

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **047956**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.10.02

(51) Int. Cl. **A61K 31/4965** (2006.01)
A61P 31/14 (2006.01)

(21) Номер заявки
202092168

(22) Дата подачи заявки
2020.10.13

(54) ПРИМЕНЕНИЕ ФАВИПИРАВИРА В ЛЕЧЕНИИ КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ

(31) 202010070142.0

(32) 2020.01.21

(33) CN

(43) 2021.07.30

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ЭКЭДЕМИ ОФ МИЛИТАРИ
МЕДИКАЛ САЙЕНСИЗ (CN)**

(72) Изобретатель:
**Чжун У, Цао Жуйюань, Цао Чэн, Гао
Тинг, Сяо Гэнфу, Ху Чжихун, Ван
Маньли, Чжан Лэйкэ, Ли Сун (CN)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

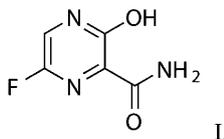
(56) RU-C2-2527766

CN-A-107737128

FURUTA Y, et al. Favipiravir (T-705), a broad spectrum inhibitor of viral RNA polymerase. PROCEEDINGS OF THE JAPAN ACADEMY. SERIES B, PHYSICAL AND BIOLOGICAL SCIENCES, 2017, Vol 93, No 7, p. 449-463. <doi: 10.2183/pjab.93.027.>

WU Y.-S., et al. Antiviral drug discovery against SARS-CoV. CURRENT MEDICINAL CHEMISTRY, 2006, Vol 13, No 17, p. 2003-2020 <doi: 10.2174/092986706777584988> Реферат, разделы 3; 3.2.2

(57) Изобретение относится к соединению фавипиравира, представленному формулой I, его геометрическому изомеру, фармацевтически приемлемой соли, сольвату и/или гидрату и фармацевтической композиции, содержащей соединение, для лечения коронавирусной инфекции.



I.

B1

047956

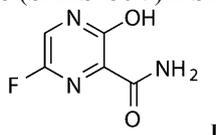
047956

B1

Настоящая заявка основана, и по ней испрашивается приоритет, на китайской патентной заявке № 202010070142.0, поданной 21 января 2020 года, описание которой включено в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

Область техники

Изобретение относится к применению фавипиравира, представленного следующей формулой I, его геометрического изомера, фармацевтически приемлемой соли, сольвата и/или гидрата и фармацевтической композиции, содержащей указанные выше соединения, в лечении инфекции, вызванной коронавирусом, в особенности, коронавирусом SARS (SARS-CoV) и SARS-CoV-2.



Уровень техники

Фавипиравир (соединение, представленное формулой I, T-705) с химическим названием 6-фтор-3-гидроксипиразин-2-карбоксамид, являющийся лекарственным средством-аналогом нуклеозида, является ингибитором вирусной РНК-полимеразы. Это лекарственное средство является противовирусным лекарственным средством широкого спектра, одобренным в Японии в качестве лекарственного средства против гриппа.

Фавипиравир обладает хорошими ингибиторными эффектами *in vitro* и *in vivo* в отношении вирусных членов семейств РНК-вирусов, таких как Filoviridae, Bunyaviridae, Arenaviridae, Togaviridae, а также членов других семейств вирусов, таких как Orthomyxoviridae, Paramyxoviridae, Picornaviridae, Flaviviridae, но его активность против коронавируса не описана. После проникновения в клетку фавипиравир может превращаться в активную форму трифосфата, встраивающуюся в цепь РНК во время транскрипции и репликации РНК-вируса, и неспецифически терминирует элонгацию вирусной цепи РНК, таким образом, осуществляя противовирусные эффекты.

Сообщают, что фавипиравир может эффективно ингибировать титр вируса в супернатанте после инфицирования вирусами линии клеток Vero E6 и имеет полумаксимальную ингибиторную концентрацию (IC₅₀) 67 мкмоль/л относительно EBOV типа Заир. Результаты исследований фармакодинамики *in vivo* с использованием модели на IFNAR^{-/-} мышцах C57BL/6 с дефицитом рецептора интерферона типа I свидетельствуют о том, что при провокационной дозе, вызывающей 100% смертность в группе плацебо, вводимой в количестве 300 мг/кг/сутки со дня 6 по день 13, фавипиравир демонстрировал коэффициент защиты 100%, и в то же время такие параметры, как масса тела, глутамат-пируваттрансаминаза, глутамат-оксалоацетаттрансаминаза и виремия, также значительно улучшались. Соответствующие результаты исследования Лаборатория оборонной науки и технологии Великобритании показали, что фавипиравир не являлся цитотоксическим для клеток Vero C1008 при высокой концентрации 1,95 г/л и мог полностью ингибировать цитопатический эффект (CPE) EBOV типа Заир в отношении клеток при концентрации лекарственного средства выше 62,5 мг/л. Модельных мышей A129 с дефицитом интерферона типа I и типа II заражали дозой, вызывающей 100% смертность в группе плацебо, и незамедлительно внутривенно вводили фавипиравир в дозе 300 мг/кг/сутки (2 раза/сутки, 150 мг/кг за раз) через 1 ч после заражения в течение последовательных 14 дней, наблюдая защиту 100% мышей от гибели, и масса тела мышей в группе введения значительно улучшалась.

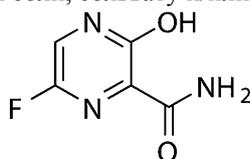
Новый коронавирус 2019 года (2019-nCoV) является новым штаммом коронавируса, который ранее не обнаруживали у людей. 11 февраля 2020 года Международный комитет по таксономии вирусов (ICTV) объявил, что официальным названием нового коронавируса 2019 года (2019-nCoV) является коронавирус тяжелого острого респираторного синдрома-2 (SARS-CoV-2). В тот же день Всемирная организация здравоохранения (WHO) объявила, что официальным названием заболевания, вызванного этим вирусом, является COVID-19. Симптомами инфекции вируса SARS-CoV-2, в основном, является пневмония, и их можно разделять на простую инфекцию, легкую пневмонию, тяжелую пневмонию, острый респираторный дистресс-синдром, сепсис, септический шок и т.д. в зависимости от тяжести заболевания. Пациенты с простой инфекцией могут иметь неспецифические симптомы, такие как лихорадка, кашель, боль в горле, заложенность носа, утомляемость, головная боль, боль или дискомфорт в мышцах, и пожилые люди и люди в состоянии иммуносупрессии могут иметь атипичные симптомы. Пациенты с легкой пневмонией, в основном, имеют кашель, диспноэ и полипноэ. Тяжелую пневмонию можно наблюдать у подростков, взрослых или детей, и ее основные симптомы включают повышение частоты дыхательных движений, тяжелую дыхательную недостаточность или диспноэ, центральный цианоз, сонливость, потерю сознания или конвульсии, удушье и т.д. Изображения легких при остром респираторном дистресс-синдроме соответствуют билатеральным теням по типу матового стекла, которые нельзя в полной мере объяснить выпотом, долевой экссудацией или ателектазом, или тени легочной массы, и основным его симптомом является отек легких. Пациенты с сепсисом зачастую имеют фатальную дисфункцию органа, и пациентами в наиболее критическом состоянии являются пациенты с септическим шоком, и они имеют высокую вероятность гибели.

В настоящее время инфекцию нового коронавируса, в основном, лечат с использованием поддерживающей терапии в клинике, и специфические противовирусные лекарственные средства недоступны.

Подробное описание изобретения

Целью настоящего изобретения является обнаружение лекарственного средства с противовирусной активностью против коронавируса, в особенности, коронавируса SARS (SARS-CoV) и SARS-CoV-2, которое можно использовать для лечения соответствующего заболевания, вызванного его инфекцией, такой как простая инфекция (такая как лихорадка, кашель и боль в горле), пневмония, острая или тяжелая острая инфекция дыхательных путей, гипоксическая дыхательная недостаточность и острый респираторный дистресс-синдром, сепсис и септический шок. С помощью творческого исследования в рамках настоящего изобретения обнаружено, что фавипиравир, представленный формулой I, обладает функцией ингибирования репликации коронавируса SARS (SARS-CoV) и SARS-CoV-2 и хорошим потенциальным терапевтическим эффектом при лечении заболевания, вызванного коронавирусом SARS (SARS-CoV) или SARS-CoV-2.

Настоящее изобретение относится к соединению, представленному формулой I, его геометрическому изомеру, фармацевтически приемлемой соли, сольвату и/или гидрату:



Формула I

В некоторых вариантах осуществления фармацевтически приемлемые соли соединения, представленного формулой I, представленного в настоящем описании, включают соли неорганических или органических кислот и соли неорганических или органических оснований. Настоящее изобретение относится ко всем формам указанных выше солей, включая, в качестве неограничивающих примеров: натриевую соль, калиевую соль, кальциевую соль, литиевую соль, соль меглума, гидрохлоридную соль, гидробромидную соль, йодогидратную соль, нитратную соль, сульфат, гидросульфат, фосфат, гидрофосфат, ацетат, пропионат, бугират, оксалат, пивалат, адипат, альгинат, лактат, цитрат, тартрат, сукцинат, малеат, фумарат, пикрат, аспаргат, глюконат, бензоат, метансульфонат, этансульфонат, бензолсульфонат, р-толуолсульфонат, эмбонат и т.д.

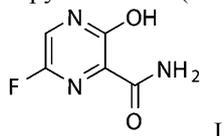
Соединение, представленное формулой I, может ингибировать репликацию коронавируса в клетках и снижать нагрузку нуклеиновыми кислотами коронавируса в культуре клеток.

После творческого поиска авторы настоящего изобретения открыли новые признаки соединения, представленного формулой I, в клетках:

во-первых, соединение, представленное формулой I, может снижать нагрузку вирусными нуклеиновыми кислотами в клетках, инфицированных SARS-CoV-2 на микромолярном уровне концентрации;

во-вторых, соединение, представленное формулой I, обладает значительным защитным эффектом в отношении мышей, инфицированных коронавирусом SARS (SARS-CoV).

Настоящее изобретение также относится к применению соединения, представленного формулой I, его геометрического изомера, фармацевтически приемлемой соли, сольвата и/или гидрата в производстве лекарственного средства для лечения заболевания или инфекции (включая, в качестве неограничивающих примеров, заболевания дыхательных путей (например, простые инфекции (такие как лихорадка, кашель и боль в горле), пневмонию, острую респираторную инфекцию, тяжелую острую респираторную инфекцию (SARI), гипоксическую дыхательную недостаточность и острый респираторный дистресс-синдром, сепсис и септический шок, тяжелый острый респираторный синдром (SARS) и т.д.)), вызванные коронавирусом, в особенности, коронавирусом SARS (SARS-CoV) и/или SARS-CoV-2,



Настоящее изобретение также относится к применению соединения, представленного формулой I, его геометрического изомера, фармацевтически приемлемой соли, сольвата и/или гидрата в производстве лекарственного средства в качестве ингибитора коронавируса.

Настоящее изобретение также относится к применению соединения, представленного формулой I, его геометрического изомера, фармацевтически приемлемой соли, сольвата и/или гидрата в производстве лекарственного средства для ингибирования репликации или репродукции коронавируса в клетке (например, клетке млекопитающего).

Настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции, содержащей соединение, представленное формулой I, его геометрический изомер, фармацевтически приемлемую соль, сольват и/или гидрат, предпочтительно, фармацевтическая композиция дополнительно содержит фармацев-

тически приемлемый носитель или эксципиент. В частности, фармацевтическая композиция представляет собой твердый препарат, инъекционный препарат, препарат для наружного использования, спрей, жидкий препарат или экстемпоральный препарат.

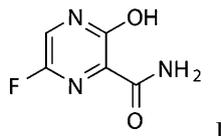
В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит эффективное количество соединения, представленного формулой I, его геометрического изомера, фармацевтически приемлемой соли, сольвата и/или гидрата.

Настоящее изобретение также относится к применению фармацевтической композиции, содержащей соединение, представленное формулой I, геометрический изомер, фармацевтически приемлемую соль, сольват и/или гидрат, или соединения, представленного формулой I, его геометрического изомера, фармацевтически приемлемой соли, сольвата и/или гидрата в производстве лекарственного средства для лечения заболевания дыхательных путей, включая, в качестве неограничивающих примеров, простую инфекцию (такую как лихорадка, кашель и боль в горле), пневмонию, острую респираторную инфекцию, тяжелую острую респираторную инфекцию (SARI), гипоксическую дыхательную недостаточность, острый респираторный дистресс-синдром, сепсис, септический шок, тяжелый острый респираторный синдром (SARS) и т.д.).

Настоящее изобретение также относится к способу лечения и/или профилактики заболевания у нуждающегося в этом млекопитающего или способу ингибирования репликации или репродукции коронавируса у нуждающегося в этом млекопитающего, включающему введение нуждающемуся в этом млекопитающему терапевтически и/или профилактически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей соединение, представленное формулой I, его геометрический изомер, фармацевтически приемлемую соль, сольват и/или гидрат, или соединения, представленного формулой I, геометрического изомера, фармацевтически приемлемой соли, сольвата и/или гидрата, где заболевание включает заболевание, вызванное коронавирусом.

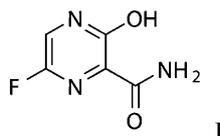
В некоторых вариантах осуществления заболевание, вызванное коронавирусом, в особенности коронавирусом SARS (SARS-CoV) и SARS-CoV-2, включает, в качестве неограничивающих примеров, заболевание дыхательных путей (например, простую инфекцию (такую как лихорадка, кашель и боль в горле), пневмонию, острую респираторную инфекцию, тяжелую острую респираторную инфекцию (SARI), гипоксическую дыхательную недостаточность, острый респираторный дистресс-синдром, сепсис, септический шок, тяжелый острый респираторный синдром (SARS) и т.д.).

Настоящее изобретение также относится к применению фармацевтической композиции в производстве лекарственного средства для лечения заболевания или инфекции, вызванной коронавирусом, в особенности коронавирусом SARS (SARS-CoV) и SARS-CoV-2 (например, заболевания дыхательных путей (например, простой инфекции (такой как лихорадка, кашель и боль в горле), пневмонии, острой респираторной инфекции, тяжелой острой респираторной инфекции (SARI), гипоксической дыхательной недостаточности, острого респираторного дистресс-синдрома, сепсиса, септического шока, тяжелого острого респираторного синдрома (SARS) и т.д.)), где фармацевтическая композиция содержит соединение, представленное формулой I, его геометрический изомер, фармацевтически приемлемую соль, сольват и/или гидрат,



предпочтительно, фармацевтическая композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель или эксципиент. В частности, фармацевтическая композиция представляет собой твердый препарат, инъекционный препарат, препарат для наружного использования, спрей, жидкий препарат или экстемпоральный препарат.

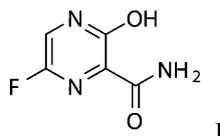
Настоящее изобретение также относится к применению фармацевтической композиции в производстве лекарственного средства в качестве ингибитора коронавируса, где фармацевтическая композиция содержит соединение, представленное формулой I, геометрический изомер, фармацевтически приемлемую соль, сольват и/или гидрат,



предпочтительно, фармацевтическая композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель или эксципиент. В частности, фармацевтическая композиция представляет собой твердый препарат, инъекционный препарат, препарат для наружного использования, спрей, жидкий препарат или экстемпоральный препарат.

Настоящее изобретение также относится к применению фармацевтической композиции в производстве лекарственного средства для ингибирования репликации или репродукции коронавируса в клетке

(например, клетке млекопитающего), где фармацевтическая композиция содержит соединение, представленное формулой I, его геометрический изомер, фармацевтически приемлемую соль, сольват и/или гидрат,



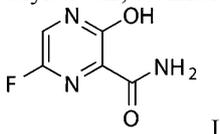
предпочтительно, фармацевтическая композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель или эксципиент. В частности, фармацевтическая композиция представляет собой твердый препарат, инъекционный препарат, препарат для наружного использования, спрей, жидкий препарат или экстемпоральный препарат.

Настоящее изобретение также относится к соединению, представленному формулой I, его геометрическому изомеру, фармацевтически приемлемой соли, сольвату и/или гидрату для применения в лечении заболевания или инфекции, вызванной коронавирусом, в особенности, коронавирусом SARS (SARS-CoV) и SARS-CoV-2 (например, включая, в качестве неограничивающих примеров, заболевание дыхательных путей (например, простую инфекцию (такую как лихорадка, кашель и боль в горле), пневмонию, острую респираторную инфекцию, тяжелую острую респираторную инфекцию (SARI), гипоксическую дыхательную недостаточность, острый респираторный дистресс-синдром, сепсис, септический шок, тяжелый острый респираторный синдром (SARS) и т.д.).

Настоящее изобретение также относится к соединению, представленному формулой I, его геометрическому изомеру, фармацевтически приемлемой соли, сольвату и/или гидрату для применения в качестве ингибитора коронавируса.

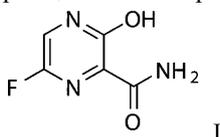
Настоящее изобретение также относится к соединению, представленному формулой I, его геометрическому изомеру, фармацевтически приемлемой соли, сольвату и/или гидрату для применения в ингибировании репликации или репродукции коронавируса в клетке (например, клетке млекопитающего).

Настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции для применения в лечении заболевания или инфекции, вызванной коронавирусом, в особенности, коронавирусом SARS (SARS-CoV) и SARS-CoV-2 (например, заболевания дыхательных путей (например, простой инфекции (такой как лихорадка, кашель и боль в горле), пневмонии, острой респираторной инфекции, тяжелой острой респираторной инфекции (SARI), гипоксической дыхательной недостаточности, острого респираторного дистресс-синдрома, сепсиса, септического шока, тяжелого острого респираторного синдрома (SARS) и т.д.)), где фармацевтическая композиция содержит соединение, представленное формулой I, его геометрический изомер, фармацевтически приемлемую соль, сольват и/или гидрат,



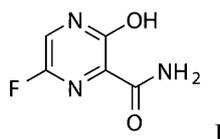
предпочтительно, фармацевтическая композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель или эксципиент. В частности, фармацевтическая композиция представляет собой твердый препарат, инъекционный препарат, препарат для наружного использования, спрей, жидкий препарат или экстемпоральный препарат.

Настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции для применения в качестве ингибитора коронавируса, где фармацевтическая композиция содержит соединение, представленное формулой I, его геометрический изомер, фармацевтически приемлемую соль, сольват и/или гидрат,



предпочтительно, фармацевтическая композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель или эксципиент. В частности, фармацевтическая композиция представляет собой твердый препарат, инъекционный препарат, препарат для наружного использования, спрей, жидкий препарат или экстемпоральный препарат.

Настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции для применения в ингибировании репликации или репродукции коронавируса в клетке (например, клетке млекопитающего), где фармацевтическая композиция содержит соединение, представленное формулой I, его геометрический изомер, фармацевтически приемлемую соль, сольват и/или гидрат,



предпочтительно, фармацевтическая композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель или эксципиент. В частности, фармацевтическая композиция представляет собой твердый препарат, инъекционный препарат, препарат для наружного использования, спрей, жидкий препарат или экстемпоральный препарат.

Настоящее изобретение также относится к применению соединения, представленного формулой I, его геометрического изомера, фармацевтически приемлемой соли, сольвата и/или гидрата в лечении заболевания или инфекции, вызванной коронавирусом (например, заболевания дыхательных путей (например, простой инфекции (такой как лихорадка, кашель и боль в горле), пневмонии, острой респираторной инфекции, тяжелой острой респираторной инфекции (SARI), гипоксической дыхательной недостаточности, острого респираторного дистресс-синдрома, сепсиса, септического шока, тяжелого острого респираторного синдрома (SARS) и т.д.).

Настоящее изобретение также относится к применению соединения, представленного формулой I, его геометрического изомера, фармацевтически приемлемой соли, сольвата и/или гидрата в качестве ингибитора коронавируса.

Настоящее изобретение также относится к применению соединения, представленного формулой I, его геометрического изомера, фармацевтически приемлемой соли, сольвата и/или гидрата в ингибировании репликации или репродукции коронавируса в клетке (например, клетке млекопитающего).

Настоящее изобретение также относится к лекарственному средству для лечения заболевания или инфекции, вызванной коронавирусом (например, заболевания дыхательных путей (например, простой инфекции (такой как лихорадка, кашель и боль в горле), пневмонии, острой респираторной инфекции, тяжелой острой респираторной инфекции (SARI), гипоксической дыхательной недостаточности, острого респираторного дистресс-синдрома, сепсиса, септического шока, тяжелого острого респираторного синдрома (SARS) и т.д.), содержащему соединение, представленное формулой I, его геометрический изомер, фармацевтически приемлемую соль, сольват и/или гидрат в качестве активного ингредиента.

Настоящее изобретение также относится к лекарственному средству в качестве ингибитора коронавируса, содержащему соединение, представленное формулой I, его геометрический изомер, фармацевтически приемлемую соль, сольват и/или гидрат в качестве активного ингредиента.

Настоящее изобретение также относится к лекарственному средству для ингибирования репликации или репродукции коронавируса в клетке (например, клетке млекопитающего), содержащему соединение, представленное формулой I, его геометрический изомер, фармацевтически приемлемую соль, сольват и/или гидрат в качестве активного ингредиента.

В некоторых вариантах осуществления в настоящей заявке коронавирус является коронавирусом SARS (SARS-CoV) или SARS-CoV-2.

В некоторых вариантах осуществления в настоящей заявке коронавирус является SARS-CoV-2.

В некоторых вариантах осуществления в настоящей заявке заболевание, вызванное коронавирусом, является заболеванием, вызванным SARS-CoV-2, а именно COVID-19.

В некоторых вариантах осуществления в настоящей заявке заболевание, вызванное коронавирусом, является атипичной пневмонией, вызванной коронавирусом SARS (SARS-CoV).

В некоторых вариантах осуществления в настоящей заявке млекопитающее относится к крупному рогатому скоту, лошадиным, козьим, свиньям, псовым, кошачьим, является грызуном, приматом, например, человеком, кошкой, собакой или свиньей.

В настоящей заявке официальным названием в случае термина "новый коронавирус 2019 года (2019-nCoV)" является коронавирус тяжелого острого респираторного синдрома-2 (SARS-CoV-2).

В настоящей заявке официальным названием в случае термина "заболевание, вызванное новым коронавирусом 2019 года (2019-nCoV)" является COVID-19.

В настоящей заявке термин "терапевтически эффективное количество" или "профилактически эффективное количество" относится к количеству, являющемуся достаточным для лечения или профилактики заболевания у пациента, но и являющемуся достаточно низким для избегания серьезных побочных эффектов (при разумном соотношении пользы/риска) в пределах разумного медицинского заключения. Терапевтически эффективное количество соединения будет изменяться в зависимости от факторов, таких как конкретное выбранное соединение (например, с учетом эффективности и времени полужизни соединения), выбранный способ введения, заболевание, подвергаемое лечению, тяжесть заболевания, подвергаемого лечению, возраст, размер, масса и физическое состояние пациента, медицинский анамнез, длительность лечения, природа сопутствующей терапии, желаемый терапевтический эффект и т.д., но специалисты в этой области все равно могут определять его общепринятыми способами.

Кроме того, следует отметить, что конкретная доза и способ применения соединения, представленного формулой I, его геометрического изомера, фармацевтически приемлемой соли, сольвата и/или гид-

рата в случае разных пациентов зависят от множества факторов, включая возраст, массу, пол, состояние здоровья, питания пациента, активности лекарственного средства, время введения, уровня метаболизма, тяжести заболевания и субъективного мнения лечащего врача. В настоящем изобретении предпочтительно использовать дозу 0,001-1000 мг/кг массы тела/сутки.

Фармацевтическую композицию, описанную в настоящей заявке, можно получать в различных формах в соответствии с разными способами введения.

В настоящей заявке фармацевтическую композицию можно вводить любым из следующих путей: посредством перорального введения, ингаляции спрея, ректального введения, назального введения, буккального введения, вагинального введения, топического введения, парентерального введения, такого как подкожная, внутривенная, внутримышечная, интраперитонеальная, интратекальная, внутрижелудочковая, интрастернальная и внутрочерепная инъекция или инфузия, или введения с помощью эксплантируемого резервуара, где предпочтительным способом введения является пероральное, интраперитонеальное или внутривенное введение.

При пероральном введении соединение, представленное формулой I, его геометрический изомер, фармацевтически приемлемую соль, сольват и/или гидрат можно получать в любой форме перорально приемлемого препарата, включая, в качестве неограничивающих примеров таблетку, капсулу, водный раствор или водную суспензию. Носитель для использования в таблетке, как правило, включает лактозу и кукурузный крахмал, а также можно добавлять смазочное средство, такое как стеарат магния. Дилуэнт для использования в капсуле, как правило, включает лактозу и сухой кукурузный крахмал. Водную суспензию, как правило, получают посредством смешивания активного ингредиента с подходящим эмульгатором и подходящим суспендирующим средством. При необходимости, в указанные выше формы перорального препарата также можно добавлять подсластитель, ароматизатор или краситель.

При ректальном введении соединение, представленное формулой I, его геометрический изомер, фармацевтически приемлемую соль, сольват и/или гидрат, как правило, можно получать в форме суппозитория, получаемого посредством смешивания лекарственного средства с подходящим нераздражающим эксципиентом. Эксципиент находится в твердом состоянии при комнатной температуре, но плавится при температуре прямой кишки, высвобождая лекарственное средство. Такой эксципиент включает масло какао, пчелиный воск и полиэтиленгликоль.

При топическом введении, в частности, для лечения легко доступной пораженной поверхности или органа, такого как глаз, кожа или нижние отделы желудочно-кишечного тракта, посредством топического введения, соединение, представленное формулой I, его геометрический изомер, фармацевтически приемлемую соль, сольват и/или гидрат можно получать в различных формах топических препаратов в соответствии с различными пораженными поверхностями или органами, конкретные инструкции являются следующими:

При топическом введении в глаз соединение, представленное формулой I, его геометрический изомер, фармацевтически приемлемую соль, сольват и/или гидрат можно составлять в такой форме препарата, как микронизированная суспензия или раствор, используемым носителем является изотонический стерильный физиологический раствор с некоторым рН, и можно добавлять или не добавлять консервант, такой как бензилхлорид алкоксид. Кроме того, в случае введения в глаз соединение также можно получать в форме мази, такой как вазелиновая мазь.

При топическом нанесении на кожу соединение, представленное формулой I, его геометрический изомер, фармацевтически приемлемые соли, сольват и/или гидрат можно получать в подходящей форме, такой как мазь, лосьон или крем, в которой активный ингредиент суспендируют или растворяют в одном или более носителях. Носитель для использования в мази включает, в качестве неограничивающих примеров, минеральное масло, вазелиновое масло, белый вазелин, пропиленгликоль, полиэтиленоксид, полипропиленоксид, эмульгирующий воск и воду. Носитель для использования в лосьоне или креме включает, в качестве неограничивающих примеров, минеральное масло, сорбитан моностеарат, Tween-60, воск цетиловых эфиров, гексадециловый ариловый спирт, 2-октилдодеканол, бензиловый спирт и воду.

При топическом введении в нижние отделы желудочно-кишечного тракта соединение, представленное формулой I, его геометрический изомер, фармацевтически приемлемую соль, сольват и/или гидрат можно получать в такой форме, как ректальный суппозиторий, как описано выше, или подходящий препарат для введения с помощью клизмы, кроме того, также можно использовать топический трансдермальный пластырь.

Соединение, представленное формулой I, его геометрический изомер, фармацевтически приемлемую соль, сольват и/или гидрат также можно вводить в форме стерильного препарата для инъекций, включая стерильный инъектируемый водный раствор или масляную суспензию, или стерильных инъектируемых растворов, где используемый носитель и растворитель включает воду, раствор Рингера и изотонический раствор хлорида натрия. Кроме того, в качестве растворителя или суспензионной среды также можно использовать стерилизуемое нелетучее масло, такое как моноглицерид или диглицерид.

Лекарственные средства в различных указанных выше формах препаратов можно получать способами, общепринятыми в области фармацевтики.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 показано, что фавипиравир может эффективно снижать нагрузку вирусными нуклеиновыми кислотами в клетках VeroE6, инфицированных SARS-CoV-2. На фиг. 1 (а) показано, что фавипиравир может снижать нагрузку вирусной РНК в клетках через 48 ч после инфицирования клеток SARS-CoV-2, и ингибиторная активность является дозозависимой; на фиг. (а) по ординате отложено количество копий вирусной РНК в образце, и по абсциссе отложена концентрация лекарственного средства; на фиг. (б) показано, что фавипиравир не имеет наблюдаемой цитотоксичности через 48 ч после обработки клеток в тестируемой концентрации; на фиг. (б) по ординате отложен процент жизнеспособности клеток относительно контрольной группы, которую обрабатывали носителем (только клетки без добавления лекарственного средства), и по абсциссе отложена концентрация лекарственного средства.

На фиг. 2 показано, что фавипиравир может эффективно защищать инфицированных коронавирусом SARS мышей от гибели. Мышам интраперитонеально инъецировали фавипиравир один раз в день через 4 часа после провокационной пробы, и в контрольной группе, которой вводили носитель, инъецировали тот же объем растворителя. Можно видеть, что все мыши в контрольной группе, которой вводили носитель, погибли, в то время как мыши в группе лечения фавипиравиром выжили, и коэффициент выживаемости является дозозависимым.

Конкретные модели осуществления настоящего изобретения

Следующие примеры являются иллюстративными предпочтительными вариантами осуществления настоящего изобретения, и они никоим образом не ограничивают настоящее изобретение.

Пример 1: Эксперимент по снижению нагрузки вирусной нуклеиновой кислотой в клетках, инфицированных SARS-CoV-2, с помощью фавипиравира

(1) Обработка инфицированных вирусом клеток лекарственным средством

Клетки Vero E6 (приобретенные в ATCC, кат. № 1586) помещали в 24-луночный планшет и инкубировали в течение 24 часов, затем осуществляли инфицирование вирусом, в частности, вирусом SARS-CoV-2 (2019-nCoV) (штаммом nCoV-2019BetaCoV/Wuhan/WIV04/2019, предоставленным Уханьским институтом вирусологии, Китайская академия наук), разводили 2%-ной поддерживающей клеточной средой (состав: FBS (приобретенную в Gibco, кат. № 16000044), добавляли к MEM (приобретенной в Gibco, кат. № 10370021) в количестве 2 об.%, таким образом, получая 2%-ную поддерживающую клеточную среду) до соответствующей концентрации, а затем добавляли в 24-луночный планшет таким образом, что каждая лунка имела вирусную нагрузку 100 TCID₅₀. Затем фавипиравир (приобретенный в Selleck Chemicals, кат. № S7975) разводили 2%-ной поддерживающей клеточной средой до соответствующих концентраций и добавляли в соответствующие лунки таким образом, что конечные концентрации лекарственного средства составляли 100 мкМ, 33 мкМ, 11 мкМ, 3,7 мкМ, 1,23 мкМ, 0,41 мкМ, 0,14 мкМ, соответственно, затем планшет помещали в инкубатор при 37°C, 5% CO₂ и непрерывно культивировали в течение 48 ч, а в контрольной группе, которую обрабатывали носителем, добавляли только 2%-ную поддерживающую клеточную среду без какого-либо тестируемого лекарственного средства.

(2) Выделение РНК

Набор для выделения РНК приобретали в Qiagen, кат. № 74106. Все из расходных материалов (центрифужных колонок, несодержащих РНКазу пробирок для элюции объемом 2 мл и т.д.) и реагентов (RLT, RW1, RPE, несодержащей РНКазу воды и т.д.), используемых в следующих стадиях выделения РНК, являлись частями набора. Все из следующих стадий выделения рекомендованы в инструкциях к набору.

1) 100 мкл супернатанта отбирали из тестового планшета, добавляли в несодержащую нуклеазу пробирку EP, затем добавляли 350 мкл буфера RLT, смешивали с использованием устройства для переноса жидкостей, чтобы полностью лизировать, и центрифугировали для получения супернатанта;

2) супернатант, полученный на стадии 1), добавляли к равному объему 70% этанола и тщательно смешивали;

3) смешанный раствор, полученный на стадии 2) выше, переносили в несодержащую РНКазу центрифужную колонку, центрифугировали при 12000 об./мин в течение 15 с и выбрасывали жидкость;

4) 700 мкл буфера RW1 добавляли в центрифужную колонку, затем осуществляли центрифугирование при 12000 об./мин в течение 15 с для очищения центрифужной колонки и выбрасывали жидкость;

5) 500 мкл буфера RPE добавляли в центрифужную колонку, затем осуществляли центрифугирование при 12000 об./мин в течение 15 с для очищения центрифужной колонки и выбрасывали жидкость;

6) 500 мкл буфера RPE добавляли в центрифужную колонку, затем осуществляли центрифугирование при 12000 об./мин в течение 2 мин для очищения центрифужной колонки и выбрасывали жидкость;

7) центрифужную колонку помещали в новую несодержащую РНКазу пробирку для элюции 2 мл, и осуществляли центрифугирование при 12000 об./мин в течение 1 мин для высушивания центрифужной колонки, а затем всю центрифужную колонку переносили в пробирку для элюции 1,5 мл на стадии 8);

8) центрифужную колонку, высушенную на стадии 7), помещали в новую пробирку для элюции 1,5 мл, добавляли 30 мкл несодержащей РНКазу воды и центрифугировали при 12000 об./мин в течение 2 мин, полученный элюат содержал соответствующую РНК, в него добавляли ингибитор РНКаз (приобретенный в NEB, кат. № M0314L), и для определения концентрации каждой РНК использовали Nano Drop

(приобретенный в Thermo Scientific, Nano Drop One).

(3) Обратная транскрипция РНК

В эксперименте для обратной транскрипции РНК использовали набор для обратной транскрипции (набор реагентов для RT PrimeScript™ с gDNA Eraser, кат. № RR047Q), произведенный TaKaRa Company. Стадии являлись следующими.

1) Удаление геномной ДНК: собирали образцы РНК из каждой экспериментальной группы, отбирали 1 мкг каждого и подвергали обратной транскрипции. Сначала 2 мкл 5-кратного буфера gDNA Eraser Buffer добавляли к образцу РНК из каждой экспериментальной группы, реакционную систему дополняли несодержащей РНКазу водой до 10 мкл, тщательно смешивали и переносили на водяную баню с температурой 42°C на 2 мин для удаления геномной ДНК, которая может находиться в образце;

2) Обратная транскрипция: в образец, полученный на стадии 1), добавляли подходящие количества фермента, смеси праймеров и реакционного буфера, дополняли несодержащей РНКазу водой до объема 20 мкл, проводили реакции на водяной бане при 37°C в течение 15 мин, затем помещали на водяную баню с температурой 85°C на 5 с, таким образом, получая кДНК посредством транскрипции.

(4) ПНР в реальном времени

Для определения количества копий на мл исходного раствора вируса использовали флуоресцентную количественную ПЦР.

Реакционную систему смешивали с TB Green Premix (Takara, кат. № RR820A) и осуществляли реакцию амплификации и считывание с использованием устройства для ПЦР в реальном времени StepOne Plus (производитель: ABI). Вычисляли количество копий на мл исходного раствора вируса. Стадии являлись следующими:

1) Получение стандартного продукта: плазмиду pMT-RBD (плазмида предоставлена Уханьским институтом вирусологии, Китайская академия наук), разводили до 5×10^8 копий/мкл, 5×10^7 копий/мкл, 5×10^6 копий/мкл, 5×10^5 копий/мкл, 5×10^4 копий/мкл, 5×10^3 копий/мкл, 5×10^2 копий/мкл. Для реакции qPCR использовали 2 мкл стандарта или матрицы кДНК.

2) последовательности праймеров, используемых в эксперименте, являлись следующими (все указаны в 5'-3'-направлении):

RBD-qF: CAATGGTTTAACAGGCACAGG,

RBD-qR: CTCAAGTGTCTGTGGATCACG.

3) Реакцию проводили следующим образом:

Предварительная денатурация: 95°C в течение 5 минут;

Параметры цикла: 95°C в течение 15 секунд, 54°C в течение 15 секунд, 72°C в течение 30 секунд, всего 40 циклов.

(5) Тест цитотоксичности лекарственного средства

Определение цитотоксичности лекарственного средства осуществляли с помощью набора ССК-8 (Beovertime). Стадии являлись следующими:

1) 1×10^4 клеток Vero E6 (ATCC) помещали в 96-луночный планшет и инкубировали при 37°C в течение 8 часов.

2) лекарственное средство разводили DMSO до подходящей концентрации маточного раствора, а затем разводили средой MEM (приобретенной в Gibco, кат. № 10370021), содержащей 2% FBS (приобретенной в Gibco, кат. № 16000044), до той же концентрации, что и в случае обработки лекарственным средством. Исходную среду в 96-луночном планшете выбрасывали, к клеткам добавляли 100 мкл содержащей лекарственное средство среды MEM и подготавливали три параллельные лунки для каждой концентрации. Использовали контрольный носитель (DMSO и среду добавляли в лунки с клетками без добавления лекарственного средства) и пустую контрольную пробу (DMSO и среду добавляли в лунки без клеток). После добавления лекарственного средства клетки культивировали при 37°C в течение 48 часов.

3) в лунку, подлежащую тестированию, добавляли 20 мкл раствора ССК-8 (Beovertime), осторожно смешивали, не допуская образования пузырьков, и непрерывно инкубировали при 37°C в течение 2 часов. OD₄₅₀ считывали с помощью спектрофотометра для чтения микропланшетов (приобретенного в Molecular Devices, модель: SpectraMax M5) и вычисляли жизнеспособность клеток:

Активность клеток (%) = $(A_{\text{группа обработки лекарственным средством}} - A_{\text{пустая контрольная проба}}) / (A_{\text{контрольный носитель}} - A_{\text{пустая контрольная проба}}) \times 100\%$,

где A представляет собой результаты считывания с помощью спектрофотометра для чтения микропланшетов.

(6) Результаты экспериментов

Результаты эксперимента по ингибированию пролиферации вируса показали, что тестируемое соединение в концентрациях 100 мкМ, 33 мкМ, 11,1 мкМ и 3,7 мкМ могло эффективно ингибировать репликацию генома вируса SARS-CoV-2 в инфицированном супернатанте (табл. 1 и фиг. 1).

Таблица 1

Тестирование противовирусной активности тестируемого соединения (фавипиравира) *in vitro*

Концентрация (мкМ)	100	33,33	11,11	3,70	1,23	0,41	0,14	Носитель
Количество копий генома вируса	734518 ±93620 ,94	977681, 5±1688 21,04	406212 7±9628 39,02	777463 2,5±21 09225,2 8	101798 36,5±1 557937, 97	155414 94,5±2 355070, 75	161522 18±272 0484,45	146729 63±228 2738,68

Результаты теста цитотоксичности показали, что обработка тестируемым соединением (фавипиравиром) не изменяла жизнеспособность клеток при всех тестируемых концентрациях, т.е. тестируемое соединение не имело токсического эффекта в отношении клеток при всех тестируемых концентрациях (табл. 2 и фиг. 1).

Таблица 2

Результаты теста цитотоксичности тестируемого соединения (фавипиравира)

Концентрация (мкМ)	100	33,33	11,11	3,70	1,23	0,41	0,14	Носитель
Жизнеспособность клеток (% от контрольного носителя)	96,37± 1,26	95,21± 4,43	96,42± 4,77	99,09± 4,91	98,57± 1,90	101,38 ±3,85	101,61 ±0,74	101,20 ±3,08

Пример 2: Эксперимент по защите инфицированных коронавирусом SARS мышей от гибели с помощью фавипиравира

(1) Группирование и маркировка мышей

Мышей A129 возрастом 3-4 недель и массой 9-13 г (предоставленных Институтом Пастера в Шанхае, Китайская академия наук) случайным образом разделяли на 4 группы, а именно контрольную группу, группу введения высокой дозы, группу введения средней дозы и группу введения низкой дозы, 10 мышей на группу, и маркировали ушными бирками.

(2) Получение лекарственного средства

В качестве растворителя для растворения фавипиравира использовали 0,5% СМС-Na. Сначала лекарственное средство фавипиравир точно взвешивали, добавляли соответствующее количество раствора 0,5% СМС-Na, попеременно подвергали вортиксированию и ультразвуковой обработке в течение 15 мин до тех пор, пока образец не становился однородной суспензией частиц, затем разводили с помощью 0,5% СМС-Na в 2 раза, и разведение осуществляли в соответствии с вводимой дозой 200 мг/кг, 100 мг/кг и 50 мг/кг, соответственно. Получаемые растворы лекарственного средства хранили при 4°C для последующего использования.

(3) Заражение мышей, введение доз и сбор данных

Заражение осуществляли посредством интраперитонеальной инъекции, т.е. каждой мышце интраперитонеально инъецировали коронавирусы SARS (предоставленные Академией военно-медицинских наук) при провокационной дозе $1 \cdot 10^6$ БОЕ, где вирусы разводили нормальным физиологическим раствором до необходимой дозы. Интраперитонеальное введение осуществляли однократно через 4 ч, 24 ч, 48 ч, 72 ч, 96 ч, 120 ч и 144 ч после заражения, соответственно, в группах введения высокая доза составляла 200 мг/кг, средняя доза составляла 100 мг/кг, и низкая доза составляла 50 мг/кг, и контрольной группе вводили тот же объем растворителя 0,5% СМС-Na. Взвешивание и регистрацию данных осуществляли в фиксированные моменты времени, одновременно регистрировали гибель мышей, и строили кривую выживаемости, как показано на фигуре 2.

(4) Результаты эксперимента

Результаты экспериментов *in vivo* показали, что конечный коэффициент выживаемости мышей являлся дозозависимым (табл. 3 и фиг. 2), что свидетельствует о том, что с помощью введения тестируемого соединения фавипиравира можно эффективно защищать мышей от гибели, вызванной инфекцией коронавирусом SARS.

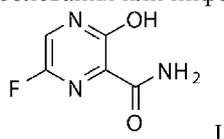
Таблица 3

Результаты эксперимента по анализу противовирусной активности тестируемого соединения (фавипирира) *in vivo*

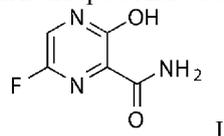
Вводимая доза	Коэффициент смертности
Носитель (контрольный растворитель)	100%
50 мг/кг	100%
100 мг/кг	50%
200 мг/кг	0%

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

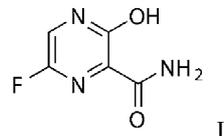
1. Применение соединения, представленного формулой I, его геометрического изомера или фармацевтически приемлемой соли в лечении заболевания или инфекции, вызванной SARS-CoV-2,



2. Применение соединения, представленного формулой I, его геометрического изомера или фармацевтически приемлемой соли в качестве ингибитора SARS-CoV-2,



3. Применение соединения, представленного формулой I, его геометрического изомера или фармацевтически приемлемой соли в ингибировании репликации или репродукции SARS-CoV-2 в клетке млекопитающего,



4. Применение по п.1, где заболевание, вызванное SARS-CoV-2, является COVID-19.

5. Применение по п.3, где млекопитающее относится к крупному рогатому скоту, лошадиным, козым, свиньям, псовым, кошачьим, грызунам или приматам.

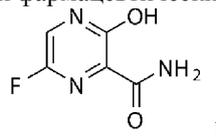
6. Применение по п.5, где млекопитающее является человеком, кошкой, собакой или свиньей.

7. Применение по п.1, где заболевание, вызванное SARS-CoV-2, является заболеванием дыхательных путей.

8. Применение по п.1, где заболевание, вызванное SARS-CoV-2, является простой инфекцией, пневмонией, острой инфекцией дыхательных путей, тяжелой острой респираторной инфекцией (SARI), гипоксической дыхательной недостаточностью, острым респираторным дистресс-синдромом, сепсисом или септическим шоком.

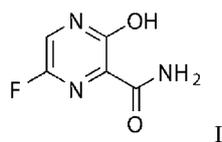
9. Применение по п.8, где простая инфекция представляет собой лихорадку, кашель и/или боль в горле.

10. Способ лечения и/или профилактики заболевания у нуждающегося в этом млекопитающего, включающий введение нуждающемуся в этом млекопитающему терапевтически и/или профилактически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей соединение, представленное формулой I, его геометрический изомер или фармацевтически приемлемую соль,



или соединения, представленного формулой I, его геометрического изомера или фармацевтически приемлемой соли, где заболевание является заболеванием, вызванным SARS-CoV-2.

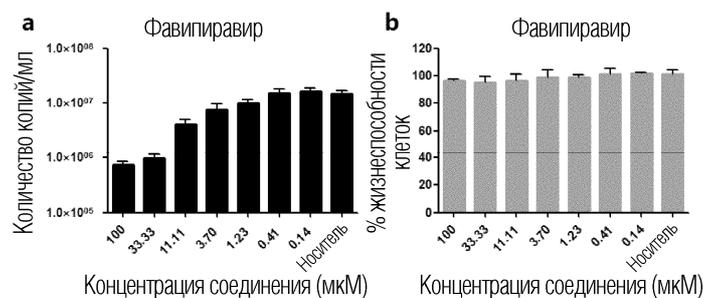
11. Способ ингибирования репликации или репродукции SARS-CoV-2 у нуждающегося в этом млекопитающего, включающий введение нуждающемуся в этом млекопитающему терапевтически и/или профилактически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей соединение, представленное формулой I, его геометрический изомер или фармацевтически приемлемую соль,



или соединения, представленного формулой I, его геометрического изомера или фармацевтически приемлемой соли.

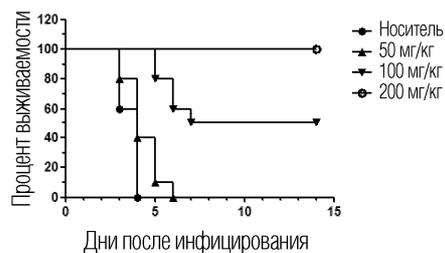
12. Способ по п.10, где заболевание, вызванное SARS-CoV-2, является COVID-19.

13. Способ по п.10 или 11, где млекопитающее включает крупный рогатый скот, лошадиных, козых, свиней, псовых, кошачьих, грызуна или примата.



Фиг. 1

Выживаемость при введении фавипиравира: доля выживших



Фиг. 2

