или производные соединений настоящего изобретения, которые включают биогидролизуемые фрагменты, такие как биогидролизуемые амиды, биогидролизуемые сложные эфиры, биогидролизуемые карбаматы, биогидролизуемые карбонаты, биогидролизуемые уреиды и биогидролизуемые фосфатные аналоги. Другие примеры пролекарственных средств включают производные раскрытых в описании соединений, которые содержат -NO, -NO², -ONO или -ONO₂ фрагменты.

Пролекарственные средства обычно можно получить, используя хорошо известные способы, такие как те, которые раскрыты в Burger's Medicinal Chemistry and Drugs Discovery (1995) 172-178, 949-982 (Manfred E. Wolff ed., 5th ed).

[0126] Термин "фармацевтически приемлемое производное" обозначает аддукт или производное, которое после введения нуждающемуся в этом пациенту, способно обеспечить получение, прямо или косвенно, соединений, которые раскрыты в описании, или их метаболитов или их остатков. Примеры фармацевтически приемлемых производных включают, но ими не ограничиваются, сложные эфиры и соли таких эфиров.

[0127] Фармацевтически приемлемые пролекарства раскрытых в описании соединений, включают, без ограничений, сложные эфиры, эфиры аминокислот, эфиры фосфатов, металлические соли и сульфонатные эфиры.

[0128] Фармацевтические композиции

[0129] Раскрытые в описании соединения могут быть лекарственными формами фармацевтических композиций, которые дополнительно включают фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель, адъювант или вектор. В одном варианте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, включающей раскрытое выше соединение настоящего изобретения и фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель, адъювант или вектор. В одном варианте настоящее изобретение

представляет собой фармацевтическую композицию, включающую эффективное количество соединения настоящего изобретения или его фармацевтически приемлемой соли и фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель, адъювант или вектор. Фармацевтически приемлемые носители включают, например, фармацевтические разбавители, эксципиенты или носители, соответствующим образом выбранные с учетом предполагаемой формы введения, и сопоставимые с обычными фармацевтическими частицами.

[0130] Термин "эффективное количество" включает "терапевтически эффективное количество" и "профилактически эффективное количество". Термин "терапевтически эффективное количество" относится к количеству, которое эффективно для лечения и/или облегчения инфекции, вызванной вирусом гриппа у пациента, инфицированного гриппом. Термин "профилактически эффективное количество" относится к количеству, которое эффективно для предотвращения и/или существенного уменьшения шансов возникновения или размеров вспышки заболеваемости вирусом гриппа. Конкретные примеры эффективных количеств раскрыты выше в разделе, озаглавленном использованием раскрытых соединений.

[0131] Фармацевтически приемлемый носитель может содержать инертные ингредиенты, которые неправильным образом не ингибируют биологическую активность соединений. Фармацевтически приемлемые носители должны быть биосовместимыми, например, нетоксичными, невоспалительными, неиммуногенными или должны быть лишены других нежелательных реакций или побочных эффектов после введения субъекту. Можно использовать стандартные способы создания фармацевтических препаратов.

[0132] Фармацевтически приемлемые носители, адъюванты или носители, в том смысле, как использованы в описании, включают любые или все растворители, разбавители, или другие жидкие носители, диспергирующие или суспендирующие средства, поверхностно активные средства, изотонические средства, загущающие или эмульгирующие средства, консерванты, твердые связующие, смазывающие средства и т.п., которые пригодны для получения нужных конкретных дозовых форм. В Remington's Pharmaceutical Sciences, Sixteenth Edition, E. W. Martin (Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1980) раскрыты различные носители, используемые при получении фармацевтически приемлемых композиций, и известные способы для их получения. За исключением таких случаев, когда любые обычные среды носителей несовместимы с раскрытыми в описании соединениями, из-за создания любых нежелательных биологических эффектов или каких-либо вредных взаимодействий с любым другим компонентом (компонентами) фармацевтически приемлемых композиций, их использование рассматривается как включенное в объем настоящего изобретения. В том смысле, как использована в описании, фраза "побочные эффекты" включает нежелательные и вредные эффекты лекарственных средств (например, профилактических или терапевтических средств). Побочные эффекты всегда являются нежелательными, но нежелательные эффекты необязательно являются вредными. Вредный эффект от лекарственного средства (например, профилактического или терапевтического средства) может быть болезненным, или создающим дискомфорт или рискованным. Побочные эффекты включают, но ими не ограничиваются, лихорадку, озноб, летаргию, желудочно-кишечные токсичности (включая желудочные и кишечные язвы и эрозии), тошноту, рвоту, нейротоксичности, нефротоксичности, почечные токсичности (включая такие состояния, как папиллярный некроз и хронический интерстициальный нефрит), печеночные токсичности (включая повышенные уровни фермента печеночной

сыворотки), миелотоксичности (включая лейкопению, миелосупрессию, тромбоцитопению и анемию), сухость во рту, металлический привкус, пролонгирование беременности, слабость, сонливость, боль (включая мышечную боль, костную боль и головную боль), облысение, астению, головокружение, экстрапирамидальные симптомы, акатизию, сердечно-сосудистые нарушения и сексуальную дисфункцию.

[0133] Некоторые примеры материалов, которые могут служить фармацевтически приемлемыми носителями, включают, но ими не ограничиваются, ионообменники, окись алюминия, стеарат алюминия, лектин, сывороточные белки (такие как человеческий сывороточный альбумин), буферные вещества (такие как твин 80, фосфаты, глицин, сорбиновая кислота или сорбат калия), частичные глицеридные смеси насыщенных растительных жирных кислот, воду, соли или электролиты (такие как протаминсульфат, динатрийгидрофосфат, гидрофосфат калия, хлорид натрия или соли цинка), коллоидную двуокись кремния, трисиликат магния, поливинилпирролидон, полиакрилаты, воски, блок-сополимеры полиэтилен-полиоксипропилена, метилцеллюлозу, гидроксипропилметилцеллюлозу, метилцеллюлозу, ланолин, сахара, такие как лактоза, глюкоза и сахароза; крахмалы, такие как кукурузный крахмал и картофельный крахмал; целлюлозу и ее производные, такие как натрийкарбоксиметилцеллюлоза карбоксиметилцеллюлоза, этилцеллюлоза и ацетат целлюлозы; порошок трагаканта; мальт; желатин; тальк; эксципиенты, такие как масло какао и воски для суппозиторий; масла, такие как арахисовое масло, хлопковое масло; сафлоровое масло; кунжутное масло; оливковое масло; кукурузное масло и соевое масло; гликоли; такие как пропиленгликоль или полиэтиленгликоль; сложные эфиры, такие как этилолеат и этиллаурат; агар; буферирующие средства, такие как гидроксид магния и гидроксид алюминия; альгиновую кислоту; не содержащую пироген воду; изотонический солевой раствор; раствор Рингера; этиловый спирт и фосфатные буферные растворы, также как другие нетоксичные совместимые смазывающие средства, такие как лаурилсульфат натрия и стеарат магния, а также окрашивающие средства, способствующие высвобождению средства, кроющие средства, подсластители, вкусовые добавки и ароматизаторы, консерванты и антиоксиданты также могут присутствовать в композициях, в соответствии с суждением формулятора.

[0134] Способы введения

[0135] Раскрытые выше соединения и фармацевтически приемлемые композиции можно вводить людям и другим животным перорально, ректально, парентерально, интрацистенально, интравагинально, внутривнутрибрюшинно, местно (в виде порошков, мазей или капель), буккально, в виде оральных или назальных спреев или т.п., в зависимости от тяжести подлежащей лечению инфекции.

[0136] Жидкие дозовые формы для перорального введения включают, но ими не ограничиваются, фармацевтически приемлемые эмульсии, микроэмульсии, растворы, суспензии, сиропы и эликсиры. В дополнении к активным соединениям жидкие дозовые формы могут содержать инертные разбавители, которые обычно используют в данной области, такие как, например, вода или другие растворители, солюбилизаторы, средства и эмульгаторы, такие как этиловый спирт, изопропиловый спирт, этилкарбонат, этилацетат, бензиловый спирт, бензилбензоат, пропиленгликоль, 1,3-бутиленгликоль, диметилформамид, масла (в частности, хлопковое, арахисовое, кукурузное, из зародышей пшеницы, оливковое, касторовое и кунжутное масла), глицерин, тетрагидрофуруриловый спирт, полиэтиленгликоли и эфиры жирных кислот сорбитана и их смеси. Кроме инертных разбавителей, пероральные композиции могут также включать адъюванты, такие как смачивающие средства, эмульгирующие и

суспендирующие средства, подсластители, вкусовые средства и отдушки.

[0137] Препараты для инъекций, например, стерильные водные или масляные суспензии для инъекций можно приготовить известными специалистам способами, используя подходящие диспергирующие или смачивающие средства и суспендирующие средства. Стерильными препаратами для инъекций могут также быть стерильные растворы, суспензии или эмульсии для инъекций в нетоксичных, парентерально приемлемых разбавителях или растворителях, например, в виде растворов в 1,3-бутандиоле. Среди приемлемых носителей и растворителей, которые можно использовать, находятся вода, раствор Рингера, U.S.P. и изотонический раствор хлорида натрия. Кроме того, в качестве растворителей или суспендирующей среды обычно используют стерильные нелетучие масла. Для таких целей можно использовать любые смеси нелетучих масел, включая синтетические моно- или диглицериды. Кроме того, в препаратах для инъекций используют жирные кислоты, такие как олеиновая кислота.

[0138] Препараты для инъекций можно стерилизовать, например, фильтруя через удерживающий бактерии фильтр, или включая стерилизующие средства в форму стерильной твердой композиции, которую можно растворить или диспергировать в стерильной воде или другой стерильной среде для инъекций непосредственно перед использованием.

[0139] Для пролонгирования действия раскрытых в описании соединений, часто бывает желательным замедлить абсорбцию соединения из подкожной или внутримышечной инъекции. Это можно осуществить, используя жидкие суспензии кристаллического или аморфного материала с плохой растворимостью в воде. В таком случае скорость абсорбции соединений зависит от скорости их растворения, что, в свою очередь, может зависеть от размера кристаллов и кристаллической формы. Альтернативно, замедленную абсорбцию формы парентерально введенного соединения осуществляют, растворяя или суспендируя такое соединение в масляном носителе. Формы депо для инъекций получают, формируя микроинкапсулированные матрицы соединения в биоразлагаемых полимерах, таких как полилактид-полигликолид. В зависимости от соотношения соединения и полимера и природы конкретно используемого полимера скорость высвобождения соединения можно регулировать. Примеры других биоразлагаемых полимеров включают поли(ортоэфиры) и поли(ангидриды). Лекарственные формы депо для инъекций получают также, помещая соединения в липосомы или микроэмульсии, которые совместимы с тканями организма.

[0140] Композициями для ректального или вагинального введения являются специальные суппозитории, которые можно получить, смешивая раскрытые в описании соединения с подходящими нераздражающими эксципиентами или носителями, такими как масло какао, полиэтиленгликоль или воск для суппозиториев, который является твердым при комнатной температуре, но становится жидким при температуре тела, и поэтому плавится в ректальной или вагинальной полости и высвобождает активное соединение.

[0141] Твердые дозовые формы для перорального введения включают капсулы, таблетки, пилюли, порошки и гранулы. В таких твердых дозовых формах активное соединение смешивают с по меньшей мере одним инертным, фармацевтически приемлемым эксципиентом или носителем, таким как цитрат натрия или дикальцийфосфат и/или а) наполнителями или увеличивающими объем средствами, такими как крахмалы, лактоза, сахароза, глюкоза, маннит и кремниевая кислота; b) связующими, такими как, например, карбоксиметилцеллюлоза, альгинаты, желатин, поливинилпирролидон, сахароза и смола акации; c) увлажнителями, такими как глицерин;

d) разрыхлителями, такими как агар-агар, карбонат кальция, картофельный крахмал или крахмал тапиоки, альгиновая кислота, некоторые силикаты и карбонат натрия; e) замедляющими растворение средствами, такими как парафин; f) ускорителями абсорбции, такими как соединения четвертичного аммония; g) смачивающими средствами, такими как, например, цетиловый спирт и глицеринмоностеарат; h) абсорбентами, такими как каолин и бентонит; и i) смазывающими средствами, такими как тальк, стеарат кальция, стеарат магния, твердые полиэтиленгликоли, лаурилсульфат натрия и их смеси. В случае капсул, таблеток и пилюль дозовые формы могут также включать буферирующие средства.

[0142] Твердые композиции аналогичного типа можно также использовать в качестве наполнителей в мягкие или твердые желатиновые капсулы, используя такие эксципиенты как лактоза или молочный сахар, также как высокомолекулярные полиэтиленгликоли и т.п. Твердые дозовые формы таблеток, драже, капсул, пилюль и гранул можно получить с нанесенными покрытиями или в оболочках, таких как желудочные покрытия и другие покрытия, хорошо известные специалистам в области получения фармацевтических препаратов. Они могут необязательно содержать сообщающие непрозрачность средства, и также могут быть композициями, которые высвобождают активный ингредиент (ингредиенты) только, или предпочтительно, в определенной части желудочно-кишечного тракта, необязательно, замедленным образом. Примеры капсулирующих композиций, которые можно использовать, включают полимерные вещества и воски. Твердые композиции аналогичного типа можно также использовать в качестве наполнителей в мягкие и твердые желатиновые капсулы, используя такие эксципиенты как лактоза или молочный сахар, также высокомолекулярные полиэтиленгликоли и т.п.

[0143] Активные соединения могут также быть в микроинкапсулированной форме с одним или более из эксципиентов, как было указано выше. Твердые дозовые формы таблеток, драже, капсул, пилюль и гранул можно получить с нанесенными покрытиями или в оболочках, таких как желудочные покрытия, покрытия, контролирующее высвобождение, и другие покрытия, хорошо известные специалистам в области фармацевтических препаратов. В таких твердых дозовых формах активное соединение может быть в смеси с по меньшей мере одним инертным разбавителем, таким как сахароза, лактоза или крахмал. Такие дозовые формы могут также включать, как это происходит обычно на практике, дополнительные вещества, отличающиеся от инертных разбавителей, например, смазывающие средства для таблеток и другие средства для получения таблеток, такие как стеарат магния и микрокристаллическая целлюлоза. В случае капсул, таблеток и пилюль, дозовые формы могут также включать буферирующие средства. Они могут необязательно содержать придающие непрозрачность средства и могут также быть композициями, которые высвобождают активный ингредиент (ингредиенты) только, или предпочтительно, в определенном участке желудочно-кишечного тракта, необязательно, замедленным образом. Примеры композиций с включениями, которые можно использовать, включают полимерные вещества и воски.

[0144] Дозовые формы для местного или чрескожного введения раскрытых в описании соединений включают мази, пасты, кремы, лосьоны, гели, порошки, растворы, спреи, средства для ингаляций или пластыри. Активный компонент смешивают в стерильных условиях с фармацевтически приемлемым носителем и при необходимости с любым из необходимых консервантов или буферов. Офтальмологические лекарственные формы, например, ушные капли и глазные капли также рассматривают как включенные в объем настоящего изобретения. Дополнительно, настоящее изобретение рассматривает

использование чрезкожных пластырей, которые обладают дополнительным преимуществом, обеспечивая контролируемую доставку соединения в организм. Такие дозовые формы можно получить, растворяя или распределяя соединение в соответствующей среде. Можно также использовать усилители абсорбции для

5 повышения проникновения соединения через кожу. Скорость можно контролировать или используя контролируемую скорость мембрану, или диспергируя указанное соединение в полимерной матрице или геле.

[0145] Раскрытые в описании композиции можно вводить перорально, парэнтерально, путем ингаляции, местно, ректально, назально, буккально, вагинально или используя имплантированный резервуар. Термин "парэнтеральный" в том смысле, как использован

10 в описании, включает, но ими не ограничивается, подкожные, внутривенные, внутримышечные, внутрисуставные, интрасиновиальные, внутригрудинные, интратекальные, внутрипеченочные, внутриочаговые и внутричерепные способы инъекций или вливаний. Более конкретно, такие композиции вводят перорально,

15 внутрибрюшинно или внутривенно.

[0146] Стерильные формы для инъекций раскрытых в описании композиций могут быть водными или масляными суспензиями. Такие суспензии можно получить известными специалистам в данной области способами, используя подходящие диспергирующие или смачивающие средства и суспендирующие средства. Стерильными

20 препаратами для инъекций могут также быть стерильные растворы для инъекций или суспензии в нетоксичном парэнтерально-приемлемом разбавителе или растворителе, например, растворы в 1,3-бутандиоле. Среди приемлемых носителей и растворителей, которые можно использовать, находятся вода, раствор Рингера и изотонический раствор хлорида натрия. Кроме того, стерильные, нелетучие масла обычно используют в качестве

25 растворителей или суспендирующей среды. Для такой цели можно использовать любое легкое нелетучее масло, включая синтетические моно- или диглицериды. Жирные кислоты, такие как олеиновая кислота и ее глицеридные производные можно использовать при получении препаратов для инъекций, например, природные фармацевтически приемлемые масла, такие как оливковое масло или касторовое масло,

30 особенно в их полиоксиэтилинированных вариантах. Такие масляные растворы или суспензии могут также содержать длинноцепочечные спиртовые разбавители или дисперсанты, такие как карбоксиметилцеллюлоза или аналогичные диспергирующие средства, которые обычно используют при создании фармацевтически приемлемых дозовых форм, включая эмульсии и суспензии. Для получения лекарственных форм

35 можно также использовать обычные поверхностно активные средства, такие как твины, спаны и другие эмульгирующие средства или усилители биодоступности, которые обычно используют при получении фармацевтически приемлемых твердых, жидких или других дозовых форм.

[0147] Раскрытые в описании фармацевтические композиции можно вводить

40 перорально в любой перорально приемлемой дозовой форме, включая, но ими не ограничиваясь, капсулы, таблетки, водные суспензии или растворы. В случае таблеток для перорального введения, обычно используемые носители включают, но ими не ограничиваются, лактозу и кукурузный крахмал. Также обычно добавляют смазывающие средства, такие как стеарат магния. Для перорального введения в форме

45 капсул, используемые разбавители включают лактозу и высушенный кукурузный крахмал. Если для перорального использования требуются водные суспензии, активный ингредиент объединяют с эмульгирующими и суспендирующими средствами. При желании можно также добавить некоторые подсластители, вкусовые или красящие

средства.

[0148] Альтернативно, раскрытые в описании фармацевтические композиции можно вводить в форме суппозиториев для ректального введения. Их можно получить, смешивая активный агент с подходящим нераздражающим эксципиентом, который является твердым при комнатной температуре, но становится жидким при ректальной температуре, и поэтому плавится в ректуме, высвобождая лекарственное средство. Такие материалы включают, но ими не ограничиваются, масло какао, пчелиный воск и полиэтиленгликоли.

[0149] Раскрытые в описании фармацевтические композиции можно также вводить местно, особенно, если подлежащий лечению участок включает участки или органы легко доступные для местного нанесения, включая болезни глаз, кожи или нижней части желудочно-кишечного тракта. Подходящие местные лекарственные формы легко получить для каждого из таких участков или органов.

[0150] Местное введение для нижней части желудочно-кишечного тракта можно осуществить в лекарственной форме ректального суппозитория (см. выше) или в лекарственной форме подходящей клизмы. Можно также использовать поверхностно-чрезкожные пластыри.

[0151] Для местных введений, фармацевтические композиции можно приготовить в подходящей мази, содержащей активное средство, суспендированное или растворенное в одном или более из носителей. Носители для местного введения соединений настоящего изобретения включают, но ими не ограничиваются, минеральное масло, вазелин, белый парафин, пропиленгликоль, полиоксиэтилен, полиоксипропиленовое соединение, эмульгирующий воск и воду. Альтернативно, фармацевтические композиции можно приготовить в виде подходящего лосьона или крема, содержащего активные компоненты, суспендированные или растворенные в приемлемых носителях. Подходящие носители включают, но ими не ограничиваются, минеральное масло, моностеарат сорбитана, полисорбат 60, воск цетиловых эфиров, цетеариловый спирт, 2-октилдодеканол, бензиловый спирт и воду.

[0152] Для оптимального использования фармацевтические композиции можно приготовить в виде микроизмельченных суспензий в изотоническом, стерильном солевом растворе с установленным значением pH, или, конкретно, в виде растворов в изотоническом стерильном солевом растворе с установленным значением pH, или с консервантом, таким как бензилалконийхлорид, или без него. Альтернативно, для офтальмологических применений такие фармацевтические композиции можно приготовить в виде мази, такой как вазелин.

[0153] Фармацевтические композиции можно также вводить с помощью назальных аэрозолей или ингаляций. Такие композиции приготавливают, используя способы, хорошо известные специалистам в области фармацевтических лекарственных форм, и их можно получать в виде растворов в физиологическом растворе, используя бензиловый спирт или другие подходящие консерванты, промоторы абсорбции для повышения биодоступности, фторуглероды и/или другие обычные солюбилизующие или диспергирующие средства.

[0154] Соединения для использования в способах настоящего изобретения можно приготовить в единичной дозовой форме. Термин "единичная дозовая форма" относится к физически дискретному количеству, подходящему в качестве единичной дозы для подлежащего лечению субъекта, причем каждая такая единица содержит заранее определенное количество активного материала, рассчитанное таким образом, чтобы обеспечить необходимый терапевтический эффект, необязательно в ассоциации с

подходящим фармацевтическим носителем. Единичная дозовая форма может быть единичной дневной дозой или одной из множества дневных доз (например, от около 1 до 4 или более раз в день). Если используют множественные дозы, единичная дневная доза может быть такой же, или может отличаться от каждой дозы.

5 [0155] Примеры

[0156] После того, как настоящее изобретение было раскрыто в общих чертах, оно будет более понятно со ссылкой на следующие примеры, которые включены просто для иллюстрации некоторых аспектов и вариантов настоящего изобретения, и никоим образом его не ограничивают.

10 [0157] ПРИМЕРЫ

[0158] Пример 1: Идентификация вариантов вируса гриппа А

[0159] *In vitro* селекционные эксперименты проводят на штамме гриппа A/ Wisconsin/ 67/2005 (H3N2). Противовирусную активность соединения 1 измеряют, используя MDCK клетки в трехдневном анализе цитопатического эффекта (CPE). Варианты с пониженной восприимчивостью к соединению 1 отбирают *in vitro* путем инфицирования репликативных лунок, содержащих MDCK клетки, вирусом гриппа с MOI 1,0, и регистрируя развитие CPE в качестве имитатора вирусной репликации. Селекционные эксперименты осуществляют, используя 384-луночные планшеты, используя 32 репликативные лунки в каждой из восьми концентраций соединения 1, в интервале от 1 (до 128(EC₅₀). Образцы вируса из надосадочной жидкости пересевают в новые клетки. Надосадочную жидкость из лунок, демонстрирующих рост вируса в присутствии ингибитора, используют, чтобы получить небольшие запасы исходного вируса, которые характеризуют в отношении восприимчивости к соединению 1. Для вирусов, отличающихся пониженной восприимчивостью к соединению 1, осуществляют экстракцию вирусной РНК, обратную транскрипцию и ПЦР-амплификацию, с последующим секвенированием по Сэнгеру PA, PB1 и PB2 кодирующих участков. Подтверждение влияния изменения первичных аминокислот на вирусную восприимчивость к соединению 1 и на вирусную репликативную способность осуществляют, используя систему обратной генетики, и анализируют природную частоту идентифицированных вариантов.

30 [0160] Варианты с пониженной восприимчивостью к соединению 1 выделены по положениям аминокислот 306, 323, 324, 363, 376, 431 и 510 PB2 белка гриппа А. Такие варианты обнаружены с очень низкими частотами (т.е., <0,01%) в базе данных последовательностей населения встречающихся в природе последовательностей гриппа человека. Кроме того, все соединение 1-селектированные PB2 варианты демонстрируют репликативную несостоятельность по сравнению с вирусом дикого типа *in vitro*.
35 Варианты, выделенные в трех селекционных экспериментах на устойчивость, расположены в кэп-связывающем кармане PB2 и, по-видимому, прямо или косвенно изменяют связывание соединения 1. Полученные результаты подтверждают механизм действия соединения 1, как ингибитора существенной 'кэп-захватывающей' активности комплекса полимеразы вируса гриппа.

[0161] Варианты с пониженной восприимчивостью к соединению 1 демонстрируют специфические изменения в PB2 гене вируса гриппа, но не в PB1 или PA генах. Варианты в положениях аминокислот PB2 Q306, F323, S324, F363, K376, M431 и N510 демонстрируют более, чем десятикратный сдвиг в восприимчивости к соединению 1.
45 Полученные в системе обратной генетики вирусы, содержащие указанные PB2 изменения, подтверждают пониженную восприимчивость к соединению 1.

[0162] Большинство выбранных вариантов с пониженной восприимчивостью к соединению 1 (S324, S337, F363, K376, F404 и M431) расположены внутри кэп-

связывающего участка PB2. Другие, Q306H и N510T, расположены в участках PB2, для которых структурная информация недоступна.

[0163] Указанные положения вариантов демонстрируют значительное перекрытие с теми положениями, которые идентифицированы в селекционных экспериментах с гриппом A/Puerto Rico/8/34 и A/California/07/2009 на устойчивость к соединению 1.

[0164] Пример 2: Соединения, среда для выращивания и дополнения к среде

[0165] Соединение 1 синтезируют в Vertex Pharmaceuticals Incorporated и растворяют в 100% диметилсульфоксиде (ДМСО) в концентрации 10 мМ и хранят при -20°C. DMEM (номер по каталогу 11960), 200 мМ L-глутамин (номер по каталогу 25030-081), жидкий пенициллин-стрептомицин (номер по каталогу 15140-122) и HEPES буфер (номер по каталогу 15630) закупают в Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). Фетальную телячью сыворотку (FBS; номера по каталогу F4135 или 10091-148) закупают в Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA), или Invitrogen, соответственно. ДМСО (номер по каталогу D2650) и Ex-CELL не содержащую сыворотки среду (номер по каталогу M8303) закупают в Sigma-Aldrich.

CellTiterGlo[®] (номер по каталогу G7573) закупают в Promega (Madison, WI, USA). Толи лсульфонилфенилаланилхлорметилкетон (TPCK)-обработанный трипсин (номер по каталогу 22725) закупают в USB Corporation (Affymetrix, Fremont, CA, USA).

[0166] Пример 3: Исходные вирусные растворы

[0167] Чтобы получить продуктивную инфекцию в клеточной линии почек собаки (MDCK), A/Wisconsin/67/2005 (Influenza Reagent Resource, FR-397, Manassas, VA, USA) сериально пересевает 10 раз в MDCK клетки. Адаптированный таким образом вирус очищают методом бляшек (обозначают как A/Wisconsin/67/2005-p1) и получают стандартным способом (World Health Organization). Короче, MDCK клетки (CCL-34, ATCC) поддерживают в DMEM, дополненной 2 мМ L глутамин, 1 (не относящимися к незаменимым аминокислотами, 100 Ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина (полная DMEM; cDMEM) с 10% FBS. Клетки инфицируют при низкой множественности заражения (MOI) в cDMEM с 1 мкг/мл TPCK-обработанного трипсина (вирусная ростовая среда; VGM) в течение приблизительно 48 часов, после чего надосадочную жидкость собирают центрифугированием при 650×g в течение 10 минут, используя центрифугу Beckman GS-6R. Исходные вирусные растворы замораживают и хранят при -80°C. TCID₅₀ (количество инфекционного агента, который обеспечивает патологические изменения в 50% клеточных культур) инфекционный титр определяют, тестируя сериальные разбавления исходного вируса на MDCK клетки в 4-дневном анализе цитопатического эффекта, и обрабатывая результаты по способу Карбера.

[0168] Таблица 1: Оборудование.

Прибор	Модель	Компания	Расположение
Центрифуга	GS-6R	Beckman Coulter	Brea, CA, USA
Инкубатор	NU-8700	Nuaire	Plymouth, MN, USA
Жидкостный манипулятор	Biomek FX	Beckman Coulter	Brea, CA, USA
Люминометр	EnVision 2103 Multilabel Plate Reader	PerkinElmer	Waltham, MA, USA
Спектрофотометр	NanoDrop, 8000 v.1.1	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA

[0169] Таблица 2: Программное обеспечение.

Цель	Программное обеспечение	Компания	Расположение
CPE анализ	Condoseo	Genedata	Basel, Switzerland
Хранение данных и TCID ₅₀	Excel	Microsoft	Redmond, WA, USA
Моделирование белка	PyMOL Molecular Graphics System 1.4.1	Schrödinger, LLC	New York, NY, USA

Информирование	Word	Microsoft	Redmond, WA, USA
Анализ последовательностей	Mutation Surveyor v3.20	SoftGenetics	State College, PA, USA

[0170] Пример 4: In vitro селекция вариантов гриппа

[0171] Жидкостный манипулятор Biomek FX (Beckman Coulter, Brea, CA, USA)

используют для высевания клеток MDCK (4×10^5 кл/мл) в черные, с прозрачным дном 384-луночные планшеты с плотностью 2×10^4 клеток на лунку в 50 мкл среды для роста вируса (VGM: Дюльбекко модифицированная среда Игла (DMEM), дополненная пенициллин/стрептомицином, L-глутамином, HEPES и 1 мкг/мл ТРСК-обработанным трипсином). Клетки инкубируют 5 часов при 37°C, 5% CO₂, при влажности, которая позволяет клеткам слипаться и образовывать монослои. Используя Biomek FX, 40 мкл среды удаляют и заменяют 25 мкл VGM, содержащей разбавленное лекарственное средство (конечная концентрация ДМСО 0,5% ДМСО) и 15 мкл вируса при (множественности заражения) MOI 1 (20000 TCID₅₀/лунку), для всего 50 мкл.

Лекарственное средство добавляют в 32 репликатные лунки в каждой из восьми концентраций соединения 1, в интервале значений от 1 (до 128×EC₅₀. Внутренние контроли, состоят из 64 лунок, содержащих только клетки, и 64 лунок с инфицированными вирусом клетками в отсутствие соединения. Планшеты инкубируют при 37°C, 5% CO₂, с насыщающей влажностью в течение 72 часов. После инкубирования 20 мкл надосадочной жидкости собирают и разбавляют 150 мкл cDMEM. 20 мкл CellTiter-Glo добавляют в планшет, содержащий 30 мкл среды и клетки, используя Biomek FX, и инкубируют при комнатной температуре в течение 10 минут. Люминесценцию, которая представляет собой меру жизнеспособности клеток за счет полного количества АТФ в клетках, измеряют, используя считывающее устройство для планшетов EnVision plate reader (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) для контроля за эффектом роста вирусов в присутствии соединения. Разбавленную надосадочную жидкость пересеивают в новые лунки. Осуществляют два дополнительных пассажа вируса. После всех трех пассажей лунки, которые демонстрируют рост вируса в присутствии ингибитора, размножают, получая небольшие вирусные исходные растворы, и полученные исходные растворы характеризуют в отношении восприимчивости к соединению 1 в трехдневном анализе защиты MDCK клеток. Для исходных растворов, демонстрирующих пониженную восприимчивость к соединению 1, определяют кодирующие последовательности PB1, PB2 и PA с последующим выделением РНК, проведением ПЦР обратной транскрипции, ПЦР амплификации и секвенирования популяции по способу Сангера. Для идентификации потенциальных вариантов, устойчивых в отношении соединения 1, для тестирования в системе, основанной на обратной генетике, используют несколько критериев. Вирус должен демонстрировать сдвиг EC₅₀ в восприимчивости соединения 1 более чем десятикратный (должен быть вне пределов детектирования-до-вариаций в анализе от 3 до 5-кратного) и должен наблюдаться во множестве экспериментальных лунок. Кроме того, также анализируют любые варианты в положениях PB2, которые ранее были идентифицированы как сообщающие устойчивость к соединению 1. И наконец, для исключения обычного полиморфизма, не связанного с соединением 1, такие варианты исключают, если они наблюдаются в контрольных лунках.

Аминокислотные изменения относительно исходного штамма идентифицируют и клонируют в фоновый A/ Puerto Rico/8/34 вирус гриппа, используя 12-плазмидную систему обратной генетики. Фенотип штамма гриппа обратной генетики снова характеризуют, используя трехдневный анализ защиты клеток MDCK и восприимчивости

к ингибитору. Природную частоту идентифицированных вариантов анализируют путем поиска опубликованных баз данных последовательностей вируса гриппа, и оценивают положение идентифицированных аминокислотных изменений внутри доступных рентгеновских кристаллических структур PB2.

[0172] Чтобы обеспечить продуктивное инфицирование в клеточной линии почки собаки (MDCK), A/Wisconsin/67/2005 сериально пересевают 10 раз в MDCK клетки. Полученный адаптированный вирус очищают, используя метод бляшек, и бляшку №1 обозначают как A/Wisconsin/67/2005-p1. Сравнение последовательностей виусов исходного и бляшки №1 A/Wisconsin/67/2005 демонстрирует идентичность последовательностей PA, PB1 и PB2. Восприимчивость к соединению 1 в трехдневном анализе MDCK клеток на базе CPE с использованием A/Wisconsin/67/2005-p1 определяют как 0,0020 мкМ.

[0173] Осуществляют отбор вариантов A/Wisconsin/67/2005-p1 (здесь именуемых как A/Wisconsin/67/2005) с пониженной восприимчивостью к соединению 1. Отбор осуществляют при концентрациях соединения 1 в интервале от EC₅₀ до 128×EC₅₀ (т.е., 0,0020 мкМ-0,256 мкМ). После трех пассажей при тех же концентрациях в лунке, из надосадочной жидкости собирают обогащенную вирусную популяцию. Шестнадцать лунок, содержащих потенциально устойчивые в отношении соединения 1 варианты (т.е., с уровнями АТФ<50% по сравнению с неинфицированными лунками), и 16 контрольных лунок отбирают для подтверждающих фенотипических анализов и секвенирования генов полимеразы (Таблицы 3 и 4).

[0174] Таблица 3: Варианты A/Wisconsin/67/2005, отобранные с использованием соединения 1

Сдвиг EC ₅₀	№ образ- ца	Сводка вариан- тов	PB2												PA	
			M11	Q306	F323	S324	K339	F363	K376	I411	M431	D506	N510	M535	V463	I505
733	6	S324R				R										
533	1	S324N				N										
440	5	M11M/T K376N	M/T						N							
353	8	N510K											K			
347	2	K376N							N							
227	3	I411V, N510K								V			K			
113	7	F323S			S											
59	10	Q306L		L												
41	4	M431I									I					
9	9	I411V, D506G								V		G				
5	11	F363L						L								
3	14															
1	12	PA V463I, PA I505L													I	L
1	13	M535V												V		
1	15	S324S/C, K339K/I				S/C	K/I									
1	16															

[0175] Таблица 4: Контрольные варианты гриппа A/Wisconsin/67/2005/, выбранные без соединения 1

EC ₅₀ Сдвиг	Номер образца	Сводка вариантов	PB2			PB1
			T35	I411	I726	P5
1	17					
1	18					

1	19			I/V		
1	20	I411I/V		I/V		
1	21	I411I/V				
1	22					
1	23	T35I	I			
1	24	PB1 P5P/L				P/L
1	25					
1	26					
1	27					
1	28	I726I/V, PB1 P5P/L			I/V	P/L
1	29					
1	30					
1	31					
1	32					

Таблица 5: Сводка вариантов, устойчивых к соединению 1

Вариант PB2	Наблюдавшиеся ^a штамм(ы)	Число наблюдений ^b	Кратность сдвига EC ₅₀ соединения 1 относительно вируса обратной генетики, Средн. ^c	Процент пикового титра ^d in vitro	Частота в базе данных ^e человека
Q306H	PR	2	154	6%	0/8919
Q306L	WI	1	ND ^f	ND ^f	0/8919
F323S	WI	1	111	1%	3/8942
F323Y	PR	1	100	ND ^f	0/8942
S324G	PR	1	18	38%	0/8942
S324I	PR	1	184	6%	0/8942
S324N	PR, WI	3	84	18%	1/8942
S324R	PR, WI	20	57	18%	0/8942
S337L	CA	1	22	6%	0/8944
S337P	CA	1	4.9	1%	2/8944
F363L	CA, WI	4	26	8%	1/8911
K376N	WI	2	ND ^f	ND ^f	0/8910
K376Q	CA	1	262	ND ^g	0/8910
K376R	PR, CA	8	100	10%	0/8910
F404Y	PR	5	378	56%	3/8912
M431I	WI	1	57	8%	0/8914
M431T	PR	2	116	1%	0/8914
N510K	WI	2	514	1%	0/8926
N510T	PR	3	205	32%	1/8926
Примечание: Некоторые варианты, которые наблюдались один раз, были выбраны для фенотипического анализа с использованием обратной генетики, так как варианты с такими положениями аминокислот наблюдались ранее в селекционных экспериментах на устойчивость.					
^a Вариант пассажа штамма наблюдают в: CA, A/California/07/2009; PR, A/Puerto Rico/8/34; WI, A/Wisconsin/67/2005					
^b Число клеток, в которых наблюдают специфический вариант					
^c Вирусы, полученные в системе обратной генетики, с изменениями только в указанном положении конструируют и тестируют в отношении восприимчивости к соединению 1 в трехдневном анализе на основе CPE. Кратность сдвигов определяют путем деления EC ₅₀ мутантного вируса на EC ₅₀ вируса дикого типа. Соединения с однократными сдвигами EC ₅₀ являются средними из по меньшей мере трех независимых экспериментов.					
^d MDCK клетки инфицируют указанным вирусом при MOI=0,01 и надосадочную жидкость титруют в течение 62 часов. Процент пикового титра определяют как процент среднего антилогарифмического титра варианта деленный на значение для среднего антилогарифмического титра дикого типа через 48 часов после инфицирования. Репликативную способность вируса анализируют в одном эксперименте с трехкратным повтором.					
^e Сводка всех опубликованных доступных последовательностей гриппа А человека (пансубтип) включена в базу данных Vertex Flu Research database от 20 марта, 2013					
^f ND не определено					
^g ND не определено, так как титр оказался ниже пределов детектирования после 48 часов					

[0176] Из 16 вариантов пересейанных вирусных изолятов, 9 имеют подтвержденный более чем десятикратный сдвиг EC₅₀. Все указанные 9 вирусов содержат варианты PB2

в положениях, охарактеризованных ранее как придающие устойчивость к соединению 1 в A/Puerto Rico/8/34 и/или A/California/07/2009 (полужирный текст в таблице 3; таблице 5). Более чем двухсоткратную устойчивость к соединению 1 демонстрируют вирусы, содержащие PB2 варианты S324R, S324N, K376N или N510K, тогда как F323S, Q306L и M431I наблюдаются в менее устойчивых вирусах (в 10-200 раз). Вариант F363L наблюдают в вирусе, придающем пятикратную устойчивость. Новыми вариантами, наблюдавшимися в указанном исследовании, обнаруженными в ранее охарактеризованных положениях PB2, были Q306L, K376N, M431I и N510K. Ни PA ни PB1 варианты не ассоциировались с устойчивостью к соединению 1 в указанном исследовании. Хотя PB1 варианты не наблюдались в пересеянных лунках с соединением 1, 2 PA варианта наблюдались в лунках, для которых не было подтверждено снижение восприимчивости к соединению 1 ($1 \times EC_{50}$).

[0177] Характеризация отдельных потенциально устойчивых в отношении соединения 1 вариантов находится в стадии исследования с использованием способов обратной генетики. К настоящему времени, указанные вирусы продемонстрировали сдвиги EC_{50} для соединения 1 в интервале от 4,9- до 514-кратного (Таблица 5). Так как все варианты были созданы с использованием системы обратной генетики для A/Puerto Rico/8/34, которая содержит последовательности, придающие устойчивость к M2-ингибитору и восприимчивость к NAI, исследования кросс-резистентности не проводились.

[0178] Для оценки репликативной способности вирусов, идентифицированных в селекционных исследованиях устойчивости, MDCK клетки инфицируют вариантами, созданными способами обратной генетики с очень низкой MOI (0,01), и вирусные титры контролируют в течение 62 часов. Пиковый титр для вируса дикого типа был определен через 48 часов после инфицирования, и поэтому все мутантные вирусы сравнивали по этой временной точке. Во всех случаях, PB2 мутантные вирусы оказались неспособными размножиться до значений титров, эквивалентных титрам вируса дикого типа (таблица 5). Лишь только F404Y достигает значения титра более половины от значения для титра вируса дикого типа (56%). 10 вирусов демонстрируют титры, значения которых составляют не более чем 10% от значений для вируса дикого типа: Q306N, F323S, S324I, S337L, S337R, F363L, K376R, M431I, M431T и N510K. Была проведена оценка K376Q, и через 48 часов после инфицирования, вирусные титры оказались ниже пределов детектирования. Следует заметить, что указанный анализ осуществляли один раз, причем каждый вирус был представлен по меньшей мере трехкратно в указанном анализе. Три значения для каждого из вирусов в каждой временной точке усредняют.

[0179] Пример 5: Характеризация восприимчивости вариантов гриппа к соединению 1

[0180] Противовирусную активность соединений оценивают по их способности предотвращать гибель MDCK клеток, как следствие инфицирования вирусом гриппа, что измеряют по клеточным уровням АТФ, используя CellTiter Glo. Короче, жидкостный манипулятор Biomek FX используют для посева MDCK клеток (4×10^5 кл/мл) в черные, с прозрачным дном 384-луночные планшеты с плотностью 2×10^4 клеток на лунку в 50 мкл VGM. Клетки инкубируют в течение 5 часов при 37°C, 5% CO₂, в условиях насыщенной влажности для обеспечения клеткам возможности слипаться и образовывать монослои. Используя Biomek FX, 40 мкл среды удаляют, и добавляют 25 мкл VGM, содержащей разбавленное лекарственное средство (конечная концентрация в ДМСО 0,5% ДМСО), и 15 мкл вируса в концентрации 100 TCID₅₀/лунку. Внутренние контроли представляют собой лунки, содержащие только клетки и клетки,

инфицированные вирусом в отсутствии соединения. Планшеты инкубируют при 37°C, 5% CO₂, в условиях насыщенной влажности в течение 72 часов. После инкубирования в каждую лунку добавляют 20 мкл CellTiter-Glo, используя Biomek FX, и инкубируют при комнатной температуре в течение 10 минут. Люминесценцию измеряют, используя устройство для считывания планшетов EnVision (PerkinElmer). EC₅₀ (концентрация соединения, при которой CPE составляет половину от значения для контроля), значения рассчитывают путем построения графика зависимости реакции от дозы соединения, используя четырехпараметрический подбор кривой способом алгоритма Левенбург Марквардта (программное обеспечение Condoseo; Genedata Basel, Switzerland).

[0181] Пример 6: Определение компетентности вирусной репликации

[0182] Компетентность вирусной репликации оценивают для вариантов обратной генетики по 62-часовым кривым роста в инфицированных MDCK клетках. MDCK клетки высевает в 96-луночные планшеты с плотностью 4×10^4 клеток на лунку и инфицируют вирусом при MOI=0,01 в отсутствии соединения. В различные моменты времени содержимое планшетов собирают, надосадочную жидкость оценивают по вирусным титрам. Строят кривые для вирусных титров в зависимости от времени, и определяют, что пиковый титр для вируса дикого типа возникает через 48 часов после инфицирования.

[0183] Пример 7: Амплификация и секвенирование комплекса полимеразы гриппа А из исходных растворов вируса или инфицированных MDCK клеток

[0184] Анализ последовательностей вируса гриппа А с использованием амплификации полимеразной цепной реакции с обратной транскриптазой (ОТ-ПЦР) для РНК фрагментов приблизительно в 2,5 килооснований для PB2, PB1 и PA кодирующих участков. Вирусную РНК экстрагируют из 100 мкл исходного вирусного раствора или из 2×10^6 инфицированных MDCK клеток в 300 мкл лизисного буфера в условиях денатурации. Вирусную РНК выделяют на стандартной коммерческой силикагельной мембране, используя или способ RNeasy Plus Mini (номер по каталогу 74134, Qiagen, Valencia, CA, USA), или способ QIAamp Virus PNA Mini (номер по каталогу 52904, Qiagen).

Комплементарный ДНК (кДНК) фрагмент синтезируют из вирусной РНК в 50 мкл реакционной среды, содержащей 2,5 мкМ праймера Universal 12 (AGCRAAAGCAGG) (SEQ ID №: 2), 400 Ед. SuperscriptTM III Reverse Transcriptase (номер по каталогу 18080-044, Invitrogen, Carlsbad, CA), 40 Ед. RNase OUT (номер по каталогу 10777-019, Invitrogen), PC2 реакционный буфер (50 мМ Tris-HCl pH 9,1, 16 мМ сульфата аммония, 3,5 мМ хлорида магния и 150 мкг/мл альбумина телячьей сыворотки) (номер по каталогу 1001, AB Peptides, St. Louis, MO, USA), 500 мкМ dNTPs (номер по каталогу 639125, Clontech, Mountain View, CA, USA) и 5 мМ дитиолтреитола (номер по каталогу 18080-044, Invitrogen), со стадией денатурирования (65°C в течение 5 минут) с последующим скачкообразным увеличением температуры (25°C в течение 10 минут, 42°C в течение 10 минут, 50°C в течение 20 минут, 55°C в течение 10 минут, и 70°C в течение 15 минут) в реакции ОТ. Для амплификации полимеразы вируса гриппа А субъединицы-кодирующие фрагменты из синтезированного пула кДНК, 5 мкл из завершенной ОТ реакционной среды объединяют с PC2 реакционным буфером, 200 мкМ dNTPs (номер по каталогу 639125, Clontech), 1,5 М бетаина (номер по каталогу B0300, Sigma Aldrich), 3,2 Ед. ДНК полимеразы KlenTaq (номер по каталогу 1001, AB Peptides), 1,6 Ед. КОЕ ДНК полимеразы (номер по каталогу 600160, Stratagene, La Jolla, CA, USA), и 400 мкМ каждого праймера для объема конечной реакции в 50 мкл (для PA сегмента: В прямом направлении: 5'-CGTCTCNGGGAGCGAAAGCAGGTA CTGATCCAAAAT (SEQ ID №: 3)

и в обратном направлении: 5'-CGTCTCNTATTAGTAGAAACAAGGTA CTTTTTTTGG A (SEQ ID №: 4), для PB1 сегмента: В прямом направлении: 5'- CGTCTCNGGGAGCGAA AGCAGGCAAACCATTTTGAA (SEQ ID №: 5) и в обратном направлении: 5'- CGTCTCNT ATTAGTAGGAACAAGGCATTTTTTTCATG (SEQ ID №: 6), для PB2 сегмента: В прямом направлении: 5'-CGTCTCNGGGAGCGAAAGCAGGTCAATTATATTCAA (SEQ ID №: 7) и В обратном направлении: 5'- CGTCTCNTATTAGTAGAAACAAGGTCGTTTTTAAAC (SEQ ID №: 8)). Реакционную смесь инкубируют при 94°C в течение 2 минут, затем 40 циклов при 94(в течение 15 секунд, 68°C-0,4°C/цикл ('ступенчатая(ПЦР) в течение 20 секунд, и 68°C в течение 3,5 минут, с последующим инкубированием при 68°C в течение 7 минут. Продукт ПЦР очищают, используя набор для очистки ПЦР QIAquick 96 (номер по каталогу 28181, Qiagen) и аликвоты анализируют в отношении качества, используя электрофорез в 1% агарозном геле. Степень чистоты и количество очищенных ПЦР продуктов оценивают, используя спектрофотометрию (NanoDrop, 8000 v.1.1; Thermo Fisher Scientific). Очищенную ДНК секвенируют в собственной лаборатории или посылают в Beckman-Coulter (Agencourt(Biosciences; Danvers, MA, USA) для секвенирования PB2, PB1 и PA сегментов.

[0185] Фрагменты последовательностей выравнивают и интерпретируют, используя программное обеспечение Mutation Surveyor (SoftGenetics, State College, PA). Аминокислотные замещения определяют, сравнивая последовательности с последовательностью соответствующего вируса, использованного для селекции по устойчивости (т.е., A/Wisconsin/67/2005).

[0186] Пример 8: Конструирование плазмид для системы обратной генетики

[0187] Плазмидные конструкции, кодирующие сегменты вирусного генома, создают следующим образом. Осуществляют выделение РНК вируса гриппа A/Puerto Rico/8/34 и синтез кДНК. кДНК амплифицируют, используя олигонуклеотиды, содержащие концевые сайты рестрикционной эндонуклеазы BsmB1, и амплифицированный продукт клонируют в шаттл-вектор PCR-XL-ТОРО, используя набор для клонирования ТОРО® XL PCR Cloning Kit (номер по каталогу K4700 10, Invitrogen). кДНК-содержащие ТОРО векторы переваривают BsmB1, и вставки лигируют в вектор экспрессии рНН21, управляемый РНК полимеразы I. Плазмиды секвенируют для подтверждения правильного интегрирования кДНК фрагмента и отсутствия нежелательных мутаций.

[0188] Аминокислотные изменения относительно исходного штамма, идентифицированные в селекционных экспериментах в отношении устойчивости, клонируют в соответствующую плазмиду рНН21-A/Puerto Rico/8/34, используя набор для мутагенеза Quick Change™ II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (номер по каталогу 200518, Agilent Technologies, Inc., Wilmington, DE, USA) в соответствии с рекомендациями изготовителя. Короче, 10 нг плазмиды дикого типа и 150 нг каждого праймера, содержащего мутации в прямом и обратном направлении, комбинируют с 5 мкл 10 (реакционного буфера, 1 мкл смеси dNTP, 3 мкл QuikSolution и 2,5 Ед. ДНК полимеразы PfuUltra HF в воде степени чистоты для ПЦР до 50 мкл, и мутации вводят, используя ПЦР. Конечный цикл осуществляют, используя начальную денатурацию при 95°C в течение 1 минуты, 18 циклов при 95°C в течение 50 секунд, 60°C в течение 50 секунд, 68°C в течение 5 минут и конечное удлинение в течение 7 минут при 68°C. Остаточную дикого типа плазмиду переваривают, используя рестрикционный фермент Dpn I, и содержащую мутацию плазмиду трансформируют в E.coli, скринируют колонии после ночи и плазмиду выделяют, используя набор QIAGEN Plasmid Plus midi (номер по каталогу 12943, Qiagen). Правильное включение точечной мутации в плазмиду подтверждают секвенированием.

[0189] Пример 9: Создание рекомбинантных вирусов

[0190] Для исследования мутаций создают рекомбинантные вирусы, путем временной трансфекции 293Т клеток (НЕК 293Т/17, CRL-11268, ATCC) плазмидной смесью, содержащей 1,25 мкг плазмиды, содержащей рНН21 мутацию, каждую из семи оставшихся рНН21 плазмид дикого типа, и четыре плазмиды комплекса экспрессии RNP. Временные трансфекции осуществляют, используя трансфекционный реагент TransIT-LT1 (номер по каталогу MIR 2300, MirusBio, Madison, WI, USA). Короче, 1:2 смесь (масс/об) плазмидной смеси, и трансфекционный реагент инкубируют в 1,5 мл среды OPTI-MEM I (номер по каталогу 11058, Invitrogen) при комнатной температуре в течение 15 минут. Затем трансфекционную смесь помещают в Т-75 матрасы, содержащие клетки 293Т с 50% клонфлюентностью в 15 мл среды OPTI-MEM I (293Т клетки поддерживают в 15 мл cDMEM, дополненной 10% FBS которые дважды промывают средой OPTI-MEM I перед добавлением трансфекционной смеси). Клетки инкубируют при 37(в 5% CO₂ в условиях насыщенной влажности в течение 72 часов. После инкубирования собирают надосадочную жидкость и ее центрифугируют при 650×g в течение 10 минут для удаления клеточного дебриса, и вирус далее распространяют в MDCK клетки, инфицированные при низких значениях MOI, после чего исходные растворы собирают и титруют.

ДРУГИЕ ВАРИАНТЫ

Следует понимать, что хотя настоящее изобретение было раскрыто в связи с его подробным описанием, предшествовавшее описание предназначено только для иллюстрации, и не ограничивает объем настоящего изобретения, который определен в прилагаемой формуле изобретения. Другие аспекты, преимущества и модификации находятся в объеме следующей формулы изобретения.

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110>VERTEX PHARMACEUTICALS, INC.

<120>ВАРИАНТЫ ВИРУСА ГРИППА А

<130>223306/14-104PRV1/355615

<160>8

<170>Патент в версии 3.5

<210>1

<211>759

<212>PRT

<213>Вирус гриппа А

<400>1

Met Glu Arg Ile Lys Glu Leu Arg Asn Leu Met Ser Gln Ser Arg Thr
1 5 10 15

Arg Glu Ile Leu Thr Lys Thr Thr Val Asp His Met Ala Ile Ile Lys
20 25 30

Lys Tyr Thr Ser Gly Arg Gln Glu Lys Asn Pro Ala Leu Arg Met Lys
35 40 45

Trp Met Met Ala Met Lys Tyr Pro Ile Thr Ala Asp Lys Arg Ile Thr
50 55 60

Glu Met Ile Pro Glu Arg Asn Glu Gln Gly Gln Thr Leu Trp Ser Lys
65 70 75 80

Met Asn Asp Ala Gly Ser Asp Arg Val Met Val Ser Pro Leu Ala Val
85 90 95

Thr Trp Trp Asn Arg Asn Gly Pro Ile Thr Asn Thr Val His Tyr Pro

100 105 110
 Lys Ile Tyr Lys Thr Tyr Phe Glu Arg Val Glu Arg Leu Lys His Gly
 115 120 125
 Thr Phe Gly Pro Val His Phe Arg Asn Gln Val Lys Ile Arg Arg Arg
 5 130 135 140
 Val Asp Ile Asn Pro Gly His Ala Asp Leu Ser Ala Lys Glu Ala Gln
 145 150 155 160
 Asp Val Ile Met Glu Val Val Phe Pro Asn Glu Val Gly Ala Arg Ile
 165 170 175
 10 Leu Thr Ser Glu Ser Gln Leu Thr Ile Thr Lys Glu Lys Lys Glu Glu
 180 185 190
 Leu Gln Asp Cys Lys Ile Ser Pro Leu Met Val Ala Tyr Met Leu Glu
 195 200 205
 Arg Glu Leu Val Arg Lys Thr Arg Phe Leu Pro Val Ala Gly Gly Thr
 15 210 215 220
 Ser Ser Val Tyr Ile Glu Val Leu His Leu Thr Gln Gly Thr Cys Trp
 225 230 235 240
 Glu Gln Met Tyr Thr Pro Gly Gly Glu Val Arg Asn Asp Asp Val Asp
 245 250 255
 20 Gln Ser Leu Ile Ile Ala Ala Arg Asn Ile Val Arg Arg Ala Ala Val
 260 265 270
 Ser Ala Asp Pro Leu Ala Ser Leu Leu Glu Met Cys His Ser Thr Gln
 275 280 285
 Ile Gly Gly Ile Arg Met Val Asp Ile Leu Arg Gln Asn Pro Thr Glu
 25 290 295 300
 Glu Gln Ala Val Asp Ile Cys Lys Ala Ala Met Gly Leu Arg Ile Ser
 305 310 315 320
 Ser Ser Phe Ser Phe Gly Gly Phe Thr Phe Lys Arg Thr Ser Gly Ser
 325 330 335
 30 Ser Val Lys Arg Glu Glu Glu Val Leu Thr Gly Asn Leu Gln Thr Leu
 340 345 350
 Lys Ile Arg Val His Glu Gly Tyr Glu Glu Phe Thr Met Val Gly Arg
 355 360 365
 Arg Ala Thr Ala Ile Leu Arg Lys Ala Thr Arg Arg Leu Ile Gln Leu
 35 370 375 380
 Ile Val Ser Gly Arg Asp Glu Gln Ser Ile Ala Glu Ala Ile Ile Val
 385 390 395 400
 Ala Met Val Phe Ser Gln Glu Asp Cys Met Ile Lys Ala Val Arg Gly
 405 410 415
 40 Asp Leu Asn Phe Val Asn Arg Ala Asn Gln Arg Leu Asn Pro Met His
 420 425 430
 Gln Leu Leu Arg His Phe Gln Lys Asp Ala Lys Val Leu Phe Gln Asn
 435 440 445
 Trp Gly Val Glu Pro Ile Asp Asn Val Met Gly Met Ile Gly Ile Leu
 45 450 455 460
 Pro Asp Met Thr Pro Ser Ile Glu Met Ser Met Arg Gly Val Arg Ile
 465 470 475 480
 Ser Lys Met Gly Val Asp Glu Tyr Ser Ser Thr Glu Arg Val Val Val

485 490 495
 Ser Ile Asp Arg Phe Leu Arg Ile Arg Asp Gln Arg Gly Asn Val Leu
 500 505 510
 Leu Ser Pro Glu Glu Val Ser Glu Thr Gln Gly Thr Glu Lys Leu Thr
 5 515 520 525
 Ile Thr Tyr Ser Ser Ser Met Met Trp Glu Ile Asn Gly Pro Glu Ser
 530 535 540
 Val Leu Val Asn Thr Tyr Gln Trp Ile Ile Arg Asn Trp Glu Thr Ile
 545 550 555 560
 10 Lys Ile Gln Trp Ser Gln Asn Pro Thr Met Leu Tyr Asn Lys Met Glu
 565 570 575
 Phe Glu Pro Phe Gln Ser Leu Val Pro Lys Ala Ile Arg Gly Gln Tyr
 580 585 590
 Ser Gly Phe Val Arg Thr Leu Phe Gln Gln Met Arg Asp Val Leu Gly
 15 595 600 605
 Thr Phe Asp Thr Ala Gln Ile Ile Lys Leu Leu Pro Phe Ala Ala Ala
 610 615 620
 Pro Pro Lys Gln Ser Arg Met Gln Phe Ser Ser Phe Thr Val Asn Val
 625 630 635 640
 20 Arg Gly Ser Gly Met Arg Ile Leu Val Arg Gly Asn Ser Pro Val Phe
 645 650 655
 Asn Tyr Asn Lys Ala Thr Lys Arg Leu Thr Val Leu Gly Lys Asp Ala
 660 665 670
 Gly Thr Leu Thr Glu Asp Pro Asp Glu Gly Thr Ala Gly Val Glu Ser
 25 675 680 685
 Ala Val Leu Arg Gly Phe Leu Ile Leu Gly Lys Glu Asp Lys Arg Tyr
 690 695 700
 Gly Pro Ala Leu Ser Ile Asn Glu Leu Ser Asn Leu Ala Lys Gly Glu
 705 710 715 720
 30 Lys Ala Asn Val Leu Ile Gly Gln Gly Asp Val Val Leu Val Met Lys
 725 730 735
 Arg Lys Arg Asp Ser Ser Ile Leu Thr Asp Ser Gln Thr Ala Thr Lys
 740 745 750
 Arg Ile Arg Met Ala Ile Asn
 35 755
 <210>2
 <211>12
 <212>ДНК
 <213>Искусственная последовательность
 40 <220>
 <223>Суб-синтетический олигонуклеотид
 <400>2
 agcraaagca gg 12
 <210>3
 45 <211>36
 <212>ДНК
 <213>Искусственная последовательность
 <220>

<223>Суб-синтетический олигонуклеотид
 <220>
 <221>прочий признак
 <222>(7)..(7)
 5 <223>n is a, c, g, t или u
 <400>3
 cgtctcnggg agcgaagca ggtactgatc caaaat 36
 <210>4
 <211>36
 10 <212>ДНК
 <213>Искусственная последовательность
 <220>
 <223>Суб-синтетический олигонуклеотид
 <220>
 15 <221>прочий признак
 <222>(7)..(7)
 <223>n is a, c, g, t или u
 <400>4
 cgtctcntat tagtagaaac aaggctacttt ttggga 36
 20 <210>5
 <211>35
 <212>ДНК
 <213>Искусственная последовательность
 <220>
 25 <223>Суб-синтетический олигонуклеотид
 <220>
 <221>прочий признак
 <222>(7)..(7)
 <223>n is a, c, g, t или u
 30 <400>5
 cgtctcnggg agcgaagca ggcaaacat ttgaa 35
 <210>6
 <211>36
 <212>ДНК
 35 <213>Искусственная последовательность
 <220>
 <223>Суб-синтетический олигонуклеотид
 <220>
 <221>прочий признак
 40 <222>(7)..(7)
 <223>n is a, c, g, t или u
 <400>6
 cgtctcntat tagtaggaac aaggcat tttt ttcattg 36
 <210>7
 45 <211>36
 <212>ДНК
 <213>Искусственная последовательность
 <220>

<223>Суб-синтетический олигонуклеотид

<220>

<221>прочий признак

<222>(7)..(7)

5 <223>n is a, c, g, t или u

<400>7

cgtctcnggg agcgaaagca ggtcaattat attcaa 36

<210>8

<211>36

10 <212>ДНК

<213>Искусственная последовательность

<220>

<223>Суб-синтетический олигонуклеотид

<220>

15 <221>прочий признак

<222>(7)..(7)

<223>n is a, c, g, t или u

<400>8

cgtctcntat tagtagaaac aaggtcgttt ttaaac 36

20

(57) Формула изобретения

1. Выделенный полинуклеотид вируса гриппа А, кодирующий мутант PB2 полимеразы вируса гриппа А, причем мутант PB2 полимеразы содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 с замещением одной аминокислоты, выбранным из группы, состоящей из: Q306H, Q306L, F323S, F323Y, S324G, S324I, S324N, S324R, S337L, S337P, F363L, K376N, K376Q, K376R, F404Y, M431I, M431T, N510K и N510T.

25

2. Выделенный полинуклеотид вируса гриппа А по п. 1, где полинуклеотид кодирует мутант PB2 полимеразы вируса гриппа А с мутацией в положении аминокислоты 306, причем указанная мутация кодирует аминокислоту Н или L.

30

3. Выделенный полинуклеотид вируса гриппа А по п. 1, где полинуклеотид кодирует мутант PB2 полимеразы вируса гриппа А с мутацией в положении аминокислоты 323, причем указанная мутация кодирует аминокислоту S или Y.

4. Выделенный полинуклеотид вируса гриппа А по п. 1, где полинуклеотид кодирует мутант PB2 полимеразы вируса гриппа А с мутацией в положении аминокислоты 324, причем указанная мутация кодирует аминокислоту G, I, N или R.

35

5. Выделенный полинуклеотид вируса гриппа А по п. 1, где полинуклеотид кодирует мутант PB2 полимеразы вируса гриппа А с мутацией в положении аминокислоты 337, причем указанная мутация кодирует аминокислоту L или P.

6. Выделенный полинуклеотид вируса гриппа А по п. 1, где полинуклеотид кодирует мутант PB2 полимеразы вируса гриппа А с мутацией в положении аминокислоты 363, причем указанная мутация кодирует аминокислоту L.

40

7. Выделенный полинуклеотид вируса гриппа А по п. 1, где полинуклеотид кодирует мутант PB2 полимеразы вируса гриппа А с мутацией в положении аминокислоты 376, причем указанная мутация кодирует аминокислоту N, Q или R.

8. Выделенный полинуклеотид вируса гриппа А по п. 1, где полинуклеотид кодирует мутант PB2 полимеразы вируса гриппа А с мутацией в положении аминокислоты 404, причем указанная мутация кодирует аминокислоту Y.

45

9. Выделенный полинуклеотид вируса гриппа А по п. 1, где полинуклеотид кодирует

мутант PB2 полимеразы вируса гриппа А с мутацией в положении аминокислоты 431, причем указанная мутация кодирует аминокислоту I или T.

10. Выделенный полинуклеотид вируса гриппа А по п. 1, где полинуклеотид кодирует мутант PB2 полимеразы вируса гриппа А с мутацией в положении аминокислоты 510, причем указанная мутация кодирует аминокислоту T или K.

11. Выделенный полинуклеотид вируса гриппа А по п. 1, где полинуклеотид кодирует мутант PB2 полимеразы вируса гриппа А, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 с замещениями двух или трех аминокислот, выбранными из группы, состоящей из: Q306H, Q306L, F323S, F323Y, S324G, S324I, S324N, S324R, S337L, S337P, F363L, K376N, K376Q, K376R, F404Y, M431I, M431T, N510K и N510T.

12. Выделенная полимеразы вируса гриппа А, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, в которой аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 1 имеет замещение одной аминокислоты, выбранное из группы, состоящей из Q306H, Q306L, F323S, F323Y, S324G, S324I, S324N, S324R, S337L, S337P, F363L, K376N, K376Q, K376R, F404Y, M431I, M431T, N510K и N510T.

13. Нуклеотидный зонд, способный к гибридизации в жестких условиях с полинуклеотидом по п. 1, кодирующим мутант PB2 полимеразы вируса гриппа А, причем мутант PB2 полимеразы содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, имеющую замещение, выбранное из группы, состоящей из: Q306H, Q306L, F323S, F323Y, S324G, S324I, S324N, S324R, S337L, S337P, F363L, K376N, K376Q, K376R, F404Y, M431I, M431T, N510K и N510T, или его комплементарная последовательность.

14. Система экспрессии, включающая плазмиду, которая содержит полинуклеотид вируса гриппа А по п. 1.

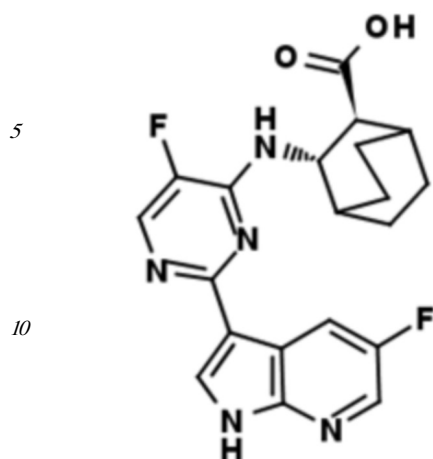
15. Система экспрессии, включающая плазмиду, причем плазида содержит вектор, и вектор включает полинуклеотид вируса гриппа А по п. 1, функционально связанный с промотором.

16. Клетка хозяина, трансфицированная, трансформированная или трансдуцированная вектором по п. 15 и используемая для экспрессии мутанта PB2 полимеразы, кодируемого полинуклеотидом, который кодирует такой мутант полимеразы.

17. Система экспрессии по п. 14, которая представляет собой систему дисплея мРНК.

18. Выделенный полинуклеотид вируса гриппа А для применения в получении иммуногенной композиции для профилактики или лечения инфекции вируса гриппа А, причем указанный полинуклеотид кодирует мутант PB2 полимеразы вируса гриппа А, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, причем мутация приводит к замещению одной аминокислоты, выбранному из группы, состоящей из: Q306H, Q306L, F323S, F323Y, S324G, S324I, S324N, S324R, S337L, S337P, F363L, K376N, K376R, K376Q, F404Y, M431I, M431T, N510K и N510T, в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1.

19. Способ оценки устойчивости к лекарственному средству вируса гриппа А, содержащему мутант PB2 полимеразы, по отношению к Соединению 1:



Соединение 1,

ингибитору полимеразы инфекции вируса гриппа А, в котором биологический образец инфицированного вирусом гриппа А пациента оценивают для определения того, включает ли биологический образец нуклеиновую кислоту, кодирующую мутант PB2 полимеразы вируса гриппа А, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, причем PB2 полимеразы содержит замещение аминокислоты, выбранное из группы, состоящей из: Q306H, Q306L, F323S, F323Y, S324G, S324I, S324N, S324R, S337L, S337P, F363L, K376N, K376Q, K376R, F404Y, M431I, M431T, N510K и N510T, в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, причем способ включает анализ биологического образца на присутствие нуклеиновой кислоты и определение, что, когда нуклеиновая кислота присутствует в биологическом образце, инфицированный вирусом гриппа А пациент является носителем инфекции вируса гриппа А, устойчивой к ингибитору полимеразы PB2, представляющему собой Соединение 1.

20. Способ по п. 19, в котором оценку устойчивости к лекарственному средству осуществляют для проведения лечения инфекции, вызванной вирусом гриппа А у пациента или для проведения оптимизации схемы лечения для пациента.

21. Способ идентификации *in vitro* соединения-кандидата для лечения инфекции, вызванной вирусом гриппа А у пациента, включающий:

- а) получение образца, инфицированного вариантом вируса гриппа А по п. 18;
- б) оценку способности соединения ингибировать активность варианта вируса гриппа А в указанном образце; и
- в) определение, что соединение является соединением-кандидатом для лечения инфекции, вызванной вирусом гриппа А, у пациента, если соединение ингибирует активность варианта вируса гриппа А.

22. Способ по п. 21, где активность варианта вируса гриппа А представляет собой репликацию.

23. Способ идентификации *in vitro* соединения-кандидата для лечения или профилактики инфекции, вызванной вирусом гриппа А у пациента, включающий:

- а) получение репликона РНК, включающего полинуклеотид по п. 1;
- б) оценку возможности соединения ингибировать репликацию репликона РНК, полученного в а), и

в) определение, что соединение является соединением-кандидатом для лечения или профилактики инфекции, вызванной вирусом гриппа А, у пациента, если соединение ингибирует репликацию варианта вируса гриппа А.

24. Композиция для лечения инфекции, вызванной вирусом гриппа А у пациента, содержащая фармацевтически эффективное количество соединения, идентифицированного по п. 23.

5

10

15

20

25

30

35

40

45