

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2022-546424
(P2022-546424A)

(43)公表日 令和4年11月4日(2022.11.4)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 31/5383(2006.01)	A 6 1 K 31/5383	4 C 0 8 6
A 6 1 P 31/16 (2006.01)	A 6 1 P 31/16	4 C 2 0 6
A 6 1 K 31/196(2006.01)	A 6 1 K 31/196	
A 6 1 K 31/166(2006.01)	A 6 1 K 31/166	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 2 1	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全24頁)

(21)出願番号	特願2022-513209(P2022-513209)	(71)出願人	516343022
(86)(22)出願日	令和2年8月27日(2020.8.27)		アトリバ セラピューティクス ゲーエム
(85)翻訳文提出日	令和4年4月6日(2022.4.6)		ペーハー
(86)国際出願番号	PCT/EP2020/073934		ドイツ連邦共和国 7 2 0 7 2 テュービ
(87)国際公開番号	WO2021/037956		ンゲン アイゼンバーンシュトラッセ 1
(87)国際公開日	令和3年3月4日(2021.3.4)	(74)代理人	100102978
(31)優先権主張番号	LU101372		弁理士 清水 初志
(32)優先日	令和1年8月27日(2019.8.27)	(74)代理人	100102118
(33)優先権主張国・地域又は機関	ルクセンブルク(LU)		弁理士 春名 雅夫
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA ,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR ,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC, 最終頁に続く	(74)代理人	100160923
			弁理士 山口 裕孝
		(74)代理人	100119507
			弁理士 刑部 俊
		(74)代理人	100142929
			弁理士 井上 隆一

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 MEK阻害剤とキャップ依存性エンドヌクレアーゼ阻害剤との組み合わせ

(57)【要約】

本発明は、1つまたは複数の有利な治療効果を示すことができるMEK阻害剤に関する。MEK阻害剤は、ウイルス感染症の予防および/または処置において使用することができる。キャップ依存性エンドヌクレアーゼ阻害剤と組み合わせたMEK阻害剤は、ウイルス疾患の処置において1つまたは複数の有利な治療効果を示すことができる。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

キャップ依存性エンドヌクレアーゼ阻害剤と組み合わせてのウイルス感染症の処置または予防における使用のためのMEK阻害剤。

【請求項 2】

CI-1040、PD-0184264 GSK-1120212、GDC-0973、PLX-4032、AZD6244、AZD8330、AS-703026、RDEA-119、RO-5126766、RO-4987655、PD-0325901、TAK-733、AS703026、PD98059およびPD184352またはその薬学的に許容される塩もしくは代謝産物からなる群より選択される、請求項1記載の使用のためのMEK阻害剤。

10

【請求項 3】

キャップ依存性エンドヌクレアーゼ阻害剤がパロキサビルマルボキシルである、請求項1または2記載の使用のためのMEK阻害剤。

【請求項 4】

CI-1040またはPD-0184264である、請求項3記載の使用のためのMEK阻害剤。

【請求項 5】

ウイルス感染症が、マイナス鎖RNAウイルスによって引き起こされる感染症である、請求項1～4のいずれか一項記載の使用のためのMEK阻害剤。

【請求項 6】

ウイルスがインフルエンザウイルスである、請求項5記載の使用のためのMEK阻害剤。

20

【請求項 7】

インフルエンザウイルスがインフルエンザA型ウイルスまたはインフルエンザB型ウイルスである、請求項5記載の使用のためのMEK阻害剤。

【請求項 8】

キャップ依存性エンドヌクレアーゼ阻害剤と同時に、その前に、またはその後に投与される、請求項1～7のいずれか一項記載の使用のためのMEK阻害剤。

【請求項 9】

医薬としての使用のための、MEK阻害剤またはその薬学的に許容される塩もしくは代謝産物とキャップ依存性エンドヌクレアーゼ阻害剤とを含む薬学的組成物。

【請求項 10】

MEK阻害剤が、CI-1040、PD-0184264、GSK-1120212、GDC-0973、PLX-4032、AZD6244、AZD8330、AS-703026、RDEA-119、RO-5126766、RO4987655、PD-0325901、TAK-733、AS703026、PD98059およびPD184352、またはその薬学的に許容される塩もしくは代謝産物より選択される、請求項9記載の使用のための薬学的組成物。

30

【請求項 11】

キャップ依存性エンドヌクレアーゼ阻害剤がパロキサビルマルボキシルである、請求項9または10記載の使用のための薬学的組成物。

【請求項 12】

MEK阻害剤がCI-1040またはPD-0184264である、請求項11記載の使用のための薬学的組成物。

40

【請求項 13】

ウイルス感染症の予防および/または処置における使用のための、請求項9～12のいずれか一項記載の薬学的組成物。

【請求項 14】

ウイルス感染症が、マイナス鎖RNAウイルスによって引き起こされる感染症である、請求項13記載の使用のための薬学的組成物。

【請求項 15】

ウイルスが、インフルエンザウイルス、好ましくはインフルエンザA型ウイルスまたはインフルエンザB型ウイルスである、請求項14記載の使用のための薬学的組成物。

50

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

本発明は、パロキサビルマルボキシシルのようなキャップ依存性エンドヌクレアーゼ(CEN)阻害剤と共に1つまたは複数の有利な治療効果を示すことができるMEK阻害剤の組み合わせに関する。MEK阻害剤は、ウイルス感染症の予防および/または処置においてキャップ依存性エンドヌクレアーゼ阻害剤と一緒に使用することができる。キャップ依存性エンドヌクレアーゼ阻害剤と組み合わせたMEK阻害剤は、ウイルス疾患の処置において1つまたは複数の改善された有利な治療効果を示すことができる。

10

【背景技術】

【0002】

発明の背景

RNAウイルスまたはDNAウイルスによる感染症は、ヒトおよび動物の健康にとって甚大な脅威である。例として、インフルエンザウイルスによる感染症はなおも、人類の重大な流行病に属しており、毎年多数の死者を出している。国家財政の点では、それらは、例えば労働に不相当であるために莫大なコスト要因である。ボルナ病ウイルス(BDV)は、主にウマおよびヒツジに罹患するが、またヒトについて単離されておりかつ神経疾患に関連しており、このウイルスによる感染症も同じように、多大な経済的重要性を有する。

【0003】

20

特定のRNAウイルスの制御に関する問題は、ウイルスポリメラーゼの高い誤り率に起因するウイルスの適応力であり、これにより、適したワクチンの産生ならびに抗ウイルス物質の開発が非常に困難になっている。さらに、ウイルスの機能を直接標的とする抗ウイルス物質の適用により、処置の当初では良好な抗ウイルス効果が示されるが、これらは、変異に基づいた耐性変種の選択にすぐに至ることが見いだされている。一例は、ウイルスの膜貫通タンパク質を標的とする抗インフルエンザ剤であるアマンタジンおよびその誘導体である。適用後短時間で、ウイルスの耐性変種が生成される。他の例は、リレンザのような、インフルエンザウイルスの表面タンパク質であるノイラミニダーゼを阻害するインフルエンザ感染症の新規治療薬である。患者において、リレンザ耐性変種が既に見いだされている(Gubareva et al., J Infect Dis 178, 1257-1262, 1998(非特許文献1))。

30

【0004】

先行技術の抗ウイルス活性物質の欠点は、それらがウイルス成分を標的としており、このため急速な耐性が起こる(アマンタジンを参照)こと、またはそれらが細胞因子に対してあまりにも広く非特異的に作用して(例えば、メチルトランスフェラーゼ阻害剤)、重大な副作用が予想されることである。

【0005】

最近、新しいクラスの抗ウイルス薬、キャップ依存性エンドヌクレアーゼ阻害剤が同定された。これらの阻害剤は、キャップ依存性エンドヌクレアーゼ(CEN)を標的とし、CENは、インフルエンザウイルスポリメラーゼのPAサブユニットに存在し、ウイルスmRNA合成中の「キャップスナッチング」プロセスを媒介する。パロキサビルマルボキシシルとも呼ばれるS-033188は、インフルエンザの処置について商標名ゾフルーザ(登録商標)の下で2018年10月にFDAによって承認されたCENの強力な選択的な小分子阻害剤である。しかし、ウイルス耐性の最初の症例がパロキサビルマルボキシシルについて既に報告されており、他のCEN阻害剤についても予想される。

40

【0006】

ゲノムが非常に小さく、このため複製に必要な機能のコーディング能力が限定的であることから、全てのウイルスは、その宿主細胞の機能に高度に依存している。ウイルス複製に必要なそのような細胞機能に影響を及ぼすことによって、感染細胞におけるウイルス複製に負の影響を及ぼすことが可能である。このシナリオにおいて、ウイルスが選択圧から

50

逃れるために、欠如している細胞機能を、適応によって、特に変異によって取り替える可能性はない。このことは既に、インフルエンザA型ウイルスについて、細胞キナーゼおよびメチルトランスフェラーゼに対する比較的的特異的な阻害剤によって示されている (Scholtissek and Muller, Arch Virol 119, 111-118, 1991 (非特許文献2))。

【0007】

多数のシグナル伝達経路を細胞が有し、その経路によって、細胞に作用するシグナルが細胞核へと伝達されることは、当技術分野において公知である。それによって細胞は、外部刺激に反応することができ、細胞増殖、細胞活性化、分化、または制御された細胞死に反応することができる。これらのシグナル伝達経路に共通であるのは、少なくとも1つのタンパク質のリン酸化によって活性化した後にシグナルを伝達するキナーゼを少なくとも1つ含む点である。ウイルス感染後に誘発される細胞プロセスを観察すると、多数のDNAおよびRNAウイルスが感染宿主細胞において、明らかにされたシグナル伝達経路、いわゆるRaf/MEK/ERKキナーゼシグナル伝達経路を選択的に活性化することが見いだされている (Benn et al., J Virol 70, 4978-4985, 1996 (非特許文献3); Bruder and Kovcsdi, J Virol 71, 398-404, 1997 (非特許文献4); Popik and Pitha, Virology 252, 210-217, 1998 (非特許文献5); Rodems and Spector, J Virol 72, 9173-9180, 1998 (非特許文献6))。このシグナル伝達経路は、細胞における最も重要なシグナル伝達経路の1つであり、増殖および分化プロセスにおいて重要な役割を果たす。増殖因子によって誘発されるシグナルは、セリン/トレオニンキナーゼRafから連続的リン酸化によって、二重特異性キナーゼMEK (MAPキナーゼキナーゼ/ERKキナーゼ) に伝達され、最終的にキナーゼERK (細胞外シグナル調節キナーゼ) に伝達される。一方、Rafのキナーゼ基質としては、MEKのみが知られており、MEKの唯一の基質としてERKアイソフォームが同定されたが、ERKは多数の基質をリン酸化することができる。これらには、例えば細胞の遺伝子発現が直接影響を受ける転写因子が属する (Cohen, Trends in Cell Biol 7, 353-361, 1997 (非特許文献7); Robinson and Cobb, Curr. Opin. Cell Biol 9, 180-186, 1997 (非特許文献8); Treisman, Curr. Opin. Cell Biol 8, 205-215, 1996 (非特許文献9))。

【0008】

先行技術を考慮すると、特に耐性の形成を回避するために、ウイルス疾患、特にインフルエンザウイルスによって引き起こされる疾患の処置において有効なさらなる化合物および組成物が必要であることは明白である。

【0009】

この点、ウイルス疾患、特にインフルエンザの治療におけるMEK阻害剤の有用性に関する進行中の研究により、このクラスの化合物は、ウイルス自体ではなく、宿主細胞の細胞成分に向けられるため、標準的な抗ウイルス処置の欠点を回避することが明らかになっている。この理由から、MEK阻害剤に対する耐性は観察されていない。WO2001/076570 (特許文献1) には、(-)RNAウイルスによって (特にインフルエンザウイルスによって) 引き起こされる感染症をMEK阻害剤により処置または予防するコンセプトが提供されている。WO2014/056894 (特許文献2) には、インフルエンザウイルス感染症の処置または予防において使用するための、AZD-6244、AZD-8330、RDEA-119、GSK-1120212 (トラメチニブ)、GDC-0973 (コピメチニブ)、CI-1040、PD-0325901、RO-5126766、MSC1936369 (AS-703026) などの特定のMEK阻害剤が提供されている。WO2015/173788A1 (特許文献3) では、インフルエンザウイルスおよび細菌の重感染を処置する方法における使用のためのMEK阻害剤が開示されている。加えて、WO2019/076947 (特許文献4) では、ウイルス感染症の予防および/または処置のための方法における使用のための新しいMEK阻害剤、PD-0184264 (ATR-002としても公知) が開示されている。

【0010】

それにもかかわらず、ウイルス感染症の処置および予防のためのさらなる組成物および化合物の提供する必要性が依然として存在している。

10

20

30

40

50

【先行技術文献】

【特許文献】

【0011】

【特許文献1】WO2001/076570

【特許文献2】WO2014/056894

【特許文献3】WO2015/173788A1

【特許文献4】WO2019/076947

【非特許文献】

【0012】

【非特許文献1】Gubareva et al., J Infect Dis 178, 1257-1262, 1998

10

【非特許文献2】Scholtissek and Muller, Arch Virol 119, 111-118, 1991

【非特許文献3】Benn et al., J Virol 70, 4978-4985, 1996

【非特許文献4】Bruder and Kovesdi, J Virol 71, 398-404, 1997

【非特許文献5】Popik and Pitha, Virology 252, 210-217, 1998

【非特許文献6】Rodems and Spector, J Virol 72, 9173-9180, 1998

【非特許文献7】Cohen, Trends in Cell Biol 7, 353-361, 1997

【非特許文献8】Robinson and Cobb, Curr. Opin. Cell Biol 9, 180-186, 1997

【非特許文献9】Treisman, Curr. Opin. Cell Biol 8, 205-215, 1996

【発明の概要】

【0013】

20

本発明において、キャップ依存性エンドヌクレアーゼ阻害剤と組み合わせてのウイルス感染症の処置または予防におけるMEK阻害剤の使用は、ウイルス感染症の有効な処置をもたらすことが分かった。具体的には、MEK阻害剤PD-0184264をパロキサビルマルボキシールと一緒に投与した場合、相乗効果が見られた。

【0014】

本発明の文脈において、MEK阻害剤は、CI-1040、PD-0184264、GSK-1120212、GDC-0973、PLX-4032、AZD6244、AZD8330、AS-703026、RDEA-119、RO-5126766、RO-4987655、PD-0325901、TAK-733、AS703026、PD98059およびPD184352またはその薬学的に許容される塩もしくは代謝産物からなる群より選択され得る。好ましい組み合わせにおいて、MEK阻害剤はCI-1040またはPD-0184264であり、キャップ依存性エンドヌクレアーゼ阻害剤はパロキサビルマルボキシールである。

30

【0015】

好ましい使用は、インフルエンザウイルスのようなマイナス鎖RNAウイルスによって引き起こされるウイルス感染症の処置または予防である。インフルエンザウイルスは、インフルエンザA型ウイルスまたはインフルエンザB型ウイルスであり得る。本発明の文脈において、MEK阻害剤は、キャップ依存性エンドヌクレアーゼ阻害剤と同時に、その前に、またはその後に投与され得る。

【0016】

さらに、医薬としての使用のための、好ましくはインフルエンザのようなウイルス疾患の処置または予防のための、MEK阻害剤またはその薬学的に許容される塩もしくは代謝産物とキャップ依存性エンドヌクレアーゼ阻害剤とを含む薬学的組成物を開示する。

40

【図面の簡単な説明】

【0017】

【図1】インフルエンザウイルスH1N1野生型(白色)およびH1N1-H275Y(灰色)に対するモック対照と比較してのオセルタミビルおよびCI-1040の抗ウイルス活性を示す。

【図2】図2a~bは、インフルエンザウイルスH1N1 WT(白色)およびH11-PA-I38T(灰色)ならびにH3N2-WT(白色)およびH3N2-PA-I38T(灰色)に対するモック対照と比較してのオセルタミビルおよびパロキサビルマルボキシールの抗ウイルス活性を示す。

【図3-1】図3a~dは、ATR002およびパロキサビルマルボキシールの相乗効果を示す

50

。MEK阻害剤(ATR002)とバロキサビルマルボキシル(BLXM)との組み合わせを4x4行列(D)で試験し、全ての値をモック感染対照(DMSO)に対して正規化した。等高線および表面プロットを、3つの異なるシナジーマデル：A) HAS；B) BlissおよびC) Loeweを用いてデータを処理する際にCombeneFitによって作成した。25を超えるシナジースコアを有する領域はマークが表示されている。

【図3-2】図3-1の説明を参照のこと。

【図3-3】図3-1の説明を参照のこと。

【図4】図4aは、x軸上の影響されたフラクション(Fa)に対するy軸上のLog(CI)としてプロットされたシナジ-拮抗作用を示す。図4bは、インフルエンザウイルスに対するバロキサビルマルボキシル(BLXM)およびATR002の薬物減少指数(DRI)を示す。

10

【発明を実施するための形態】

【0018】

詳細な説明

以下の説明は、本発明を理解する際に有用でありうる情報を含む。本明細書において提供される情報のいずれも、特許を請求する本発明に対する先行技術であること、もしくはそれらに関連することを自認するものではなく、または具体的もしくは非明示的に参照されるいずれの刊行物も先行技術であると自認するものではない。

【0019】

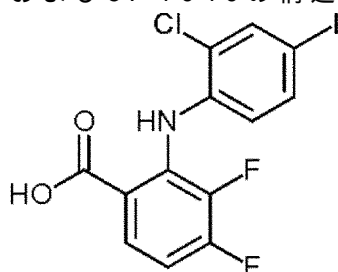
「MEK阻害剤」は、本明細書において使用される場合、MEK(分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼキナーゼ)を阻害することにより、細胞におけるまたは対象における分裂促進性シグナル伝達カスケードRaf/MEK/ERKを阻害する。このシグナル伝達カスケードは、ウイルス複製を促進するために、多くのウイルス、特にインフルエンザウイルスによって乗っ取られる。それゆえ、ボトルネックMEKでのRaf/MEK/ERK経路の特異的遮断はウイルス、特にインフルエンザウイルスの増殖を減弱させる。さらに、MEK阻害剤は毒性が低く、ヒトでの有害な副作用をほとんど示さない。ウイルス耐性を誘発する傾向もない(Ludwig, 2009)。特に好ましいMEK阻害剤は、ATR-002としても公知のPD-0184264である。

20

【0020】

MEK阻害剤は、好ましくは、CI-1040、PD-0184264、GSK-1120212、GDC-0973、PLX-4032、AZD6244、AZD8330、AS-703026、RDEA-119、RO-512676、RO-4987655、PD-0325901、TAK-733、AS703026、PD98059およびPD184352またはその薬学的に許容される塩もしくは代謝産物より選択される。これらのMEK阻害剤は当技術分野において公知であり、例えば、Fremin and Meloche (2010), J. Hematol. Oncol. 11;3:8の表1に記載されている。以下において、PD-0184264およびCI-1040の構造式を参考のために示す。

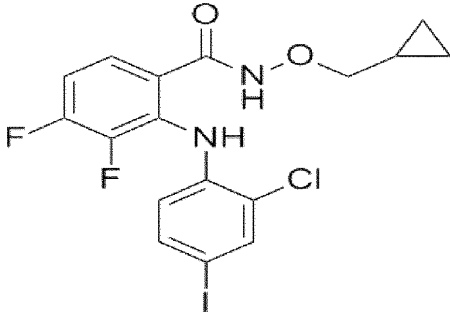
30



40

PD-0184264の構造式

50



10

CI-1040の構造式

2-(2-クロロ-4-ヨードフェニルアミノ)-N-(シクロプロピルメトキシ)-3,4-ジフルオロベンズアミド

【0021】

「代謝産物」は、本明細書において使用される場合、例えば肝臓中における、対象によるMEK阻害剤の分解中に生じる、MEK阻害剤の代謝の中間最終産物に関する。好ましい態様において、MEK阻害剤はCI-1040の代謝産物であり、例えば、PD-0184264は、MEK阻害剤CI-1040の代謝産物である。

【0022】

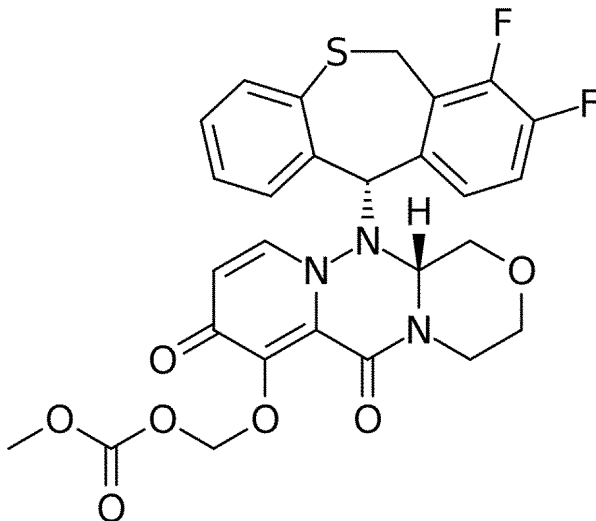
「キャップ依存性エンドヌクレアーゼ(CEN)阻害剤」は、サブユニットPA、PB1およびPB2からなるインフルエンザウイルスのヘテロ三量体RNA依存性ポリメラーゼのPAサブユニットのN末端ドメインに位置するCENを阻害する。これはウイルス転写および複製に不可欠である。「キャップスナッチング」のプロセスにおいて、ウイルスmRNA合成は、宿主mRNAのキャップ構造へのPB2結合、続いてのCENによるショートキャップドオリゴヌクレオチド切断によって開始される。興味深いことに、CENは、インフルエンザウイルス株間で十分に保存されており、従って、理想的な抗インフルエンザウイルス薬標的であると考えられる。

20

【0023】

好ましい態様において、CEN阻害剤は、インフルエンザの処置についてのファースト・イン・クラスの抗ウイルス薬である、パロキサビルマルボキシル(以前はS-033188とも表示された)である。経口投与後、パロキサビルマルボキシルは、CENへ結合するその活性形態(パロキサビル酸)へ代謝され得る。以下の構造式はパロキサビルマルボキシルを表す。

30



40

パロキサビルマルボキシル

【0024】

50

本発明の目的のために、上記で定義された活性化合物(MEK阻害剤および/またはCEN阻害剤)はまた、薬学的に許容されるその塩を含む。本明細書において用いられる「薬学的または美容的に許容される塩」という語句は、所望の投与形態にとって安全かつ効果的な本発明の化合物の塩を意味する。薬学的に許容される塩は、塩酸、リン酸、酢酸、シュウ酸、酒石酸などに由来するものなどの陰イオンと共に形成されるもの、およびナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、水酸化第二鉄、イソプロピルアミン、トリエチルアミン、2-エチルアミノエタノール、ヒスチジン、プロカインなどに由来するものなどの陽イオンと共に形成されるものを含む。

【0025】

本明細書において既に概説したように、インフルエンザウイルス(IV)感染症は、依然として世界中で公衆衛生上の懸念である。現在、ウイルス自体を標的とする全ての利用可能なワクチンおよび抗ウイルス薬は、耐性を発現する傾向がある。インフルエンザウイルスは、Raf/MEK/ERKシグナル経路のようなウイルスのライフサイクルに關与する細胞経路を調節および制御することができ、vRNPの核外輸送はウイルス誘発活性化に強く依存することが、証明されている。このラインに沿って、本発明者らは、インビトロおよびインビボレベルにわたって、インフルエンザウイルスに対する、CI-1040の活性代謝産物であるMEK阻害剤PD0184264(ATR002)の抗ウイルスポテンシャルを以前実証した(実施例1、WO2019/076947も参照のこと)。キャップ依存性エンドヌクレアーゼタンパク質を阻害するように設計された、新たに認可された抗ウイルス薬、いわゆるパロキサビルマルボキシル(ゾフルーザ)は、オセルタミビル耐性株を含む、広範囲のインフルエンザウイルスにおいて効能を示した。しかし、新たに認可された薬物に対する耐性変種の出現が既に報告されている。

10

20

【0026】

実施例1および図1に示されるように、オセルタミビルおよびCI-1040は両方とも、インフルエンザA/Mississippi/3/2001(H1N1)の野生型(wt)株に対して有効である。対照的に、ノイラミニダーゼ(NA)遺伝子中にH275Y突然変異を有する変異インフルエンザ株に対する両方の薬物の抗ウイルスポテンシャルを調べる間に、オセルタミビル有効性の大幅な減少が観察された。CI-1040は、対照的に、野生型株において観察されたものに匹敵する抗ウイルス効果を示した。さらにATR002(CI-1040の活性代謝産物)の潜在的な抗ウイルス活性を評価するために、本発明者らは、キャップ依存性エンドヌクレアーゼタンパク質を阻害するように設計されている新たに認可された抗インフルエンザウイルス薬パロキサビルマルボキシル(BLXM)に対してATR002の抗ウイルス活性を比較した。図2Aに示されるように、BLXMは、ウイルス力価のほぼ完全な低下を伴って野生型インフルエンザrgA/Giessen/6/09(H1N1-WT)に対して非常に強力であることが分かり、一方、ATR002活性は13%より低かった。逆に、変異株rgA/Giessen/6/09(H1N1)-PA-I38Tを使用して調べた場合、BLXM活性は37%より低かったが、ATR002は、野生型において見られたのと同じ効果を示した。同様に、rgA/Victoria/3/75(H3N2-WT)およびrgA/Victoria/3/75(H3N2-PA-I38T)を用いて抗ウイルス活性を調べる間に(図2B)、ATR002は両方の変異体に対してその効力を明らかにし、一方、BLXMは突然変異体においてその活性の約41%を失った。

30

40

【0027】

最近認可された抗インフルエンザ薬パロキサビルマルボキシルおよび潜在的なMEK阻害剤(ATR002)の両方がインフルエンザ処置についての治療選択肢と考えられ得ると仮定して、本発明者らは、実施例2において、これら2つの薬物の組み合わせが抗ウイルス活性を増大させるかどうかを調べた。各薬物の個々の処置と比較してのウイルス力価の減少によって示されるように、BLXM(0.008および0.04 nM)と組み合わせられた場合、ATR002の種々の濃度(0.4、2、および10 μM)で抗ウイルス活性の驚くべき増加がある。さらに、より低い濃度のATR002およびBLXMの組み合わせが、低CI値を伴って強力な相乗効果をもたらすことが、Chou-Talalayモデルから推測することができる(図4)。これらのデータは、最も広く使用されているモデル(HAS、Bliss、およびLoewe)と一致

50

しており、これらはまた、より高い用量での組み合わせは、相乗効果よりもむしろより強い相加効果をもたらすことを明らかにした(図3A~C)。

【0028】

従って、本発明者らは、驚くべきことに、MEK阻害剤およびCEN阻害剤の併用投与は、ウイルス疾患の予防および/または処置において予想外のシナジーをもたらし、特に、MEK阻害剤およびCEN阻害剤の併用は、インフルエンザA型ウイルスおよび/またはB型ウイルスの阻害において相乗効果をもたらすことを見出した。実際に、本明細書において示されるように、MEK阻害剤CI-1040、PD-0184264 GSK-1120212、GDC-0973、PLX-4032、AZD6244、AZD8330、AS-703026、RDEA-119、RO-5126766、RO-4987655、PD-0325901、TAK-733、AS703026、PD98059およびPD184352は、経口で利用可能であり、少なくとも第I相臨床試験中であるか、またはそのいくつかはさらに第II相臨床試験中であるか、またはさらにPLX-4032のように癌に対して販売が承認されているが、パロキサビルなどのCEN阻害剤と併用すると、インフルエンザA型ウイルスおよび/またはインフルエンザB型ウイルスの両方に対して抗ウイルス活性を有することを証明している。併用処置は、本明細書に記載されるHAS、BlissおよびLOEWE法によって決定されたように、パロキサビルの抗ウイルス活性を有意に増加させ、相乗的抗ウイルス効果をもたらした(図3)。総合すると、結果は、MEK阻害剤(具体的にはPD-0184264およびCI-1040)と併用すると、パロキサビルの抗ウイルス活性が増加することを証明している。これらのデータは、インフルエンザに対する新規抗ウイルス治療計画を開発する途中の今後のインビトロおよびインビボ前臨床研究にとって有望である。

10

20

【0029】

従って、本発明の併用法は、ウイルス疾患の予防および/または処置において、特にマイナス鎖RNAウイルスによって引き起こされる感染症、さらに特に、インフルエンザウイルスによって引き起こされるウイルス疾患の予防および/または処置において相乗効果を提供する方法であることが、本発明者らによって見いだされた。なおさらに特には、A型またはB型インフルエンザウイルスの予防および/または処置においてである。

【0030】

上述のように、本発明は、キャップ依存性エンドヌクレアーゼ阻害剤と組み合わせでのウイルス感染症の予防および/または処置の方法における使用のためのMEK阻害剤に関する。本発明は、さらに、医薬としての使用のための、MEK阻害剤またはその薬学的に許容される塩もしくは代謝産物とキャップ依存性エンドヌクレアーゼ阻害剤とを含む薬学的組成物に関する。実施例に示されるように、キャップ依存性エンドヌクレアーゼ阻害剤と組み合わせでのMEK阻害剤は、驚くべき相乗的抗ウイルス効果を示す。

30

【0031】

本発明の薬学的組成物は、相乗効果を生じる量で投与されうる。

【0032】

「シナジー」または「相乗効果」は、相加的を超える効果として定義されうる(Chou, 2006, Pharmacolog Reviews, 58: 621-681)。薬物の併用における相乗的相互作用は、それらによって臨床で用いた場合の効能の増加、用量の減少、副作用毒性の減少、および最小限の耐性獲得が起こりうることから、非常に望ましく、追求されている(Chou, 2006)。併用治療における薬物相互作用を評価するための2つの最も一般的な方法は、アイソボグラムおよび併用係数(CI)である(Zhao et al., 2004, Clinical Cancer Res 10:7994-8004)。薬物耐性の獲得に対抗するためおよび薬物の用量を最小限にするために薬物を併用する癌治療の分野および抗ウイルス治療の分野の両方における多数の試験が、シナジーを評価するためにCI指標を用いている。CIは、Chou and Talalay 1984 (Adv. Enzyme Regul. 22:27-55)のアプローチに基づいており、半数影響原理(median effect principle)および多剤効果の式(multiple-drug effect equation)に依存している。CIは、プログラムCompuSyn(CompuSyn, Paramus, N.J.)を用いて容易に算出することができる。Chou自身(Chou 2006)は、CI値が0.

40

50

85 ~ 0.9であれば相互作用はわずかに相乗的、CI値が0.7 ~ 0.85であれば中等度に相乗的、CI値が0.3 ~ 0.7であれば相乗的、CI値が0.1 ~ 0.3であれば強く相乗的、およびCI値が< 0.1であれば、非常に強く相乗的であると定義している。癌治療の文献では、相乗作用を定義するCIの値は異なりえて、例えばLin et al., 2007, Carcinogenesis 28: 2521-2529では、薬物間の相乗作用はCI < 1として定義され、Fischel et al., 2006, Preclinical Report 17: 807-813では、相乗作用はCI < 0.8として定義された。抗ウイルス治療の分野では、類似の数値が用いられている。例えば、Wyles et al., 2008, Antimicrob Agents Chemotherapy 52: 1862-1864では、相乗作用はCI < 0.9として定義され、Gantlett et al., 2007, Antiviral Res 75:188-197でも相乗作用はCI < 0.9として定義された。これらの参照文献に基づき、相乗作用をCI値 0.9として定義することができる。実施例2に示されるように、Chou-Talalay、ならびにCombeneftソフトウェアによって計算されるハイエスト・シングル・エージェント (highest single agent) (HSA)、BlissおよびLoeweモデルは、PD-0184264およびパロキサピルマルボキシルの組み合わせの相乗作用を示す。ハイエスト・シングル・エージェント (HSA)、BlissおよびLoeweモデルは、例えば、Fouquier and Guedj 2015 (Pharmacology Research & Perspectives 3(3):e00149)に説明および概説されている。

10

【0033】

本発明のMEK阻害剤およびCEN阻害剤は、ウイルス疾患の処置において、二つの薬物の単純な相加的効果として予想される、個別にまたは併用して投与したMEK阻害剤およびCEN阻害剤の各々の相加的効果より大きい相乗効果を有しうる。そのような場合、MEK阻害剤の相乗的有効量は、CEN阻害剤なしでMEK阻害剤を投与した場合のウイルス感染症の処置に必要な量より少ない。同様に、CEN阻害剤の相乗的有効量は、MEK阻害剤なしでCEN阻害剤を投与した場合のウイルス感染症の処置に必要な量より少ない。MEK阻害剤とCEN阻害剤の相乗効果を生じる量は、相乗効果因子 (CI値) によって定義される。相乗効果因子 (CI値) によって定義する場合、CIは、約0.9未満、または約0.85未満、または約0.8未満、または約0.75未満、または約0.7未満、または約0.65未満、または約0.6未満、または約0.55未満、または約0.5未満、または約0.45未満、または約0.4未満、または約0.35未満、または約0.3未満、または約0.25未満、または約0.2未満、または約0.15未満、または約0.1未満である。

20

30

【0034】

本発明によるMEK阻害剤とCEN阻害剤の併用使用は、ウイルスまたはウイルス株が、耐性、特にCEN阻害剤に対する耐性を示すかまたは耐性を獲得しているウイルス疾患の場合にも有益な治療効果を提供する。加えて、併用使用では、耐性の獲得が全く観察されないか、または遅れることから、併用使用は、時間を経ても両方の薬物の効能を保存するように作用しうる。

【0035】

CEN阻害剤としてのパロキサピルマルボキシルは、本発明の方法および/または薬学的組成物においてMEK阻害剤としてのCI-1040と組み合わせて使用され得る。CEN阻害剤としてのパロキサピルマルボキシルは、本発明の処置および/または薬学的組成物における使用においてMEK阻害剤としてのPD-0184264と組み合わせて使用され得る。CEN阻害剤としてのパロキサピルマルボキシルは、本発明の処置および/または薬学的組成物における使用においてMEK阻害剤としてのGSK-1120212と組み合わせて使用され得る。CEN阻害剤としてのパロキサピルマルボキシルは、本発明の処置および/または薬学的組成物における使用においてMEK阻害剤としてのGDC-0973と組み合わせて使用され得る。CEN阻害剤としてのパロキサピルマルボキシルは、本発明の処置および/または薬学的組成物における使用においてMEK阻害剤としてのPLX-4032と組み合わせて使用され得る。CEN阻害剤としてのパロキサピルマルボキシルは、本発明の処置および/または薬学的組成物における使用においてMEK阻害剤としてのAZD6244と組み合わせて使用され得る。CEN阻害剤としてのパロキサピルマルボキシルは、本発明の処置および

40

50

／または薬学的組成物における使用においてMEK阻害剤としてのAZD8330と組み合わせて使用され得る。CEN阻害剤としてのバロキサビルマルボキシシルは、本発明の処置および／または薬学的組成物における使用においてMEK阻害剤としてのAS-703026と組み合わせて使用され得る。CEN阻害剤としてのバロキサビルマルボキシシルは、本発明の処置および／または薬学的組成物における使用においてMEK阻害剤としてのRDEA-119と組み合わせて使用され得る。CEN阻害剤としてのバロキサビルマルボキシシルは、本発明の処置および／または薬学的組成物における使用においてMEK阻害剤としてのRO-5126766と組み合わせて使用され得る。CEN阻害剤としてのバロキサビルマルボキシシルは、本発明の処置および／または薬学的組成物における使用においてMEK阻害剤としてのRO-4987655と組み合わせて使用され得る。CEN阻害剤としてのバロキサビルマルボキシシルは、本発明の処置および／または薬学的組成物における使用においてMEK阻害剤としてのPD-0325901と組み合わせて使用され得る。CEN阻害剤としてのバロキサビルマルボキシシルは、本発明の処置および／または薬学的組成物における使用においてMEK阻害剤としてのTAK-733と組み合わせて使用され得る。CEN阻害剤としてのバロキサビルマルボキシシルは、本発明の処置および／または薬学的組成物における使用においてMEK阻害剤としてのAS703026と組み合わせて使用され得る。CEN阻害剤としてのバロキサビルマルボキシシルは、本発明の処置および／または薬学的組成物における使用においてMEK阻害剤としてのPD98059と組み合わせて使用され得る。CEN阻害剤としてのバロキサビルマルボキシシルは、本発明の処置および／または薬学的組成物における使用においてMEK阻害剤としてのPD184352と組み合わせて使用され得る。好ましくは、本発明の処置および本発明の薬学的組成物における使用において、バロキサビルマルボキシシルとPD-0184264(ATR-002)とを併用する。

【0036】

本発明の使用において、MEK阻害剤およびCEN阻害剤は同時に、あらかじめ、または引き続いて投与される。MEK阻害剤およびCEN阻害剤は、好ましくは同時に投与される。それらは1つの製剤としてまたは異なる製剤で投与されうる。1つの製剤はまた、本発明の薬学的組成物として本明細書において記載される。

【0037】

本発明のMEK阻害剤およびCEN阻害剤の併用投与によって予防または処置されるウイルス感染症は、好ましくは、マイナス鎖RNAウイルスによって引き起こされる感染症である。より好ましくは、ウイルス疾患は、インフルエンザウイルスによって引き起こされ、さらにより好ましくは、ウイルス疾患は、インフルエンザA型ウイルスまたはインフルエンザB型ウイルスによって引き起こされる。インフルエンザウイルスは、例えば、H1N1、H5N1、H7N7、およびH7N9である。場合によっては、ウイルスは、CEN阻害剤のような抗ウイルス剤に対して耐性を獲得している。インフルエンザA型ウイルスサブタイプH1N1、H2N2、H3N2、H5N6、H5N8、H6N1、H7N2、H7N7、H7N9、H9N2、H10N7、N10N8および／またはH5N1が特に好ましい。

【0038】

MEK阻害剤とCEN阻害剤を併用して用いる本発明の処置における使用または薬学的組成物における使用において、患者は、好ましくは、哺乳動物または鳥類である。適した哺乳動物の例には、マウス、ラット、ウシ、ヤギ、ヒツジ、ブタ、イヌ、ネコ、ウマ、モルモット、イヌ科動物、ハムスター、ミンク、アザラシ、クジラ、ラクダ、チンパンジー、アカゲザル、およびヒトが挙げられるがこれらに限定されるわけではない。適した鳥類の例には、例を挙げれば、七面鳥、ニワトリ、ガチョウ、カモ、コガモ、マガモ、ムクドリ、オナガガモ、カモメ、ハクチョウ、ホロホロチョウ、または水鳥が挙げられるがこれらに限定されるわけではない。複数のヒト患者は本発明の特定の態様である。1人のヒト患者は本発明の特定の態様である。患者および対象という用語は交換可能に用いられる。

【0039】

本発明のMEK阻害剤は、経口的に、静脈内に、胸腔内に、筋肉内に、局所的に、または吸入によって投与されうる。好ましくは、MEK阻害剤は、吸入によってまたは経口的

に投与される。

【0040】

本発明のCEN阻害剤は、経口的に、静脈内に、胸腔内に、筋肉内に、局所的に、または吸入によって投与されうる。好ましくは、CEN阻害剤は、吸入によってまたは経口的に投与される。

【0041】

MEK阻害剤およびCEN阻害剤が、本発明の薬学的組成物中のような1つの製剤中に存在する場合、製剤は、経口的に、静脈内に、胸腔内に、筋肉内に、局所的に、または吸入によって投与されうる。好ましくは、製剤は、経口的にまたは吸入によって投与される。

【0042】

本発明の処置における使用は、MEK阻害剤またはその薬学的に許容される塩の治療的有効量と、同時的または逐次的な本明細書に記載されるようなCEN阻害剤とによる処置を必要とする患者を処置する段階を含み得る。

【0043】

1つの局面において、(1)MEK阻害剤またはその代謝産物またはその薬学的に許容される塩である化合物の治療的有効量を、処置を必要とする患者に投与する段階；および同時または逐次的に(2)パロキサビルマルボキシルまたはその薬学的に許容される塩の治療的有効量を該患者に投与する段階を含む、患者におけるウイルス感染症を処置する方法が提供される。言い換えれば、この局面に従って、方法は、MEK阻害剤またはその代謝産物またはその薬学的に許容される塩の治療的有効量を、パロキサビルマルボキシルまたはその薬学的に許容される塩による処置を受けている患者に投与する段階、または、パロキサビルマルボキシルまたはその薬学的に許容される塩の治療的有効量を、MEK阻害剤またはその代謝産物またはその薬学的に許容される塩による処置を受けている患者に投与する段階を含む。

【0044】

本発明の処置における使用の1つの態様において、化合物MEK阻害剤は、有効治療投薬量で経口または吸入により投与されうるが、CEN阻害剤は、承認された処方情報に提供される用量および投与スケジュール、またはそれより少ない用量および投与スケジュールで、好ましくは、(相乗効果に起因して)より低い用量で投与されうる。例えば、パロキサビルマルボキシルのラベルに従って、パロキサビルマルボキシルは、40 mg(40~80 kgの対象体重)または80 mg(80 kgを超える対象体重)のカプセルで投与される。単回用量としての40 mgまたは80 mgの投薬量が、成人および青年の標準投薬量である。パロキサビルマルボキシルをMEK阻害剤と併用して投与する場合には、より低い投薬量が用いられうる。一態様において、MEK阻害剤の治療的有効量は、例えば、0.1 mg~2000 mg、0.1 mg~1000mg、0.1~500mg、0.1~200mg、30~300mg、0.1~75mg、0.1~30 mgである。

【0045】

本明細書において議論される逐次的併用治療において、好ましくは、逐次的併用における薬物は、第一の薬物の血漿中レベルが実質的に減少するかまたは消失した後に第二の薬物が投与されるように、その薬物動態プロファイルに従って投与される。MEK阻害剤およびCEN阻害剤の薬物動態プロファイルは、一般的に当技術分野において公知である。

【0046】

上記に概説したように、本発明は、医薬としての使用のための、MEK阻害剤またはその薬学的に許容される塩もしくは代謝産物とキャップ依存性エンドヌクレアーゼ阻害剤とを含む薬学的組成物をさらに提供する。1つの具体的な態様において、本発明の薬学的組成物は、ウイルス感染症、好ましくはマイナス鎖RNAウイルスによって、より好ましくはインフルエンザウイルスによって、最も好ましくはインフルエンザA型またはインフルエンザB型ウイルスによって引き起こされる感染症の予防および/または処置における使用のためのものである。

【0047】

10

20

30

40

50

本発明の薬学的組成物は、経口投与可能な懸濁剤または錠剤、点鼻スプレー、滅菌注射可能調製物（静脈内、胸腔内、筋肉内）、例えば滅菌の注射可能な水性もしくは油性の懸濁剤、または坐剤の剤形でありうる。懸濁剤として経口投与する場合、これらの組成物は、薬学的製剤の技術分野において利用可能な技術に従って調製され、増量剤としての結晶セルロース、懸濁化剤としてのアルギン酸またはアルギン酸ナトリウム、増粘剤としてのメチルセルロース、および当技術分野において公知の甘味料/香味料を含みうる。即時放出錠として、これらの組成物は、結晶セルロース、リン酸二カルシウム、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、およびラクトース、ならびに/または当技術分野において公知の他の賦形剤、結合剤、増量剤、崩壊剤、希釈剤、および滑沢剤を含みうる。注射可能な液剤または懸濁剤は、マンニトール、1,3-ブタンジオール、水、リンゲル液、または等張塩化ナトリウム溶液などの、適した非毒性の非経口で許容される希釈剤もしくは溶媒、または合成モノもしくはジグリセリドを含む滅菌の無刺激の固定油、およびオレイン酸を含む脂肪酸などの、適した分散剤もしくは湿潤剤および懸濁化剤を用いて、公知の技術分野に従って製剤化されうる。本発明の方法における薬学的化合物は、任意の適した単位投与剤形で投与することができる。適した経口製剤は、本発明の薬学的組成物の文脈においても、錠剤、カプセル剤、懸濁剤、シロップ剤、チューインガム、ウェーハ、エリキシル剤、およびその他の剤形でありうる。結合剤、賦形剤、滑沢剤、および甘味料または香味料などの薬学的に許容される担体を、経口薬学的組成物に含めることができる。望ましければ、特別な剤形の味、色、および形状を変化させるために慣例的な物質を同様に含めることができる。

10

20

【0048】

注射可能製剤に関して、薬学的組成物は、適したバイアルまたはチューブ中で適した賦形剤と混合される凍結乾燥粉末でありうる。診療所で使用する前に、凍結乾燥粉末を適した溶媒系に溶解することによって、薬物を再構成して、静脈内または筋肉内注射にとって適した組成物を形成してもよい。

【0049】

1つの態様において、薬学的組成物は、上記のように、治療的有効量（例えば、0.1 mgから2000 mg、0.1 mgから1000 mg、0.1から500 mg、0.1から200 mg、30から300 mg、0.1から75 mg、0.1から30 mg）のMEK阻害剤および治療的有効量のCEN阻害剤を有する経口投与可能な剤形（例えば、錠剤またはカプセル剤またはシロップ剤等）でありうる。例えば、パロキサビルマルボキシルのラベルに従って、パロキサビルマルボキシルは、40 mg(40~80 kgの対象体重)または80 mg(80 kgを超える対象体重)のカプセルで投与される。単回用量としての40 mgまたは80 mgの投薬量が、成人および青年の標準投薬量である。パロキサビルマルボキシルをMEK阻害剤と併用して投与する場合には、より低い投薬量が用いられうる。

30

【0050】

各活性化合物の治療的有効量は、当業者に明らかであるように、用いられる化合物の活性、患者の体内での活性化合物の安定性、軽減されるべき状態の重症度、処置される患者の体重、投与経路、体が活性化合物を吸収、分布、および排泄する容易さ、処置される患者の年齢および感受性、有害事象、ならびにその他を含むがこれらに限定されるわけではない要因に応じて変化しうる。様々な要因が時間と共に変化するにつれて、投与量を調節することができる。

40

【0051】

本発明の別の局面に従って、(1) PD-0184264、PLX-4032、AZD6244、AZD8330、AS-703026、GSK-1120212、RDEA-119、RO-5126766、RO-4987655、CI-1040、PD-0325901、GDC-0973、TAK-733、PD98059およびPD184352などのMEK阻害剤の単位投与剤形と、(2) パロキサビルなどのCEN阻害剤の単位投与剤形とを区画のある容器中に含む薬学的キットが提供される。任意で、キットは本発明による併用治療法においてキットを用いるための説明書をさらに含む。

【0052】

50

定義

本明細書および以下の特許請求の範囲の全体を通して、本文がそれ以外であることを必要としている場合を除き、「含む (comprise)」という用語ならびに「含む (comprises)」および「含む (comprising)」などのその変化形は、記載される整数もしくは段階または整数もしくは段階の群を含めるが、他の任意の整数もしくは段階または整数もしくは段階の群を除外しないことを示唆していると理解される。本明細書において用いられる場合、「含む (comprising)」という用語は、「含む (containing)」という用語に置き換えることができるか、または場合によっては本明細書において用いられる場合「有する (having)」という用語に置き換えることができる。

【0053】

本明細書において用いられる場合の「からなる」は、特許請求の範囲の要素に明記されていないいかなる要素、段階、または成分も除外する。本明細書において用いられる場合の「本質的にからなる」は、特許請求の範囲の基本的かつ新規特徴に実質的に影響を及ぼさない材料または段階を除外しない。本明細書における各々の例において、「含む」、「本質的にからなる」、および「からなる」という用語はいずれも、他の2つの用語のいずれかと置き換えてもよい。

【0054】

本明細書において用いられる場合、多数の列挙された要素間の「および/または」という接続詞は、個々の要素および複合要素の両方の選択肢を包含すると理解される。例として、2つの要素が「および/または」によってつながっている場合、第一の選択肢は、第二の要素がなくとも第一の要素を適用可能であることを意味する。第二の選択肢は、第一の要素がなくとも第二の要素を適用可能であることを意味する。第三の選択肢は、第一および第二の要素を共に適用可能であることを意味する。これらの選択肢のいずれも、本明細書において用いられる「および/または」という用語の意味に含まれ、それゆえ「および/または」という用語の必要条件を満たすと理解される。複数の選択肢を同時に適用可能であることもまた、本明細書において用いられる「および/または」という用語の意味に含まれ、それゆえ「および/または」という用語の必要条件を満たすと理解される。

【実施例】

【0055】

実施例1：MEK阻害剤と他の標準治療との比較

試薬

A549細胞(ATCC(登録商標)CCL-185(商標))、0.3% triton-x-100、MDCK I細胞(ATCC(登録商標)CRL-2936(商標))、0.1% tween 20、リン酸緩衝食塩水(PBS、Gibcoカタログ番号：14190144)、PBS+10% FCS+ 0.1% tween 20、Infection PBS、Roti(登録商標)-Histofix 10%(Roth、カタログ番号：A146.1) ワーキング溶液4%を調製する、TPCK-トリプシン、一次抗体(抗NP; AA5H、カタログ番号：MCA400)、2x MEM、二次抗体(ペルオキシダーゼ標識抗マウス抗体、カタログ番号：115-035-003)、アルブミン画分V溶液、KPL True Blue(商標)(カタログ番号：5510-0049)、Avicel 2.5%(RC-581、FMC BioPolymer)。

【0056】

方法

1日目

- 1- 2つの24ウェルプレートにプレーティングする
 - a. 細胞型：A549
 - b. 播種密度：0.5x10⁵細胞/ml
- 2- 24時間インキュベートする

【0057】

2日目

- 3- 調製された24ウェルプレートのコンフルエンスを確認する
- 4- 培地を除去し、PBSで2回洗浄する

10

20

30

40

50

【0058】

ウイルス希釈

- 5- ウイルス(力価： 6.0×10^7 pfu/ml)の10倍連続希釈を行う
- 6- 各ウェルに0.001 MOIで接種する
- 7- 45分間インキュベートする

【0059】

被験物質の濃度溶液の調製

- 8- 感染培地へ最終濃度 $2 \mu\text{g/ml}$ でTPCK-トリプシンを添加する

【0060】

ATR002

10

- 被験化合物：ATR002
- 溶媒：DMSO
- 濃度：ストック溶液10 mM、ワーキング溶液：1 mM
- 感染培地中において以下の濃度溶液を調製する：50、10、2、および $0.4 \mu\text{M}$

【0061】

パロキサビルマルボキシシル

- 被験化合物：パロキサビルマルボキシシル(BLXM)
- 濃度：ストック溶液1mM 溶媒：DMSO
- ワーキング溶液：100 nM
- 感染培地中において以下の濃度溶液を調製する：1、0.2、0.04および 0.008 nM

20

【0062】

- 9- 4x4行列で組み合わせを調製する
- 10- 感染培地中において最終濃度1%でDMSO対照を調製する

【0063】

24ウェルプレートおよび試験物質

- 11- インキュベーション後にプレートのコンフルエンスを確認する
- 12- 接種材料を除去する
- 13- 各ウェルへ各濃度溶液1 mlを添加する
- 14- 22時間インキュベートする

【0064】

96ウェルプレートを調製する

30

- 15- 13個の96ウェルプレートを調製する
 - a. 細胞型：MDCK II
 - b. 播種密度： 3×10^5 細胞/ウェル
- 16- 24時間インキュベートする

【0065】

3日目

24ウェルプレートおよび被験物質

- 17- エッペンドルフ1.5 ml中において各チューブ中 $300 \mu\text{l}$ で各濃度の2つのアリコートを作る。1つを -80 C で保存する

40

【0066】

96ウェルプレート(U字型)を調製する

- 18- U字型の各ウェル中に $100 \mu\text{l}$ Infection PBSを添加することによって、前に調製された96ウェルプレートの同数を調製する
- 19- 各列の最初のウェルへ $50 \mu\text{l}$ のその対応する濃度溶液を添加する
 - 各プレートは、陰性および陽性対照に対応する2つの列を有する
- 20- 濃度溶液を各々の最初のウェルへ添加後、最初のウェルから次のウェルへ $50 \mu\text{l}$ 移すことによって連続希釈を作る。最後に、最後の $50 \mu\text{l}$ を捨てる

【0067】

MDCK II 96ウェルプレート

50

- 21- コンフルエンシーを確認する
- 22- 増殖培地を除去し、PBSで2回洗浄する
- 23- U字型96ウェルプレート中において調製された希釈物をMDCK IIプレートへ移す
- 24- 1時間インキュベートする

【0068】

Avicelオーバーレイの調製

- 25- 2x MEM培地および2x Avicelを1:1で混合する
- 26- TPCK-トリプシンを最終濃度2 μ g/mlで添加する
- 27- インキュベーション期間後、接種材料を捨て、100 μ l/ウェルのAvicelオーバーレイを適用する
- 28- 22時間インキュベートする

10

【0069】

4日目

固定および染色

- 29- 22時間後、4%パラホルムアルデヒド溶液で30分間4 にて固定し、PBSで2回洗浄する
- 30- PBS中に調製された0.3% triton-x-100を100 μ l/ウェルで添加し、10分間インキュベートする
- 31- それを捨て、次いで10% FCS(PBS中に新たに調製された)を100 μ l/ウェルで添加する
- 32- 振盪機上で10分間インキュベートする
- 33- それを捨て、次いで50 μ lの一次抗体(抗NP; AA5H)を添加する
- 34- 振盪機上で60分間インキュベートする
- 35- (PBS+ 0.1% tween 20)で5分間洗浄する(3回)
- 36- 50 μ lの二次抗体(ペルオキシダーゼ標識抗マウス抗体)を添加する
- 37- 振盪機上で30~60分間インキュベートする
- 38- (PBS+ 0.1% tween 20)で5分間洗浄する(3回)
- 39- 50 μ lのTrue Blue(商標)を10分間添加する
- 40- 水で洗浄し、次いでそれを乾燥させる
- 41- データ解析を実行する

20

30

【0070】

結果

図1に描写されるように、オセルタミビルおよびCI-1040は、A/Mississippi/3/2001(H1N1)の野生型(wt)株に対して非常に有効である。対照的に、NA遺伝子中にH275Y突然変異を有する変異株に対する両方の薬物の抗ウイルスポテンシャルを実証する間に、オセルタミビル有効性の大幅な減少が観察され、一方、CI-1040は野生株とかなり似た匹敵する抗ウイルス効果を示した。

【0071】

さらにATR002(CI-1040の活性代謝産物)の潜在的な抗ウイルス活性を評価するために、本発明者らは、キャップ依存性エンドヌクレアーゼタンパク質を阻害するように設計された新たに認可された抗インフルエンザウイルス薬パロキサビルマルボキシル(BLXM)に対してATR002の抗ウイルス活性を比較した。図2Aに示されるように、BLXMは、ウイルス力価のほぼ完全な低下を伴って野生型rgA/Giessen/6/09(H1N1-WT)に対して非常に強力であり、一方、ATR002活性は13%より低かった。逆に、変異株rgA/Giessen/6/09(H1N1)-PA-I38Tを使用して調べた場合、BLXM活性は37%より低かったが、ATR002は、野生型において見られたような安定した効果を示した。同様に、rgA/Victoria/3/75(H3N2-WT)およびrgA/Victoria/3/75(H3N2-PA-I38T)を用いて抗ウイルス活性を実証する間に(図2B)、ATR002は両方の変異体に対してその効力を明らかにし、一方、BLXMはその活性の約41%を失った。

40

【0072】

50

実施例2：ATR002およびバロキサビルマルボキシルの相乗効果

材料および方法

薬物

CI-1040の活性代謝産物であるMEK阻害剤ATR-002 (PD0184264) [2-(2-クロロ-4-ヨードフェニルアミノ)-N-3,4-ジフルオロ安息香酸は、ChemCon GmbH (Freiburg, Germany)で合成された。

【0073】

インフルエンザウイルスのキャップ依存性エンドヌクレアーゼであるバロキサビルマルボキシルをHycultec GmbH (Cat: HY-109025)から購入し、製造業者の説明書に従ってワーキング溶液1 mMについて調製した。

10

【0074】

細胞およびウイルス

ヒト肺腺癌細胞(A549、ATCC (登録商標) CCL185 (商標))およびMadin-Darbyイヌ腎臓細胞(MDCK II、ATCC (登録商標) CRL2936 (商標))をATCCから購入し、10% FBSおよび100 U/mlペニシリン-ストレプトマイシンが補われたイスコフ改変ダルベッコ培地(IMDM)中で培養した。

【0075】

インフルエンザウイルスH1N1を、0.001 MOIでウイルス阻害実験において使用した。

【0076】

ウイルス阻害アッセイ

ATR-002またはバロキサビルマルボキシルのような他の薬物に対するインフルエンザウイルスの感受性を、薬物の存在下でFFUの減少を測定することによって決定した。種々の濃度(0.4 ~ 50 μ M)のATR-002および(0.008 ~ 1 nM)バロキサビルマルボキシルを、1 μ g/ml L-トシルアミド2-フェニルエチルクロロメチルケトン(TPCK)処理トリプシンが補われたインフルエンザウイルス感染培地(0.2% BSA、1 mM MgCl₂、0.5 mM CaCl₂、100 U/mLペニシリン、0.1 mg/mLストレプトマイシン、および2 μ g/ml TPCK処理トリプシンが補われたDMEM培地)中において5倍連続希釈を作ることによって調製した。A549細胞(ヒト肺腺癌細胞株(A549、ATCC (登録商標) CCL185 (商標))をATCCから購入し、10% FBSおよび100 U/mLペニシリン-ストレプトマイシンが補われたイスコフ改変ダルベッコ培地(IMDM)中で培養した。細胞を37 °Cおよび5% CO₂雰囲気中に維持し、24ウェルプレート中においてH1N1に感染させ、45分間インキュベートした。インキュベーション後、接種材料を除去し、コンフルエントな単層をPBSで洗浄し、被験薬を含有する感染培地を補った。各処理に対応する細胞培養上清を24時間後に採取し、以前記載されたように(Matrosovich et al., 2006, Virol J. 31(3):63)、MDCK IIを使用するフォーカス減少アッセイへ供した(Madin-Darbyイヌ腎臓細胞(MDCK II、ATCC (登録商標) CRL2936 (商標))は、ATCCから購入し、10% FBSおよび100 U/mLペニシリン-ストレプトマイシンが補われたイスコフ改変ダルベッコ培地(IMDM)中で培養した。細胞は37 °Cおよび5% CO₂雰囲気中に維持した)。

20

30

【0077】

組み合わせ研究からのシナジー/拮抗作用の解析

PD0184264とバロキサビルマルボキシルとの組み合わせを使用した場合の可能性のある相加および相乗効果を決定するために、ウイルス阻害アッセイからのデータを、3つの公開モデル(ハイエスト・シングル・エージェント(HSA)、Bliss、およびLoewe)を用いてシナジー/拮抗作用を同時に評価するCombenefitソフトウェア(Di Veroli et al., 2016, Bioinformatics 32(18):2866-2868)を使用して先ず解析した。

【0078】

また、参照モデルについての用量反応表面を作成するために個々の化合物についての用量反応曲線を含め、それから実験表面とモデル化表面とを次いで比較した。各組み合わせにおいて、モデル化表面からの実験表面の偏差を、シナジー(効果の増加)または拮抗作

40

50

用（効果の減少）の程度を示すパーセンテージスコアに帰着させた。「等高線」および「表面」プロットをシナジー分布についてのグラフィカル出力として選択した。

【0079】

CompuSynソフトウェアを使用するChou-Talalayモデル(Chou, 2010, Cancer Res 70(2):440-446)に従って、データをさらに解析した。ソフトウェアは各薬物組み合わせについての併用係数(CI)を計算し、ここで、CI値<1はシナジーを示し、CI=1は相加的であり、CI>1は拮抗作用を示す。

【0080】

結果

インフルエンザウイルス(IV)感染症は世界中で公衆衛生上の懸念である。現在、ウイルス自体を標的とする全ての利用可能なワクチンおよび抗ウイルス薬は、耐性を発現する傾向がある。インフルエンザウイルスは、Raf/MEK/ERKシグナル経路のようなウイルスのライフサイクルに関与する細胞経路を調節および制御することができ、vRNPの核外輸送はウイルス誘発活性化に強く依存することが、証明されている。このラインに沿って、本発明者らは、インビトロおよびインビボレベルにわたって、インフルエンザウイルスに対する、CI-1040の活性代謝産物であるMEK阻害剤PD0184264(ATR002)の抗ウイルスポテンシャルを以前実証した(実施例1、WO2019/076947も参照のこと)。最近になって、キャップ依存性エンドヌクレアーゼタンパク質を阻害するように設計された、新たに認可された抗ウイルス薬、いわゆるパロキサビルマルボキシル(ゾフルーザ)は、オセルタミビル耐性株を含む広範囲のインフルエンザウイルスにおいて効能を示した。しかし、新たに認可された薬物に対する耐性変種の出現が既に報告されている。

【0081】

最近認可された抗インフルエンザ薬パロキサビルマルボキシルおよび潜在的なMEK阻害剤(ATR002)の両方を治療選択肢と仮定して、本発明者らは、これら2つの薬物の組み合わせが抗ウイルス活性を増大させるかどうかを調べた。驚くべきことに、各薬物の個々の処置と比較してのウイルス力価の減少によって示されるように、BLXM(0.008および0.04 nM)と組み合わせられた場合、ATR002の種々の濃度(0.4、2、および10 μM)で抗ウイルス活性の増加がある。さらに、より低い濃度のATR002およびBLXMの組み合わせが、低CI値を伴って強力な相乗効果をもたらすことが、Chou-Talalayモデルから推測することができる(図4Aおよび表1を参照のこと)。表2および図4Bもまた、薬物用量減少指数(DRI)で表されるように、強力な相乗効果を示す。これらのデータは、最も広く使用されているモデル(HAS、Bliss、およびLoewe)と一致しており、これらはまた、より高い用量での組み合わせは、相乗効果よりもむしろより強い相加効果をもたらすことを明らかにした(図3)。

【0082】

(表1) 薬物組み合わせについての併用係数(CI)値

10

20

30

40

50

濃度 BLXM (nM)	濃度 ATR002 (μ M)	CI	
0.008	0.4	0.17469	
1	10	0.24757	
0.008	10	0.28142	
1	50	0.29305	
0.2	50	0.35104	
0.008	50	0.42303	
0.008	2	0.44177	10
0.2	10	0.63435	
0.04	2	0.91172	
0.04	0.4	1.18204	
1	2	1.31281	
0.2	2	1.62481	
1	0.4	1.94132	
0.2	0.4	2.31597	
0.04	10	2.92652	
0.04	50	3.32808	20

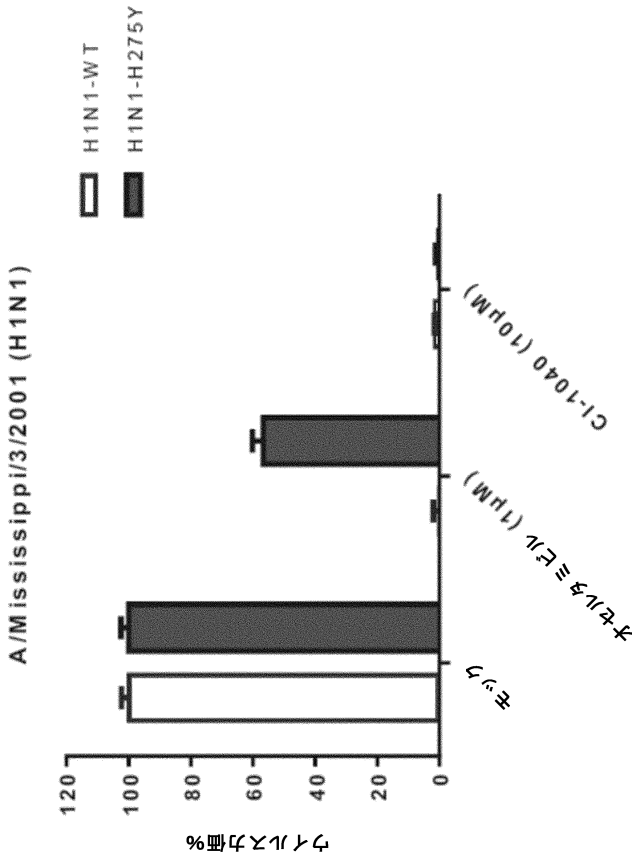
【 0 0 8 3 】

(表2) BLXMおよびATR002予測組み合わせの薬物用量減少(DRI)データ例

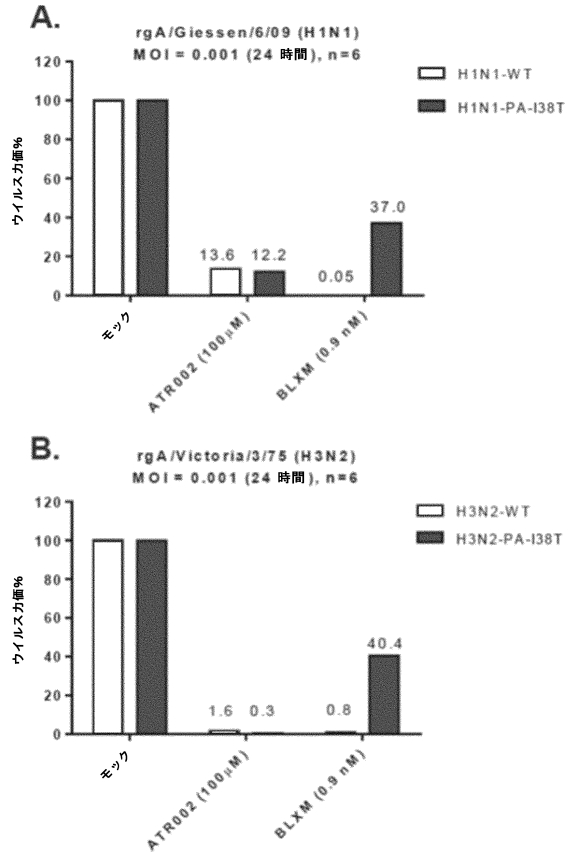
Fa ^b	用量 BLXM (nM)	用量 ^a ATR002(μ M)	DRI		
			BLXM	ATR002	
0.99	4.23358 ^a	879.684 ^a	4.23358	17.5937	
0.97	1.50936 ^a	228.8 ^a	7.54681	4.57599	
0.95	0.92466	120.664 ^a	115.583	2.41327	
0.9	0.4644	49.0947	2.32201	4.90947	
0.88	0.38452	38.3704	48.0652	3.83704	
0.6	0.08906	5.68262	11.133	2.84131	30
0.58	0.08253	5.14432	10.316	12.8608	
0.57	0.07947	4.89711	1.98684	2.44855	

^a その経験的推定からシフトする予測用量^b 非感染 感染細胞のフラクシオンまたは阻害効果

【 図 面 】
【 図 1 】



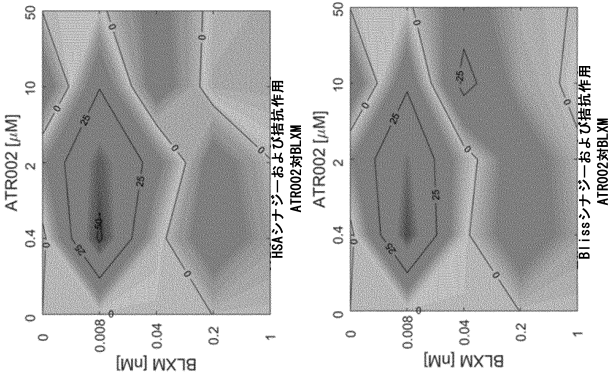
【 図 2 】



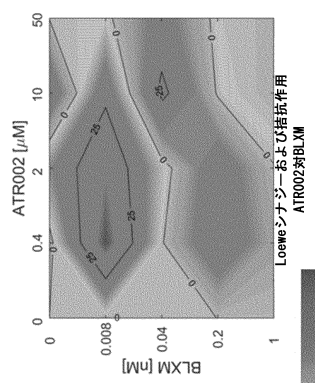
10

20

【 図 3 - 1 】

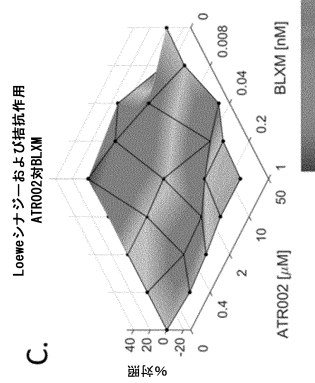
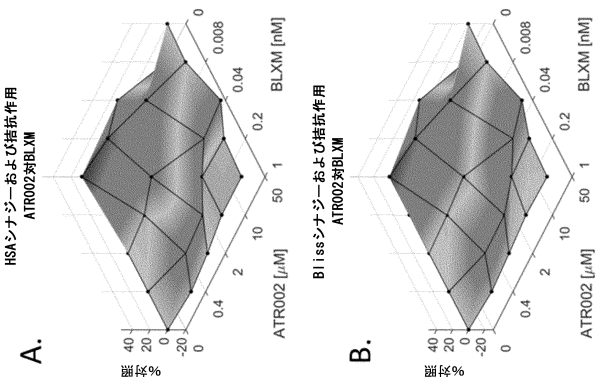


【 図 3 - 2 】



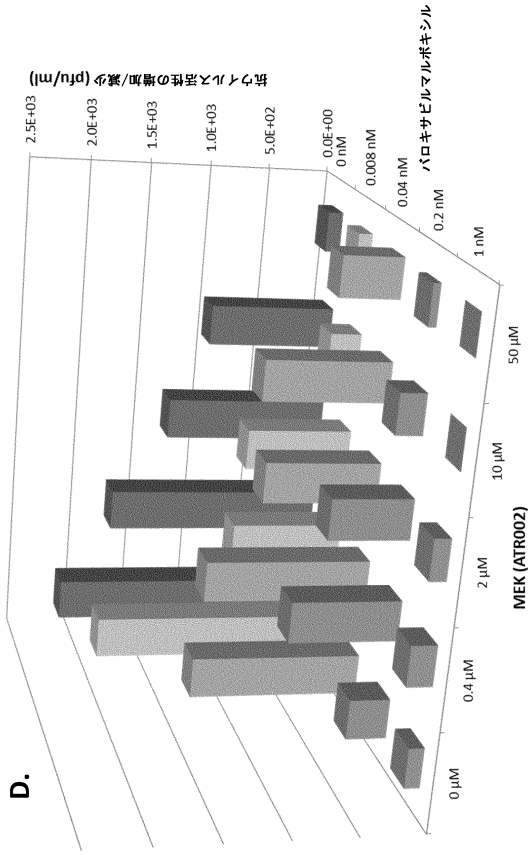
30

40



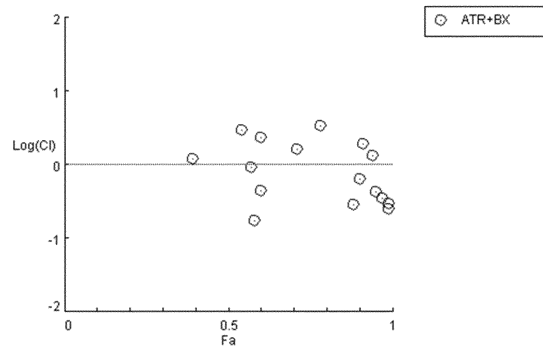
50

【 3 - 3 】



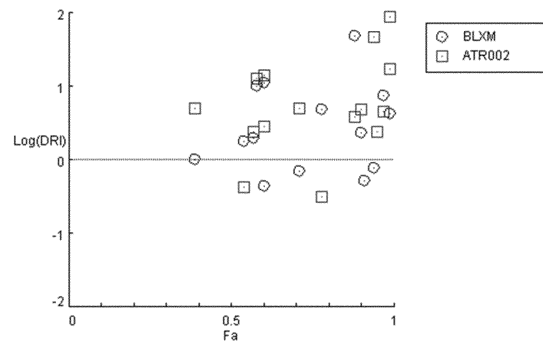
【 4 】

A.



10

B.



20

30

40

50

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2020/073934

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
INV.	A61K31/16	A61K31/196
	A61P31/14	A61P31/16
	A61K31/18	A61K31/353
		A61K31/4196
		A61K31/4458
		A61K31/4184
		A61K45/06
		A61K31/519
		A61K31/506
		A61P31/12
		A61K31/53
		A61K31/535
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K A61P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	STEINMETZER T ET AL: "Strategies for the development of influenza drugs: Basis for new efficient combination therapies", TOPICS IN MEDICINAL CHEMISTRY, SPRINGER, DE, vol. 15, 18 February 2015 (2015-02-18), pages 143-181, XP009192578, ISSN: 1862-2461, DOI: 10.1007/7355_2014_84 abstract page 165, paragraph 3 - page 166, paragraph 1 page 169, paragraph 2 -----	1-15
T	US 2019/298669 A1 (PLANZ OLIVER [DE]) 3 October 2019 (2019-10-03) examples 1-4 claims 1-15 -----	
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents :		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance		*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
E earlier application or patent but published on or after the international filing date		*X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)		*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		*Z* document member of the same patent family
P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 25 November 2020		Date of mailing of the international search report 03/12/2020
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Strack, Eberhard

3

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2020/073934

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2019298669	A1	NONE	03-10-2019

10

20

30

40

50

フロントページの続き

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1 . T R I T O N

2 . T W E E N

(74)代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100205707

弁理士 小寺 秀紀

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72)発明者 ブランツ オリバー

ドイツ連邦共和国 7 2 5 8 1 デッティンゲン アンデアエルムス シューベルトシュトラッセ 7

(72)発明者 エウエス ハゼム

ドイツ連邦共和国 7 2 0 7 6 テュービンゲン フィヒテンウエグ 9

F ターム (参考) 4C086 AA01 AA02 CB22 GA16 MA02 MA04 MA52 MA55 NA05 ZB33
ZC75

4C206 AA01 AA02 FA33 HA16 MA02 MA04 MA72 MA75 NA05 ZB33
ZC75