



República Federativa do Brasil  
Ministério da Economia  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

**(11) BR 112015007616-5 B1**



**(22) Data do Depósito: 08/10/2013**

**(45) Data de Concessão: 09/08/2022**

---

**(54) Título:** USO DE INIBIDORES DE MEK EM COMBINAÇÃO COM OSELTAMIVIR, E COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA E SEU USO

**(51) Int.Cl.:** A61K 45/06; A61K 31/215; A61K 31/325; A61K 31/437; A61K 31/4458; (...).

**(30) Prioridade Unionista:** 08/10/2012 US 61/711,136.

**(73) Titular(es):** ATRIVA THERAPEUTICS GMBH.

**(72) Inventor(es):** STEPHAN PLESCHKA; OLIVER PLANZ; STEPHAN LUDWIG.

**(86) Pedido PCT:** PCT EP2013070917 de 08/10/2013

**(87) Publicação PCT:** WO 2014/056894 de 17/04/2014

**(85) Data do Início da Fase Nacional:** 06/04/2015

**(57) Resumo:** INIBIDORES DE MEK NO TRATAMENTO DE DOENÇAS POR VÍRUS. A presente invenção refere-se a inibidores de MEK que são capazes de exibir um ou mais efeitos terapêuticos benéficos. Os inibidores de MEK podem ser usados na prevenção e/ou tratamento de infecção viral. Inibidores de MEK em combinação com compostos inibidores de neuraminidase são capazes de exibir um ou mais efeitos terapêuticos benéficos no tratamento de doenças virais.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"USO DE INIBIDORES DE MEK EM COMBINAÇÃO COM OSELTAMIVIR, E COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA E SEU USO"**.

CAMPO DA INVENÇÃO

[001] A presente invenção se refere a inibidores de MEK que são capazes de exibir um ou mais efeitos terapêuticos benéficos. Os inibidores de MEK podem ser usados na prevenção e/ou tratamento de infecção viral. Inibidores de MEK em combinação com compostos inibidores de neuraminidase são capazes de exibir um ou mais efeitos terapêuticos benéficos no tratamento de doenças virais.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[002] Infecções com vírus de RNA ou DNA são uma ameaça significativa para a saúde de homens e animais. Por exemplo, infecções com vírus influenza ainda pertencem às grandes epidemias da humanidade e causam de ano para ano um grande número de vítimas. Em termos das economias nacionais, elas são um fator de custo imenso, por exemplo, devido à inaptidão para o trabalho. Infecções com o vírus da doença de Borna (BDV) (*Borna disease virus*), que pode afetar principalmente cavalos e ovelha, mas que também foi isolado para humanos e está ligado a doenças neurológicas, têm igualmente uma enorme importância econômica.

[003] O problema de controle em vírus de RNA particulares é a adaptabilidade dos vírus causada por uma taxa de falha alta das polimerases virais, o que torna a produção de vacinas adequadas bem como o desenvolvimento de substâncias antivirais muito difíceis. Ainda foi constatado que a aplicação de substâncias antivirais imediatamente direcionada contra funções do vírus mostra um bom efeito antiviral no início do tratamento, mas vai rapidamente levar à seleção de variantes resistentes com base em mutação. Um exemplo é o agente anti-influenza amantadina e seus derivados direcionados contra uma

proteína de transmembrana do vírus. Dentro de um curto tempo após a aplicação, variantes resistentes do vírus são geradas. Outros exemplos são os novos agentes terapêuticos para infecções por influenza inibindo a proteína de superfície viral-influenza neuraminidase. A esses pertencem, por exemplo, Relenza. Em pacientes, variantes resistentes a Relenza já foram encontradas (Gubareva e outros, *J. Infect. Dis.* 178, 1257-1262, 1998). Expectativas depositadas neste agente terapêutico não puderam então ser satisfeitas.

[004] Devido ao genoma muito pequeno e então capacidade de codificação limitada de funções sendo necessárias para a replicação, todos os vírus são dependentes a um alto grau de funções de suas células hospedeiro. Ao exercer influência sobre tais funções celulares sendo necessárias para a replicação viral, é possível afetar negativamente a replicação do vírus na célula infectada. Aqui, não há nenhuma possibilidade que o vírus substitua a função celular faltante através de adaptação, em particular por mutações, a fim de então escapar da pressão de seleção. Isso poderia já ter sido mostrado para o vírus da influenza A com inibidores relativamente não específicos contra cinases celulares e metil transferases (Scholtissek e Müller, *Arch. Virol.* 119, 111-118, 1991).

[005] É conhecido na técnica que células têm um grande número de cursos de transmissão de sinal, através dos quais sinais agindo nas células são transmitidos para o núcleo celular. Desta maneira a célula é capaz de reagir a estímulos externos e reagir através de proliferação celular, ativação celular, diferenciação ou morte de célula controlada. É comum para esses cursos de transmissão de sinal que eles contenham pelo menos uma cinase ativando por fosforilação pelo menos uma proteína subsequentemente transmitindo um sinal. Quando observando os processos celulares induzidos após infecções por vírus, é constatado que vários vírus de DNA e RNA ativam preferivelmente na célula

hospedeiro infectada um curso de transmissão de sinal definido, o chamado curso de transmissão de sinal Raf/MEK/ERK cinase (Benn e outros, *J. Virol.* 70, 4978-4985, 1996; Bruder e Kovesdi, *J. Virol.* 71, 398-404, 1997; Popik e Pitha, *Virology* 252, 210-217, 1998; Rodems e Spector, *J. Virol.* 72, 9173-9180, 1998). Este curso de transmissão de sinal é um dos cursos de transmissão de sinal mais importantes em uma célula e desempenha um papel significativo em processos de proliferação e diferenciação. Sinais induzidos por fator de crescimento são transmitidos por fosforilação sucessiva de Raf serina/treonina cinase para a MEK cinase dual-específica (MAP cinase cinase/ERK cinase) e finalmente para a ERK cinase (cinase regulada por sinal extracelular). Visto que como um substrato de cinase de Raf apenas MEK é conhecida, e as isoformas de ERK foram identificadas como os únicos substratos para MEK, ERK é capaz de fosforilar um grande número de substratos. A esses pertencem, por exemplo, fatores de transcrição, de maneira que a expressão de gene celular é diretamente influenciada (Cohen, *Trends in Cell Biol* 7, 353-361, 1997; Robinson e Cobb, *Curr. Opin. Cell Biol* 9, 180-186, 1997; Treisman, *Curr. Opin. Cell Biol.* 8, 205-215, 1996).

[006] O inconveniente de substâncias ativas antivirais da técnica anterior é que elas são ou direcionadas contra um componente viral e então rapidamente levam à resistência (cf. amantadina) ou agem de uma maneira muito ampla e não específica contra fatores celulares (por exemplo, inibidores de metil transferase) e efeitos colaterais significantes devem ser esperados. Consequentemente, nenhuma das substâncias sendo ativas contra fatores celulares é conhecida ter sido desenvolvida para um agente terapêutico para doenças de vírus. Por outro lado, a inibição de outras cinases, por exemplo, a inibição da JNK cinase do curso de transmissão de sinal de MEKK/SEK/JNK, pode aumentar a multiplicação do vírus. Ainda é conhecido que a ativação

aumentada de novamente outras cinases, por exemplo, a proteína cinase C (PKC), inibe a replicação de vírus (Driedger e Quick, WO 92/02484).

[007] Com relação aos processos celulares induzidos após uma infecção por vírus, é verificado que um grande número de vírus de DNA e RNA ativa, na célula hospedeiro infectada, um curso de transdução de sinal definido, a chamada cascata de Raf/MEK/ERK cinase.

[008] Esta cascata de cinase pertence aos cursos de sinalização mais importantes na célula e desempenha um papel essencial em processos de proliferação e diferenciação.

[009] Sinais induzidos por fator de crescimento são transferidos através de fosforilação sucessiva da serina/treonina Raf cinase para a MEK cinase dupla-específica (MAP cinase cinase/ERK cinase) e finalmente para a ERK cinase (cinase regulada por sinal extracelular). Visto que como um substrato de cinase de Raf apenas MEK é conhecida, e as outras isoformas de ERK foram identificadas para MEK como o único substrato, ERK pode fosforilar um bom número de substratos. A eles pertence, por exemplo, a fosforilação de fatores de transcrição, que leva a uma modificação direta da expressão do gene celular.

[0010] A investigação deste curso de sinalização em processo de decisão celular levou à identificação de vários inibidores farmacológicos, que inibem o curso de sinalização, dentre outras posições, no nível de MEK, isto é, no "gargalo da garrafa" da cascata.

[0011] O inibidor de MEK PD98059 inibe a ativação de MEK pela Raf cinase.

[0012] O inibidor de MEK PD184352 foi descrito (2-(2-cloro-4-iodo-fenilamino)-N-ciclopropilmetoxi)-3,4-difluor-benzamida), com o qual administração oral no modelo de camundongo poderia eficientemente inibir o crescimento de carcinoma de cólon.

[0013] O inibidor de MEK AZD6244 (Selumetinibe) é um fármaco sendo investigado para o tratamento de vários tipos de câncer, por exemplo, câncer de pulmão de célula não pequena (NSCLC).

[0014] AZD8330 é um inibidor de MEK seletivo, oralmente ativo, com uma  $IC_{50}$  de 7 nM. AZD8330 tem atividade antineoplástica potencial. AZD8330 inibe especificamente proteína cinase cinase 1 ativada por mitógeno (MEK ou MAP/ERK cinase 1), resultando em inibição de sinalização de célula mediada por fator de crescimento e proliferação de célula de tumor.

[0015] O inibidor de MEK RDEA-119 (BAY-869766) foi mostrado ser um inibidor alostérico de MEK1/2 seletivo, potente, para o tratamento de câncer.

[0016] O inibidor de MEK GSK-1120212 (Trametinibe) é um inibidor alostérico potente e seletivo das enzimas MEK1 e MEK2 (MEK1/2) com atividade antitumor promissora em um teste clínico fase I (ASCO 2010).

[0017] TAK-733 é um inibidor de sítio alostérico de MEK não competitivo com ATP, seletivo, potente, com uma  $IC_{50}$  de 3,2 nM.

[0018] O inibidor de MEK RO5126766 é um inibidor de proteína cinase específico para as proteínas cinases ativadas por mitógeno (MAPKs) (*Mitogen-Activated Protein Kinases*) Raf e MEK com atividade antineoplástica potencial. O inibidor de cinase dupla Raf/MEK RO5126766 inibe especificamente as atividades de cinase de Raf e MEK, resultando na inibição de transcrição de gene alvo que promove transformação maligna de células.

[0019] O inibidor de MEK AS703026 é um inibidor alostérico novo, altamente seletivo e potente de MEK1/2 que está atualmente sob teste clínico de Fase II para leucemia mieloide aguda.

[0020] O inibidor de MEK PLX-4032 (Zelboraf<sup>®</sup> (Vemurafenibe)) é comercializado para o tratamento de melanoma de estágio final.

[0021] Os inibidores de MEK CI-1040, PD0325901, AZD6244,

GDC-0973, RDEA119, GSK1120212, AZD8330, RO5126766, RO4987655, TAK-733 e AS703026 são conhecidos na técnica e, por exemplo, descritos na Tabela 1 e mostrados na Figura 4 de Fremin e Meloche (2010), *J. Hematol. Oncol.* 11; 3:8.

[0022] Neuraminidase (também conhecida como sialidase, acilneuraminil hidrolase e EC 3.2.1.18) é uma enzima comum dentre animais e vários micro-organismos. Ela é uma glicoidrolase que cliva ácidos siálicos alfa-cetosidicamente ligados terminais de glicoproteínas, glicolípídeos e oligossacarídeos. Muitos dos micro-organismos contendo neuraminidase são patogênicos para o homem e outros animais incluindo galinhas, cavalos, suíno e focas. Esses organismos patogênicos incluem vírus influenza.

[0023] A neuraminidase está implicada na patogenicidade do vírus influenza. Ela é pensada ajudar na eluição de virions recém-sintetizados de células infectadas e auxiliar no movimento do vírus (através de sua atividade de hidrolase) através do muco do trato respiratório.

[0024] Uma classe de agentes anti-influenza específicos, os inibidores de neuraminidase, demonstrou inibição de ambos os vírus influenza A e B. Oseltamivir é usado para o tratamento de infecções virais, no entanto, ele não trata congestão nasal. Oseltamivir é o profármaco de éster de etila do análogo de ácido siálico de estado de transição carbocíclico RO 64-0802 (GS4071), um inibidor potente e seletivo de neuraminidase de vírus influenza A e B. Oseltamivir oral foi aprovado para o tratamento de influenza aguda nos Estados Unidos em 1999. Ele demonstrou eficácia ambos no tratamento e prevenção de doença influenza.

[0025] Fosfato de oseltamivir é um profármaco de carboxilato de oseltamivir (oseltamivir), um inibidor da glicoproteína neuraminidase essencial para replicação de vírus influenza A e B. Oseltamivir está disponível da Roche Pharma.TM. AG (Suíça). Alternativamente,

oseltamivir pode ser preparado de acordo com os métodos descritos na Patente U.S. No. 5.763.482 para Bischofberger e outros e Patente U.S. No. 5.866.601 para Lew e outros. Cerca de 10-15% de pacientes tomando oseltamivir têm náusea e vômito. Pacientes com disfunção renal devem tomar doses menores.

[0026] Zanamivir (Relenza) é um pó oralmente inalado atualmente aprovado em 19 países para o tratamento de, e em dois para a profilaxia de, influenzas A e B. Zanamivir é um inibidor competitivo da glicoproteína neuraminidase, que é essencial no ciclo infectivo de vírus influenza. Ele imita muito o ácido siálico, o substrato natural da neuraminidase. De alguns anos para cá, vários eventos resultaram em mudanças na informação de prescrição de zanamivir que agora contém novos avisos de bromoespasma, dispneia, erupção cutânea, urticária e reações do tipo alérgica, incluindo edemas facial e orofaríngeo.

[0027] Peramivir é um inibidor de neuraminidase, agindo como um inibidor análogo de estado de transição de neuraminidase de influenza e então prevenindo que novos vírus surjam de células infectadas.

[0028] É agora conhecido que inibidores de neuraminidase não são eficazes para todos os vírus influenza e uma resistência pode ser desenvolvida pela nova geração de linhagem de vírus influenza.

[0029] Em vista da técnica anterior, está claro que há a necessidade de compostos e composições eficazes no tratamento de doenças por vírus, em particular em doenças causadas pelo vírus influenza.

#### DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

[0030] Esta necessidade é obviada pelo uso de compostos inibidores de MEK da invenção ou sua combinação com um ou mais tais como um, dois, três, etc, inibidores de neuraminidase.

[0031] Quando usado aqui, um "inibidor de MEK" pode ser também chamado um inibidor de cinase Proteína Cinase Ativada por Mitógeno (MAPK). É conhecido que em um curso de MAPK, uma MAPK cinase

cinase (MAPKKK) ativa uma MAPK cinase (MAPKK) que por sua vez ativa uma MAPK que transduz um sinal para, por exemplo, um fator de transcrição ou outras cinases ou proteína efetora/de transdução de sinal; vide, por exemplo, Figura 1 de Fremin e Meloche, mencionados acima. Inibidores de MEK da invenção preferivelmente inibem MEK1/2 de um indivíduo, tal como um mamífero ou ave conforme aqui descrito. No entanto, pode ser que um inibidor de MEK da invenção não apenas iniba uma MEK, preferivelmente MEK1/2, mas também sua cinase a montante (isto é, MAPKKK), desta maneira exercendo uma inibição dupla. Sem ser limitado pela teoria, PLX-4032 pode ser tal inibidor duplo. Desta maneira, um inibidor de MEK da invenção pode em um aspecto preferido ser um inibidor duplo, desta maneira inibindo uma MEK, preferivelmente MEK1/2 e a MAPKKK a montante correspondente. MEK1/2 é a MAPKK no curso Ras/Raf, de maneira que Ras/Raf age como uma MAPKKK e ERK1/2 age como MAPK.

[0032] Quando usado aqui, o termo "inibidor de MEK" inclui um inibidor de MEK, tal como um dos inibidores de MEK conforme aqui revelado, mas um ou mais inibidores de MEK, tais como dois, três, quatro, cinco ou mais inibidores de MEK, por exemplo, selecionados dos inibidores de MEK revelados aqui.

[0033] Um inibidor de neuraminidase é um fármaco antiviral direcionado ao vírus influenza, que funciona bloqueando a função da proteína neuraminidase viral, desta maneira prevenindo que o vírus se ligue a uma célula que ele pretende infectar e/ou prevenir que o vírus se reproduza brotando da célula hospedeiro, uma vez que os vírus recém-produzidos não podem brotar da célula onde eles replicaram. Inibidores de neuraminidase preferidos são oseltamivir, zanamivir, peramivir ou um sal farmacologicamente aceitável de qualquer uma dessas substâncias, tais como fosfato de oseltamivir, carboxilato de oseltamivir, etc.

## SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[0034] A presente invenção pode ser sumarizada pelos itens que seguem:

[0035] 1. Um método para a profilaxia e/ou tratamento de uma doença viral compreendendo administrar um inibidor de MEK ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo a um paciente com necessidade do mesmo.

[0036] 2. O método de acordo com o item 1, onde a doença viral é uma infecção causada por um vírus de filamento de RNA negativo.

[0037] 3. O método de acordo com o item 2, onde o vírus é vírus influenza.

[0038] 4. O método de acordo com o item 1 ou 2 ou 3, onde o inibidor de MEK é selecionado dos grupos: PLX-4032, AZD6244, AZD8330, AS-703026, GSK-1120212, RDEA-119, RO-5126766, RO-4987655, CI-1040, PD-0325901, GDC-0973, TAK-733, PD98059 e PD184352 ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo.

[0039] 5. O método de acordo com qualquer um dos itens anteriores, onde o inibidor de MEK ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo é administrado em combinação com um inibidor de neuraminidase ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo.

[0040] 6. O método de acordo com o item 5, onde o inibidor de MEK ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo é administrado contemporaneamente, previamente ou subsequentemente ao inibidor de neuraminidase ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo.

[0041] 7. O método de acordo com o item 5 ou 6, onde o inibidor de neuraminidase é selecionado de oseltamivir, fosfato de oseltamivir, zanamivir ou peramivir ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo.

[0042] 8. Uma composição farmacêutica compreendendo um inibidor de MEK ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo e um inibidor de neuraminidase ou um sal farmacologicamente aceitável do

mesmo.

[0043] 9. Uma composição farmacêutica compreendendo um inibidor de MEK e um inibidor de neuraminidase ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo para uso como um medicamento.

[0044] 10. A composição farmacêutica do item 8 ou 9, onde o inibidor de MEK é selecionado de PLX-4032, AZD6244, AZD8330, AS-703026, GSK-1120212, RDEA-119, RO-5126766, RO-4987655, CI-1040, PD-0325901, GDC-0973, TAK-733, PD98059 e PD184352 ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo.

[0045] 11. A composição farmacêutica do item 8 ou 9 ou 10, onde o inibidor de neuraminidase é selecionado de oseltamivir, fosfato de oseltamivir, zanamivir ou peramivir.

[0046] 12. A composição farmacêutica conforme definido no item 8 ou 10 ou 11 para uso na profilaxia e/ou tratamento de uma doença viral.

[0047] 13. Um composto inibidor de MEK para uso na profilaxia e/ou tratamento de uma doença viral.

[0048] 14. Um composto selecionado de PLX-4032, AZD6244, AZD8330, AS-703026, GSK-1120212, RDEA-119, RO-5126766, RO-4987655, CI-1040, PD-0325901, GDC-0973, TAK-733, PD98059 e PD184352 ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo para uso na profilaxia e/ou tratamento de uma doença viral.

[0049] 15. O composto para uso de acordo com o item 14 selecionado de PLX-4032, AZD6244, AZD8330, GDC-0973, RDEA119, GSK1120212, RO51267766, RO4987655, TAK-733 e AS703026 ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo.

[0050] 16. O composto para uso de acordo com o item 14 ou 15, onde a doença viral é uma infecção causada por vírus de filamento de RNA negativo.

[0051] 17. O composto para uso de acordo com o item 16, onde o

vírus é um vírus influenza.

[0052] 18. O composto para uso de acordo com o item 13 ou 14 ou 15 ou 16 ou 17, onde o composto é administrado em combinação com um inibidor de neuraminidase ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo.

[0053] 19. O composto para uso de acordo com o item 18, onde o inibidor de neuraminidase é selecionado de oseltamivir, fosfato de oseltamivir, zanamivir ou peramivir.

[0054] 20. Um inibidor de MEK ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo para uso em um método para a profilaxia e/ou tratamento de uma doença viral, onde o dito inibidor de MEK é selecionado do grupo consistindo em PLX-4032, AZD6244, AZD8330, AS-703026, GSK-1120212, RDEA-119, RO-5126766, RO-4987655, CI-1040, PD-0325901, GDC-0973, TAK-733, PD98059 e PD184352 ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo.

[0055] 21. O inibidor de MEK ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo para uso de acordo com a reivindicação 20, onde a doença viral é uma infecção causada por um vírus de filamento de RNA negativo.

[0056] 22. O inibidor de MEK ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo para o uso de acordo com a reivindicação 21, onde o vírus é vírus influenza.

[0057] 23. O inibidor de MEK ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo para uso de acordo com a reivindicação 22, onde o vírus influenza é vírus influenza A ou vírus influenza B.

[0058] 24. O inibidor de MEK ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo para uso de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, onde o inibidor de MEK ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo é administrado em combinação com um inibidor de neuraminidase ou um sal farmacologicamente

aceitável do mesmo.

[0059] 25. O inibidor de MEK ou um sal farmacêuticamente aceitável do mesmo para o uso de acordo com a reivindicação 24, onde o inibidor de MEK ou um sal farmacêuticamente aceitável do mesmo é administrado contemporaneamente, previamente ou subsequentemente ao inibidor de neuraminidase ou um sal farmacêuticamente aceitável do mesmo.

[0060] 26. O inibidor de MEK ou um sal farmacêuticamente aceitável do mesmo para uso de acordo com a reivindicação 24 ou 25, onde o inibidor de neuraminidase é selecionado de oseltamivir, fosfato de oseltamivir, zanamivir ou peramivir ou um sal farmacêuticamente aceitável do mesmo.

[0061] 27. Uma composição farmacêutica compreendendo um inibidor de MEK ou um sal farmacêuticamente aceitável do mesmo e um inibidor de neuraminidase ou um sal farmacêuticamente aceitável do mesmo.

[0062] 28. Uma composição farmacêutica compreendendo um inibidor de MEK e um inibidor de neuraminidase ou um sal farmacêuticamente aceitável do mesmo para uso como um medicamento.

[0063] 29. A composição farmacêutica da reivindicação 27 ou 28, onde o inibidor de MEK é selecionado de PLX-4032, AZD6244, AZD8330, AS-703026, GSK-1120212, RDEA-119, RO-5126766, RO-4987655, CI-1040, PD-0325901, GDC-0973, TAK-733, PD98059 e PD184352 ou um sal farmacêuticamente aceitável do mesmo.

[0064] 30. A composição farmacêutica da reivindicação 27, 28 ou 29, onde o inibidor de neuraminidase é selecionado de oseltamivir, fosfato de oseltamivir, zanamivir ou peramivir.

[0065] 31. A composição farmacêutica conforme definido em qualquer uma das reivindicações 27 a 30 para uso na profilaxia e/ou

tratamento de uma doença viral.

### MÉTODO DE TRATAMENTO

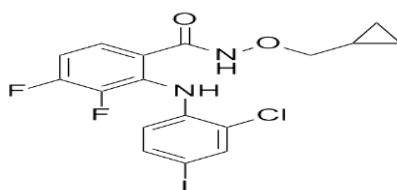
[0066] A invenção é baseada no objetivo de provisão de substâncias para aplicação na prevenção ou terapia de doenças virais, em particular prevenção e/ou terapia contra vírus de RNA de filamento negativo de replicação intracelular e/ou intranuclear, tais substâncias não sendo imediatamente direcionadas contra funções dos vírus, mas seletivamente inibindo uma enzima celular, e inibindo via este efeito seletivo a replicação viral de vírus.

[0067] Surpreendentemente, foi constatado que este objetivo pode ser atingido através de um inibidor de cascata de cinase de acordo com a invenção ou em particular por fármacos contendo um composto inibidor de MEK.

[0068] Desta maneira, em um aspecto, a presente invenção provê um método para a profilaxia e/ou tratamento de uma doença viral compreendendo administrar um inibidor de MEK a um paciente com necessidade do mesmo.

[0069] Em um aspecto, o método da invenção é para a profilaxia e/ou tratamento de uma doença viral que é uma infecção causada por vírus de filamento de RNA negativo. Mais preferivelmente, a doença viral é causada por um vírus influenza, ainda mais preferivelmente é causada por vírus influenza A ou B. Vírus influenza são, por exemplo, H1N1, H5N1, H7N7, H7N9.

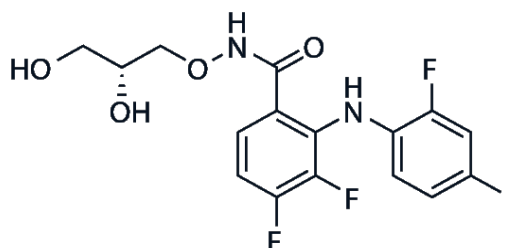
[0070] Os inibidores de MEK da invenção são selecionados preferivelmente de PLX-4032, AZD6244, AZD8330, AS-703026, GSK-1120212, RDEA-119, RO-5126766, RO-4987655, CI-1040, PD-0325901, GDC-0973, TAK-733, PD98059 e PD184352.



## Fórmula Estrutural I

CI-1040

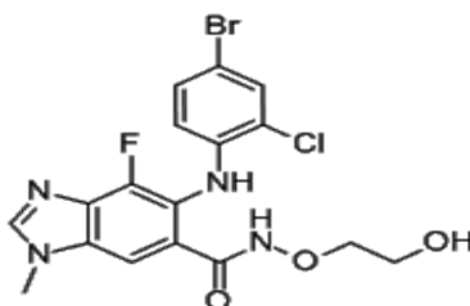
2-(2-cloro-4-iodofenilamino)-N-ciclopropilmetoxi)-3,4-difluorbenzamida



## Fórmula Estrutural II

PD0325901

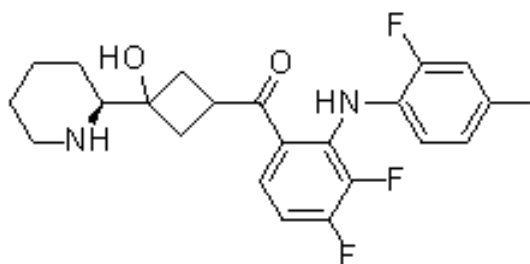
(R)-N-(2,3-diidroxiopropoxi)-3,4-difluor-2-(2-fluor-4-iodo-fenilamino)-benzamida



## Fórmula Estrutural III

AZD6244

6-(4-bromo-2-clorofenilamino)-7-fluor-N-(2-hidroxietoxi)-3-metil-3H-benzo[d]imidazol-5-carboxamida

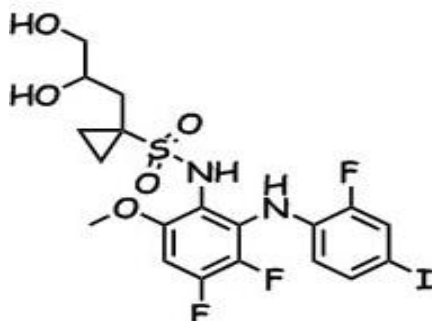


## Fórmula Estrutural IV

GDC-0973

[3,4-difluor-2-[(2-fluor-4-iodofenil)amino]fenil]

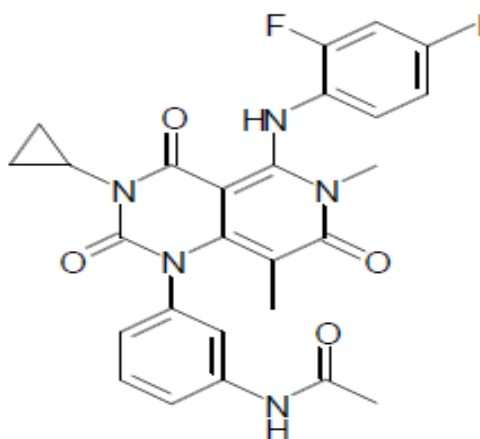
[3-hidroxi-3-[(2S)-2-piperidinil]-1-azetidini]metanona



Fórmula Estrutural V

RDEA-119

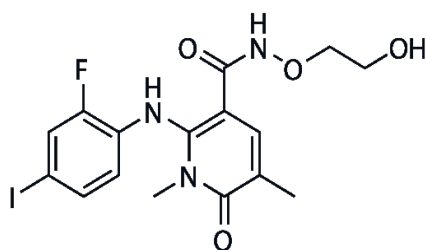
(S)-N-(3,4-difluor-2-(2-fluor-4-iodofenil-amino)-6-metoxifenil)-1-(2,3-diidroxipropil)ciclopropano-1-sulfonamida



Fórmula Estrutural VI

GSK-1120212

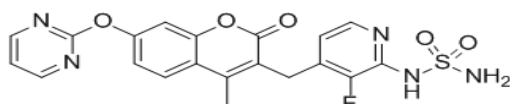
N-(3-(3-ciclopropil-5-(2-fluor-4-iodofenilamino)-6,8-dimetil-2,4,7-trioxo-3,4,6,7-tetraidropirido[4,3-d]pirimidin-1(2H)-il)fenil)acetamida



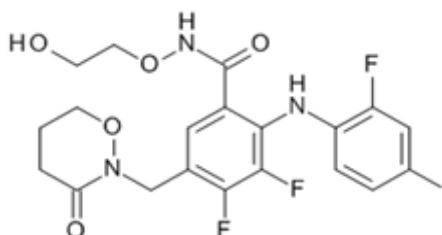
## Fórmula Estrutural VII

AZD8330

2-(2-fluor-4-iodofenilamino)-N-(2-hidroxiétoxi)-1,5-dimetil-6-oxo-1,6-diidropiridino-3-carboxamida

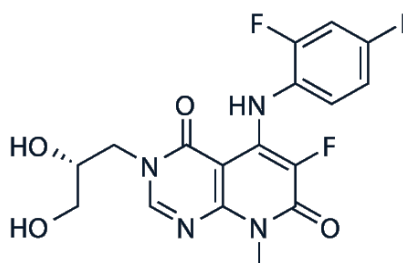


## Fórmula Estrutural VIII

C<sub>20</sub>H<sub>16</sub>FN<sub>5</sub>O<sub>5</sub>S

## Fórmula Estrutural IX

RO4987655

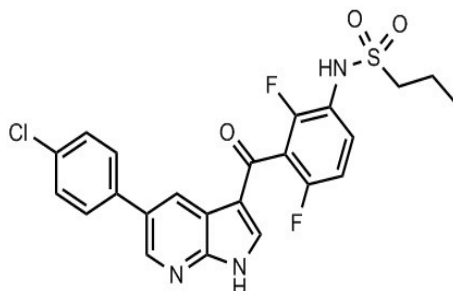
C<sub>20</sub>H<sub>19</sub>F<sub>3</sub>IN<sub>3</sub>O<sub>5</sub>

## Fórmula Estrutural X

TAK-733

(R)-3-(2,3-diidroxipropil)-6-fluor-5-(2-fluor-4-iodofenilamino)-8-

metilpirido[2,3-d]pirimidino-4,7(3H,8H)-diona

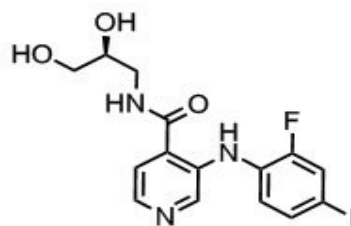


Zelborafe (vemurafenibe)

Fórmula Estrutural XI

PLX-4032

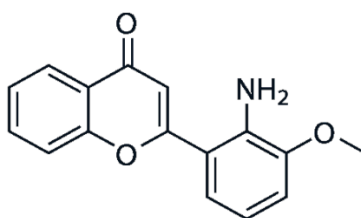
N-[3-[[5-(4-Clorofenil)-1H-pirrol[2,3-b]piridin-3-il]carbonil]-2,4-difluorfenil]-1-propanossulfonamida



Fórmula Estrutural XII

AS703026

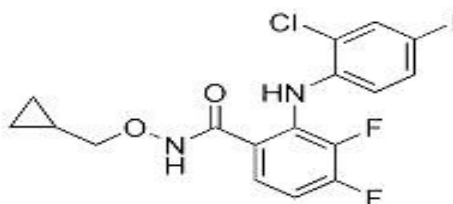
(S)-N-(2,3-diidroxiopropil)-3-(2-fluor-4-iodofenilamino)isonicotinamida



Fórmula Estrutural XIII

PD98059

2-(2-amino-3-metoxifenil)-4H-cromen-4-ona



## Fórmula Estrutural XIV

PD184352

2-(2-cloro-4-iodofenilamino)-N-(ciclopropilmetoxi)-3,4-difluorbenzamida [0071] Mais preferivelmente, eles são selecionados de PLX-4032, AZD6244, AZD8330, GDC-0973, RDEA119, GSK1120212, RO51267766, RO4987655, TAK-733 e AS703026. Com mais preferência ainda, eles são selecionados de AZD6244, AZD8330, GSK1120212 e PLX-4032 ou de PD-0325901, AZD-6244, AZD-8330 e RDEA-119. Esses inibidores de MEK são conhecidos na técnica e, por exemplo, descritos na Tabela 1 de Fremin e Meloche (2010), *J. Hematol. Oncol.* 11;3:8.

[0072] Na verdade, conforme demonstrado nos Exemplos apensos, os inibidores de MEK AS-703026, AZD-6244, AZD-8033, PLX-4032, GSK-1120212, RDEA-119, RO-5126766, CI-1040, PD-0325901 são altamente ativos contra vírus influenza A ou B como agente único. Também, conforme demonstrado nos Exemplos apensos, os inibidores de MEK revelados aqui mostram um efeito sinérgico em combinação com um inibidor de neuraminidase, tal como oseltamivir, contra ambos vírus influenza A e/ou vírus influenza B.

[0073] O indivíduo ou paciente da invenção é um mamífero ou uma ave. Exemplos de mamíferos adequados incluem, mas não estão limitados a, um rato, uma vaca, uma cabra, uma ovelha, um porco, um cachorro, um gato, um cavalo, um porquinho-da-índia, um canino, um *hamster*, uma marta, uma foca, uma baleia, um camelo, um chimpanzé, um macaco *rhesus* e um humano. Exemplos de aves adequadas incluem, mas não estão limitados a, um peru, uma galinha, um ganso, um pato, um marreco, um pato-real, um estorninho, um arrabio-do-norte, uma gaivota, um cisne, uma galinha d'angola ou aves aquáticas, para mencionar algumas. Pacientes humanos são uma modalidade particular da presente invenção.

[0074] No método da invenção, o inibidor de MEK pode ser administrado oralmente, intravenosamente, intrapleuralmente, intramuscularmente, topicamente ou via inalação. Preferivelmente, o inibidor de MEK é administrado através de inalação nasal ou oralmente.

[0075] A composição farmacêutica compreendendo o inibidor de MEK pode estar na forma de suspensões ou comprimidos oralmente administráveis; *sprays* nasais, preparações injetáveis estéreis (intravenosamente, intrapleuralmente, intramuscularmente), por exemplo, como suspensões ou supositórios aquosos ou oleaginosos injetáveis estéreis. Quando administradas oralmente como uma suspensão, essas composições são preparadas de acordo com técnicas disponíveis no campo de formulação farmacêutica e podem conter celulose microcristalina para fornecer volume, ácido algínico ou alginato de sódio como um agente de suspensão, metilcelulose como um potencializador de viscosidade e agentes adoçantes/saborizantes conhecidos na técnica. Como comprimidos de liberação imediata, essas composições podem conter celulose microcristalina, fosfato de dicálcio, amido, estearato de magnésio e lactose e/ou outros excipientes, ligantes, extensores, desintegrantes, diluentes e lubrificantes conhecidos na técnica. As soluções ou suspensões injetáveis podem ser formuladas de acordo com a técnica conhecida, usando diluentes ou solventes parenteralmente aceitáveis, não tóxicos, adequados, tais como manitol, 1,3-butanodiol, água, solução de Ringer ou solução de cloreto de sódio isotônica, ou agentes de dispersão ou umectantes e suspensão adequados, tais como óleos estéreis, suaves, fixos, incluindo mono- ou diglicerídeos sintéticos, e ácidos graxos, incluído ácido oleico.

[0076] No método da invenção, o inibidor de MEK é administrado em uma quantidade terapêuticamente eficaz.

COMPOSTO INIBIDOR DE MEK PARA USO

[0077] Em um aspecto, a presente invenção provê um inibidor de MEK para uso na (um método para) profilaxia e/ou tratamento de uma doença viral.

[0078] Em um aspecto, a presente invenção provê um inibidor de MEK para uso na (um método para) profilaxia e/ou tratamento de uma doença viral compreendendo administrar um inibidor de MEK a um indivíduo ou um paciente com necessidade do mesmo.

[0079] A doença viral é preferivelmente uma infecção causada por um vírus de filamento de RNA negativo. Mais preferivelmente, a doença viral é causada por um vírus influenza, ainda mais preferivelmente a doença viral é causada por vírus influenza A ou B. Vírus influenza são, por exemplo: H1N1, H5N1, H7N7, H7N9.

[0080] Os inibidores de MEK da invenção são selecionados preferivelmente de PLX-4032, AZD6244, AZD8330, AS-703026, GSK-1120212, RDEA-119, RO-5126766, RO-4987655, CI-1040, PD-0325901, GDC-0973, TAK-733, PD98059 e PD184352. Mais preferivelmente são selecionados de AZD6244, GDC-0973, RDEA119, GSK1120212, AZD8330, RO51267766, RO4987655, TAK-733, PLX-4032 e AS703026. Ainda mais preferivelmente eles são selecionados de GSK1120212, AZD6244, PLX-4032 ou de PD-0325901, AZD-6244, AZD-8330 e RDEA-119.

[0081] O inibidor de MEK para uso na presente invenção pode ser administrado oralmente, intravenosamente, intrapleuralmente, intramuscularmente, topicamente ou via inalação. Preferivelmente, o inibidor de MEK é administrado através de inalação nasal ou oralmente.

[0082] O inibidor de MEK para uso é administrado em uma quantidade terapeuticamente eficaz.

[0083] A composição farmacêutica compreendendo o inibidor de MEK para uso pode estar na forma de suspensões ou comprimidos oralmente administrados; *sprays* nasais, preparações injetáveis estéreis

(intravenosamente, intrapleuralmente, intramuscularmente), por exemplo, como suspensões ou supositórios aquosos ou oleaginosos injetáveis estéreis. Quando administradas oralmente como uma suspensão, essas composições são preparadas de acordo com técnicas disponíveis na arte de formulação farmacêutica e podem conter celulose microcristalina para fornecer volume, ácido algínico ou alginato de sódio como um agente de suspensão, metilcelulose como um potencializador de viscosidade e agentes adoçantes/saborizantes conhecidos na técnica. Como comprimidos de liberação imediata, essas composições podem conter celulose microcristalina, fosfato dicálcio, amido, estearato de magnésio e lactose e/ou outros excipientes, ligantes, extensores, desintegrantes, diluentes e lubrificantes conhecidos na técnica. As soluções ou suspensões injetáveis podem ser formuladas como conhecido na técnica, usando diluentes ou solventes parenteralmente aceitáveis, não tóxicos, adequados, tais como manitol, 1,3-butanodiol, água, solução de Ringer ou solução de cloreto de sódio isotônica ou agentes de dispersão ou umectantes e de suspensão adequados, tais como óleos estéreis, suaves, fixos, incluindo mono- ou diglicerídeos sintéticos, e ácidos graxos, incluindo ácido oleico.

#### COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS PARA USO

[0084] Em um aspecto, a presente invenção provê uma composição farmacêutica compreendendo um inibidor de MEK para uso na profilaxia e/ou tratamento de uma doença viral.

[0085] Em um aspecto, a presente invenção provê uma composição farmacêutica compreendendo um inibidor de MEK para uso na profilaxia e/ou tratamento de uma doença viral compreendendo administrar um inibidor de MEK a um paciente com necessidade do mesmo.

[0086] A doença viral é preferivelmente uma infecção causada por vírus de filamento de RNA negativo. Mais preferivelmente, a doença

viral é causada por um vírus influenza, ainda mais preferivelmente a doença viral é causada por vírus influenza A ou B. Vírus influenza são, por exemplo: H1N1, H5N1, H7N7, H7N9.

[0087] Os inibidores de MEK da composição farmacêutica para uso da invenção são selecionados preferivelmente de PLX-4032, AZD6244, AZD8330, AS-703026, GSK-1120212, RDEA-119, RO-5126766, RO-4987655, CI-1040, PD-0325901, GDC-0973, TAK-733, PD98059 e PD184352. Mais Preferivelmente são selecionados de AZD6244, GDC-0973, RDEA119, GSK1120212, AZD8330, RO51267766, RO4987655, TAK-733, PLX-4032 e AS703026. Ainda mais Preferivelmente eles são selecionados de GSK1120212, AZD6244, PLX-4032 ou de PD-0325901, AZD-6244, AZD-8330 e RDEA-119.

[0088] A composição farmacêutica para o uso da invenção e compreendendo um inibidor de MEK é administrada a um paciente que é um mamífero ou uma ave. Exemplos de mamíferos adequados incluem, mas não estão limitados a, um camundongo, um rato, uma vaca, uma cabra, uma ovelha, um porco, um cachorro, um gato, um cavalo, um porquinho-da-índia, um canino, um *hamster*, uma marta, uma foca, uma baleia, um camelo, um chimpanzé, um macaco *rhesus* e um humano, com humano sendo preferido. Exemplos de aves adequadas incluem, mas não estão limitados a, um peru, uma galinha, um ganso, um pato, um marreco, um pato-real, um estorninho, um arrabio-do-norte, uma gaivota, um cisne, uma galinha d'angola ou aves aquáticas, para mencionar algumas. Pacientes humanos são uma modalidade particular da presente invenção.

[0089] A composição farmacêutica pode estar na forma de suspensões ou comprimidos oralmente administrados; *sprays* nasais, preparações injetáveis estéreis (intravenosamente, intrapleuralmente, intramuscularmente), por exemplo, como suspensões ou supositórios aquosos ou oleaginosos injetáveis estéreis. Quando administradas

oralmente como uma suspensão, essas composições são preparadas de acordo com técnicas disponíveis na arte de formulação farmacêutica e podem conter celulose microcristalina para fornecer volume, ácido algínico ou alginato de sódio como um agente de suspensão, metilcelulose como um potencializador de viscosidade e agentes adoçantes/saborizantes conhecidos na técnica. Como comprimidos de liberação imediata, essas composições podem conter celulose microcristalina, fosfato de dicálcio, amido, estearato de magnésio e lactose e/ou outros excipientes, ligantes, extensores, desintegrantes, diluentes e lubrificantes conhecidos na técnica. As soluções ou suspensões injetáveis podem ser formuladas de acordo com a técnica conhecida, usando diluentes ou solventes parenteralmente aceitáveis, não tóxicos, adequados, tais como manitol, 1,3-butanodiol, água, solução de Ringer ou solução de cloreto de sódio isotônica, ou agentes de dispersão ou umectantes e suspensão adequados, tais como óleos estéreis, suaves, fixos, incluindo mono- ou diglicerídeos sintéticos, e ácidos graxos, incluindo ácido oleico. Preferivelmente, os inibidores de MEK são administrados oralmente ou via *spray* nasal.

#### TERAPIA DE COMBINAÇÃO

[0090] Surpreendentemente, os inventores verificaram ainda que a administração combinada de um inibidor de MEK e um inibidor de neuraminidase cria sinergias inesperadas na prevenção e/ou tratamento de doenças virais, em particular a combinação de um inibidor de MEK e um inibidor de neuraminidase leva a um efeito sinérgico na inibição de vírus influenza A e/ou vírus B. Na verdade, conforme aqui mostrado, os inibidores de MEK, CI-1040, GSK-1120212, PD-0325901, AZD-6244, AZD-8330, RDEA-119, PLX-4032 que estão oralmente disponíveis e pelo menos em um teste clínico de fase I, alguns deles estão até mesmo em um teste clínico de fase II ou até mesmo admitidos para comercialização, tal como PLX-4032, contra câncer demonstram

atividade antiviral, contra os vírus influenza A e/ou vírus influenza B, em combinação com um inibidor de neuraminidase, tal como oseltamivir. Tratamento de combinação aumentou a atividade antiviral de oseltamivir significativamente e resultou em um efeito antiviral sinérgico conforme determinado pelo método Chou-Talalay descrito aqui. Juntos, esses resultados demonstram atividade antiviral aumentada de oseltamivir após combinação com inibidores de MEK. Esses dados são promissores para investigações *in vitro* e *in vivo* pré-clínicas adicionais de maneira a desenvolver novos regimes antivirais contra influenza.

[0091] Desta maneira, a presente invenção provê um método para a profilaxia e/ou tratamento de uma doença viral compreendendo administrar um inibidor de MEK em combinação com um inibidor de neuraminidase a um paciente com necessidade do mesmo.

[0092] No método da invenção, um inibidor de MEK e um inibidor de neuraminidase são administrados contemporaneamente, previamente ou subsequentemente. O inibidor de MEK e um inibidor de neuraminidase são preferivelmente administrados contemporaneamente. Eles podem ser administrados como uma formulação única ou em formulações separadas.

[0093] A doença viral a ser prevenida ou ser tratada pela administração combinada de um inibidor de MEK e um inibidor de neuraminidase da invenção é preferivelmente uma infecção causada por vírus de filamento de RNA negativo. Mais preferivelmente, a doença viral é causada por um vírus influenza, ainda mais preferivelmente a doença viral é causada por vírus influenza A ou B. Vírus influenza são, por exemplo: H1N1, H5N1, H7N7, H7N9. Preferivelmente, os vírus não mostram ou desenvolveram resistência contra um inibidor de neuraminidase. Mais preferivelmente, os vírus não mostram ou desenvolveram resistência contra um inibidor de neuraminidase selecionado de carboxilato de oseltamivir (oseltamivir), fosfato de

oseltamivir ou zanamivir ou peramivir, preferivelmente carboxilato de oseltamivir ou fosfato de oseltamivir.

[0094] Os inibidores de MEK da invenção a serem usados em combinação com um inibidor de neuraminidase são selecionados preferivelmente de PLX-4032, AZD6244, AZD8330, AS-703026, GSK-1120212, RDEA-119, RO-5126766, RO-4987655, CI-1040, PD-0325901, GDC-0973, TAK-733, PD98059 e PD184352. Mais Preferivelmente são selecionados de AZD6244, GDC-0973, RDEA119, GSK1120212, AZD8330, RO51267766, RO4987655, TAK-733, PLX-4032 e AS703026. Ainda mais preferivelmente eles são selecionados de GSK1120212, AZD6244, PLX-4032 ou de PD-0325901, AZD-6244, AZD-8330 e RDEA-119.

[0095] O inibidor de neuraminidase é preferivelmente selecionado de carboxilato de oseltamivir (oseltamivir), fosfato de oseltamivir ou zanamivir ou peramivir, preferivelmente carboxilato de oseltamivir ou fosfato de oseltamivir.

[0096] No método da invenção, onde o inibidor de MEK e o inibidor de neuraminidase são usados em combinação, o paciente é um mamífero ou uma ave. Exemplos de mamíferos adequados incluem, mas não estão limitados a, um camundongo, um rato, uma vaca, uma cabra, uma ovelha, um porco, um cachorro, um gato, um cavalo, um porquinho-da-índia, um canino, um *hamster*, uma marta, uma foca, uma baleia, um camelo, um chimpanzé, um macaco *rhesus* e um humano. Exemplos de aves adequadas incluem, mas não estão limitados a, um peru, uma galinha, um ganso, um pato, um marreco, um pato-real, um estorninho, um arrabio-do-norte, uma gaivota, um cisne, uma galinha d'angola ou aves aquáticas, para mencionar algumas. Pacientes humanos são uma modalidade particular da presente invenção. Um paciente humano é uma modalidade particular da presente invenção.

[0097] Desta maneira, a presente invenção provê um método para

a profilaxia e/ou tratamento de uma doença viral compreendendo administrar um inibidor de MEK em combinação com oseltamivir ou fosfato de oseltamivir a um paciente com necessidade do mesmo.

[0098] Desta maneira, a presente invenção provê um método para a profilaxia e/ou tratamento de uma doença viral compreendendo administrar um inibidor de MEK em combinação com zanamivir a um paciente com necessidade do mesmo.

[0099] Desta maneira, a presente invenção provê um método para a profilaxia e/ou tratamento de uma doença viral compreendendo administrar um inibidor de MEK em combinação com peramivir a um paciente com necessidade do mesmo.

[00100] Uma combinação de acordo com a invenção é CI-1040 ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo e oseltamivir, preferivelmente fosfato de oseltamivir.

[00101] Uma combinação de acordo com a invenção é PD0325901 ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo e oseltamivir, preferivelmente fosfato de oseltamivir

[00102] Uma combinação de acordo com a invenção é GSK-1120212 e oseltamivir, preferivelmente fosfato de oseltamivir.

[00103] Uma combinação de acordo com a invenção é RO5126766 ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo e oseltamivir, preferivelmente fosfato de oseltamivir.

[00104] Uma combinação de acordo com a invenção é PLX-4032 ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo e oseltamivir, preferivelmente fosfato de oseltamivir.

[00105] Uma combinação de acordo com a invenção é AZD6244 ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo e oseltamivir, preferivelmente fosfato de oseltamivir.

[00106] Uma combinação de acordo com a invenção é GDC-0973 ou sal farmacologicamente aceitável do mesmo e oseltamivir,

preferivelmente fosfato de oseltamivir.

[00107] Uma combinação de acordo com a invenção é RDEA119 ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo e oseltamivir, preferivelmente fosfato de oseltamivir.

[00108] Uma combinação de acordo com a invenção é AZD8330 ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo e oseltamivir, preferivelmente fosfato de oseltamivir.

[00109] Uma combinação de acordo com a invenção é RO4987655 ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo e oseltamivir, preferivelmente fosfato de oseltamivir.

[00110] Uma combinação de acordo com a invenção é TAK-733 ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo e oseltamivir, preferivelmente fosfato de oseltamivir.

[00111] Uma combinação de acordo com a invenção é AS703026 ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo e oseltamivir, preferivelmente fosfato de oseltamivir.

[00112] Uma combinação de acordo com a invenção é PD98059 ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo e oseltamivir, preferivelmente fosfato de oseltamivir.

[00113] Uma combinação de acordo com a invenção é PD184352 ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo e oseltamivir, preferivelmente fosfato de oseltamivir.

[00114] Uma combinação de acordo com a invenção é CI-1040 ou sal farmacologicamente aceitável do mesmo e zanamivir ou sal farmacologicamente aceitável do mesmo.

[00115] Uma combinação de acordo com a invenção é PD0325901 ou sal farmacologicamente aceitável do mesmo e zanamivir ou sal farmacologicamente aceitável do mesmo.

[00116] Uma combinação de acordo com a invenção é GSK-1120212 ou sal farmacologicamente aceitável do mesmo e zanamivir ou

sal farmaceuticamente aceitável do mesmo.

[00117] Uma combinação de acordo com a invenção é RO5126766 ou sal farmaceuticamente aceitável do mesmo e zanamivir ou sal farmaceuticamente aceitável do mesmo.

[00118] Uma combinação de acordo com a invenção é PLX-4032 ou sal farmaceuticamente aceitável do mesmo e zanamivir ou sal farmaceuticamente aceitável do mesmo.

[00119] Uma combinação de acordo com a invenção é AZD6244 ou sal farmaceuticamente aceitável do mesmo e zanamivir ou sal farmaceuticamente aceitável do mesmo.

[00120] Uma combinação de acordo com a invenção é GDC-0973 ou sal farmaceuticamente aceitável do mesmo e zanamivir ou sal farmaceuticamente aceitável do mesmo.

[00121] Uma combinação de acordo com a invenção é RDEA119 ou sal farmaceuticamente aceitável do mesmo e zanamivir ou sal farmaceuticamente aceitável do mesmo.

[00122] Uma combinação de acordo com a invenção é AZD8330 e zanamivir ou sal farmaceuticamente aceitável do mesmo.

[00123] Uma combinação de acordo com a invenção é RO4987655 ou sal farmaceuticamente aceitável do mesmo zanamivir ou sal farmaceuticamente aceitável do mesmo.

[00124] Uma combinação de acordo com a invenção é TAK-733 e zanamivir ou sal farmaceuticamente aceitável do mesmo.

[00125] Uma combinação de acordo com a invenção é AS703026 ou sal farmaceuticamente aceitável do mesmo e zanamivir ou sal farmaceuticamente aceitável do mesmo.

[00126] Uma combinação de acordo com a invenção é PD98059 ou sal farmaceuticamente aceitável do mesmo e zanamivir ou sal farmaceuticamente aceitável do mesmo.

[00127] Uma combinação de acordo com a invenção é PD184352 ou

sal farmaceuticamente aceitável do mesmo e zanamivir ou sal farmaceuticamente aceitável do mesmo.

[00128] Uma combinação de acordo com a invenção é CI-1040 ou sal farmaceuticamente aceitável do mesmo e peramivir ou sal farmaceuticamente aceitável do mesmo.

[00129] Uma combinação de acordo com a invenção é PD0325901 ou sal farmaceuticamente aceitável do mesmo e peramivir ou sal farmaceuticamente aceitável do mesmo.

[00130] Uma combinação de acordo com a invenção é GSK-1120212 ou sal farmaceuticamente aceitável do mesmo e peramivir ou sal farmaceuticamente aceitável do mesmo.

[00131] Uma combinação de acordo com a invenção é RO5126766 ou sal farmaceuticamente aceitável do mesmo e peramivir ou sal farmaceuticamente aceitável do mesmo.

[00132] Uma combinação de acordo com a invenção é PLX-4032 ou sal farmaceuticamente aceitável do mesmo e peramivir ou sal farmaceuticamente aceitável do mesmo.

[00133] Uma combinação de acordo com a invenção é AZD6244 ou sal farmaceuticamente aceitável do mesmo e peramivir ou sal farmaceuticamente aceitável do mesmo.

[00134] Uma combinação de acordo com a invenção é GDC-0973 ou sal farmaceuticamente aceitável do mesmo e peramivir ou sal farmaceuticamente aceitável do mesmo.

[00135] Uma combinação de acordo com a invenção é RDEA119 ou sal farmaceuticamente aceitável do mesmo e peramivir ou sal farmaceuticamente aceitável do mesmo.

[00136] Uma combinação de acordo com a invenção é AZD8330 ou sal farmaceuticamente aceitável do mesmo e peramivir ou sal farmaceuticamente aceitável do mesmo.

[00137] Uma combinação de acordo com a invenção é RO4987655

ou sal farmaceuticamente aceitável do mesmo e peramivir ou sal farmaceuticamente aceitável do mesmo.

[00138] Uma combinação de acordo com a invenção é TAK-733 ou sal farmaceuticamente aceitável do mesmo e peramivir ou sal farmaceuticamente aceitável do mesmo.

[00139] Uma combinação de acordo com a invenção é AS703026 ou sal farmaceuticamente aceitável do mesmo e peramivir ou sal farmaceuticamente aceitável do mesmo.

[00140] Uma combinação de acordo com a invenção é PD98059 ou sal farmaceuticamente aceitável do mesmo e peramivir ou sal farmaceuticamente aceitável do mesmo.

[00141] Uma combinação de acordo com a invenção é PD184352 ou sal farmaceuticamente aceitável do mesmo e peramivir ou sal farmaceuticamente aceitável do mesmo.

[00142] O inibidor de MEK da presente invenção pode ser administrado oralmente, intravenosamente, intrapleuralmente, intramuscularmente, topicamente ou via inalação. Preferivelmente, o inibidor de MEK é administrado através de inalação ou oralmente.

[00143] O inibidor de neuraminidase da presente invenção pode ser administrado oralmente, intravenosamente, intrapleuralmente, intramuscularmente, topicamente ou através de inalação. Preferivelmente, o inibidor de neuramidase é administrado através de inalação ou oralmente.

[00144] Quando o inibidor de MEK e o inibidor de neuraminidase estão em uma formulação única, a formulação pode ser administrada oralmente, intravenosamente, intrapleuralmente, intramuscularmente, topicamente ou através de inalação. Preferivelmente, a formulação é administrada oralmente ou através de inalação.

[00145] Desta maneira, a presente invenção provê um método de tratamento de doença viral, em particular doença viral onde a infecção

é causada por um vírus de filamento de RNA negativo, mais em particular uma doença onde o vírus é o vírus influenza A ou B por uma terapia de combinação. Em uma modalidade preferida da invenção, o vírus não mostra ou desenvolveu resistência a um inibidor de neuraminidase.

[00146] O método compreende tratamento de um paciente com necessidade de tratamento com uma quantidade terapeuticamente eficaz de um inibidor de MEK ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo; e simultaneamente ou sequencialmente um inibidor de neuraminidase conforme descrito abaixo.

[00147] Em um aspecto, um método de tratamento de doenças virais em um paciente é provido, o qual compreende (1) administrar a um paciente com necessidade de tratamento uma quantidade terapeuticamente eficaz de um composto que é um inibidor de MEK ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo; e simultaneamente ou sequencialmente (2) administração ao dito paciente de uma quantidade terapeuticamente eficaz de oseltamivir e fosfato de oseltamivir. Em outras palavras, de acordo com o presente aspecto, o método compreende administrar uma quantidade terapeuticamente eficaz de um inibidor de MEK ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo a um paciente que está sob tratamento de oseltamivir ou fosfato de oseltamivir ou administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz de oseltamivir ou fosfato de oseltamivir a um paciente que está sob tratamento com um inibidor de MEK ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo. Preferivelmente o inibidor de MEK é selecionado de PLX-4032, AZD6244, AZD8330, AS-703026, GSK-1120212, RDEA-119, RO-5126766, RO-4987655, CI-1040, PD-0325901, GDC-0973, TAK-733, PD98059 e PD184352 ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo para uso em combinação simultânea ou sequencial com um inibidor de neuraminidase tal como oseltamivir ou fosfato de oseltamivir

para tratamento e/ou prevenção de uma doença viral.

[00148] Em um aspecto, um método de tratamento de doenças virais em um paciente é provido, o qual compreende (1) administrar a um paciente com necessidade de tratamento uma quantidade terapêuticamente eficaz de um composto que é um inibidor de MEK ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo; e simultaneamente ou sequencialmente (2) administração ao dito paciente de uma quantidade terapêuticamente eficaz de zanamivir ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo. Em outras palavras, de acordo com este aspecto, o método compreende administrar uma quantidade terapêuticamente eficaz de um inibidor de MEK ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo a um paciente que está sob tratamento de zanamivir ou sal farmacologicamente aceitável do mesmo ou administração de uma quantidade terapêuticamente eficaz de zanamivir ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo a um paciente que está sob tratamento com um inibidor de MEK ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo. Preferivelmente, o inibidor de MEK é selecionado de PLX-4032, AZD6244, AZD8330, AS-703026, GSK-1120212, RDEA-119, RO-5126766, RO-4987655, CI-1040, PD-0325901, GDC-0973, TAK-733, PD98059 e PD184352 ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo para uso em combinação simultânea ou sequencial com um inibidor de neuraminidase tal como zanamivir ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo e/ou prevenção de uma doença viral.

[00149] Em um aspecto, um método de tratamento de doenças virais em um paciente é provido, o qual compreende (1) administrar a um paciente com necessidade de tratamento uma quantidade terapêuticamente eficaz de um composto que é um inibidor de MEK ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo; e simultaneamente ou sequencialmente (2) administração ao dito paciente de uma quantidade

terapeuticamente eficaz de peramivir ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo. Em outras palavras, de acordo com este aspecto, o método compreende administrar uma quantidade terapêuticamente eficaz de um inibidor de MEK ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo a um paciente que está sob tratamento de peramivir ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo ou administração de uma quantidade terapêuticamente eficaz de peramivir ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo a um paciente que está sob tratamento com um inibidor de MEK ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo. Preferivelmente o inibidor de MEK é selecionado de PLX-4032, AZD6244, AZD8330, AS-703026, GSK-1120212, RDEA-119, RO-5126766, RO-4987655, CI-1040, PD-0325901, GDC-0973, TAK-733, PD98059 e PD184352 ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo para uso em combinação simultânea ou sequencial com um inibidor de neuraminidase tal como peramivir ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo para tratamento ou prevenção de uma doença viral.

[00150] Em outra modalidade, a presente invenção provê um inibidor de neuraminidase tal como oseltamivir, fosfato de oseltamivir, zanamivir ou peramivir ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo para uso em combinação com um inibidor de MEK tais como PLX-4032, AZD6244, AZD8330, AS-703026, GSK-1120212, RDEA-119, RO-5126766, RO-4987655, CI-1040, PD-0325901, GDC-0973, TAK-733, PD98059 e PD184352 ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo para tratamento e/ou prevenção de uma doença viral. Preferivelmente, o inibidor de MEK é GSK1120212 ou AZD6244 ou PLX-4032.

[00151] Nos métodos de terapia de combinação da presente invenção, o inibidor de MEK tais como PLX-4032, AZD6244, AZD8330, AS-703026, GSK-1120212, RDEA-119, RO-5126766, RO-4987655, CI-

1040, PD-0325901, GDC-0973, TAK-733, PD98059 e PD184352 e o inibidor de neuraminidase tal como oseltamivir, fosfato de oseltamivir, zanamivir ou peramivir pode ser administrado ao mesmo tempo, ou separadamente de acordo com seus respectivos programas ou regimes de dosagem. Quando administrado mais ou menos ao mesmo tempo, o inibidor de MEK e o inibidor de neuraminidase podem ser administrados na mesma composição farmacêutica ou em formas unitárias de dosagem separadas.

[00152] Por exemplo, em uma modalidade do método de combinação da presente invenção, o composto inibidor de MEK pode ser administrado oralmente ou através de inalação de uma dosagem terapeuticamente eficaz, enquanto o inibidor de neuraminidase pode ser administrado em uma dose e programa de dosagem conforme provido na informação de prescrição aprovada ou menos. Preferivelmente administrado em uma dosagem menor. Por exemplo, de acordo com o rótulo de Tamiflu, Tamiflu é administrado em cápsulas de 30 mg ou 45 mg ou 75 mg. Uma dosagem de 75 mg duas vezes por dia é a dosagem padrão para adultos e adolescentes. Uma dose menor pode ser usada quanto Tamiflu é administrado em combinação com inibidor de MEK.

[00153] Nas terapias de combinação sequenciais discutidas acima, preferivelmente os fármacos em combinação sequencial são administrados de acordo com seus perfis farmacocinéticos de maneira que o segundo fármaco é administrado após o nível no plasma do primeiro fármaco ser substancialmente reduzido ou removido.

[00154] Os perfis farmacocinéticos do inibidor de MEK e dos fármacos inibidores de neuraminidase discutidos acima são geralmente conhecidos na técnica.

[00155] A quantidade terapeuticamente eficaz para cada composto ativo pode variar com fatores incluindo, mas não limitado a, a atividade do composto usado, estabilidade do composto ativo no corpo do

paciente, a severidade das condições a serem aliviadas, o peso total do paciente tratado, a via de administração, a facilidade de absorção, distribuição e excreção do composto ativo pelo corpo, a idade e sensibilidade do paciente a ser tratado, eventos adversos, e similar, como será aparente ao versado na técnica. A quantidade de administração pode ser ajustada conforme os vários fatores mudam com o tempo.

[00156] Os compostos farmacêuticos no método da presente invenção podem ser administrados em quaisquer formas de dosagem unitária. Formulações orais adequadas podem estar na forma de comprimidos, cápsulas, suspensão, xarope, goma de mascar, *wafer*, elixir e similar. Carreadores farmacêuticamente aceitáveis tais como ligantes, excipientes, lubrificantes e agentes adoçantes ou saborizantes podem ser incluídos nas composições farmacêuticas orais. Se desejado, agentes convencionais para modificação de gostos, cores e formatos das formas especiais podem ser também incluídos.

[00157] Para formulações injetáveis, as composições farmacêuticas podem estar em pó liofilizado em mistura com excipientes adequados em um frasco ou tubo adequado. Antes do uso na clínica, os fármacos podem ser reconstituídos dissolvendo o pó liofilizado em um sistema solvente adequado para formar uma composição adequada para injeção intravenosa ou intramuscular.

[00158] De acordo com outro aspecto da presente invenção, uma composição farmacêutica é provida, compreendendo uma quantidade terapeuticamente eficaz de um inibidor de MEK bem como uma quantidade terapeuticamente eficaz de um inibidor de neuraminidase escolhido do grupo de oseltamivir, fosfato de oseltamivir, zanamivir e peramivir.

[00159] Em uma modalidade, a presente invenção pode estar em uma forma oralmente administrável (por exemplo, comprimido ou

cápsula ou xarope, etc) com uma quantidade terapeuticamente eficaz (por exemplo, de a partir de 0,1 mg a 2000 mg, 0,1 mg a 1000 mg, 0,1 a 500 mg, 0,1 a 200 mg, 30 a 300 mg, 0,1 a 75, mg, 0,1 a 30 mg) de inibidor de MEK e uma quantidade terapeuticamente eficaz (por exemplo, de a partir de 0,1 mg a 2000 mg, 0,1 mg a 1000 mg, 0,1 a 500 mg, 0,1 a 200 mg, 30 a 300 mg, 0,1 a 75 mg, 0,1 a 30 mg) de inibidor de neuraminidase conforme acima descrito. Por exemplo, de acordo com o rótulo de Tamiflu, ele é administrado em cápsulas de 30 mg ou 45 mg ou 75 mg. Uma dosagem de 75 mg duas vezes por dia é a dosagem padrão para adultos e adolescentes. Uma dose menor pode ser usada quando Tamiflu é administrado em combinação com um inibidor de MEK.

[00160] De acordo com outro aspecto da presente invenção, um estojo farmacêutico é provido, o qual compreende, em um recipiente compartimentalizado, (1) uma forma de dosagem unitária de um inibidor de MEK tais como PLX-4032, AZD6244, AZD8330, AS-703026, GSK-1120212, RDEA-119, RO-5126766, RO-4987655, CI-1040, PD-0325901, GDC-0973, TAK-733, PD98059 e PD184352 e (2) uma forma de dosagem unitária de um inibidor de neuraminidase tal como oseltamivir, fosfato de oseltamivir, zanamivir ou peramivir. Opcionalmente, o estojo compreende ainda instruções para uso do estojo no método de terapia de combinação de acordo com a presente invenção.

[00161] Foi constatado pelos presentes inventores que o método de combinação da invenção é tal de maneira que provê uma sinergia na prevenção e/ou tratamento de doenças virais, em particular na prevenção e/ou tratamento de uma infecção causada por um vírus de filamento de RNA negativo, mais em particular doença virais causadas por vírus influenza. Ainda mais em particular na prevenção e/ou tratamento de vírus influenza A ou B.

[00162] As combinações da invenção podem ser administradas em uma quantidade sinérgica.

[00163] "Sinergia" ou "efeito sinérgico" pode ser definido como um efeito que é mais do que aditivo (Chou, 2006, *Pharmacolog. Reviews*, 58: 621-681). Interações sinérgicas dentre combinações de fármaco são altamente desejáveis e buscadas uma vez que elas podem resultar em eficácia aumentada, dosagem menor, toxidez colateral reduzida e desenvolvimento minimizado de resistência quando usadas clinicamente (Chou, 2006). Os métodos mais populares para avaliação de interações de fármaco em terapias de combinação são isoblograma e índice de combinação (CI) (Zhao e outros, 2004, *Clinical Cancer Res.* 10:7994-8004). Vários estudos em ambos o campo de terapia de câncer e campo de terapia antiviral, onde combinações de fármaco para combater o desenvolvimento de resistência a fármaco e minimizar doses de fármaco, usam o índice CI para avaliar sinergia. CI é baseado na abordagem de Chou e Talalay 1984 (*Adv. Enzyme Regul.* 22:27-55) e se baseia no princípio de efeito médio e na equação de efeito de fármaco múltiplo. CI pode ser prontamente calculada usando o programa CompuSyn (CompySyn, Paramus, N.J.). O próprio Chou (Chou 2006) define uma interação como levemente sinérgica se o valor de valores CI for 0,85-0,9, moderadamente sinérgica se o valor CI for 0,7-0,85, sinérgica se o valor CI for 0,3-0,7, fortemente sinérgica se o valor CI for 0,1-0,3 e muito fortemente sinérgica se o valor CI for <0,1. Na literatura de terapia de câncer, os valores de CI que definem sinergismo podem variar, por exemplo, em Lin e outros, 2007, *Carcinogenesis* 28: 2521-2529, sinergismo entre dois fármacos foi definido como  $CI < 1$ , e em Fischel e outros, 2006, *Preclinical Report* 17: 807-813, sinergismo foi definido como  $CI < 0,8$ . Números similares são usados no campo de terapia antiviral. Por exemplo, em Wyles e outros, 2008, *Antimicrob. Agents Chemotherapy* 52: 1862-1864, sinergismo foi

definido como  $CI < 0,9$  e em Gantlett e outros, 2007, *Antiviral Res.* 75:188-197, sinergismo foi definido como  $CI < 0,09$ . Com base nessas referências, sinergismo pode ser definido como valores CI de  $\leq 0,9$ . Todos os artigos referidos acima são aqui expressamente incorporados a título de referência em sua totalidade.

[00164] O inibidor de MEK e o inibidor de neuraminidase da invenção podem ter um efeito sinérgico no tratamento de uma doença viral maior do que o efeito aditivo de cada um do inibidor de MEK e do inibidor de neuraminidase administrado separadamente ou em combinação conforme previsto por um efeito aditivo simples dos dois fármacos. Em tal caso, a quantidade sinergisticamente eficaz do inibidor de MEK é menos do que a quantidade necessária para tratar a infecção viral se o inibidor de MEK foi administrado sem o inibidor de neuraminidase. Similarmente, a quantidade sinergisticamente eficaz do inibidor de neuraminidase é menos do que a quantidade necessária para tratar a infecção viral ou se o inibidor de neuraminidase foi administrado sem o inibidor de MEK. A quantidade sinérgica do inibidor de MEK e do inibidor de neuraminidase pode ser definida pelo fator de sinergismo (valor CI). Se definido pelo fator de sinergismo (valor CI) então CI é menos do que cerca de 0,9, alternativamente menos do que cerca de 0,85, alternativamente menos do que cerca de 0,8, alternativamente menos do que cerca de 0,75, alternativamente menos do que cerca de 0,7, alternativamente menos do que cerca de 0,65, alternativamente menos do que cerca de 0,6, alternativamente menos do que cerca de 0,55, alternativamente menos do que cerca de 0,5, alternativamente menos do que cerca de 0,45, alternativamente menos do que cerca de 0,4, alternativamente menos do que cerca de 0,35, alternativamente menos do que cerca de 0,3, alternativamente menos do que cerca de 0,25, alternativamente menos do que cerca de 0,2, alternativamente menos do que cerca de 0,15, alternativamente menos do que cerca de 0,1.

[00165] Preferivelmente, um efeito sinérgico é observado contra um vírus que não mostra ou desenvolveu uma resistência a um inibidor de neuraminidase.

[00166] O uso combinado de um inibidor de MEK e um inibidor de neuraminidase de acordo com a invenção provê um efeito terapêutico benéfico também em caso de doença viral onde o vírus ou linhagem de vírus mostra ou desenvolveu uma resistência, em particular uma resistência a um inibidor de neuraminidase. Ainda, o uso combinado pode agir para preservar a eficácia de ambos os fármacos com o tempo porque o desenvolvimento de resistência não seria observado de modo algum ou seria retardado no tempo.

#### DEFINIÇÕES

[00167] Em todo o presente pedido e nas reivindicações que seguem, a menos que o contexto requeira de outro modo, a palavra "compreendem" e variações tais como "compreende" e "compreendendo" serão entendidos implicar a inclusão de um inteiro declarado ou etapa ou grupo de inteiros ou etapas, mas não a exclusão de qualquer outro inteiro ou etapa ou grupo de inteiro ou etapa. Quando usado aqui o termo "compreendendo" pode ser substituído pelo termo "contendo" ou algumas vezes quando usado aqui pelo termo "tendo".

[00168] Quando usado aqui "consistindo em" exclui qualquer elemento, etapa ou ingrediente não especificado no elemento da reivindicação. Quando aqui usado, "consistindo essencialmente em" não exclui materiais ou etapas que não afetam materialmente as características básicas e novas da reivindicação. Em cada caso aqui qualquer um dos termos "compreendendo", "consistindo essencialmente em" e "consistindo em" pode ser substituído com qualquer um dos dois outros termos.

[00169] Conforme aqui usado, o termo conjuntivo "e/ou" entre elementos mencionados múltiplos é entendido como compreendendo

ambas as opções individual e combinada. Por exemplo, onde dois elementos são unidos por "e/ou", uma primeira opção se refere à aplicabilidade do primeiro elemento sem o segundo. Uma segunda opção se refere à aplicabilidade do segundo elemento sem o primeiro. Uma terceira opção se refere à aplicabilidade dos primeiro e segundo elementos juntos. Qualquer uma dessas opções é compreendida estar dentro do significado, e então satisfaz a necessidade do termo "e/ou" conforme aqui usado. Aplicabilidade concomitante de mais de uma das opções é também compreendida estar dentro do significado, e então satisfaz a necessidade do termo "e/ou" conforme aqui usado.

[00170] Conforme aqui usado o termo doença viral inclui doença causada por um vírus, por exemplo, doenças causadas por vírus de filamento de RNA negativo. Por exemplo, vírus influenza são vírus de filamento de RNA negativo; por exemplo, vírus influenza A e B. O vírus influenza ou linhagem do vírus influenza de acordo com a invenção pode mostrar ou ter desenvolvido uma resistência a um ou mais inibidores de neuraminidase (por exemplo, oseltamivir, fosfato de oseltamivir, zanamivir ou peramivir) ou o vírus influenza ou linhagem do vírus influenza de acordo com a invenção não mostra ou não desenvolveu uma resistência a um ou mais inibidores de neuraminidase (por exemplo, oseltamivir, fosfato de oseltamivir, zanamivir ou peramivir).

[00171] Conforme aqui usado, o termo "sais farmacêuticamente aceitáveis" se refere aos sais orgânicos ou inorgânicos, relativamente não tóxicos, incluindo sais de adição ácidos inorgânicos ou orgânicos do composto.

## FIGURAS

[00172] A Figura 1 mostra a inibição da proliferação de vírus influenza A devido a AS-703026, AZD-6244, PLX-4032, GSL-1120212 RDEA-119 e RO-5126766.

[00173] As Figuras 2a-b mostram a atividade antiviral de Oseltamivir,

CI-1040 e de Oseltamivir + CI-1040 contra vírus influenza.

[00174] As Figuras 3a-c mostram a atividade antiviral de Oseltamivir, PLX-4032 e de Oseltamivir + PLX4032 em razões 1:1 e 1:10 contra vírus influenza.

[00175] As Figuras 4a-b mostram a atividade antiviral de Oseltamivir, GSK-1120212 e de Oseltamivir + GSK-1120212 em razão 1:10 contra vírus influenza.

[00176] As Figuras 5a-c mostram a atividade antiviral de Oseltamivir, AZD-6244 e de Oseltamivir + AZD-6244 em razões 1:10 e 1:100 contra vírus influenza.

[00177] A Figura 6 mostra estudos *in vitro* com o inibidor de MEK CI-1040 contra vírus influenza H5N1.

[00178] A Figura 7 mostra estudos *in vitro* com o inibidor de MEK PD-0325901 contra vírus influenza H5N1.

[00179] A Figura 8 mostra resultados do tratamento oral de camundongos infectados com vírus influenza com CI-1040 ou PD-0325901.

[00180] A Figura 9 mostra estudos *in vitro* com o inibidor de Raf-MEK PLX-4032 contra vírus influenza H1N1pdm09.

[00181] A Figura 10 mostra estudos *in vitro* com o inibidor de MEK AZD-8330 contra vírus influenza H1N1pdm09.

[00182] A Figura 11 mostra estudos *in vitro* com uma combinação de CI-1040 e Oseltamivir contra vírus influenza H1N1pdm09.

[00183] A Figura 12 mostra resultados do tratamento oral de camundongos infectados com vírus influenza com combinação de PLX-4032 e Oseltamivir.

[00184] A Figura 13 mostra estudos *in vitro* com PLX-4032 (Verumafenibe) contra vírus influenza H7N9.

[00185] A Figura 14 mostra o efeito sinérgico de inibição com MEK e neuraminidase contra vírus influenza B.

## EXEMPLOS

### COMPOSTOS ANTIVIRAIS

[00186] Carboxilato de oseltamivir (Oseltamivir) foi obtido da Toronto Research Chemicals, Inc. e dissolvido em PBS estéril. Para estudos *in vitro* os inibidores de MEK CI-1040, PD-0325901, AS-703026, AZD-6244, AZD-8330, PLX-4032, GSL-1120212 RDEA-119 e RO-5126766 foram testados. Cada inibidor de MEK foi dissolvido em uma concentração de estoque de 10 nM em DMSO ou solvente adequado. A partir desta solução uma série de diluição foi preparada para atingir a concentração de inibidor de MEK desejada. Devido ao fato de DMSO afetar a vitalidade da célula apenas 1% de solução de inibidor de MEK /DMSO foi dado ao meio. Inibidores de MEK adicionais, tais como aqueles revelados aqui, podem ser testados da mesma maneira que aqueles aqui referidos, ou sozinhos ou em combinação com um inibidor de neuraminidase, tal como oseltamivir.

### ANÁLISE DE VIABILIDADE CELULAR (CITOTOXIDEZ)

[00187] A fim de determinar se a concentração do inibidor de MEK usado para experimentos afetaria a viabilidade de célula, uma análise de toxidez de composto foi realizada. As células MDCK II foram semeadas em placas de cultura de 96 cavidades em uma densidade de  $8 \times 10^4$  células por cavidade em meio essencial mínimo (MEM) (*Minimal Essential Medium*) contendo soro bovino fetal inativado com calor 10% (FCS) (*Fetal Calf Serum*), 100 U/mL de penicilina, 10 mg/mL de estreptomicina. As células foram incubadas a 37° C com CO<sub>2</sub> 5% de um dia para o outro. Em seguida, as células foram lavadas duas vezes com PBS. MEM contendo concentrações diferentes de inibidor de MEK (0,001-1000 µM) foi adicionado às células. Após adição de inibidor de MEK, as células foram incubadas por mais 48 h a 37° C e CO<sub>2</sub> 5%. Então, as células foram fixadas através de incubação por 30 min a 4° C com 100 µl de paraformaldeído (PFA) 4%. Adição de 100 µl de violeta

crystal por 30 min em temperatura ambiente tingiu as células viáveis. Após tingimento, as placas foram lavadas e secas. Para a extração da violeta cristal das células viáveis 100 µl de metanol 100% foram adicionados a cada cavidade. Após incubação por 30 min em temperatura ambiente, a extinção foi medida com uma leitura de ensaio imunoabsorvente ligado à enzima (ELISA) em OD = 490 nm. A porcentagem de viabilidade celular após tratamento com o composto antiviral foi calculada como segue: Inibição percentual =  $100/[(OD\ 490)\ \text{amostra\ controle\ de\ célula} \times (OD\ 490)\ \text{amostra\ tratada}]$ . O valor de CC<sub>50</sub> (isto é, a concentração de composto que reduz a viabilidade celular em 50%) foi determinado com o GraphPad Prism 5 Software através de gráfico da viabilidade celular percentual como uma função de concentração de composto.

#### TITULAÇÃO DO VÍRUS INFLUENZA (ENSAIO DE PLACA AVICEL®)

[00188] Inibidores de MEK diferentes estão disponíveis, os quais já foram usados em testes clínicos contra câncer (Larusso e outros, 2005; Haura e outros, 2010). Desta maneira, a requerente investigou se os inibidores AS-703026, AZD-6244, PLX-4032, GSL-1120212 RDEA-119 e RO-5126766 também funcionam como antivirais contra vírus influenza em cultura de célula MDCKII.

[00189] Células MDCK II e A549 foram cultivadas com MEM suplementado com soro bovino FCS 10% e antibióticos (penicilina e estreptomicina). Para infecção as células foram cultivadas de um dia para o outro em placas de 96 cavidades ( $8 \times 10^4$  células/cavidade). Imediatamente antes da infecção as células foram lavadas com PBS e subsequentemente incubadas com o vírus influenza A diferente em um MOI de 0,001 por 30 min a 37° C. Após o período de incubação de 30 min, o inóculo foi aspirado e as células foram incubadas ou com MEM ou MEM contendo concentrações de inibidor de MEK diferentes (1-100 µM). Os sobrenadantes foram coletados em 24 h pós-infecção. Para

avaliar o número de partículas infecciosas (título de placa/foco; pfu) nos sobrenadantes de cultura de célula coletados e homogenatos de pulmão de camundongos, um ensaio de placa Avicel foi realizado em formato de placa de 96 cavidades conforme anteriormente descrito (Matrosovich e outros, 2006). Células infectadas com vírus foram imunotíngidas por uma incubação de 1 h com um anticorpo monoclonal específico para a nucleoproteína do vírus influenza A (AbD Serotec) seguido por incubação por 30 min com anticorpo anticamundongo marcado com peroxidase (DIANOVA) e incubação por 10 min com substrato de peroxidase True Blue® (KPL). Após a reação ter sido parada com água da torneira as placas foram secas e varridas com uma resolução de 1200 dpi usando o *scanner* CANONFCAN 8800F (Canon). Para definir o título do vírus dos sobrenadantes as placas/*foci* de células infectadas para cada amostra em cada faixa das placas de 96 cavidades foram contadas. O título do vírus é dado como o logaritmo na base 10 do valor médio das placas/*foci* (pfu). O limite de detecção para este teste foi  $<1,7 \log_{10}$  pfu/mL. Conforme mostrado na Fig. 1, os inibidores de MEK testados foram também capazes de reduzir o título do vírus progênie após infecção de células MDCKII.

### SINERGISMO

[00190] Para testar a sinergia entre inibidor de neuraminidase e inibidor de MEK, a IC<sub>50</sub> de inibidores de MEK diferentes em combinação com inibidor de neuraminidase contra vírus influenza A em células epiteliais de adenocarcinomas de pulmão humano (A549) foi avaliada.

[00191] (1) Oseltamir-carboxilato, CI-040, e Oseltamir-carboxilato misturado com CI-1040 em uma razão 1:1 (com base na concentração µg/mL) (vide Figuras 2a-b).

[00192] (2) Oseltamir-carboxilato, PLX-4032, e Oseltamir-carboxilato misturado com PLX-4032 em razões 1:1 e 1:10 (com base na concentração µg/mL) (vide Figuras 3a, 3b e 3c).

[00193] (3) Oseltamir-carboxilato, GSK-110212, e Oseltamir-carboxilato misturado com GSK-1120212 em uma razão 1:10 (com base na concentração  $\mu\text{g/mL}$ ) (vide Figuras 4a-b).

[00194] (4) Oseltamir-carboxilato, AZD-6244, e Oseltamir-carboxilato misturado com AZD-6244, em razões 1:10 e 1:100 (com base na concentração  $\mu\text{g/mL}$ ) (vide Figuras 5a, 5b e 5c).

[00195] Para cada experimento, o valor CI em ED50, ED75, ED90 e ED95 (dose de combinação de fármaco que produz um efeito, por exemplo, redução de título de vírus de 50%, 75%, 90% e 95% no sobrenadante celular) foi calculado para combinação de fármaco. Os fatores de sinergismo (valores CI) para as várias combinações são sumarizados na TABELA 1 abaixo e Figuras 2b, 3b a 3c, 4b, 5b e 5c. Os valores CI foram calculados usando o programa CompySyn (CompuSyn, Paramus, N.J.). Em todos os casos para Oseltamivir-carboxilato os valores CI foram  $\leq 0,53$ , mostrando sinergia significativa entre Oseltamivir-carboxilato e todos os inibidores de MEK. Esta sinergia inesperada e única no campo de antivirais contra influenza.

**TABELA 1**

|                  | <b>Oseltamivir-carboxilato</b> |             |             |             |
|------------------|--------------------------------|-------------|-------------|-------------|
|                  | <b>ED50</b>                    | <b>ED75</b> | <b>ED90</b> | <b>ED95</b> |
| CI-1040          | 0,5202                         | 0,4010      | 0,3987      | 0,4412      |
| PLX-4032 (1:1)   | 0,2783                         | 0,3472      | 0,4332      | 0,5036      |
| PLX-4032 (1:10)  | 0,2245                         | 0,2305      | 0,2367      | 0,2413      |
| AZD-6244 (1:10)  | 0,1472                         | 0,2086      | 0,2962      | 0,3760      |
| AZD-6244 (1:100) | 0,1140                         | 0,1616      | 0,2330      | 0,2993      |
| GSK-1120212      | 0,4874                         | 0,4758      | 0,4648      | 0,4576      |

**ESTUDOS *IN VITRO* E *IN VIVO* ADICIONAIS**

[00196] Estudos in vitro com o inibidor de MEK CI-1040 contra vírus influenza H5N1

[00197] Células MDCK II foram infectadas com A/Mallard/Bavaria/01/2006 (MB1, H5N1) em um MOI de 0,001. Depois de 30 minutos, as células foram tratadas com CI-1040 por 24 horas.

[00198] A partir da Figura 6 pode ser visto que o inibidor de MEK CI-1040 é altamente potente contra linhagens de vírus influenza diferentes na cultura celular. CI-1040 é também potente contra panH1N1 (RB1) e FPV.

[00199] Estudos In vitro com o inibidor de MEK PD-0325901 contra vírus influenza H5N1

[00200] Células MDCK II foram infectadas com A/Mallard/Bavaria/01/2006 (MB1, H5N1) em um MOI de 0,001. Após 30 min, as células foram tratadas com PD-0325901 por 24 h.

[00201] A partir da Figura 7 pode ser visto que o inibidor de MEK PD-0325901 é altamente potente contra H5N1 e outras linhagens do vírus influenza diferentes na cultura celular. PD-0325901 é também potente contra panH1N1 (RB1) e FPV.

[00202] *Tratamento oral de camundongos infectados com vírus influenza com CI-1040 ou PD-0325901*

[00203] Oito horas antes da infecção camundongos BL/6 (*per os*) foram tratados com CI-1040, PD-0325901 (25 mg/kg) ou solvente. No ponto de tempo da infecção (A/Regensburg/D6/09, H1N1pdm09, RB1, MLD50 5 vezes) os camundongos foram tratados novamente, depois de oito horas (4 no total). Vinte e quatro horas após infecção títulos de vírus pulmonar foram detectados (n=5).

[00204] A partir da Figura 8 pode ser visto que os inibidores de MEK CL-1040 e PD-0325901 são potentes na redução de título de vírus no pulmão de camundongos infectados com H1N1pdm09.

[00205] *Estudos In vitro com o inibidor de Raf-MEK duplo PLX-4032 contra vírus influenza H1N1pdm09*

[00206] Células A549 foram infectadas com H1N1pdm09 (RB1) em

um MOI de 0,001. Após 30 min, as células foram tratadas com PLX-4032 ou OC por 24 h. Os valores de IC<sub>50</sub> foram calculados com GraphPad.

[00207] A partir da Figura 9 pode ser visto que o inibidor de Raf-MEK duplo PLX-4032 é potente contra vírus influenza H1N1pdm09.

[00208] *Estudos In vitro com o inibidor de MEK AZD-8330 contra vírus influenza H1N1*

[00209] As células A549 foram infectadas com H1N1pdm09 (RB1) em um MOI de 0,001. Após 30 min, as células foram tratadas com AZD-8330 ou OC por 24 h. Os valores de IC<sub>50</sub> foram calculados com Graphpad.

[00210] A partir da Figura 10 pode ser visto que o inibidor de MEK AZD-8330 é muito potente contra H1N1pdm01 na cultura celular.

[00211] *Estudos in vitro com uma combinação de CI-1040 e Oseltamivir contra vírus influenza H1N1pdm09*

[00212] As células A549 foram infectadas com H1N1pdm09 (RB1) em um MOI de 0,001. Após 30 min, as células foram tratadas com CI-1040 ou Oseltamivir sozinho ou em combinação por 24 h.

[00213] A partir da Figura 11 pode ser visto que uma combinação de CI-1040 e Oseltamivir contra vírus influenza H1N1pdm09 é altamente potente contra H1N1pdm09 em cultura celular.

[00214] *Tratamento oral de camundongos infectados com vírus influenza com combinação de PLX-4032 e Oseltamivir*

[00215] Doze horas antes da infecção os camundongos BL/6 foram tratados (*per os*) com PLX-4032 (50 mg/kg), Tamiflu (5 mg/kg) e solvente sozinho ou em combinação (PLX-4032 + Tamiflu). No ponto de tempo de infecção (H1N1pdm09, RB1, MLD50 5 vezes) os camundongos foram tratados novamente, após doze horas (3 no total). Vinte e quatro horas após infecção os títulos do vírus pulmonar foram detectados. (n=5).

[00216] Pode ser visto da Figura 12 que a combinação de PLX-4032

e Oseltamivir (Tamiflu) resulta em uma redução significativa de título de vírus no pulmão comparado com o tratamento com Oseltamivir (Tamiflu) sozinho.

[00217] Estudos In vitro com PLX-4032 (Vemurafenibe) contra vírus influenza H7N9

[00218] Células A549 foram infectadas com A/Anhui/1/2013 (H7N9) (moi=0,01) por 30 min e subsequentemente tratadas com as quantidades indicadas de Vemurafenibe por 24 h. Dados mostrados na Figura 13A representam média  $\pm$  SD de pelo menos três experimentos independentes com duas amostras biológicas. Significância estatística foi avaliada através do teste t de *Student* (\*\*  $p < 0,01$ ).

[00219] Na Figura 13B dados de dose-resposta mostrados na Figura 13A foram usados para determinar a curva de EC<sub>50</sub> com GraphPad Prism 5 Software. EC<sub>50</sub> = 12  $\mu$ M.

[00220] Pode ser visto das Figuras 13A e B que PLX-4032 é altamente potente contra H7N9. Sem ser limitado pela teoria, PLX-4032 é também altamente ativo contra outros subtipos do vírus influenza A.

[00221] Efeito sinérgico de inibição de MEK e neuraminidase simultânea contra vírus influenza B

[00222] Células MDCK-II foram infectadas com vírus influenza B/Lee/40 em um MOI de 1. Após absorção (1h em RT) meios com ou sem os compostos (inibidor de MEK AZD-8330, inibidor de neuraminidase Oseltamivir) foram adicionados nas concentrações indicadas (vide Figura 14). As células infectadas foram incubadas por 30 h a 33° C. Neste ponto de tempo os sobrenadantes foram coletadas e o título de partículas de vírus infecciosas foi determinado através de ensaio de foco.

[00223] Pode ser visto a partir da Figura 14 que a combinação de um inibidor de MEK, tal como AZD-8330, e um inibidor de neuraminidase, tal como oseltamivir, tem um efeito sinérgico sobre a inibição do vírus influenza B.

## REIVINDICAÇÕES

1. Uso de

(i) um inibidor de MEK, ou de um sal farmacologicamente aceitável do mesmo,

em combinação com

(ii) oseltamivir, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo;

caracterizado pelo fato de que é para preparação de um medicamento para tratamento de uma infecção por um vírus Influenza;

sendo que o dito inibidor de MEK é selecionado do grupo consistindo em AZD6244, GSK-1120212, CI-1040, PLX-4032 e AZD-8330, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo.

2. Uso, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o inibidor de MEK, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, e o oseltamivir, ou sal farmacologicamente aceitável do mesmo, estão em uma formulação única ou em formulações separadas.

3. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende:

um inibidor de MEK, selecionado do grupo que consiste em AZD6244, GSK-1120212, CI-1040, PLX-4032 e AZD-8330, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, e

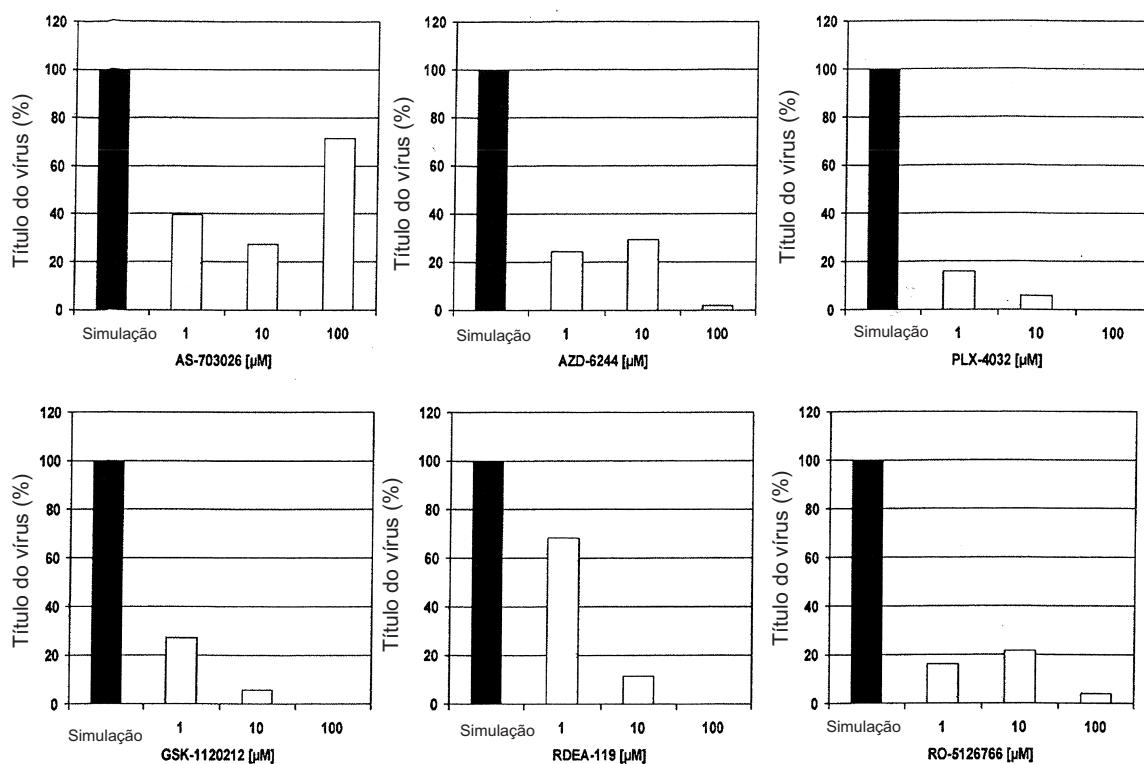
oseltamivir ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo,

quando usada como um medicamento no tratamento de uma infecção por um vírus influenza.

4. Uso de uma composição farmacêutica, como definida na reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que é para preparação de um medicamento para tratar um indivíduo com uma infecção por um vírus Influenza.

## Inibidores de MEK inibem a proliferação de vírus Influenza A

Fig. 1



## Atividade antiviral de Oseltamivir ou CI-1040 contra vírus Influenza

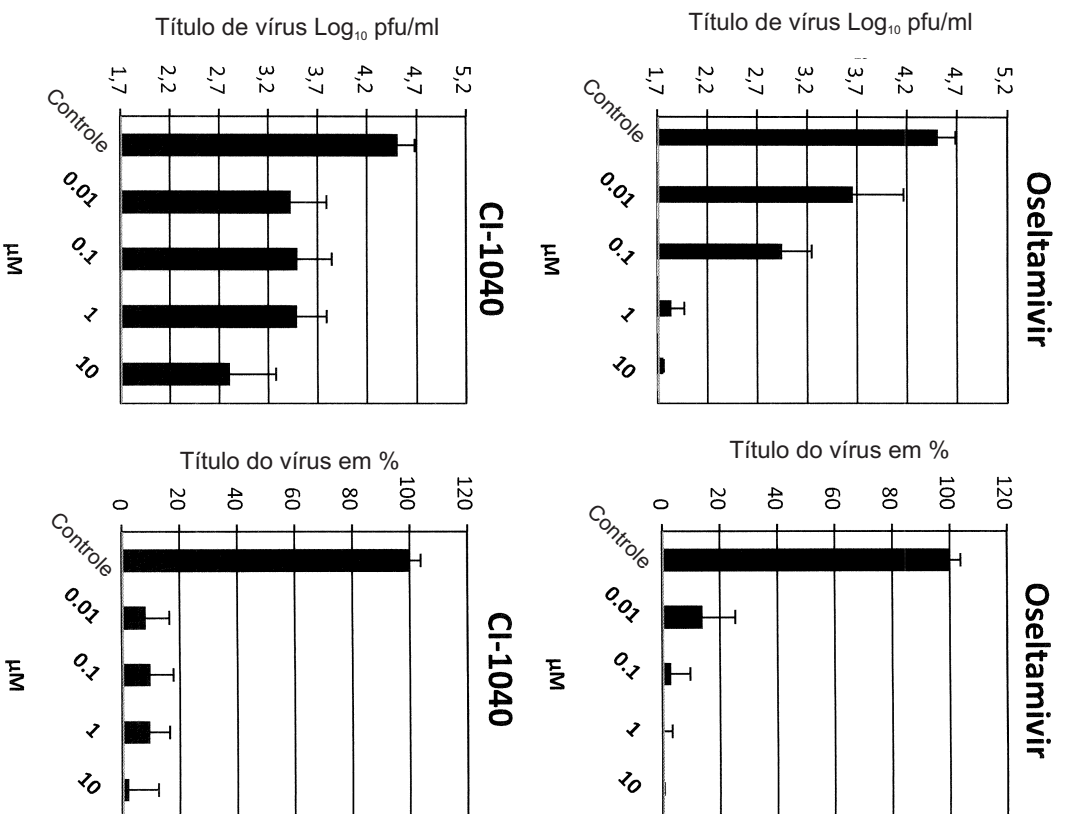
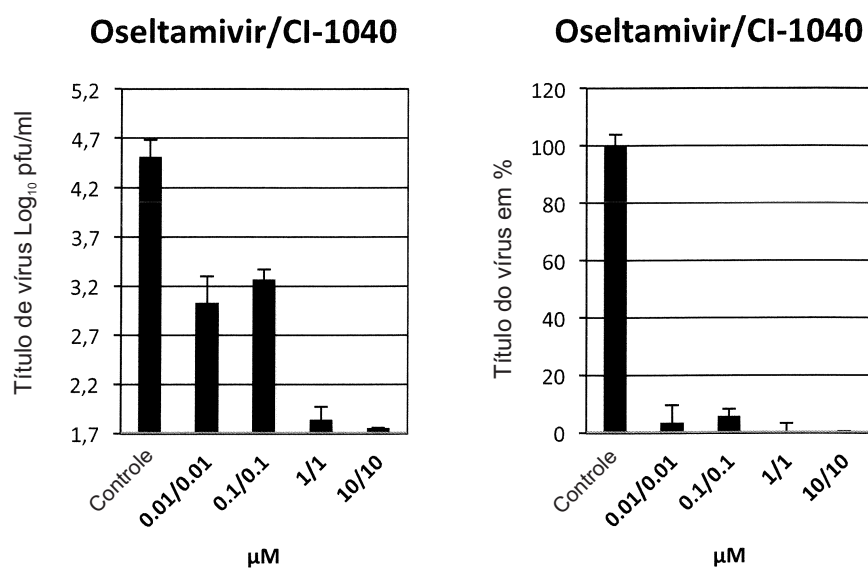


Fig. 2a

## Combinção de Oseltamivir e CI-1040



|                             | IC <sub>50</sub><br>(ng/ml) |
|-----------------------------|-----------------------------|
| Oseltamivir                 | 0,169                       |
| CI-1040                     | 0,143                       |
| Oseltamivir + CI-1040 (1:1) | 0,158                       |

|             | Valores CI para Oseltamivir + CI-1040 (1:1) |
|-------------|---|
| <b>ED50</b> | 0,5202                                      |
| <b>ED75</b> | 0,4010                                      |
| <b>ED90</b> | 0,3987                                      |
| <b>ED95</b> | 0,4412                                      |

Fig. 2b

Atividade antiviral de Oseltamivir ou PLX-4032 contra vírus Influenza

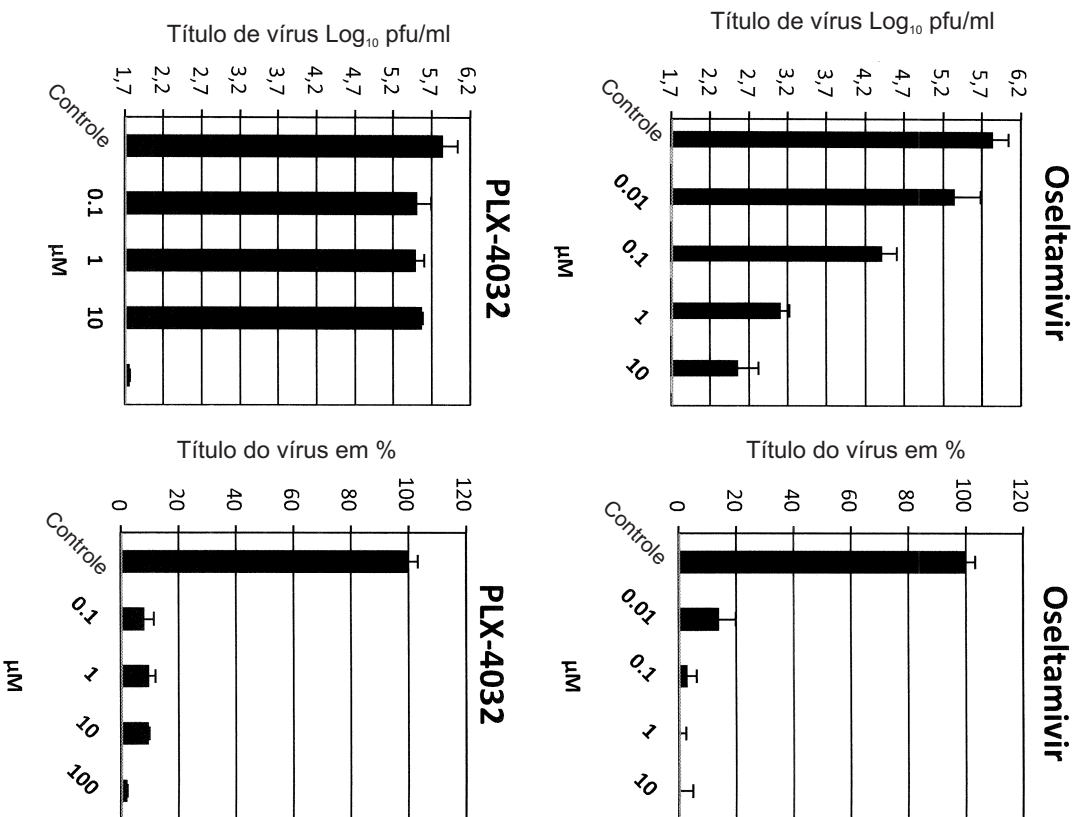
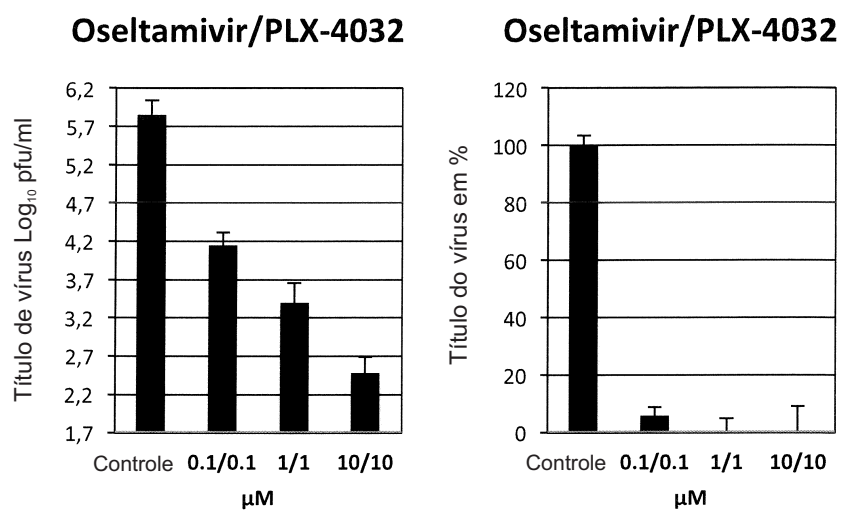


Fig. 3a

## Combinação de Oseltamivir e PLX-4032 (1:1)

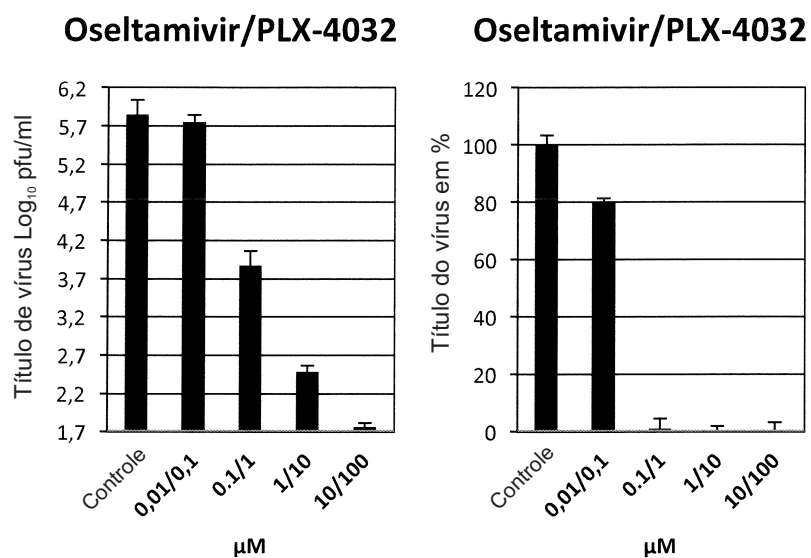


|             | Valores CI para Oseltamivir + PLX-4032 (1:1) |
|-------------|--|
| <b>ED50</b> | 0,2783                                       |
| <b>ED75</b> | 0,3472                                       |
| <b>ED90</b> | 0,4332                                       |
| <b>ED95</b> | 0,5036                                       |

|                              | IC <sub>50</sub><br>(ng/ml) |
|------------------------------|-----------------------------|
| Oseltamivir                  | 1,12                        |
| PLX-4032                     | 202,10                      |
| Oseltamivir + PLX-4032 (1:1) | 1,68                        |

Fig. 3b

## Combinação de Oseltamivir e PLX-4032 (1:10)



|             | Valores CI para Oseltamivir + PLX-4032 (1:10) |
|-------------|---|
| <b>ED50</b> | 0,2247  |
| <b>ED75</b> | 0,2305  |
| <b>ED90</b> | 0,2367  |
| <b>ED95</b> | 0,2413  |

|                               | IC <sub>50</sub><br>(ng/ml) |
|-------------------------------|-----------------------------|
| Oseltamivir                   | 1,12                        |
| PLX-4032                      | 202,10                      |
| Oseltamivir + PLX-4032 (1:10) | 11,25                       |

Fig. 3c

## Atividade antiviral de Oseltamivir ou GSK-1120212 contra vírus Influenza

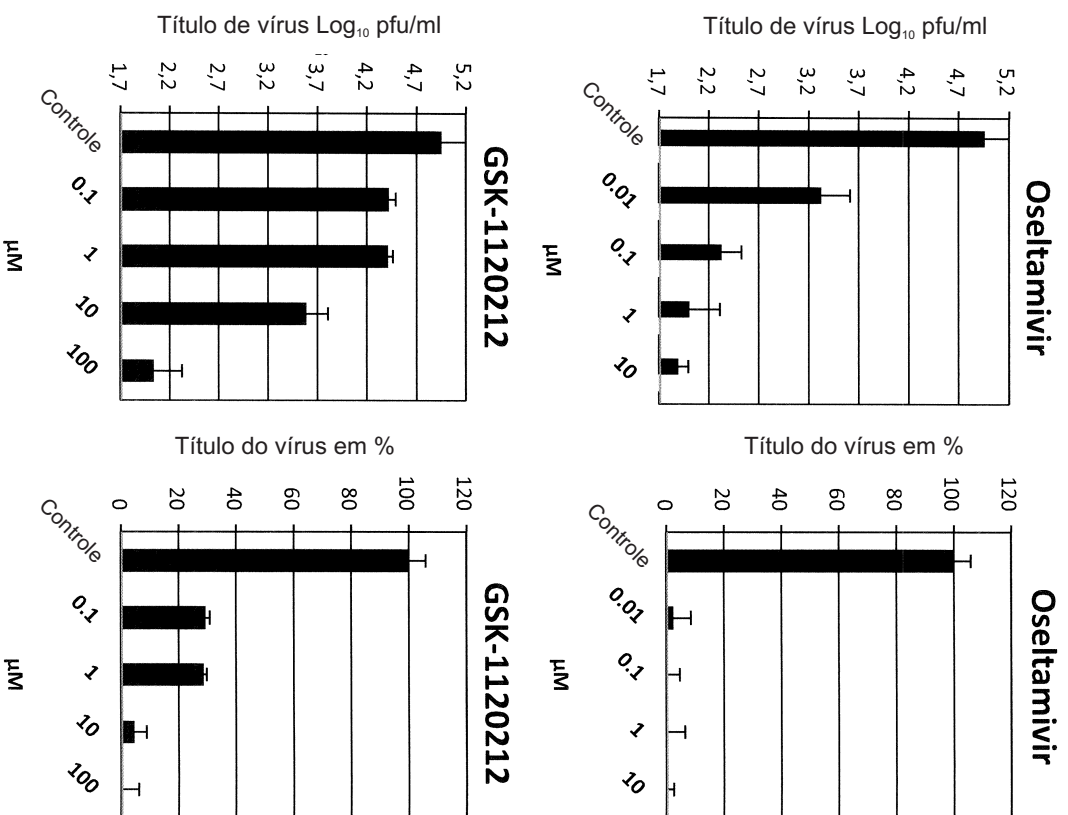
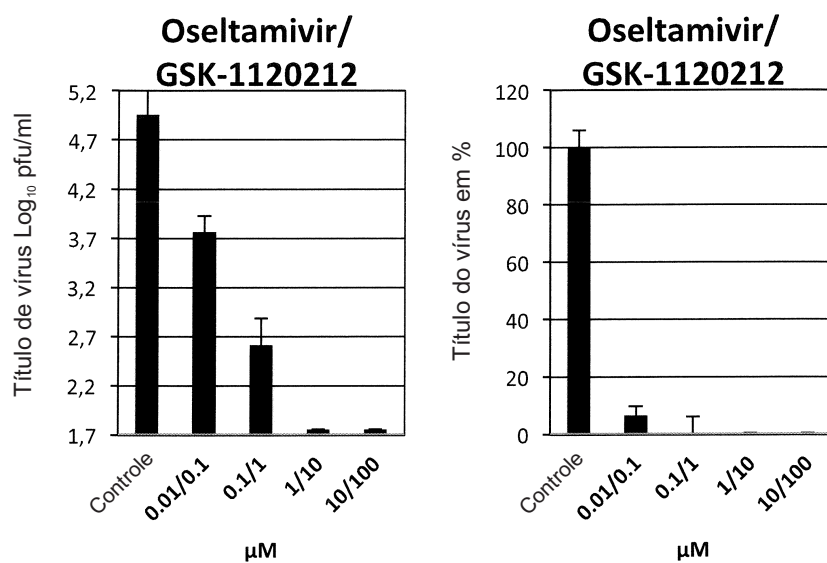


Fig. 4a

## Combinção de Oseltamivir e GSK-1120212



|                                  | IC <sub>50</sub><br>(ng/ml) |
|----------------------------------|-----------------------------|
| Oseltamivir                      | 0,081                       |
| GSK-1120212                      | 29,600                      |
| Oseltamivir + GSK-1120212 (1:10) | 9,271                       |

|             | Valores CI para Oseltamivir + GSK-1120212 (1:10) |
|-------------|--|
| <b>ED50</b> | 0,4874   |
| <b>ED75</b> | 0,4758   |
| <b>ED90</b> | 0,4648   |
| <b>ED95</b> | 0,4576   |

Fig. 4b

Atividade antiviral de Osetamivir ou AZD-6244 contra vírus Influenza

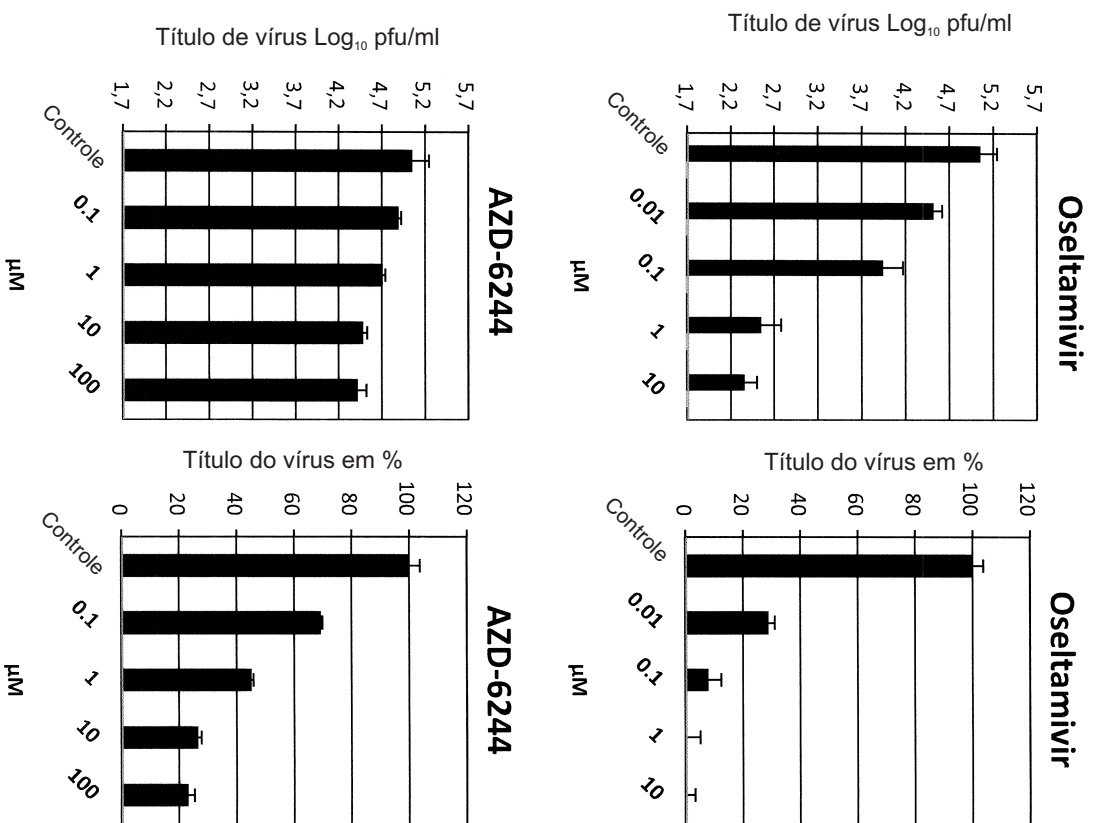
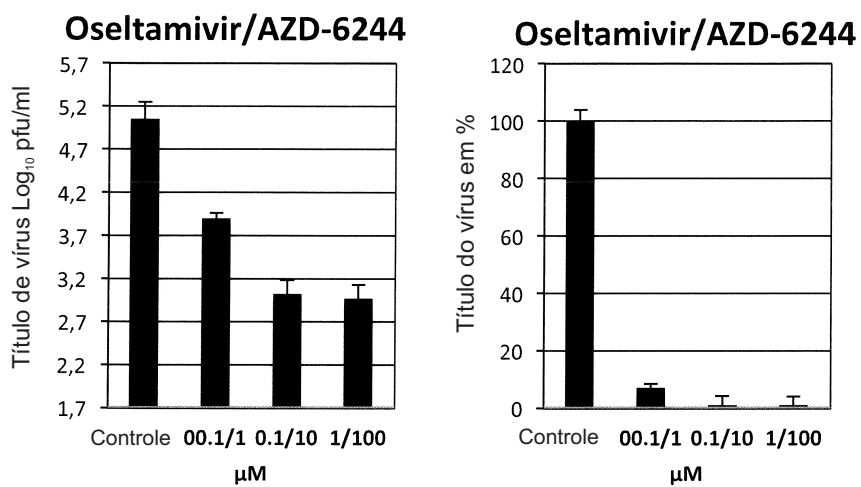


Fig. 5a

### Combinação de Oseltamivir e AZD-6244 (1:10)

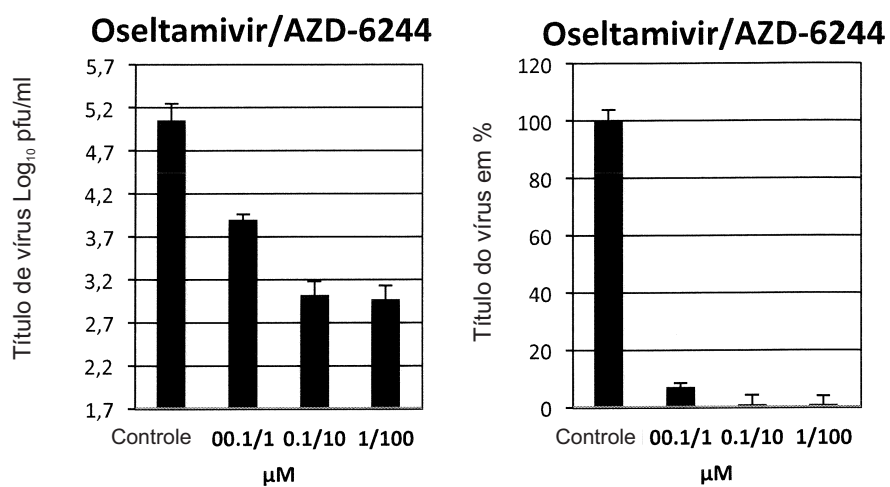


|                               | IC <sub>50</sub><br>(ng/ml) |
|-------------------------------|-----------------------------|
| Oseltamivir                   | 0,06                        |
| AZD-6244                      | 377,23                      |
| Oseltamivir + AZD-6244 (1:10) | 1,64                        |

|      | Valores CI para Oseltamivir + AZD-6244 (1:10) |
|------|---|
| ED50 | 0,1472  |
| ED75 | 0,2086  |
| ED90 | 0,2962  |
| ED95 | 0,3760  |

**Fig. 5b**

### Combinação de Oseltamivir e AZD-6244 (1:10)



| Valores CI para Oseltamivir + AZD-6244 (1:100) |        |
|--|--------|
| <b>ED50</b>                                    | 0,1140 |
| <b>ED75</b>                                    | 0,1616 |
| <b>ED90</b>                                    | 0,2330 |
| <b>ED95</b>                                    | 0,2993 |

|                                | IC <sub>50</sub><br>(ng/ml) |
|--------------------------------|-----------------------------|
| Oseltamivir                    | 0,06                        |
| AZD-6244                       | 377,23                      |
| Oseltamivir + AZD-6244 (1:100) | 107,76                      |

**Fig. 5c**

Estudos *In vitro* com o inibidor de MEK CI-1040 contra vírus influenza H5N1

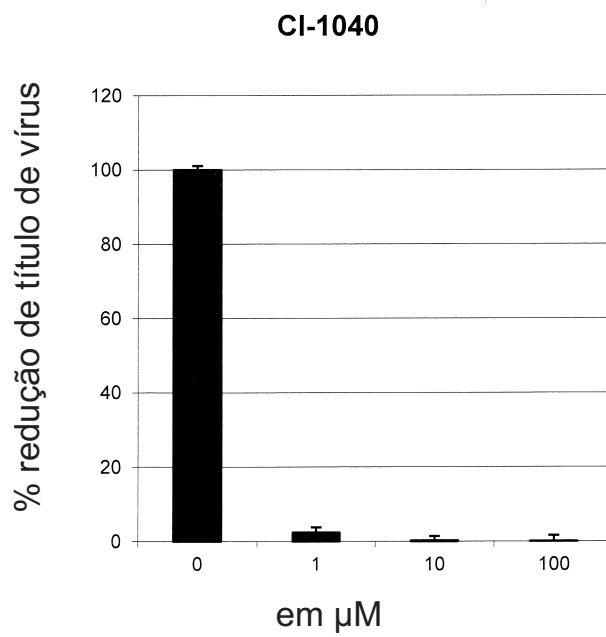
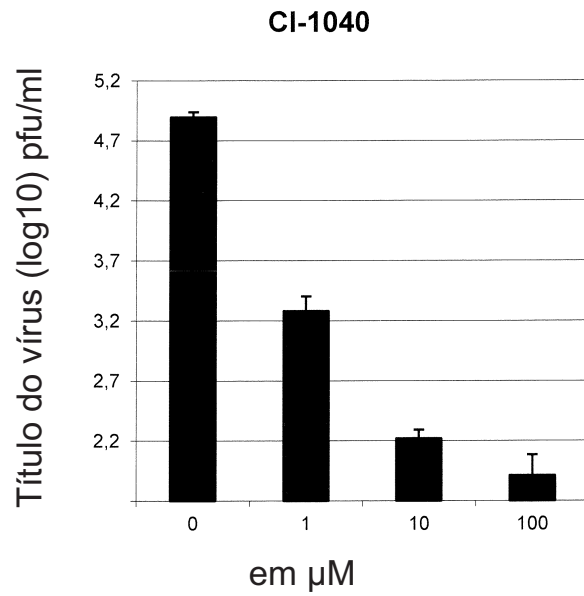


Fig. 6

Estudos *In vitro* com o inibidor de MEK PD-0325901 contra vírus influenza H5N1

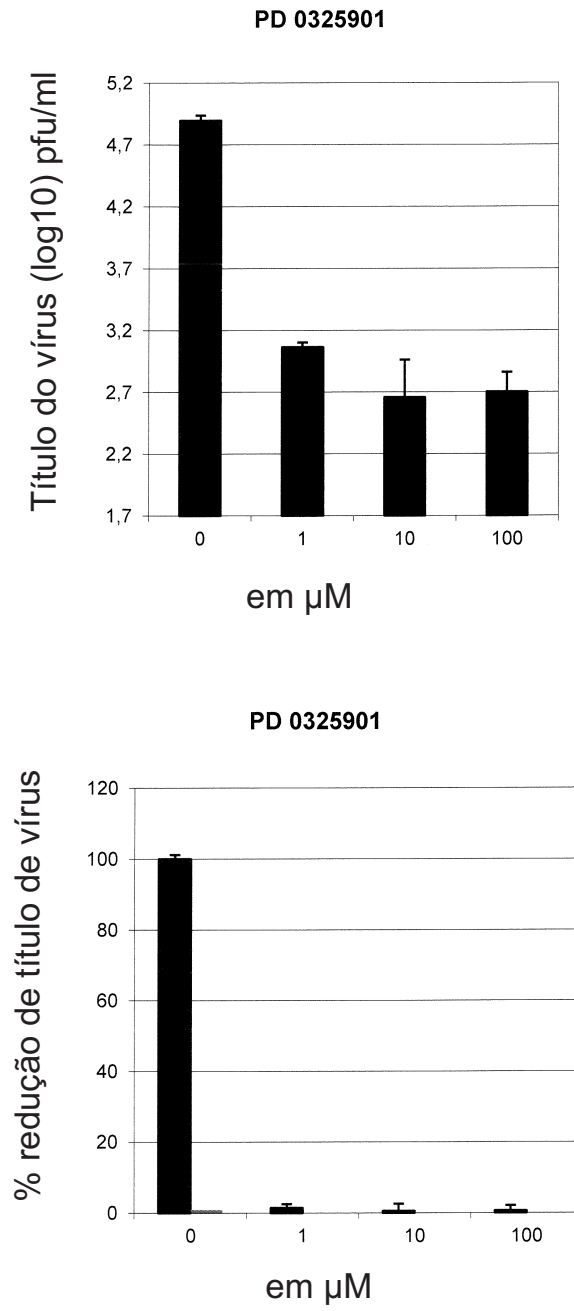


Fig. 7

Tratamento oral de camundongos infectados com vírus influenza  
com CI-1040 ou PD-03250901

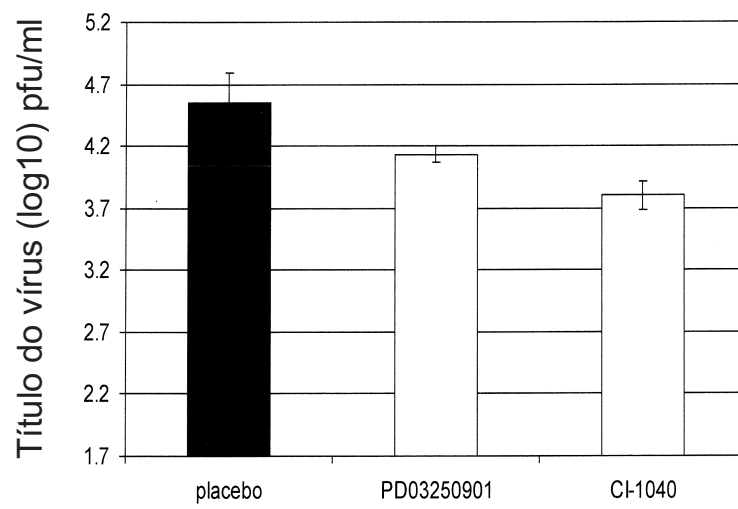


Fig. 8

Estudos *In vitro* com o inibidor de Raf-MEK duplo PLX-4032 contra vírus Influenza H1N1pdm09

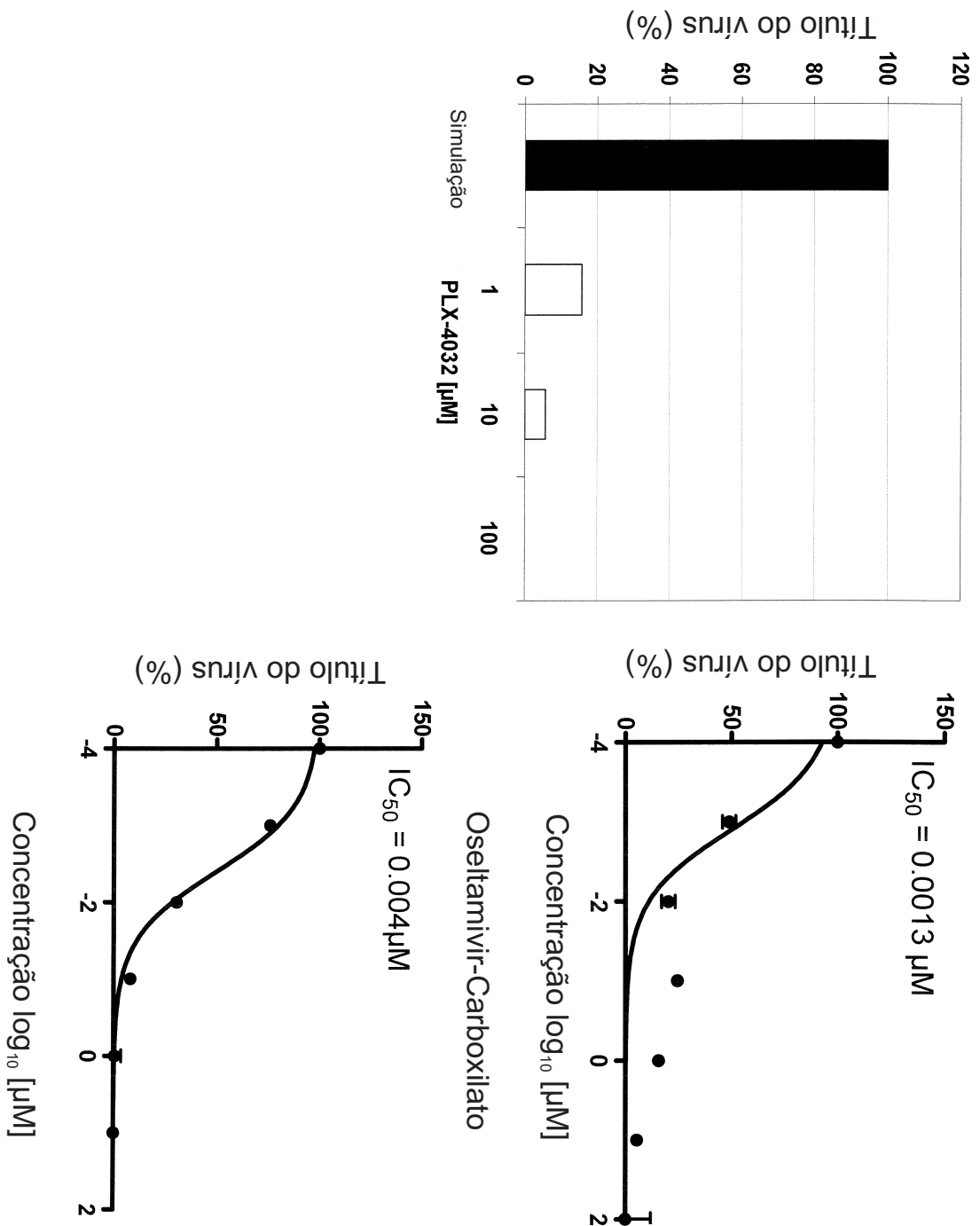


Fig. 9

Estudos *In vitro* com o inibidor de MEK AZD-8330 contra vírus influenza H1N1pdm09

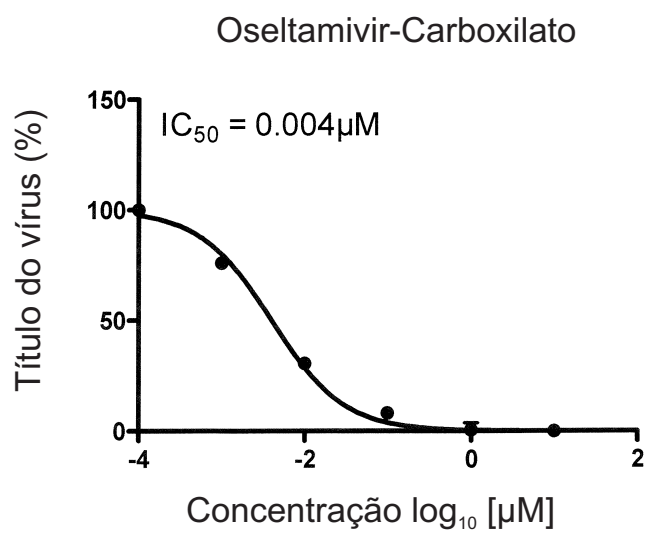
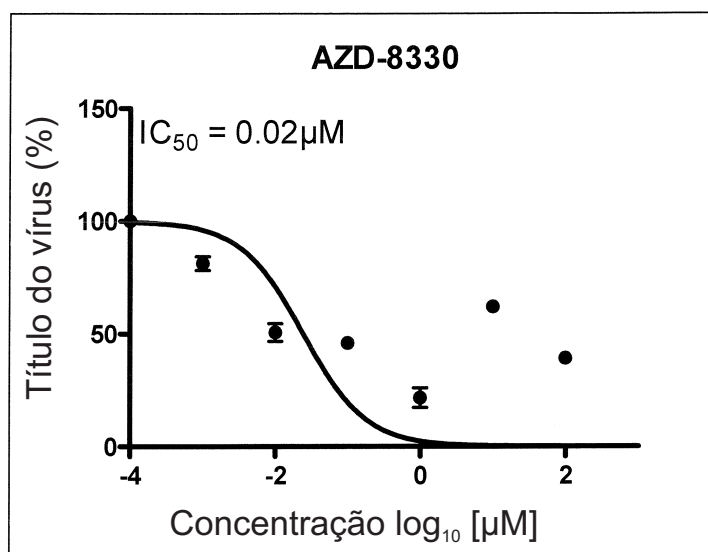


Fig. 10

Estudos *In vitro* com uma combinação de CL-1040 e Osetamivir contra vírus influenza H1N1pdm09

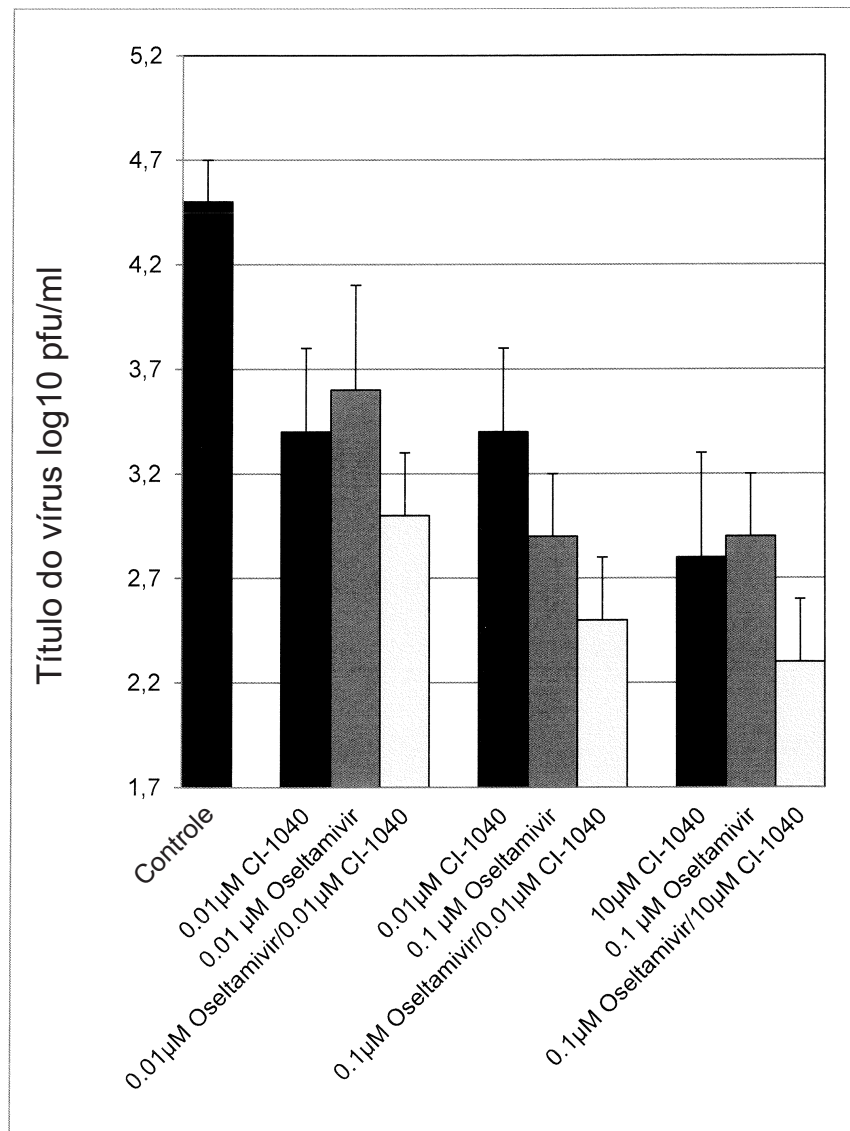


Fig. 11

Tratamento oral de camundongos infectados com vírus influenza com combinação de PLX-4032 e Oseltamivir

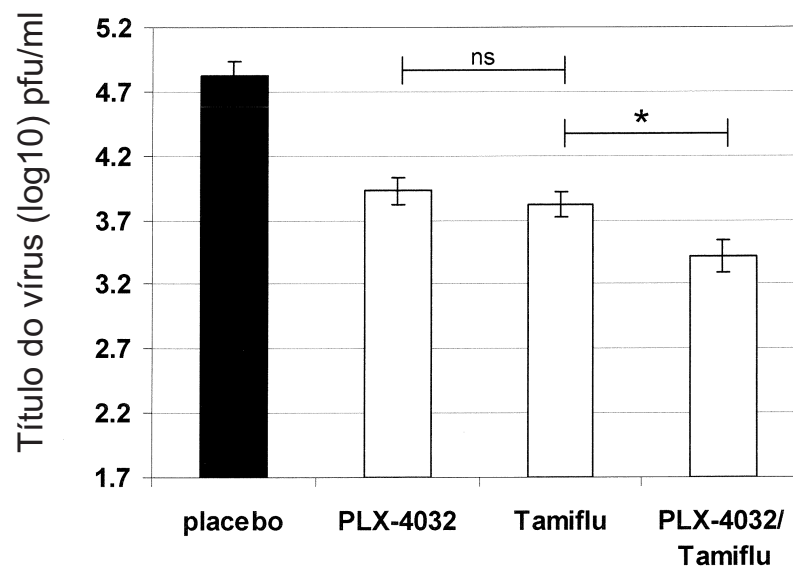
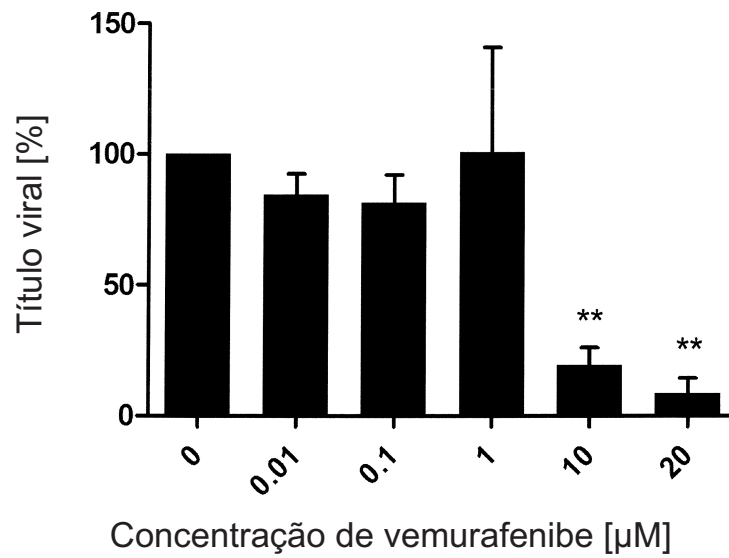


Fig. 12

Estudos *In vitro* com PLX-4032 (Vemurafenibe)  
contra vírus influenza H7N9

A



B

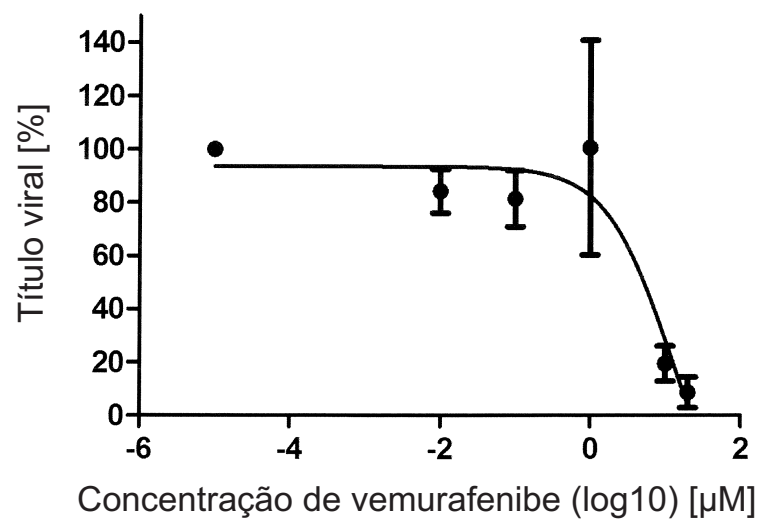


Fig. 13

Estudos *In vitro* com PLX-4032 (Vemurafenibe) contra vírus influenza H7N9

Efeitos sinérgico de Inibição Simultânea de MEK e Neuraminidase  
Contra Vírus Influenza B

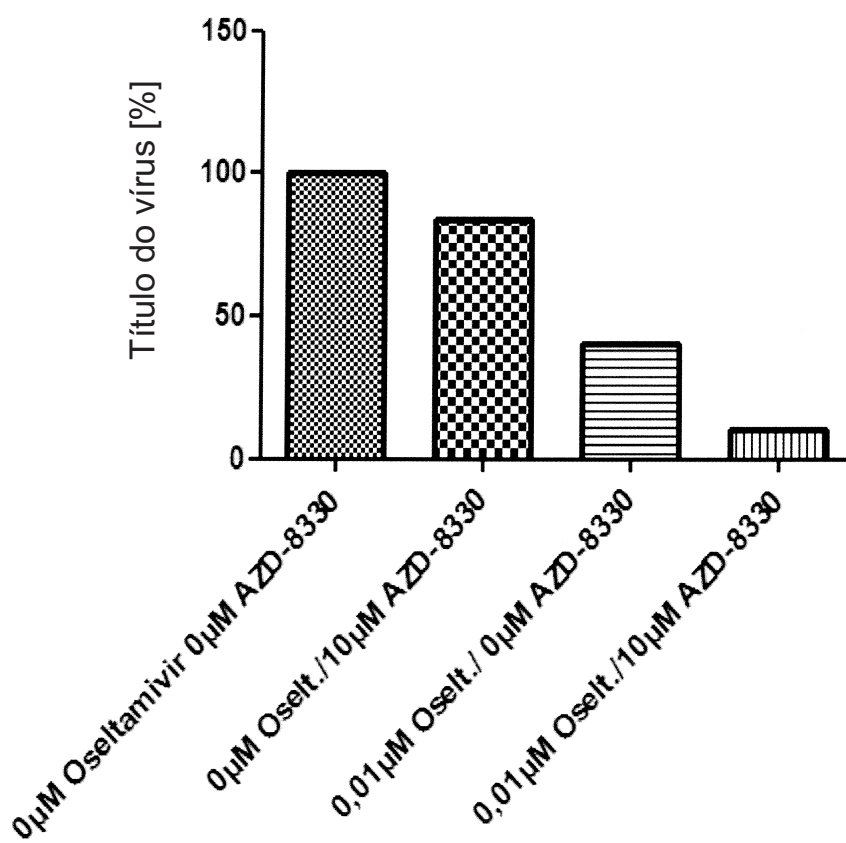


Fig. 14