

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) 028605

(13) B1

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45) Дата публикации и выдачи патента**

**2017.12.29**

**(21) Номер заявки**

**201590703**

**(22) Дата подачи заявки**

**2013.10.08**

**(51) Int. Cl. A61K 45/06 (2006.01)**

**A61K 31/215 (2006.01)**

**A61K 31/325 (2006.01)**

**A61K 31/437 (2006.01)**

**A61K 31/4458 (2006.01)**

**A61K 31/52 (2006.01)**

**A61P 31/14 (2006.01)**

**A61P 31/16 (2006.01)**

---

**(54) КОМБИНАЦИЯ ОЗЕЛЬТАМИВИРА И ИНГИБИТОРА МЕК ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ  
ВИРУСНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ**

---

**(31) 61/711,136**

**(32) 2012.10.08**

**(33) US**

**(43) 2015.07.30**

**(86) PCT/EP2013/070917**

**(87) WO 2014/056894 2014.04.17**

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

**(72) Изобретатель:**

**Плешка Штефан, Планц Оливер,  
Людвиг Штефан (DE)**

**(74) Представитель:**

**Носырева Е.Л. (RU)**

**(56) KAROLINE DROEBNER ET AL.: "Antiviral activity of the MEK-inhibitor U0126 against pandemic H1N1v and highly pathogenic avian influenza virus and", ANTIVIRAL RESEARCH, ELSEVIER BV, NL, vol. 92, no. 2, 3, August 2011 (2011-08-03), pages 195-203, XP028325598, ISSN: 0166-3542, DOI: 10.1016/j.antiviral.2011.08.002 [retrieved on 2011-08-11], abstract, page 196, right-hand column, paragraph 2.3, page 198; table 1**

**US-A1-2010137431**

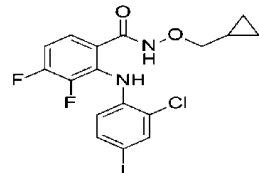
**PUZANOV I. ET AL.: "Vemurafenib: Braf kinase inhibitor, oncolytic", DRUGS OF THE FUTURE 2011 PROUS SCIENCE ESP, vol. 36, no. 3, March 2011 (2011-03), pages 191-199, XP007922458, ISSN: 0377-8282, the whole document**

**HSING-PANG HSIEH ET AL.: "Strategies of Development of Antiviral Agents Directed Against Influenza Virus Replication", CURRENT PHARMACEUTICAL DESIGN, vol. 13, no. 34, 1 December 2007 (2007-12-01), pages 3531-3542, XP055093630, ISSN: 1381-6128, DOI: 10.2174/138161207782794248, page 3536, paragraph 2.5, page 3536, paragraph 2.6 - page 3537, page 3537; figure 2**

**WO-A1-2009140853**

**S. LUDWIG: "Targeting cell signalling pathways to fight the flu: towards a paradigm change in anti-influenza therapy", JOURNAL OF ANTIMICROBIAL CHEMOTHERAPY, vol. 64, no. 1, 6 May 2009 (2009-05-06), pages 1-4, XP055093636, ISSN: 0305-7453, DOI: 10.1093/jac/dkp161, abstract**

**(57) Изобретение относится к комбинации ингибитора МЕК, представленного структурной формулой**



или его фармацевтически приемлемой соли с ингибитором нейраминидазы для профилактики и/или лечения вирусных заболеваний.

**B1**

**028605**

**028605 B1**

### Область изобретения

Изобретение относится к ингибитору МЕК, который способен проявлять один или несколько благоприятных терапевтических эффектов. Ингибитор МЕК можно применять в предупреждении и/или лечении вирусной инфекции. Ингибитор МЕК в комбинации с ингибитором нейраминидазы способен проявлять один или несколько благоприятных терапевтических эффектов в лечении вирусных заболеваний.

### Предпосылки изобретения

Инфекции, вызываемые РНК- или ДНК-содержащими вирусами, представляют собой серьезную угрозу здоровью человека и животных. Например, инфекции, вызываемые вирусами гриппа, по-прежнему относятся к крупным эпидемиям человечества и из года в год приводят к большому числу человеческих жертв. С точки зрения национальных экономик они являются фактором очень больших издержек, например, из-за нетрудоспособности. Инфекции, вызываемые вирусом болезни Борна (BDV), который в основном поражает лошадей и овец, но который также был выделен у людей и связан с неврологическими заболеваниями, также имеют огромное экономическое значение.

Проблема контроля, в частности, РНК-содержащих вирусов состоит в способности вирусов к адаптации, обусловленной высокой частотой ошибок у вирусных полимераз, что делает получение подходящих вакцин, а также разработку противовирусных веществ крайне сложным. Кроме того, было установлено, что применение противовирусных веществ, направленных непосредственно на функции вируса, демонстрирует хороший противовирусный эффект в начале лечения, но быстро приводит к отбору устойчивых вариантов на основе мутации. Примером является противовирусное средство амантадин и его производные, направленные на трансмембранный белок вируса. В течение короткого промежутка времени после начала применения образуются устойчивые варианты вируса. Другими примерами являются новые терапевтические препараты для лечения гриппозных инфекций, ингибирующие нейраминидазу - поверхностный белок вируса гриппа. К ним относится, например, реленза. У пациентов уже были выявлены варианты, устойчивые к релензе (Gubareva et al., J. Infect Dis 178, 1257-1262, 1998). Таким образом, данный терапевтический препарат не оправдал ожиданий.

Из-за очень маленького генома и, таким образом, ограниченной способности к кодированию функций, являющихся необходимыми для репликации, все вирусы являются в высокой степени зависимыми от функций их клеток-хозяев. Оказывая влияние на такие клеточные функции, являющиеся необходимыми для репликации вируса, можно отрицательно воздействовать на репликацию вируса в инфицированной клетке. При этом у вируса нет никакой возможности заместить отсутствующую клеточную функцию посредством адаптации, в частности, посредством мутаций, чтобы, таким образом, избежать селекционного давления. Это уже было показано в отношении вируса гриппа А с относительно неспецифичными ингибиторами клеточных киназ и метилтрансфераз (Scholtissek and Mitter, Arch Virol 119, 111-118, 1991).

Из уровня техники известно, что клетки имеют множество путей передачи сигналов, посредством которых сигналы, оказывающие действие на клетки, передаются в ядро клетки. Тем самым клетка способна реагировать на внешние раздражители и реагировать посредством пролиферации клеток, активации клеток, дифференцировки или контролируемой гибели клеток. Общим у данных путей передачи сигналов является то, что они содержат по меньшей мере одну киназу, активирующую посредством фосфорилирования по меньшей мере один белок, передающий сигнал далее. При наблюдении клеточных процессов, индуцированных после инфицирования вирусами, было установлено, что множество ДНК- и РНК-содержащих вирусов преимущественно активируют в инфицированной клетке-хозяине определенный путь передачи сигнала, так называемый Raf/МЕК/ERK-киназный путь передачи сигнала (Benn et al., J. Virol 70, 4978-4985, 1996; Brader and Kovesdi, J. Virol 71, 398-404, 1997; Popik and Pitha, Virology 252, 210-217, 1998; Rodems and Spector, J. Virol 72, 9173-9180, 1998). Данный путь передачи сигнала является одним из важнейших путей передачи сигнала в клетке и играет значительную роль в процессах пролиферации и дифференцировки. Передача сигналов, индуцированная факторами роста, осуществляется посредством последовательного фосфорилирования от серин/треониновой киназы Raf к киназе МЕК с двойной специфичностью (киназе киназы MAP/киназе ERK) и в итоге к киназе ERK (киназе, регулируемой внеклеточными сигналами). Притом, что в качестве киназы-субстрата для Raf известна только МЕК, а изоформы ERK были идентифицированы в качестве единственного субстрата для МЕК, ERK способна фосфорилировать целый ряд субстратов. К ним принадлежат, например, транскрипционные факторы, посредством которых осуществляется непосредственное влияние на экспрессию генов в клетке (Cohen, Trends in Cell Biol 7, 353-361, 1997; Robinson and Cobb, Curr. Opin. Cell Biol 9, 180-186, 1997; Treisman, Curr. Opin. Cell Biol 8, 205-215, 1996).

Недостаток известных из уровня техники противовирусных активных веществ состоит в том, что они либо направлены против компонента вируса и, таким образом, быстро приводят к формированию устойчивости (см. амантадин), либо оказывают слишком широкое и неспецифическое действие в отношении клеточных факторов (например, ингибиторы метилтрансферазы), при этом можно ожидать значительные побочные эффекты. Следовательно, не известно ни одно вещество, являющееся активным в отношении клеточных факторов, на основе которого разработан терапевтический препарат против вирусных заболеваний. С другой стороны, ингибирование других киназ, например ингибирование киназы JNK

в пути передачи сигнала MEKK/SEK/JNK, может усиливать размножение вируса. Кроме того, известно, что повышенная активация также и других киназ, например протеинкиназы С (РКС), ингибитирует репликацию вирусов (Driedger and Quick, WO 92/02484).

Что касается клеточных процессов, которые индуцируются после инфицирования вирусом, было обнаружено, что множество ДНК- и РНК-содержащих вирусов активируют в инфицированной клетке-хозяине определенный путь передачи, так называемый Raf/MEK/ERK-киназный каскад.

Данный киназный каскад принадлежит к наиболее важным сигнальным путям в клетке и играет существенную роль в процессах пролиферации и дифференцировки.

Передача сигналов, индуцированная факторами роста, осуществляется посредством последовательного фосфорилирования от серин/треониновой киназы Raf к киназе MEK с двойной специфичностью (киназе киназы MAP/киназе ERK) и в итоге к киназе ERK (киназе, регулируемой внеклеточными сигналами). Притом, что в качестве киназы-субстрата для Raf известна только MEK, а изоформы ERK были идентифицированы в качестве единственного субстрата для MEK, ERK может фосфорилировать целый ряд субстратов. К этому относится, например, фосфорилирование транскрипционных факторов, что приводит к непосредственной модификации экспрессии генов в клетке.

Исследование данного сигнального пути в процессах принятия решения клетками привело к обнаружению нескольких фармакологических ингибиторов, которые ингибируют данный сигнальный путь среди прочих точек на уровне MEK, т.е. в "узком месте" каскада.

Ингибитор MEK PD98059 ингибитирует активацию MEK киназой Raf.

Был описан ингибитор MEK PD184352 (2-(2-хлор-4-йодфениламино)-N-циклогексилметокси-3,4-дифторбензамид), который при пероральном введении в мышной модели может эффективно ингибировать рост карциномы толстой кишки.

Ингибитор MEK AZD6244 (селуметиниб) представляет собой лекарственное средство, исследуемое в отношении лечения различных типов рака, например, немелкоклеточного рака легкого (NSCLC).

AZD8330 представляет собой активный при пероральном введении селективный ингибитор MEK с  $IC_{50}$  7 нМ. AZD8330 характеризуется потенциальной противоопухолевой активностью. AZD8330 специфично ингибирует киназу 1 митоген-активируемой протеинкиназы (киназу 1 MEK или MAP/ERK), результатом чего является ингибирование индуцированных факторами роста передачи сигнала в клетках и пролиферации опухолевых клеток.

Было показано, что ингибитор MEK RDEA-119 (BAY-869766) является эффективным, селективным, аллостерическим ингибитором MEK1/2 для лечения рака.

Ингибитор MEK GSK-1120212 (траметиниб) представляет собой эффективный и селективный аллостерический ингибитор ферментов MEK1 и MEK2 (MEK1/2) с возможной противоопухолевой активностью в клиническом испытании в фазе I (ASCO 2010).

TAK-733 представляет собой эффективный, селективный, не конкурирующий с АТФ ингибитор MEK, связывающийся с аллостерическим центром, с  $IC_{50}$  3,2 нМ.

Ингибитор MEK RO5126766 представляет собой ингибитор протеинкиназы, специфичный в отношении митоген-активируемых протеинкиназ Raf и MEK (MAPK), с потенциальной противоопухолевой активностью. Ингибитор киназы Raf/MEK с двойной специфичностью RO5126766 специфично ингибирует киназные активности Raf и MEK, результатом чего является ингибирование транскрипции целевого гена, которая способствует злокачественному перерождению клеток.

Ингибитор MEK AS703026 представляет собой новый, высокоселективный и эффективный аллостерический ингибитор MEK1/2, который в настоящее время проходит клиническое испытание в фазе II в отношении лечения острого миелоидного лейкоза.

Ингибитор MEK PLX-4032 (Zelboraf®)(вемурафениб) представлен на рынке для лечения меланомы на поздних стадиях.

Ингибиторы MEK CI-1040, PD0325901, AZD6244, GDC-0973, RDEA119, GSK1120212, AZD8330, RO5126766, RO4987655, TAK-733 и AS703026 известны из уровня техники и, например, описаны в табл. 1 и показаны на фиг. 4 в Fremin and Meloche (2010), J. Hematol. Oncol. 11;3:8.

Нейраминидаза (также известная как сиалидаза, ацилнейраминилгидролаза и ЕС 3.2.1.18) представляет собой фермент, широко распространенный у животных и ряда микроорганизмов. Он представляет собой гликогидролазу, которая расщепляет альфа-кетозидные связи концевых остатков сиаловой кислоты в гликопротеинах, гликолипидах и олигосахаридах. Многие микроорганизмы, содержащие нейраминидазу, являются патогенными для человека и других животных, включая птиц, лошадей, свиней и тюленей. Данные патогенные организмы включают вирус гриппа.

Нейраминидаза непосредственно связана с патогенностью вируса гриппа. Полагают, что она помогает выделению новосинтезированных вирионов из инфицированных клеток и принимает участие в миграции вируса (посредством своей гидролазной активности) через слизистую оболочку дыхательных путей.

Класс специфичных средств против гриппа - ингибиторы нейраминидазы - продемонстрировал ингибирование как вируса гриппа А, так и вируса гриппа В. Озельтамивир применяют в лечении вирусных инфекций; однако он не излечивает заложенность носа. Озельтамивир является пролекарством в виде

сложного этилового эфира карбоциклического аналога переходного состояния сиаловой кислоты RO 64-0802 (GS4071), который представляет собой эффективный и селективный ингибитор нейраминидаз вирусов гриппа А и В.

Форма озельтамивира для перорального применения была одобрена для лечения острого гриппа в Соединенных Штатах в 1999 году. Он продемонстрировал эффективность как в лечении, так и в предупреждении заболевания гриппом.

Фосфат озельтамивира является пролекарством карбоксилата озельтамивира (озельтамивира), представляющего собой ингибитор гликопroteина нейраминидазы, имеющего принципиальное значение для репликации вирусов гриппа А и В. Озельтамивир доступен от Roche Pharma.TM. AG (Швейцария). В качестве альтернативы, озельтамивир может быть получен согласно способам, описанным в патенте США № 5763483, выданном Bischofberger и соавт., и патенте США № 5866601, выданном Lew и соавт. Приблизительно 10-15% пациентов, принимающих озельтамивир, испытывают тошноту и рвоту. Пациентам с нарушением функции почек следует принимать более низкие дозы.

Занамивир (реленза) представляет собой порошок для пероральных ингаляций, который в настоящее время одобрен в 19 странах для лечения и в двух для профилактики гриппа А и В. Занамивир представляет собой конкурентный ингибитор гликопroteина нейраминидазы, имеющего принципиальное значение в инфекционном цикле вирусов гриппа. Он с большой точностью имитирует сиаловую кислоту, которая является природным субстратом для нейраминидазы. За последние несколько лет ряд событий привел к изменениям в инструкции по применению занамивира, которая теперь содержит предупреждения о бронхоспазме, одышке, сыпи, крапивнице и реакциях аллергического типа, включая отек лица и роготолки.

Перамивир представляет собой ингибитор нейраминидазы, действующий в качестве ингибитора нейраминидазы вируса гриппа по типу аналога переходного состояния и тем самым предупреждающий появление новых вирусов из инфицированных клеток.

Известно, что ингибиторы нейраминидазы не являются эффективными в отношении всех вирусов гриппа, и у нового поколения штамма вируса гриппа может развиваться устойчивость.

С учетом предшествующего уровня техники, очевидно, что существует потребность в соединениях и композициях, которые эффективны в лечении вирусных заболеваний, в частности, заболеваний, вызываемых вирусом гриппа.

#### Описание изобретения

Данная потребность устраняется путем применения соединения, являющегося ингибитором MEK, по настоящему изобретению с ингибитором нейраминидазы.

При использовании в данном документе "ингибитор MEK" может также называться ингибитором киназы митоген-активируемой протеинкиназы (MAPK). Известно, что в сигнальном пути MAPK киназа киназы MAPK (MAPKK) активирует киназу MAPK (MAPKK), которая, в свою очередь, активирует MAPK, которая передает сигнал, например, транскрипционному фактору, или другим киназам, или эффекторному белку/белку-переносчику сигнала; см., например, фиг. 1 во Fremin and Meloche, упоминаемом в данном документе выше. Ингибиторы MEK по настоящему изобретению предпочтительно ингибируют MEK1/2 у субъекта, такого как млекопитающее или птица, описанные в данном документе. Однако, может быть и так, что ингибитор MEK по настоящему изобретению не только ингибирует MEK, предпочтительно MEK1/2, но также и вышерасположенную от нее киназу (т.е. MAPKK), тем самым осуществляя двойное ингибирование. Не ограничиваясь конкретной теорией, полагают, что PLX-4032 может быть таким двойным ингибитором. Следовательно, ингибитор MEK по настоящему изобретению в предпочтительном аспекте может быть двойным ингибитором, ингибируя, таким образом, MEK, предпочтительно MEK1/2 и соответствующую вышерасположенную MAPKK. MEK1/2 представляет собой MAPKK в сигнальном пути Ras/Raf, где при этом Ras/Raf действует как MAPKK, а ERK1/2 действует как MAPK.

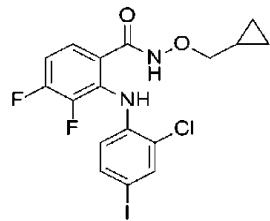
При использовании в данном документе выражение "ингибитор MEK" включает один ингибитор MEK, как, например, один из ингибиторов MEK, раскрытых в данном документе, но и один или несколько ингибиторов MEK, как, например, два, три, четыре, пять или более ингибиторов MEK, например, выбранных из ингибиторов MEK, раскрытых в данном документе.

Ингибитор нейраминидазы представляет собой противовирусное лекарственное средство, целенаправленно воздействующее на вирус гриппа, которое действует путем блокирования функции вирусного белка нейраминидазы, предупреждая, таким образом, связывание вируса с клеткой, являющейся мишенью для инфекции, и/или предупреждая размножение вируса путем отпочковывания от клетки-хозяина, поскольку новообразованные вирусы не могут отпочковываться от клетки, в которой они реплицировались. Предпочтительными ингибиторами нейраминидазы являются озельтамивир или его фармацевтически приемлемая соль, например, фосфат озельтамивира.

### Краткое описание изобретения

Настоящее изобретение может быть кратко охарактеризовано в следующих пунктах.

1. Применение комбинации ингибитора MEK CI-1040, представленного структурной формулой



или его фармацевтически приемлемой соли с ингибитором нейраминидазы для профилактики и/или лечения вирусного заболевания, где указанный ингибитор нейраминидазы представляет собой озельтамивир или его фармацевтически приемлемые соли.

2. Применение по п.1, где вирусное заболевание представляет собой инфекцию, вызываемую вирусом, содержащим РНК с отрицательной цепью.

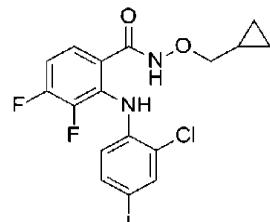
3. Применение по п.2, где вирус представляет собой вирус гриппа.

4. Применение по п.3, где вирус представляет собой вирус гриппа А или вирус гриппа В.

5. Применение по любому из предыдущих пунктов, где ингибитор MEK или его фармацевтически приемлемая соль вводятся одновременно с ингибитором нейраминидазы или его фармацевтически приемлемой солью, перед ними или после них.

6. Применение по любому из предыдущих пунктов, где фармацевтически приемлемой солью озельтамивира является фосфат озельтамивира.

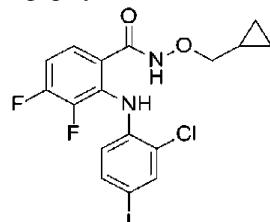
7. Фармацевтическая композиция для профилактики и/или лечения вирусного заболевания, содержащая комбинацию ингибитора MEK CI-1040, представленного формулой



или его фармацевтически приемлемой соли с ингибитором нейраминидазы, где указанный ингибитор нейраминидазы представляет собой озельтамивир или его фармацевтически приемлемые соли.

8. Фармацевтическая композиция по п.7, где фармацевтически приемлемой солью озельтамивира является фосфат озельтамивира.

9. Применение фармацевтической композиции, содержащей комбинацию ингибитора MEK CI-1040, представленного следующей структурной формулой:



или его фармацевтически приемлемой соли с ингибитором нейраминидазы, где указанный ингибитор нейраминидазы представляет собой озельтамивир или его фармацевтически приемлемые соли, в качестве лекарственного препарата для профилактики и/или лечения вирусного заболевания.

10. Применение по п.9, где фармацевтически приемлемой солью озельтамивира является фосфат озельтамивира.

### Способ лечения

Настоящее изобретение продиктовано целью, заключающейся в обеспечении веществ для применения в предупреждении или терапии вирусных заболеваний, в частности, в предупреждении и/или терапии заболеваний, вызываемых вирусами, содержащими РНК с отрицательной цепью, характеризующимися внутриклеточной и/или внутриядерной репликацией, при этом такие вещества, не являясь непосредственно направленными на функции вируса, селективно ингибируют клеточные ферменты и посредством данного селективного эффекта ингибируют репликацию вирусов.

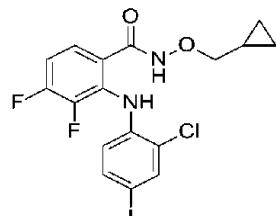
Было обнаружено, что данной цели можно достичь с помощью ингибитора каскада киназ в соответствии с настоящим изобретением или, в частности, с помощью лекарственных средств, содержащих соединение, являющееся ингибитором MEK.

Следовательно, в одном аспекте настоящее изобретение предусматривает способ профилактики

и/или лечения вирусного заболевания, включающий введение ингибитора МЕК пациенту, нуждающемуся в этом.

В одном аспекте способ по настоящему изобретению направлен на профилактику и/или лечение вирусного заболевания, которое представляет собой инфекцию, вызываемую вирусом, содержащим РНК с отрицательной цепью. Вирусное заболевание более предпочтительно вызывается вирусом гриппа, еще более предпочтительно вызывается вирусами гриппа А или В. Вирусы гриппа представляют собой, например, H1N1, H5N1, H7N7, H7N9.

Ингибитором МЕК по настоящему изобретению является CI-1040 [2-(2-хлор-4-йодфениламино)-N-(циклогексилметокси)-3,4-дифторбензамид], структурная формула которого приведена ниже:



В действительности, как показано в прилагаемых примерах, ингибитор МЕК CI-1040 является высокоактивным в отношении вируса гриппа А или В в режиме монотерапии. Также, как показано в прилагаемых примерах, ингибитор МЕК, раскрытий в данном документе, демонстрирует синергический эффект в комбинации с ингибитором нейраминидазы, таким как озельтамивир, в отношении как вируса гриппа А, так и вируса гриппа В.

Субъектом или пациентом по настоящему изобретению является млекопитающее или птица. Примеры подходящих млекопитающих включают, без ограничения, мышь, крысу, корову, козу, овцу, свинью, собаку, кошку, лошадь, морскую свинку, представителя семейства псовых, хомяка, норку, тюленя, кита, верблюда, шимпанзе, макака-резуса и человека. Примеры подходящих птиц включают, помимо прочих, без ограничения, индейку, курицу, гуся, утку, чирка, крякву, скворца, шилохвость, чайку, лебедя, цесарку или водоплавающую птицу. В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения представлены пациенты-люди.

В способе по настоящему изобретению ингибитор МЕК можно вводить перорально, внутривенно, внутриплеврально, внутримышечно, местно или посредством ингаляции. Ингибитор МЕК предпочтительно вводят посредством назальной ингаляции или перорально.

Фармацевтическая композиция, содержащая ингибитор МЕК, может быть в форме перорально вводимых суспензий или таблеток; спреев для носа, стерильных инъекционных препаратов (для внутривенного, внутриплеврального, внутримышечного введения), например, в виде стерильных инъекционных водных или масляных суспензий или суппозиториев. При пероральном введении в виде суспензии даные композиции получают в соответствии с методиками, доступными в области получения фармацевтических составов, и они могут содержать микрокристаллическую целлюлозу для придания объема, альгиновую кислоту или альгинат натрия в качестве супендирующего средства, метилцеллюлозу в качестве загустителя и подсластители/ароматизаторы, известные в данной области техники. Данные композиции в виде таблеток с немедленным высвобождением могут содержать микрокристаллическую целлюлозу, фосфат дикальция, крахмал, магния стеарат и лактозу и/или другие наполнители, связующие вещества, сухие разбавители, разрыхлители, разбавители и смазывающие средства, известные в данной области техники. Инъекционные растворы или суспензии могут быть составлены согласно известным в данной области техники методикам с применением нетоксичных, приемлемых для парентерального введения разбавителей или растворителей, таких как маннит, 1,3-бутандиол, вода, раствор Рингера или изотонический раствор хлорида натрия, или подходящих диспергирующих или увлажняющих и супендирующих средств, таких как стерильные, мягкие, нелетучие масла, в том числе синтетические моно- или диглицериды, и жирные кислоты, в том числе олеиновая кислота.

В способе по настоящему изобретению ингибитор МЕК вводят в терапевтически эффективном количестве.

#### **Применяемые соединения, являющиеся ингибиторами МЕК**

В одном аспекте настоящее изобретение предусматривает ингибитор МЕК для применения в профилактике и/или лечении (способе профилактики и/или лечения) вирусного заболевания.

В одном аспекте настоящее изобретение предусматривает ингибитор МЕК для применения в профилактике и/или лечении (способе профилактики и/или лечения) вирусного заболевания, включающий введение ингибитора МЕК субъекту или пациенту, нуждающемуся в этом.

Вирусное заболевание предпочтительно представляет собой инфекцию, вызываемую вирусом, содержащим РНК с одной отрицательной цепью. Более предпочтительно, вирусное заболевание вызывается вирусом гриппа, еще более предпочтительно, вирусное заболевание вызывается вирусом гриппа А или В. Вирусы гриппа представляют собой, например, H1N1, H5N1, H7N7, H7N9.

Ингибитор МЕК по настоящему изобретению представляет собой CI-1040.

Ингибитор МЕК для применения в настоящем изобретении можно вводить перорально, внутривенно, внутриплеврально, внутримышечно, местно или посредством ингаляции. Ингибитор МЕК предпочтительно вводят посредством назальной ингаляции или перорально.

Применяемый ингибитор МЕК вводят в терапевтически эффективном количестве.

Применяемая фармацевтическая композиция, содержащая ингибитор МЕК, может быть в форме перорально вводимых супензий или таблеток; спреев для носа, стерильных инъекционных препаратов (для внутривенного, внутриплеврального, внутримышечного введения), например, в виде стерильных инъекционных водных или масляных супензий или суппозиториев. При пероральном введении в виде супензии данные композиции получают в соответствии с методиками, доступными в области получения фармацевтических составов, и они могут содержать микрокристаллическую целлюлозу для придания объема, альгиновую кислоту или альгинат натрия в качестве супендирующего средства, метилцеллюлозу в качестве загустителя и подсластители/ароматизаторы, известные в данной области техники. Данные композиции в виде таблеток с немедленным высвобождением могут содержать микрокристаллическую целлюлозу, фосфат дикальция, крахмал, магния стеарат и лактозу и/или другие наполнители, связующие вещества, сухие разбавители, разрыхлители, разбавители и смазывающие средства, известные в данной области техники. Инъекционные растворы или супензии могут быть составлены согласно известным в данной области техники методикам с применением нетоксичных, приемлемых для парентерального введения разбавителей или растворителей, таких как маннит, 1,3-бутандиол, вода, раствор Рингера или изотонический раствор хлорида натрия, или подходящих диспергирующих или увлажняющих и супендирующих средств, таких как стерильные, мягкие, нелетучие масла, в том числе синтетические моно- или диглицериды, и жирные кислоты, в том числе олеиновая кислота.

#### **Применяемая фармацевтическая композиция**

В одном аспекте настоящее изобретение предусматривает фармацевтическую композицию, содержащую ингибитор МЕК, для применения в профилактике и/или лечении вирусного заболевания.

В одном аспекте настоящее изобретение предусматривает фармацевтическую композицию, содержащую ингибитор МЕК, для применения в профилактике и/или лечении вирусного заболевания, включающего введение ингибитора МЕК пациенту, нуждающемуся в этом.

Вирусное заболевание предпочтительно представляет собой инфекцию, вызываемую вирусом, содержащим РНК с отрицательной цепью. Более предпочтительно, вирусное заболевание вызывается вирусом гриппа, еще более предпочтительно, вирусное заболевание вызывается вирусом гриппа А или В. Вирусы гриппа представляют собой, например, H1N1, H5N1, H7N7, H7N9.

Ингибитор МЕК в применяемой фармацевтической композиции по настоящему изобретению представляет собой С1-1040.

Применяемую фармацевтическую композицию по настоящему изобретению, содержащую ингибитор МЕК, вводят пациенту, которым является млекопитающее или птица. Примеры подходящих млекопитающих включают, без ограничения, мышь, крысу, корову, козу, овцу, свинью, собаку, кошку, лошадь, морскую свинку, представителя семейства псовых, хомяка, норку, тюленя, кита, верблюда, шимпанзе, макака-резуса и человека, при этом человек является предпочтительным. Примеры подходящих птиц включают, помимо прочих, без ограничения, индейку, курицу, гуся, утку, чирка, крякву, скворца, шилохвость, чайку, лебедя, цесарку или водоплавающую птицу. В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения представлены пациенты-люди.

Фармацевтическая композиция может быть в форме перорально вводимых супензий или таблеток; спреев для носа, стерильных инъекционных препаратов (для внутривенного, внутриплеврального, внутримышечного введения), например, в виде стерильных инъекционных водных или масляных супензий или суппозиториев. При пероральном введении в виде супензии данные композиции получают в соответствии с методиками, доступными в области получения фармацевтических составов, и они могут содержать микрокристаллическую целлюлозу для придания объема, альгиновую кислоту или альгинат натрия в качестве супендирующего средства, метилцеллюлозу в качестве загустителя и подсластители/ароматизаторы, известные в данной области техники. Данные композиции в виде таблеток с немедленным высвобождением могут содержать микрокристаллическую целлюлозу, фосфат дикальция, крахмал, магния стеарат и лактозу и/или другие наполнители, связующие вещества, сухие разбавители, разрыхлители, разбавители и смазывающие средства, известные в данной области техники. Инъекционные растворы или супензии могут быть составлены согласно известным в данной области техники методикам с применением нетоксичных, приемлемых для парентерального введения разбавителей или растворителей, таких как маннит, 1,3-бутандиол, вода, раствор Рингера или изотонический раствор хлорида натрия, или подходящих диспергирующих или увлажняющих и супендирующих средств, таких как стерильные, мягкие, нелетучие масла, в том числе синтетические моно- или диглицериды, и жирные кислоты, в том числе олеиновая кислота. Ингибиторы МЕК предпочтительно вводят перорально или посредством спрея для носа.

### Комбинированная терапия

Авторы настоящего изобретения в дальнейшем обнаружили, что при комбинированном введении ингибитора МЕК и ингибитора нейраминидазы возникают синергические эффекты в предупреждении и/или лечении вирусных заболеваний, в частности, комбинация ингибитора МЕК и ингибитора нейраминидазы приводит к синергическому эффекту в ингибировании вируса гриппа А и/или вируса гриппа В. В действительности, как показано в данном документе, ингибитор МЕК СІ-1040, который доступен в форме для перорального введения и проходит клинические испытания в фазе I, демонстрирует противовирусную активность как против вируса гриппа А, так и против вируса гриппа В в комбинации с ингибитором нейраминидазы, таким как озельтамивир. Комбинированное лечение в значительной степени повышает противовирусную активность озельтамивира и обуславливает синергический противовирусный эффект, определенный с помощью способа Чоу-Талалая, описанного в данном документе. В совокупности данные результаты демонстрируют повышенную противовирусную активность озельтамивира после комбинирования с ингибитором МЕК. Эти результаты являются многообещающими для дополнительных доклинических *in vitro* и *in vivo* исследований в перспективе разработки новых схем противовирусной терапии гриппа.

Следовательно, настоящее изобретение предусматривает способ профилактики и/или лечения вирусного заболевания, включающий введение ингибитора МЕК в комбинации с ингибитором нейраминидазы пациенту, нуждающемуся в этом.

В способе по настоящему изобретению ингибитор МЕК вводят одновременно с ингибитором нейраминидазы, перед ним или после него. Ингибитор МЕК и ингибитор нейраминидазы предпочтительно вводят одновременно. Их можно вводить в виде одного состава или в отдельных составах.

Вирусное заболевание, подлежащее предупреждению или лечению с помощью комбинированного введения ингибитора МЕК и ингибитора нейраминидазы по настоящему изобретению, предпочтительно представляет собой инфекцию, вызываемую вирусом, содержащим РНК с отрицательной цепью. Более предпочтительно, вирусное заболевание вызывается вирусом гриппа, еще более предпочтительно, вирусное заболевание вызывается вирусом гриппа А или В. Вирусы гриппа представляют собой, например, H1N1, H5N1, H7N7, H7N9. У данных вирусов предпочтительно не проявляется или не развивается устойчивость к ингибитору нейраминидазы. Более предпочтительно, у данных вирусов не проявляется или не развивается устойчивость к ингибитору нейраминидазы, выбранному из карбоксилата озельтамивира (озельтамивира) или фосфата озельтамивира.

Ингибитор МЕК по настоящему изобретению, предназначенный для применения в комбинации с ингибитором нейраминидазы, представляет собой СІ-1040.

Ингибитор нейраминидазы предпочтительно выбран из карбоксилата озельтамивира (озельтамивира) или фосфата озельтамивира.

В способе по настоящему изобретению, где ингибитор МЕК применяют в комбинации с ингибитором нейраминидазы, пациентом является млекопитающее или птица. Примеры подходящих млекопитающих включают, без ограничения, мышь, крысу, корову, козу, овцу, свинью, собаку, кошку, лошадь, морскую свинку, представителя семейства псовых, хомяка, норку, тюленя, кита, верблюда, шимпанзе, макака-резуса и человека. Примеры подходящих птиц включают, помимо прочих, без ограничения, индейку, курицу, гуся, утку, чирка, крякву, скворца, шилохвость, чайку, лебедя, цесарку или водоплавающую птицу. В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения представлены пациенты-люди. В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения представлен пациент-человек.

Следовательно, настоящее изобретение предусматривает способ профилактики и/или лечения вирусного заболевания, включающий введение ингибитора МЕК в комбинации с озельтамивиром или фосфатом озельтамивира пациенту, нуждающемуся в этом.

Комбинация в соответствии с настоящим изобретением представляет собой СІ-1040 или его фармацевтически приемлемую соль и озельтамивир, предпочтительно фосфат озельтамивира.

Ингибитор МЕК по настоящему изобретению можно вводить перорально, внутривенно, внутриплеврально, внутримышечно, местно или посредством ингаляции. Ингибитор МЕК предпочтительно вводят посредством ингаляции или перорально.

Ингибитор нейраминидазы по настоящему изобретению можно вводить перорально, внутривенно, внутриплеврально, внутримышечно, местно или посредством ингаляции. Ингибитор нейраминидазы предпочтительно вводят посредством ингаляции или перорально.

Если ингибитор МЕК и ингибитор нейраминидазы находятся в одном составе, состав можно вводить перорально, внутривенно, внутриплеврально, внутримышечно, местно или посредством ингаляции. Состав предпочтительно вводят перорально или посредством ингаляции.

Следовательно, настоящее изобретение предусматривает способ лечения вирусного заболевания, в частности, вирусного заболевания, при котором инфекция вызывается вирусом, содержащим РНК с отрицательной цепью, более конкретно заболевания, при котором данный вирус представляет собой вирус гриппа А или В, с помощью комбинированной терапии. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения у данного вируса не проявляется или не развивается устойчивость к ингибитору нейраминидазы.

Данный способ включает лечение пациента, нуждающегося в лечении, с помощью терапевтически эффективного количества ингибитора МЕК или его фармацевтически приемлемой соли и ингибитора нейраминидазы, вводимых одновременно или последовательно, как описано ниже.

В одном аспекте предусматривается способ лечения вирусных заболеваний у пациента, включающий (1) введение пациенту, нуждающемуся в лечении, терапевтически эффективного количества соединения, которое представляет собой ингибитор МЕК или его фармацевтически приемлемую соль; и (2) введение указанному пациенту терапевтически эффективного количества озельтамивира или фосфата озельтамивира, что осуществляется одновременно или последовательно. Иначе говоря, в соответствии с данным аспектом способ включает введение терапевтически эффективного количества ингибитора МЕК или его фармацевтически приемлемой соли пациенту, который проходит лечение озельтамивиром или фосфатом озельтамивира, или введение терапевтически эффективного количества озельтамивира или фосфата озельтамивира пациенту, который проходит лечение ингибитором МЕК или его фармацевтически приемлемой солью. Ингибитор МЕК представляет собой СI-1040 или его фармацевтически приемлемую соль для одновременного или последовательного применения в комбинации с ингибитором нейраминидазы, таким как озельтамивир или фосфат озельтамивира, для лечения и/или предупреждения вирусного заболевания.

В другом варианте осуществления настоящего изобретение предусматривает ингибитор нейраминидазы, такой как озельтамивир или его фармацевтически приемлемую соль, например, фосфат озельтамивира, для применения в комбинации с ингибитором МЕК, таким как СI-1040 или его фармацевтически приемлемой солью, для лечения и/или предупреждения вирусного заболевания.

В способах комбинированной терапии по настоящему изобретению ингибитор МЕК, такой как СI-1040, и ингибитор нейраминидазы, такой как озельтамивир или фосфат озельтамивира, можно вводить в одно и то же время или по отдельности, руководствуясь соответствующими режимами или схемами их дозирования. При введении приблизительно в одно и то же время ингибитор МЕК и ингибитор нейраминидазы можно вводить в одной фармацевтической композиции или в отдельных стандартных лекарственных формах.

Например, в одном варианте осуществления комбинированного способа по настоящему изобретению соединение, представляющее собой ингибитор МЕК, можно вводить перорально или посредством ингаляции в эффективных терапевтических дозировках, тогда как ингибитор нейраминидазы можно вводить в дозах согласно режиму дозирования, приведенному в утвержденной инструкции по применению, или меньших. Предпочтительным является введение в более низкой дозировке. Например, согласно этикетке для тамифлю тамифлю вводят в капсулах по 30, или 45, или 75 мг. Дозировка 75 мг дважды в день представляет собой стандартную дозировку для взрослых и подростков. Можно применять более низкую дозировку при введении тамифлю в комбинации с ингибитором МЕК.

В видах последовательной комбинированной терапии, обсуждающихся выше, лекарственные средства предпочтительно вводят в последовательной комбинации в соответствии с их фармакокинетическими профилями таким образом, что второе лекарственное средство вводят после значительного снижения уровня первого лекарственного средства в плазме крови или выведения его оттуда.

Обсуждающиеся выше фармакокинетические профили лекарственных средств, представляющих собой ингибиторы МЕК и ингибиторы нейраминидазы, в целом известны из уровня техники.

Терапевтически эффективное количество активного соединения может варьировать в зависимости от факторов, включающих, без ограничения, активность применяемого соединения, стабильность активного соединения в организме пациента, тяжесть состояний, которые необходимо облегчить, общая масса тела пациента, подлежащего лечению, путь введения, легкость абсорбции, распределения в организме и выделения из организма активного соединения, возраст и чувствительность пациента, подлежащего лечению, нежелательные явления и т.п., что будет очевидно специалисту в данной области. Вводимое количество можно корректировать, поскольку со временем различные факторы изменяются.

Фармацевтические соединения в способе по настоящему изобретению можно вводить в любых подходящих стандартных лекарственных формах. Подходящие составы для перорального применения могут быть в форме таблеток, капсул, суппозиции, сиропа, жевательной резинки, облатки, эликсира и т.п. Фармацевтически приемлемые носители, такие как связующие вещества, наполнители, смазывающие средства и подсластители или ароматизаторы, могут быть включены в фармацевтические композиции для перорального применения. При необходимости также могут быть включены традиционные средства для модификации вкуса, цвета и конфигурации конкретных форм.

Для инъекционных составов фармацевтические композиции могут находиться в форме лиофилизированного порошка в смеси с подходящими наполнителями в подходящих флаконе или пробирке. Перед применением в клинической практике лекарственные препараты можно разводить путем растворения лиофилизированного порошка в подходящей системе растворителей с получением композиции, пригодной для внутривенной или внутримышечной инъекции.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предусмотрена фармацевтическая композиция, содержащая терапевтически эффективное количество ингибитора МЕК, а также терапевтически эффективное количество ингибитора нейраминидазы, выбранного из озельтамивира и фосфата озельта-

мивира.

В одном варианте осуществления композиция может быть в форме для перорального введения (например, в форме таблетки, или капсулы, или сиропа и т.д.) с терапевтически эффективным количеством (например, от 0,1 до 2000 мг, от 0,1 до 1000 мг, от 0,1 до 500 мг, от 0,1 до 200 мг, от 30 до 300 мг, от 0,1 до 75 мг, от 0,1 до 30 мг) ингибитора МЕК и терапевтически эффективным количеством (например, от 0,1 до 2000 мг, от 0,1 до 1000 мг, от 0,1 до 500 мг, от 0,1 до 200 мг, от 30 до 300 мг, от 0,1 до 75 мг, от 0,1 до 30 мг) ингибитора нейраминидазы, как описано выше. Например, согласно этикетке для тамифлю его вводят в капсулах по 30, или 45, или 75 мг. Дозировка 75 мг дважды в день представляет собой стандартную дозировку для взрослых и подростков. Можно применять более низкую дозировку при введении тамифлю в комбинации с ингибитором МЕК.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предусмотрен фармацевтический набор, содержащий в многокамерном контейнере (1) стандартную лекарственную форму ингибитора МЕК, такого как СІ-1040, и (2) стандартную лекарственную форму ингибитора нейраминидазы, такого как озельтамивир или фосфат озельтамивира. Набор необязательно дополнительно содержит инструкции по применению набора в способе комбинированной терапии в соответствии с настоящим изобретением.

Авторами настоящего изобретения было обнаружено, что комбинированный способ по настоящему изобретению обеспечивает синергизм в предупреждении и/или лечении вирусных заболеваний, в частности, в предупреждении и/или лечении инфекции, вызываемой вирусом, содержащим РНК с отрицательной цепью, более конкретно вирусных заболеваний, вызываемых вирусом гриппа. Еще более конкретно - в предупреждении и/или лечении заболеваний, вызываемых вирусом гриппа А или В.

Комбинации по настоящему изобретению можно вводить в количестве, обеспечивающем синергический эффект.

"Синергизм" или "синергический эффект" можно определить как эффект, превышающий аддитивный (Chou, 2006, Pharmacol Reviews, 58: 621-681). Синергические взаимодействия между комбинациями лекарственных средств являются весьма желательными и востребованными, поскольку они могут обуславливать повышение эффективности, снижение дозировки, ослабление побочного токсического действия и минимизация развития устойчивости при применении в клинической практике (Chou, 2006). Двумя наиболее популярными способами оценки взаимодействий лекарственных средств в различных видах комбинированной терапии являются анализ изоболограмм и показателя аддитивности (CI) (Zhao et al., 2004, Clinical Cancer Res 10:7994-8004). В различных исследованиях как в области терапии рака, так и в области противовирусной терапии, где комбинации лекарственных средств используются для противодействия развития устойчивости к лекарственным средствам и для минимизации доз лекарственных средств, для оценки синергизма применяют CI-индекс. CI определяют на основе подхода Чоу-Талалая, описанного в 1984 г. (Adv. Enzyme Regul. 22:27-55), исходя из принципа медианного эффекта и уравнения эффекта для нескольких лекарственных средств. CI можно легко рассчитать с помощью программы CompuSyn (CompuSyn, Парамус, Нью-Джерси). Сам Чоу (Chou 2006) определяет взаимодействие как незначительно выраженное синергическое, если значение CI составляет 0,85-0,9, умеренно выраженное синергическое, если значение CI составляет 0,7-0,85, синергическое, если значение CI составляет 0,3-0,7, сильно выраженное синергическое, если значение CI составляет 0,1-0,3, и очень сильно выраженное синергическое, если значение CI составляет <0,1. В литературе по терапии рака значения CI, которые определяют синергизм, могут варьировать, например, в Lin et al., 2007, Carcinogenesis 28: 2521-2529 синергизм лекарственных средств определяли как CI<1, а в Fischel et al., 2006, Preclinical Report 17: 807-813 синергизм определяли как CI<0,8. Сходные числовые значения применяют в области противовирусной терапии. Например, в Wyles et al., 2008, Antimicrob Agents Chemotherapy 52: 1862-1864 синергизм определен как CI<0,9, а в Gantlett et al., 2007, Antiviral Res 75:188-197 синергизм определен как CI<0,9. С учетом данных литературных источников синергизм можно определить как значения CI<0,9. Все из приведенных выше статей настоящим включены в явной форме в качестве ссылки во всей своей полноте.

Ингибитор МЕК и ингибитор нейраминидазы по настоящему изобретению могут характеризоваться синергическим эффектом в лечении вирусного заболевания, превышающим аддитивный эффект при введении ингибитора МЕК и ингибитора нейраминидазы по отдельности или в комбинации, как предположили по простому аддитивному эффекту двух лекарственных средств. В таком случае синергически эффективное количество ингибитора МЕК является меньшим, чем количество, необходимое для лечения вирусной инфекции, если бы ингибитор МЕК вводили без ингибитора нейраминидазы. Аналогичным образом, синергически эффективное количество ингибитора нейраминидазы является меньшим, чем количество, необходимое для лечения вирусной инфекции, если бы ингибитор нейраминидазы вводили без ингибитора МЕК. Синергическое количество ингибитора МЕК и ингибитора нейраминидазы можно определить по коэффициенту синергизма (значению CI). При определении по коэффициенту синергизма (значению CI) CI составляет менее чем приблизительно 0,9, в качестве альтернативы, менее чем приблизительно 0,85, в качестве альтернативы, менее чем приблизительно 0,8, в качестве альтернативы, менее чем приблизительно 0,75, в качестве альтернативы, менее чем приблизительно 0,7, в качестве альтернативы, менее чем приблизительно 0,65, в качестве альтернативы, менее чем приблизительно 0,6, в качестве альтернативы, менее чем приблизительно 0,55, в качестве альтернативы, менее чем приблизительно

0,5, в качестве альтернативы, менее чем приблизительно 0,45, в качестве альтернативы, менее чем приблизительно 0,4, в качестве альтернативы, менее чем приблизительно 0,35, в качестве альтернативы, менее чем приблизительно 0,3, в качестве альтернативы, менее чем приблизительно 0,25, в качестве альтернативы, менее чем приблизительно 0,2, в качестве альтернативы, менее чем приблизительно 0,15, в качестве альтернативы, менее чем приблизительно 0,1.

Синергический эффект предпочтительно наблюдается в отношении вируса, у которого не проявляется или не развивается устойчивость к ингибитору нейраминидазы.

Комбинированное применение ингибитора МЕК и ингибитора нейраминидазы в соответствии с настоящим изобретением обеспечивает благоприятный терапевтический эффект также и в случае вирусного заболевания, где у данного вируса или штамма вируса проявляется или развивается устойчивость, в частности, устойчивость к ингибитору нейраминидазы. Кроме того, комбинированное применение может содействовать сохранению эффективности обоих лекарственных средств с течением времени для того, чтобы развитие устойчивости не наблюдалось вообще или будет задерживаться во времени.

#### Определения

Во всем данном описании и следующей за ним формуле изобретения, если по контексту не требуется иное, слово "содержать" и его варианты, такие как "содержит" и "содержащий", следует понимать как подразумевающие включение указанного целого числа или этапа или группы целых чисел или этапов, но не исключение любого другого целого числа или этапа или группы целых чисел или этапов. При использовании в данном документе выражение "содержащий" можно заменить выражением "включающий" или иногда, при использовании в данном документе, выражением "имеющий".

При использовании в данном документе "состоящий из" исключает любой элемент, этап или ингредиент, не определенные элементом пункта формулы изобретения. При использовании в данном документе "состоящий главным образом из" не исключает материалы или этапы, которые не оказывают значительного влияния на основные и новые характеристики в пункте формулы изобретения. В каждом конкретном случае в данном документе любое из выражений "содержащий", "состоящий главным образом из" и "состоящий из" можно заменить любым из двух других выражений.

При использовании в данном документе соединительное выражение "и/или" между несколькими перечисляемыми элементами понимается как охватывающее как отдельные, так и объединенные варианты. Например, если два элемента объединены с помощью "и/или", то первый вариант относится к применимости первого элемента без второго. Второй вариант относится к применимости второго элемента без первого. Третий вариант относится к применимости первого и второго элементов вместе. Любой из данных вариантов следует понимать как находящийся в пределах значения и, таким образом, удовлетворяющий требованию используемого в данном документе выражения "и/или". Любой из данных вариантов следует понимать как находящийся в пределах значения и, таким образом, удовлетворяющий требованию используемого в данном документе выражения "и/или". Возможность одновременного применения более чем одного из вариантов также следует понимать как находящуюся в пределах значения и, таким образом, удовлетворяющую требованию используемого в данном документе выражения "и/или".

Используемое в данном документе выражение "вирусное заболевание" включает заболевание, вызываемое вирусом, например, заболевания, вызываемые вирусом, содержащим РНК с отрицательной цепью. Например, вирусы гриппа являются вирусами, содержащими РНК с отрицательной цепью; например, вирусами гриппа А и В. У вируса гриппа или штамма вируса гриппа в соответствии с настоящим изобретением может проявляться или развиваться устойчивость к одному или нескольким ингибиторам нейраминидазы (например, к озельтамивиру или фосфату озельтамивира), или у вируса гриппа или штамма вируса гриппа в соответствии с настоящим изобретением не проявляется или не развивается устойчивость к одному или нескольким ингибиторам нейраминидазы (например, озельтамивиру или фосфату озельтамивира).

Используемое в данном документе выражение "фармацевтически приемлемые соли" относится к относительно нетоксичным, органическим или неорганическим солям активных соединений, в том числе к солям присоединения неорганических или органических кислот указанного соединения.

#### Фигуры

На фиг. 1а, 1б показана противовирусная активность озельтамивира, CI-1040 и озельтамивира + CI-1040 в отношении вируса гриппа.

На фиг. 2 показаны результаты *in vitro* исследований с ингибитором МЕК CI-1040 в отношении вируса гриппа H5N1.

На фиг. 3 показаны результаты пероральной обработки мышей, инфицированных вирусом гриппа, с помощью CI-1040 или PD-03250901.

На фиг. 4 показаны результаты *in vitro* исследований с комбинацией CI-1040 и озельтамивира в отношении вируса гриппа H1N1pdm09.

### Примеры Противовирусные соединения

Карбоксилат озельтамивира (озельтамивир) получали от Toronto Research Chemicals, Inc. и растворяли в стерильном PBS. В *in vitro* исследованиях тестировали ингибитор MEK CI-1040. Ингибитор MEK растворяли в исходной концентрации 10 мМ в DMSO или подходящем растворителе. Из данного раствора готовили серию разведений для достижения желаемой концентрации ингибитора MEK. Поскольку DMSO оказывает влияние на жизнеспособность клеток, в среду добавляли только 1% раствор ингибитора MEK/DMSO. Дополнительные ингибиторы MEK можно тестировать таким же способом, как и тот, что упоминается в данном документе, либо отдельно, либо в комбинации с ингибитором нейраминидазы, таким как озельтамивир.

#### Анализ жизнеспособности клеток (цитотоксичности)

Чтобы определить, будет ли концентрация применяемого для экспериментов ингибитора MEK оказывать воздействие на жизнеспособность клеток, проводили анализ токсичности соединений. Клетки MDCK II высевали в 96-луночные культуральные планшеты при плотности  $8 \times 10^4$  клеток на лунку в минимальной поддерживающей среде (MEM), содержащей 10% инактивированную нагреванием эмбриональную телячью сыворотку (FCS), 100 ед./мл пенициллина, 100 мг/мл стрептомицина. Клетки инкубировали при 37°C с 5% CO<sub>2</sub> в течение ночи. После этого клетки дважды промывали с помощью PBS. К клеткам добавляли MEM, содержащую различные концентрации ингибитора MEK (0,001-1000 мКМ). После добавления ингибитора MEK клетки дополнительно инкубировали в течение 48 ч при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. Далее клетки фиксировали посредством инкубирования в течение 30 мин при 4°C со 100 мкл 4% параформальдегида (PFA). При добавлении 100 мкл кристаллического фиолетового на 30 мин при комнатной температуре окрашивались жизнеспособные клетки. После окрашивания планшеты промывали и высушивали. Для экстракции кристаллического фиолетового из жизнеспособных клеток в каждую лунку добавляли 100 мкл 100% метанола. После инкубирования в течение 30 мин при комнатной температуре экстракцию измеряли с помощью планшет-ридера для твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) при OD = 490 нм. Процент жизнеспособности клеток после обработки противовирусным соединением рассчитывали следующим образом:

$$\text{процент ингибирования} = 100/[(\text{OD 490}) \text{ для контрольного образца клеток} \times (\text{OD 490}) \text{ для обработанного образца}].$$

Значение CC<sub>50</sub> (т.е. концентрация соединения, которая снижает жизнеспособность клеток на 50%) определяли с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 5 путем построения кривой зависимости процента жизнеспособности клеток от концентрации соединения.

#### Синергизм

Для тестирования синергизма ингибитора нейраминидазы и ингибитора MEK оценивали IC<sub>50</sub> ингибитора MEK CI-1040 в комбинации с ингибитором нейраминидазы в отношении вируса гриппа A в эпителиальных клетках adenокарциномы легкого человека (A549).

Карбоксилат озельтамивира, CI-1040 и карбоксилат озельтамивира, смешанный с CI-1040 в соотношении 1:1 (из расчета концентрации в мКг/мл) (см. фиг. 1a, 1b).

В эксперименте для комбинации лекарственных средств рассчитывали значение CI при ED50, ED75, ED90 и ED95 (дозе комбинации лекарственных средств, вызывающей эффект, например, снижение титра вируса на 50, 75, 90 и 95% в надосадочной жидкости культуры клеток). Коэффициенты синергизма (значения CI) для различных комбинаций приведены в таблице ниже и на фиг. 1b. Значения CI рассчитывали с помощью программы CompuSyn (CompuSyn, Парамус, Нью-Джерси). Для карбоксилата озельтамивира значение CI составляло ≤0,53, что демонстрировало значительный синергизм карбоксилата озельтамивира и ингибитора MEK. Данный синергизм является неожиданным и уникальным в области противовирусных средств против гриппа.

Карбоксилат озельтамивира				
	ED50	ED75	ED90	ED95
CI-1040	0,5202	0,4010	0,3987	0,4412

#### Дополнительные *in vitro* и *in vivo* исследования

*In vitro* исследования с ингибитором MEK CI-1040 в отношении вируса гриппа H5N1.

Клетки MDCK II инфицировали A/Mallard/Bavaria/01/2006 (MB1, H5N1) при MOI 0,001. Через 30 мин клетки обрабатывали CI-1040 в течение 24 ч.

На фиг. 2 можно увидеть, что ингибитор MEK CI-1040 является высокоеффективным в отношении различных штаммов вируса гриппа в культуре клеток. CI-1040 также является эффективным в отношении пандемического H1N1 (RB1) и FPV.

Пероральная обработка мышей, инфицированных вирусом гриппа, с помощью CI-1040 или PD-03250901.

За 8 ч до инфицирования мышей BL/6 обрабатывали (перорально) с помощью CI-1040, PD-

03250901 (25 мг/кг) или растворителя. Через полных 8 ч в момент времени, соответствующий инфицированию (A/Regensburg/D6/09, H1N1pdm09, RBI, 5-кратная MLD50), мышей снова обрабатывали (всего 4). Через 24 ч после инфицирования определяли титр вируса в легких (n=5).

На фиг. 3 можно увидеть, что ингибиторы MEK CI-1040 и PD-03250901 являются эффективными в снижении титра вируса в легких мышей, инфицированных H1N1pdm09.

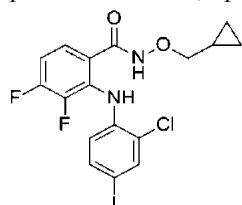
In vitro исследования с комбинацией CI-1040 и озельтамивира в отношении вируса гриппа H1N1pdm09.

Клетки A549 инфицировали H1N1pdm09 (RBI) при MOI 0,001. Через 30 мин клетки обрабатывали CI-1040 или озельтамивиром в отдельности в течение 24 ч.

На фиг. 4 можно увидеть, что комбинация CI-1040 и озельтамивира против H1N1pdm09 является высокоэффективной в отношении H1N1pdm09 в культуре клеток.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение комбинации ингибитора MEK CI-1040, представленного структурной формулой



или его фармацевтически приемлемой соли с ингибитором нейраминидазы для профилактики и/или лечения вирусного заболевания, где указанный ингибитор нейраминидазы представляет собой озельтамивир или его фармацевтически приемлемые соли.

2. Применение по п.1, где вирусное заболевание представляет собой инфекцию, вызываемую вирусом, содержащим РНК с отрицательной цепью.

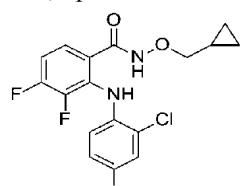
3. Применение по п.2, где вирус представляет собой вирус гриппа.

4. Применение по п.3, где вирус представляет собой вирус гриппа А или вирус гриппа В.

5. Применение по любому из предыдущих пунктов, где ингибитор MEK или его фармацевтически приемлемая соль вводятся одновременно с ингибитором нейраминидазы или его фармацевтически приемлемой солью, перед ними или после них.

6. Применение по любому из предыдущих пунктов, где фармацевтически приемлемой солью озельтамивира является фосфат озельтамивира.

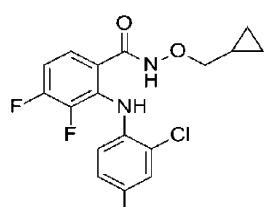
7. Фармацевтическая композиция для профилактики и/или лечения вирусного заболевания, содержащая комбинацию ингибитора MEK CI-1040, представленного структурной формулой



или его фармацевтически приемлемой соли с ингибитором нейраминидазы, где указанный ингибитор нейраминидазы представляет собой озельтамивир или его фармацевтически приемлемые соли.

8. Фармацевтическая композиция по п.7, где фармацевтически приемлемой солью озельтамивира является фосфат озельтамивира.

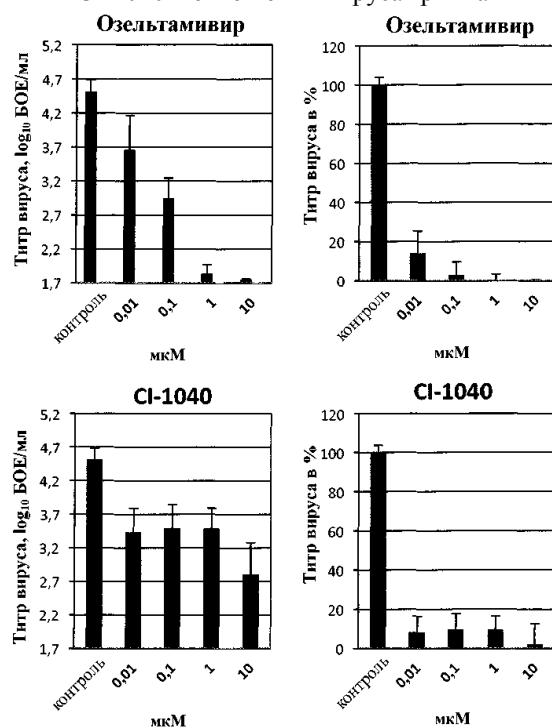
9. Применение фармацевтической композиции, содержащей комбинацию ингибитора MEK CI-1040, представленного структурной формулой



или его фармацевтически приемлемой соли с ингибитором нейраминидазы, где указанный ингибитор нейраминидазы представляет собой озельтамивир или его фармацевтически приемлемые соли, в качестве лекарственного препарата для профилактики и/или лечения вирусного заболевания.

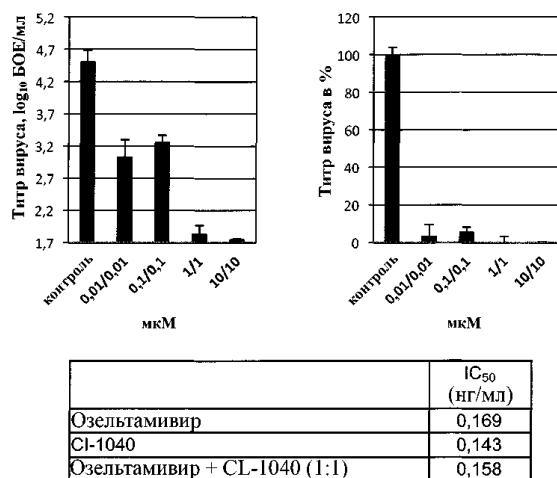
10. Применение по п.9, где фармацевтически приемлемой солью озельтамивира является фосфат озельтамивира.

Противовирусная активность озельтамивира или  
CI-1040 в отношении вируса гриппа



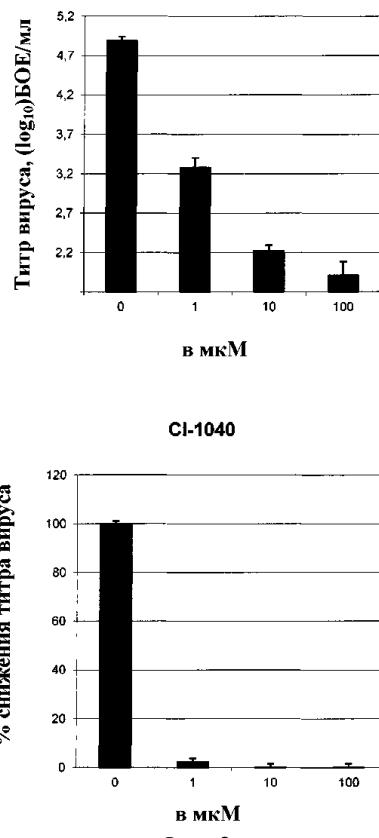
Фиг. 1а

Комбинация озельтамивира и CI-1040  
Озельтамивир/CL-1040      Озельтамивир/CL-1040



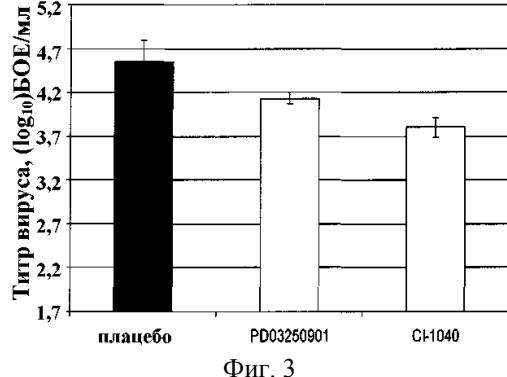
Фиг. 1б

In vitro исследования с ингибитором MEK CI-1040  
в отношении вируса гриппа H5N1  
**CI-1040**



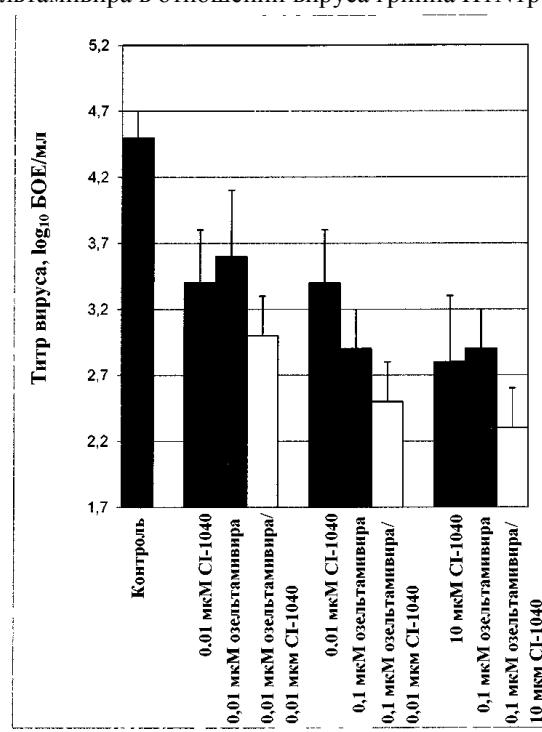
Фиг. 2

Пероральная обработка мышей, инфицированных вирусом гриппа, с помощью CI-1040 или PD-03250901



Фиг. 3

In vitro исследования с комбинацией CI-1040 и  
озельтамивира в отношении вируса гриппа H1N1pdm09



Фиг. 4

