



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.06.06

(21) Номер заявки
202192454

(22) Дата подачи заявки
2020.04.16

(51) Int. Cl. *A61K 31/196* (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
A61P 31/16 (2006.01)
A61P 31/14 (2006.01)

(54) НОВЫЙ ИНГИБИТОР МЕК ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ВИРУСНЫХ И БАКТЕРИАЛЬНЫХ ИНФЕКЦИЙ

(31) LU101183

(32) 2019.04.16

(33) LU

(43) 2022.03.22

(86) PCT/EP2020/060692

(87) WO 2020/212478 2020.10.22

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

(72) Изобретатель:
Планц Оливер (DE)

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(56) HAASBACH EMANUEL ET AL.: "The MEK-inhibitor CI-1040 displays a broad anti-influenza virus activity in vitro and provides a prolonged treatment window compared to standard of care in vivo", *ANTIVIRAL RESEARCH*, ELSEVIER BV, NL, vol. 142, 2 April 2017 (2017-04-02), pages 178-184, XP029985433, ISSN: 0166-3542, DOI:10.1016/J.ANTIVIRAL.2017.03.024 abstract; Fig. 3

CHRISTIN BRUCHHAGEN ET AL.: "Metabolic conversion of CI-1040 turns a cellular MEK-inhibitor into an antibacterial compound", *SCIENTIFIC REPORTS*, vol. 8, no. 1, 14 June 2018 (2018-06-14), XP055650125, DOI: 10.1038/

S41598-018-27445-7, whole document, particularly Fig. 1; p. 2, first par.

Martin Laure: "PD0184264, an active metabolite of the MEK-inhibitor CI-1040 shows superior pharmacokinetics and antiviral activity against influenza virus", 2 September 2018 (2018-09-02), page P112, XP055650114, Retrieved from the Internet: URL:https://evis.events/event/28/papers/849/files/940-abstract775.pdf [retrieved on 2019-12-05], the whole document

MARTIN LAURE ET AL.: "Antiviral efficacy against influenza virus and pharmacokinetic analysis of a novel MEK-inhibitor, ATR-002, in cell culture and in the mouse model", *ANTIVIRAL RESEARCH*, vol. 178, 15 April 2020 (2020-04-15), page 104806, XP055714215, NL ISSN: 0166-3542, DOI:10.1016/j.antiviral.2020.104806 chapter 3.8; Fig. 8

PATRICIA M. LORUSSO ET AL.: "Phase I and Pharmacodynamic Study of the Oral MEK Inhibitor CI-1040 in Patients With Advanced Malignancies", *JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY*, vol. 23, no. 23, 10 August 2005 (2005-08-10), pages 5281-5293, XP055540372, US ISSN: 0732-183X, DOI:10.1200/JCO.2005.14.415 cited in the application abstract; Fig. 1

FABRICE CARRAT ET AL.: "Time Lines of Infection and Disease in Human Influenza: A Review of Volunteer Challenge Studies", *AMERICAN JOURNAL OF EPIDEMIOLOGY*, vol. 167, no. 7, 29 January 2008 (2008-01-29), pages 775-785, XP055650243, US ISSN: 0002-9262, DOI: 10.1093/aje/kwm375 abstract; Fig. 3-5

(57) Изобретение относится к применению PD-0184264 в способе лечения вирусной инфекции или вирусно-бактериальной коинфекции. Также предложено применение композиций, содержащих такие ингибиторы, в лечении вирусной инфекции, а также в профилактике и/или лечении бактериальной коинфекции.

Уровень техники

Вирусы гриппа А являются возбудителями тяжелых респираторных заболеваний, приводящих к значительной заболеваемости и смертности. Большинство смертельных случаев при вирусной инфекции гриппа фактически являются результатом вторичной пневмонии, вызываемой различными бактериями, такими как *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Streptococcus pneumoniae* и *Haemophilus influenzae* (Morens et al., 2008, Chertow et al., 2013). Наиболее серьезными проблемами бактериального коинфицирования являются внезапно возросшая патогенность (Iwao et al., 2012, Paddock et al., 2012, Parker et al., 2012) и ограниченный арсенал сильнодействующих противоинфекционных средств против различных патогенов. Высокая изменчивость вирусов гриппа и постоянное появление новых штаммов (Neumann et al., 2009, Taubenberger et al., 2010, Parry, 2013), особые свойства бактериальных штаммов (Grundmann et al. 2006, Moran et al., 2006, Gillet et al., 2007, Shilo et al., 2011), а также быстрое развитие резистентности 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) в отношении имеющихся лекарственных средств/антибиотиков являются основными причинами низкой эффективности способов лечения.

В WO 2001/076570 предложена концепция лечения или предупреждения инфекций, вызванных (-)РНК-вирусами, в частности вирусами гриппа, с помощью ингибиторов МЕК. В WO 2014/056894 предложены особые ингибиторы МЕК, такие как AZD-6244, AZD-8330, RDEA-119, GSK-1120212 (траметиниб), GDC-0973 (кобиметиниб), CI-1040, PD-0325901, RO-5126766, MSC1936369 (AS-703026) для применения в лечении или предупреждении вирусных инфекций гриппа. В WO 2015/173788 A1 раскрыты ингибиторы МЕК для применения в способе лечения вируса гриппа и бактериальных коинфекций.

Пандемия H1N1 в 2009 году ясно демонстрирует, что вирус гриппа А (ВГА) оказывает сильное воздействие на глобальные системы здравоохранения (Mackey and Liang, 2012; Monto et al., 2011; Robertson and Inglis, 2011). Это подтверждается пандемией коронавируса 2019/2020 (Covid19). Помимо профилактической вакцинации, только несколько противовирусных препаратов одобрены для лечения гриппа, и на сегодняшний день ни одного препарата не известно для Covid19. Это подчеркивает острую необходимость в разработке дополнительных эффективных противовирусных препаратов для лучшей борьбы с инфекциями. Примечательно, что на ранней стадии пандемии, в отсутствие вакцин, противовирусные препараты являются самостоятельным лечением. Кроме того, появление ВГА, которые устойчивы к одобренным в настоящее время противовирусным препаратам, подчеркивает острую необходимость в разработке новых и широко доступных противовирусных препаратов (Moss et al., 2010).

Однако, несмотря на то, что некоторые представляющие интерес ингибиторы МЕК уже известны и предназначены для применения в лечении или предупреждении вирусных инфекций, в частности вирусной инфекции гриппа, все еще имеется необходимость в создании дополнительных, наилучшим образом усовершенствованных ингибиторов МЕК для такого применения.

Кроме того, большое значение имеет то, что противовирусная терапия вирусных инфекций должна начаться как можно скорее после заражения. Например, временное окно для начала лечения гриппа осельтамивиром составляет всего лишь не более 24 ч. Очень часто пациент обращается к врачу уже по прошествии указанного периода времени, что делает лечение общепринятыми противовирусными методами бесполезным. Кроме того, противовирусная терапия может быть противопоказана из-за возможного взаимодействия лекарственных препаратов, особенно у пожилых людей, которым часто приходится принимать один или несколько препаратов постоянно. Очень часто прекращение приема подобных препаратов довольно проблематично. Как следствие, сроки начала противовирусной терапии уже пройдены до того, как эти пациенты начинают противовирусную терапию.

Принимая во внимание предшествующий уровень техники, очевидно, что имеется потребность в новых соединениях и композициях, эффективных в лечении вирусных заболеваний, в частности, заболеваний дыхательных путей, вызванных РНК-вирусами, таких как вирус гриппа (IV) или коронавирусы (CoV), особенно при позднем начале лечения. Кроме того, имеется потребность в разработке способов лечения вирусных инфекций в случаях, когда вирус устойчив к противовирусной терапии, а также профилактики и/или лечения бактериальных коинфекций.

Краткое описание изобретения

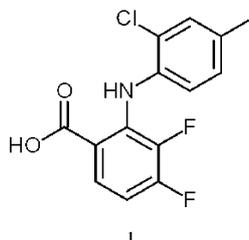
Решением указанной технической задачи является предоставление PD-0184264, метаболита CI-1040, для применения в лечении или профилактике вирусных заболеваний, таких как грипп или коронавирусная инфекция, бактериальные инфекции или коинфекция, включающая бактериальную инфекцию и вирусное заболевание. Данное решение также отражено в вариантах реализации настоящего изобретения, описанных ниже, а также в формуле изобретения, и проиллюстрировано в примерах и на фигурах. Авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что метаболит PD-0184264 ингибитора МЕК CI-1040 имеет более высокую противовирусную и антибактериальную активность, чем сам CI-1040. Кроме того, было продемонстрировано, что PD-0184264 эффективен даже если лечение начинается через более чем 24 ч после заражения, при том, что предпочтительно у субъекта наблюдались симптомы вирусной инфекции в течение по меньшей мере 24 ч, по меньшей мере 36 ч, по меньшей мере 48 ч или по меньшей мере 72 ч.

Предпочтительно лечение начинается по меньшей мере через 24 ч и в течение 48 ч после начала заболевания. Предпочтительно вирусная инфекция вызвана вирусом с положительной или отрицательной цепью РНК. Предпочтительно РНК-вирус с отрицательной цепью представляет собой вирус гриппа, более предпочтительно - вирус гриппа А (ВГА) или вирус гриппа В (ВГВ), еще более предпочтительно вирус гриппа А выбран из группы, состоящей из H1N1, H2N2, H3N2, H5N6, H5N8, H6N1, H7N2, H7N7, H7N9, H9N2, H10N7, N10N8 или H5N1, или вирус гриппа В выбран из группы, состоящей из типа ВГВ линий Ямагата и Виктория. Предпочтительно РНК-вирус с положительной цепью представляет собой коронавирус, такой как коронавирус тяжелого острого респираторного вируса (SARS-CoV и SARS-CoV2) или коронавирус ближневосточного респираторного синдрома (MERS).

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения вирус устойчив к противовирусному лечению, причем более предпочтительно противовирусное лечение представляет собой введение осельтамивира, занамивира, перамивира, амантадина, римантадина, фавипиравира, балоксавира марбоксила или пимодивира.

В одном варианте реализации вирус, устойчивый к противовирусному лечению, представляет собой мутант H1N1 H275Y. Следовательно, применение PD-0184264 позволяет решить техническую задачу, лежащую в основе настоящего изобретения, посредством предоставления более эффективного способа лечения вирусных инфекций, в частности вирусных инфекций гриппа, а также вирусных коинфекций, в частности коинфекций вируса гриппа, бактериальных коинфекций, с увеличенным терапевтическим окном, позволяющим начать лечение через более чем 24 ч и не позднее по меньшей мере 72 ч после обнаружения первых симптомов.

Несмотря на то, что ингибитор МЕК СИ-1040 уже показал свою эффективность в лечении или предупреждении вирусной инфекции гриппа и коинфекций, вызванной вирусом гриппа, или бактериальной инфекции, авторы изобретения обнаружили, что метаболит (PD-0184264, формула 1) СИ-1040 является более эффективным в направленном воздействии на вирус гриппа или коинфекций, включающие вирус гриппа и бактериальную инфекцию, чем сам СИ-1040. PD-0184264 представляет собой один из нескольких метаболитов СИ-1040 (Wabnitz et al., 2004, LoRusso et al., 2005), однако не было ни сведений, ни предположений о том, что метаболит действует более эффективно, чем СИ-1040. К большому удивлению авторов изобретения, они действительно обнаружили, что один из метаболитов (PD-0184264, структура 1 ниже) является более эффективным и обладает более высоким терапевтическим потенциалом, чем СИ-1040, как показано в примерах. Наличие указанного свойства PD-0184264 невозможно было предположить, поскольку PD-0184264 действительно демонстрирует более слабое ингибирующее действие на киназы МЕК *in vitro*, чем СИ-1040 (см. пример 9). Кроме того, анализы *in vitro* продемонстрировали более слабый противовирусный эффект PD-0184264 по сравнению с СИ-1040 (см. пример 10), тогда как анализы *in vivo* неожиданно продемонстрировали гораздо более сильный противовирусный эффект PD-0184264 по сравнению с СИ-1040 (см. пример 11).



В соответствии с вышеизложенным, настоящее изобретение относится к PD-0184264 или его фармацевтически приемлемой соли для применения в способе профилактики и/или лечения бактериальной инфекции и/или вирусного заболевания. Предпочтительно вирус, вызывающий вирусное заболевание, представляет собой РНК-вирус. Если РНК-вирус представляет собой РНК-вирус с отрицательной цепью, он предпочтительно является вирусом гриппа и более предпочтительно - вирусом гриппа А или гриппа В. Если РНК-вирус представляет собой РНК-вирус с положительной цепью, данный вирус предпочтительно является коронавирусом, таким как SARS, SARS-CoV2 или MERS.

Настоящее изобретение также относится к PD-0184264 или его фармацевтически приемлемой соли для применения в способе профилактики и/или лечения бактериальной инфекции. Бактериальная инфекция, предпочтительно, опосредована бактерией, выбранной из группы, состоящей из Staphylococcaceae, Streptococcaceae, Legionellaceae, Pseudomonadaceae, Bacillaceae, Chlamydiaceae, Mycoplasmataceae, Enterobacteriaceae, Pseudomonadales и/или Pasteurellaceae.

Настоящее изобретение также относится к PD-0184264 или его фармацевтически приемлемой соли для применения в способе профилактики и/или лечения коинфекции, включающей бактериальную инфекцию и вирусное заболевание.

Предпочтительно PD-0184264 или его фармацевтически приемлемая соль предназначены для применения в способе профилактики и/или лечения коинфекции, включающей бактериальную инфекцию и вирусное заболевание, при этом бактериальная инфекция опосредована бактерией, выбранной из группы, состоящей из Staphylococcaceae, Streptococcaceae, Legionellaceae, Pseudomonadaceae, Bacillaceae, Chlamy-

diaceae, Mycoplasmataceae, Enterobacteriaceae, Pseudomonadales и/или Pasteurellaceae.

Предпочтительно PD-0184264 или его фармацевтически приемлемая соль предназначены для применения в способе профилактики и/или лечения коинфекции, включающей бактериальную инфекцию и вирусное заболевание, при этом вирус представляет собой РНК-вирус с отрицательной цепью, предпочтительно вирус гриппа, более предпочтительно - вирус гриппа А или вирус гриппа В.

Предпочтительно PD-0184264 или его фармацевтически приемлемая соль предназначены для применения в способе профилактики и/или лечения вирусного заболевания, при этом PD-0184264 или его фармацевтически приемлемую соль вводят в комбинации с ингибитором нейраминидазы или его фармацевтически приемлемой солью.

Предпочтительно PD-0184264 или его фармацевтически приемлемая соль предназначены для применения в способе профилактики и/или лечения коинфекции, включающей бактериальную инфекцию и вирусное заболевание, при этом PD-0184264 или его фармацевтически приемлемую соль вводят в комбинации с ингибитором нейраминидазы или его фармацевтически приемлемой солью.

В альтернативном варианте реализации PD-0184264 или его фармацевтически приемлемая соль предназначены для применения в способе профилактики и/или лечения вирусного заболевания или в способе профилактики и/или лечения коинфекции, включающей бактериальную инфекцию и вирусное заболевание, при этом ингибитор нейраминидазы выбран из осельтамивира, фосфата осельтамивира, занамивира, ланинамивира или перамивира или их фармацевтически приемлемой соли.

Также в настоящем изобретении предложена фармацевтическая композиция, содержащая PD-0184264 или его фармацевтически приемлемую соль и ингибитор нейраминидазы или его фармацевтически приемлемую соль.

Предпочтительно PD-0184264 предназначен для применения в способе профилактики и/или лечения вирусного заболевания и/или в способе профилактики и/или лечения бактериальных заболеваний, и/или в способе профилактики и/или лечения коинфекции, включающей в себя бактериальную инфекцию и вирусное заболевание, при этом PD-0184264 комбинируют с одним или несколькими ингибиторами МЕК.

Предпочтительно PD-0184264 или его фармацевтически приемлемая соль предназначены для применения в профилактике и/или лечении бактериальной инфекции, вирусной инфекции или коинфекции у субъекта, предпочтительно позвоночного животного, более предпочтительно - птицы или млекопитающего, наиболее предпочтительно - человека.

Настоящее изобретение также относится к способу лечения бактериальной инфекции у субъекта, включающему введение терапевтически эффективного количества PD-0184264 или его фармацевтически приемлемой соли нуждающемуся в этом субъекту.

Кроме того, настоящее изобретение относится к способу лечения вирусного заболевания у субъекта, включающему введение терапевтически эффективного количества PD-0184264 или его фармацевтически приемлемой соли нуждающемуся в этом субъекту. В предпочтительном варианте реализации изобретения PD-0184264 вводят субъекту один раз в сутки в виде пероральной дозированной лекарственной формы, составляющей от 100 до 900 мг, предпочтительно 600 мг.

В дополнительном варианте реализации настоящее изобретение относится к способу лечения коинфекции, включающей бактериальную инфекцию и вирусное заболевание у субъекта, причем способ включает введение терапевтически эффективного количества PD-0184264 или его фармацевтически приемлемой соли нуждающемуся в этом субъекту.

Предпочтительно вирус представляет собой РНК-вирус с отрицательной цепью, более предпочтительно вирус представляет собой вирус гриппа и наиболее предпочтительно вирус гриппа представляет собой вирус гриппа А или вирус гриппа В.

Предпочтительно бактериальная инфекция опосредована бактерией, выбранной из группы, состоящей из Staphylococcaceae, Streptococcaceae, Legionellaceae, Pseudomonadaceae, Bacillaceae, Chlamydiaceae, Mycoplasmataceae, Enterobacteriaceae, Pseudomonadales и Pasteurellaceae.

Краткое описание чертежей

На фигурах продемонстрировано.

Фиг. 1. Лечение мышей, зараженных вирусом гриппа А, с помощью PD-0184264 или CI-1040. Результаты эксперимента из примера 1 представлены в виде титра вируса (\log_{10}) БОЕ/мл (слева) или % титра вируса (справа).

Фиг. 2. График, демонстрирующий влияние PD-0184264 и CI-1040 на бактериальный рост MRSA. В разные моменты времени, как показано на горизонтальной оси графика, оптическую плотность бесклеточных бактериальных культур измеряли в качестве показателя роста бактерий, который показан на вертикальной оси графика в % (OD600). Данные представляют собой среднее значение трех биологических повторностей, описанных в примере 2.

Фиг. 3. Ингибирование бактериального роста MRSA различными концентрациями PD-0184264. PD-0184264 вводили в различных концентрациях (как показано) в ночную культуру *S. aureus* USA300 (MRSA). Через 6 ч определяли оптическую плотность.

Данные, показанные на фигуре, представляют собой один эксперимент из трех биологических по-

вторностей, описанных в примере 2.

Фиг. 4. Влияние CI-1040 и PD-0184264 на рост бактерий. (А) Влияние CI-1040 на рост бактерий при различных концентрациях. (В, С) Влияние PD-0184264 на штамм 6850 (В) или штамм USA300 (С) *S. aureus* при различных концентрациях PD-184264.

Фиг. 5. Введение PD-0184264 в клетки, инфицированные одним патогеном, или в коинфицированные клетки защищает клетки. Эпителиальные клетки легкого человека (A549) предварительно обрабатывали PD-0184264 (в указанных концентрациях) или растворителем ДМСО (диметилсульфоксид) и заражали штаммом вируса гриппа человека A/Puerto Rico/8/34 (H1N1). Учитывая противовирусный и сильный антибактериальный эффект PD-0184264 (фиг. 2-4), авторы изобретения проанализировали, может ли указанная особенность данного соединения также наблюдаться макроскопически в отношении разрушающих клетки цитопатических эффектов (CPE), вызываемых ВГА (вирусом гриппа А) и/или заражением *S. aureus*. Небольшое разрушение клеточного монослоя наблюдалось после инфицирования ВГА (H1N1) (средняя панель) или штаммом *S. aureus* 6850 (верхняя панель) в отдельности. Вышеуказанный CPE значительно возрастал при коинфицировании обоими патогенами (нижняя панель), однако ингибировался в присутствии возрастающих концентраций PD-0184264.

Фиг. 6. Сравнение антибактериального действия PD-0184264 с общеизвестными антибиотиками. Чтобы сопоставить антибактериальные свойства ингибитора MEK PD0184164 с действием общеизвестного антибиотика, бактерии обрабатывали в течение ночи растворителем, ингибиторами MEK U0126 и PD-0184264 или различными концентрациями антибиотика гентамицина. По сравнению с бактериями, обработанными растворителем, инкубация с ингибитором MEK первого поколения U0126 вызвала всего лишь незначительное снижение титров бактерий, тогда как обработка PD-0184264 вызвала очень сильное снижение бактериальной нагрузки. Это происходило с обоими бактериальными штаммами.

Фиг. 7. (а) Результаты анализов времени добавления, сравнения антибактериального действия PD-0184264 с другими соединениями, ингибирующими MEK, или с антибиотиком гентамицином. (b) Результаты испытания *S. aureus* на устойчивость к ингибитору MEK PD0184264 по сравнению с обработкой гентамицином, эритромицином или без обработки.

Фиг. 8. Структура домена бактериальной киназы PknB (вверху) (Rakette et al.2012) и гомологии последовательностей сайта аутофосфорилирования PknB с сайтами активации MAP-киназ млекопитающих p38, JNK (с-Jun-N-терминальной киназы) и ERK (внеклеточно регулируемой киназы) прямой MEK-мишени (Miller et al. 2010).

Фиг. 9. Определение влияния лечения ингибитором на минимальную ингибирующую концентрацию (MIC) различных антибиотиков.

Фиг. 10. Стрессоустойчивость штамма 6850 и штамма MRSA USA300 *S. aureus* при обработке PD-0184264.

Фиг. 11. Лечение PD-0184264 ухудшает рост различных серотипов *Streptococcus pneumoniae*. (А) Влияние PD-0184264 на культуры штаммов *Streptococcus pneumoniae* TIGR4 (серотип 4) и D39 wt (серотип 2), как измерено OD600; (В) Влияние PD-0184264 на культуры штаммов *Streptococcus pneumoniae* TIGR4 (серотип 4) и D39 wt (серотип 2) показано в КОЕ/мл; (С) влияние PD-0184264 на культуры *Bacillus subtilis* показано в КОЕ/мл.

Фиг. 12. Таблица 1: антибиотики.

Фиг. 13. Изображения, демонстрирующие, что обработка клеток ингибитором PD-0184264 сильно снижает вызванный патогеном CPE (цитопатический эффект) при инфицировании бактериями (*S. aureus*) или вирусом (ВИ гриппа) в отдельности и коинфицировании.

Фиг. 14. График, демонстрирующий изменения внутриклеточной бактериальной нагрузки при обработке CI-1040 (а) или PD-0184264 (b). Были получены сопоставимые результаты при введении CI-1040 или PD-0184264 в более поздние сроки во время продолжающегося инфицирования (с).

Фиг. 15. График, демонстрирующий жизнеспособность клеток (А, В) и разрыв мембран (С, D). (А, В) демонстрируют жизнеспособность клеток A549 в присутствии возрастающих концентраций PD-0184264. На (С) и (D) проводился LDH-анализ для определения разрыва мембран вследствие обработки ингибитором.

Фиг. 16. Анализ внеклеточной киназы, демонстрирующий ингибирующее действие CI-1040 и PD-0184264 на путь MEK. Активность киназ измеряется путем определения количества фосфорилированного целевого белка ERK (внеклеточной киназы) с помощью анализа ELISA. Три независимые серии экспериментов были проведены с аналогичными результатами. Один репрезентативный эксперимент представлен в настоящем изобретении.

Фиг. 17. Противовирусная активность PD-0184264 против вируса гриппа H1N1pdm09 в анализе *in vitro*. (А) Клетки A549 были заражены вирусом (MOI (множественность заражения) = 0,001) для определения снижения титра вируса. (В) Клетки A549 заражали вирусом RBI (MOI=0,001) и обрабатывали различными концентрациями PD-0184264 (100, 50, 10, 5, 1, 0,5 и 0,1 мкМ) для определения значения EC₅₀. (С) Клетки A549 обрабатывали различными концентрациями PD-0184264 (100, 50, 10, 5, 1, 0,5 и 0,1 мкМ) в течение 24 ч с последующим окрашиванием WST в течение 4 ч для определения значения CC₅₀.

Фиг. 18. Снижение титра вируса в легких мышей с помощью PD-0184264 в условиях *in vivo*. После

заражения вирусом H1N1pdm09 самки мышей линии C57BL/6 получали лечение путем перорального введения 2,8, 8,4 или 25 мг/кг PD-0184264 (левая панель) или 25, 75 или 150 мг/кг CI-1040 (правая панель). Через 24 ч после заражения животных умерщвляли и определяли титр вируса стандартным методом.

Фиг. 19. PD-0184264 обладает лучшей биодоступностью, чем CI-1040. (А) Самцы мышей линии NMRI получали лечение путем внутривенного введения либо 75 мг/кг CI-1040 (темно-серая область), либо 75 мг/кг PD-0184264. Кровь собирали через 15 мин, 30 мин, 1 ч, 2 ч, 4 ч, 6 ч, 8 ч и 24 ч (день испытания 2) после введения, и анализировали плазму на присутствие лекарственного средства. (В) Самцы мышей NMRI получали лечение путем введения либо 150 мг/кг CI-1040 (темно-серая область), либо 150 мг/кг PD-0184264 перорально через желудочный зонд. Кровь собирали через 15 мин, 30 мин, 1 ч, 2 ч, 4 ч, 6 ч, 8 ч и 24 ч (день испытания 2) после введения, и анализировали плазму на присутствие лекарственного средства.

Фиг. 20. Выживаемость мышей после обработки PD-0184264. Восемь самок мышей линии C57BL/6 были заражены H1N1pdm09 {MQ} и получали лечение путем перорального введения 25 мг/кг PD-0184264 (ATR-002, средне-серая линия) или одного растворителя (светло-серая линия). Лечение начинали через 24, 48 или 72 ч после заражения в течение пяти дней, как показано на графиках (серая полоса). При обнаружении снижения массы тела на 20% (серая пунктирная линия) мышей умерщвляли. Для создания обих изображений использовалось программное обеспечение Graphpad Prism 8. Значение *p* определяли с помощью логарифмического рангового критерия Мантеля-Кокса.

Подробное описание изобретения

Нижеследующее описание включает информацию, которая может быть полезна для понимания настоящего изобретения. Это не означает, что какая-либо информация, представленная в настоящем документе, является предшествующим уровнем техники или относится к изобретениям, представленным в настоящем изобретении, или что какая-либо публикация, на которую прямо или косвенно ссылается настоящий документ, является предшествующим уровнем техники.

Как было сказано выше, настоящее изобретение относится к PD-0184264 для применения в способе лечения вирусного заболевания или коинфекции, включающей бактериальную инфекцию и вирусную инфекцию. Как показано в примерах, PD-0184264, по-видимому, действует на бактериальную киназу PknB и, таким образом, по меньшей мере частично может оказывать бактериостатическое действие.

Кроме того, как продемонстрировано в прилагаемых примерах, PD-0184264 является эффективным при вирусной и бактериальной инфекции, а также при бактериальной и вирусной коинфекции. Указанное действие неожиданно оказалось сильнее, чем у CI-1040-ингибитора МЕК, уже известного по предшествующему уровню техники для лечения бактериальных и вирусных инфекций. При сравнении ингибирующего действия CI-1040 и PD-0184264 на киназу МЕК, как показано в примере 9, можно было бы ожидать обратного результата, поскольку в предшествующем уровне техники для достижения указанного эффекта использовались ингибиторы МЕК.

То же самое справедливо и при сравнении противовирусного эффекта PD-0184264 и CI-1040 в анализах *in vitro*. В настоящем изобретении CI-1040 более эффективен, чем PD-0184264, как видно из примера 10. В частности, в анализе *in vitro* для достижения такого же ингибирующего эффекта необходима в 10 раз более высокая концентрация PD-0184264. Неожиданно было обнаружено, что, несмотря на слабое ингибирование в условиях *in vitro*, PD-0184264 превосходит CI-1040 в условиях *in vivo*, как видно из примера 11. Как показано на фиг. 18, в легких уже при 2,8 мг/кг PD-0184264 наблюдается снижение титра вируса, тогда как при 25 мг/кг PD-0184264 наблюдается снижение титра вируса по меньшей мере на 90%. Напротив, CI-1040 демонстрирует аналогичное снижение только при 150 мкМ. Кроме того, в примере 1 продемонстрировано снижение титра вируса в легких с помощью PD-0184264. В примере 1 мышей заражали вирусом гриппа и лечили CI-1040 или PD-0184264 в дозировке 150 мг/кг, 75 мг/кг или 25 мг/кг соответственно. Как показано на Фиг. 1, уже 25 мг/кг PD-0184264 демонстрирует тот же эффект, что и 150 мг/кг CI-1040. Таким образом, к большому удивлению авторов изобретения, PD-0184264 демонстрирует сильный противовирусный эффект в условиях *in vivo*, хотя предыдущие данные *in vitro* не давали никакого стимула для продолжения работы с PD-0184264. Этот неожиданный эффект может основываться на более высокой биодоступности PD-0184264 по сравнению с CI-1040, которая продемонстрирована в примере 12.

Примеры 2, 4 и 6-8 дополнительно демонстрируют сильный антибактериальный эффект PD-0184264 также по сравнению с CI-1040 и другими ингибиторами МЕК. В примере 2 анализируется влияние PD-0184264 на бактериальный рост. На фиг. 2 показано, что PD-0184264 ингибирует рост бактерий, тогда как CI-1040 не влияет на бактериальный рост. На фиг. 3 показано, что ингибирование роста бактерий PD-0184264 зависит от концентрации, демонстрируя почти полное ингибирование роста, начиная с 50 мкМ PD-0184264. Аналогичным образом, также на фиг. 4 показано, что ингибирование роста бактерий PD-0184264 зависит от концентрации - уже при 10 мкМ PD-0184264 наблюдается значительное снижение роста, тогда как CI-1040 не влияет на бактериальный рост. В примере 4 антибактериальный эффект PD-0184264 сравнивается с ингибитором МЕК U0126 или антибиотиком гентамицином. На фиг. 6 показано, что PD-184264 обладает антибиотическим действием, сходным с действием гентамицина, то-

гда как ингибитор МЕК U0126, известный из предшествующего уровня техники, не влияет на рост бактерий. То же самое справедливо и для фиг. 7А, на котором показана динамика бактериального роста. На фиг. 7В дополнительно показано, что PD-0184264 не вызывает резистентности к PD-0184264, тогда как бактерии легко вырабатывают резистентность к гентамицину и эритромицину. Таким образом, PD-0184264 не вызывает резистентность у бактерий. В примере 6 анализировалось влияние PD-0184264 на чувствительность бактерий к антибиотику. Как показано на фиг. 9 и в табл. 2, лечение PD-0184264 действительно привело к увеличению восприимчивости бактерий к различным антибиотикам, что было наиболее заметно в случае с пенициллином и гентамицином. Кроме того, на фиг. 10 показано, что PD-0184264 снижает устойчивость бактерий к стрессу. В примере 7 приведены доказательства того, что действие PD-0184264 не ограничивается *S. aureus*, но также оказывает влияние на другие бактерии, такие как *Streptococcus pneumoniae* (см. фиг. 11 А и В) и *Bacillus subtilis* (см. фиг. 11С).

Примеры 3 и 8 подчеркивают эффективность PD-0184264 в отношении бактериальной и вирусной коинфекций. В примере 3 анализировали, может ли эффективность PD-0184264 также наблюдаться макроскопически в отношении разрушающих клетки цитопатических эффектов (CPE), вызываемых вирусной и/или бактериальной инфекцией. На фиг. 5 показано, что снижение ингибитором PD-0184264 цитопатического эффекта, вызываемого, в частности, бактериальной и вирусной коинфекцией, зависит от концентрации, демонстрируя эффект уже при 15 мкМ PD-0184264. То же самое анализировалось и в примере 8, который также демонстрирует на фиг. 13 положительный эффект PD-0184264 при бактериально-вирусной коинфекции. В примере 8 дополнительно анализировали влияние PD-0184264 на внутриклеточный титр бактерий при коинфекции. На фиг. 14 показано, что PD-0184264 снижает внутриклеточный титр бактерий, тогда как CI-1040 не оказывает какого-либо влияния. Кроме того, пример 8 и фиг. 15 демонстрируют, что PD-0184264 не оказывает цитотоксического действия.

Кроме того, в примере 13 было показано, что лечение PD-0184264 мышей, зараженных штаммом гриппа H1N1, приводит к значительной разнице в выживаемости даже если лекарственное средство вводили уже через 72 ч после заражения (см. фиг. 20).

Указанные результаты сопоставимы с данными, полученными с помощью CI-1040, которые представлены в работе Haasbach (Haasbach et al. 2017), а также в дальнейших экспериментах, проведенных автором заявки. В данных экспериментах было установлено, что CI-1040 имеет увеличенное терапевтическое окно по сравнению с известными противовирусными препаратами, и, в частности, с Tamiflu (осельтамивир), что позволяет вводить его в период, когда Tamiflu неэффективен. Используя мышиную модель, авторы настоящего изобретения продемонстрировали, что CI-1040 может снижать титры вируса гриппа в легких *in vivo*. Неожиданно было обнаружено, что терапевтическое окно для CI-1040 расширяется по меньшей мере до 48 ч после заражения, когда лечение Тамифлю® не оказывает какого-либо влияния.

Согласно инструкции по применению по стандартам FDA, осельтамивир (Тамифлю®) в настоящее время показан для лечения гриппа у пациентов с симптомами, наблюдающимися не более 2 суток. Это соответствует тому, что наблюдалось на мышиную модель в предыдущих исследованиях, где осельтамивир перестает действовать, если он вводится более чем через 48 ч после заражения вирусом гриппа. Напротив, PD-0184264 был эффективным даже через 72 ч после заражения. Следовательно, было продемонстрировано, что PD-0184264, как и CI-1040, имеет более продолжительное терапевтическое окно, чем осельтамивир. По этой причине, вероятно, что эффекты, наблюдаемые на мышиную модель, могут быть экстраполированы на пациентов-людей, что означает, что PD-0184264 или его фармацевтически приемлемая соль либо производное могут вводиться пациентам более чем через 2 дня после появления симптомов вирусной инфекции. Это также имеет смысл, когда способ действия CI-1040 и PD-0184264 сравнивают со способом действия осельтамивира. Как было сказано выше, считается, что осельтамивир блокирует элюирование вирионов из инфицированных клеток. По этой причине он эффективен только в том случае, если вирионы еще не покинули клетку. Было обнаружено, что CI-1040 и PD-0184264, напротив, блокируют путь МЕК, который необходим для репликации вируса, так что вирусные комплексы RNP удерживаются в ядре клетки. Что касается молекулярного способа действия ингибирования МЕК, авторы ранее показали, что ингибирование киназы прототипом ингибитора U0126 приводит к блокаде ядерного цитоплазматического транспорта вирусных комплексов RNP (Pleschka et al., 2001). Это может быть подтверждено для CI-1040 и PD-0184264. На основании данных в примере 13 и дальнейших предварительных исследований предполагается, что PD-0184264 будет оказывать такое же действие, что и CI-1040, поскольку он является метаболитом CI-1040 и нацелен на тот же путь, что и CI-1040.

Таким образом, способы и области применения настоящего изобретения также относятся к лечению вирусной инфекции у субъектов, у которых наблюдались симптомы в течение по меньшей мере 24 ч, по меньшей мере 36 ч или по меньшей мере 48 ч. Данные сроки, естественно, включают все промежутки времени между ними, такие как 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46 или 47 ч для субъекта, проявляющего симптомы. В предпочтительном варианте реализации субъект проявляет симптомы в течение по меньшей мере 48 ч на момент начала лечения. Например, лечение может быть начато между 24 и 48 ч после начала заболевания. В данном контексте следует отметить, что тер-

мины "проявление симптомов" и "начало заболевания" могут использоваться взаимозаменяемо. Однако лечение также может быть начато по меньшей мере через 60 ч, по меньшей мере через 72 ч или по меньшей мере через 96 ч после заражения. В случаях, когда PD-0184264 или его фармацевтически приемлемую соль либо производное вводят, когда другое противовирусное средство уже было признано неэффективным, PD-0184264 или его фармацевтически приемлемую соль или производное можно вводить через 24 ч после завершения лечения предыдущим противовирусным средством.

Кроме того, вполне вероятно, что, как и CI-1040, PD-0184264 также эффективен против вирусов гриппа, которые устойчивы к противовирусному лечению. Это особенность CI-1040 и PD-0184264, которая решает проблему многих стандартных противовирусных препаратов и позволяет вводить CI-1040 и PD-0184264 после того, как лечение стандартными противовирусными препаратами не дало результатов. Стандартное противовирусное лечение, используемое в настоящем документе, определяется как лечение лекарственным средством, которое было одобрено для применения в качестве противовирусного средства и которое эффективно ингибирует развитие вирусного патогена на любой стадии его жизненного цикла. Примеры включают ингибиторы входа, ингибиторы декапсидации, ингибиторы обратной транскрипции, ингибиторы полимеразы, ингибиторы эндонуклеазы, ингибиторы созревания белков, ингибиторы интегразы, ингибиторы транскрипции, ингибиторы трансляции, ингибиторы протеазы, ингибиторы сборки вирионов или ингибиторы высвобождения вирионов. Касаемо вирусов гриппа известны два различных стандартных подхода противовирусного лечения: ингибиторы нейраминидазы и ингибиторы белка M2.

Таким образом, в одном из вариантов реализации настоящего изобретения вирус устойчив к противовирусному лечению. Как описано в настоящем документе, противовирусное лечение может относиться к введению ингибиторов нейраминидазы, таких как осельтамивир, занамивир, ланинамивир и перамивир, и/или к введению ингибиторов M2, таких как амантадин и римантадин. Соответственно, противовирусное лечение может представлять собой введение осельтамивира, занамивира, амантадина и/или римантадина. В другом варианте реализации противовирусное лечение относится к введению осельтамивира, занамивира, перамивира, амантадина, римантадина, фавипиравира, балоксавира марбоксила и/или пимодивира.

PD-0184264 может быть использован в способе лечения и/или профилактики заболеваний, описанном в настоящем изобретении. Таким образом, термин "осуществление лечения" или "лечение" включает введение PD-0184264, предпочтительно в форме лекарственного средства, субъекту, страдающему от коинфекции, включающей бактериальную инфекцию и вирусное заболевание, с целью ослабления или улучшения симптомов, сопровождающих такие инфекции. Аналогично, включает введение PD-0184264, предпочтительно в форме лекарственного средства, субъекту, страдающему бактериальной инфекцией, или с целью ослабления или улучшения симптомов, сопровождающих такие инфекции. Дополнительно включает введение PD-0184264, предпочтительно в форме лекарственного средства, субъекту, страдающему вирусной инфекцией или с целью ослабления или улучшения симптомов, сопровождающих такие инфекции. Коинфекция, включающая бактериальную инфекцию и вирусное заболевание, при этом вирусное заболевание и бактериальная инфекция представляют собой медицинское состояние, которое лечится или предотвращается с помощью PD-0184264 или его фармацевтически приемлемой соли.

Кроме того, в настоящем изобретении термин "профилактика" или "предупреждение" относится к какой-либо медицинской процедуре или процедуре общественного здравоохранения, целью которой является предупреждение медицинского состояния, описанного в настоящем изобретении. В контексте настоящего изобретения термины "предупреждать", "предупреждение" и "осуществление предупреждения" относятся к снижению риска наступления или развития данного состояния, а именно коинфекции, включающей вирусную инфекцию и бактериальную инфекцию, одной только бактериальной или вирусной инфекции, как описано в настоящем изобретении. Термин "профилактика" также означает снижение или подавление рецидива коинфекции, включающей вирусную инфекцию гриппа и бактериальную инфекцию, одной только бактериальной или вирусной инфекции у субъекта.

PD-0184264 по настоящему изобретению эффективен в лечении коинфекции, как показано в примерах 3 и 8. В настоящем изобретении термин "коинфекция" включает вирусное заболевание, предпочтительно вирусную инфекцию гриппа, и бактериальную инфекцию. Такая коинфекция может иметь место при одновременном заражении хозяина, например субъекта и/или отдельной клетки, бактерией и вирусом гриппа. Также может случиться так, что хозяин, например, субъект и/или клетка одновременно инфицируется одной или несколькими вирусными частицами и одной или несколькими бактериями. Однако такое коинфицирование также может происходить последовательно. В таком случае субъект и/или клетка сначала инфицируется одной или несколькими вирусными частицами, а позже этот же субъект и/или клетка инфицируется одной или несколькими бактериями либо наоборот. Период времени между двумя заражениями может представлять собой период 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. В связи с этим, из-за увеличенного терапевтического окна PD-0184264, предполагается, что профилактика вторичных бактериальных инфекций будет более эффективной с продленным введением лекарственного средства. Подобная ситуация также может представлять собой су-

перинфекцию, при которой второе заражение накладывается на более раннее заражение, особенно другим микробным возбудителем экзогенного или эндогенного происхождения, который устойчив к лечению, используемому против первой инфекции.

В составе коинфекции вирусная инфекция гриппа может быть опосредована вирусом гриппа А или вирусом гриппа В, предпочтительно вирус гриппа А представляет собой H1N1, H2N2, H3N2, H5N6, H5N8, H6N1, H7N2, H7N7, H7N9, H9N2, H10N7, N10N8 или H5N1. В одном варианте реализации вирус гриппа А представляет собой H1N1. В других вариантах реализации вирус гриппа А представляет собой H3N2, H5N1 и H7N9. В дополнительных вариантах реализации вирус гриппа А представляет собой H3N2, H5N1, H1N1, H5N6, H7N2 и H7N9.

Настоящее изобретение также относится к "бактериальной инфекции", которая может иметь место в условиях коинфекции, описанной выше, присутствующей у хозяина, например, субъекта и/или клетки. Бактериальная инфекция может быть опосредована какой-либо бактерией; предпочтительно опосредована бактерией, выбранной из группы, состоящей из Staphylococcaceae, Streptococcaceae, Legionellaceae, Pseudomonadaceae, Bacillaceae, Chlamydiaceae, Mycoplasmataceae, Enterobacteriaceae, Pseudomonadales и/или Pasteurellaceae.

Бактериальная инфекция может быть опосредована бактерией, выбранной из группы, состоящей из рода Staphylococcus, предпочтительно Staphylococcus aureus, метициллин-чувствительного и метициллин-резистентного Staphylococcus aureus, экспрессирующего PVL (лейкоцидин Пантона-Валентайна) Staphylococcus aureus и/или семейства Streptococcaceae, предпочтительно Streptococcus mitis, Streptococcus pyogenes или Streptococcus pneumonia, рода Legionella, предпочтительно Legionella pneumophila, рода Pseudomonas, предпочтительно Pseudomonas aeruginosa, рода Bacillus, предпочтительно Bacillus subtilis, рода Chlamydomphila, предпочтительно Chlamydomphila pneumonia, рода Mycoplasma, предпочтительно Mycoplasma pneumonia, рода Klebsiella, предпочтительно Klebsiella pneumonia, рода Moraxella, предпочтительно Moraxella catarrhalis и/или рода Haemophilus, предпочтительно Haemophilus influenza. Предпочтительно бактерия выбрана из группы, состоящей из Staphylococcus aureus, Streptococcus pneumonia или Haemophilus influenza. Наиболее предпочтительно бактерия представляет собой Staphylococcus aureus.

"Вирусное заболевание" или "вирусная инфекция", к которым также относится настоящее изобретение, может иметь место в рамках описанной выше коинфекции или может возникать как единичная инфекция, присутствующая у хозяина, например, субъекта и/или клетки. Вирусное заболевание или вирусная инфекция могут быть опосредованы каким-либо вирусом; предпочтительно они опосредованы вирусом, который вызывает инфекции дыхательных путей, такие как РНК-вирус. Предпочтительными вирусами являются вирусы гриппа или коронавирусы. Предпочтительно, вирусная инфекция гриппа опосредована вирусом гриппа А или вируса гриппа В, при этом вирусы гриппа А являются предпочтительными. Особенно предпочтительными являются подтипы вируса гриппа А H1N1, H2N2, H3N2, H5N6, H5N8, H6N1, H7N2, H7N7, H7N9, H9N2, H10N7, N10N8 и/или H5N1. Предпочтительно, коронавирусная инфекция опосредована SARS-CoV, SARS-CoV2 или MERS-CoV.

В альтернативном варианте реализации PD-0184264 вводят в комбинации с одним или более ингибиторами МЕК. Ингибиторы МЕК включают, например, U0126, PLX-4032, AZD6244, AZD8330, AS-703026, GSK-1120212, RDEA-119, RO-5126766, RO-4987655, CI-1040, PD-0325901, GDC-0973, TAK-733, PD98059, ARRY-438162, ARRY-162, ARRY-300, PF-3644022 и PD184352. Дополнительный ингибитор МЕК может быть введен одновременно с PD-0184264, до или после него.

Предпочтительно, PD-0184264 предназначен для применения в способах профилактики и/или лечения коинфекции по настоящему изобретению, при этом PD-0184264 комбинируют с одним или более ингибиторами, нацеленными на вирус гриппа или бактерию. PD-0184264 может быть вводиться одновременно с одним или более ингибиторов, нацеленных на вирус гриппа, до или после них.

Как правило, ингибитор, нацеленный на вирус гриппа, представляет собой какой-либо ингибитор или лекарственное средство, эффективное в терапии гриппа. Известны различные вещества, эффективные в снижении вирусной инфекции гриппа. Среди них, например, ингибиторы нейраминидазы вируса, соединения, нацеленные на белок (M2) ионного канала вируса, а также соединения, нацеленные на активность полимеразы или эндонуклеазы вируса посредством вмешательства в компонент комплекса полимеразы вируса:

PB1, PB2, PA или NP. В соответствии с настоящим изобретением предусмотрены также фармацевтически приемлемые соли указанных ингибиторов. Однако в настоящем изобретении предпочтительный ингибитор представляет собой ингибитор МЕК, особенно предпочтителен PD-0184264.

"Ингибиторы МЕК" ингибируют митогенный сигнальный каскад Raf/МЕК/ERK в клетках или у субъекта путем ингибирования МЕК (киназа митоген-активируемой протеинкиназы). Указанный сигнальный каскад захватывается многими вирусами, в частности вирусами гриппа, для стимулирования репликации вируса. Поэтому специфическая блокада пути Raf/МЕК/ERK на узком участке МЕК препятствует росту вирусов, в частности вирусов гриппа. Кроме того, ингибиторы МЕК проявляют низкую токсичность и незначительные побочные эффекты у людей. Также отсутствует тенденция возникновения резистентности вирусов (Ludwig, 2009). Особенно предпочтительным ингибитором является PD-0184264.

"Ингибитор нейраминидазы" представляет собой противовирусное лекарственное средство, нацеленное на вирус гриппа, которое работает посредством блокировки функционирования белка нейраминидазы вируса, таким образом препятствуя высвобождению вируса из инфицированных клеток-хозяев, поскольку свежепродуцированные вирусы не могут выделяться из клетки, в которой они реплицированы. Также включены фармацевтически приемлемые соли ингибитора нейраминидазы. Предпочтительные ингибиторы нейраминидазы представляют собой осельтамивир, занамивир, перамивир, ланинамивир или фармацевтически приемлемую соль какого-либо из этих веществ, такие как фосфат осельтамивира, карбоксилат осельтамивира и т.п. Наиболее предпочтительные ингибиторы нейраминидазы представляют собой фосфат осельтамивира, занамивир, осельтамивир или перамивир.

Соединения, нацеленные на белок (M2) ионного канала вируса, представляют собой, к примеру, амантадин и/или римантадин, в то время как соединения, нацеленные на активность полимеразы или эндонуклеазы посредством воздействия на компонент комплекса полимеразы вируса - PB1, PB2, PA или NP, представляют собой, например, NP-блокатор нуклеозина или ингибитор полимеразы T-705 (фавипиравир).

Кроме того, PD-0184264 можно комбинировать с одним или более ингибиторами, нацеленными на бактерию. Пример 6 показывает, что PD-0184264 повышает чувствительность бактерий к антибиотикам. Ингибитором, нацеленным на бактерию, может быть какой-либо ингибитор, эффективный в снижении бактериальной инфекции. В настоящем изобретении PD-0184264 является строго предпочтительным в качестве ингибитора, нацеленного на бактерию, однако еще одним ингибитором, нацеленным на бактерию, известным специалисту в данной области техники, является антибиотик. Предпочтительные антибиотики могут быть выбраны из табл. 1 (фиг. 12). Таким образом, в одном варианте реализации антибиотик выбран из группы, состоящей из антибиотиков, перечисленных в табл. 1 (фиг. 12). В другом варианте реализации антибиотик выбран из группы, состоящей из класса антибиотиков, перечисленных в табл. 1 (фиг. 12). В еще одном варианте реализации антибиотик выбран из группы, состоящей из названия рода антибиотиков, перечисленных в табл. 1 (фиг. 12). Более предпочтительными являются антибиотики, выбранные из гентамицина, рифампицина, лизостафина, эритромицина, левофлоксацина, ванкомицина, тейкопланина, пенициллина и оксациллина.

"Субъект", которого могут лечить ингибиторами, в частности ингибиторами МЕК или комбинацией ингибиторов по настоящему изобретению, предпочтительно представляет собой позвоночное животное. В контексте настоящего изобретения термин "субъект" включает индивидуума, нуждающегося в лечении коинфекции, как описано в настоящем изобретении, либо только бактериальной или вирусной инфекции. Предпочтительно, субъект представляет собой пациента, страдающего от коинфекции или только бактериальной или вирусной инфекции, либо подвержен риску ее возникновения. Предпочтительно пациент представляет собой позвоночное животное, более предпочтительно - млекопитающее. Млекопитающие включают сельскохозяйственных животных, спортивных животных, домашних животных, приматов, мышей и крыс, но не ограничиваются указанными. Предпочтительно млекопитающее представляет собой человека, лошадь, собаку, кошку, корову, свинью, мышь, крысу и т. д., особенно предпочтительно представляет собой человека. В некоторых вариантах реализации субъект представляет собой человека, которому необязательно более 1 года и менее 14 лет, в возрасте от 50 до 65, в возрасте от 18 до 50 или старше 65 лет. В других вариантах реализации субъект представляет собой субъекта-человека, который выбран из группы, состоящей из субъектов, которым по меньшей мере 50 лет, субъектов, которые проживают в учреждениях постоянного ухода, субъектов, имеющих хронические нарушения легочной или сердечно-сосудистой системы, субъектов, которым в течение предыдущего года требовалось регулярное медицинское наблюдение или госпитализация из-за хронических заболеваний обмена веществ, почечной дисфункции, гемоглобинопатий или иммуносупрессии, субъектов в возрасте до 14 лет, субъектов в возрасте от 6 месяцев до 18 лет, которые получают долговременную аспириновую терапию, а также женщины, которые будут на втором или третьем триместре беременности во время сезона гриппа. В способе по настоящему изобретению PD-0184264 может вводиться перорально, внутривенно, внутривенно, внутримышечно, местно или путем ингаляции. Предпочтительно PD-0184264 вводится путем ингаляции, местно или перорально. В предпочтительном варианте реализации PD-0184264 вводится один раз в сутки в пероральной дозе от 100 мг до 900 мг, предпочтительно 600 мг, в течение 7-21 дней.

В частности, как описано в примере 14, PD-0184264 вводили с начальной дозой 100 мг и до трех этапов повышения в семи группах испытуемых в соответствии с режимом однократной возрастающей дозы / многократной возрастающей дозы (SAD/MAD). Схема введения включала одну дозу PD-0184264, увеличивающуюся со 100 мг до 900 мг (SAD) с последующими семью дозами PD-0184264, увеличивающимися со 100 мг до 600 мг один раз в сутки в течение семи дней (MAD). Когорта каждой дозы была признана безопасной Комитетом по надзору за безопасностью (SRC) с разрешением переходить к следующей более высокой дозе (до 900 мг SAD и 600 мг MAD соответственно). Наблюдаемый фармакокинетический профиль подтверждает правильность назначенного режима "один раз в сутки" для дальнейшей клинической разработки.

Всего в ходе исследования было зарегистрировано лишь несколько нежелательных явлений, а серьезных нежелательных явлений не наблюдалось. Таким образом, PD-0184264 признан безопасным и хо-

рошо переносимым. Фармакокинетика воздействия и определение ингибирования МЕК были проверены и подтверждают поддержание клинически значимых уровней в крови.

Настоящее изобретение также предусматривает различные композиции, предпочтительно фармацевтические композиции. Настоящее изобретение относится к композиции, содержащей PD-0184264 для применения в способе профилактики и/или лечения коинфекции, включающей бактериальную инфекцию и вирусное заболевание. Настоящее изобретение также относится к композиции, содержащей PD-0184264 для применения в способе профилактики и/или лечения бактериальной инфекции и/или вирусного заболевания. В настоящем изобретении также предложена композиция, содержащая PD-0184264 и один или более ингибиторов, нацеленных на вирус, в частности вирус гриппа и/или бактерию, для применения в способе профилактики и/или лечения коинфекции, включающий бактериальную инфекцию и вирусную инфекцию, в частности вирусную инфекцию гриппа. Кроме того, настоящее изобретение относится к композиции, содержащей PD-0184264 и один или более ингибиторов, нацеленных на бактерию, для применения в способе профилактики и/или лечения бактериальной инфекции или вирусной инфекции.

Как было сказано выше, композиция, содержащая PD-0184264 и иногда один или более ингибиторов, нацеленных на бактерию, и/или один или несколько ингибиторов, нацеленных на вирус, в частности вирус гриппа, может представлять собой фармацевтическую композицию. В предпочтительном варианте реализации фармацевтическая композиция содержит PD-0184264 и ингибитор, нацеленный на вирус гриппа, в частности ингибитор нейраминидазы. В другом варианте реализации фармацевтическая композиция содержит PD-0184264 и дополнительный ингибитор МЕК. Предпочтительно такие композиции дополнительно содержат носитель, предпочтительно фармацевтически приемлемый носитель. Композиция может быть в форме перорально вводимых суспензий или таблеток, назальных спреев, препаратов для ингаляционных устройств, стерильных инъекционных препаратов (вводимых внутривенно, внутримышечно, внутривенно, внутримышечно), например, в виде стерильных инъекционных водных или масляных суспензий или суппозитория.

Фармацевтическая композиция для применения по настоящему изобретению, содержащая PD-0184264 и, необязательно, один или более ингибиторов, нацеленных на вирус гриппа, и/или один или более ингибиторов, нацеленных на бактерию, вводится пациенту, который представляет собой млекопитающее или птицу. Примеры подходящих млекопитающих включают мышь, крысу, корову, козу, овцу, свинью, собаку, кошку, лошадь, морскую свинку, собаку, хомяка, норку, тюленя, кита, верблюда, шимпанзе, макаку резус и человека, предпочтительно человека, но не ограничиваются указанными. Примеры подходящих птиц включают индейку, курицу, гуся, утку, чирка, крякву, скворца, шилохвость, чайку, лебедя, цесарку или некоторых водоплавающих птиц, но не ограничиваются указанными. Пациенты-люди представляют собой один из конкретных вариантов реализации настоящего изобретения.

Ингибитор или ингибиторы предпочтительно вводятся в терапевтически эффективном количестве. "Терапевтически эффективное количество" для PD-0184264 или каждого активного соединения/ингибитора может варьировать в зависимости от факторов, включающих, но не ограничивающихся следующим: активность используемого соединения, стабильность активного соединения в организме пациента, тяжесть состояния, которое необходимо облегчить, общая масса пациента, получающего лечение, путь введения, легкость всасывания, распространения и выведения соединения организмом, возраст и чувствительность пациента, подлежащего лечению, нежелательные явления и т. п., что должно быть очевидным для специалиста в данной области. Вводимое количество может корректироваться, так как различные факторы меняются с течением времени. Ингибиторы, способы и области применения, описанные в настоящем изобретении, применимы как для лечения человека, так и для применения в ветеринарии.

Описанные в настоящем изобретении соединения, в частности PD-0184264 и, необязательно, один или несколько ингибиторов, нацеленных на вирус гриппа, и/или один или несколько ингибиторов, нацеленных на бактерию, обладающие желаемой терапевтической активностью, могут вводиться субъекту в физиологически приемлемом носителе, как описано в настоящем изобретении. В зависимости от способа введения соединения могут быть составлены различными способами, как обсуждается ниже. Концентрация терапевтически активного соединения в композиции может варьировать примерно от 0,1 до 100 мас. %. Лекарственные средства могут вводиться отдельно или в комбинации с другими видами лечения. Пример 1 показывает, что 25 и 75 мг/кг PD-0184264 эффективны *in vivo* при пероральном введении. Соответственно, PD-0184264 может вводиться в дозировке в диапазоне от 10 до 100 мг/кг PD-0184264, предпочтительно в диапазоне от 25 до 75 мг/кг PD-0184264. Предпочтительное введение производится в виде однократной суточной дозы от 100 до 900 мг, включая какое-либо количество в пределах указанной дозы от 200, 300, 400, 500, 600, 700 и 800 мг. В предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения введение производится один раз в сутки перорально в дозировке 600 мг. PD-0184264 можно вводить в течение периода от 1 до 21 дня или более непрерывно, предпочтительно в течение 7-14 дней.

Фармацевтические соединения в способе по настоящему изобретению могут вводиться в любой подходящей дозированной лекарственной форме. Подходящие составы для перорального введения могут быть в форме таблеток, капсул, суспензии, сиропа, жевательной резинки, облаток, настоя и т.п. Фарма-

цевтически приемлемые носители, такие как связывающие, вспомогательные, скользящие вещества, а также подсластители или ароматизаторы могут быть включены в пероральные фармацевтические композиции. При желании также могут быть включены общеиспользуемые добавки для изменения вкуса, цвета и формы конкретных лекарственных форм.

Для инъекционных составов фармацевтические композиции могут быть в виде лиофилизированного порошка в смеси с подходящими вспомогательными веществами в подходящем флаконе или тюбике. Перед использованием в лечебном учреждении лекарственные средства могут быть восстановлены путем растворения лиофилизированного порошка в подходящей системе растворителей для образования композиции, подходящей для внутривенной или внутримышечной инъекции.

Комбинация PD-0184264 с противовирусным агентом, таким как ингибитор нейраминидазы, например осельтамивир, вызывает синергетический эффект. Данный синергетический эффект может представлять собой повышенный противовирусный эффект, приводящий, например, к снижению титра вируса или продлению терапевтического окна. Таким образом, настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции, содержащей терапевтически эффективное количество PD-0184264, а также терапевтически эффективное количество ингибитора нейраминидазы, выбранного из группы, состоящей из осельтамивира, фосфата осельтамивира, ланинамивира, занамивира и перамивира. В одном из вариантов реализации композиция может быть в форме для перорального введения (например, таблетки или капсулы или сиропа и т. п.) с терапевтически эффективным количеством (например, от 0,1 до 2000 мг, от 0,1 до 1000 мг, от 0,1 до 500 мг, от 0,1 до 500 мг, от 0,1 до 200 мг, от 30 до 300 мг, от 0,1 до 75 мг, от 0,1 до 30 мг) ингибитора нейраминидазы, как описано выше.

В дополнительных вариантах реализации PD-0184264 предназначен для применения в способах профилактики и/или лечения коинфекции по настоящему изобретению, причем PD-0184264 снижает как вирусную, так и бактериальную инфекцию при контакте с тест-системой *in vitro*, причем указанная тест-система содержит культивируемые клетки, инфицированные а) вирусом гриппа б) бактерией по сравнению с тест-системой *in vitro* перед контактом. В другом варианте реализации PD-0184264 предназначен для применения в способах профилактики и/или лечения коинфекции по настоящему изобретению, причем PD-0184264 снижает бактериальную инфекцию при контакте с тест-системой *in vitro*, причем указанная тест-система содержит культивируемые клетки, инфицированные бактерией, по сравнению с тест-системой *in vitro* перед контактом.

Таким образом, настоящее изобретение также относится к тест-системе *in vitro*, причем данная тест-система содержит культивируемые клетки, инфицированные

- а) вирусом гриппа и
- б) бактерией.

Кроме того, в настоящем изобретении также предложена тест-система *in vitro*, причем данная тест-система *in vitro* содержит культивируемые клетки, инфицированные бактерией.

В случаях, когда тест-система *in vitro* включает вирусную и бактериальную инфекцию, эти инфицирования могут происходить последовательно или одновременно.

"Культивируемая клетка" или "культивируемые клетки" представляет/представляют собой клетки, которых нет в их естественной среде, например в растении или животном. Точнее говоря, культивируемая клетка может представлять собой первичную клеточную культуру, которая содержит клетки, выделенные из их естественной среды, или клеточную линию. Предпочтительно культивируемые клетки представляют собой эпителиальные клетки легкого человека. Предпочтительно культивируемые клетки высевают с плотностью 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 на 0,5 мл, 1 мл, 1,5 мл, 2 мл, 2,5 мл, 3 мл, 3,5 мл, 4 мл среды, такой как DMEM (среда Игла, модифицированная по способу Дульбекко). Наиболее предпочтительной является плотность 8×10^5 на 2 мл DMEM.

Подобные культивируемые клетки инфицируют вирусом и бактерией или в других вариантах реализации - только бактерией. Как было сказано выше, коинфицирование может быть последовательным или одновременным. К примеру, культивируемые клетки могут быть инфицированы сначала вирусом гриппа, а через 30 мин - бактерией/бактериями. Также можно дополнительно добавить в культуру антибиотик через 3 ч, чтобы удалить внеклеточные бактерии. При таком сценарии антибиотик затем снова смывают. В других вариантах реализации клетки инфицируют только бактерией.

В настоящем изобретении термин "приведение в контакт" относится к пространственному приближению клетки, содержащей вирус гриппа и бактерию, к PD-0184264. Это может означать, например, что ингибитор наносится через шприц на среду, в которой находятся культивируемые клетки.

В одном из вариантов реализации уменьшение вирусной инфекции представляет собой сокращение числа бляшкообразующих единиц (БОЕ)/мл, а уменьшение бактериальной инфекции представляет собой сокращение числа колониеобразующих единиц (КОЕ)/мл. "Бляшкообразующие единицы" - количество частиц, способных образовывать бляшки, таких как частицы вируса, на единицу объема. Это скорее функциональный количественный показатель, чем показатель абсолютного количества частиц: вирусные частицы, которые являются дефектными или не способны инфицировать клетку-мишень, не образуют

бляшку и, следовательно, не будут учитываться. Например, раствор вируса гриппа с концентрацией 1000 БОЕ/мкл указывает на то, что 1 мкл раствора содержит достаточно вирусных частиц, чтобы получить 1000 инфекционных бляшек в клеточном монослое. Применительно к настоящему изобретению, культура клеток, обработанная ингибитором, демонстрирует уменьшенное количество бляшкообразующих единиц в культуре после обработки по сравнению с культурой до обработки PD-0184264.

Возможное "уменьшение количества бляшкообразующих единиц (БОЕ)/мл" анализируют следующим образом. Сначала культивируемые клетки, коинфицированные вирусом гриппа и бактерией, анализируются на их способность образовывать бляшкообразующие единицы (БОЕ)/мл, например, отбирают несколько клеток из чашки Петри и высевают их для подсчета бактериальных бляшек, которые будут образовываться. Данный результат затем сравнивают с количеством бляшкообразующих единиц (БОЕ)/мл, образуемых клетками той же культуры после применения ингибитора. Если количество бляшкообразующих единиц (БОЕ)/мл после обработки ингибитором уменьшается по сравнению с количеством, образованным до применения ингибитора, имеет место сокращение числа бляшкообразующих единиц.

"Колониеобразующие единицы (КОЕ)/мл" - показатель количества жизнеспособных бактерий в образце. Существуют разные способы. Например, для создания колониеобразующих единиц образец (например, культивируемые клетки в небольшом объеме) распределяют по поверхности чашки с питательным агаром и дают возможность высохнуть перед инкубацией для подсчета. "Жизнеспособная бактерия" означает бактерия, способная размножиться посредством бинарного деления в контролируемых условиях. Чтобы колонию было видно, нужно чтобы она достаточно сильно выросла - при подсчете колоний неясно, возникла ли колония из одной клетки или из 1000 клеток. Следовательно, для отражения этой неясности результаты выражают в КОЕ/мл (колониеобразующих единиц на 1 миллилитр) для жидкостей и КОЕ/г (колониеобразующих единиц на 1 грамм) для твердых веществ (а не клеток/мл или клеток/г).

"Колониеобразующие единицы (КОЕ)/мл" можно анализировать следующим образом. Сначала культивируемые клетки, коинфицированные вирусом гриппа и бактерией или только одной бактерией, анализируют на их способность создавать колониеобразующие единицы (КОЕ)/мл, например, отбирая несколько клеток из чашки Петри и высевая их для подсчета. Полученный результат затем сравнивают с количеством колониеобразующих единиц (КОЕ)/мл, образуемых клетками той же культуры после применения ингибитора. Если количество колониеобразующих единиц (КОЕ)/мл уменьшается до количества, образованного до применения ингибитора, имеет место сокращение численности.

Как правило, специалист в данной области умеет применять эти широко известные методики анализа бактериальных и вирусных инфекций. Методика определения количества бляшкообразующих единиц (БОЕ)/мл и колониеобразующих единиц (КОЕ)/мл, более подробно описана в литературе (Tuschert et al., 2011, Hrincius et al., 2010).

Для целей настоящего изобретения активное соединение, как определено выше, также включает его фармацевтически приемлемую(ые) соль(и). В контексте настоящего изобретения фраза "фармацевтически или косметически приемлемая(ые) соль(и)" означает соли соединений по настоящему изобретению, которые безопасны и эффективны для желаемой формы введения. Фармацевтически приемлемые соли включают соли, образованные анионами, например, соли, полученные из соляной, фосфорной, уксусной, щавелевой, винной кислот и т. п., и соли, образованные катионами, например, соли натрия, калия, аммония, кальция, гидроксидов железа, изопропиламина, триэтиламина, 2-этиламиноэтанола, гистидина, прокаина и т. п.

Настоящее изобретение также охарактеризовано следующими положениями:

1. PD-0184264 или его фармацевтически приемлемая соль для применения в способе профилактики и/или лечения вирусного заболевания.
2. PD-0184264 или его фармацевтически приемлемая соль для применения по п.1, где указанный вирус представляет собой РНК-вирус с отрицательной цепью.
3. PD-0184264 или его фармацевтически приемлемая соль для применения по п.1 или 2, где указанный вирус представляет собой вирус гриппа.
4. PD-0184264 или его фармацевтически приемлемая соль для применения по любому из пп.1-3, где указанный вирус гриппа представляет собой вирус гриппа А или вирус гриппа В.
5. PD-0184264 или его фармацевтически приемлемая соль для применения в способе профилактики и/или лечения бактериальной инфекции.
6. PD-0184264 или его фармацевтически приемлемая соль для применения по п.5, где указанная бактериальная инфекция опосредована бактерией, выбранной из группы, состоящей из Staphylococcaceae, Streptococcaceae, Legionellaceae, Pseudomonadaceae, Bacillaceae, Chlamydiaceae, Mycoplasmataceae, Enterobacteriaceae, Pseudomonadales и/или Pasteurellaceae.
7. PD-0184264 или его фармацевтически приемлемая соль для применения в способе профилактики и/или лечения коинфекции, включающей бактериальную инфекцию и вирусное заболевание.
8. PD-0184264 или его фармацевтически приемлемая соль для применения по п.7, где указанная бактериальная инфекция опосредована бактерией, выбранной из группы, состоящей из Staphylococcaceae, Streptococcaceae, Legionellaceae, Pseudomonadaceae, Bacillaceae, Chlamydiaceae, My-

coplasmataceae, Enterobacteriaceae, Pseudomonadales и/или Pasteurellaceae.

9. PD-0184264 или его фармацевтически приемлемая соль для применения по п.7 или 8, где указанный вирус представляет собой РНК-вирус с отрицательной цепью.

10. PD-0184264 или его фармацевтически приемлемая соль для применения по любому из пп.7-9, где указанная вирусная инфекция вызвана вирусом гриппа.

11. PD-0184264 или его фармацевтически приемлемая соль для применения по любому из пп.7-10, где указанная вирусная инфекция вызвана вирусом гриппа А или вирусом гриппа В.

12. PD-0184264 или его фармацевтически приемлемая соль для применения по любому из пп.1-4 и 7-11, где PD-0184264 или его фармацевтически приемлемую соль вводят в комбинации с ингибитором нейраминидазы или его фармацевтически приемлемой солью.

13. PD-0184264 или его фармацевтически приемлемая соль для применения по п.12, где указанный ингибитор нейраминидазы выбран из осельтамивира, фосфата осельтамивира, занамивира, ланинамивира или перамивира или их фармацевтически приемлемой соли.

14. Фармацевтическая композиция, содержащая PD-0184264 или его фармацевтически приемлемую соль.

15. Фармацевтическая композиция, содержащая PD-0184264 или его фармацевтически приемлемую соль и ингибитор нейраминидазы или его фармацевтически приемлемую соль.

16. Применение по любому из предыдущих пунктов, включающее дополнительный ингибитор МЕК.

17. PD-0184264 или его фармацевтически приемлемая соль для применения по любому из предыдущих пунктов у субъекта, предпочтительно у позвоночного животного.

Следует отметить, что при использовании в настоящем изобретении и в прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа также включают и формы множественного числа, если не указано иное. Таким образом, например, упоминание термина "реагент" включает один или более различных реагентов, а упоминание термина "способ" включает эквивалентные стадии и способы, известные специалистам в данной области техники, которые могут быть изменены или заменены на способы, описанные в настоящем изобретении.

Все публикации и патенты, цитируемые в настоящем описании, включены в настоящее изобретение полностью посредством ссылки. В той степени, в которой данные, включенные посредством ссылки, противоречат или не согласуются с настоящим описанием, настоящее описание превалирует над любыми такими данными.

Если не указано иное, термин "по меньшей мере", предшествующий ряду элементов, следует понимать как относящийся к каждому элементу в ряду. Специалисты в данной области техники распознают или смогут установить, используя не более чем рутинные эксперименты, множество эквивалентов конкретных вариантов реализации изобретения, описанных в настоящем изобретении. Предполагается, что такие эквиваленты включены в настоящее изобретение.

Во всем описании и в формуле изобретения, которая следует ниже, подразумевается, что термин "содержать" и такие варианты, как "содержит" и "содержащий", включает указание 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, если контекст не требует иного. При использовании в настоящем изобретении термин "содержащий" может быть заменен термином "состоящий" или иногда при использовании в настоящем изобретении термином "имеющий".

При использовании в настоящем изобретении термин "состоящий из" исключает любой элемент, стадию или ингредиент, не указанный в пункте формулы изобретения. При использовании в настоящем изобретении выражения "состоящий по существу из" не исключает материалы или стадии, которые не оказывают существенного влияния на основные и новые характеристики формулы изобретения.

В настоящем изобретении в каждом конкретном случае любой из терминов "содержащий", "состоящий по существу из" и "состоящий из" может быть заменен любым из двух других терминов.

Несколько документов процитированы по всему тексту настоящего описания. Каждый из документов, процитированных в настоящем изобретении (включая все патенты, патентные заявки, научные публикации, спецификации изготовителя, инструкции и т. д.) выше или ниже, полностью включен в настоящее изобретение посредством ссылки. Никакая информация, изложенная в данном документе не должна толковаться как признание того, что настоящее изобретение не может предшествовать такому раскрытию вследствие более раннего изобретения.

Примеры

Настоящее изобретение проиллюстрировано нижеследующими примерами. Указанные примеры не следует истолковывать как ограничивающие объем настоящего изобретения. Примеры включены в целях иллюстрации, и настоящее изобретение ограничено только формулой изобретения.

Пример 1. Лечение мышей PD-0184264 приводит к снижению титра вируса в легком.

Мышей линии C57BL/6 в возрасте 8 недель (по пять в каждой группе) инфицировали $1,5 \times 10^5$ БОЕ ($5 \times \text{MLD}_{50}$) штамма вируса гриппа A/Regensburg/D6/2009 (RB1, H1N1pdm09). Начав за час до заражения,

мышам вводили 150 мг/кг CI-1040; 75 мг/кг CI-1040, 25 мг/кг CI-1040, 75 мг/кг PD0184264, 25 мг/кг PD0184264 или растворитель (контроль): 50 мкл ДМСО/150 мкл Cremophor/800 мкл ФСБ с интервалом в 8 ч. Все животные получали объем 200 мкл перорально. Через 24 ч после заражения мышей умертвили, их легкие взвесили, поместили в пробирку Lysing Matrix D (MP Bio) и на данные образцы нанесли БСР (буферный солевой раствор) в количестве, равном 10-кратному объему легкого. Органы измельчили с помощью FastPrep FP 120 (Savant). Для удаления клеточного дебриса гомогенаты центрифугировали в течение 15 мин при 2000 об/мин и собирали супернатант. Определение титра вируса в гомогенатах производили с помощью технологии анализа бляшек AVICEL® plaque assay. Результаты представлены на фиг. 1 в виде титра вируса (log₁₀) БОЕ/мл (слева) или % титра вируса (справа). Титр вируса определяли два исследователя независимо друг от друга. Были представлены средние значения из всех титрований.

Пример 2. Введение CI-1040 или PD-0184264 оказывает ингибирующее действие на рост бактерий, включая MRSA *in vitro*.

Для исследования влияния CI-1040 или PD-0184264 на рост бактерий в целом в бесклеточную ночную культуру штамма MRSA *S. aureus* (USA300) добавили 50 мкМ или CI-1040, или PD-0184264, или такой же объем (40 мкл) ДМСО, служащего растворителем (фиг. 2). Рост бактерий контролировали в течение 360 мин. PD-0184264 оказал сильное воздействие на рост бактерий, который почти полностью отсутствовал в течение всего периода наблюдения. CI-1040 незначительно ингибировал рост MRSA, начиная через 120 мин после начала эксперимента, по сравнению с растворителем контроля, как видно из фиг. 2. Это указывает на то, что PD-0184264, а также CI-1040 в дополнение к блокированию

МЕК в клетках также блокирует бактериальный компонент, ответственный за рост бактерий.

Для исследования концентраций PD-0184264, необходимых для ингибирования роста бактерий, PD-0184264 вводили в различных концентрациях (как показано на фиг. 3) в ночную культуру *S. aureus* USA300 (MRSA). Бактерии MRSA инкубировали с ингибитором МЕК в разных концентрациях в диапазоне от 0 до 100 мкМ, и отслеживали рост бактерий через шесть ч после культивирования. Концентрация, необходимая для ингибирования 50% роста бактерий, находилась в диапазоне 15-25 мкМ.

Эти данные могут быть проверены в незначительно отличающихся экспериментальных условиях, путем определения фактических бактериальных титров вместо оптической плотности (OD) в более поздние моменты времени после обработки. Дневную культуру *S. aureus* 6850 довели до концентрации 20 КОЕ/мл и обрабатывали различными концентрациями CI-1040 как показано на рисунке в течение ночи при 37°C и 5% CO₂. Затем измеряли оптическую плотность (OD₆₀₀). Оставшуюся культуру промыли ФСБ (фосфатно-солевым буфером) и серийно разбавленные растворы поместили в чашки с агаром ВНИ (агар с сердечно-мозговой вытяжкой). Титры бактерий показаны в колониеобразующих единицах на 1 мл (КОЕ/мл). Результаты, представляющие собой средние значения + SD (стандартное отклонение) трех независимых биологических экспериментов с двумя техническими повторностями, показаны на фиг. 4А. В дополнение, дневные культуры *S. aureus* 6850 (фиг. 4В) или штамма MRSA USA300 (фиг. 4С) довели до концентрации 20 КОЕ/мл и обрабатывали различными концентрациями PD-0184264, как показано на рисунке, в течение ночи при 37°C и 5% CO₂. Утром измеряли оптическую плотность (OD₆₀₀). Оставшиеся культуры однократно промыли ФСБ и затем серийно разбавленные растворы поместили в чашки с агаром ВНИ. Титры бактерий определяли с помощью счетчика колоний "protocol3" и отображали на логарифмической шкале в колониеобразующих единицах на 1 мл (КОЕ/мл). Результаты представляют собой средние значения ± SD трех независимых биологических экспериментов с двумя техническими повторностями. Статистическую значимость анализировали методом однофакторного дисперсионного анализа ANOVA с последующим тестом с помощью критерия Даннета для множественных сравнений. И CI-1040 (фиг. 4А), и PD-0184264 (фиг. 4В, С) в указанных анализах также были эффективны против штамма *S. aureus* 6850 (фиг. 4А, В) и штамма MRSA USA 300 (фиг. 4С). Очень сильное снижение титров до 1,5-2 порядков можно было детектировать с помощью 20 мкМ PD-0184264 (фиг. 4В, С).

Пример 3. Введение PD-0184264 в клетки, инфицированные одним патогеном, или в коинфицированные клетки защищает клетки от цитопатического действия ВГА и/или *S. aureus*.

Учитывая противовирусный и сильный антибактериальный эффект PD-0184264 (фиг. 2-4 в приведенном выше примере 2), анализировали, можно ли также макроскопически наблюдать указанное свойство данного соединения в отношении разрушающих клетки цитопатических эффектов (CPE), вызванных заражением ВГА (вирусом гриппа А) и/или *S. aureus*. Эпителиальные клетки легкого человека (A549) предварительно обработали PD-0184264 (в указанных концентрациях) или растворителем (ДМСО) и инфицировали штаммом вируса гриппа человека А/Puerto Rico/8/34 (H1N1) при множественной инфекции (MOI=0,001) при 37°C. Через 30 мин разбавленный раствор вируса удалили, клетки промыли ФСБ и добавили инвазивную среду DMEM/INV (содержащую 1% сывороточного альбумина человека, 25 нМ ГЭПЭС) с или без *S. aureus* 6850 (MOI=0,1) в присутствии указанной концентрации ингибитора или растворителя контроля. Через 3 ч после бактериального заражения клетки обрабатывали DMEM/FBS, содержащим 10% FBS и 2 мкг/мл лизостафина, в течение 20 мин для удаления внеклеточных бактерий. После дополнительной промывки ФСБ к клеткам добавили инфекционную среду DMEM/BA (0,2% BA, 1 мМ MgCl₂, 0,9 мМ CaCl₂, 100 ед./мл пенициллина, 0,1 мг/мл стрептомицина),

содержащую ингибитор или растворитель. После 24-часового инкубационного периода при 37°C морфологию клеток исследовали с помощью световой микроскопии. Как показано на фиг. 5, после инфицирования только ВГА (H1N1) или только штаммом *S. aureus* 6850 наблюдалось незначительное разрушение клеточного монослоя. Данный CPE сильно возрос при коинфекции обоими патогенами (нижняя панель). Однако с увеличением количества ингибитора МЕК данный фенотип может быть возвращен в предыдущее состояние в степени, зависящей от концентрации, поскольку клеточный монослой остается неповрежденным, а клетки имеют менее круглую форму. Указанное действие PD-0184264 по защите клеток прекрасно отражает его противовирусные и антибактериальные свойства (фиг. 5).

Пример 4. Сравнение антибактериального действия PD-0184264 с общеизвестными антибиотиками.

Чтобы сопоставить антибактериальные свойства ингибитора МЕК PD0184164 с действием общеизвестного антибиотика, бактерии в течение ночи обрабатывали растворителем, ингибиторами МЕК U0126 и PD-0184264 или различными концентрациями антибиотика гентамицина. Дневные культуры *S. aureus* 6850 или штамма MRSA USA300 довели до концентрации 20 КОЕ/мл и в течение ночи обрабатывали, как показано на рисунке, ингибиторами МЕК U0126 и PD-0184264 или антибиотиком гентамицином при 37°C и 5% CO₂. Утром измеряли оптическую плотность (OD₆₀₀). Оставшиеся культуры однократно промыли ФСБ и затем серийно разбавленные растворы поместили в чашки с агаром ВНИ. Титры бактерий определяли с помощью счетчика колоний "protocol3" и отображали на графике в колониеобразующих единицах на 1 мл (КОЕ/мл). Результаты, показанные на фиг. 6, представляют собой средние значения ± SD трех независимых биологических экспериментов с двумя техническими повторностями. Статистическую значимость анализировали методом однофакторного дисперсионного анализа ANOVA с последующим тестом с помощью критерия Даннета для множественных сравнений. По сравнению с бактериями, обработанными растворителем, инкубация с ингибитором МЕК первого поколения U0126 вызвала лишь незначительное снижение титров бактерий, тогда как обработка PD-0184264 вызвала очень сильное снижение бактериальной нагрузки, как показано на фиг. 4 выше. Это происходило в случаях с обоими бактериальными штаммами. Как и ожидалось, рост обоих бактериальных штаммов был сильно ингибирован обработкой гентамицином в концентрациях, превышающих 1 мкг/мл, хотя антибактериальное действие антибиотика было сильнее в случае с *S. aureus* 6850. При концентрации гентамицина 0,5 мкг/мл у обоих штаммов не было зафиксировано снижение титров бактерий. В итоге воздействие ингибитора МЕК PD-0184264 на рост бактерий было почти таким же эффективным, как и воздействие низких концентраций антибиотика гентамицина.

Для дополнительного сравнения антибактериального действия PD-0184264 с другими соединениями, ингибирующими МЕК, или с антибиотиком гентамицином проводили анализы влияния времени добавления (фиг. 7а). Ночную культуру *S. aureus* 6850 разделили на шесть субкультур, содержащих 15 мл среды ВНИ вместе с растворителем ДМСО в отдельности или с одним из ингибиторов МЕК U0126 и PD-0184264, либо с двумя различными концентрациями антибиотика гентамицина (0,5 или 2 мкг/мл). Сразу после добавления разных соединений измеряли OD₆₀₀ и серийно разбавленные растворы помещали в чашки с агаром ВНИ для расчета титров бактерий. Оставшиеся культуры дополнительно инкубировали при 37°C с 5% CO₂ в присутствии только вышеуказанных веществ или растворителя. Данную процедуру повторяли дважды через 3 и 6 ч после инокуляции. Титры бактерий определяли с помощью счетчика колоний "protocol3" и отображали на графике в колониеобразующих единицах на 1 мл (КОЕ/мл). При обработке ингибитором МЕК PD-0184264 наблюдалось самое сильное ингибирование роста бактерий по сравнению со всеми другими соединениями. Позже производили замену среды и культуры дополнительно инкубировали без добавления каких-либо веществ. Все культуры достигли мутности предварительно обработанной растворителем культуры, что указывает на то, что ингибитор МЕК PD-0184264 проявляет скорее бактериостатическое, чем бактерицидное действие.

Развитие резистентности к различным традиционно используемым антибиотикам происходит регулярно и представляет собой серьезную проблему в лечебных учреждениях. С целью проверить, вызывает ли ингибитор МЕК PD0184264 развитие резистентности у *S. aureus*, культуры в течение почти трех недель постоянно обрабатывали в присутствии ингибитора, гентамицина, эритромицина или оставляли необработанными. В частности, культуры выращивали в течение 24 ч в присутствии или в отсутствие веществ, измеряли OD₆₀₀, а затем указанные культуры доводили до концентрации 20 КОЕ/мл и снова выращивали в течение 24 ч. Эту процедуру повторяли в течение 17 дней. Данные представляют собой средние значения + SD трех независимых экспериментов. Статистическую значимость анализировали методом однофакторного дисперсионного анализа ANOVA с последующим тестом с помощью критерия Даннета для множественных сравнений (* p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001; **** p < 0.0001). Как видно в случае с гентамицином, развитие резистентности происходило в течение первой недели обработки в отличие от макролидного антибиотика эритромицина. Примечательно, что обработка ингибитором МЕК не вызывала резистентности (см. результаты, показанные на фиг. 7b).

Пример 5. Бактериальная киназа PknV может быть мишенью для PD-0184264 у бактерий.

Предполагается, что ингибитор PD-0184264 является специфичным для киназ МЕК, которые содержатся в организме млекопитающих. Его прямое антибактериальное действие ставит вопрос о способе

действия в прокариотах, то есть существует ли МЕК-подобный бактериальный компонент, на который также может специфически направленно воздействовать PD-0184264. В связи с этим объектом исследования становится бактериальная серин/треонинкиназа PknB. Данная киназа демонстрирует большое структурное и функциональное сходство с клеточными серин/треонинкиназами, точнее с MAP-киназами, такими как p38, INK и ERK (Miller et al., 2010, Raketle et al. 2012) (фиг. 8), которые являются МЕК-мишенями в клетках млекопитающих. Интересно, что киназа, как было продемонстрировано, активируется аутофосфорилированием, таким образом, это дает веские основания предполагать, что она проявляет активность подобную активности МЕК.

Пример 6. PD-0184264 повышает чувствительность *Staphylococcus aureus* к антибиотикам и снижает устойчивость к бактериальному стрессу.

Благодаря экспрессии трех доменов, связывающих пенициллин (PASTA) (см. фиг. 8, верхняя панель), PknB участвует в регуляции чувствительности к антибиотикам. Доказано, что недостаток киназы приводит к повышенной восприимчивости к различным антибиотикам, особенно к различным Р-лактамам (Tamber et al. 2010). С целью выяснить, может ли обработка бактерий ингибитором МЕК PD-0184264 воздействовать на бактериальную киназу и приводить к формированию фенотипа, сходного с инактивированной киназой, культуры бактерий в течение ночи обрабатывали растворителем (ДМСО) или 20 мкМ PD-0184264 и затем использовали для определения минимальной ингибирующей концентрации (МИС) различных антибиотиков. Дневные культуры *S. aureus* 6850 доводили до концентрации 20 КОЕ/мл и обрабатывали растворителем (ДМСО) или ингибитором МЕК PD-0184264 в течение ночи при 37°C и 5% CO₂. Утром измеряли оптическую плотность (OD₆₀₀). Говоря коротко, обработанные растворителем и ингибитором культуры однократно промыли ФСБ и растворы, разбавленные в соотношении 1:1, поместили в чашки с агаром ВНИ. Вскоре после инокуляции тест-полоски для определения МИС для разных антибиотиков (Thermo Fischer Scientific) поместили в середину чашки и затем инкубировали в течение 18-24 ч при 37°C. После 18 ч инкубации при 37°C концентрации МИС определяли визуальным анализом чашек. Концентрация, при которой визуально наблюдалось прекращение ингибирования роста, была обозначена как МИС для каждого отдельного антибиотика.

Обработка PD-0184264 действительно привела к повышению восприимчивости бактерий к различным антибиотикам, что было наиболее заметно в случае с пенициллином и гентамицином (фиг. 9, табл. 2). Данный результат полностью согласуется с опубликованными данными, полученными при использовании мутантного штамма, в котором отсутствует киназа (Tamber et al. 2010).

Таблица 2

Определение МИС после обработки ингибитором PD0184264 в течение ночи

	Минимальная ингибирующая концентрация (МИС) [мг/л]			
	<i>S. aureus</i> 6850		<i>S. aureus</i> USA300	
	необработанные	PD0184264	необработанные	PD0184264
Пенициллин	16	0,25 - 0,5	> 256	8
Меропенем	0,06	0,03	0,12 - 0,25	0,06
Линезолид	2	1	2	1
Ципрофлоксацин	0,25	0,12 - 0,25	8	4 - 8
Гентамицин	2	0,12	1	0,12

Наблюдаемое повышение восприимчивости к антибиотикам при обработке PD-0184264, соответствующее фенотипу бактерий, в которых отсутствует киназа (Tamber et al. 2010), убедительно свидетельствует о том, что ингибитор может направленно воздействовать непосредственно на PknB. Поскольку известно, что киназа играет важную роль в устойчивости к бактериальному стрессу, рост бактерий в условиях теплового стресса отслеживали после обработки бактерий ингибитором PD-0184264. Штамм *S. aureus* 6850 и штамм MRSA USA300 в течение ночи обрабатывали растворителем или 20 мкМ PD-0184264. На следующий день подготовили субкультуры с таким же количеством бактерий (подтверждено OD₆₀₀ и посевом на агаре ВНИ) и дополнительно инкубировали при 42°C в течение 6 ч. Затем титры бактерий рассчитывали путем посева серийно разбавленных растворов в чашки с агаром ВНИ. Как показано на фиг. 10, бактерии, обработанные PD-0184264, в указанных условиях получили сильные повреждения по сравнению с патогенами, обработанными растворителем. То же самое наблюдалось и у чувствительного к метициллину штамма 6850 (черные столбцы), и у штамма MRSA USA300 (серые столбцы). Нарушение устойчивости к стрессу в присутствии ингибитора является еще одним показателем того, что PD-0184264 направленно воздействует непосредственно на киназу PknB, которая является важным медиатором устойчивости к стрессу. Таким образом, вышеприведенные данные предоставляют убедительные косвенные доказательства того, что PD-0184264 проявляет свое антибактериальное действие путем ингибирования бактериальной киназы PknB.

Пример 7. Введение PD-0184264 оказывает ингибирующее действие на рост *Streptococcus pneumoniae* и *Bacillus subtilis*

Помимо *S. aureus*, существуют другие бактерии, которые, как известно, вызывают у пациентов вторичную бактериальную пневмонию после заражения вирусом гриппа (ВГ). В данном контексте наиболее распространенным патогеном является *Streptococcus pneumoniae*. Эти бактерии представляют собой наи-

более распространенную причину внебольничной пневмонии. В отличие от *S. aureus*, вторичные заражения, вызванные *Streptococcus pneumoniae*, происходят на поздней стадии, следующей за ВГ, и поэтому соответствуют конечной стадии постгриппозной пневмонии.

Подобно *S. aureus*, большинство штаммов *Streptococcus pneumoniae* экспрессируют эукариотоподобные серин/треонинкиназы, такие как PknB, которые в высокой степени сохраняются среди различных родов. Кроме того, указанные киназы имеют высокую гомологию с клеточными MAP-киназами (например, ERK, JNK, p38). Результаты, показанные в примерах 2-6, полученные на различных штаммах *S. aureus*, уже продемонстрировали ингибирующее действие обработки PD-0184264 на рост бактерий, что указывает на участие бактериальных киназ, таких как PknB, в наблюдаемом фенотипе. Поразительно, что гомолог *S. aureus* PknB также имеется у *Streptococcus pneumoniae*, что позволяет предположить, что эти бактерии также могут быть чувствительными к PD-0184264. Таким образом, было проанализировано воздействие PD-0184264 на разные штаммы *Streptococcus pneumoniae*. Штаммы *Streptococcus pneumoniae* можно разделить на различные серотипы, которые отличаются своей вирулентностью и общей патогенностью. Для проверки факта наличия серотип- или штамм-независимого действия, использовали инкапсулированные штаммы D39 и TIGR4, оба из которых вирулентны, но относятся к разным серотипам. Было установлено, что обработка PD-0184264 нарушает рост различных серотипов *Streptococcus pneumoniae*. В частности, дневные культуры штаммов *Streptococcus pneumoniae* TIGR4 (серотип 4) и D39 wt (серотип 2) довели до оптической плотности (OD_{600}), равной 1, разбавили 1:2000 в среде ВНИ и в течение ночи обрабатывали растворителем (DMCO) или различными концентрациями специфического ингибитора MEK PD0184264 (PD; активный метаболит CI-1040), как показано на фиг. 11. Затем снова измерили OD_{600} (результаты показаны на фиг. 11A) и серийно разбавленные растворы поместили в чашки с агаром ВНИ для определения титров бактерий (результаты показаны на фиг. 11B). В результате видно, что оба серотипа чувствительны к PD-0184264 (фиг. 11 A, B).

Такие же результаты получены и у *Bacillus subtilis*, у которых также наблюдалось сильное сокращение численности жизнеспособных бактерий в присутствии 10 мкМ PD-0184264 и полное их уничтожение при более высоких концентрациях (см. результаты на фиг. 11 с). В частности, с целью исследовать факт наличия потенциального антибактериального действия на *B. Subtilis* ночные культуры *B. Subtilis* инкубировали с растворителем или с ингибитором MEK PD-0184264 в разных концентрациях (как показано на фиг. 11) в течение 18 ч. Затем определяли бактериальную нагрузку путем измерения OD_{600} и посева серийно разбавленных растворов в чашки с агаром ВНИ. Данные, показанные на фиг. 11, представляют собой средние значения \pm SD трех независимых экспериментов. В итоге полученные данные указывают на широкую применимость PD-0184264 в противобактериальном лечении.

Пример 8. PD-0184264, в отличие от CI-1040, снижает внутриклеточные титры бактерий.

Заражение вирусом гриппа (ВГ) приводит к увеличению экспрессии противовирусных цитокинов, наиболее важным является тот факт, что IFN (интерфероны) I типа, которые активируют последующие критически важные противовирусные ответы, могут также усиливать последующие бактериальные заражения. Чтобы увидеть, вызовет ли обработка CI-1040 или PD-0184264 сенсификацию клеток к вторичному заражению *S. aureus*, клеточные культуры иммортализованных клеток альвеолярного и базального эпителия человека (A549) инфицировали вирусом гриппа и *S. aureus* в присутствии или в отсутствие ингибиторов. В частности, клетки A549 предварительно обрабатывали в течение 10 мкМ специфического ингибитора MEK PD-0184264 или DMCO в качестве растворителя контроля. После этого клетки промыли ФСБ и инфицировали вирусом гриппа (ВГ) (МОИ указан на рисунке) в течение 30 мин при 37°C, 5% CO₂. Далее клетки промыли ФСБ и инфицировали *S. aureus* 6850 (МОИ указан на рисунке) в присутствии или в отсутствие ингибитора в течение 3 ч. Чтобы не допустить избыточного роста бактерий, производили промывку антибиотиком лизостафином (2 мкг/мл) в течение 20 мин при 37°C для удаления неинтернализованных бактерий. Затем клетки однократно промыли и дополнительно инкубировали до тех пор, пока не прошло 24 ч после заражения, в присутствии ингибитора или растворителя. В конце периода инкубации монослой клеток анализировали с помощью световой микроскопии. Исследование с помощью микроскопа показало, что суперинфекция обоими патогенами привела к значительному усилению цитопатического эффекта (CPE) по сравнению с заражением одним патогеном (фиг. 13, верхняя панель). CPE полностью исчез в присутствии PD-0184264 (фиг. 13, нижняя панель), что указывает на снижение репликации вируса.

Для сравнения результатов обработки PD-0184264 и CI-1040, клетки A549 предварительно обрабатывали 10 мкМ CI-1040, PD-0184264 или растворителем (DMCO) в течение 60 мин, и затем инфицировали вирусом гриппа (H7N7) при MOI=0,001 и 37°C. Полученные результаты показаны на фиг. 14A и 14B соответственно. В качестве альтернативы, клетки оставили необработанными (DMSO) и инфицировали ВГ (H1N1) при MOI=0,01 и 37°C. Через 30 мин раствор вируса удалили, клетки промыли ФСБ и добавили к ним инвазионную среду с или без *S. aureus* 6850 (6850) (MOI=0,1) в присутствии 10 мкМ CI-1040, PD-0184264 или растворителя контроля. Через 3 ч после бактериального заражения клетки обрабатывали лизостафином (2 мкг/мл) в течение 20 мин для удаления внеклеточных бактерий. Затем клетки промыли и добавили к ним инфекционную среду, содержащую ингибитор или растворитель. После инкубации

общей продолжительностью 24 ч (после заражения вирусом) анализировали титры внутриклеточных бактерий. Результаты представляют собой средние значения \pm SD трех отдельных экспериментов. Статистическую значимость оценивали методом однофакторного дисперсионного анализа ANOVA с последующим тестом с помощью критерия Тьюки для множественных сравнений (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$). Как видно из фиг. 14А, обработка CI-1040 не вызвала сенсibilизацию клеток к вторичному заражению *S. aureus*, поскольку не было зафиксировано изменение внутриклеточной бактериальной нагрузки. Неожиданно введение PD-0184264 даже вызывало снижение внутриклеточных титров бактерий, как можно видеть на фиг. 14В. Сопоставимые результаты были получены при введении CI-1040 или PD-0184264 в более поздние периоды времени во время течения инфекции, как показано на фиг. 14С.

Чтобы исключить возможность того, что снижение репликации вирусов и внутриклеточных бактерий было результатом цитотоксического действия PD-0184264 на клетки A549, жизнеспособность клеток в присутствии возрастающих концентраций отслеживали в течение 24 и 48 ч. Кроме того, был проведен LDH-анализ для определения разрывов мембран вследствие обработки ингибитором. Было продемонстрировано, что обработка клеток A549 ингибитором PD-0184264 не вызывает токсичность клеток. Клетки A549 обрабатывали в течение 24 (как показано на фиг. 15 А и С) или 48 (как показано на фиг. 15 В и D) ч с повышением концентрации PD-0184264 (1, 5, 10, 20, 50 или 100 мкМ). По истечении времени инкубации супернатанты отбирали для количественного определения высвобождения LDH (как показано на фиг. 15 С, D) с помощью набора для анализа цитотоксичности CytoSelect LDH Cytotoxicity Assay Kit в соответствии с инструкциями производителя. Кроме того, жизнеспособные клетки подсчитывали путем окрашивания трипановым синим. Жизнеспособность клеток была нормализована до состояния клеток, обработанных ДМСО, и показана в % жизнеспособности. Данные представляют собой средние значения \pm SD трех независимых экспериментов. Статистическую значимость определяли методом однофакторного дисперсионного анализа ANOVA с последующим тестом с помощью критерия Даннета для множественных сравнений (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; 27 *** $p < 0.001$).

Пример 9. Определение значений IC_{50} для CI-1040 и PD-0184264.

Аликвоты ингибиторов растворили в 100% ДМСО (Маточный раствор 10 мМ). Для анализа значений IC_{50} (концентрация полумаксимального ингибирования) на планшете для микротитрования были приготовлены следующие серийно разбавленные растворы:

50 мкМ, 25 мкМ, 5 мкМ, 2,5 мкМ, 0,5 мкМ, 0,25 мкМ, 0,05 мкМ, 0,025 мкМ, 0,005 мкМ. 1 мкл каждого раствора добавляли к 49 мкл реакционной смеси киназы с получением следующих тестовых концентраций:

1 мкМ, 500 нМ, 100 нМ, 50 нМ, 10 нМ, 5 нМ, 1 нМ, 0,5 нМ, 0,1 нМ.

3 мкл активного c-Raf1, 2 мкл MEK1wt и 3 мкл ERK2wt очищенных растворов белков смешивали с киназным буфером и 1 мкл ДМСО или ДМСО/ингибитор (конечный объем 45 мкл). Полученную смесь инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре в темноте. После этой предварительной инкубации, обеспечивающей связывание ингибитора с белком MEK, киназную реакцию запускали добавлением 5 мкл 10 мМ АТФ и перемешиванием пипеткой. Образцы инкубировали в течение 30 мин при 26°C в термосмесителе (Errendorf) при 500 об/мин. Для остановки реакции киназы добавляли 5,5 мкл 20% раствора SDS (додецилсульфат натрия), и полученную смесь затем инкубировали в течение 10 мин при 50°C. Затем каждый образец разбавили 190 мкл блокирующего буфера (1% БСА (бычий сывороточный альбумин) в TBST (трис-буферный солевой раствор с Tween®)). 100 мкл каждого образца добавляли в лунки 96-луночного планшета для микротитрования, покрытые антителами к ERK (внеклеточно регулируемой киназе).

Образцы киназной реакции (100 мкл на лунку) инкубировали в течение 60 мин при комнатной температуре в лунках 96-луночного планшета для микротитрования, покрытых антителами к ERK и блокированных БСА. Затем чашки последовательно промывали 3×5 мин 100 мкл промывочного буфера TBST. Для обнаружения фосфорилированной ERK добавляли антитело к фосфо-ERK (p44/p42) (1:3000, 100 мкл на лунку в блокирующем буфере) и инкубировали в течение ночи при 4°C.

После трех стадий промывки (3×100 мкл на лунку) добавили конъюгированное с HRP антитело к мышинному IgG (1:1000 в TBST) и инкубировали в течение 60 мин при комнатной температуре. После трех дополнительных стадий промывки (3×100 мкл на лунку TBST) добавили 100 мкл на лунку субстрата пероксидазы АВТS и инкубировали в течение 30 мин при 30°C. Реакцию субстрата останавливали добавлением 2,5 мкл 20% SDS. Оптическую плотность (OD) смеси измеряют при длине волны 405 нм в ELISA-ридере. Внеклеточный анализ киназы выявил, что для ингибирования 50% активности MEK CI-1040 требуется в 12,5 раз меньше, чем PD-0184264 (фиг. 16), который фактически является более слабым ингибитором киназы MEK. Таким образом, никто не предполагал, что PD-0184264 обладает сильным противовирусным и антибактериальным действием. Однако, как показано в приведенных выше примерах, PD-0184264 проявляет более сильную противовирусную и антибактериальную активность по сравнению с CI-1040 *in vivo*.

Пример 10. Противовирусная активность PD-0184264 в анализе *in vitro*.

Лекарственные средства.

CI-1040 [2-(2-хлор-4-йодфениламино)-N-(циклопропилметокси)-3,4-дифторбензамид; Лот: СС-5395.0-16] и PD-0184264 (PD0184264) [2-(2-хлор-4-йодфениламино)-N-3,4-дифторбензойная кислота; Лот: СС-5595.4-10] были синтезированы в ChemCon GmbH (Фрайбург, Германия). Для экспериментов по выращиванию клеток приготовили 10 мМ исходный раствор CI-1040 ($M=478,66$ г/моль) и PD-0184264 ($M=409,55$ г/моль) в ДМСО (Merck-Millipore; Германия).

Вирус и клетки.

Эксперименты по ингибированию вируса проводили со штаммом вируса гриппа А RB1 [A/Regensburg/D6/09 (H1N1pdm09)] с MOI=0,001.

Анализ ингибирования потомства вируса.

Клетки A549 инфицировали RB 1 в течение 30 мин при 37°C в атмосфере с 5% CO₂. После инкубации раствор вируса аспирировали, а клетки промывали ФСБ и добавляли к ним 500 мкл Среды IMDM (среда Дульбекко в модификации Искова)/ВА (бычий альбумин) - (0,2% ВА, 1 мМ MgCl₂, 0,9 мМ CaCl₂, 100 ед/мл пенициллина, 0,1 мг/мл стрептомицина) и 0,6 мкл трипсина, обработанного ТРСК в присутствии 10 мМ CI-1040 или различных концентраций PD-0184264 (100 мкМ, 50 мкМ, 10 мкМ, 5 мкМ, 1 мкМ, 0,5 мкМ и 0,1 мкМ, конечная концентрация ДМСО составляла 1%) в течение 24 ч при 37°C в 5% CO₂. В качестве растворителя контроля использовали среду IMDM/ВА с 1% ДМСО. Супернатанты клеточных культур собирали для определения титров потомства вируса на клетках MDCK (Мадин-Дарби почек собак) II методом анализа бляшек AVICEL® plaque assay, как описано выше (Haasbach et al. 2011, Matrosovich et al. 2006).

WST-анализ.

Клетки A549 высевали в 96-луночный планшет с плоским дном (Грайнер, Германия) и выращивали в течение ночи. После этого клетки обрабатывали различными концентрациями PD-0184264 (100 мкМ, 50 мкМ, 10 мкМ, 5 мкМ, 1 мкМ, 0,5 мкМ и 0,1 мкМ), растворенного в 100 мкл IMDM (ThermoFisher, Германия) с добавлением 5% фетальной телячьей сыворотки (Sigma-Aldrich; Германия), конечная концентрация ДМСО в сыворотке составляла 1%, и культивирование проводили при 37°C и 5% CO₂ в течение 24 ч. После этого в культуральную среду добавили 10 мкл реагента WST-1 (Roche, Германия) и инкубировали в течение четырех ч. В течение этого времени стабильная тетразолиевая соль WST-1 расщеплялась до растворимого формазана метаболически активными клетками в культуре. После данного периода инкубации образовавшийся краситель формазан количественно определяли с помощью ELISA-ридера при 405 нм. Измеренная оптическая плотность прямо коррелирует с количеством жизнеспособных клеток.

Результаты.

Противовирусную активность PD-0184264 против RB1 исследовали в ходе стандартного анализа ингибирования вируса (фиг. 17А). Было зафиксировано снижение титра вируса на $98,87 \pm 0,03\%$ при обработке клеток 100 мкМ PD-0184264 ($P>0,0001$). Аналогичное снижение было зафиксировано при обработке 50 мкМ PD-0184264 ($91,50 \pm 2,08\%$; $P>0,0001$). При использовании 10 мкМ PD-0184264 ($58,97 \pm 4,45\%$), напротив, зафиксировали только слабое снижение титра вируса. 1 мкМ PD-0184264 практически не вызвали какое-либо сокращение численности потомства вируса. Таким образом, по сравнению с сокращением количества вируса с помощью 10 мкМ CI-1040 ($96,78 \pm 0,65\%$; $P>0,0001$), для достижения аналогичного сокращения численности потомства вируса гриппа необходима почти в 10 раз более высокая концентрация PD-0184264. Это также соответствует значению EC₅₀ (полумаксимальной эффективной концентрации) у PD-0184264 по сравнению с CI-1040. У PD-0184264 значение EC₅₀ составляет 0,804 мкМ (фиг. 17В). В другом исследовании значение EC₅₀ у CI-1040 при применении против RB1 составило 0,026 мкМ (Haasbach et al. 2017). Значение CC₅₀ (полумаксимальной цитотоксической концентрации) у PD-0184264 составляет более 1576 (фиг. 17С), что выше, чем у CI-1040 ($>312,3$ мкМ; Haasbach et al.2017). Таким образом, PD-0184264 имеет S.I. (индекс селективности) равный 1960.

Итог/Обсуждение.

Результаты демонстрируют пониженную противовирусную активность PD-0184264 в клеточной культуре, т.е. *in vitro*, по сравнению с CI-1040. Необходима почти в 10 раз более высокая концентрация PD-0184264 для достижения такого же сокращения численности вируса, как у CI-1040 в анализе *in vitro*. Разница значений EC₅₀ между этими двумя соединениями еще более выражена. Значение EC₅₀ у PD-0184264 в 31 раз выше, чем значение EC₅₀ у CI-1040 (Haasbach et al. 2017). S.I. PD-0184264 при применении против RB1 на клетках A549 также снижается по сравнению с ростом у CI-1040.

Пример 11. Снижение титра вируса в легком мышей с помощью PD-0184264 *in vivo*.

(А) После заражения H1N1pdm09 самкам мышей линии C57BL/6 перорально вводили либо 2,8, 8,4 или 25 мг/кг PD-0184264 (левая сторона), либо 25, 75 или 150 мг/кг CI-1400 (левая сторона). Через 24 ч после заражения животных умерщвляли и брали легкое для приготовления 10% суспензии. Титр вируса определяли стандартным способом. Титр вируса мышей, обработанных двумя ингибиторами МЕК, сравнивали с титром вируса мышей, обработанных только растворителем (контроль). Титр вируса в легких мышей контроля был принят за 100% (черная полоса). Для построения графика обоих рисунков исполь-

зовали программное обеспечение Graphpad Prism 7.

Лекарственные средства.

CI-1040 [2-(2-хлор-4-йодфениламино)-N-(циклопропилметокси)-3,4-дифторбензамид; Лот: СС-5395.0-16] и PD-0184264 (PD0184264) [2-(2-хлор-4-йодфениламино)-N-3,4-дифторбензойная кислота; Лот: СС-5595.4-10] были синтезированы в ChemCon GmbH (Фрайбург, Германия). Для перорального применения 25 мг/кг 2,5 мг PD-0184264 растворили в 50 мкл ДМСО (Sigma-Aldrich, Германия) и дополнительно разбавили 0,15 мл Кремофора ЭЛ (Cremophor EL) (Merck-Millipore, Германия) и 0,8 мл ФСБ (Gibco, Германия). Для применения 8,4 мг/кг и 2,8 мг/кг, 0,84 мг или 0,28 мг PD-0184264 растворили в 50 мкл ДМСО (Sigma-Aldrich, Германия) и дополнительно разбавили 0,15 мл Кремофор ЭЛ/0,8 мл ФСБ. 202,5 мг CI-1040 растворили в 0,5 мл ДМСО/0,15 мл Кремофор ЭЛ/0,8 мл ФСБ и дополнительно разбавили Кремофором ЭЛ и ФСБ.

Животные.

Для антивирусных исследований использовали самок мышей линии C57Bl/6 в возрасте восьми недель (Charles River Laboratories, Германия) с массой тела 21,0-24,0 г при введении. Животные получали обычное питание. Питьевая вода была доступна в неограниченном количестве.

Применение лекарственных средств.

Лекарственные средства вводили однократной дозой в 1 день исследований через желудочный зонд. Скорость применения составляла 15 секунд на дозу при объеме введения 200 мкл.

Анализ титрования вируса легкого.

Через 24 ч после заражения мышей умертвили, легкие взвесили, перенесли в пробирку Lysing Matrix D (MP Bio) и нанесли ССР (сбалансированный солевой раствор) в количестве, равном 10-кратному объему легкого. Органы измельчали с помощью FastPrep FP 120 (Savant). Для удаления клеточного дебриса гомогенаты центрифугировали в течение 15 мин при 2000 об/мин и собирали супернатант. Определение титра вируса в гомогенатах производили методом анализа бляшек AVICEL® plaque assay, как описано выше (Haasbach et al. 2011, Mastrosovich et al. 2006).

Итог/Обсуждение.

Результаты экспериментов показаны на фиг. 18. По сравнению с контрольным экспериментом, только при концентрации CI-1040 75 мг/кг или выше был зафиксирован какой-либо эффект в снижении титра вируса. Напротив, PD-0184264 продемонстрировал снижение титра вируса в легких уже при концентрации от 2,8 мг/кг до приблизительно 70%. При концентрации 8,4 мг/кг титр вируса снижается до приблизительно 20%, тогда как при 25 мг/кг титр вируса снижается до приблизительно 10%. Таким образом, для достижения эффекта как при 150 мг/кг CI-1040, требуется в 6 раз более низкая концентрация PD-0184264, что подчеркивает высокий потенциал PD-0184264 для противовирусного действия.

Пример 12. PD-0184264 имеет более высокую биодоступность по сравнению с CI-1040.

(А) Самцам мышей линии NMRI внутривенно вводили 75 мг/кг CI-1040 (темно-серая область) или 75 мг/кг PD-0184264. Кровь собирали через 15 мин, 30 мин, 1 ч, 2 ч, 4 ч, 6 ч, 8 ч и 24 ч (2 день исследований) после введения, и анализировали плазму на присутствие лекарственного средства. (В) Самцам мышей линии NMRI вводили 150 мг/кг CI-1040 (темно-серая область) или 150 мг/кг PD-0184264 перорально через желудочный зонд. Кровь собирали через 15 мин, 30 мин, 1 ч, 2 ч, 4 ч, 6 ч, 8 ч и 24 ч (2 день исследований) после введения, и анализировали плазму на присутствие лекарственного средства. Каждая единица данных представляет собой среднее значение трех образцов плазмы. Для построения графика обоих рисунков использовали программное обеспечение Graphpad Prism 7.

Лекарственные средства.

CI-1040 [2-(2-хлор-4-йодфениламино)-N-(циклопропилметокси)-3,4-дифторбензамид; Лот: СС-5395.0-15] и PD-0184264 (PD0184264) [2-(2-хлор-4-йодфениламино)-N-3,4-дифторбензойная кислота; Лот: СС-5595.4-10] были синтезированы в ChemCon GmbH (Фрайбург, Германия). Для внутривенного введения 30,65 мг CI-1040 растворили в 0,075 мл ДМСО (Sigma-Aldrich, Швейцария) и дополнительно разбавили 0,225 мл Кремофора ЭЛ (Merck-Millipore, Германия) и 2,7 мл ФСБ (Gibco, Германия). 34,88 мг PD-0184264 растворили в 0,075 мл ДМСО и дополнительно разбавили 0,225 мл Кремофор ЭЛ/2,7 мл ФСБ. Для перорального применения 202,5 мг CI-1040 растворили в 0,5 мл ДМСО/1,5 мл Кремофор ЭЛ/8,0 мл ФСБ. 81,0 мг PD-0184264 растворили в 0,2 мл ДМСО/0,6 мл Кремофор ЭЛ/3,2 мл ФСБ.

Животные.

Для фармакокинетических исследований использовали самцов мышей линии NMRI в возрасте восьми недель (Charles River Laboratories, Германия) с массой тела 23,9-36,5 г при введении. Животные получали обычное питание. Питьевая вода была доступна в неограниченном количестве.

Забор крови и подготовка плазмы.

Эксперименты проводили в LPT GmbH (Гамбург, Германия). Было собрано достаточное количество цельной крови, взятой под анестезией изофлураном, для получения по меньшей мере 2×100 мкл плазмы с Li-гепарином 3 животных на каждую группу, и в следующие моменты времени: 0 (до введения), 15 мин, 30 мин, 1 ч, 2 ч, 4 ч, 6 ч, 8 ч и 24 ч (2 день исследований) после введения. Образцы цельной крови немедленно охлаждали с помощью системы Iso-Therm-Rack (Eppendorf AG, Германия) вплоть до центрифуги-

рования в течение 0,5 ч после извлечения. Сразу же после центрифугирования образцы хранили при -20°C до следующего анализа. Анализ плазмы производили, используя стандартные процедуры, в Prolytic GmbH (Франкфурт, Германия).

Применение лекарственных средств.

Лекарственные средства вводили однократной дозой в 1 день исследований через желудочный зонд или внутривенной болюсной инъекцией в хвостовую вену. Скорость введения составляла 15 секунд на дозу при объеме введения 200 мкл.

Результаты.

Фармакокинетические эксперименты показали, что более сильное воздействие PD-0184264 по сравнению с CI-1040 было зафиксировано в плазме мышей после внутривенного введения (фиг. 19А) и перорального применения (фиг. 19В) со значениями АУЦ (аналитического ультрацентрифугирования) 1953,68 мкг·ч/мл PD-0184264, которые намного выше, чем значения для CI-1040. Следует отметить, что через восемь ч после внутривенного введения и после перорального применения CI-1040 в плазме практически не было обнаружено лекарственных средств. Напротив, после перорального применения PD-0184264 2 на временной отметке 8 ч все еще фиксировалась высокая концентрация.

Вывод/Обсуждение.

Резкое различие в содержании веществ в плазме у PD-0184264 и CI-1040 после однократного внутривенного применения уже дает основания предполагать, что CI-1040 может быстро распадаться. Авторы изобретения предположили, что уменьшение количества лекарственного средства происходит моноэкспоненциально. В общем и целом данное предположение верно. При низких концентрациях количество лекарственного средства обычно уменьшается моноэкспоненциально. Также и конечная константа скорости выведения из организма не меняется с течением времени или при разных концентрациях циркулирующего лекарственного средства. Тем не менее, на данный момент неизвестно, играют ли другие процессы, такие как энтерогепатическая циркуляция, какую-либо значимую роль в конечной фазе фармакокинетического профиля. В общем итоге PD-0184264 демонстрирует более высокую противовирусную активность, чем CI-1040 *in vivo*, что может быть обусловлено более высокой биодоступностью данного лекарственного средства.

Пример 13. PD-0184264 имеет увеличенное терапевтическое окно Применение лекарственных средств и препаратов.

Для перорального применения 25 мг/кг 10 мг PD-0184264 растворили в 50 мкл ДМСО (Sigma-Aldrich, Германия) и дополнительно разбавили 0,15 мл Кремофора ЭЛ (Merck-Millipore, Германия) и 0,8 мл ФСБ (Gibco, Германия). Для применения растворителя 50 мкл ДМСО (Sigma-Aldrich, Германия) разбавили 0,15 мл Кремофора ЭЛ (Merck-Millipore, Германия) и 0,8 мл ФСБ (Gibco, Германия). Лекарственные средства вводили через желудочный зонд два раза в сутки с интервалом в восемь ч. Лечение начинали через 24, 48 или 72 ч после заражения. Скорость применения составляла 15 секунд на дозу при объеме введения 50 мкл.

Животные.

Для исследований выживаемости использовали самок мышей линии C57Bl/6 в возрасте восьми недель (Charles River Laboratories, Германия) с массой тела 17,0-21,0 г при введении.

Животные получали обычное питание. Питьевая вода была доступна в неограниченном количестве. Вирусная инфекция.

Для заражения животных анестезировали путем внутрибрюшинной инъекции 200 мкл кетамин/ромпуна. Равные количества 2% исходного раствора ромпуна (Bayer) и 10% кетамин (Sanofi) смешивали в соотношении 1:10 с ФСБ. Мышей интраназально инфицировали 3×10^5 БОЕ штамма A/Regensburg/D6/2009 гриппа H1N1pdm09 ($5 \times \text{MLD}_{50}$). Соответствующие дозы вируса разбавляли в 50 мкл ССР и 25 мкл инокулировали в каждую ноздрю. Все исследования на животных были одобрены Институциональным комитетом по уходу и использованию животных в Тюбингене.

Клиническое наблюдение.

Согласно правилам контролирующих органов животных наблюдали и взвешивали ежедневно. До появления клинических симптомов мышей наблюдали два раза в сутки и три раза в сутки после появления заболевания. При обнаружении снижения массы тела на 20% мышей умерщвляли. Ни одно из животных не умерло в клетке, все были умерщвлены обработкой CO₂ с последующим вывихом шеи.

Результаты.

Самки мышей линии C57Bl/6 были заражены H1N1pdm09. Введение 25 мг/кг PD-0184264 началось через 24, 48 или 72 ч после заражения. Мыши, которые служили в качестве контролей, получали только растворитель. Этим животным пришлось умертвить между четвертым и восьмым днями после заражения, так как они показали снижение массы тела $\geq 20\%$. При начале лечения через 24 ч после заражения, двух из восьми животных пришлось умертвить на десятый день, в то время как шесть из восьми мышей были защищены. Различий в снижении массы тела не было, тем не менее, на десятый день после заражения мыши снова набирали массу тела до конца периода наблюдения. Разница между мышами, получавшими растворитель, и мышами, получавшими PD-0184264, в плане выживаемости была статистически значи-

мой (логарифмический ранговый критерий Мантеля-Кокса $P=0,0001$). При начале лечения через 48 ч после заражения, трех из восьми животных пришлось умертвить между восьмым и десятым днями, а пять из восьми мышей были защищены. Снова не было никакой разницы в снижении массы тела. На 9-й день после заражения мыши вновь набирали вес до конца периода наблюдения. Разница в выживаемости снова была значительной (логарифмический ранговый критерий Мантеля-Кокса $P=0,0004$). Разница в выживаемости также была значительной (логарифмический ранговый критерий Мантеля-Кокса $P=0,0002$) даже при начале лечения уже через 72 ч после заражения. В данном случае шесть из восьми животных пришлось умертвить между седьмым и десятым днями, в то время как две из восьми мышей были защищены. Начиная с девятого дня после заражения, масса тела мышей увеличивалась.

Итог/Обсуждение.

Лечение мышей, инфицированных H1N1pdm09, 25 мг/кг PD-0184264 приводит к значительной разнице в выживаемости, даже несмотря на то, что лекарственное средство вводили уже через 72 ч после заражения.

Пример 14: Клинические исследования PD-0184264 I фазы на здоровых людях.

Было проведено рандомизированное двойное слепое плацебо-контролируемое исследование повышения дозы, которое продемонстрировало безопасность и переносимость PD-0184264 на 70 здоровых добровольцах. Оно проводилось в соответствии с адаптивным дизайном с начальной дозой 100 мг и до трех этапов повышения дозы в семи группах испытуемых в соответствии с режимом однократной возрастающей дозы / многократной возрастающей дозы (SAD/MAD). Схема введения включала одну дозу PD-0184264, увеличивающуюся со 100 мг до 900 мг (SAD) с последующими семью дозами PD-0184264, увеличивающимися со 100 мг до 600 мг один раз в сутки в течение семи дней (MAD). Когорта каждой дозы была признана безопасной Комитетом по надзору за безопасностью (SRC) с разрешением переходить к следующей более высокой дозе (до 900 мг SAD и 600 мг MAD соответственно). Наблюдаемый фармакокинетический профиль подтверждает правильность назначенного режима "один раз в сутки" для дальнейшей клинической разработки.

Всего в ходе исследования было зарегистрировано лишь несколько нежелательных явлений, а серьезных нежелательных явлений не наблюдалось. Таким образом, PD-0184264 признан безопасным и хорошо переносимым. Фармакокинетика воздействия и определение ингибирования МЕК были проверены и подтверждают поддержание клинически значимых уровней в крови.

Источники.

Bright, R.A., Shay, D.K., Shu, B., Cox, N.J. and Klimov, A.I. (2006). Adamantane resistance among influenza A viruses isolated early during the 2005-2006 influenza season in the United States. *JAMA: The Journal of the American Medical Association* 295, 891-894

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

De Clercq, E. and Neyts, J. (2007). Avian influenza A (H5N1) infection: targets and strategies for chemotherapeutic intervention. *Trends in pharmacological sciences* 28, 280-285.

Gillet, Y., Vanhems, P., Lina, G., Bes, M., Vandenesch, F., Floret, D. and Etienne, J. (2007). Factors predicting mortality in necrotizing community acquired 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.
- 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. et al (2017). The MEK-inhibitor CI-1040 displays a broad anti-influenza virus activity in vitro and provides a prolonged treatment window compared to standard of care in vivo. *Antiviral research* 142, 178-184.
- 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.
- Hrincius, E. 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
- 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.
- LoRusso, P., Adjei, A., Varterasian, M., Gadgeel, S., Reid, J., Mitchell, D., et al. (2005). Phase I and Pharmacodynamic Study of the Oral MEK Inhibitor CI-1040 in Patients With Advanced Malignancies. *Journal of Clinical Oncology* 23(23), 5281-5293.
- Ludwig, S. (2009). Targeting cell signaling pathways to fight the flu: towards a paradigm change in anti-influenza therapy. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 64, 1-4.
- Mackey, T.K., Liang, B.A., 2012. Lessons from SARS and H1N1/A: employing a WHO-WTO forum to promote optimal economic-public health pandemic response. *J Public Health Policy* 33, 119-130.
- Matrosovich M, Matrosovich T, Garten W, Klenk HD (2006). New low-viscosity overlay medium for viral plaque assays. *Virology* 3:63.
- Miller, M., Donat, S., Raketts, S., Stehle, T., Kouwen, T.R., Diks, S.H., Dreisbach, A., Reilman, E., Gronau, K., Becher, D., Peppelenbosch, M.P., van Dijk, J.M., Ohlsen, K. (2010). Staphylococcal PknB as the first prokaryotic representative of the proline-directed kinases. *PLoS One*, 5, e9057
- Monto, A.S., Black, S., Plotkin, S.A., Orenstein, W.A., 2011. Response to the 2009 pandemic: effect on influenza control in wealthy and poor countries. *Vaccine* 29, 6427-6431.
- 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.
- Moss, R.B., Davey, R.T., Steigbigel, R.T., Fang, F., 2010. Targeting pandemic influenza: a primer on influenza antivirals and drug resistance. *J Antimicrob Chemother* 65, 1086-1093.
- Neumann, G., Noda, T. and Kawaoka, Y. (2009). Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus. *Nature* 459, 931-939.
- 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.
- 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.
- Pleschka, S., Wolff, T., Ehrhardt, C., Hobom, G., Planz, O., Rapp, U.R., Ludwig, S., 2001. Influenza virus propagation is impaired by inhibition of the Raf/MEK/ERK signalling cascade. *Nat Cell Biol* 3, 301-305.
- Rakette, S., Donat, S., Ohlsen, K and Stehle, T (2012). Structural analysis of *Staphylococcus aureus* serine/threonine kinase PknB. *PLoS One* 7(6), e39136.
- Robertson, J.S., Inglis, S.C., 2011. Prospects for controlling future pandemics of influenza. *Virus Res* 162, 39-46.
- Shilo, N. and Quach, C. (2011). Pulmonary infections and community associated methicillin resistant *Staphylococcus aureus*: a dangerous mix? *Paediatric respiratory reviews* 12, 182-189.
- Tamber, S., Schwartzman, J. and Cheung, A.L. (2010). Role of PknB kinase in antibiotic resistance and virulence in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain USA300. *Infection and Immunity* 78, 3637-3646.
- Taubenberger, J.K. and Kash, J.C. (2010). Influenza virus evolution, host adaptation, and pandemic formation. *Cell host & microbe* 7, 440-451.
- Wabnitz, A., Mitchell, D, and Wabnitz, D. (2004). In Vitro and in Vivo Metabolism of the Anti-Cancer Agent CI-1040, a MEK Inhibitor, in Rat, Monkey, and Human. *Pharmaceutical Research* 21(9), 1670-1679.
- Tuchscher, L. et al. (2011). *Staphylococcus aureus* phenotype switching: an effective bacterial strategy to escape host immune response and establish a chronic infection. *EMBO molecular medicine* 3, 129-141

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение PD-0184264 или его фармацевтически приемлемой соли в способе лечения вирусного заболевания у субъекта, при этом указанный субъект проявлял симптомы вирусной инфекции в течение по меньшей мере 36 ч, по меньшей мере 48 ч или по меньшей мере 72 ч на момент начала лечения.

2. Применение PD-0184264 или его фармацевтически приемлемой соли по п.1, дополнительно для применения в профилактике или лечении бактериальной коинфекции.

3. Применение PD-0184264 или его фармацевтически приемлемой соли по п.1 или 2, где указанная вирусная инфекция представляет собой инфекцию дыхательных путей, вызванную РНК-вирусом с отрицательной или положительной цепью, причем предпочтительно указанный РНК-вирус с отрицательной цепью представляет собой вирус гриппа, причем предпочтительно указанный вирус представляет собой вирус гриппа А или вирус гриппа В, причем предпочтительно указанный вирус гриппа А выбран из группы, состоящей из H1N1, H2N2, H3N2, H5N6, H5N8, H6N1, H7N2, H7N7, H7N9, H9N2, H10N7, N10N8 или H5N1, причем предпочтительно вирус гриппа В выбран из группы, состоящей из линий Ямагата или Виктория типа ВГВ.

4. Применение PD-0184264 или его фармацевтически приемлемой соли по любому из пп.1-3, причем указанная вирусная инфекция вызвана РНК-вирусом с положительной цепью, причем предпочтительно указанный вирус представляет собой коронавируса, причем предпочтительно указанный вирус представляет собой SARS-CoV, SARS-CoV2 или MERS.

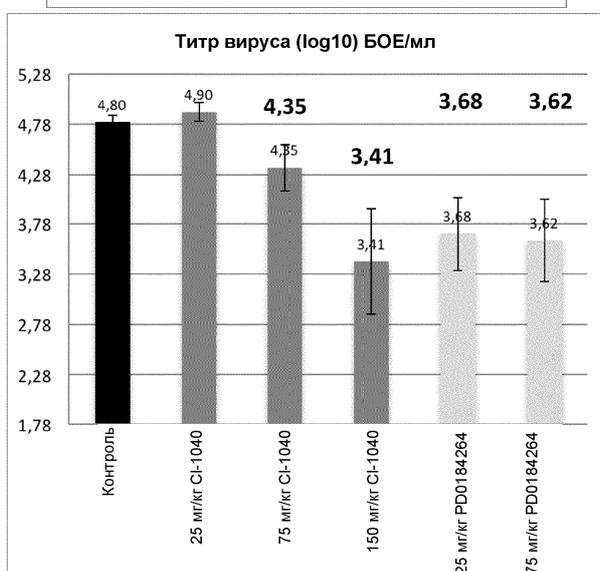
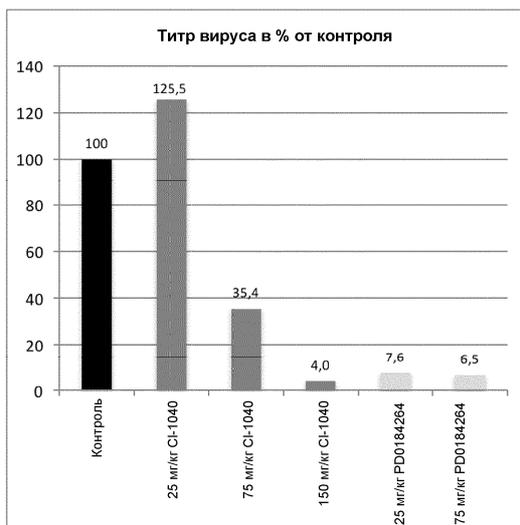
5. Применение PD-0184264 или его фармацевтически приемлемой соли по любому из пп.1-4, где указанный вирус устойчив к стандартному противовирусному лечению, причем предпочтительно стандартное противовирусное лечение представляет собой введение осельтамивира, занамивира, перамивира, амантадина, римантадина, фавипиравира, балоксавира марбоксила и/или пимодивира, причем предпочтительно указанный вирус представляет собой мутант H275Y вируса А H1N1.

6. Применение PD-0184264 или его фармацевтически приемлемой соли по любому из пп.1-5, где указанный субъект получал лечение стандартным противовирусным средством до введения PD-0184264.

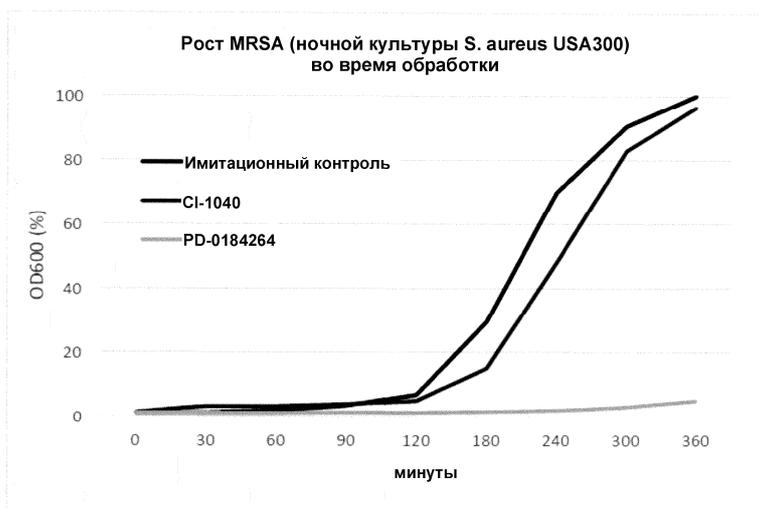
7. Применение PD-0184264 или его фармацевтически приемлемой соли по любому из пп.1-6, где PD-0184264 или его фармацевтически приемлемую соль вводят в комбинации с ингибитором нейраминидазы или его фармацевтически приемлемой солью, причем предпочтительно указанный ингибитор нейраминидазы выбран из осельтамивира, фосфата осельтамивира, занамивира, ланинамивира или перамивира или их фармацевтически приемлемой соли.

8. Применение PD-0184264 или его фармацевтически приемлемой соли по любому из предыдущих пунктов у субъекта, предпочтительно у позвоночного животного, наиболее предпочтительно у человека.

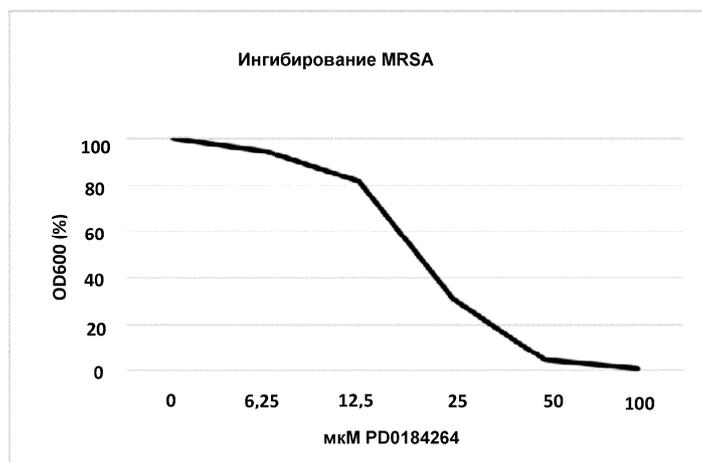
9. Применение PD-0184264 или его фармацевтически приемлемой соли по любому из пп.1-8, где PD-0184264 вводят субъекту-человеку один раз в сутки в дозе от 100 до 900 мг, предпочтительно 600 мг, причем предпочтительно PD-0184264 вводят субъекту-человеку в течение 1-21 дня подряд, предпочтительно 7-14 дней подряд, причем предпочтительно PD-0184264 вводят субъекту-человеку в виде пероральной дозированной лекарственной формы.



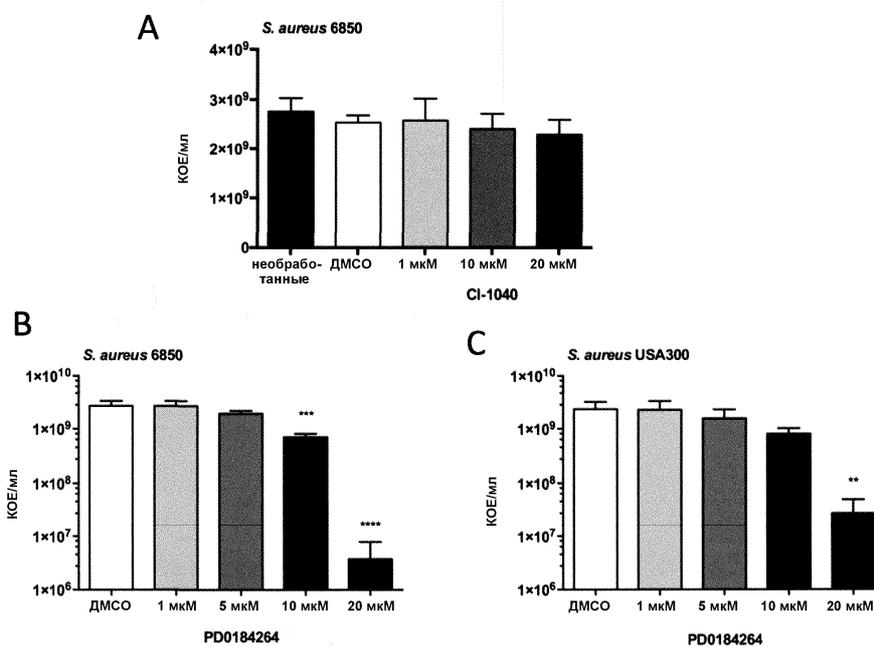
Фиг. 1



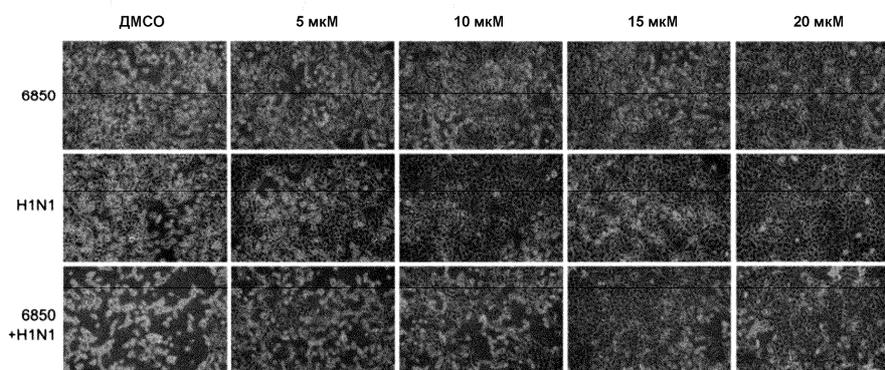
Фиг. 2



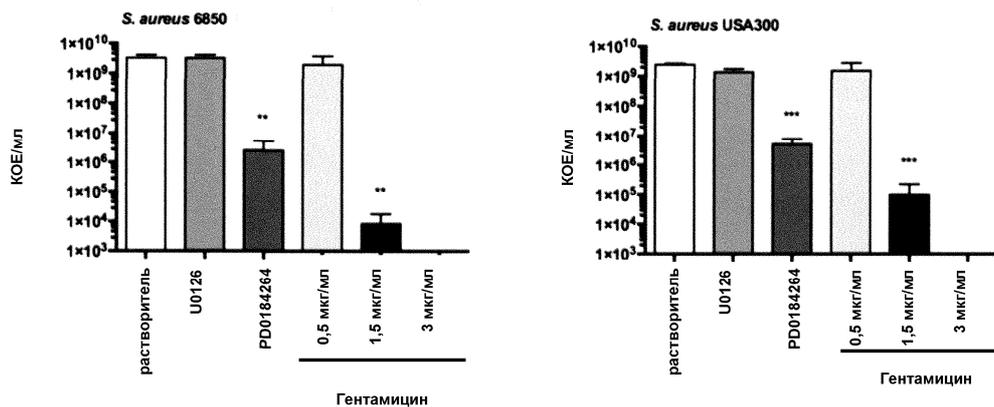
Фиг. 3



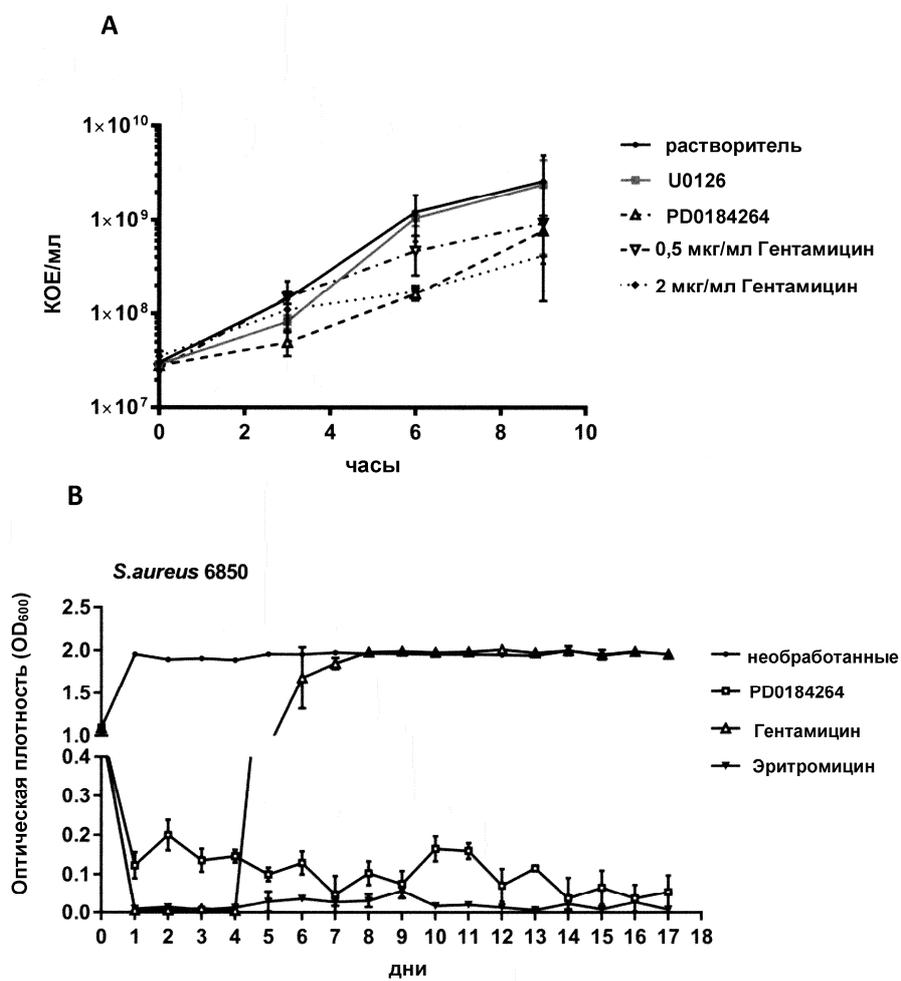
Фиг. 4



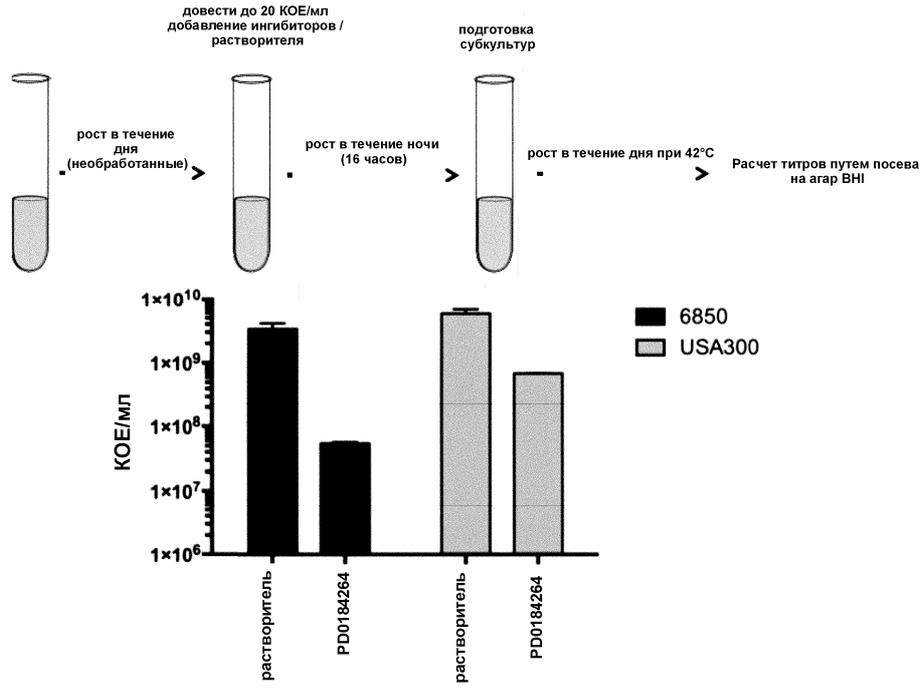
Фиг. 5



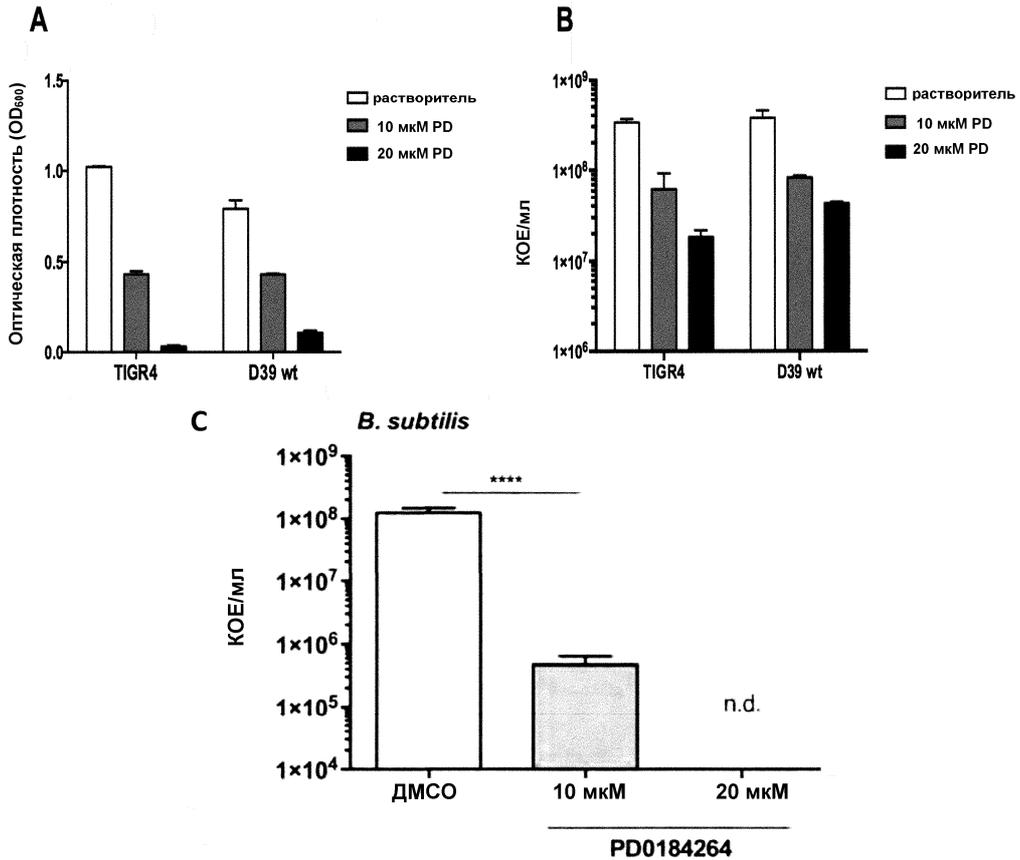
Фиг. 6



Фиг. 7



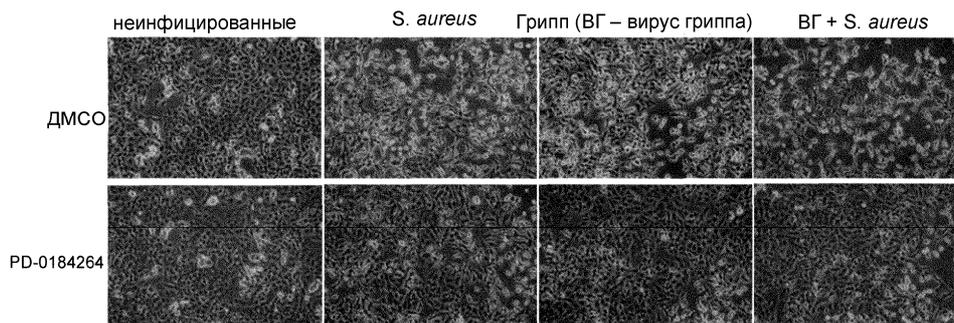
Фиг. 10



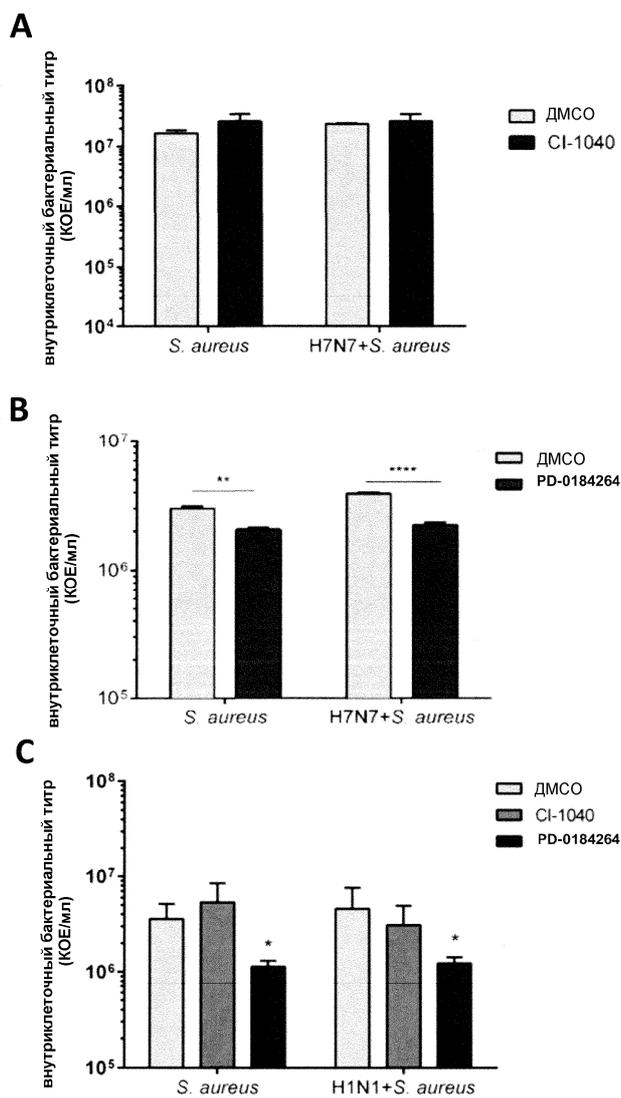
Фиг. 11

Класс антибиотиков	Непатентованное наименование
Аминогликозиды	Амикацин, Гентамицин, Канамицин, Неомицин, Нетилмицин, Тобрамицин, Паромомицин, Спектиномицин
Ансамцины	Гельданамицин, Гербимицин, Рифаксимин, Стрептомицин
Карбацефем	Лоракарбеф
Карбапенемы	Эртапенем, Дорипенем, Смипенем/Циластатин, Меропенем
Цефалоспорины (первое поколение)	Цефадроксил, Цефазолин, Цефалотин, Цефалексин
Цефалоспорины (второе поколение)	Цефаклор, Цефамандол, Цефокситин, Цефпрозил, Цефуроксим
Цефалоспорины (третье поколение)	Цефиксим, Цефдинир, Цефдиторен, Цефопемзон, Цефотаксим, Цефподоксим, Цефтазидим, Цефтибутен, Цефтизоксим, Цефтриаксон
Цефалоспорины (четвертое поколение)	Цефепим
Цефалоспорины (пятое поколение)	Цефтаролин, Фозамил, Цефтобипрол
Гликопептиды	Тейкопланин, Ванкомицин, Телаванцин
Линкозамиды	Клиндамицин, Линкомицин
Липопептид	Даптомицин
Макролиды	Азитромицин, Кларитромицин, Диритромицин, Эритромицин, Рокситромицин, Тролеандомицин, Телитромицин, Спирамицин
Монобактамы	Азтреонам
Нитрофураны	Фуразолидон, Нитрофурантоин
Оксазоидиноны	Линезолид, Позизолид, Радезолид, Торезолид
Пенициллины	Амоксициллин, Ампициллин, Азлоциллин, Карбенициллин, Клоксациллин, Диклоксациллин, Флуциоксацилин, Мезлоциллин, Метициллин, Нафциллин, Оксациллин, Пенициллин G, Пенициллин V, Пиперациллин, Пенициллин G, Темоциллин, Тикарциллин
Комбинации пенициллина	Амоксициллин/циавианат, Ампициллин/сульбактам, Пиперациллин/тазобактам, Тикарциллин/клавуланат
Полипептиды	Бацитрацин, Колистин, Полимиксин В
Хинолоны / Фторхинолон	Ципрофлоксацин, Эноксацин, Гатифлоксацин, Гемифлоксацин, Левофлоксацин, Ломефлоксацин, Моксифлоксацин, Налидиксовая Кислота, Норфлоксацин, Офлоксацин, Тровафлоксацин, Грепафиоксацин, Спарфлоксацин, Темафлоксацин
Сульфаниламиды	Мафенид, Сульфацетамид, Сульфадиазин, Сульфадиазин Серебра, Сульфадиметоксин, Сульфаметизол, Сульфаметоксазол, Сульфанимид (устаревшее), Сульфасалазин, Сульфизоксазол, Триметоприм-Сульфаметоксазол (Ко-тримоксазол) (TMP-SMX), Сульфонамидохризоидин (устаревшее)
Тетрациклины	Демеклоксиклин, Доксикиклин, Миноциклин, Окситетрациклин, Тетрациклин
Лизостафин	представляет собой металлоэндопептидазу <i>Staphylococcus simulans</i> . Он может действовать в качестве противомикробного средства против <i>Staphylococcus aureus</i> .

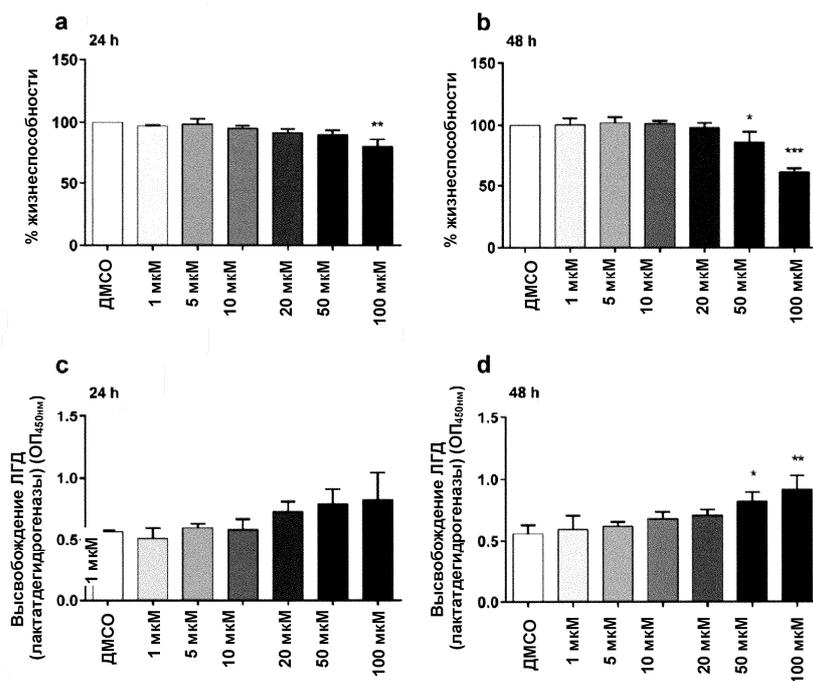
Фиг. 12 (таблица 1)



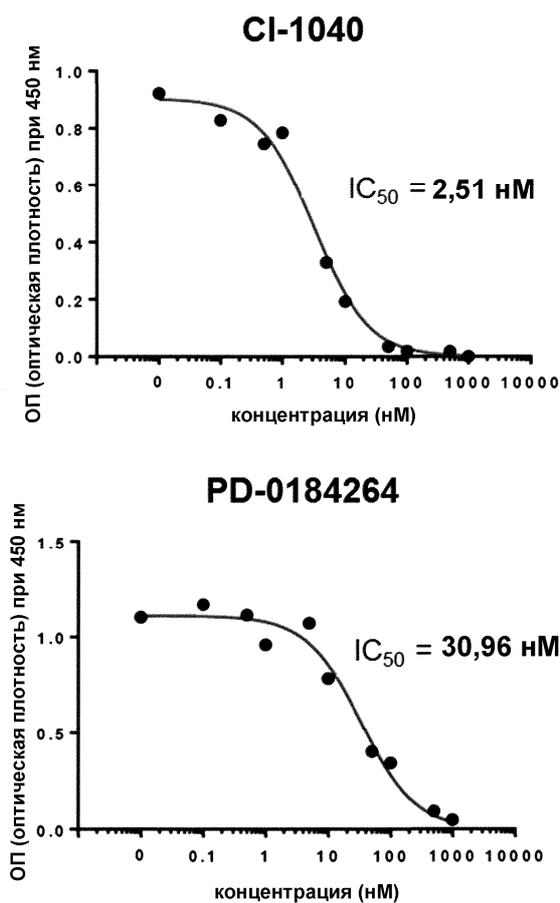
Фиг. 13



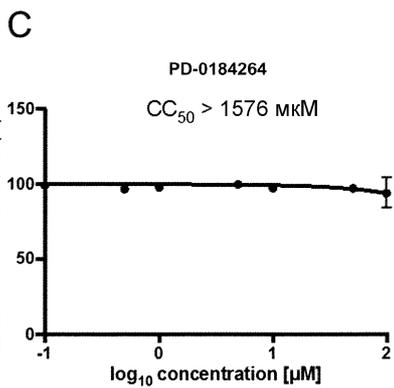
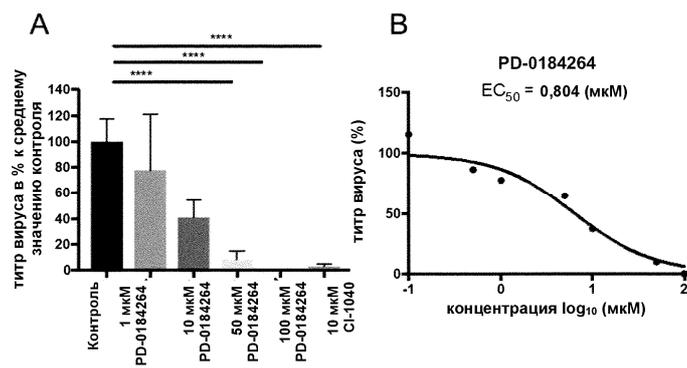
Фиг. 14



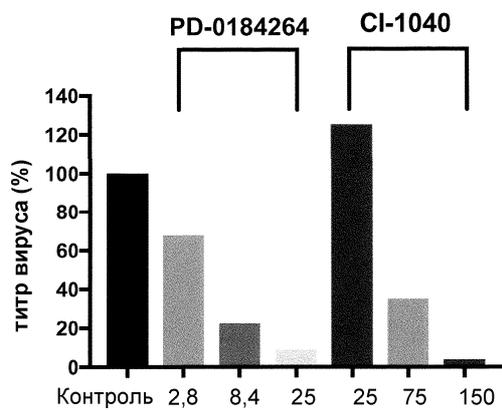
Фиг. 15



Фиг. 16

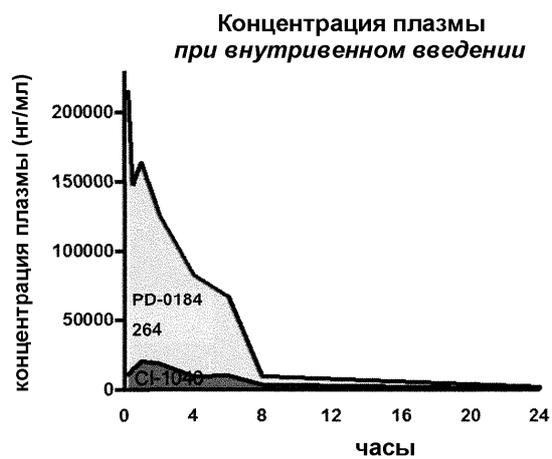


Фиг. 17

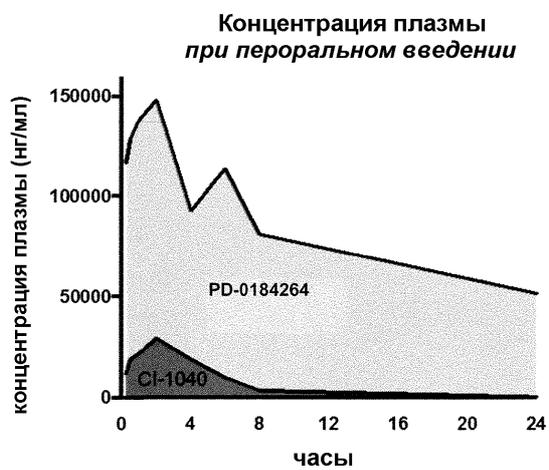


Фиг. 18

А

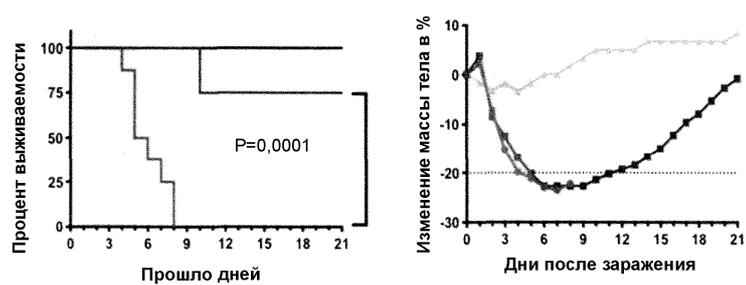


Б

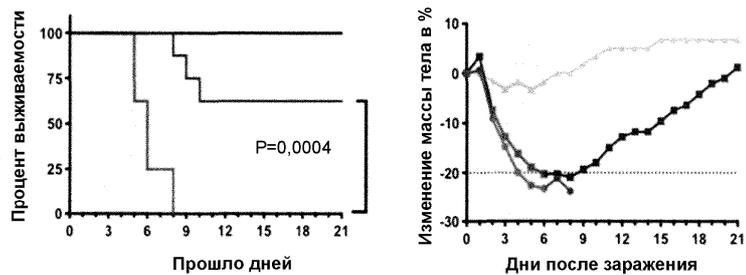


Фиг. 19

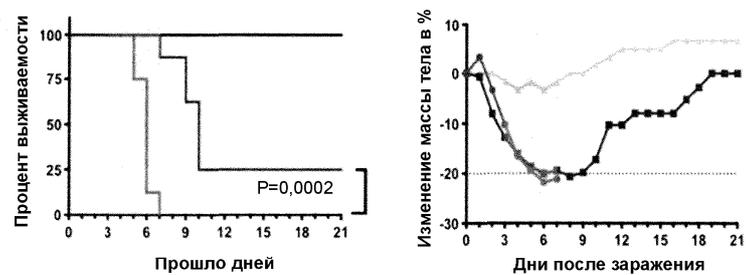
Начало лечения: 24 ч. после заражения



Начало лечения: 48 ч. после заражения



Начало лечения: 72 ч. после заражения



Условные обозначения:

— Растворитель
 - - 25 мг/кг ATR-002
 — Незараженные

Условные обозначения:

— Растворитель
 - - 25 мг/кг ATR-002
 — Незараженные

Фиг. 20

