



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.03.24

(21) Номер заявки
201692303

(22) Дата подачи заявки
2015.05.18

(51) Int. Cl. *A61K 31/277* (2006.01)
A61K 31/216 (2006.01)
A61K 31/4439 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
A61P 31/16 (2006.01)
C12Q 1/18 (2006.01)

(54) ПРИМЕНЕНИЕ ИНГИБИТОРА МЕК ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ КОИНФЕКЦИИ,
ВКЛЮЧАЮЩЕЙ БАКТЕРИАЛЬНУЮ ИНФЕКЦИЮ И ИНФЕКЦИЮ, ВЫЗВАННУЮ
ВИРУСОМ ГРИППА

(31) 92455

(32) 2014.05.16

(33) LU

(43) 2017.03.31

(86) PCT/IB2015/053644

(87) WO 2015/173788 2015.11.19

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
АТРИВА ТЕРЕПЬЮТИКС ГМБХ
(DE)

(72) Изобретатель:
Эрхардт Кристина, Людвиг Штефан
(DE)

(74) Представитель:
Носырева Е.Л. (RU)

(56) LUDWIG S ET AL: "MEK inhibition impairs influenza B virus propagation without emergence of resistant variants", FEBS LETTERS, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 561, no. 1-3, 12 March 2004 (2004-03-12), pages 37-43, XP004495449, ISSN: 0014-5793, DOI: 10.1016/S0014-5793(04)00108-5 abstract

Y. BORGELING ET AL: "Inhibition of p38 Mitogen-activated Protein Kinase Impairs Influenza Virus-induced Primary and Secondary Host Gene Responses and Protects Mice from Lethal H5N1 Infection", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 289, no. 1, 4 November 2013 (2013-11-04), pages 13-27, XP055161048, ISSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/jbc.M113.469239 abstract
US-A1-2012017892

DATABASE BIOSIS [Online] BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 16 November 2002 (2002-11-16), BAKKER FRANK ET AL: "MEK1/2 Inhibitor U0126 Blocks Activation of the JAK/STAT Pathway in Malignant Plasma

Cell Tumors.", XP002734329, Database accession no. PREV200300337084 abstract & BLOOD, vol. 100, no. 11, 16 November 2002 (2002-11-16), page Abstract No. 2386, 44TH ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY OF HEMATOLOGY, PHILADELPHIA, PA, USA; DECEMBER 06-10, 2002 ISSN: 0006-4971

MUNIYAPPA ET AL: "Activation of c-Jun N-terminal kinase (JNK) by widely used specific p38 MAPK inhibitors SB202190 and SB203580: A MLK-3-MKK7-dependent mechanism", CELLULAR SIGNALLING, ELSEVIER SCIENCE LTD, GB, vol. 20, no. 4, 8 December 2007 (2007-12-08), pages 675-683, XP022486417, ISSN: 0898-6568, DOI: 10.1016/J.CELLSIG.2007.12.003 abstract; figure 1

TOTH L ET AL: "Mechanism of the irreversible inhibition of human cyclooxygenase-1 by aspirin as predicted by QM/MM calculations", JOURNAL OF MOLECULAR GRAPHICS AND MODELLING, ELSEVIER SCIENCE, NEW YORK, NY, US, vol. 40, 9 January 2013 (2013-01-09), pages 99-109, XP028981038, ISSN: 1093-3263, DOI: 10.1016/J.JMGM.2012.12.013 abstract

LOEFFLER BETTINA ET AL: "Pathogenesis of Staphylococcus aureus necrotizing pneumonia: the role of PVL and an influenza coinfection", EXPERT REVIEW OF ANTI-INFECTIVE THERAPY, vol. 11, no. 10, October 2013 [2013-10], pages 1041-1051, XP009181895, page 1043, left-hand column, first paragraph; page 1046, right-hand column

JP-A-2007055983

Kyros Ipaktchi ET AL: "Topical p38 MAPK Inhibition Reduces Bacterial Growth on Burn Wounds in an in vivo Burn Model NIH Public Access INTRODUCTION", 1 July 2008 (2008-07-01), pages 1-14, XP055160894, Retrieved from the Internet: URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2000830/pdf/nihms27502.pdf> [retrieved on 2015-01-09] 4th paragraph on page 2; 3rd paragraph on page 5; paragraph bridging page 6 and 7
US-A1-2003232998

(57) Настоящее изобретение относится к применению ингибитора МЕК для лечения коинфекции, включающей бактериальную инфекцию, опосредованную бактерией, выбранной из группы, включающей Staphylococcaceae и/или Streptococcaceae, и инфекцию, вызванную вирусом гриппа, где ингибитор МЕК выбран из группы, включающей CI-1040 и GDC-0973. Также предусмотрена композиция, содержащая такой ингибитор для применения в способе лечения коинфекции, включающей бактериальную инфекцию и инфекцию, вызванную вирусом гриппа.

Область изобретения

Настоящее изобретение относится к применению ингибитора МЕК для лечения коинфекции, включающей бактериальную инфекцию и инфекцию, вызванную вирусом гриппа. Также предусмотрена композиция, содержащая такой ингибитор, для применения при лечении коинфекции, включающей бактериальную инфекцию и инфекцию, вызванную вирусом гриппа.

Предпосылки создания изобретения

Вирусы гриппа А являются возбудителем тяжелых респираторных заболеваний, которые приводят к значительной частоте осложнений и смертности. Большая часть летальных исходов во время инфекции вируса гриппа (IV) фактически является результатом вторичной пневмонии, вызванной различными бактериями, такими как *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Streptococcus pneumoniae* и *Haemophilus influenzae* (Morens et al., 2008, Chertow et al., 2013). Наиболее острые проблемы в отношении бактериальной коинфекции заключаются в непредвиденном повышении патогенности (Iwao et al., 2012, Paddock et al., 2012, Parker et al., 2012) и ограниченном наборе эффективных противоинфекционных средств против различных патогенов. Главными причинами неудовлетворительных результатов лечения являются высокая изменчивость вирусов гриппа и постоянное появление новых штаммов (Neumann et al., 2009, Taubenberger et al., 2010, Parry, 2013), определенные свойства бактериальных штаммов (Grundmann et al., 2006, Moran et al., 2006, Gillet et al., 2007, Shilo et al., 2011), а также быстрое развитие устойчивости как вирусов гриппа (Hayden et al., 1992, Bright et al., 2006, Pinto et al., 2006, De Clercq et al., 2007, Pinto et al., 2007), так и бактерий (Grundmann et al., 2006, Moran et al., 2006, Shilo et al., 2011) против доступных лекарственных средств/антибиотиков. Более того, характерным является то, что в настоящее время лечение коинфекций, вызванных вирусами гриппа и бактериями, не предоставляется возможным с применением одного соединения. Согласно настоящему изобретению данная проблема решается в том аспекте, что предлагается противовоспалительная стратегия против коинфекций, включающих бактериальную инфекцию, опосредованную бактерией, выбранной из группы, включающей *Staphylococcaceae* и/или *Streptococcaceae*, и инфекцию, вызванную вирусом гриппа, с применением одного лекарственного средства. Кроме того, согласно настоящему изобретению решается проблема быстрого развития устойчивости бактерий путем получения лекарственного средства, которое целенаправленно воздействует на клеточные факторы, а не на саму бактерию.

Сущность изобретения

Техническая задача решается при помощи отображенных в формуле изобретения вариантов осуществления, описанных в настоящем описании, и проиллюстрированных в примерах и на фигурах.

Как было указано ранее, настоящее изобретение относится к применению ингибитора МЕК для лечения коинфекций, включающей бактериальную инфекцию и инфекцию, вызванную вирусом гриппа.

Несмотря на интенсивные исследования в прошлом веке, IV все еще представляет серьезную опасность для человечества. Сезонные вспышки заболевания, которые особенно опасны для лиц пожилого возраста и лиц с ослабленным иммунитетом, связаны с инфекциями, вызванными вирусами гриппа А или В.

В течение последних десятилетий наблюдается повышение частоты возникновения метициллин-резистентных штаммов *S. aureus*, вызывающие проблемы, особенно у младенцев и детей, которые одновременно были инфицированы IV (Iverson et al., 2011, Thorburn et al., 2012). Одной из основных проблем, возникающих при бактериальных коинфекциях, является непредвиденное и сильное повышение патогенности, которое, вероятно, обусловлено ускоренной экспрессией цитокина, что также приводит к повреждению тканей. В частности, при коинфекции, вызванной лейкоцидином Пантон-Валентина (PVL), экспрессируемым *S. aureus*, наблюдается тяжелое повреждение эпителия легкого, вызванное неконтролируемым высвобождением протеаз после опосредованного PVL уничтожения нейтрофилов (Gillet et al., 2007, Niemann et al., 2012). Бактериальные коинфекции обычно появляются в течение первых шести дней после инфекции IV, приводя к еще более быстрому развитию болезни, воспалению легких и повышению смертности (Iverson et al., 2011, Chertow et al., 2013). Однако в некоторых случаях бактериальная коинфекция возникает, когда, как кажется, вирусная инфекция уже устранена. Для лечения вирусных/бактериальных коинфекций существуют только ограниченные возможности.

Одна перспективная противовирусная стратегия для борьбы с гриппом основана на факте, что IV, будучи внутриклеточными патогенами, сильно зависят от клеточных сигнальных систем (Gong et al., 2009, Ludwig, 2009). IV приобрели способность захватывать клеточные факторы для своих собственных целей (Ludwig et al., 2003). Более того, IV способны подавлять врожденный иммунный ответ своих хозяев. С учетом этих зависимостей, клеточные функции, способствующие поддержанию вируса, являются наиболее перспективными кандидатами для нового противовирусного воздействия (Ludwig et al., 2003, Ludwig, 2011, Planz, 2013). В последние годы исследователи выявили, что подходящими мишенями в подходе к противовирусной терапии являются пути передачи сигнала в рамках сигнального каскада митоген-активируемых киназ

Raf/MEK/ERK (Pleschka et al., 2001, Ludwig et al., 2004, Olschlager et al., 2004, Marjuki et al., 2006, Ludwig, 2009, Droebner et al., 2011), модуль IKK/NFκB (Pleschka et al., 2001, Wurzer et al., 2004, Marjuki et al., 2006, Mazur et al., 2007, Ludwig et al., 2008, Dudek et al., 2010, Droebner et al., 2011, Ehrhardt et al., 2013, Haasbach et al., 2013), сигнальный путь p38 (Borgeling et al., 2014), а также сигнальный путь PI3K (Ehrhardt et al., 2006, Ehrhardt et al., 2007a, Ehrhardt et al., 2007b, Ehrhardt et al., 2009, Eierhoff et al., 2010).

Целенаправленное воздействие на клеточные, а не вирусные факторы, предупреждает проблему устойчивости, поскольку патоген не может заменить утраченную клеточную функцию. Для некоторых клеточных факторов химические соединения являются доступными даже несмотря на то, что на ранней стадии некоторые из них уже прошли клиническое испытание или даже уже лицензированы. В отличие от репликации IV, деление *S. aureus* не зависит от клетки-хозяина. Новые антибактериальные альтернативные средства не нацелены на важные генные продукты, вырабатываемые патогеном, а ингибируют вирусные факторы в ходе инфекции, вызванной *S. aureus*, без уничтожения бактерии или стимуляции иммунитета хозяина (Park et al., 2012). С помощью других стратегий предупреждают образование колоний *S. aureus* у человека в качестве хозяина (Park et al., 2012). Такие соединения также характеризуются более низкой способностью к индукции устойчивости. За последнее время накопились данные, что *S. aureus* также использует клеточные сигнальные пути для собственной выгоды во время инфекции (Oviedo-Boयोso et al., 2011), однако такие клеточные факторы, способствующие поддержанию бактерий, до сих пор не были подробно охарактеризованы в качестве мишеней для антибактериальной терапии.

Неожиданно было обнаружено, что лекарственные средства против внутриклеточных сигнальных факторов, таких как NFκB, киназы MEK или p38 MAP, которые, как было показано ранее, обладают противогриппозной активностью, также характеризуются активностью в отношении *S. aureus* и обеспечивают снижение титров как вирусов, так и бактерий в случае коинфекции. Таким образом, такие ингибиторы элементов пути передачи сигнала являются наиболее перспективными кандидатами для лечения вызванных IV или только *S. aureus* инфекций, однако, что наиболее важно, для лечения тяжелого гриппа с сопутствующей бактериальной коинфекцией.

В одном варианте осуществления ингибитор MEK предназначен для лечения коинфекции в соответствии с настоящим изобретением, где бактериальная инфекция опосредована бактерией, выбранной из группы, включающей *Staphylococcaceae* и/или *Streptococcaceae*.

В другом варианте осуществления ингибитор MEK предназначен для лечения коинфекции в соответствии с настоящим изобретением, где инфекция вируса гриппа опосредована вирусом гриппа А или вирусом гриппа В, при этом предпочтительно вирус гриппа А представляет собой H1N1, H2N2, H3N2, H6N1, H7N7, H7N9, H9N2 H10N7, H10N8 или H5N1.

В дополнительных вариантах осуществления ингибитор MEK предназначен для лечения коинфекции в соответствии с настоящим изобретением у позвоночного.

Также в настоящем изобретении предусмотрена композиция, содержащая ингибитор MEK, для применения в способе лечения коинфекции, включающей бактериальную инфекцию опосредованную бактерией, выбранной из группы, включающей *Staphylococcaceae* и/или *Streptococcaceae*, и инфекцию, вызванную вирусом гриппа, где ингибитор MEK выбран из группы, включающей CI-1040 и GDC-0973. Предпочтительно композиция дополнительно содержит носитель.

Краткое описание графических материалов

На фигурах показано.

Фиг. 1 - шкала времени процедуры коинфицирования. Клетки инфицировали IV в течение 30 мин. Проводили коинфицирование с помощью *S. aureus* 6850, или клетки были подвергнуты имитационной обработке. Внеклеточные бактерии лизировали и удаляли при обработке антибиотиком спустя 3 ч после инфицирования бактериями. После промывания в PBS клетки дополняли свежей средой (DMEM/INV) и инкубировали не более 18 ч после инфицирования вирусом.

Фиг. 2 - ингибитор MEK U0126 обеспечивает снижение титров IV (A/Puerto Rico/8/34) и нагрузки *S. aureus* даже в случае коинфицирования. Эпителиальные клетки легкого человека высевали в 6-луночные планшеты (8×10^5 клеток/луноку) в 2 мл DMEM [10% FCS]. Спустя 16-20 ч после высевания клетки промывали и инкубировали с PBS/BA [0,2% альбумина бычьей сыворотки (BSA), 1 mM MgCl₂, 0,9 mM CaCl₂, 100 ед/мл пенициллина, 0,1 мг/мл стрептомицина] (500 мкл на 6 лунок) или PBS/BA, содержащем вирус гриппа A/Puerto Rico/8/34, при множественном инфицировании (MOI=0,1) при 37°C. После 30 мин инкубации разбавленный вирус отсасывали, клетки промывали PBS и дополняли средой для заражения DMEM/INV [1% альбумина сыворотки человека, 25 нмоль/л HEPES] (2 мл на 6 лунок) с *S. aureus* 6850 или без него (MOI=0,5) в присутствии 50 мкМ U0126 или DMSO (растворитель в качестве контроля). Спустя 3 ч после инфицирования бактериями, клетки обрабатывали антибиотиками для удаления внеклеточных бактерий. Следовательно клетки промывали PBS и затем инкубировали с

DMEM/INV, содержащей антибиотика [2 мкг/мл лизостафина (Sigma)], (1 мл на 6 лунок) в течение 20 мин при 37°C. После дополнительного промывания PBS клетки дополняли DMEM/INV, содержащей 50 мкМ U0126 или DMSO и 0,333 мкг/мл трипсина (Invitrogen). После периода инкубации в течение дополнительных 14 ч при 37°C определяли титры IV и внутриклеточных бактерий, как описано в (Hrincius et al., 2010; Tuchscher et al., 2011).

Титры IV представлены в виде бляшкообразующих единиц (БОЕ)/мл (А, С), а титры *S. aureus* представлены в виде колониеобразующих единиц (КОЕ)/мл (В, D). Данные представляют средние значения \pm SD трех независимых экспериментов с двумя биологическими образцами. Статистическую значимость оценивали с помощью двустороннего двухвыборочного t-критерия (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). (Е) *S. aureus* в присутствии 50 мкМ U0126 приводит к снижению титров бактерий при инкубации в течение 18 ч в сравнении с обработкой бактерий с помощью DMSO. Определенное количество *S. aureus* 6850 суспензионной культуры разбавляли в DMEM/INV, дополненной 50 мкМ U0126 или DMSO, и инкубировали при 37°C в течение 18 ч. Бактерии разбавляли и определяли с применением серийного разведения на чашках с агаром. Данные представляют средние значения \pm SD трех независимых экспериментов с двумя биологическими образцами. Статистическую значимость оценивали с помощью двустороннего двухвыборочного t-критерия (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Фиг. 3 - ингибитор MEK U0126 обеспечивает снижение титров IV (A/FPV/Bratislava/79) и нагрузки *S. aureus* даже в случае коинфицирования. Эпителиальные клетки легкого человека высевали в 6-луночные планшеты (8×10^5 клеток/лунку) в 2 мл DMEM [10% FCS]. Спустя 16-20 ч после высевания клетки промывали и инкубировали с PBS/BA [0,2% альбумина бычьей сыворотки (BSA), 1 мМ $MgCl_2$, 0,9 мМ $CaCl_2$, 100 ед/мл пенициллина, 0,1 мг/мл стрептомицина] (500 мкл на 6 лунок) или PBS/BA, содержащем вирус гриппа A/FPV/Bratislava/79, при множественном инфицировании (MOI=0,001) при 37°C. После 30 мин инкубации разбавленный вирус отсасывали, клетки промывали PBS и дополняли средой для заражения DMEM/INV [1% альбумина сыворотки человека, 25 нмоль/л HEPES] (2 мл на 6 лунок) с *S. aureus* 6850 или без него (MOI=0,5) в присутствии 50 мкМ U0126 или DMSO (растворитель в качестве контроля). Спустя 3 ч после инфицирования бактериями, клетки обрабатывали антибиотиками для удаления внеклеточных бактерий. Следовательно клетки промывали PBS и затем инкубировали с DMEM/INV, содержащей антибиотика [2 мкг/мл лизостафина (Sigma)], (1 мл на 6 лунок) в течение 20 мин при 37°C. После дополнительного промывания PBS клетки дополняли DMEM/INV, содержащей 50 мкМ U0126 или DMSO. После периода инкубации в течение дополнительных 14 ч при 37°C определяли титры IV и внутриклеточных бактерий, как описано в (Hrincius et al., 2010; Tuchscher et al., 2011). Титры IV представлены в виде бляшкообразующих единиц (БОЕ)/мл (А, С), а титры *S. aureus* представлены в виде колониеобразующих единиц (КОЕ)/мл (В, D). Данные представляют средние значения \pm SD двух независимых экспериментов с двумя биологическими образцами. Статистическую значимость оценивали с помощью двустороннего двухвыборочного t-критерия (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Фиг. 4 - ингибитор р38 SB202190 обеспечивает снижение титров IV и нагрузки *S. aureus* даже в случае коинфицирования. Эпителиальные клетки легкого человека высевали в 6-луночные планшеты (8×10 клеток/лунку) в 2 мл DMEM [10% FCS]. Спустя 16-20 ч после высевания клетки промывали и инкубировали с PBS/BA [0,2% альбумина бычьей сыворотки (BSA), 1 мМ $MgCl_2$, 0,9 мМ $CaCl_2$, 100 ед/мл пенициллина, 0,1 мг/мл стрептомицина] (500 мкл на 6 лунок) или PBS/BA, содержащем вирус гриппа A/Puerto Rico/8/34, при множественном инфицировании (MOI=0,1) при 37°C. После 30 мин инкубации разбавленный вирус отсасывали, клетки промывали PBS и дополняли средой для заражения DMEM/INV [1% альбумина сыворотки человека, 25 нмоль/л HEPES] (2 мл на 6 лунок) с *S. aureus* 6850 или без него (MOI=0,5) в присутствии 10 мкМ SB202190 или DMSO (растворитель в качестве контроля). Спустя 3 ч после инфицирования бактериями клетки обрабатывали антибиотиками для удаления внеклеточных бактерий. Следовательно клетки промывали PBS и затем инкубировали с DMEM/INV, содержащей антибиотика [2 мкг/мл лизостафина (Sigma)], (1 мл на 6 лунок) в течение 20 мин при 37°C. После дополнительного промывания PBS клетки дополняли DMEM/INV, содержащей 10 мкМ SB202190 или DMSO и 0,333 мкг/мл трипсина (Invitrogen). После периода инкубации в течение дополнительных 14 ч при 37°C определяли титры IV и внутриклеточных бактерий, как описано в (Hrincius et al., 2010; Tuchscher et al., 2011). Титры IV представлены в виде бляшкообразующих единиц (БОЕ)/мл (А, С), а титры *S. aureus* представлены в виде колониеобразующих единиц (КОЕ)/мл (В, D). Данные представляют средние значения \pm SD трех независимых экспериментов с двумя биологическими образцами. Статистическую значимость оценивали с помощью двустороннего двухвыборочного t-критерия (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Фиг. 5 - ингибитор NF-каппаВ (NFκB) LG-ASA обеспечивает снижение титров IV и нагрузки *S. aureus* даже в случае коинфицирования. Эпителиальные клетки легкого человека высевали в 6-луночные планшеты (8×10 клеток/лунку) в 2 мл DMEM [10% FCS]. Спустя 16-20 ч после высевания клетки промывали и инкубировали с PBS/BA [0,2% альбумина бычьей сыворотки (BSA), 1 мМ $MgCl_2$, 0,9 мМ $CaCl_2$, 100 ед/мл пенициллина, 0,1 мг/мл стрептомицина] (500 мкл на 6 лунок) или PBS/BA, содержащем вирус

гриппа A/Puerto Rico/8/34, при множественном инфицировании ($MOI=0,1$) при $37^{\circ}C$. После 30 мин инкубации разбавленный вирус отсасывали, клетки промывали PBS и дополняли средой для заражения DMEM/INV [1% альбумина сыворотки человека, 25 нмоль/л HEPES] (2 мл на 6 лунок) с *S. aureus* 6850 или без него ($MOI=0,5$) в присутствии 5 мМ LG-ASA. Воду применяли в качестве контрольного растворителя. Спустя 3 ч после инфицирования бактериями, клетки обрабатывали антибиотиками для удаления внеклеточных бактерий. Следовательно клетки промывали PBS и затем инкубировали с DMEM/INV, содержащей антибиотика [10% FBS, 2 мкг/мл лизостафина (Sigma)], (1 мл на 6 лунок) в течение 20 мин при $37^{\circ}C$. После дополнительного промывания PBS клетки дополняли DMEM/INV, содержащей 5 мМ LG-ASA или воды и 0,333 мкг/мл трипсина (Invitrogen). После периода инкубации в течение дополнительных 14 ч при $37^{\circ}C$ определяли титры IV и внутриклеточных бактерий, как описано в (Hrincius et al., 2010, Tuchscher et al., 2011). Титры IV представлены в виде бляшкообразующих единиц (БОЕ)/мл (А, С), а титры *S. aureus* представлены в виде колониеобразующих единиц (КОЕ)/мл (В, D). Данные представляют средние значения \pm SD двух независимых экспериментов (титр вируса) и трех независимых экспериментов (титр бактерий) с двумя биологическими образцами. Статистическую значимость оценивали с помощью двустороннего двухвыборочного t-критерия (* $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$).

Фиг. 6 - амифлю в качестве ингибитора вирусной нейраминидазы снижает уровень репликации IV, однако увеличивает нагрузку *S. aureus*.

Эпителиальные клетки легкого человека высевали в 6-луночные планшеты (8×10^5 клеток/лунку) в 2 мл DMEM [10% FCS]. Спустя 16-20 ч после посева клетки промывали и инкубировали с PBS/BA [0,2% альбумина бычьей сыворотки (BSA), 1 мМ $MgCl_2$, 0,9 мМ $CaCl_2$, 100 ед/мл пенициллина, 0,1 мг/мл стрептомицина] (500 мкл на 6 лунок) или PBS/BA, содержащем вирус гриппа A/FPV/Bratislava/79, при множественном инфицировании ($MOI=0,1$) при $37^{\circ}C$. После 30 мин инкубации разбавленный вирус отсасывали, клетки промывали PBS и дополняли средой для заражения DMEM/INV [1% альбумина сыворотки человека, 25 нмоль/л HEPES] (2 мл на 6 лунок) с *S. aureus* 6850 или без него ($MOI=0,5$) в присутствии 2 мМ тамифлю или Нерес (растворитель в качестве контроля). Спустя 3 ч после инфицирования бактериями, клетки обрабатывали антибиотиками для удаления внеклеточных бактерий.

Следовательно клетки промывали PBS и затем инкубировали с DMEM/INV, содержащей антибиотика [2 мкг/мл лизостафина (Sigma)], (1 мл на 6 лунок) в течение 20 мин при $37^{\circ}C$. После дополнительного промывания PBS клетки дополняли DMEM/INV, содержащей 2 мМ тамифлю или НЕРЕС. После периода инкубации в течение дополнительных 14 ч при $37^{\circ}C$ определяли титры IV и внутриклеточных бактерий, как описано в (Hrincius et al., 2010; Tuchscher et al., 2011).

Фиг. 7 - титры внутриклеточных *S. aureus* 6850 снижаются при обработке LG-ASA. Эпителиальные клетки легкого человека (A549) инфицировали с помощью 0,5 MOI *S. aureus* 6850 в DMEM/INV [1% альбумина сыворотки человека, 25 нмоль/л HEPES] в течение 3 ч в присутствии (А, С) и в отсутствие (В, D) в указанных количествах LG-ASA. Через три часа после инфицирования включали промывание с антибиотиком с применением DMEM/INV, содержащей антибиотика [2 мкг/мл лизостафина (Sigma)], для удаления непоглощенных бактерий, а затем клетки дополняли DMEM/INV, содержащей указанные количества LG-ASA. Морфологию клетки наблюдали с помощью световой микроскопии (А, В), а количества поглощенных бактерий определяли с применением серийного разведения на чашках с агаром спустя 18 ч после инфицирования (С, D).

Фиг. 8 (табл. 2) - ингибиторы р38.

Фиг. 9 (табл. 3) - ингибиторы NF κ B.

Фиг. 10 (табл. 4) - ингибиторы NF κ B.

Фиг. 11 (табл. 5) - антибиотики.

Фиг. 12 - шкала времени процедуры коинфицирования *in vitro*. Эпителиальные клетки легкого человека (A549) инфицировали вирусом гриппа А (IAV) в течение 30 мин при указанном множественном инфицировании (MOI), растворенном в PBS/BA [0,2% альбумина бычьей сыворотки, 1 мМ $MgCl_2$, 0,9 мМ $CaCl_2$, 100 ед/мл пенициллина, 0,1 мг/мл стрептомицина] при $37^{\circ}C$. После 30 мин инкубации разбавленный вирус отсасывали, клетки промывали PBS. После чего осуществляли инфицирование бактериями *Staphylococcus aureus* 6850 (*S. aureus*), или клетки были подвергнуты имитационной обработке. Следовательно клетки дополняли средой для заражения DMEM/INV [1% альбумина сыворотки человека, 25 нмоль/л, HEPES] с *S. aureus* или без него, в дополнение к указанным количествам ингибитора (U0126 или CI-1040) или растворителя в качестве контроля. Спустя 3 ч после инфицирования бактериями включали промывание с антибиотиком [DMEM, 10% FBS, 2 мкг/мл лизостафина или 100 мкг/мл гентамицина, 20 мин] для удаления непоглощенных бактерий. После дополнительного промывания PBS клетки дополняли средой для инфицирования DMEM (0,2% BA, 1 мМ $MgCl_2$, 0,9 мМ $CaCl_2$, 100 ед/мл пенициллина, 0,1 мг/мл стрептомицина) в присутствии или в отсутствие ингибитора и инкубировали не более 18 ч после инфицирования вирусом при $37^{\circ}C$.

Фиг. 13 - ингибирование сигнального пути MEK/ERK приводит к повышению выживаемости клеток после инфицирования одного типа или коинфицирования.

Эпителиальные клетки легкого человека (A549) инфицировали штаммом вируса птичьего гриппа

A/FPV/Bratislava/79 (H7N7) (FPV) или штаммом вируса гриппа человека A/Wisconsin/67/2005 (H3N2) при множественном инфицировании (MOI=0,01) (H7N7) или (MOI=0,5) (H3N2) при 37°C. Через 30 мин разбавленный вирус удаляли, клетки промывали PBS и дополняли средой для заражения DMEM/INV (содержащей 1% альбумина сыворотки человека, 25 нМ HEPES) с *S. aureus* 6850 или без него (MOI=0,1) в присутствии 50 мкМ U0126 или растворителя в качестве контроля. Спустя 3 ч после инфицирования бактериями клетки обрабатывали DMEM/FBS, содержащей 10% FBS, 2 мкг/мл лизостафина в течение 20 мин для удаления непоглощенных бактерий. После дополнительного промывания PBS клетки дополняли средой для инфицирования DMEM/BA (0,2% BA, 1 мМ MgCl₂, 0,9 мМ CaCl₂, 100 ед/мл пенициллина, 0,1 мг/мл стрептомицина), содержащей 50 мкМ U0126 или растворитель. После периода инкубации в течение 18 ч при 37°C наблюдали морфологию клетки с помощью световой микроскопии.

Фиг. 14 - ингибирование сигнального пути MEK/ERK приводит к снижению титров вируса при инфицировании одного типа и коинфицировании.

Эпителиальные клетки легкого человека (A549) инфицировали штаммом вируса птичьего гриппа A/FPV/Bratislava/79 (H7N7) (A, C) или штаммом вируса гриппа человека A/Wisconsin/67/2005 (H3N2) (B, D) при множественном инфицировании (MOI=0,01) (A, C) или (MOI=0,5) (B, D) при 37°C. Через 30 мин разбавленный вирус удаляли, клетки промывали PBS и дополняли средой для заражения DMEM/INV (содержащей 1% альбумина сыворотки человека, 25 нМ HEPES) с *S. aureus* 6850 или без него (MOI=0,1) в присутствии 50 мкМ U0126 или растворителя в качестве контроля. Спустя 3 ч после инфицирования бактериями, клетки обрабатывали DMEM/FBS, содержащей 10% FBS, 2 мкг/мл лизостафина, в течение 20 мин для удаления внеклеточных бактерий. После дополнительного промывания PBS клетки дополняли средой для инфицирования DMEM/BA (0,2% BA, 1 мМ MgCl₂, 0,9 мМ CaCl₂, 100 ед/мл пенициллина, 0,1 мг/мл стрептомицина), содержащей 50 мкМ U0126 или растворитель. После периода инкубации в течение 18 ч при 37°C определяли титры вируса при помощи стандартного анализа бляшкообразования. Титры вируса представлены в виде бляшкообразующих единиц/мл (БОЕ/мл) на линейной (A, B) или логарифмической шкале (C, D). Данные представляют средние значения \pm SD четырех независимых экспериментов с двумя биологическими образцами. Статистическую значимость оценивали с помощью двустороннего одновыборочного t-критерия (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

Фиг. 15 - ингибирование MEK при введении U0126 приводит к уменьшению бактериального роста.

Эпителиальные клетки легкого человека (A549) инфицировали штаммом вируса птичьего гриппа A/FPV/Bratislava/79 (H7N7) или штаммом вируса гриппа человека A/Wisconsin/67/2005 (H3N2) (A, C) при множественном инфицировании (MOI=0,01) (H7N7) или (MOI=0,5) (H3N2) при 37°C. Через 30 мин разбавленный вирус удаляли, клетки промывали PBS и дополняли средой для заражения DMEM/INV (содержащей 1% альбумина сыворотки человека, 25 нМ HEPES) с *S. aureus* 6850 или без него (MOI=0,1) (A) в присутствии 50 мкМ U0126 или растворителя в качестве контроля. Спустя 3 ч после инфицирования бактериями клетки обрабатывали DMEM/FBS, содержащей 10% FBS, 2 мкг/мл лизостафина, в течение 20 мин (A, C) для удаления непоглощенных бактерий. После дополнительного промывания PBS клетки дополняли средой для инфицирования DMEM/BA (0,2% BA, 1 мМ MgCl₂, 0,9 мМ CaCl₂, 100 ед/мл пенициллина, 0,1 мг/мл стрептомицина), содержащей 50 мкМ U0126 или растворитель. Количества поглощенных бактерий определяли с применением серийного разведения клеточных лизатов на чашках с агаром спустя 18 ч после инфицирования (A, C). Влияние U0126 на бактериальный рост анализировали при введении U0126, как указано, в ночную культуру *S. aureus* 6850 (100 КОЕ/мл). Через 16 ч серийные разведения высевали на чашки с агаром BHI (B, D). Титры бактерий представлены в виде колониеобразующих единиц/мл (КОЕ/мл) на линейной (A, B) или логарифмической шкале (C, D). Данные представляют средние значения \pm SD четырех (A, C) или трех (B, D) независимых экспериментов с двумя биологическими образцами. Статистическую значимость оценивали с помощью двустороннего одновыборочного t-критерия (** $p < 0,001$).

Фиг. 16 - Ингибирование сигнального пути MEK/ERK приводит к уменьшению количества вирусных белков и провоспалительных хемокинов.

Эпителиальные клетки легкого человека (A549) инфицировали штаммом вируса гриппа человека A/Wisconsin/67/2005 (H3N2) при множественном инфицировании (MOI=5) при 37°C. Через 30 мин разбавленный вирус удаляли, клетки промывали PBS и дополняли средой для заражения DMEM/INV (содержащей 1% альбумина сыворотки человека, 25 нМ HEPES) с *S. aureus* 6850 или без него (MOI=50) в присутствии 50 мкМ U0126 или растворителя в качестве контроля. Спустя 3 ч после инфицирования бактериями клетки обрабатывали DMEM/FBS, содержащей 10% FBS, 100 мкг/мл гентамицина, в течение 30 мин для удаления внеклеточных бактерий. После дополнительного промывания PBS клетки дополняли средой для инфицирования DMEM/BA (0,2% BA, 1 мМ MgCl₂, 0,9 мМ CaCl₂, 100 ед/мл пенициллина, 0,1 мг/мл стрептомицина), содержащей 50 мкМ U0126 или растворитель. После периода инкубации в течение 8 ч при 37°C анализировали уровни мРНК CCL3 и CCL5 при помощи qRT-PCR со специфическими праймерами (A, B). Экспрессию вирусного белка (PB-1) и уровень фосфорилирования ERK-1/2, а также компоненты бактериальной клеточной стенки (PGN), определяли при помощи вестерн-блоттинга (C). Данные представляют собой предварительные результаты по трем биологическим образцам и двум техническим повторам в одном эксперименте.

Фиг. 17 - введение U0126 приводит к снижению титров бактерий *in vivo* независимо от титров вируса.

Мышей 12-недельного возраста Balb/C инфицировали штаммом вируса гриппа A/Puerto Rico/8/34 (PR8, H1N1) при 50 БОЕ в день 0 (анестезировали изофлураном). Начиная с дня 1 мышей ежедневно обрабатывали с помощью *i.p.* инъекции 30 мг/кг/день U0126 или растворителя в качестве контроля (10% DMSO, 30% кремофора EL, 60% PBS). В день 3 мышей инфицировали *Staphylococcus aureus* 6850 при $5 \cdot 10^7$ КОЕ под анестезией с помощью изофлурана и непосредственно обрабатывали U0126 или растворителем в качестве контроля. В день 4 легкие удаляли и гомогенизировали в PBS (0,1 г на 1000 мкл PBS). Для расчета титров бактерий серийные разведения гомогената высевали на чашки с агаром ВНИ. Для определения титров вируса проводили стандартный анализ бляшкообразования. Статистический анализ проводили с применением U-критерия Манна-Уитни (* $p < 0,05$).

Фиг. 18 - специфический ингибитор MEK CI-1040 обеспечивает снижение титров вируса при инфицировании одного типа и коинфицировании.

Эпителиальные клетки легкого человека (A549) инфицировали штаммом вируса птичьего гриппа A/FPV/Bratislava/79 (H7N7) (A, C) или штаммом вируса гриппа человека A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) (B, D) при множественном инфицировании (MOI=0,01) при 37°C. Через 30 мин разбавленный вирус удаляли, клетки промывали PBS и дополняли средой для инфицирования DMEM/INV (содержащей 1% альбумина сыворотки человека, 25 нМ HEPES) с 6850 *S. Aureus* или без него (MOI=0,1) в присутствии 10 мкМ CI-1040 или растворителя в качестве контроля. Спустя 3 ч после инфицирования бактериями, клетки обрабатывали DMEM/FBS, содержащей 10% FBS, 2 мкг/мл лизостафина, в течение 20 мин для удаления внеклеточных бактерий. После дополнительного промывания PBS клетки дополняли средой для инфицирования DMEM/BA (0,2% BA, 1 мМ MgCl₂, 0,9 мМ CaCl₂, 100 ед/мл пенициллина, 0,1 мг/мл стрептомицина), содержащей 10 мкМ CI-1040 или растворитель. После периода инкубации в течение 18 ч при 37°C определяли титры вируса при помощи стандартного анализа бляшкообразования. Титры вируса представлены в виде бляшкообразующих единиц/мл (БОЕ/мл) на линейной (A, B) или логарифмической шкале (C, D). Данные представляют средние значения двух независимых экспериментов с двумя биологическими образцами.

Фиг. 19 - введение CI-1040 оказывает ингибирующий эффект на бактериальный рост *in vitro*.

Влияние CI-1040 на бактериальный рост анализировали при введении CI-1040 в различных концентрациях (как указано) в ночную культуру *S. aureus* 6850 (100 КОЕ/мл). Через 16 ч серийные разведения высевали на чашки с агаром ВНИ (A, B). Титры бактерий представлены в виде колониеобразующих единиц/мл (КОЕ/мл) на линейной (A) или логарифмической шкале (B). Данные представляют собой предварительные данные с двумя биологическими образцами.

Фиг. 20 - обработка специфическим ингибитором MEK кобиметинибом (GDC-0973) обеспечивает уменьшение патогенной нагрузки *in vivo*.

Мышей 8-недельного возраста Balb/C (5 на группу) инфицировали штаммом вируса гриппа A/Puerto Rico/8/34 (PR8, H1N1) при 50 БОЕ в день 0 (анестезировали изофлураном). Спустя 6 ч после инфицирования вирусом мышей обрабатывали посредством перорального введения 10 мг/кг/день кобиметиниба или растворителем в качестве контроля (10% DMSO, 5% Tween 20, 85% PBS). Далее обработку проводили ежедневно. В день 3 мышей инфицировали *Staphylococcus aureus* 6850 при $5 \cdot 10^7$ КОЕ под анестезией с помощью изофлурана, а через 6 ч обрабатывали кобиметинибом или растворителем в качестве контроля. В день 4 легкие удаляли и гомогенизировали в PBS (0,1 г на 1000 мкл PBS). Для расчета титров бактерий серийные разведения гомогената высевали на чашки с агаром ВНИ. Для определения титров вируса проводили стандартный анализ бляшкообразования. Статистический анализ проводили с применением U-критерия Манна-Уитни.

Фиг. 21 - LG-ASA улучшает морфологию клетки при инфицировании вирусом гриппа A (IAV) и/или *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*).

Эпителиальные клетки легкого человека (A549) инфицировали штаммом вируса гриппа человека A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) при множественном инфицировании (MOI=0,1), растворенном в PBS/BA [0,2% альбумина бычьей сыворотки, 1 мМ MgCl₂, 0,9 мМ CaCl₂, 100 ед/мл пенициллина, 0,1 мг/мл стрептомицина] при 37°C. После 30 мин инкубации, разбавленный вирус отсасывали, клетки промывали PBS и дополняли средой для заражения DMEM/INV [1% альбумина сыворотки человека, 25 нМ/л HEPES] с *S. aureus* SH1000 или без него (MOI=0,1) в присутствии 5 мМ LG-ASA или растворителя в качестве контроля. Спустя 3 ч после инфицирования бактериями клетки обрабатывали антибиотиками [DMEM, 10% FBS, 2 мкг/мл лизостафина, 20 мин] для удаления внеклеточных бактерий. После дополнительного промывания PBS клетки дополняли DMEM/INV, содержащей 5 мМ LG-ASA или растворителем. После периода инкубации в течение 18 ч при 37°C наблюдали морфологию клетки с помощью световой микроскопии.

Фиг. 22 - ингибитор NFκB LG-ASA обеспечивает снижение титров вируса гриппа и нагрузки *S. aureus*.

Эпителиальные клетки легкого человека (A549) инфицировали штаммом вируса гриппа A/Puerto

Rico/8/34 (H1N1) при множественном инфицировании (MOI=0,1), растворенном в PBS/BA [0,2% альбумина бычьей сыворотки, 1 мМ $MgCl_2$, 0,9 мМ $CaCl_2$, 100 ед/мл пенициллина, 0,1 мг/мл стрептомицина] при 37°C (А-Н). После 30 мин инкубации разбавленный вирус отсасывали, клетки промывали PBS и дополняли средой для заражения DMEM/INV [1% альбумина сыворотки человека, 25 нМ/л HEPES] с *S. aureus* SH1000 или без него (MOI=50) (А, В), (MOI=0,01) (С-Д), *S. aureus* 6850 (MOI=50) (Е, F), (MOI=0,1) (G, H) в присутствии 5 мМ LG-ASA или растворителя в качестве контроля. Спустя 3 ч после инфицирования бактериями клетки обрабатывали антибиотиками [DMEM, 10% FBS, 2 мкг/мл лизостафина, 20 мин] для удаления внеклеточных бактерий. После дополнительного промывания PBS клетки дополняли DMEM/INV, содержащей 5 мМ LG-ASA или растворителем. После периода инкубации в течение 8 ч (А, В, Е, F) или 18 ч (С, D, G, H) при 37°C определяли титры IAV (А, С, Е, G) с помощью стандартных анализов бляшкообразования. Клетки лизировали посредством гипотонического шока и количества поглощенных бактерий (В, D, F, H) определяли с применением серийного разведения на чашках с агаром. Данные представляют средние значения \pm SD трех (А-Н) с двумя биологическими образцами. Статистическую значимость оценивали с помощью двустороннего одновыборочного t-критерия (* p <0,05; ** p <0,01).

Фиг. 23 - ингибитор NF κ B LG-ASA обеспечивает снижение титров вируса гриппа и нагрузки *S. aureus*.

На этой фигуре представлены данные, полученные другим способом, как на фиг. 22. В частности, необработанные контроли в каждом эксперименте произвольно приравнивали к 100% и затем рассчитывали средние значения. Статистическую значимость оценивали с помощью двустороннего одновыборочного t-критерия (* p <0,05; ** p <0,01).

Фиг. 24 - Ингибирование сигнального пути NF κ B приводит к снижению поглощения бактерий.

Эпителиальные клетки легкого человека (A549) предварительно инкубировали с 5 мМ (А-Д) и 10 мМ (С, D) LG-ASA в течение 4 ч, а затем инфицировали *S. aureus* 6850 (MOI=50) (А, В) в течение 30-120 мин и USA 300 (MOI=5) (С, D) в течение 120 мин в присутствии и в отсутствие указанных количеств LG-ASA, растворенных в DMEM/INV [1% альбумина сыворотки человека, 25 нмоль/л HEPES]. Спустя 30-120 мин после инфицирования включали промывание с антибиотиком [DMEM, 10% FBS, 2 мкг/мл лизостафина, 20 мин] для удаления непоглощенных бактерий. Клетки трижды промывали PBS и лизировали посредством гипотонического шока. Количества поглощенных бактерий определяли с применением серийного разведения на чашках с агаром (А-Д). Данные (А, С) представляют средние значения \pm SD трех независимых экспериментов с двумя биологическими образцами. На фиг. 24 В, D необработанные контроли в каждом эксперименте произвольно приравнивали к 100% и затем рассчитывали средние значения. Статистическую значимость оценивали с помощью двустороннего одновыборочного t-критерия (* p <0,05; ** p <0,01; *** p <0,001).

Фиг. 25 - стимуляция сигнального пути NF κ B приводит к повышению поглощения бактерий.

Эпителиальные клетки легкого человека (A549) предварительно инкубировали с 5 мМ LG-ASA и 2,5 нг/мл TNF-альфа в течение 4 ч, а затем инфицировали (А) *S. aureus* 6850 или (В) *S. aureus* USA300 (MOI=5) в течение 120 мин в присутствии и в отсутствие указанных количеств LG-ASA и TNF-альфа, растворенных в DMEM/INV [1% альбумина сыворотки человека, 25 нмоль/л HEPES] (А). Спустя 120 мин после инфицирования включали промывание с антибиотиком [DMEM, 10% FBS, 2 мкг/мл лизостафина, 20 мин] для удаления непоглощенных бактерий. Клетки трижды промывали PBS и лизировали посредством гипотонического шока. Количества поглощенных бактерий определяли с применением серийного разведения на чашках с агаром (А) спустя 120 мин после инфицирования. (А) Данные представляют средние значения \pm SD четырех независимых экспериментов с двумя биологическими образцами. Статистическую значимость оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа, а затем с помощью критерия множественного сравнения (* p <0,05; ** p <0,01; *** p <0,001). (В) Данные представляют средние значения \pm SD трех независимых экспериментов с тремя биологическими образцами, при этом необработанные контроли в каждом эксперименте произвольно приравнивали к 100% и затем рассчитывали средние значения.

Фиг. 26 - обработка коинфицированных IAV/*S. aureus* мышей с помощью LG-ASA приводит к повышению выживаемости и снижению потери веса тела.

(А) мышей BALB/c (4 мыши на группу) инфицировали вирусом гриппа A/Puerto Rico/8/34 при 50 БОЕ в день 0. В день 6 после инфицирования вирусом гриппа мышей дополнительно инфицировали *S. aureus* 6850 при 10^8 КОЕ. В день 7 после инфицирования вирусом гриппа коинфицированных мышей обрабатывали с помощью LG-ASA (1 моль, 10 мин) один раз в день посредством ингаляции. Выживаемость контролировали в течение 14 дней.

В то время как (4/4) (черная линия) необработанные коинфицированные мыши умирали через 1 день после коинфицирования, (2/4) обработанные с помощью LG-ASA коинфицированные мыши выживали (серая линия).

(В) показаны результаты двух независимых экспериментов. Мышей Balb/C 9-недельного возраста (4 мыши на группу) инфицировали штаммом вируса гриппа A/Puerto Rico/8/34 при 50 БОЕ утром в день

0 (анестезировали изофлураном). Спустя 6 ч после инфицирования вирусом мышей взвешивали и обрабатывали H₂O в виде аэрозоля или 1M LG-ASA в ингаляционной камере в течение 10 мин. Такую обработку также проводили в день 1, 2 и 3 в то же время, что и в день 0. Утром в день 3 мышей инфицировали *Staphylococcus aureus* 6850 при 5×10^7 КОЕ под анестезией с помощью изофлурана. В день 4 мышей взвешивали в последний раз. Статистический анализ проводили с применением U-критерия Манна-Уитни (* $p < 0,05$).

Подробное описание настоящего изобретения и предпочтительного варианта осуществления

Следующее описание включает в себя информацию, которая может быть полезна для понимания настоящего изобретения. Не является признанием то, что любая информация, предусмотренная в настоящем документе, является предшествующим уровнем техники или имеет отношение к недавно заявленным изобретениям, или что любая публикация, упоминаемая прямо или косвенно, является предшествующим уровнем техники.

Ранее было указано, что настоящее изобретение относится к применению ингибитора MEK для лечения коинфекции, включающей бактериальную инфекцию и инфекцию, вызванную вирусом гриппа.

Используемый в настоящем документе "ингибитор MEK" также может быть назван ингибитором киназы митоген-активируемой протеинкиназы (МАРК). Известно, что в сигнальном пути МАРК, киназа киназы МАРК (МАРККК) активирует киназу МАРК (МАРКК), которая, в свою очередь, активирует МАРК, которая передает сигнал, например, транскрипционному фактору, или другим киназам, или эффекторному белку/белку-переносчику сигнала; см., например, фиг. 1 у Fremin and Meloche (Fremin and Meloche (2010), J. Hematol. Oncol. 11;3:8). Ингибиторы MEK по настоящему изобретению предпочтительно ингибируют MEK 1/2 у субъекта, такого как млекопитающее или птица, как описано в настоящем документе. Однако, может быть и так, что ингибитор MEK по настоящему изобретению ингибирует не только MEK, предпочтительно MEK1/2, но также и вышерасположенную от нее киназу (т.е. МАРККК), тем самым осуществляя двойное ингибирование. Не вдаваясь в теорию, 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 MEK 1/2 и соответствующую вышерасположенную МАРККК. MEK 1/2 представляет собой МАРКК в сигнальном пути Ras/Raf, где при этом Ras/Raf действует как МАРККК, а ERK1/2 действует как МАРК.

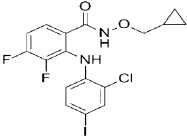
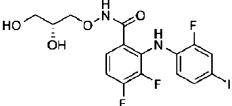
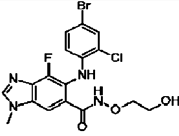
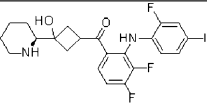
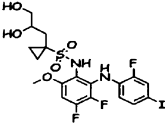
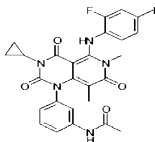
Ингибитор MEK может представлять собой малую молекулу, большую молекулу, пептид, олигонуклеотид и т.п. Ингибитор MEK может быть белком, или его фрагментом, или молекулой нуклеиновой кислоты. Также выражение "ингибитор MEK" включает фармацевтически приемлемую соль ингибитора MEK.

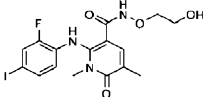
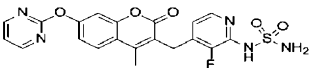
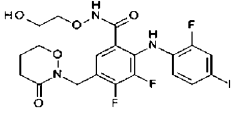
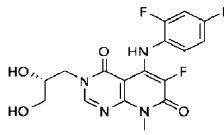
Определение того, является ли соединение ингибитором MEK, или не является таковым, находится в пределах квалификации рядового специалиста в данной области. В одном варианте осуществления ингибиторы MEK выбраны из группы, включающей соединения/ингибиторы, перечисленные в таблице 1.

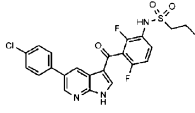
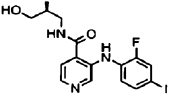
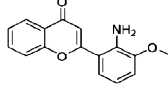
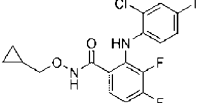
Ингибиторы MEK по настоящему изобретению выбраны предпочтительно из U0126, PLX-4032, AZD6244, AZD8330, AS-703026, GSK-1120212, RDEA-119, RO-5126766, RO-4987655, CI-1040, PD-0325901, GDC-0973, TAK-733, PD98059, PD184352, ARRY-438162 и PF-3644022, предпочтительно AZD8330, GSK-1120212, U0126, GDC-0973, CI-1040, PD0325901, ARRY-438162, PF-3644022 и AZD6244 и наиболее предпочтительно U0126, CI-1040, GDC-0973 (кобиметиниба), AZD8330, GSK-1120212, наиболее предпочтительно U0126, GDC-0973, CI-1040, AZD8330 и GSK-1120212.

Некоторые из таких ингибиторов дополнительно описаны ниже в таб. 1.

Таблица 1. Ингибиторы МЕК

	<p>Структурная формула I</p> <p>CI-1040</p> <p>2-(2-хлор-4-йодфениламино)-N-(циклопропилметокси)-3,4-дифторбензамид</p>
	<p>Структурная формула II</p> <p>PD0325901</p> <p>(R)-N-(2,3-дигидроксипропокси)-3,4-дифтор-2-(2-фтор-4-йодфениламино)бензамид</p>
	<p>Структурная формула III</p> <p>AZD6244</p> <p>6-(4-бром-2-хлорфениламино)-</p>
	<p>7-фтор-N-(2-гидроксиэтокси)-3-метил-3H-бензо[d]имидазол-5-карбоксамид</p>
	<p>Структурная формула IV</p> <p>GDC-0973</p> <p>[3,4-дифтор-2-[(2-фтор-4-йодфенил)амино]фенил]</p> <p>[3-гидрокси-3-[(2S)-2-пиперидинил]-1-азетидинил]метанон</p>
	<p>Структурная формула V</p> <p>RDEA-119</p> <p>(S)-N-(3,4-дифтор-2-(2-фтор-4-йодфенил-амино)-6-метоксифенил)-1-(2,3-дигидроксипропил)циклопропан-1-сульфонамид</p>
	<p>Структурная формула VI</p> <p>GSK-1120212</p> <p>N-(3-(3-циклопропил-5-(2-фтор-4-йодфениламино)-6,8-диметил-2,4,7-триоксо-3,4,6,7-тетрагидропиридо[4,3-d]пиримидин-1(2H)-ил)фенил)ацетамид</p>

	<p>Структурная формула VII</p> <p>AZD8330</p> <p>2-(2-фтор-4-йодфениламино)-N-(2-гидроксиэтокси)-1,5-диметил-6-оксо-1,6-дигидропиридин-3-карбоксамид</p>
	<p>Структурная формула VIII</p> <p>RO5126766</p> <p>C20H16FN5O5S</p>
	<p>Структурная формула IX</p> <p>RO4987655</p> <p>C20H19F3IN3O5</p>
	<p>Структурная формула X</p> <p>TAK-733</p> <p>(R)-3-(2,3-дигидроксипропил)-6-фтор-5-(2-фтор-4-йодфениламино)-8-метилпиридо[2,3-d]пиримидин-4,7(3H,8H)-дион</p>

 Эспбораф (всмурафсфенб)	Структурная формула XI PLX-4032 N-[3-[[5-(4-хлорфенил)-1Н-пирроло [2,3-б]пиридин-3-ил]карбонил]-2,4- дифторфенил]-1-пропансульфонамид
	Структурная формула XII AS703026 (S)-N-(2,3-дигидроксипропил)-3- (2-фтор-4-йодфениламино) изоникотинамид
	Структурная формула XIII PD98059 2-(2-амино-3-метоксифенил)-4Н- хромен-4-он
	Структурная формула XIV PD184352 2-(2-хлор-4-йодфениламино)- N-(циклопропилметокси)-3,4- дифторбензамид

Также предпочтительным является выбор из PLX-4032, AZD6244, AZD8330, GDC-0973, RDEA119, GSK1120212, RO51267766, RO4987655, TAK-733 и AS703026. Еще более предпочтительно они выбраны из AZD6244, AZD8330, GSK1120212 и PLX-4032 или из PD-0325901, AZD-6244, AZD-8330 и RDEA-119. Такие ингибиторы MEK известны из уровня техники и, например, описаны в табл.1 у Fremin and Meloche (2010), J. Hematol. Oncol. 11;3:8.

Более подробная информация по некоторым из таких ингибиторов можно получить из Arthur and Ley (2013) Mitogen-activated protein kinases in innate immunity; Nature Reviews Immunology 13,679-692(2013).

Действительно, как показано в прилагаемых примерах, ингибиторы MEK U0126 и CI-1040, раскрытые в настоящем документе, демонстрируют эффект в случае коинфекции, а также в случае только бактериальной инфекции.

"Ингибитор киназы p38 MAP" хорошо известен из уровня техники. Выражения "ингибитор p38", "ингибитор киназы p38" и "ингибитор киназы p38 MAP" используются в настоящем документе взаимозаменяемо. В контексте настоящего изобретения ингибитор киназы p38 MAP ингибирует киназу p38 MAP. Предпочтительно ингибитор киназы p38 MAP ингибирует одну из изоформ киназы p38 MAP, предпочтительно одну из четырех изоформ (α , β , γ или δ) киназы p38 MAP, предпочтительно α -изоформу, более предпочтительно он ингибирует любую комбинацию из двух изоформ киназы p38 MAP, еще более предпочтительно он ингибирует любую комбинацию из трех изоформ киназы p38 MAP и наиболее предпочтительно он ингибирует все изоформы из изоформ α , β , γ и δ киназы p38 MAP. В некоторых вариантах осуществления ингибитор киназы p38 MAP ингибирует изоформу p38, которая вовлечена в воспалительные заболевания, аутоиммунные заболевания, деструктивные поражения костей, пролиферативные нарушения, инфекционные заболевания, вирусные заболевания или нейродегенеративные заболевания. Как сообщается, α -изоформа киназы p38 MAP вовлечена в воспаление, пролиферацию, дифференциацию и апоптоз, при этом биологические функции p38 β , p38 δ и p38 γ все еще не до конца понятны. Соответственно, согласно настоящему документу предпочтительно ингибитор киназы p38 MAP ингибирует α -изоформу.

Ингибитор киназы p38 MAP может представлять собой малую молекулу, большую молекулу, пептид, олигонуклеотид и т.п. Ингибитор киназы p38 MAP может быть белком или его фрагментом или мо-

лекулой нуклеиновой кислоты. Также выражение ингибитор р38 включает фармацевтически приемлемую соль ингибитора 38.

Определение того, является ли соединение ингибитором киназы р38, или не является таковым, находится в пределах квалификации рядового специалиста в данной области.

Существует множество примеров ингибиторов р38 в уровне техники. В патентах США № 5965583, 6040320, 6147096, 6214830, 6469174, 6521655 раскрыты соединения, которые являются ингибиторами р38. В патентах США № 6410540, 6476031 и 6448257 также раскрыты соединения, которые являются ингибиторами р38. Аналогично, в патентах США № 6410540, 6479507 и 6509361 раскрыты соединения, которые заявляются как ингибиторы р38. В опубликованных заявках на патент США № 20020198214 и 20020132843 раскрыты соединения, указанные как ингибиторы р38. Другой ингибитор киназы р38 MAP представляет собой BIRB 796 BS (1-(5-трет-бутил-2-п-толил-2Н-пиразол-3-ил)-3-[4-(2-морфолин-4-ил-этокси)-нафталин-1-ил]-мочевина); см. Branger (2002), J. Immunol. 168:4070-4077 или US 6319921 для рассмотрения дополнительных ингибиторов киназы р39 MAP.

Другие ингибиторы киназы р38 MAP представляют собой AMG 548 (Amgen), BIRB 796 (Boehringer Ingelheim), VX 702 (Vertex/Kissei), SCIO 469, SCIO 323 (Scios Inc.), SB 681323 (GlaxoSmithKline), PH-797804 (Pfizer) и Org-48762-0 (Organon NV); см., например, Lee and Dominguez in Curr Med Chem. 2005;12(25):2979-2994 и Dominguez in Curr Opin Drug Discov Devel. 2005 Jul;8(4):421-430.

Согласно настоящему изобретению ингибитор может оказывать свое регуляторное влияние выше или ниже по сигнальному пути относительно киназы р38 MAP или непосредственно на киназу р38 MAP, при этом последний способ действия является предпочтительным. Примеры ингибитора, регулирующего активность киназы р38 MAP, включают такие, где ингибитор может снижать уровень транскрипции и/или трансляции киназы р38 MAP, может снижать уровень или ингибировать посттрансляционную модификацию, и/или перемещение в клетке киназы р38 MAP, или может сокращать время полужизни киназы р38 MAP. Ингибитор может также обратимо или необратимо связывать киназу р38 MAP, ингибировать ее активацию, инактивировать ее ферментативную активность или иным образом нарушать ее взаимодействие с нижерасположенными субстратами.

Четыре изоформы киназы р38 MAP имеют высокую степень гомологии последовательностей. Альфа и бета изоформы киназы р38 MAP являются близкородственными, в то время как гамма и дельта изоформы являются более отличными. Учитывая высокую степень структурного сходства, не удивительно, что определенные соединения, способные ингибировать одну изоформу киназы р38 MAP, часто могут ингибировать другие изоформы киназы MAP. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления ингибитор киназы р38 MAP, который является специфическим для α -изоформы киназы, характеризуется по меньшей мере тремя категориями структурных признаков, которые теоретически допускают специфическое ингибирование изоформ.

Избирательное связывание ингибитора-кандидата киназы р38 MAP может быть определено с помощью ряда способов. Гены различных изоформ киназы р38 MAP известны из уровня техники. Рядовой специалист в данной области может легко клонировать и экспрессировать различные изоформы киназы, выделить их и затем провести исследования по связыванию с соединениями-кандидатами для определения характеристик связывания изоформ. Такие серии экспериментов были проведены для α -изоформы киназы р38 MAP, и они представлены в патенте США № 6617324 B1.

Другой анализ избирательности в отношении киназы описан в Mihara (2008), Br. J. Pharmacol. 154(1): 153-164.

Более подробная информация по некоторым из таких ингибиторов можно получить из Arthur and Ley (2013) Mitogen-activated protein kinases in innate immunity; Nature Reviews Immunology 13,679-692(2013).

NF κ B (ядерный фактор энхансера гена легкой цепи каппа активированных В-клеток) является белковым комплексом, который управляет транскрипцией ДНК. NF κ B обнаружен почти во всех типах клеток животных и вовлечен в клеточные ответы на стимулы, такие как стресс, цитокины, свободные радикалы, ультрафиолетовое излучение, окисленные ЛПНП и бактериальные или вирусные антигены. Транскрипционные комплексы NF κ B у позвоночных могут находиться в виде любых из множества гомо- и гетеродимеров, образованных субъединицами p50 (NF κ B1), p52 (NF κ B2), c-Rel, RelA (p65) и RelB (Gilmore TD. (2006) Oncogene 25: 6680-6684). Такие комплексы связываются с регуляторными участками ДНК, называемыми κ B-участками, как правило, для активации экспрессии конкретного гена-мишени. В большинстве типов клеток димеры NF κ B находятся в цитоплазме в неактивной форме за счет связывания с любым из нескольких белков-ингибиторов I κ B (I κ B α , β , ϵ , γ , p105 и p100). В ответ на широкий спектр стимулов I κ B быстро фосфорилируется, присоединяет убиквитин и разрушается с помощью протеасомы. Затем освобожденный димер NF κ B перемещается в ядро, где он может модулировать экспрессию конкретного гена.

Фосфорилирование и разрушение I κ B имеет большое значение для регуляции комплексов NF κ B, что опосредуется комплексом киназы I κ B (IKK), содержащим две киназные субъединицы, IKK α и IKK β , и связанный регуляторный белок, подобный каркасовому белку, называемый NEMO (он же IKK γ) (Gil-

more and Herscovich (2006) Inhibitors of NFκB signaling: 785 and counting *Oncogene*. 25, 6887-6899). Следует отметить, что, как показано в качестве примера в примере 3 настоящего изобретения, сигнальный путь NFκB также имеет важное значение для поглощения бактерий (таких как *S. aureus*) в клетки.

Согласно настоящему изобретению ингибитор может оказывать свое регуляторное влияние выше или ниже по сигнальному пути относительно NFκB или непосредственно на NFκB, при этом последний способ действия является предпочтительным. Примеры ингибиторов, регулирующих активность NFκB, включают такие, где ингибитор может снижать уровень транскрипции и/или трансляции NFκB или может сокращать время полужизни NFκB. Ингибитор может также обратимо или необратимо связывать NFκB, ингибировать его активацию, инактивировать его активность или иным образом нарушать его взаимодействие с нижерасположенными мишенями, такими как гены-мишени. Также ингибитор NFκB может ингибировать протеинкиназы, такие как молекулы, которые ингибируют фосфорилирование IκBα посредством, например, ингибирования IKK. Соединения, которые обладают такой активностью, представляют собой SC-893, BMS-345541, которые могут выступать в качестве эталонных соединений. Также ингибитор NFκB может ингибировать протеинфосфатазы, или ингибировать протеасому, или убиквитинирование. Примеры таких ингибиторов NFκB, которые могут также выступать в качестве эталонных соединений, включают ингибиторы тирозиновой протеинфосфатазы, боронат, бортезомиб, NPI-0052. В качестве альтернативы, ингибитор NFκB может блокировать транслокацию в ядро NFκB или его связывание с ДНК. Примеры таких ингибиторов включают такие, которые могут также выступать в качестве эталонных соединений, SN50, дегидроксиметилэпоксиминомидин и имитаторы NFκB ODN. Дополнительную информацию по ингибитору NFκB можно получить из Gupta et al. (2010) (Gupta et al. (2010) Inhibiting NFκB activation by small molecules as a therapeutic strategy. *Biochim Biophys Acta*. 1799(10-12): 775-787).

Ингибитор NFκB может представлять собой малую молекулу, большую молекулу, пептид, олигонуклеотид и т.п. Ингибитор NFκB может быть белком, или его фрагментом, или молекулой нуклеиновой кислоты. Также выражение ингибитор NFκB включает фармацевтически приемлемую соль ингибитора NFκB. В одном варианте осуществления ингибитор NFκB выбран из группы, включающей ингибиторы/молекулы, перечисленные в таблицах 3 и 4 на фиг. 9 и 10. В другом варианте осуществления ингибитор NFκB выбран из группы, включающей ингибиторы/молекулы, перечисленные в табл. 3 на фиг. 9. В другом варианте осуществления ингибитор NFκB выбран из группы, включающей ингибиторы/молекулы, перечисленные в табл. 4 на фиг. 10.

Вместе с выражением "SC75741" или "SC75741 (и производные)" в дополнение к SC75741 в настоящем изобретении также предусмотрены производные SC75741.

В целом специалист в данной области знает как выяснить, является ли соединение ингибитором MEK, ингибитором p38 и/или ингибитором NFκB. Дополнительным примером того, как можно определить, является ли соединение ингибитором MEK и/или ингибитором p38, будет выделение белка MEK и/или p38 NFκB. Белок может быть выделен из клеток, где белок MEK и/или p38 экспрессируется естественным образом или где он сверхэкспрессируется в результате трансфекции олигонуклеотида или при инфицировании вирусом, который управляет экспрессией белка MEK и/или p38. Дополнительно белок MEK и/или p38 может также быть экспрессирован рекомбинантно. После выделения белка рядовой специалист в данной области может измерить активность киназы в присутствии или в отсутствие потенциального ингибитора MEK и/или p38. Если киназная активность ниже в присутствии предполагаемого ингибитора, чем в его отсутствие, значит ингибитор представляет собой ингибитор MEK и/или p38 соответственно.

Если воздействие на MEK и/или p38 непосредственное, ингибитор должен характеризоваться значением IC_{50} приблизительно 5 мкМ или меньше, предпочтительно 500 нМ или меньше, более предпочтительно 100 нМ или меньше. В сходном варианте осуществления ингибитор должен характеризоваться значением IC_{50} в отношении p38-α изоформы, которое предпочтительно по меньшей мере в десять раз меньше, чем значение, наблюдаемое при исследовании того же ингибитора в отношении других изоформ киназы p38 MAP, в этом же или в сравнительном анализе. Следует отметить, что значения IC_{50} зависят от анализа и могут изменяться от определения к определению. Важнее учитывать относительные соотношения значений IC_{50} для соединений, а не сами точные значения.

IC_{50} представляет собой концентрацию соединения, которая ингибирует фермент на 50% относительно активности, измеренной в отсутствие ингибитора.

Значения IC_{50} рассчитывают с применением концентрации ингибитора, которая вызывает снижение на 50% по сравнению с контролем. Значения IC_{50} зависят от анализа и будут варьировать от измерения к измерению. В связи с этим, значения IC_{50} представляют собой относительные значения. Значения, определенные для конкретного ингибитора, должны быть сравнены в целом, а не на абсолютной основе.

Образцы или анализы, включающие киназу MAP и/или MAPK, которые обрабатывают потенциальным активатором, ингибитором или модулятором, сравнивают с контрольными образцами без ингибитора, активатора или модулятора для исследования степени ингибирования. Контрольные образцы (необ-

работанные ингибиторами) могут быть определены как значение относительной активности киназы MAP и/или MAPK, составляющее 100%. Ингибирование киназы MAP и/или MAPK достигается, когда значение киназной активности MAP и/или MAPK относительно контроля составляет приблизительно 80%, необязательно 50% или 25-0%. Активация киназы MAP и/или MAPK достигается, когда значения киназной активности MAP относительно контроля составляет 110%, необязательно 150%, необязательно 200-500% или выше 1000-3000%. Иллюстративные анализы активности связывания MAP киназы в соответствии с настоящим изобретением представляют собой блот-анализ киназы MAP и/или MAPK с применением лиганда (Aymerich et al., Invest Ophthalmol Vis Sci. 42:3287-93, 2001); анализ киназы MAP и/или MAPK с применением колонки для аффинной хроматографии (Alberdi et al., J Biol Chem. 274:31605-12, 1999) и анализ связывания киназы MAP и/или MAPK с лигандом (Alberdi et al., J Biol Chem. 274:31605-12, 1999). Каждая включена посредством ссылки в полном объеме.

Также избирательность ингибиторов может быть измерена с помощью анализа киназной избирательности, что описано в Mihara (2008), Br. J. Pharmacol. 154(1):153-164.

В случае ингибитора NFκB можно измерять, например, генные продукты (белки) генов-мишеней NFκB в необработанной контрольной клетке и сравнивать экспрессию этих продуктов генов-мишеней с клеткой, которая была обработана ингибитором NFκB. Некоторые гены-мишени описаны в Oeckinghaus and Ghosh (2009) The NF-κB Family of Transcription Factors and Its Regulation. Cold Spring Harb Perspect Biol. Oct 2009; 1(4): a000034.

Уровень экспрессии снижается, когда клетки обрабатывают ингибитором. С помощью других стратегий можно выявлять разрушение IκBα вместе с накоплением p-p65 и транслокацией в ядро NFκB посредством вестерн-блоттинга. Также взаимодействия NFκB с ДНК клеток, необработанных ингибитором, по сравнению с клетками, которые были обработаны ингибитором, можно анализировать с применением анализа изменения электрофоретической подвижности (EMSA).

Ингибирующие свойства молекулы можно также анализировать путем сравнения ее действия с эталонным соединением. "Эталонное соединение", упоминаемое в настоящем документе, означают соединение, которое можно использовать в качестве положительного контроля для определения того, характеризуется ли молекула свойствами ингибитора MEK, ингибитора p38 и/или свойств ингибитора NFκB. Таким образом, также любой из ингибиторов, перечисленных в настоящем документе, может быть использован в качестве эталонного соединения. Возможный тест может представлять собой тест, в котором клетки, например, стимулированные для активации сигнального пути MEK, p38 и/или NFκB, обрабатывают эталонным соединением, а параллельно, например в другой лунке, обрабатывают соединением, представляющим интерес.

Ингибиторы в соответствии с настоящим изобретением могут применяться в способе лечения и/или профилактики. Таким образом, выражение "осуществление лечения" или "лечение" включает введение ингибитора MEK, ингибитора p38 и/или ингибитора NFκB, предпочтительно в форме лекарственного средства, субъекту, страдающему от коинфекции, включающей бактериальную инфекцию и инфекцию, вызванную вирусом гриппа, в целях уменьшения интенсивности или смягчения симптомов. Аналогично, выражение включает введение ингибитора MEK, ингибитора p38 и/или ингибитора NFκB, предпочтительно в форме лекарственного средства, субъекту, страдающему от бактериальной инфекции, в целях уменьшения интенсивности или смягчения симптомов.

Кроме того, выражение "профилактика", используемое в настоящем документе, относится к любой медицинской процедуре или процедуре, связанной с общественным здравоохранением, цель которой заключается в предупреждении заболевания. Используемые в настоящем документе выражения "предупреждать", "предупреждение" и "предупреждающий" относятся к уменьшению риска возникновения или развития определенного состояния, а именно коинфекции, включающей инфекцию, вызванную вирусом гриппа, и бактериальную инфекцию или только бактериальную инфекцию. Также под "профилактикой" подразумевается уменьшение или ингибирование повторной коинфекции, включающей инфекцию, вызванную вирусом гриппа, и бактериальную инфекцию или только бактериальную инфекцию.

Ингибиторы в соответствии с настоящим изобретением являются эффективными для лечения коинфекции. Выражение "коинфекция", используемое в настоящем документе, включает инфекцию, вызванную вирусом гриппа, и бактериальную инфекцию. Такая коинфекция может иметь место при одновременном инфицировании хозяина, например субъекта и/или отдельной клетки бактерией и вирусом гриппа. Также может быть, что хозяин, например субъект и/или клетка, одновременно инфицированы одной или более вирусными частицами и одной или более бактериями. Однако такое коинфицирование может также происходить последовательно. В таком случае, сначала происходит инфицирование одной или более вирусными частицами, а через некоторое время тот же хозяин и/или клетка инфицируются одной или более бактериями, или наоборот. Промежутком времени между двумя инфекциями может быть промежуток времени, составляющий максимум 14 дней, 13 дней, 12 дней, 11 дней, 10 дней, 9 дней, 8 дней, 7 дней, 6 дней, 5 дней, 4 дня, 3 дня, 2 дня, 1 день, 12 ч, 6 ч, 3 ч, 1,5 ч или минимум 30 мин.

Такая ситуация также может иметь место в случае суперинфекции, при которой вторая инфекция перекрывается с более ранней, в частности вызванной различными микробными агентами экзогенного

или эндогенного происхождения, которые являются устойчивыми к лечению, применяемому против первой инфекции.

При коинфекции, инфекция, вызванная вирусом гриппа, может быть опосредована вирусом гриппа А или вирусом гриппа В, предпочтительно вирус гриппа А представляет собой H1N1, H2N2, H3N2, H6N1, H7N7, H7N9, H9N2 H10N7, H10N8 или H5N1. В одном варианте осуществления вирус гриппа А представляет собой H1N1. В других вариантах осуществления вирус гриппа А представляет собой H3N2, H5N1 и H7N9. В дополнительных вариантах осуществления вирус гриппа А представляет собой H3N2, H5N1, H1N1 и H7N9.

Настоящее изобретение также относится к "бактериальной инфекции", которая может иметь место в условиях коинфекции, описанной выше, или может иметь место в качестве единственной инфекции, присутствующей у хозяина, например у субъекта и/или в клетке. Бактериальная инфекция может быть опосредована любой бактерией, предпочтительно она опосредована бактерией, выбранной из группы, включающей *Staphylococcaceae*, *Streptococcaceae*, *Legionellaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Chlamydiaceae*, *Mycoplasmataceae*, *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonadales* и/или *Pasteurellaceae*.

В других вариантах осуществления бактериальная инфекция опосредована бактерией, выбранной из группы, включающей *Staphylococcus*, предпочтительно *Staphylococcus aureus*, чувствительный к метициллину и устойчивый в отношении метициллина *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus*, экспрессирующий лейкоцидин Пантона-Валентина (PVL) и/или *Streptococcaceae*, предпочтительно *Streptococcus mitis*, *Streptococcus pyogenes* или *Streptococcus pneumoniae*, *Legionella*, предпочтительно *Legionella pneumophila*, *Pseudomonas*, предпочтительно *Pseudomonas aeruginosa*, *Chlamydia*, предпочтительно *Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma*, предпочтительно *Mycoplasma pneumoniae*, *Klebsiella*, предпочтительно *Klebsiella pneumoniae*, *Moraxella*, предпочтительно *Moraxella catarrhalis* и/или *Haemophilus*, предпочтительно *Haemophilus influenzae*. Предпочтительно бактерия выбрана из группы, включающей *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* или *Haemophilus influenzae*. Наиболее предпочтительно бактерия представляет собой *Staphylococcus aureus*.

В настоящем изобретении также предусматривается, что ингибиторы можно комбинировать друг с другом. Таким образом, в одном варианте осуществления ингибитор МЕК комбинируют с другим ингибитором МЕК, ингибитором р38 и/или ингибитором NFκB. В соответствии с вышесказанным выражение "другой ингибитор" используется для разъяснения того, что например, один ингибитор МЕК можно также комбинировать с другим ингибитором МЕК, при этом такие два ингибитора МЕК не являются одинаковыми. Например, ингибитор МЕК CI-1040 можно комбинировать с ингибитором МЕК GDC-0973. Это аналогичным образом относится к ингибиторам р38 и NFκB.

В целом, ингибитор, целенаправленно воздействующий на вирус гриппа, представляет собой любой ингибитор или лекарственное средство, эффективное при терапии гриппа. Различные вещества, как известно, являются эффективными в подавлении инфекции, вызванной вирусом гриппа. Среди них, например, ингибиторы нейраминидазы, соединения, целенаправленно воздействующие на белок, являющийся ионным каналом (M2), и соединения, целенаправленно воздействующие на полимеразную или эндонуклеазную активность посредством нарушения функции компонента вирусного полимеразного комплекса PB1, PB2, PA или NP. В настоящем изобретении также предусмотрены фармацевтически приемлемые соли данных ингибиторов.

"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, которая является мишенью для инфицирования, и/или предупреждая репродукцию вируса путем отпочкования от клетки-хозяина, поскольку новообразованные вирусы не могут отпочковываться от клетки, в которой они реплицировались. Также предусмотрены фармацевтически приемлемые соли ингибитора нейраминидазы. Предпочтительными ингибиторами нейраминидазы являются озельтамивир, занамивир, перамивир или фармацевтически приемлемая соль любого из данных веществ, такая как озельтамивира фосфат, озельтамивира карбоксилат и т.д. Наиболее предпочтительными ингибиторами нейраминидазы являются озельтамивира фосфат, занамивир, озельтамивир или перамивир.

Соединения, целенаправленно воздействующие на белок, являющийся ионным каналом (M2), представляют собой, например, амантадин и/или римантадин, в то время как соединения, целенаправленно воздействующие на полимеразную или эндонуклеазную активность посредством нарушения функции компонента вирусного полимеразного комплекса PB1, PB2, PA или NP, представляют собой, например, блокатор NP нуклеозин или ингибитор полимеразы T-705.

В качестве альтернативы или в дополнение, ингибитор МЕК, ингибитор р38 и/или ингибитор NFκB можно комбинировать с одним или более ингибиторами, целенаправленно воздействующими на бактерию. Ингибитором, целенаправленно воздействующим на бактерию, может быть любой ингибитор, эффективный в подавлении бактериальной инфекции. Предпочтительным ингибитором, хорошо известным специалисту в данной области, является антибиотик. Предпочтительные антибиотики можно найти в табл. 5 (фиг. 11). Таким образом, в одном варианте осуществления антибиотик выбран из группы, вклю-

чающей антибиотика, перечисленные в табл. 5 (фиг. 11). В дополнительном варианте осуществления антибиотик выбран из группы, включающей класс антибиотиков, перечисленных в табл. 5 (фиг. 11). В другом варианте осуществления антибиотик выбран из группы, включающей генерические названия антибиотиков, перечисленных в табл. 5 (фиг. 11). Более предпочтительными являются антибиотики, выбранные из гентамицина, рифампицина, лизостафина, эритромицина, левофлоксацина, ванкомицина, тейкопланина, пенициллина и оксациллина.

"Субъект", которого можно лечить с помощью ингибиторов или комбинаций ингибиторов в соответствии с настоящим изобретением, предпочтительно представляет собой позвоночное. В контексте настоящего изобретения выражение "субъект" подразумевает индивидуума, который нуждается в лечении коинфекции или бактериальной инфекции отдельно. Предпочтительно субъектом является пациент, страдающий от коинфекции, или отдельно бактериальной инфекции, или подвержен риску их возникновения. Предпочтительно пациентом является позвоночное, более предпочтительно млекопитающее. Млекопитающие включают без ограничения сельскохозяйственных животных, животных, используемых в спорте, домашних животных, приматов, мышей и крыс. Предпочтительно млекопитающим является человек, собака, кошка, корова, свинья, мышь, крыса и т.д., особенно предпочтительным является человек. В некоторых вариантах осуществления субъектом является субъект-человек, возраст которого не обязательно составляет более 1 года и менее 14 лет; от 50 до 65 лет или старше 65 лет. В других вариантах осуществления субъектом является субъект-человек, который выбран из группы, включающей субъектов, которым по меньшей мере 50 лет, субъектов, которые нуждаются в постоянном медицинском уходе, субъектов, которые имеют хронические нарушения со стороны легких или сердечно-сосудистой системы, субъектов, которые нуждались в постоянном медицинском наблюдении или госпитализации в течение предыдущего года в связи с хроническими метаболическими заболеваниями, почечной дисфункцией, гемоглобинопатией или ослаблением иммунной системы, субъектов в возрасте менее 14 лет, субъектов в возрасте от 6 месяцев до 18 лет, которые получают длительную терапию аспирином, и женщин, которые будут находиться во втором или третьем триместре беременности в сезон гриппа.

В способе по настоящему изобретению ингибитор МЕК, ингибитор р38 или ингибитор NFκB, а также ингибитор, целенаправленно воздействующий на вирус гриппа, и ингибитор, целенаправленно воздействующий на бактерию, можно вводить перорально, внутривенно, интраплеврально, внутримышечно, местно или с помощью ингаляции. Предпочтительно ингибитор МЕК вводят посредством назальной ингаляции или перорально.

Настоящее изобретение также предусматривает композицию. Настоящее изобретение относится к композиции, содержащей ингибитор МЕК, для применения в способе лечения коинфекции, включающей бактериальную инфекцию, опосредованную бактерией, выбранной из группы, включающей *Staphylococcus* и/или *Streptococcus*, и инфекцию, вызванную вирусом гриппа, где ингибитор МЕК выбран из группы, включающей CI-1040 и GDC-0973.

Композиция, содержащая ингибитор МЕК, ингибитор р38 и/или ингибитор NFκB и дополнительно, в конечном виде, один или более ингибиторов, целенаправленно воздействующих на бактерию, и/или один или более ингибиторов, целенаправленно воздействующих на вирус гриппа, может представлять собой фармацевтическую композицию. Предпочтительно такие композиции дополнительно содержат носитель, предпочтительно фармацевтически приемлемый носитель. Композиция может находиться в форме суспензий или таблеток для перорального введения; назальных спреев, стерильных препаратов для инъекций (внутривенных, интраплевральных, внутримышечных), например, в виде стерильных инъекционных водных или масляных суспензий или суппозиториях. При пероральном введении в виде суспензии 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. В виде таблеток с быстрым высвобождением данные композиции могут содержать микрокристаллическую целлюлозу, дикальция фосфат, крахмал, стеарат магния и лактозу и/или другие наполнители, связующие вещества, сухие наполнители, разрыхлители, разбавители и смазывающие средства, известные из уровня 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.

Ингибитор или ингибиторы предпочтительно вводят в терапевтически эффективном количестве.

Фармацевтическую композицию для применения по настоящему изобретению и содержащую ингибитор МЕК, вводят пациенту, которым является млекопитающее или птица. Примеры подходящих млекопитающих включают без ограничения мышь, крысу, корову, козу, овцу, свинью, собаку, кошку, ло-

шадь, морскую свинку, представителя семейства псовых, хомяка, норку, тюленя, кита, верблюда, шимпанзе, макака-резуса и человека, при этом человек является предпочтительным. Примеры подходящих птиц включают без ограничения, например, индюка, курицу, гуся, утку, чирка, крикву, скворца, шилохвоста, чайку, лебедя, цесарку или водоплавающую птицу. В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения представлены пациенты-люди.

"Терапевтически эффективное количество" каждого активного соединения/ингибитора может варьировать в зависимости от факторов, включающих без ограничения активность применяемого соединения, стабильность активного соединения в организме пациента, тяжесть состояний, которые необходимо облегчить, общий вес 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.

Ингибиторы, способы и пути применения, описанные в настоящем документе, применимы как для лечения человека, так и для применения в ветеринарии. Соединения, описанные в настоящем документе, в частности ингибитор МЕК, ингибитор р38 и/или ингибитор NFκB и необязательно один или более ингибиторов, целенаправленно воздействующих на вирус гриппа, и/или один или более ингибиторов, целенаправленно воздействующих на бактерию, обладающие необходимой терапевтической активностью, можно вводить субъекту в физиологически приемлемом носителе, как описано в настоящем документе. В зависимости от способа введения, соединения могут быть составлены различными способами, что обсуждается ниже. Концентрация терапевтически активного соединения при составлении может варьировать от приблизительно 0,1 до 100 вес.%. Средства можно вводить отдельно или в комбинации с другими лекарственными препаратами.

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, суспензии, сиропа, жевательной резинки, облатки, эликсира и т.п. Фармацевтически приемлемые носители, такие как связующие вещества, вспомогательные вещества, 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 ампуле или флаконе. Перед применением в клинике лекарственные препараты можно восстанавливать путем растворения лиофилизированного порошка в подходящей системе растворителей с получением композиции, подходящей для внутривенной или внутримышечной инъекции.

"Культивируемая клетка" или "культивируемые клетки" представляет собой/представляют собой клетку/клетки, которая/которые находится/находятся не в ее/их естественной среде, например в растении или животном. Предпочтительно культивируемая клетка может представлять собой первичную культуру клеток, которая включает клетки, извлеченные из их естественной среды, или клеточную линию. Предпочтительно культивируемые клетки представляют собой эпителиальные клетки легкого человека. Предпочтительно культивируемые клетки высеивают при плотности приблизительно 1×10^5 , 2×10^5 , 3×10^5 , 4×10^5 , 5×10^5 , 6×10^5 , 7×10^5 , 8×10^5 , 9×10^5 , 10×10^5 , 11×10^5 , наиболее предпочтительно 8×10^5 клеток в 0,5 мл, 1 мл, 1,5 мл, 2 мл, 2,5 мл, 3 мл, 3,5 мл, 4 мл среды, такой как DMEM. Наиболее предпочтительной является плотность 8×10^5 клеток в 2 мл DMEM.

Такие культивируемые клетки инфицируют вирусом и бактерией или, в других вариантах осуществления, отдельно бактерией. Как уже было описано выше, коинфицирование может происходить последовательно или одновременно. Например, культивируемые клетки могут быть инфицированы сначала вирусом гриппа, а спустя 30 мин бактерией/бактериями. Также возможно дополнительное добавление антибиотика в культуру спустя 3 ч, для удаления внеклеточных бактерий. В таком случае антибиотик затем снова вымывают. В других вариантах осуществления клетки инфицируют только бактерией.

Выражение "приведение в контакт", используемое в настоящем документе, относится к приведению клетки, содержащей вирус гриппа и бактерию, в пространственном отношении, в непосредственную близость с ингибитором МЕК, ингибитором р38 и/или ингибитором NFκB. Это может означать, например, что ингибитор применяют в среде, в которой культивируемые клетки распределены с помощью пипетки.

После приведения в контакт, если ингибитор является активным, вирусная инфекция, а также бактериальная инфекция, подавляется. В некоторых вариантах осуществления, опять-таки, ингибитор в соответствии с настоящим изобретением применяется для подавления только бактериальной инфекции в отсутствие инфекции, вызванной вирусом гриппа.

В одном варианте осуществления подавление вирусной инфекции представляет собой уменьшение числа бляшкообразующих единиц (БОЕ)/мл, а подавление бактериальной инфекции представляет собой уменьшение числа колониеобразующих единиц (КОЕ)/мл. "Бляшкообразующие единицы (БОЕ)/мл"

представляет собой показатель числа частиц, способных формировать бляшки на единицу объема, таких как вирусные частицы. Он является функциональным показателем, а не показателем абсолютного количества частиц: вирусные частицы, которые являются неполноценными, или которые не в состоянии инфицировать их клетку-мишень, не будут образовывать бляшки и, таким образом, не будут учтены. Например, раствор вируса гриппа с концентрацией 1000 БОЕ/мкл указывает на то, что 1 мкл раствора содержит достаточно вирусных частиц для образования 1000 инфекционных бляшек в клеточном моно-слое. В случае настоящего изобретения клеточная культура, обработанная ингибитором, демонстрирует уменьшение числа бляшкообразующих единиц в культуре после обработки, при сравнении с культурой перед обработкой ингибитором в соответствии с настоящим изобретением.

Возможное "уменьшение количества бляшкообразующих единиц (БОЕ)/мл" анализируют следующим образом. Сначала культивируемые клетки, коинфицированные вирусом гриппа и бактерией, анализируют на предмет их способности формировать бляшкообразующие единицы (БОЕ)/мл путем, например, отсасывания некоторого количества клеток из чашки Петри и высеивания их на чашках для подсчета бактериальных бляшек, которые будут формироваться. Данный результат затем сравнивают с числом бляшкообразующих единиц (БОЕ)/мл, сформированных клетками той же культуры, после применения ингибитора. Если число бляшкообразующих единиц (БОЕ)/мл уменьшается после обработки ингибитором по сравнению с числом, полученным перед применением ингибитора, имеет место уменьшение числа бляшкообразующих единиц.

"Колониеобразующие единицы (КОЕ)/мл" используют для оценки числа жизнеспособных бактерий в образце. Существуют различные способы. Например, для получения колониеобразующих единиц образец (например, культивируемые клетки в маленьком объеме) рассредотачивают по поверхности чашки с питательным агаром и высушивают перед инкубацией для подсчета. Жизнеспособную бактерию определяют по способности размножиться путем бинарного деления в контролируемых условиях. Визуальное появление колонии в клеточной культуре требует значительного роста - при подсчете колоний неясно, возникла колония из одной клетки или 1000 клеток. Следовательно результаты записываются как (КОЕ)/мл (колониеобразующих единиц на миллилитр) для жидкостей и КОЕ/г (колониеобразующих единиц на грамм) для сухих веществ для исключения этой неопределенности (вместо клеток/мл или клеток/г).

"Колониеобразующие единицы (КОЕ)/мл" можно анализировать следующим образом. Сначала культивируемые клетки, коинфицированные вирусом гриппа и бактерией или отдельно бактерией, анализируют на предмет их способности формировать колониеобразующие единицы (КОЕ)/мл путем, например, отсасывания некоторого количества клеток из чашки Петри и высеивания их на чашках для подсчета. Данный результат затем сравнивают с числом колониеобразующих единиц (КОЕ)/мл, сформированных клетками той же культуры, после применения ингибитора. Если число колониеобразующих единиц (КОЕ)/мл уменьшается по сравнению с числом, полученным перед применением ингибитора, имеет место уменьшение.

В целом специалист в данной области знаком с этими хорошо известными методиками анализа бактериальных и вирусных инфекций. Как можно измерить бляшкообразующие единицы (БОЕ)/мл и колониеобразующие единицы (КОЕ)/мл дополнительно описано в литературе (Tuchscher, L. et al. (2011). Переклочение фенотипа *Staphylococcus aureus*: эффективная стратегия при бактериальной инфекции, позволяющая избежать иммунный ответ хозяина и закрепить хроническую инфекцию (EMBO molecular medicine 3, 129-141 and Hrincius, E.R et al. (2010) CRK adaptor protein expression is required for efficient replication of avian influenza A viruses and controls JNK mediated apoptotic responses. Cellular microbiology 12, 831-843).

Следует отметить, что используемые в настоящем документе формы единственного числа включают ссылки на множественное число, если в контексте явно не указано иное. Таким образом, например, ссылка на "реагент" включает один или более таких различных реагентов, а ссылка на "способ" включает ссылку на соответствующие стадии и способы, известные рядовому специалисту в данной области, которые могут быть изменены или заменены на способы, описанные в настоящем документе.

Все публикации и патенты, цитируемые в настоящем раскрытии, включены посредством ссылки в их полном объеме. В тех случаях, когда материал, включенный посредством ссылки, противоречит или не соответствует настоящему описанию, настоящее описание будет заменять любой такой материал.

Если не указано иное, выражение "по меньшей мере", предшествующий ряду элементов, следует понимать как относящиеся к каждому элементу ряда. Специалисту в данной области будет понятно, или он сможет определить, с применением лишь рутинных экспериментов, множество эквивалентов конкретных вариантов осуществления настоящего изобретения, описанных в настоящем документе. Подразумевается, что такие эквиваленты охватываются настоящим изобретением.

Во всем настоящем 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 стадии или группы целых чисел или стадий, но не исключение любого другого целого числа или стадии или группы целых чисел или стадий. При использовании в настоящем документе выражение "содержащий" можно заменить выражением

"включающий" или иногда, при использовании в настоящем документе, выражением "имеющий".

При использовании в настоящем документе, выражение "включающий" исключает любой элемент, стадию или ингредиент, не определенные элементом пункта формулы изобретения. При использовании в настоящем документе "состоящий главным образом из" не исключает материалы или стадии, которые не оказывают значительного влияния на основные и новые признаки пункта формулы изобретения.

В каждом конкретном случае в настоящем документе любое из выражений "содержащий", "состоящий главным образом из" и "состоящий из" можно заменить любым из двух других выражений.

Некоторые документы цитированы по всему тексту настоящего описания. Каждый из документов, цитируемых в настоящем документе (включая все патенты, патентные заявки, научные публикации, спецификации производителя, инструкции и т.д.), выше или ниже, включен в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме. Ничто в настоящем документе не должно подразумевать признание того, что настоящее изобретение не может быть датировано задним числом настоящего раскрытия в соответствии с предшествующим изобретением.

Примеры

В следующих примерах проиллюстрировано настоящее изобретение. Эти примеры не должны быть истолкованы как ограничивающие объем настоящего изобретения. Данные примеры включены в целях иллюстрации, а настоящее изобретение ограничено только формулой изобретения.

Пример 1.

В последние годы непрерывно возрастает потребность в дополнительных и альтернативных терапевтических стратегиях, помимо вакцинации или лечения традиционными противовирусными средствами против IV (блокаторами нейраминидазы и M2) и традиционными антибиотиками против *S. aureus*. В настоящее время для противовирусного воздействия было идентифицировано несколько клеточных факторов в качестве потенциальных мишеней. В отличие от этого, знания о роли клеточных факторов в бактериальной инфекции и, в частности, в качестве мишеней для антибактериального лечения, либо путем уменьшения количества бактерий и/или начала экспрессии активированного цитокина, является недостаточно понятным, еще больше в присутствии коинфекции IV.

Был разработан протокол инфицирования, который позволяет определить (1) титры вирусного потомства и (2) титры внутриклеточных бактерий, а также (3) изменения иммунологических защитных механизмов в присутствии или в отсутствие потенциальных противоиных средств при коинфицировании IV и *S. aureus*. В первоначальном подходе исследовали эффект ингибитора MEK (U0126=50 мкМ), ингибитора p38 (SB202190 = 10 мкМ) и ингибитора NFκB (LASAG=5 мМ), в сравнении с растворителем в качестве контроля, в отношении инфекции, вызванной IV и *S. aureus*, в случае инфицирования одного типа или коинфицирования. В качестве контроля применяли ингибитор вирусной нейраминидазы озельтамивир (тамифлю) (2 мкМ) в сравнении с Hepes. Для инфицирования вирусом применяли вирус гриппа человека A/Puerto Rico/8134 (H1N1) или вирус птичьего гриппа A/FPV/Bratislava/79 (H7N7), а для инфицирования бактериями применяли штамм *S. aureus* 6850. Процедура инфицирования (фиг. 1):

Эпителиальные клетки легкого человека высевали в 6-луночные планшеты (8×10^5 клеток/луноку) в 2 мл DMEM [10% FCS]. Спустя 16-20 ч после посева клетки промывали и инкубировали с PBS/BA [0,2% альбумина бычьей сыворотки (BSA), 1 mM MgCl₂, 0,9 mM CaCl₂, 100 ед/мл пенициллина, 0,1 мг/мл стрептомицина] (500 мкл на 6 лунок) или PBS/BA, содержащем вирус при указанном множественном инфицировании (MOI) при 37°C. После 30 мин инкубации разбавленный вирус отсасывали, клетки промывали PBS и дополняли средой для заражения DMEM/INV [1% альбумина сыворотки человека, 25 нмоль/л HEPES] (2 мл на 6 лунок) с бактериями или без них при указанном MOI, в присутствии или в отсутствие тестируемого соединения. Спустя 3 ч после инфицирования бактериями клетки обрабатывали антибиотиками для удаления внеклеточных бактерий. Следовательно клетки промывали PBS и затем инкубировали с DMEM/INV, содержащей антибиотика [2 мкг/мл лизостафина (Sigma)], (1 мл на 6 лунок) в течение 20 мин при 37°C. После дополнительного промывания PBS клетки дополняли DMEM/INV, содержащей тестируемое вещество, и инкубировали в течение указанного времени при 37°C. В случае A/Puerto Rico/8/34, DMEM/INV дополнительно дополняли 0,333 мкг/мл трипсина (Invitrogen). Определение титров IV и внутриклеточных бактерий осуществляли, как описано в (Hrincius et al., 2010, Tuchscher et al., 2011).

Титры IV представлены в виде бляшкообразующих единиц (БОЕ)/мл, а титры *S. aureus* представлены в виде колониеобразующих единиц (КОЕ)/мл. Данные представляют средние значения \pm SD трех независимых экспериментов с двумя биологическими образцами. Статистическую значимость оценивали с помощью двустороннего двухвыборочного t-критерия (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001).

В случае коинфекции присутствие *S. aureus* влияет на репликацию IV, а присутствие IV влияет на количество внутриклеточных *S. aureus* соответственно, что связано с изменениями врожденных иммунных ответов, а также механизмами аутофагии и апоптоза. Тем не менее, авторы настоящего изобретения наблюдали, согласно ожиданию, ингибирующие эффекты U0126 (фиг. 2, 3), SB202190 (фиг. 4) и LG-ASA (фиг. 5) в отношении репликации IV. Что интересно, титры вирусов также снижались при лечении такими ингибиторами в присутствии *S. aureus*. Кроме того, авторы настоящего изобретения были прият-

но удивлены, когда количества внутриклеточных *S. aureus* уменьшались в присутствии U0126, SB202190 или LG-ASA независимо от отсутствия или присутствия IV.

Другое удивительное наблюдение касается репликации бактерий в присутствии U0126 (50 мкМ). В случае, когда *S. aureus* культивировали в течение ночи при 37°C в DMEM/INV без живых клеток, титры бактерий были уже снижены, однако в той же степени, что и при инфицировании клеток, что указывает на зависимость бактерий от клеточного фактора (фиг. 2 E).

В качестве контроля исследовали титры вирусов и количества внутриклеточных бактерий при применении ингибитора вирусной нейраминидазы озельтамивира (тамифлю) (фиг. 6). В то время как титры IV значительно снижались в отсутствие или в присутствии *S. aureus*, количества внутриклеточных бактерий наоборот увеличивались.

Полученные результаты демонстрируют большой потенциал веществ, целенаправленно воздействующих на клеточные факторы, в качестве противоинфекционных средств против коинфекции, вызванной IV и *S. aureus*, по сравнению с веществами против самого патогена.

Пример 2.

В дополнительных экспериментах исследовали эффект ингибитора MEK U0126, CI-1040 и кобиметиниба (GDC-0973), по сравнению с растворителем в качестве контроля, в отношении инфекции, вызванной вирусом гриппа А (IAV) и *S. aureus* 6850, в случае инфицирования одного типа или коинфицирования.

Процедура коинфицирования представлена на фиг. 12. Для исследования жизнеспособности эпителиальных клеток легкого человека в условиях данного эксперимента, морфологию клеток наблюдали с помощью световой микроскопии (фиг. 13) через 18 ч после инфицирования, что является моментом времени, при котором определяли патогенную нагрузку (фиг. 14).

Как видно из фиг. 13, инфицирование только *S. aureus* 6850 (6850), штаммами вируса гриппа A/FPV/Bratislava/79 (H7N7) (FPV) или A/Wisconsin/67/2005 (H3N2), а также коинфицирование, приводило к незначительному, но четко выявляемому повреждению клеток. В присутствии U0126 (50 мкМ) клеточный слой выглядел гораздо меньше поврежденным.

Определяли эффект ингибитора MEK U0126 (50 мкМ) в отношении репликации вируса гриппа A/FPV/Bratislava/79 (H7N7) (FPV) или A/Wisconsin/67/2005 (H3N2), по сравнению с растворителем в качестве контроля, в эпителиальных клетках легкого человека в случае инфицирования одного типа или коинфицирования (фиг. 14).

Ингибирование сигнального пути MEK/ERK приводит к значительному снижению титров вируса при инфицировании подтипами IAV H7N7 и H3N2 в случае инфицирования одного типа (фиг. 14). Титры вируса также снижались в случае коинфекции в присутствии U0126 до значительных уровней в коинфицированных H7N7/*S. aureus* клетках (фиг. 14).

Кроме того, анализировали эффект ингибитора MEK U0126 (50 мкМ) в отношении поглощенного *S. aureus* 6850 (фиг. 15 A, C). В условиях данного эксперимента титры бактерий лишь незначительно снижались в присутствии ингибитора.

Для дальнейшего исследования эффекта U0126 в отношении бактериального роста, в целом, ночную культуру *S. aureus* 6850 без клеток дополняли различными количествами U0126 (10 мкМ и 50 мкМ) или растворителем (фиг. 15 B, D). Бактериальный рост ингибировали в присутствии U0126 в зависимости от концентрации, по сравнению с растворителем в качестве контроля (фиг. 15 B, D).

Поскольку экспрессия провоспалительных цитокинов и хемокинов способствует тяжелому воспалению и повреждению тканей, синтез мРНК соответствующих хемокинов, таких как CCL3, также известный как воспалительный белок макрофагов 1 α (MIP1 α) и CCL5, также известный как RANTES, анализировали при помощи qRT-PCR в эксперименте с инфицированием в присутствии или в отсутствие U0126 (50 мкМ) (фиг. 16 A, B). Синтез мРНК CCL3, индуцируемый IAV, уровень которого повышался в присутствии *S. aureus* 6850, в присутствии U0126 снижался. Подобным образом, синтез CCL5 мРНК, индуцируемый IAV, уровень которого повышался в присутствии *S. aureus*, в присутствии U0126 (50 мкМ) снижался.

С помощью вестерн-блоттинга с применением фосфоспецифических антител к ERK1/2 подтвердили ингибирующий эффект U0126 в отношении сигнального пути MEK/ERK (фиг. 16 C). Кроме того, наблюдали снижение уровня синтеза вирусного белка (PB1) при ингибировании сигнального пути MEK/ERK.

Для подтверждения антипатогенного потенциала U0126 на мышинной модели *in vivo*, мышей, инфицированных вирусом гриппа, оставляли необработанными или ежедневно обрабатывали U0126 и подвергали суперинфицированию с помощью *S. aureus* 6850 (фиг. 17). Введение U0126 приводило к снижению титров бактерий *in vivo* независимо от титров вируса. Отсутствие снижения титров вируса можно объяснить поздним введением U0126 в момент времени, когда титры вируса уже снижаются во время инфекции. Вышеупомянутые эксперименты указывают на то, что ингибитор оказывает более значительный ингибирующий эффект в случае его введения перед инфицированием вирусом гриппа. Тем не менее, титры бактерий значительно снижались в случае применения U0126.

В других подходах определяли эффект ингибитора MEK CI-1040 (10 мкМ) в отношении репликации вируса гриппа A/FPV/Bratislava/79 (H7N7) (FPV) или A/Puerto Rico/8/34 (H1N1), по сравнению с растворителем в качестве контроля, в эпителиальных клетках легкого человека в случае инфицирования одного типа или коинфицирования (фиг. 18).

Ингибирование сигнального пути MEK/ERK посредством CI-1040 приводит к снижению титров вируса при инфицировании подтипами IAV H7N7 и H1N1 в случае инфицирования одного типа и коинфицирования (фиг. 18).

Для дальнейшего исследования эффекта CI-1040 в отношении бактериального роста, в целом, ночную культуру *S. aureus* 6850 дополняли различными количествами CI-1040 (1 мкМ и 10 мкМ) или растворителем (фиг. 19 А, В). Бактериальный рост незначительно был ингибирован в присутствии CI-1040 в зависимости от концентрации, по сравнению с растворителем в качестве контроля (фиг. 19 А, В).

Для подтверждения антипатогенного потенциала другого ингибитора MEK, тестировали кобиметиниб на мышинной модели *in vivo*, мышей, инфицированных вирусом гриппа, оставляли необработанными или ежедневно обрабатывали кобиметинибом и подвергали суперинфицированию с помощью *S. aureus* 6850 (фиг. 20). Введение кобиметиниба приводило к незначительному, но четко выявляемому снижению титров вируса и бактерий *in vivo*. Поскольку недавно было показано, что максимальная переносимая доза кобиметиниба составляет 30 мг/кг/день. Таким образом, ингибирующий эффект можно улучшить с помощью более высоких дозировок, по сравнению с применяемыми в данном эксперименте (10 мг/кг/день), которые были значительно ниже максимальной переносимой дозы.

В заключение, полученные результаты демонстрируют различные ингибиторы MEK в качестве потенциальных веществ против IAV/*S. aureus*.

Пример 3.

В дополнительных экспериментах исследовали эффект ингибитора NFκB LG-ASA (LASAG) в отношении инфекции, вызванной вирусом гриппа А (IAV) и *S. aureus* 6850, в случае инфицирования одного типа или коинфицирования.

Процедура коинфицирования представлена на фиг. 21 (в верхней части). Для исследования жизнеспособности эпителиальных клеток легкого человека после инфицирования в отсутствие и в присутствии LG-ASA (5 мМ), наблюдали морфологию клеток с помощью световой микроскопии через 18 ч после инфицирования (фиг. 21). В то время как инфицирование с помощью IAV и/или *S. aureus* в отсутствие LG-ASA (левая секция) приводило к разрушению клеток, в присутствии LG-ASA (правая секция) морфология клетки улучшалась.

Эффект ингибитора NFκB LG-ASA (5 мМ) в отношении репликации вируса гриппа A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) определяли в эпителиальных клетках легкого человека в случае инфицирования одного типа или коинфицирования (фиг. 22, 23) через 8 ч (фиг. 22, 23 А, В, Е, F) и через 18 ч (фиг. 22, 23 С, D, G, H) после инфицирования. Для инфицирования применяли два разных штамма *S. aureus*: (a) *S. aureus* SH1000 (фиг. 22, 23 А-D) и (b) *S. aureus* 6850 (фиг. 22, 23 Е-H).

В то время как уровень репликации IAV снижался в присутствии LG-ASA через 8 и 18 ч после инфицирования, снижение титров бактерий наблюдалось только через 18 ч после инфицирования. На фиг. 22 результаты представлены на линейной шкале. Для более наглядного представления ингибирующего эффекта LG-ASA в отношении патогена, необработанные контроли из трех независимых экспериментов произвольно приравнивали к 100%, данные представлены средними значениями (фиг. 23).

Поскольку LG-ASA добавляли непосредственно во время инфицирования бактериями, такие результаты демонстрировали очень ранний эффект в отношении поглощения бактерий, которое стимулировали во время непрерывного высвобождения и нового бактериального поглощения.

Совсем недавно было показано, что NFκB необходим для фагоцитоза *S. aureus* моноцитами (Zhu et al., 2014; Exp.Cell Res. 1;327(2):256-63). Основываясь на этих фактах и собственных наблюдениях, авторы настоящего изобретения хотели узнать, предотвращает ли LG-ASA поглощение бактерий. За 4 ч до инфицирования бактериями эпителиальные клетки легкого человека предварительно обрабатывали и определяли поглощенные бактерии не более чем через два часа после инфицирования. Чтобы обеспечить выявление только поглощенных бактерий, непоглощенные бактерии удаляли с помощью промывания с антибиотиком перед лизисом клеток. Данные свидетельствуют о зависимости от времени поглощения *S. aureus* 6850, которое блокируется в присутствии LG-ASA (фиг. 24 А, В). Зависимый от концентрации ингибирующий эффект LG-ASA может быть дополнительно продемонстрирован на бактериальном штамме *S. aureus* USA300 (фиг. 24 С, D). Для более наглядного представления ингибирующего эффекта LG-ASA в отношении патогена, что показано на фиг. 24 А, С, необработанные контроли из трех независимых экспериментов произвольно приравнивали к 100%, данные представлены средними значениями (фиг. 24 В, D).

Для подтверждения важности опосредованной NFκB передачи сигнала для поглощения *S. aureus*, NFκB индуцировали с помощью стимуляции TNF-α за 4 ч до инфицирования. Активация NFκB приводила к усилению поглощения *S. aureus* 6850 и *S. aureus* USA300. В качестве контроля, индуцированную TNF-α активацию одновременно блокировали с помощью LG-ASA, что приводило к ингибированию

поглощения бактерий, стимулированного TNF- α , как и ожидалось (фиг. 25).

Для подтверждения антипатогенного потенциала LG-ASA на мышинной модели *in vivo* тестировали различные условия коинфицирования в присутствии и в отсутствие LG-ASA.

Как видно на фиг. 26, обработка мышей, коинфицированных IAV/S. aureus, с помощью LG-ASA приводит к повышению выживаемости (фиг. 26 A) и уменьшению потери веса тела (фиг. 26 B).

В заключение, полученные результаты демонстрируют, что ингибиторы NF κ B, такие как LG-ASA, действуют как вещества против IAV/S. aureus *in vitro* и *in vivo*.

Список литературы.

Borgeling, Y., Schmolke, M., Viemann, D., Nordhoff, C., Roth, J. and Ludwig, S. (2014). Inhibition of 38 mitogen-activated protein kinase impairs influenza virus-induced primary and secondary host gene

responses and protects mice from lethal H5N1 infection. The Journal of biological chemistry 289, 13-27.

Chertow, D.S. and Memoli, M.J. (2013). Bacterial coinfection in influenza: a • rounds review. JAMA: the Journal of the American Medical Association 309, 275-282.

Droebner, K., Pleschka, S., Ludwig, S. and Planz, O. (2011). Antiviral activity of the MEK-inhibitor U0126 against pandemic H1N1v and highly pathogenic avian influenza virus *in vitro* and *in vivo*. Antiviral research 92, 195-203.

Dudek, S.E., Luig, C., Pauli, E.K., Schubert, U. and Ludwig, S. (2010). The clinically approved proteasome inhibitor PS-341 efficiently blocks influenza A virus and vesicular stomatitis virus propagation by establishing an antiviral state. Journal of virology 84, 9439-9451,

Ehrhardt, C. and Ludwig, S. (2009). A new player in a deadly game: influenza viruses and the PI3K/Akt signalling pathway. Cellular microbiology 11, 863-871.

Ehrhardt, C., Marjuki, H., Wolff, T., Nurnberg, B., Planz, O., Pleschka, S. and Ludwig, S. (2006). Bivalent role of the phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) during influenza virus infection and host cell defence. Cellular microbiology 8, 1336-1348.

Ehrhardt, C., Ruckle, A., Hrincius, E.R., Haasbach, E., Anhlan, D., Ahmann, K., et al. (2013). The NF-kappaB inhibitor SC75741 efficiently blocks influenza virus propagation and confers a high barrier for

development of viral resistance. Cellular microbiology 15, 1198-1211.

Ehrhardt, C., Wolff, T. and Ludwig, S. (2007a). Activation of phosphatidylinositol 3-kinase signaling by the nonstructural NS1 protein is not conserved among type A and B influenza viruses. *Journal of*

virology 81, 12097-12100.

Ehrhardt, C., Wolff, T., Pleschka, S., Planz, O., Beermann, W., Bode, J.G., et al. (2007b). Influenza A virus NS1 protein activates the PI3K/Akt pathway to mediate antiapoptotic signaling responses. *Journal of virology* 81, 3058-3067.

Eierhoff, T., Hrincius, ER., Rescher, U., Ludwig, S. and Ehrhardt, C. (2010). The epidermal growth factor receptor (EGFR) promotes uptake of influenza A viruses (IAV) into host cells. *PLoS pathogens* 6,

e1001099.

Gillet, Y., Vanhems, P., Lina, G., Bes, M., Vandenesch, F., Floret, D. and Etienne, J. (2007). Factors predicting mortality in necrotizing communityacquired pneumonia caused by *Staphylococcus aureus* containing Panton-Valentine leukocidin. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 45, 315-321.

Gong, J., Fang, H., Li, M., Liu, Y., Yang, K., Liu, Y. and Xu, W. (2009). Potential targets and their relevant inhibitors in anti-influenza fields. *Current medicinal chemistry* 16, 3716-3739.

Grundmann, H., Aires-de-Sousa, M., Boyce, J. and Tiemersma, E. (2006). Emergence and resurgence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a public-health threat. *Lancet* 368, 874-885.

Haasbach, E., Reiling, S.J., Ehrhardt, C., Droebner, K., Ruckle, A., Hrincius, E.R., et al. (2013). The NF-kappaB inhibitor SC75741 protects mice against highly pathogenic avian influenza A virus. *Antiviral research* 99, 336-344.

Hayden, F. (2009). Developing new antiviral agents for influenza treatment: what does the future hold? *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 48 Suppl 1, S3-13.

Hayden, F.G. and Hay, A.J. (1992). Emergence and transmission of influenza A viruses resistant to amantadine and rimantadine. *Current topics in microbiology and immunology* 176, 119-130.

Iverson, A.R., Boyd, K.L., McAuley, J.L., Piano, L.R., Hart, M.E. and McCullers, J.A. (2011). Influenza virus primes mice for pneumonia from *Staphylococcus aureus*. *The Journal of infectious diseases* 203, 880- 888.

Iwao, Y., Ishii, R., Tomita, Y., Shibuya, Y., Takano, T., Hung, W.C., et al. (2012). The emerging ST8 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone in the community in Japan: associated infections, genetic diversity, and comparative genomics. *J Infect Chemother* 18, 228-240.

Lee, L.T., Lee, C.W., Tung, W.1-1., Wang, S.W., Lin, C.C., Shu, J.C. and Yang, C.M. (2010). Cooperation of TLR2 with MyD88, PI3K, and Rad in lipoteichoic acid-Induced cPLA2/COX-2-dependent airway inflammatory responses. *The American journal of pathology* 176, 1671-1684.

Ludwig, S. (2009). Targeting cell signalling pathways to fight the flu: towards a paradigm change in anti-influenza therapy. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 64, 1-4.

Ludwig, S. (2011). Disruption of virus-host cell interactions and cell signaling pathways as an anti-viral approach against influenza virus infections. *Biological chemistry* 392, 837-847.

Ludwig, S. and Planz, O. (2008). Influenza viruses and the NF-kappaB signaling pathway - towards a novel concept of antiviral therapy. *Biological chemistry* 389, 1307-1312.

Ludwig, S., Planz, O., Pleschka, S. and Wolff, T. (2003). Influenza-virus induced signaling cascades: targets for antiviral therapy? *Trends in molecular medicine* 9, 46-52.

Ludwig, S., Wolff, T., Ehrhardt, C., Wurzer, W.J., Reinhardt, J., Planz, O. and Pleschka, S. (2004). MEK inhibition impairs influenza B virus propagation without emergence of resistant variants. *FEBS letters* 561,37-43.

Marjuki, H., Alam, M.I., Ehrhardt, C., Wagner, R., Planz, O., Klenk, H.D., et al. (2006). Membrane accumulation of influenza A virus hemagglutinin triggers nuclear export of the viral genome via protein kinase C-mediated activation of ERK signaling. *The Journal of biological chemistry*

281, 16707-16715.

Mazur, I., Wurzer, W.J., Ehrhardt, C., Pleschka, S., Puthavathana, P., Silberzahn, T., et al. (2007). Acetylsalicylic acid (ASA) blocks influenza virus propagation via its NF-kappaB-inhibiting activity. *Cellular microbiology* 9, 1683-1694.

Moran, G.J., Krishnadasan, A., Gorwitz, R.J., Fosheim, G.E., McDougal, L.K., Carey, R.B., et al. (2006). Methicillin-resistant *S. aureus* infections among patients in the emergency department. *The New England Journal of medicine* 355, 666-674.

Morens, D.M., Taubenberger, J.K. and Fauci, A.S. (2008). Predominant role of bacterial pneumonia as a cause of death in pandemic influenza: implications for pandemic influenza preparedness. *The Journal of infectious diseases* 198, 962-970.

Neumann, G., Noda, T. and Kawaoka, Y. (2009). Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus. *Nature* 459, 931-939.

Niemann, S., Ehrhardt, C., Medina, E., Warnking, K., Tuchscher, L., Heitmann, V., et al. (2012). Combined action of influenza virus and *Staphylococcus aureus* α -hemolysin provokes severe lung epithelium damage. *The Journal of infectious diseases* 206, 1138-1148.

Olschlager, V., Pleschka, S., Fischer, T., Rziha, H.J., Wurzer, W., Stitz, L., et al. (2004). Lung-specific expression of active Raf kinase results in increased mortality of influenza A virus-infected mice. *Oncogene* 23, 6639-6646.

Oviedo-Boyso, J., Cortes-Vieyra, R., Huante-Mendoza, A., Yu, H.B., Valdez-Alarcon, J.J., Bravo-Patino, A., et al. (2011). The phosphoinositide-3-kinase-Akt signaling pathway is important for *Staphylococcus aureus* internalization by endothelial cells. *Infection and immunity* 79, 4569-4577.

Paddock, C.D., Liu, L., Denison, A.M., Bartlett, J.H., Holman, R.C., DeLeon-Carnes, M., et al. (2012). Myocardial injury and bacterial pneumonia contribute to the pathogenesis of fatal Influenza B Virus

infection. *The Journal of infectious diseases* 205, 895-905.

Park, B. and Liu, G.Y. (2012). Targeting the host-pathogen interface for treatment of *Staphylococcus aureus* infection. *Seminars in immunopathology* 34, 299-315.

Parker, D. and Prince, A. (2012). Immunopathogenesis of *Staphylococcus aureus* pulmonary infection. *Seminars in immunopathology* 34, 281-297.

Parry, J. (2013). H7N9 avian flu infects humans for the first time. *Bmj* 346, f2151.

Pinto, L.H. and Lamb, R.A. (2006). The M2 proton channels of influenza A and B viruses. *The Journal of biological chemistry* 281, 8997-9000.

Pinto, L.H. and Lamb, R.A. (2007). Controlling influenza virus replication by inhibiting its proton channel. *Molecular bioSystems* 3, 18-23.

Planz, O. (2013). Development of cellular signaling pathway inhibitors as new antivirals against influenza. *Antiviral research* 98, 457-468.

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

Shilo, N. and Quach, C. (2011). Pulmonary infections and community associated methicillin resistant *Staphylococcus aureus*: a dangerous mix? Paediatric respiratory reviews 12, 182-189.

Taubenberger, J.K, and Kash, J.C. (2010). Influenza virus evolution, host adaptation, and pandemic formation. Cell host & microbe 7, 440-451.

Thorburn, K. and Riordan, A. (2012). Pulmonary bacterial coinfection in infants and children with viral respiratory infection. Expert review of antiinfective therapy 10, 909-916.

Wurzer, W.J., Ehrhardt, C., Pleschka, S., Berberich-Siebelt, F., Wolff, T., Walczak, H., et al. (2004). NF-kappaB-dependent induction of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and Fas/FasL is crucial for efficient influenza virus propagation. The Journal of biological chemistry 279, 30931-30937.

Zhu F, Yue W, Wang Y. The nuclear factor kappa B (NF-κB) activation is required for phagocytosis of *staphylococcus aureus* by RAW 264.7 cells. Exp Cell Res. 2014 Oct 1;327(2):256-63.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение ингибитора МЕК для лечения коинфекции, включающей бактериальную инфекцию, опосредованную бактерией, выбранной из группы, включающей *Staphylococcaceae* и/или *Streptococcaceae*, и инфекцию, вызванную вирусом гриппа, где ингибитор МЕК выбран из группы, включающей CI-1040 и GDC-0973.

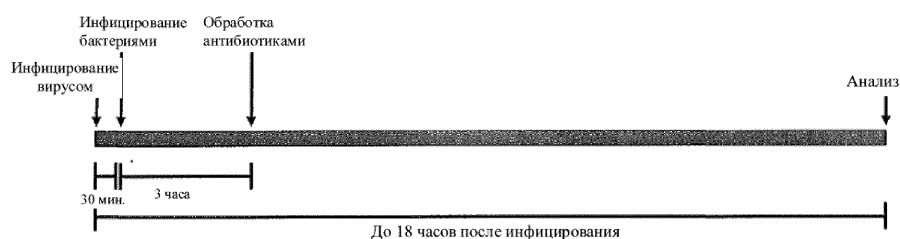
2. Применение по п.1, где бактериальная инфекция опосредована *Staphylococcus Aureus* или *Streptococcus pneumoniae*.

3. Применение по п.1 или 2, где инфекция, вызванная вирусом гриппа, опосредована вирусом гриппа А или вирусом гриппа В.

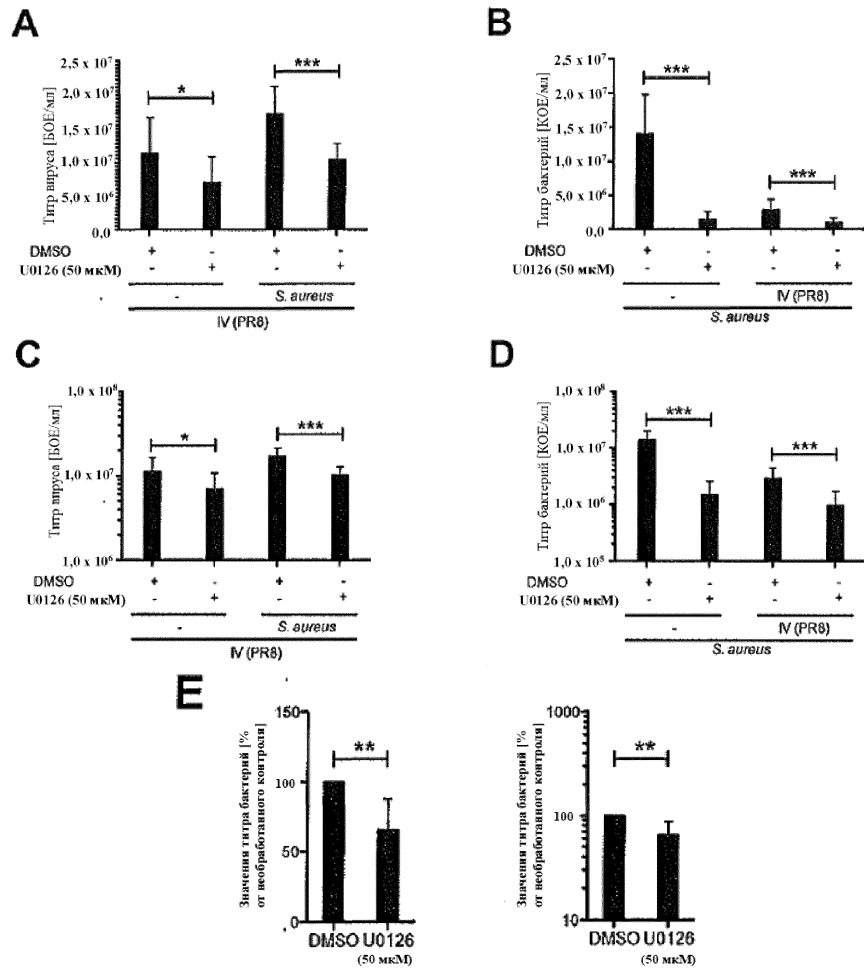
4. Применение по п.3, где вирус гриппа А представляет собой H1N1, H2N2, H3N2, H6N1, H7N7, H7N9, H9N2, H10N7, H10N8 или H5N1.

5. Применение по любому из пп.1-4 у позвоночного.

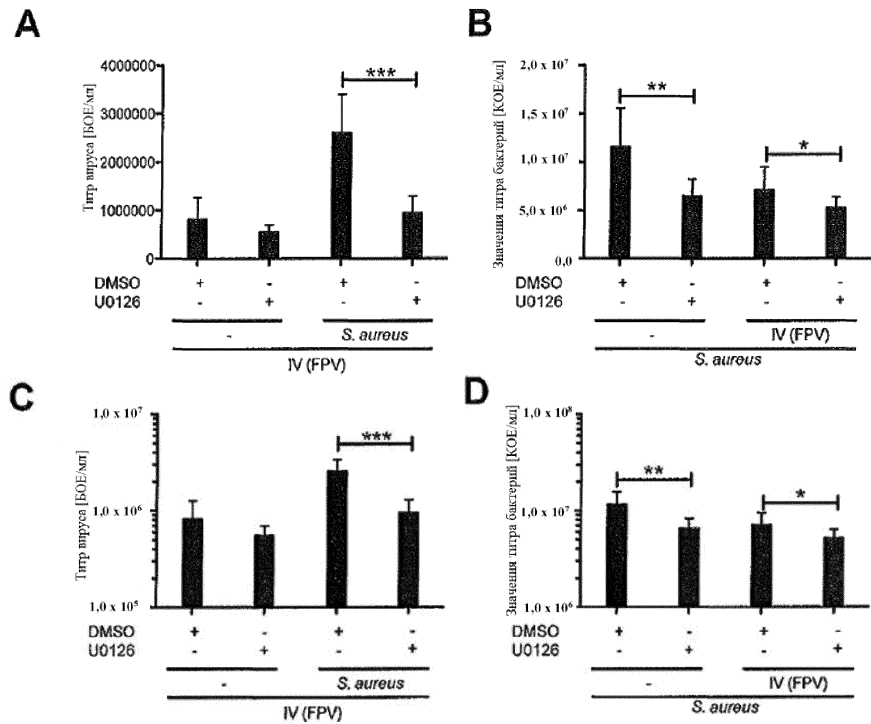
6. Композиция, содержащая ингибитор МЕК, для применения в способе лечения коинфекции, включающей бактериальную инфекцию, опосредованную бактерией, выбранной из группы, включающей *Staphylococcaceae* и/или *Streptococcaceae*, и инфекцию, вызванную вирусом гриппа, где ингибитор МЕК выбран из группы, включающей CI-1040 и GDC-0973.



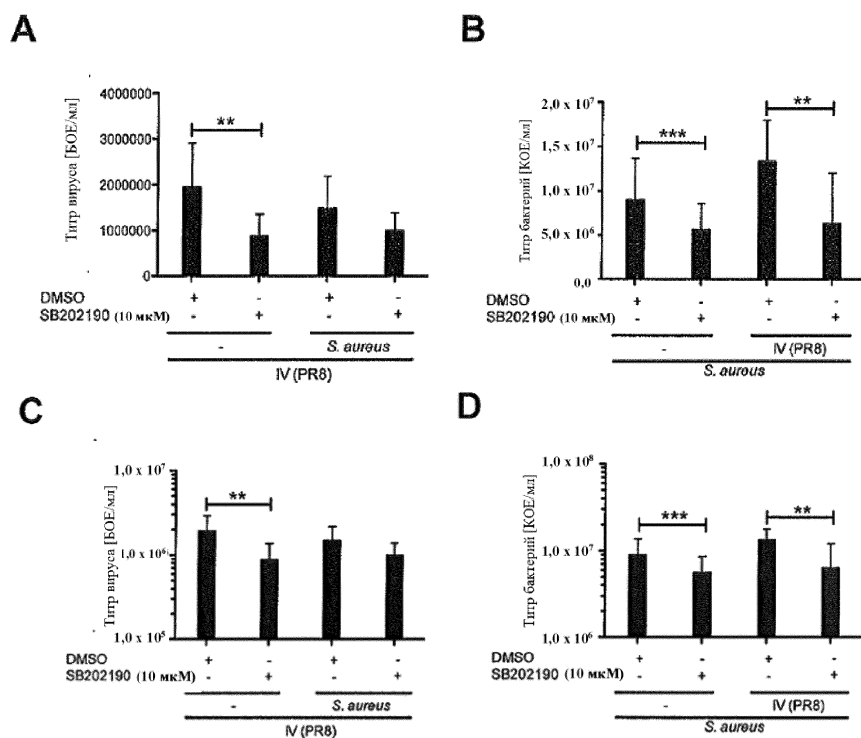
Фиг. 1



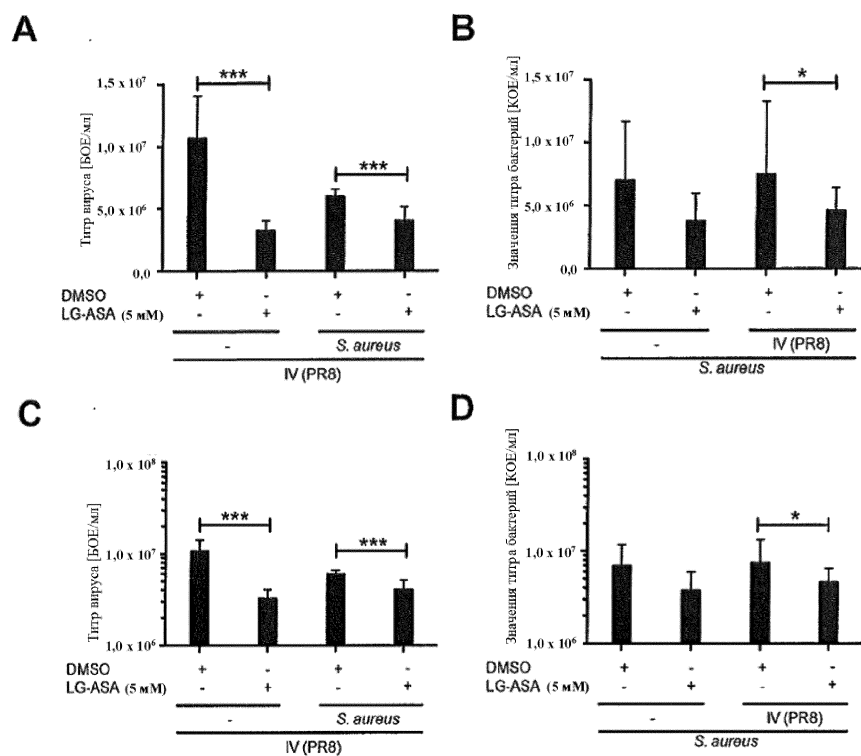
Фиг. 2



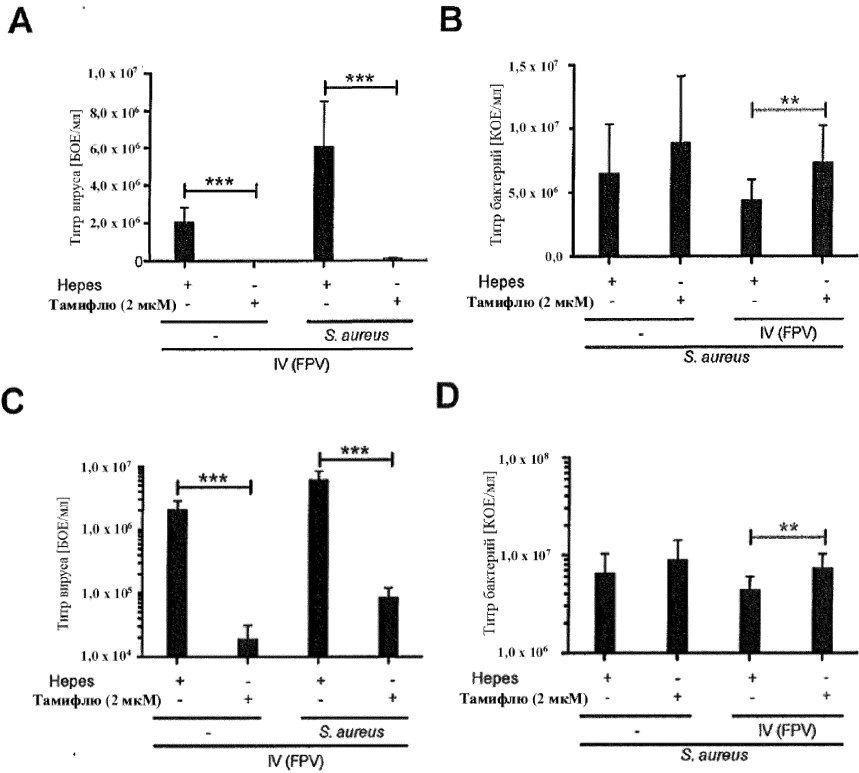
Фиг. 3



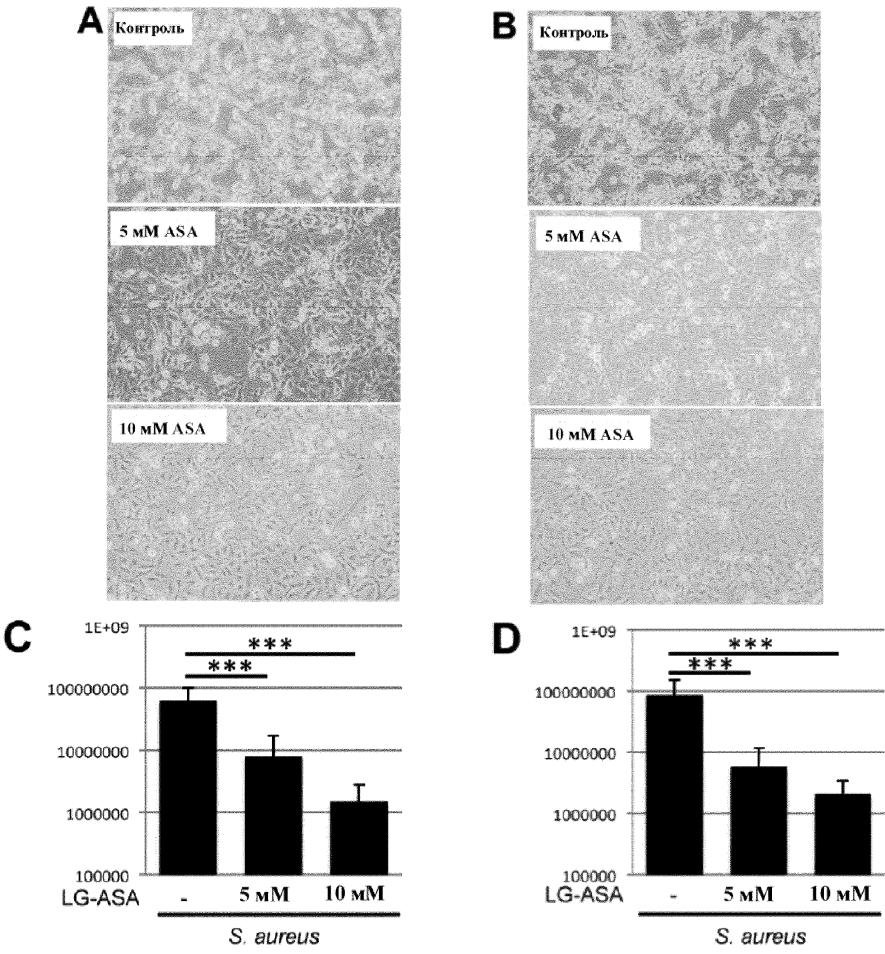
Фиг. 4



Фиг. 5



Фиг. 6

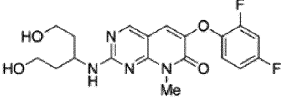
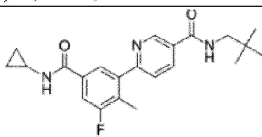
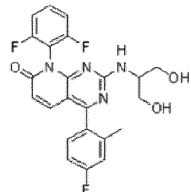


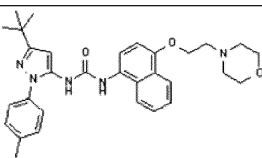
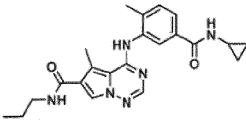
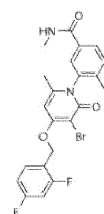
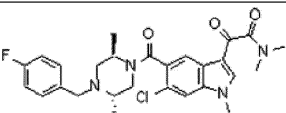
Фиг. 7

Ингибитор p38	Название или № CAS
LY2228820	№ CAS 862507-23-1
CAY10571	№ CAS 152121-46-5
CGH 2466	№ CAS 252198-68-8
SB220025	№ CAS 165806-53-1
Антибиотик LL Z1640-2	№ CAS 66018-38-0
ТАК 715	№ CAS 303162-79-0
Гидрохлорид SB202190	№ CAS 152121-30-7
SKF 86002	№ CAS 72873-74-6
AMG548	2-[[[(2S)-2-амино-3-фенилпропил]амино]-3-метил-5-(2-нафталинил)-6-(4-пиридирил)-4(3H)-пиримидинон

СМРD-1	2'-Фтор-N-(4-гидроксифенил)-[1,1'-дифенил]-4-бутанамид
ЕО 1428	2-Метилфенил-[4-[(2-амино-4-бромфенил)амино]-2-хлорфенил]метанол
ЛХ 401	1-[2-Метокси-4-(метилтио)бензоил]-4-(фенилметил)пиперидин
ML 3403	[5-[4-(4-Фторфенил)-2-метилтио-1H-имидазол-4-ил]-N-(1-фенилэтил)-2-пиридинамин
RWJ 67657	4-[4-(4-Фторфенил)-1-(3-фенилпропил)-5-(4-пиридирил)-1H-имидазол-2-ил]-3-бутин-1-ол
SB 202190	4-[4-(4-Фторфенил)-5-(4-пиридирил)-1H-имидазол-2-ил]фенол
SB 203580	4-[5-(4-Фторфенил)-2-[4-(метилсульфонил)фенил]-1H-имидазол-4-ил]пирдин
Гидрохлорид SB 203580	Гидрохлорид 4-[5-(4-фторфенил)-2-[4-(метилсульфонил)фенил]-1H-имидазол-4-ил]пиридина
SB 239063	Транс-4-[4-(4-фторфенил)-5-(2-метокси-4-пиримидинил)-1H-имидазол-1-ил]циклогексанол

Гидрохлорид SCIO 469	Гидрохлорид 6-хлор-5-[[[(2 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)-4-[(4-фторфенил)метил]-2,5-диметил-1-пиперазинил]карбонил]- <i>N,N</i> ,1-триметил- α -оксо-1 <i>H</i> -индол-3-ацетамида
SX 011	6-Хлор-5-[[4-[(4-фторфенил)метил]-1-пиперидинил]карбонил]- <i>N,N</i> ,1-триметил- α -оксо-1 <i>H</i> -индол-3-ацетамид
TAK 715	<i>N</i> -[4-[2-этил-4-(3-метилфенил)-5-тиазолпил]-2-пиридинил]бензамид
VX 702	6-[(Аминокарбонил)(2,6-дифторфенил)амино]-2-(2,4-дифторфенил)-3-пиридинкарбоксаид
SB 203580	
Ингибитор TIE-2-киназы	№ CAS 948557-43-5
2-(4-Хлорфенил)-4-(фторфенил)-5-пиридин-4-ил-1,2-дигидропиразол-3-он	2-(4-Хлорфенил)-4-(фторфенил)-5-пиридин-4-ил-1,2-дигидропиразол-3-он
VX 745	№ CAS 209410-46-8

Памапимод	 <p>6-(2,4-Дифторфенокси)-2-[[[3-гидрокси-1-(2-гидроксиэтил)пропил]амино]-8-метилпиридо[2,3-<i>d</i>]пиримидин-7(8<i>H</i>)-он, R-1503; Ro-4402257</p>
Лосмапимод (GW856553)	 <p>6-[5-(Циклопропилкарбамойл)-3-фтор-2-метилфенил]-<i>N</i>-(2,2-диметилпропил)пиридин-3-карбоксаид</p>
Дилмапимод (SB681323)	

	8-(2,6-Дифторфенил)-2-((1,3-дигидроксипропан-2-ил)амино)-4-(4-фтор-2-метилфенил)пиридо[2,3-d]пиримидин-7(8H)-он № CAS: 444606-18-2
Дорамапимод (BIRB 796)	 CAS 285983-48-4 C31H37N5O3
BMS-582949	
PH797804	
ARRY-797	
SCIO-469	 CAS 309913-83-5 C27H30ClFN4O3

Фиг. 8 (таблица 2)

А. Выше NF-κB	Кахвеол	Производное AIDCA	Каталпозид	Е-73	Пептиды RelA (P1 и P6)
Натуральный продукт	Вещества, полученные из перца олеяющего	TDZD	Циклопинтенон	Экабет натрия	Вирусный белок
15d-PGJ(2)	Экстракты лакричника	TPCA-1	Дигидроартеанинун	Мезилат габексата	Протеаза 3C (вирус EMC)
Калагуалин	Манумидин А	Производные пиридина	Докозагексаеновая кислота	Глимепирид	Вирус чумки собак
Конофиллин	Монохлорамин	ASHP	Эмодин	Гипохлорит	MNF (вирус миксомы)
Эводиамин	N-ацетилцистеин	Акролеин	Экстракт травы эфедры (мао)	Лозартин	Белок
Гелданамицин	Оксид азота	AGRO100	Эквол	LY294002	C5a
Перилловый спирт	Нитрозилкобаламин	Аминопиримидин	Эрбстатин	Перванадат	DQ 65-79
PSK	Олеандрин	AS602868	Эстроген	Фениларсин-оксид	Fox1j
Рокаламиды	Омега-3-жирные кислоты	Аспирин	Этакриновая кислота	Фенитоин	GILZ
Вирусный белок	Окисленный LDL	Азидотимидин	Фосфомидин	Ro106-9920	HSCO
E1A аденовируса	Пандуратин А	BAY-11-7082	Глиотоксин грибов	Sabaeksan	HSP-72
NSSA (вирус гепатита С)	PEITC	BAY-11-7083	Gamisanghyulyunbueum	U0126 (ингибитор MEK)	Интерлейкин-10
Белок	Петрозаспонгиолит М	Производное бензимидазола	Генипин	Прочее	Интерлейкин-11
Сверхэкспрессия эрбина	Фитиновая кислота	Бензилэтионанат	Генистеин	Стимуляция блуждающего нерва	Интерлейкин-13
BG21 Golli	Пикетатанол	BMS-345541	Глабридин	Низкоинтенсивная лазерная терапия	MTS-SR-IκBa
KSR	Пиносилвин	Карбоплатин	Сульфат глюкозамина	Цинк	Онконаза
MAST205	Экстракт <i>Plagus flosculosus</i>	CDDO-Me	Глутамин	D. Активаторы IκB	Ген RASSF1A
Онкобелок NPM-ALK	Плумбагин	CHS 828	Gumiganghwaltang	Транслокация NF-κB	ROR-α
Протеаза вируса гепатита С	Экстракт граната	Соединение 5	Изомаллотохроманол	Натуральный продукт	Поверхностно-активный белок А
PEDF	Простагландин A1	Соединение А	Изомаллотохромен	PGG	TAT-SR-IκBa

Ритуксимаб	Кверцетин	Циклопентеноны	Экстракт плодов <i>Kochia scoparia</i>	15-дезоксиспергуалин	Белок ZAS3
TNAP	Ренгиолон	CYL-19s	L-аскорбиновая кислота	2',8''-Дианигенин	Белок ZUD
Синтетический продукт	Розмариновая кислота	CYL-26z	Метаболит лефлуномида	SF (из <i>Pteri gueminpinnata</i>)	В-амилоидный белок

Бетанин	Роттерлин	Производное диаилпиридина	Мелатонин	Экстракт листьев <i>Agastache rugosa</i>	Синтетический продукт
Дезлоратадин	Сайкосапонин-d	DPE	Мидазолам	Альгиновая кислота	BMD
LY29 и LY30	Экстракт <i>Salvia miltiorrhiza</i>	Эпоксикинон	Момордин I	Экстракт <i>Anrodia camphorata</i>	Карбарил
MOL 294 **	Сангвинарин	Мезилат габексата	Экстракт <i>Morinda officinalis</i>	Апигенин	CGS 25462
Пефаблок	Экстракт SAm	Гливек	Экстракт <i>Mosla dianthera</i>	Астрагалозид IV	DHMEQ
Ренин	Стауреспорин	Гидрохинон	Экстракт <i>Opuntia ficus-indica</i>	AT514 (серратамолид)	Дилтиазем
SMI и FP	Сесквитерпеновые лактоны	Ибупрофен	Сапонины ширококолокольчика	Аторвастатин	Диоксин
В. Активность ПКК и	Скопарон	IQCAD	Полимиксин В	Экстракт синей жимолости	Дипиридамол
фосфорилирование IxV	Силибинин	Индолкарбоксамид	Экстракт плодов <i>Poncirus trifoliata</i>	Экстракт <i>Buthus martensii</i>	Дисульфирам
Натуральный продукт	Силимарин	Изобутилниртрил	Пробиотики	Кантаридин	Эналаприл
[6]-Гингерол	Сульфорафан	Димер джестерона	Простагландин	Хинзаноид	mEET
Ацетат 1'-ацетоксикавигола	Сулиндак	Аналог 15-дезоксиспергуалина	Резинифератоксин	Кларитромицин	Флувастатин
20(S)-протопанаксатриол	Тетрандин	Метотрексат	Экстракты крапивы жгучей	Экстракт <i>Cornus officinalis</i>	Индол-3-карбинол
4-гидроксиксинонелаль	Теафлавин	MLB120	Тиопентал	Эриокаликсин В	JSH-23
Ацетилбосвеллиевые кислоты	Тиенопирин	Монохлорамин	Типифарниб	Ганглиозиды	KL-1156
Анандамид	Гилианин	MX781 (антагонист ретиноидных рецепторов)	Титан	Глюкокортикоиды	Лефлуномид
Анетол	Урсоловая кислота	4-NPR	TNP-470	Экстракты HP	Левамизол
Апигенин	Веснаринон	Мезилат нафамостата	<i>Trichomonas vaginalis</i>	Гирсутенон	MEB
<i>Artemisia vestita</i>	Веделолактон	NSAID	Липопротейны, богатые TG	Человеческое грудное молоко	Моксифлоксацин
Baoganning	Витанолиты	PS-1145 (MLN1145)	Урсодезоксихолевая кислота	JM34	Омапатрилат
Бетулиновая кислота	Ксантоангелол D	PQD	Экстракт <i>Xanthium strumarium</i>	KIOM-79	R-этодолак

Экстракты малины ежевичкообразной	Зерумбон	Производное пиридоксина	β -PEITC	Лептомицин В	Ролипрам
Буддлеясапонин IV	β -карболин	SC-514	8-MSO	Неомицин	SC236 (ингибитор COX-2)
Какоспонгионоид В	γ -мангостин	Сцитонемин	β -лапахон	Nucling	Трифлузал
Калагуалин	γ -токотриенол	Салицилат натрия	Пептид	Орегонин	Легучие анестетики
Кардамонин	Пептид	Статины (некоторые)	Пенетратин	ОХРАРС	Е. Связывание NF- κ B с ДНК

Кардамонин	Пептид IKK β	Сульфасалазин	VIP	Леонифлорин	Неорганический комплекс
Каспарол	Пептид CC2-LZ NEMO	Аналоги сульфасалазина	Белок	Фаллацидин	Металлы (хром, кадмий, золото, свинец, ртуть, цинк, мышьяк)
Кобротоксин	Белок	Сурванта	Активированный белок С	Пиперин	Натуральный продукт
Циклопоксидон	Антитромбин III	Галидомид	HSP-70	Питавастатин	Антинодафин
Декурсин	Хорионический гонадотропин	ГН1 52	Интерлейкин-13	Экстракт корня ширококолокольчика	Антоцианины
Дегидроаскорбиновая кислота	FHIT	YC-1	Внутриклеточный Ig	Пробиотики	Экстракт <i>Arnica montana</i>
Дексанабинол	HB-EGF	Прочее	Продукт гена Munt1	Рапамицин	Артемизинин
Дигитоксин	Фактор роста гепатоцитов	Свинец	Белок, связанный с нейроброматозом 2 типа	Водный экстракт ревеня	Байкалеин
Диосгенин	Интерферон α	Легкая гипотермия	PACAP	Экстракт <i>Salvia miltiorrhiza</i>	Бамбарский земляной орех
Дитерпены	Интерлейкин-10	Физиологический раствор (низкая концентрация Na ⁺)	SAIF	Экстракт SH	Бразильский продукт
Докозагексаеновая кислота	PAN1	С. Разрушение I κ B	ST2 (белок, подобный рецептору IL-1)	Селенометнонин	Кальцитриол
Фалкариндол	PTEN	Натуральный продукт	α -MSH	Shenfu	Капснат
Флавопиридол	SOCS1	5'-метилтиадеозин	γ -глутамил-гистидин-синтетаза	Экстракт корня софоры	Катализид
Фуранонафтохинон	Вирусный белок	Экстракт <i>Artemisia tracyanogol</i>	Бактериальный/вирусный белок	Soroongsan	Кора кошачьего когтя
Гарцинин В	Аденовирус	Алахлор	K1L (белок вируса осповакцины)	Экстракт <i>Sorbus commixta</i>	
Экстракт <i>Glossogyne tenuifolia</i>	Коровый белок (вирус гепатита С)	Аментофлавоин	Nef (HIV-1)	Сфондин	
Хлорамин глицина	Цитомегаловирус	<i>Antrodia camphorata</i>	Белок Vpu (HIV-1)	Т. Полигликозиды	
Гуттулестерон	E7 (папилломавирус)	Экстракт <i>Artemisia capillaries</i>	VopJ	Younggaechulgamtang	
Гербицидин А	MC159	Аукубин	Синтетический продукт	α -пинен	

Хонокиол	MC160	Байкалеин	1-Бромпропан	Пептид	Cheongyeolsaseuptang
Гипоэтоксид	NSSB (вирус гепатита С)	Экстракт ежевики	Ацетаминофен	NCPD	Хитозан
Индирубин-3'-оксим	VIRF3 (KSHV)	Buchang-tang	Диамид	PNSO	Корень цикория
Изопалонтигенин	Синтетический продукт	Капсаицин	Добутамин		CSPDP
Кларитромицин	Сверхэкспрессия AIM2	Раксофеласт	F. Протеасома/протеаза	Экстракт коры	
Клорикроман	Ангиопозтин-1	Рибавирин	Натуральный продукт	<i>Mangifera indica</i>	

С-К и Rh(2)	Антитромбин	Рифамиды	Циклоспорин А	Мангиферин	
Экстракт коры коричневого дерева	Белок AytA (сальмонелла)	Ритонавир	Лактацистин	Мелатонин	
Криптотаншенин	β -катенин	Рокситромицин	Пептид	Антоцианины шелковицы	
Цитохалазин D	Бромелайн	DAAS	ALLnL	Мирицетин	
Экстракт черного риса	CaMKK	Производное серотонина	LLM	N-ацетил-L-цистеин	
Danshenshu	Сверхэкспрессия CD43	Симвастатин	Убиквитинлигаза	Нациселин	
Дитерпеноиды	Сверхэкспрессия FLN29	SM-7368**	Z-LLL	Нарингин	
Энт-каурановые дитерпеноиды	FLIP	T-614	Z-LLnV	N-этилмалеимид	
Гидрохлорид эпинастина	G-120	Сульфасалазин	Синтетический продукт	Нитрозоглутатион	
Эпоксикинол А	Gax (гомеобоксный белок)	SUN C8079	APNE	NDGA	
Эритромицин	Фактор устойчивости к HIV-1	Триклозан в комбинации с CPC	Пептид, содержащий бороновую кислоту	Охнафлавоин	
Эводиамин	Интерлейкин-4	Табачный дым	ВТЕБ	Ортофенантролин	
Рыбий жир	SspH1 и IpaH9.8	Верапамил	3,4-дихлоризокумарин	Фениларсин-оксид	

Экстракты	NDPP1(белок CARD)	Прочее	Дезокиспергуалин	PhIP	
<i>Fomes fomentarius</i>	Сверхэкспрессируемый ZIP1	Жар (лихорадоподобный)	DFP	<i>Phyllanthus urinaria</i>	
Фукоидан	p8	Дыхательный ацидоз	Дисульфрам	PMC	
Галловая кислота	p202a	Гиперосмолярность	FK506 (такролимус)	PTX	
<i>Ganoderma lucidum</i>	p21 (рекомбинантный)	Гипотермия	Бортезомиб	Пиритион	
Гарцинол	PIAS1	Спирт	Салиноспориамид А	Пирролиндитиокарбамат	
Геранилгераниол	Проопиомеланокартин	Е. Трансактивация NF-κB	TLCK	Кверцетин	
Гинголид В	Белок PYPAF1	Натуральные продукты	TPCK	Хинозолины	
Глицирризин	Ингибитор Raf-киназы	4'-DM-6-Mrtox	С. Антиоксиданты	Ребамипид	
Галофутинон	Белок плодов	4-фенилкумарины	23- Гидроксирасовая кислота	Красное вино	
Гематенин	<i>Rhus verniciflua</i>	АНУР	Выдержанный чесночный экстракт	Окислительно-восстановительный фактор 1	

Соединение растительного происхождения 861	SLPI	Аденозин	Анетодитиолтион	Ресвератрол	
Гидроксизитилкрамал	Siah2	цАМФ	Апоцинин	Вещество, полученное из женьшеня	
Гидроксизитилпуэрарин	Сверхэкспрессия	Экстракт <i>Artemisia sylvestica</i>	Сок/экстракты яблока	Ротенон	
Гиперицин	ацетилазы SIRT1	Бифидобактерии	Арктигенин	Рокситромицин	
Камебакаурин	Siva-1	Черника и ягодная смесь	p7F полыни	S-аллилцистеин	
Линолевая кислота	<i>Solana nigrum L.</i>	BSASM	Астаксантин	Саукинон	
Корень воробейника	Поверхностно-активный белок А	Фенилпропаноиды BF	Бенидипин	Спинолактон	
Макролидные антибиотики	Сверхэкспрессия Tom1	cPrG HC	Бис-эвгенол	Экстракты земляники	
Экстракты средиземноморских растений	Трансдоминантный p50	Экстракт морских водорослей	Соединения BG	Таксифолин	
	Утероглобин	Экстракт плодов бенинаксы	BNA	Темпол	
2-Метоксистеридиол	VEGF	Глюкокортикоиды	CAPE	Тепоксалин	
6-MTC	Синтетический продукт	Гипенозид XLIX	Карнозол	Трет-бутилгидрохинон	

Никотин	Ингибитор АДФ-рибозилрования	Kwei Ling Ko3	Карведилол	Тетрациклическое соединение А	
Экстракт коры	7-амино-4-метилкумарин	Корень LC	Производные катехола	Витамин B6	
<i>Ochna macrocalyx</i>	Амрион	Лютеолин	Целастрол	Витамин С	
Оридонин	Атровастат	Манассантины А, В	Цефарантин	Витамин D	
PC-SPES (смесь 8 трав)	Бенфотиамин	Экстракт коры MI	Хлорогеновая кислота	Производные витамина Е	
PGG	Бензамид	Мезуол	Хлорофиллин	Вогонин	
Пеплуанон	Бисфенол А	Нобилетин	Полифенолы какао	Ксантогуомол	
Экстракты	Карпрофен	Фомол	Куркумин	Якухинон А, В	
<i>Phyllanthus amarus</i>	Карбоцистеин	Психозин	DNEA	α-липовая кислота	
Растительное соединение А	Целекоксиб	Qingkailing	DNEA-сульфат	α-токоферол	
Полнозеллин	Гемцитабин	Сауцернеол D и E	Дегидроэвдиамин	α-токофериласцетат	
Пренилбисаболан 3	Коричный альдегид	Shuanghuanglian	Деметилтраксиллагенин	α-токоферилсукцинат	

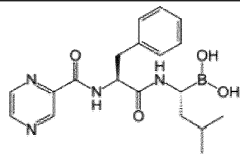
Простагландин E2	2-метокси-CNA	Экстракт <i>Smilax bockii</i>	Диэтилдитиокарбамат	β-каротин	
PSK	2-гидрокси-CNA	Триинолеин	Дефероксамин		
Хинная кислота	CDS	Экстракт <i>Uncaria tomentosa</i>	Дигидроизоэвгенол		
Санггенон C	Соединение CP	Экстракты WS	Дигидролипоевая кислота		
Сезамин	Цианогуанидин	Вортманин	Дилазеп		
Shen-Fu	HMP	α-зеараленол	Фенофибровая кислота		
Силибинин	α-диформетилорнитин	Вирусный белок	DMDTC		
Синоменин	DTD	BZLF1 (белок EBV)	Диметилсульфоксид		
Экстракт птериса мечевидного	Синий Эванса	Продукты гена SH (PMV)	Дисульфирам		
Экстракт	Эводиамин	Белок	Эбселен		
<i>Tanacetum larvatum</i>	Фенолдопам	Антитромбин	Эдаравон		
Танзионы	FEX	Фактор репрессии NF-каппа-B	EGTA		
Таурин + ниацин	Фиораты	PIAS3	ЕРС-K1		
TZD MCC-555	FK778	РТХ-B	Эпигаллокатехин-3-галлат		
Трихостатин А	Меглумин флуниксина	Синтетический продукт	Эрготионеин		
Триптолид	Флурбипрофен	17-AAG	Этилпируват		
Тирфостин AG-126	Гидрохинон	TMFC	<i>Ganoderma lucidum</i>		
Урсоловая кислота	IMD-0354	Производные AQC	Полисахариды		
Витаферин А	JSH-21	Производные	Гарцинол		
Ксантогулом	КТ-90	9-аминоакридина	γ-глутамилцистеин-сингетаз		
Ксилит	Ловастатин	Производные хромена	Экстракт <i>Ginkgo biloba</i>		

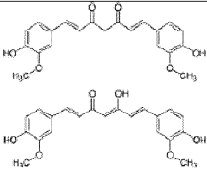
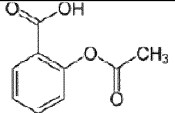
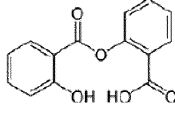
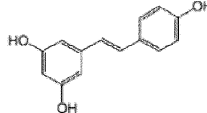

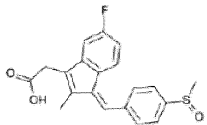
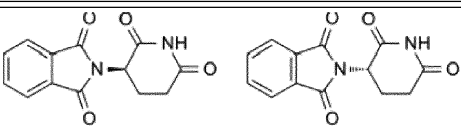
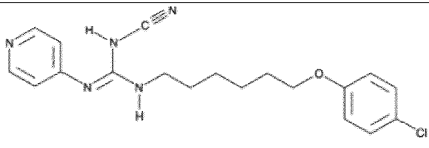
Yan-gan-wan	Меркаптопирозин	D609	Глутатион		
Yin-Chen-Hao	Мевинолин	Диметилфумарат	Гематеин		

Экстракт <i>Yucca schidigera</i>	Моноэтилфумарат	EMDPC	Гидрохинон		
Пептид	Моксифлоксацин	Гистидин	Гидрохинон		
Грелин	Никорандил	PI HIV-1	IRFI 042		
Пептид YY	Нилвадипин	Месаламин	Тетраксиссодержащее соединение железа		
Рапамипцин	NO-ASA	PEITC	Изовитексин		
Вирусный белок	Панэпоксидон	Пранлукаст	Экстракт Kangen-kagyu		
Вирус африканской чумы свиней	Пептидные нуклеиновые кислоты	RO31-8220	Кетамин		
Белки С, V вируса Сендай	Периндоприл	(ингибитор PKC)	Лацидипин		
E1B (аденовирус)	PAD	SB203580 (ингибитор MAPK)	Лазароиды		
ICP27 (HSV-1)	α-PBN	Тетратиомолибдат	L-цистеин		
H4/N5 (браковирин)	Пиоглитазон	Траниласт	Разновидности брусники		
NS3/4A (вирус гепатита С)	Пирфенидон	Троглитазон	Лупеол		
Белок	Производные PNO	Прочее	Магнолол		
Адипонектин	Квинадрин	Пониженная гравитация	Мальтол		

Фиг. 9 (таблица 3)

Ингибитор NFκB	Название или № CAS
MG 132	<i>N</i> -[(фенилметокси)карбонил]-L-лейцил- <i>N</i> -[(1S)-1-формил-3-метилбутил]-L-лейцинамид
TRCA-1	2-[(Аминокарбонил)амино]-5-(4-фторфенил)-3-тиофенкарбоксамид
PCTC	Пирролидиндитиокарбамат аммония
IMD 0354	<i>N</i> -[3,5-бис(трифторметил)фенил]-5-хлор-2-гидроксibenзамид
Лютеолин	2-(3,4-Дигидроксифенил)-5,7-дигидроксi-4 <i>H</i> -1-бензопиран-4-он
Фенэтиловый сложный эфир кофейной кислоты/CAPE	2-Фенилэтиловый сложный эфир 3-(3,4-дигидроксифенил)-2-пропеновой кислоты
Кардамонин	(2 <i>E</i>)-1-(2,4-дигидроксi-6-метоксифенил)-3-фенил-2-пропен-1-он
PF 184	8-[[[5-хлор-2-[3,4-диметил-3,4-бис(гидроксиметил)-1-пирролидинил]-4-пиридирил]карбонил]амино]-1-(4-фторфенил)-4,5-дигидро-1 <i>H</i> -бенз[<i>g</i>]индазол-3-карбоксамид
IKK 16	Гидрохлорид <i>N</i> -(4-пирролидин-1-илпиперидин-1-ил)-[4-(4-бензо[<i>b</i>]тиофен-2-илпиримидин-2-иламино)фенил]карбонамида
SC 514	4-Амино-[2',3'-дитиофен]-5-карбоксамид
Витаферин А	δ-лактон (4β,5β,6β,22 <i>R</i>)-5,6-эпокси-4,22,27-тригидроксi-1-оксоэргоста-2,24-диен-26-овой кислоты
Арктигенин	(3 <i>R</i> ,4 <i>R</i>)-4-[(3,4-диметоксифенил)метил]дигидро-3-[(4-гидроксi-3-метоксифенил)метил]-2(3 <i>H</i>)-фуранон
Bay 11-7085	(2 <i>E</i>)-3-[[4-(1,1-диметилэтил)фенил]сульфонил]-2-пропеннитрил
PSI	<i>Трет</i> -бутиловый сложный эфир <i>N</i> -[(фенилметокси)карбонил]-L-изолейцил-L-α-глутамил- <i>N</i> -[(1S)-1-формил-3-метилбутил]-L-аланинамида
PR 39 (свиной)	Arg-Arg-Arg-Pro-Arg-Pro-Pro-Tyr-Leu-Pro-Arg-Pro-Arg-Pro-Pro-Phe-Phe-Pro-Pro-Arg-Leu-Pro-Pro-Arg-Ile-Pro-Pro-Gly-Phe-Pro-Pro-Arg-Phe-Pro-Pro-Arg-Phe-Pro-NH ₂
Ro 106-9920	6-(фенилсульфинил)тетразоло[1,5- <i>b</i>]пиридазин
Bay 11-7821	(2 <i>E</i>)-3-[(4-метилфенил)сульфонил]-2-пропеннитрил
ML-130	1-[(4-метилфенил)сульфонил]-1 <i>H</i> -бензимидазол-2-амин
Целастрол	(9β,13α,14β,20α)-3-гидроксi-9,13-диметил-2-оксо-24,25,26-триноролеана-1(10),3,5,7-тетраен-29-овая кислота
Таншинон ПА	6,7,8,9-Тетрагидро-1,6,6-триметилфенантро[1,2- <i>b</i>]фуран-10,11-дион
HU 211	(6a <i>S</i> ,10a <i>S</i>)-3-(1,1-диметилгептил)-6a,7,10,10a-тетрагидро-1-гидроксi-6,6-диметил-6 <i>H</i> -дibenзо[<i>b,d</i>]пиран-9-метанол
Глиотоксин	(3 <i>R</i> ,5a <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,10a <i>R</i>)-2,3,5a,6-тетрагидро-6-гидроксi-3-(гидроксиметил)-2-метил-10 <i>H</i> -3,10a-эпидитиопиразино[1,2- <i>a</i>]индол-1,4-дион
CID 2858522	1-[3,5-Бис(1,1-диметилэтил)-4-гидроксифенил]-2-[2-[(3-гидроксипропил)амино]-5,6-диметил-1 <i>H</i> -бензимидазол-1-ил)этанон
Хонокиол	5,3'-Диаллил-2,4'-дигидроксидифенил
Андрографолид	(3 <i>E</i> ,4 <i>S</i>)-3-[2-[(1 <i>R</i> ,4a <i>S</i> ,5 <i>R</i> ,6 <i>R</i> ,8a <i>S</i>)-декагидро-6-гидроксi-5-(гидроксиметил)-5,8a-диметил-2-метилен-1-нафталинил]этилиден]дигидро-4-гидроксi-2(3 <i>H</i>)-фуранон
1OZ-гимениалдинин	(4 <i>Z</i>)-4-(2-амино-1,5-дигидро-5-оксо-4 <i>H</i> -имидазол-4-илиден)-2-бром-4,5,6,7-тетрагидропирроло[2,3- <i>c</i>]азепин-8(1 <i>H</i>)-он
ACHP	2-Амино-6-[2-(циклопропилметокси)-6-гидроксифенил]-4-(4-пиперидинил)-3-пиридинкарбонитрил
Пристимерин	Метловый сложный эфир (9β,13α,14β,20α)-3-гидроксi-9,13-диметил-2-оксо-24,25,26-триноролеана-1(10),3,5,7-тетраен-29-овой кислоты
Сульфасалазин	5-[[4-(2-пиридилсульфамонил)фенил]азо]салициловая кислота
Дигидрохлорид ML 120B	Дигидрохлорид <i>N</i> -(6-хлор-7-метокси-9 <i>H</i> -пиридо[3,4- <i>b</i>]индол-8-ил)-2-метил-3-пиридинкарбоксамид
Амлексанокс	2-Амино-7-(1-метилэтил)-5-оксо-5 <i>H</i> -[1]бензопирано[2,3- <i>b</i>]пиридин-3-карбоновая кислота
9-Метилстрептимидон	№ CAS 51867-94-8
N-стеаронилфитосфингозин	№ CAS 34354-88-6
2-(1,8-нафтиридин-2-ил)-фенол	№ CAS 65182-56-1
S-аминосалициловая кислота	№ CAS 89-57-6

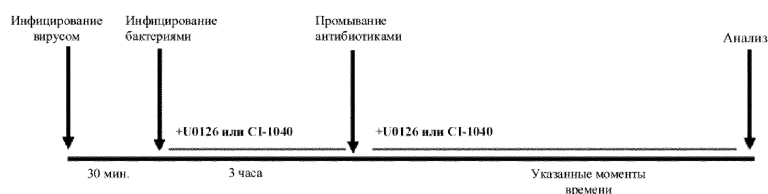
BAY11-7085	№ CAS 196309-76-9
Этил-3,4-дигидроксициннамат	№ CAS 66648-50-8
Геланалин	№ CAS 6754-13-8
Ингибитор активации NF-κB II, JSH-23	№ CAS 749886-87-1
Модулятор рецепторов глюкокортикоидов, CpdA	№ CAS 14593-25-0
PPM-18	№ CAS 65240-86-0
Аспирин	№ CAS 50-78-2
LASAG	Lys-Gly-ацетилсалицилат (также называемый LG-ацетилсалицилатом), смесь ацетилсалицилата D,L-лизина и глицина, см. также LG-ASA
Аммониевая соль пирролидиндитиокарбаминовой кислоты	№ CAS 5108-96-3
(R)-MG132	№ CAS 1211877-36-9
Рокагламид	№ CAS 84573-16-0
Салицилат натрия	№ CAS 54-21-7
QNZ	№ CAS 545380-34-5
PS-1145	№ CAS 431898-65-6
CAY10512	№ CAS 139141-12-1
Куркумин (синтетический)	№ CAS 458-37-7
LG-ASA	Lys-Gly-ацетилсалицилат (также называемый LG-ацетилсалицилатом), смесь ацетилсалицилата D,L-лизина и глицина, см. также LASAG
Бортезомиб	 <p>(1R)-3-метил-1-[[[(2S)-3-фенил-2-[(2-пиразинкарбонил)-амино]пропанойл)амино]бутилбороновая кислота</p>

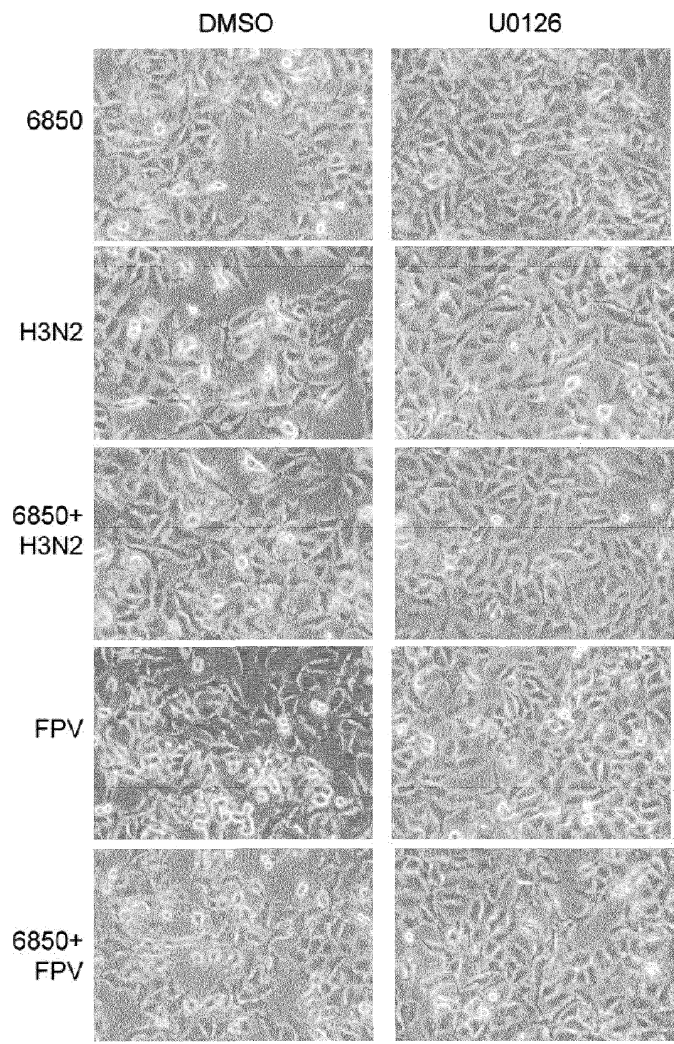
Куркумин	 <p>(1E,6E)-1,7-бис-(4-гидрокси-3-метоксифенил)-гепта-1,6-диен-3,5-дион</p>
Аспирин	 <p>Ацетилсалициловая кислота</p>
Салсалаат	 <p>2-(2-Гидроксibenzoил)оксибензойная кислота</p>
Ресвератрол	 <p>3,5,4'-Тригидрокси-транс-стильбен</p>
Дезокиспергуалин	 <p>$C_{17}H_{37}N_7O_3$</p>
Сулиндак	 <p>{{(1Z)-5-фтор-2-метил-1-[4-(метилсульфинил)бензилиден]-1H-инден-3-ил}уксусная кислота</p>
Талидомид	 <p>(R)-талидомид (S)-талидомид</p> <p>$C_{13}H_{10}N_2O_4$</p>
AGRO-100	Также известен как AS1411
CHS 828	 <p>GMX 1778 (CAS 200484-11-3)</p>

Фиг. 10 (таблица 4)

Класс антибиотиков	Генерические названия
Аминогликозиды	Амикацин, гентамицин, канамицин, неомицин, нетилмицин, тобрамицин, паромомицин, спектиномицин
Ансамбицины	Гелданамицин, гербиномицин, рифаксимин, стрептомицин
Карбапенымы	Лоракарбеф
Карбапенемы	Эртапенем, дорипенем, имипенем/циластатин, меропенем
Цефалоспорины (первого поколения)	Цефадроксил, цефазолин, цефалотин, цефалексин
Цефалоспорины (второго поколения)	Цефаклор, цефамандол, цефокситин, цефпрозил, цефуроксим
Цефалоспорины (третьего поколения)	Цефиксим, цефдинир, цефдиторен, цефоперазон, цефотаксим, цефподоксим, цефтазидим, цефтибутен, цефтизоксим, цефтриаксон
Цефалоспорины (четвертого поколения)	Цефепим
Цефалоспорины (пятого поколения)	Фосамил цеftarолина, цефтобипрол
Гликопептиды	Тейкопланин, ванкомицин, телаванцин
Линкозамиды	Клиндамицин, линкомицин
Липопептиды	Далтомицин
Макролиды	Азитромицин, кларитромицин, дицитромицин, эритромицин, рокситромицин, тролеандомицин, телитромицин, спирамицин
Монобактамы	Азтреонам
Нитрофураны	Фуразолидон, нитрофурантонн
Оксазолидиноны	Линезолид, посизолид, радезолид, торезолид
Пенициллины	Амоксициллин, ампициллин, азлоциллин, карбенициллин, клоксациллин, диклоксациллин, флуоксоксициллин, мезлоциллин, метициллин, нафциллин, оксациллин, пенициллин G, пенициллин V, пиперациллин, пенициллин G, темоциллин, тикарциллин
Комбинации пенициллинов	Амоксициллин/клавуланат, ампициллин/сульбактам, пиперациллин/тазобактам, тикарциллин/клавуланат
Полипептиды	Бацитрацин, колистин, полимиксин В
Хинолоны/фторхинолоны	Ципрофлоксацин, эноксацин, гатифлоксацин, гемифлоксацин, левофлоксацин, ломефлоксацин, моксифлоксацин, налидиксовая кислота, норфлоксацин, офлоксацин, тровафлоксацин, грепафлоксацин, спарфлоксацин, темзафлоксацин
Сульфонамиды	Мафенид, сульфаметамид, сульфадиазин, сульфадиазин серебра, сульфадиметоксин, сульфаметизол, сульфаметоксазол, сульфанилимид (устаревший), сульфасалазин, сульфизоксазол, триметоприм-сульфаметоксазол (ко-тримоксазол) (TMP-SMX), сульфонамидохризондин (устаревший)
Тетрациклины	Демеклоциллин, доксициллин, миноциклин, окситетрациклин, тетрациклин
Лизостафин	Представляет собой металлоэндопептидазу <i>Staphylococcus simulans</i> . Он может функционировать в качестве противомикробного средства против <i>Staphylococcus aureus</i> .

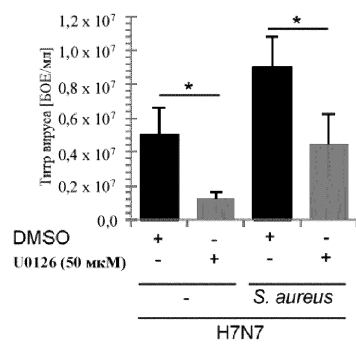
Фиг. 11 (таблица 5)

В
Фиг. 12

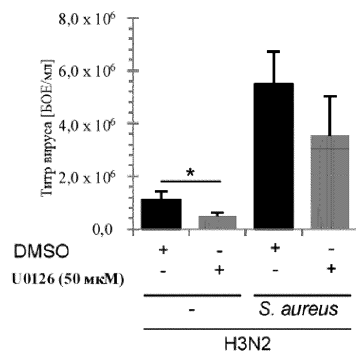


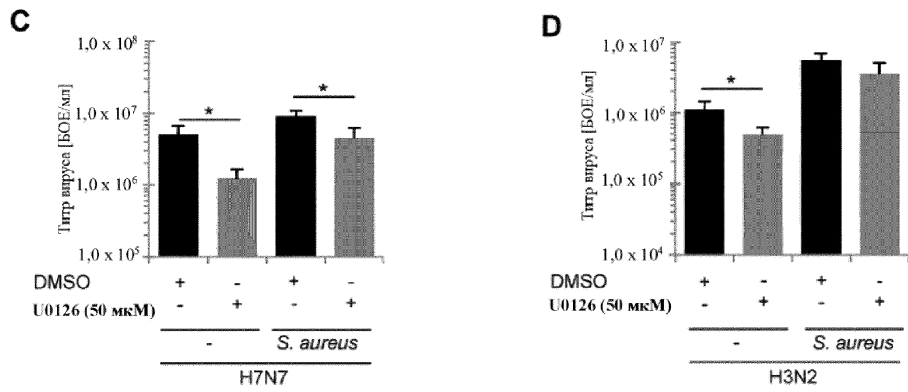
Фиг. 13

A

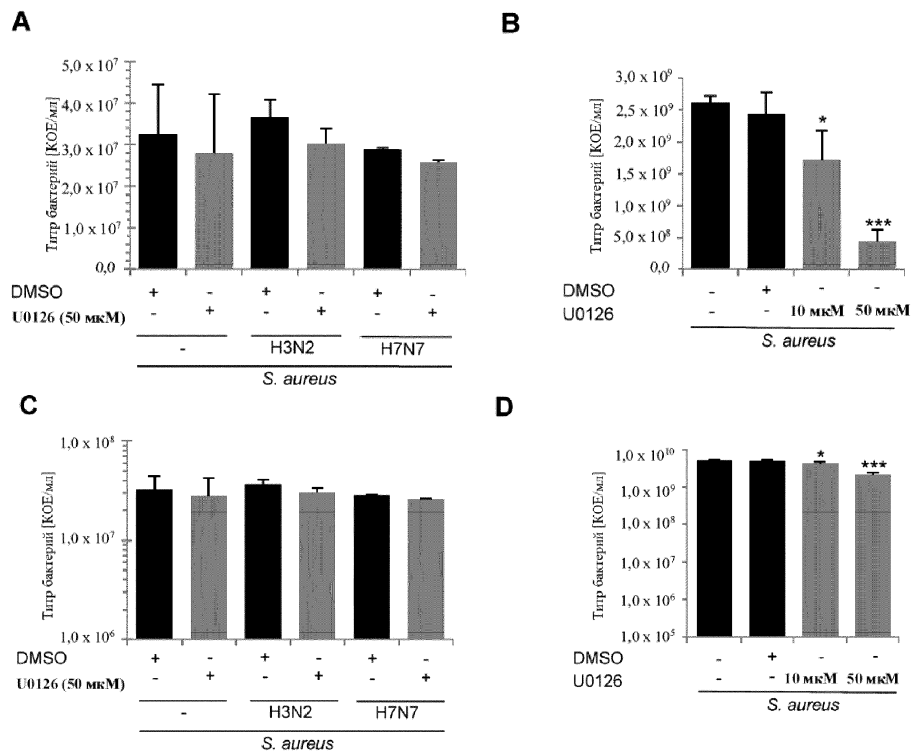


B

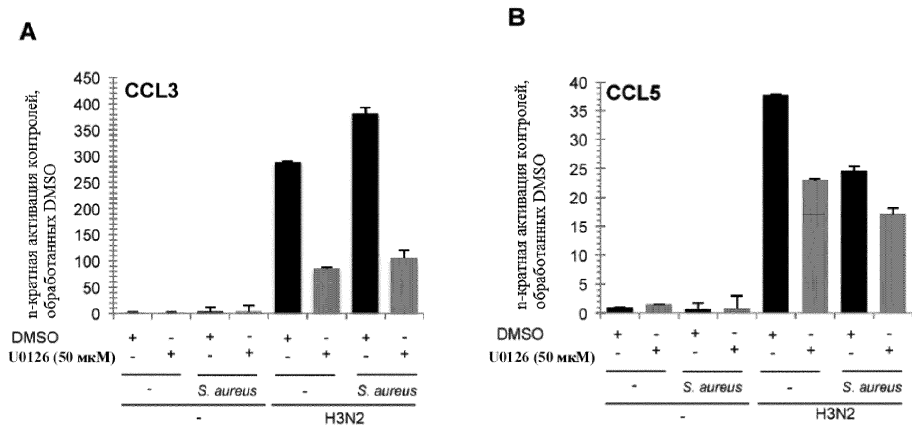


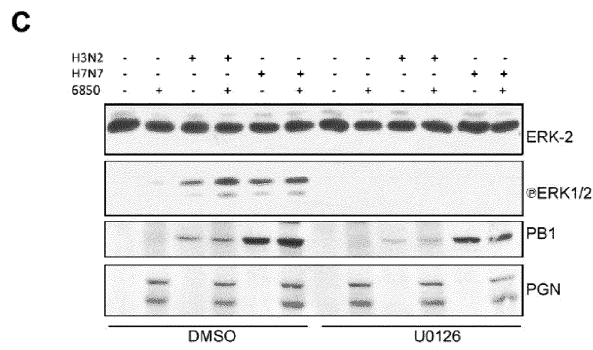


Фиг. 14



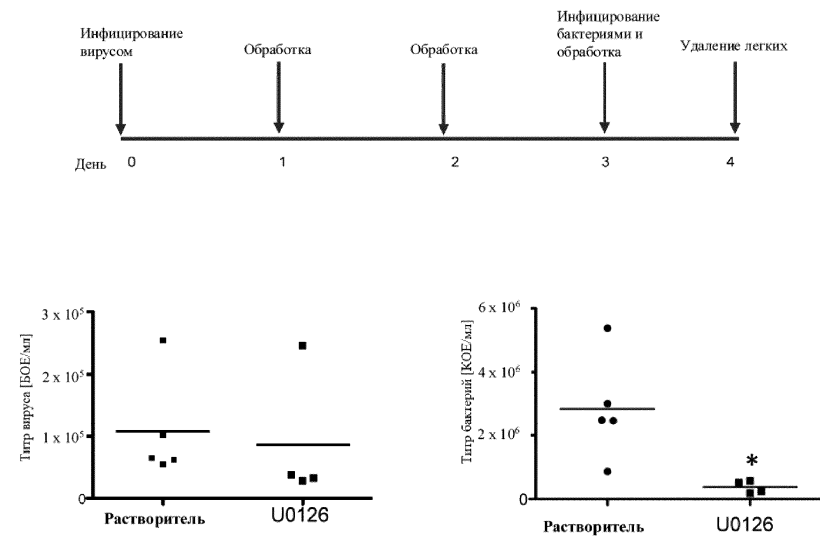
Фиг. 15



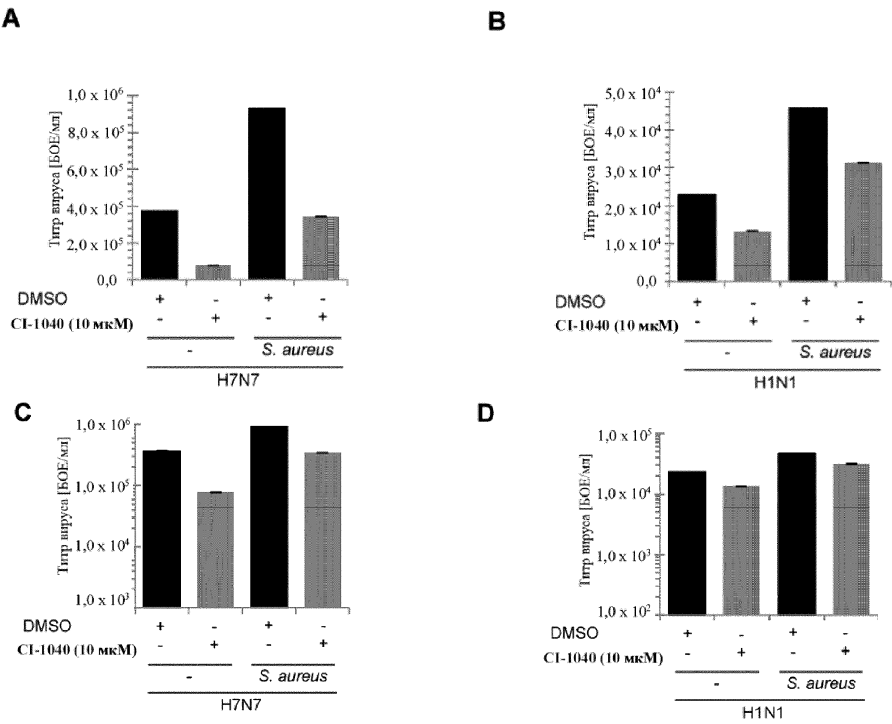


Фиг. 16

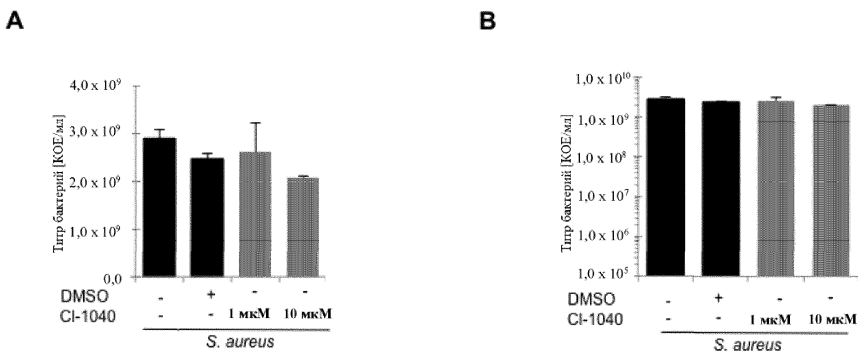
Процедура инфицирования для экспериментов *in vivo*



Фиг. 17

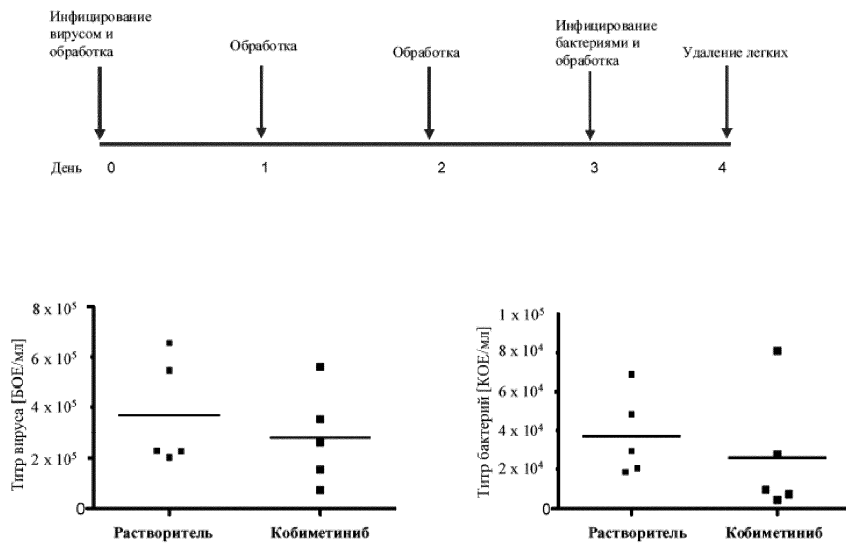


Фиг. 18

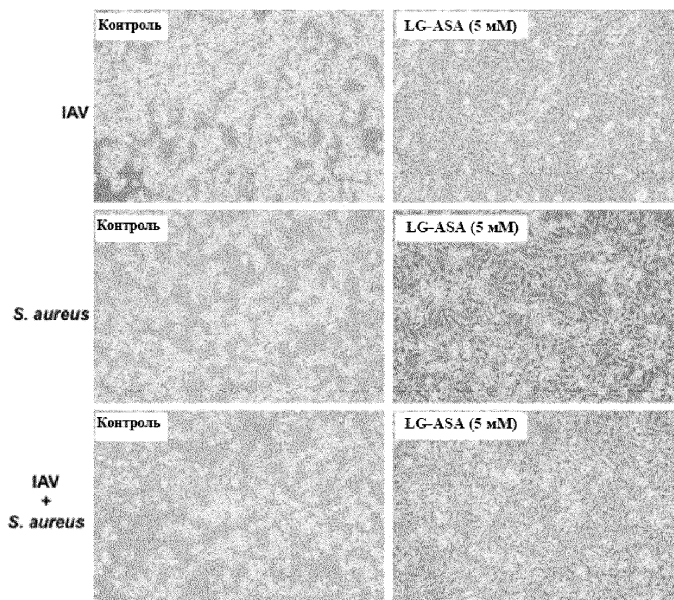
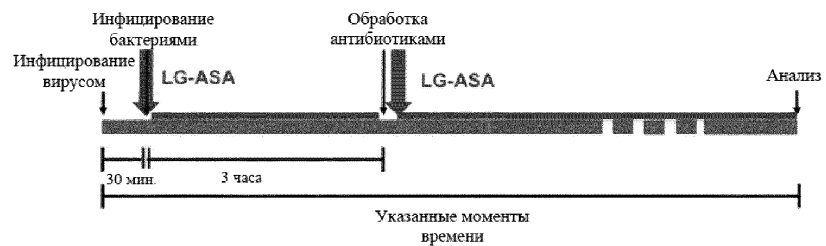


Фиг. 19

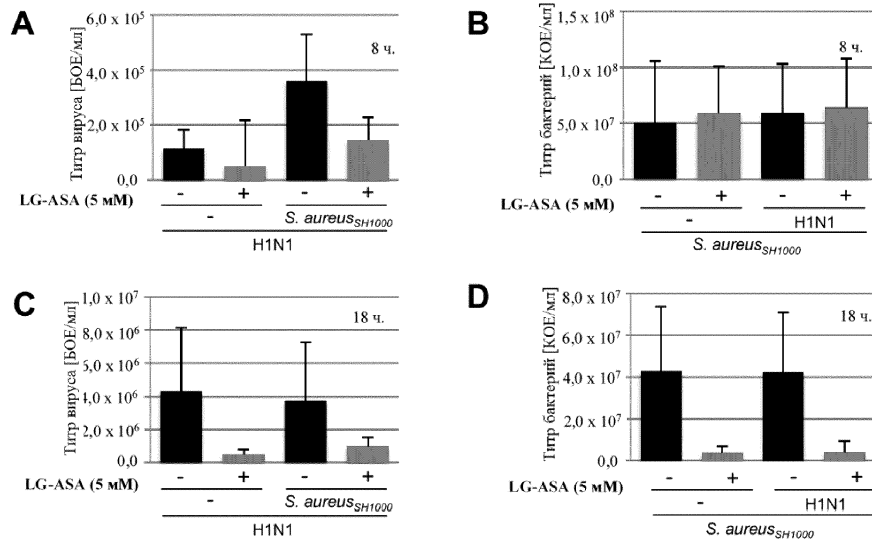
Процедура инфицирования для экспериментов *in vivo*

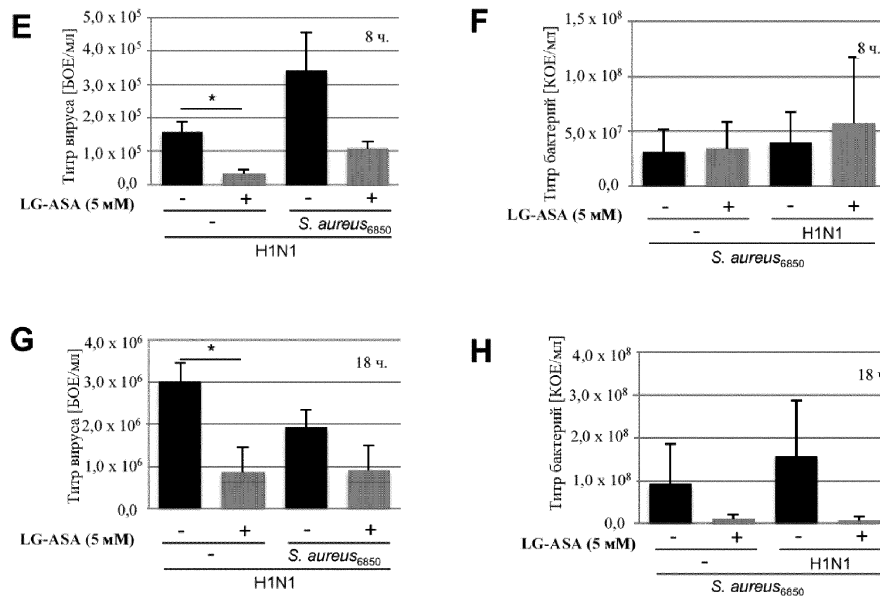


Фиг. 20

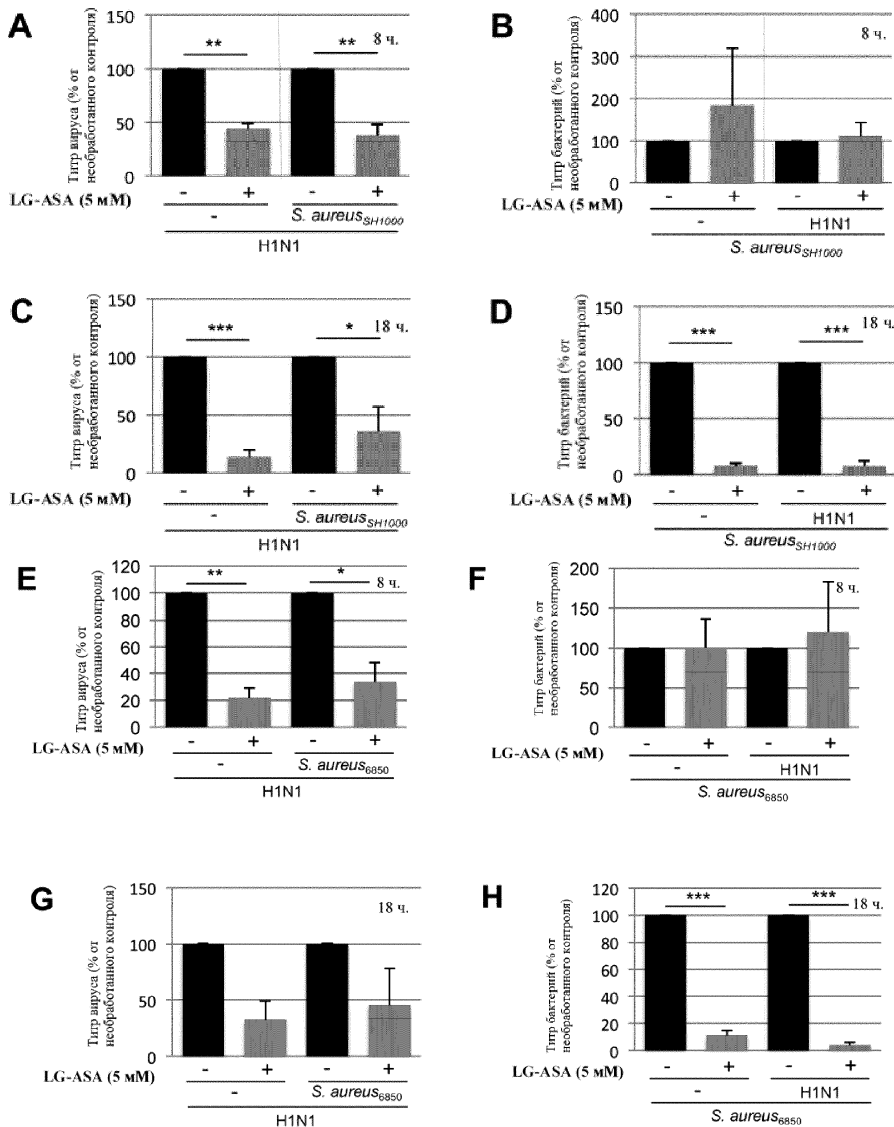


Фиг. 21

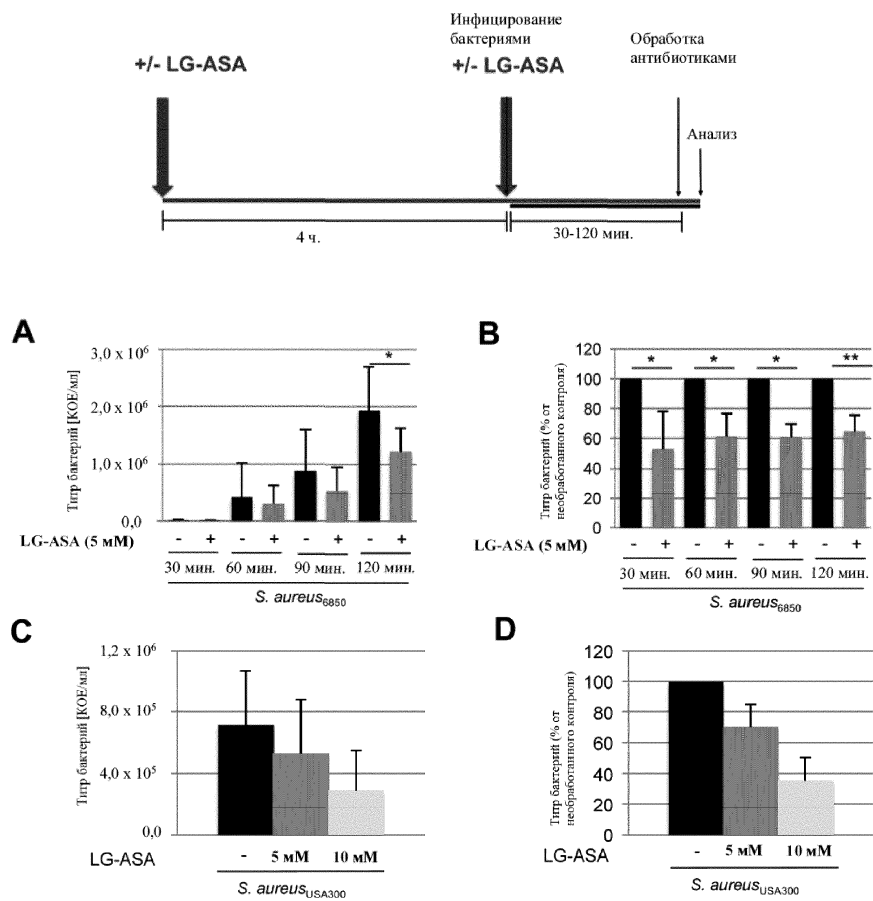




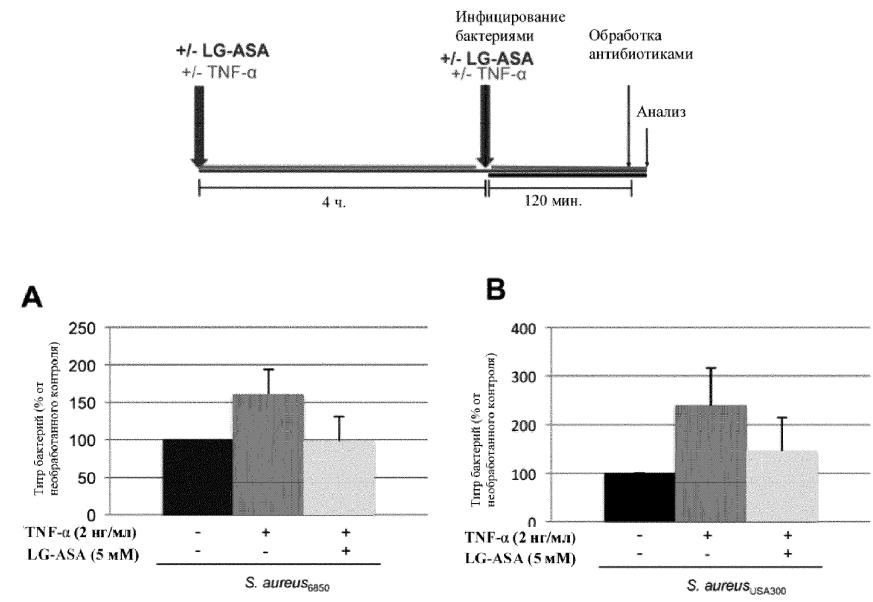
Фиг. 22



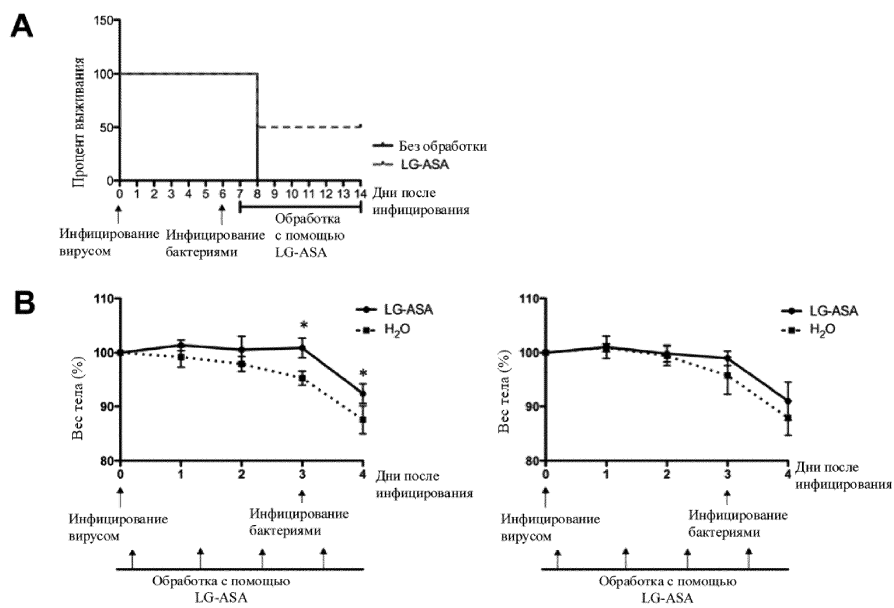
Фиг. 23



Фиг. 24



Фиг. 25



Фиг. 26



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2