(12) **Oversettelse av europeisk patentskrift**

(11) **NO/EP 2123276 B1**

NORGE

(19) NO
(51) Int Cl.
A61K 31/4965 (2006.01)
A61K 31/215 (2006.01)
A61P 31/16 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)
C07D 241/24 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Oversettelse publisert	2013.04.08
(80)	Dato for Den Europeiske Patentmyndighets publisering av det meddelte patentet	2012.11.28
(86)	Europeisk søknadsnr	08711267.8
(86)	Europeisk innleveringsdag	2008.02.14
(87)	Den europeiske søknadens Publiseringsdato	2009.11.25
(30)	Prioritet	2007.02.16, JP, 2007035975
(84)	Utpekte stater	AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MT NL NO PL PT RO SE SI SK TR
(73)	Innehaver	Toyama Chemical Co., Ltd., 2-5 Nishishinjuku 3-Chome, Shinjuku-kuTokyo 160-0023, Japan
(72)	Oppfinner	MAEKAWA, Masako, c/o TOYAMA CHEMICAL CO. LTD. Toyama Works 4-1 Shimookui 2-Chome, Toyama-Shi Toyama 930-8508, Japan
(74)	Fullmektig	Bryn Aarflot AS, Postboks 449 Sentrum, 0104 OSLO, Norge

(54) Benevnelse **Farmasøytisk preparat som omfatter pyrazinderivat, og metode for anvendelse av pyrazinderivat i kombinasjon**

(56) Anførte publikasjoner

EP-A1- 1 112 743
JP-A- 01 197 437
WO-A1-00/10569
DATABASE CAPLUS [Online] GOVORKOVA E.A. ET AL.: 'Neuraminidase inhibitor-rimantadine combinations exert additive and synergistic anti-influenza virus effects in MDCK cells', XP008111831 Database accession no. (2004:1065557) & ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY vol. 48, no. 12, 2004, pages 4855 - 4863
DATABASE CAPLUS [Online] MADREN L.K. ET AL.: 'In vitro inhibitory effects of combinations of anti-influenza agents', XP008111829 Retrieved from STN Database accession no. (1995:445031) & ANTIVIRAL CHEMISTRY & CHEMOTHERAPY vol. 6, no. 2, 1995, pages 109 - 113
DATABASE CAPLUS [Online] SHIGETA S.: 'Recent progress in anti-influenza chemotherapy', XP008111832 Retrieved from STN Database accession no. (1999:739739) & DRUGS IN R & D vol. 2, no. 3, pages 153 - 164
DATABASE CAPLUS [Online] TAKAHASHI K. ET AL.: 'In vitro and in vivo activities of T-705 and oseltamivir against influenza virus', XP008111830 Retrieved from STN Database accession no. (2003:989463) & ANTIVIRAL CHEMISTRY & CHEMOTHERAPY vol. 14, no. 5, 2003, pages 235 - 241
DATABASE CAPLUS, [Online] 13 December 2004 (2004-12-13), GOVORKOVA E A ET AL: "Neuraminidase inhibitor-rimantadine combinations exert additive and synergistic anti-influenza virus effects in MDCK cells", XP008111831, retrieved from CAPLUS Database accession no. 20010530 (2004-1065557)

DATABASE CAPLUS, [Online] 22 November 1999 (1999-11-22), SHIGETA S: "Recent progress in anti-influenza chemotherapy", XP008111832, retrieved from CAPLUS Database accession no. (1999-739739) (1999-739739)
DATABASE CAPLUS, [Online] 28 March 1995 (1995-03-28), MADREN L K ET AL: "In vitro inhibitory effects of combinations of anti-influenza agents", XP008111829, retrieved from CAPLUS Database accession no. (1995-445031) (1995-445031)
FURUTA, Y.; TAKAHASHI, K.; FUKUDA, Y.; KUNO, M.; KAMIYAMA, T.; NOMURA, N.;: "In vitro and in vivo Activities of Anti-Influenza Virus Compound T-705", ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, vol. 46, no. 4, April 2002 (2002-04), pages 977-981, XP002631741, DOI: 10.1128/AAC.46.4.977-981.2002
FURUTA, Y.; TAKAHASHI, K.; KUNO-MAEKAWA, M.; SANGAWA, H.; UEHARA, S.;: "Mechanism of Action of T-705 against Influenza Virus", ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, vol. 49, no. 3, March 2005 (2005-03), pages 981-986, XP002631742, DOI: 10.1128/AAC-49.3.981-986.2005
TAKAHASHI K ET AL: "In vitro and in vivo activities of T-705 and oseltamivir against influenza virus", ANTIVIRAL CHEMISTRY & CHEMOTHERAPY, BLACKWELL SCIENTIFIC PUBL., LONDON, GB, vol. 14, no. 5, 19 December 2003 (2003-12-19), pages 235-241, XP008135294, ISSN: 0956-3202

Beskrivelse

TEKNISK OMRÅDE

Den foreliggende oppfinnelse angår et farmasøytisk preparat som omfatter et pyrazin-derivat eller et salt derav og en eller flere neuraminidase inhibitorer for anvendelse i behandling (f.eks. terapi eller forebygging) av virale sykdommer. Dessuten angår den foreliggende oppfinnelse et pyrazinderivat eller et salt derav og en eller flere neura-minidase inhibitorer i kombinasjon for anvendelse i behandlingen (f.eks. terapi eller forebygging) av influensa.

TEKNIKKENS STAND

Influensavirusinfeksjon (heretter omtalt som influensa) bevirket ved influensavirus er ofte en fatal sykdom. I de senere årene har viruser slik som avian influensa forekommet, som utviser sterk patogenitet overfor mennesker. Avian influensa truer med å være pandemisk.

Legemidler for anvendelse på influensa er imidlertid mye færre enn antimikrobielle midler eller lignende, amantadin og oseltamivir som for tiden er anvendt, har f.eks. problemer slik som resistens mot dem.

En fremgangsmåte for anvendelse av anti-influensavirusmidler i kombinasjon er blitt omtalt for det formål å redusere legemiddelresistens overfor influensavirus, øke terapeutiske effekter og/eller redusere bivirkninger, osv. Legemidlene anvendt i kombinasjon er imidlertid begrenset i antall og gir ikke alltid tilfredsstillende effekter.

Neuraminidase inhibitorer er f.eks. kjent som legemidler som utviser effekter på influensavirus. Neuraminidase, som er en glykoprotein-projeksjon funnet på overflaten influensavirus, kreves for at influensavirus skal infisere celler i halsen eller bronkier og proliferere for spredning til deres naboceller. Inhiberingen av neuraminidase kan under-trykke spredningen av slikt influensavirus til nabocellene. En neuraminidase inhibitor, oseltamivir, omdannes f.eks. til sin aktive form GS-4071 in vivo, som utviser antivirale effekter slik at den inhiberer neuraminidase på influensavirus (ikke-patentdokument 1). Oseltamivir og zanamivir er kommersielt tilgjengelige som neuraminidase inhibitorer. Slike legemidler utvikles og studeres fremdeles.

På den annen side er et pyrazinderivat med antivirale aktiviteter kjent (patentdokument 1). Dette pyrazinderivat er kjent til å utvise antivirale effekter ved intracellulær ribosyl-fosforylering slik at det inhiberer virus RNA polymerase (patentdokument 2).

Videre er virkningsmekanismen for anti-influensa pyrazinderivat T-705 (6-fluor-3-hydroksy-2-pyrazinkarboksamid) blitt undersøkt (ikke-patentdokument 3) og dets in vitro og in vivo aktiviteter er blitt studert (ikke-patent dokument 2) og sammenlignet med den kommersielt tilgjengelige neuraminidase inhibitoren oseltamivir (ikke-patentdokument 4).

Kombinasjoner av neuraminidase inhibitorer med andre legemidler, slik som polyoksometalat PM-523 (ikke-patentdokument 5), rimantadin (ikke-patentdokument 6) eller rimantadin, ribavirin og 2'–deoksy-2'-fluorguanosin (ikke-patentdokument 7) ble tidligere rapportert til å vise additive eller synergistiske effekter mot influensaviruset.

Hverken et farmasøytisk preparat som omfatter en neuraminidase inhibitor og et pyrazinderivat eller en fremgangsmåte for å anvende en neuraminidase inhibitor og et pyrazinderivat i kombinasjon har imidlertid til nå vært kjent.

PATENTDOKUMENT 1: Pamflett i WO00/10569 hvor EP 1 112 743 er et patent-familiemedlem på engelsk

PATENTDOKUMENT 2: Pamflett i WO03/015798

IKKE-PATENTDOKUMENT 1: Japanese Journal of Clinical Medicine, 2003, vol. 61, s. 1975-1979

IKKE-PATENTDOKUMENT 2: Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2002, vol. 46, s. 977-981

IKKE-PATENTDOKUMENT 3: Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2005, vol. 49, s. 981-986

IKKE-PATENTDOKUMENT 4: Antiviral Chemistry & Chemotherapy, 2003, vol. 14, s. 235-241

IKKE-PATENTDOKUMENT 5: Drugs in R & D, 1999, vol. 2, s. 153-164

IKKE-PATENTDOKUMENT 6: Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2004, vol. 48, s. 4855-4863

IKKE-PATENTDOKUMENT 7: Antiviral Chemistry & Chemotherapy, 1995, vol. 6, s. 109-113

OPPSUMMERING AV OPPFINNELSEN

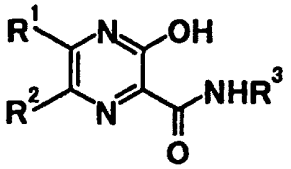
PROBLEMER SOM LØSES VED OPPFINNELSEN

Der har vært et krav om et farmasøytisk preparat som har sterke anti-influensavirus-aktiviteter med få bivirkninger og som er anvendbart for behandling (f.eks. terapi eller forebygging) av influensa og for en metode for behandling av influensa.

MIDLER FOR Å LØSE PROBLEMENE

Under slike forhold, har den foreliggende oppfinner gjennomført grundige studier og har følgelig gjennomført den foreliggende oppfinnelse ved å finne et farmasøytisk preparat som omfatter et pyrazinderivat representert ved den etterfølgende formel [1] eller et salt derav og en eller flere neuraminidase inhibitorer:

[Formel 1]



[1]

hvor R^1 og R^2 er like eller forskjellige og representerer hver et hydrogenatom eller et halogenatom; og R^3 representer et hydrogenatom,
har sterke anti-influensavirusaktiviteter og er anvendbart for behandling av influensa, og hvor anvendelsen av disse forbindelser i kombinasjon er anvendbar for behandling av influensa.

Også beskrevet heri er farmasøytiske preparater som definert ovenfor hvor R^3 i pyrazinderivatet representert ved formel [1] er en aminobeskyttende gruppe.

FORDELER MED OPPFINNELSEN

Et farmasøytisk preparat som omfatter et pyrazinderivat eller et salt derav og en eller flere neuraminidase inhibitorer har synergistiske sterke anti-influensavirusaktiviteter og er anvendbart for behandling (f.eks. terapi eller forebygging) av influensa. En metode for anvendelse av disse forbindelser i kombinasjon er anvendbar som en metode for behandling (f.eks. terapi eller forebygging) av influensa.

SÆRLIG UTFØRELSE AV DEN FORELIGGENDE OPPFINNELSE

Den foreliggende oppfinnelse vil heretter bli beskrevet mere detaljert.

I den foreliggende beskrivelse, dersom annet ikke er spesifisert, betyr et halogenatom fluor, klor, brom og jodatomer; en acylgruppe betyr f.eks. en formylgruppe, en rett-kjedet eller forgrenet C_{2-12} alkanoylgruppe (f.eks. acetyl, propionyl, butyryl, isovaleryl og pivaloyl), en ar-C_{1-6} alkylkarbonylgruppe (f.eks. benzylkarbonyl), en cyklisk hydrokarbon-karbonylgruppe (f.eks. benzoyl og naftoyl), en heterocyklisk karbonylgruppe (f.eks. nikotinoyl, tenoyl, pyrrolidinkarbonyl og furoyl), en succinylgruppe, en glutarylgruppe, en maleoylgruppe, en ftaloylgruppe og en rettkjedet elle forgrenet alfa-aminoalkanoyl-gruppe (som kan være N-terminalt beskyttet) avledet fra aminosyrer (eksempler på aminosyrer inkluderer glycin, alanin, valin, leucin, isoleucin, serin, treonin, cystein, metionin, asparginsyre, glutaminsyre, asparagin, glutamin, arginin, lysin, histidin, hydroksylysin, fenylalanin, tyrosin, trytofan, prlin og hydroksyprolin); en alkyloksy-karbonylgruppe betyr f.eks. en rettkjedet eller forgrenet C_{1-12} alkyloksykarbonylgruppe slik som metoksykarbonyl, etoksykarbonyl, 1,1-dimetylpropoksykarbonyl, isopropoksy-karbonyl, 2-etylheksyloksykarbonyl, tert-butoksykarbonyl og tert-pentyloksykarbonyl; en aralkyloksykarbonylgruppe betyr f.eks. en ar-C_{1-6} alkyloksykarbonylgruppe slik som benzyloksykarbonyl og fenetyloksykarbonylgruppe; en aryloksykarbonylgruppe betyr f.eks. en fenyloksykarbonylguppe; en aralkylgruppe betyr f.eks. en ar-C_{1-6} alkylgruppe slik som benzyl, difenylmetyl, trityl, fenetyl og naftylmetyl; en alkoksyalkylgruppe betyr f.eks. en C_{1-6} alkyloksy-C_{1-6} alkylgruppe slik som metoksymetyl og 1-etoksyetyl; en aralkyloksyalkylgruppe betyr f.eks. en ar-C_{1-6} alkyloksy-C_{1-6} alkylgruppe slik som benzyloksymetyl og fenetyloksymetyl;
en aryltiogruppe betyr f.eks. en fenyltiogruppe; en alkylsulfonylgruppe betyr f.eks. en C_{1-6} alkylsulfonylgruppe slik som metylsulfonyl, etylsulfonyl og propylsulfonyl; en aryl-sulfonylgruppe betyr f.eks. benzensulfonyl, toluensulfonyl og naftalensulfonylgruppe; en dialkylaminoalkylidengruppe betyr f.eks. N,N-dimetylaminometylen og N,N-dietyl-aminometylengrupper; en aralkylidengruppe betyr f.eks. benzyliden- og naftyl-metylengrupper; en nitrogeninneholdende heterocyklisk alkylidengruppe betyr f.eks. en 3-hydroksy-4-pyridylmetylengruppe; en cykloalkylidengruppe betyr f.eks. cyklopentyliden- og cykloheksylidengrupper; en diarylfosforylgruppe betyr f.eks. en difenylfosforylgruppe; en diaralkylfosforylgruppe betyr f.eks. en dibenzylfosforylgruppe; en oksygen-inneholdende heterocyklisk alkylgruppe betyr f.eks. en 5-metyl-2-okso-2H-1,3-dioksol-4-ylmetylgruppe; og en subtituert silylgruppe betyr f.eks. trimetylsilyl-, trietylsilyl- og tributylsilylgrupper.

En aminobeskyttende gruppe omfatter alle grupper tilgjengelige som vanlige amino-beskyttende grupper. Eksempler derpå inkluderer grupper beskrevet i W. Greene et al., Protective Groups in Organic Synthesis, 3rd ed., s. 494-653, 1999, John Wiley & Sons, INC. Spesifikke eksempler derpå inkluderer en acylgruppe, en alkyloksykarbonylgruppe, en aralkyloksykarbonylgruppe, en aryloksykarbonylgruppe, en aralkylgruppe, alkoksyalkylgruppe, en aralkyloksyalkylgruppe, en aryltiogruppe, en alkylsulfonylgruppe, en arylsulfonylgruppe, en dialkylaminoalkylidengruppe, en aralkylidengruppe, en nitrogen-inneholdende heterocyklisk alkylidengruppe, en cykloalkylidengruppe, en diarylfosforylgruppe, en diaralkylfosforylgruppe, en oksygen-inneholdende heterocyklisk alkylgruppe og en substituert silylgruppe.

Eksempler på et salt av forbindelsen med den generelle formel [1] anvendt den foreliggende oppfinnelse kan vanligvis inkludere kjente salter av hydroksylgrupper.

Eksempler derpå inkluderer: salter med alkalimetaller slik som natrium og kalium, salter med jordalkalimetaller slik som kalsium og magnesium, ammoniumsalter og salter med nitrogen-innholdende organiske baser slik som trimetylamin, trietylamin, tributylamin, N-metylpiperidin, N-metylmorfolin, dietylamin, dicykloheksylamin, prokain, dibenzylamin, N-benzyl-β-fenetylamin, 1-efenamin og N,N'-dibenzyletylendiamin.

Ønskede eksempler på saltet inkluderer farmakologisk aksepterbare salter. Et salt med natrium er foretrukket.

Ønskelige eksempler på forbindelsen med den generelle formel [1] anvendt i den foreliggende oppfinnelse inkluderer de etterfølgende forbindelser:
forbindelser representert ved den generelle formel [1] hvor R^1 er et hydrogenatom, R^2 er et fluoratom og R^3 er et hydrogenatom.

Forbindelsen med den generelle formelen [1] anvendt i den foreliggende oppfinnelse fremstilles ved å kombinere metoder som er kjente per se innen teknikkens stand og kan fremstilles i henhold til f.eks. en fremstillingsmetode som beskrevet i patentdokument 1.

Eksempler på neuraminidase inhibitor anvendt i den foreliggende oppfinnelse inkluderer forbindelser som sådan eller deres in vivo metabolitter med inhiberende effekter på

neuraminidase, slik som oseltamivir, zanamivir, peramivir, CS-8958 og FRUNET. Oseltamivir og zanamivir er foretrukne. Oseltamivir er ytterligere ønskelig.

Administreringsruten for et farmasøytisk preparat ifølge oppfinnelsen er ikke spesielt begrenset, og det kan administreres intravenøst, oralt, intramuskulært, hypodermisk, ved inhalasjon, ved spraying eller gjennom andre administreringsruter. Dessuten kan pyrazinderivatet representert ved den generelle formel [1] eller saltet derav administreres med neuraminidase inhibitoren samtidig eller i en spesiell rekkefølge.

Det farmasøytiske preparatet ifølge oppfinnelsen er anvendbart for behandling (f.eks. terapi eller forebygging) av influensa.

Det farmasøytiske preparatet ifølge oppfinnelsen tillater behandling (f.eks. terapi eller forebygging) av mere alvorlig influensa. Dessuten utviser de individuelle legemidler som anvendes sterke anti-influensviruseffekter selv når de administreres i nedsatte mengder. Deres respektive bivirkninger kan derfor reduseres.

Når det farmasøytiske preparatet ifølge oppfinnelsen anvendes, kan det vanligvis blandes passende med farmasøytiske hjelpestoffer anvendt i formulering, slik som en eksipiens, en bærer og et fortynningsmiddel. Disse formuleringer kan administreres oralt eller parenteralt i en form slik som en tablett, en kapsel, et pulver, en sirup, en granul , en pille, en suspensjon, en emulsjon, en oppløsning, et pulverformet preparat, en stikkpille, øyedråper, nesedråper, øredråper, et plaster, en salve eller en injeksjon i henhold til en konvensjonell metode. Dessuten kan en administreringsmetode, en dose og hyppigheten av administrering passende velges i henhold til pasientens alder, kroppsvekt og symptom. Det kan vanligvis administreres oralt eller parenteralt (f.eks. injeksjon, intravenøst drypp og administrering til et rektalt sted) til en voksen person i en eller flere oppdelte doser, i dose/doser av 0,01 til 1000 mg/kg per døgn.

EKSEMPLER

Den foreliggende oppfinnelse vil nå bli beskrevet med henvisning til testeksempler. Den foreliggende oppfinnelse skal imidlertid ikke anses å være begrenset til disse.

6-fluor-3-hydroksy-2-pyrazinkarboksamid (heretter omtalt som T-705) ble valgt som en testforbindelse. GS-4071, som er en in vivo aktiv form av oseltamivir, og zanamivir ble valgt som neuraminidase inhibitorer. I denne sammenheng, ble GS-4071 anvendt i de

foreliggende tester oppnådd ved ekstraksjon fra Tamiflu (kommersielt tilgjengelig legemiddel) etterfulgt av hydrolyse i henhold til en konvensjonell metode.

Testeksempel 1
T-705 ble valgt som en testforbindelse. GS-4071 ble valg som en neuraminidase inhibitor.

(1) Dyrking av MDCK celler
Madin-Darby kanin-nyre (heretter omtalt som MDCK) celler subdyrket ved 37°C under 5% karbondioksidbetingelser i et Eagles MEM medium supplert med 10% føtalt bovint serum i dyrkingsoppløsning ble dissosiert ved en etylendiamintetraeddiksyre-trypsin metode og suspendert i det samme medium som over. Cellesuspensjonen som ble fremstilt til å inneholde 2 x 10^4 celler i 100 ml ble deretter inokulert i en 96-brønns plate. Cellene ble dyrket over natten ved 37°C under 5% karbondioksid betingelser for å oppnå en monolag av MDCK celler.

(2) Influensavirusinfeksjon og legemiddeltilsetning,
Et testmedium som anvendes var et medium fremstilt ved å tilsette L-1-tosylamido-2-fenyletylklormetylketon (TPCK)-behandlet trypsin i en konsentrasjon på 3 µg/ml til et Eagles MEM medium inneholdende 1% bovint serumalbumin supplert med 60 µg/ml kanamycin og fire ganger den vanlige konsentrasjon av vitaminer.

MDCK cellene oppnådd i avsnitt (1) ble vasket med et Eagles MEM medium etter fjerning av kultur supernatanten. Deretter ble det til hver brønn tilsatt de etterfølgende midler: 100 µl av et Eagles MEM medium inneholdende bovint serumalbumin og vitaminer i to ganger konsentrasjonen av testmediet, 50 µl av et influensavirus (PR/8 (H1N1)) oppløsning justert til 4,0 x 10^3 PFU/ml med et Eagles MEM medium inneholdende TPCK-behandlet trypsin i fire ganger konsentrasjonen av testmediet, og 50 µl av et Eagles MEM medium inneholdende T-705 eller GS-4071 i fire ganger målkonsentrasjon (T-705 målkonsentrasjon (µg/ml): 0,0156, 0,0313, 0,0625, 0,125, 0,25, 0,5, 1, 2 og 4, og GS-4071 målkonsentrasjon (µg/ml): 0,00313, 0,00625, 0,0125, 0,025, 0,05, 0,1, 0,2, 0,4 og 0,8) eller inneholdende en T-705/GS-4071 (5:1 forhold uttrykt i konsentrasjonsvekt) blanding i fire ganger målkonsentrasjonen.

Etter legemiddeltilsetning, ble cellene dyrket ved 35°C i 2 døgn under 5% karbondioksid-betingelser.

(3) »Neutral red uptake» analyse
Cytopatisk effekt (CPE) observert sammen med influensavirus proliferasjon ble bedømt ved metodene beskrevet i J. Virol, Methods, 2002, vol, 106, s. 71-79 og Proc, Natl. Acad. Sci, 1998, vol. 95, s. 8874-8849.

Etter komplettering av dyrkingen, ble 0,033% «neutral red" oppløsning fortynnet med en kalsium/magnesium-fri Dulbeccos fosfatbuffer tilsatt i et volum av 100 µl til hver brønn. Platen fikk stå ved 35°C under betingelser med 5% karbondioksid. To timer senere ble oppløsningene i brønnene fjernet med sug. Etter vasking to ganger med 100 µl av en kalsium/magnesium-fri Dulbeccos fosfatbuffer, ble 100 ml av en blandet oppløsning av en buffer (pH 4,2, sammensatt av 0,1 mol/l natriumcitrat og 0,1 mol/l saltsyre) og etanol i 1:1 volumforhold ble tilsatt til hver brønn. Platen fikk stå ved romtemperatur, beskyttet mot lys. Tretti minutter senere ble absorbans (540 nm) målt ved å anvende en mikro-plateavleser (BIO-Rad Modell 550). Ikke-infiserte kontroller ble fremstilt ved å tilsette, i stedet for influensavirusoppløsning, 50 ml av Eagles MEM medium inneholdende TPCK-behandlet trypsin ved fire ganger konsentrasjonen av testmedium og underkastet de samme prosedyrene som dem for testgruppen, etterfulgt av absorbansmåling. For blindprøve, ble brønner som ikke var inokulert med MDCK cellene underkastet de samme prosedyrene som dem for de ikke-infiserte kontrollene, etterfulgt av absorbansmåling. Åtte brønner ble anvendt i hver konsentrasjon. En gjennomsnittsverdi ble anvendt, og en tallverdi oppnådd ved å subtrahere absorbansen for blindprøve fra den målte verdi ble anvendt for den følgende beregning som absorbans. En verdi oppnådd ved å subtrahere absorbansen av infiserte kontroller fra dem til ikke-infiserte kontroller ble anvendt som en verdi for fullstendig inhibering av virusproliferasjon. Inhiberingsraten av virus-proliferasjon i hver test ble beregnet i henhold til den etterfølgende formel:

Inhiberingsrate av virusproliferasjon = (absorbans for enkeltlegemiddel eller kombinerte legemidler)-(absorbans for infisert kontroll)/(absorbans for ikke-infisert kontroll)-(absorbans for infisert kontroll)).

(4) Analyse av kombinasjonseffekter
Fra konsentrasjonen av enkeltlegemidler og to legemidler anvendt i kombinasjon, forholdet av kombinasjonslegemiddelet og inhiberingsraten for virusproliferasjon, ble kombinasjonseffekter analysert ved å anvende SAS frigivelse 8.2 (SAS Institute Japan Ltd.) i henhold til Median effektmetoden ifølge Shou et al. Av metoder vist i Advanced

Enzyme Regulation, 1984, vol. 22, s. 27-55, ble en ligning for legemidler hvis virkningsmekanismen er fullstendig uavhengig av hverandre (innbyrdes ikke-eksklusive legemidler) anvendt for å beregne en CI verdi. Kombinasjonseffekten ble bestemt basert på en CI verdi ved 50% inhibering av virusproliferasjon i henhold til beskrivelsen i artikkelen til Taira et al. [Acta Medica Okayama., 2006, vol. 60, s. 25-34] hvor CI ≤ 0,8 representerer synergisme, 0,8 < CI < 1,2 representerer additivitet, og 1,2 ≤ CI representerer antagonisme.

Inhiberingsratene for virusproliferasjon av T-705 anvendt alene, av GS-4071 anvendt alene, og for kombinasjonen av disse legemidler er vist i tabell 1. Analyseresultatene ved anvendelse av disse verdier er vist i tabell 2.

[Tabell 1]

Enkel anvendelse av T-705		Enkel anvendelse av GS-4071		Kombinert anvendelse av T-705 og GS-4071	
Konsentrasjon (µg/ml)	Inhiberings-rate	Konsentrasjon (µg/ml)	Inhiberings-rate	Konsentrasjon (µg/ml)	Inhiberings-rate
0,0156	0,019	0,00313	0,019	0,01873	0,040
0,0313	0,067	0,00625	0,11	0,03755	0,21
0,0625	0,097	0,0125	0,14	0,075	0,41
0,125	0,27	0,025	0,25	0,15	0,59
0,25	0,43	0,05	0,29	0,3	0,73
0,5	0,60	0,1	0,42	0,6	0,96
1	0,85	0,2	0,61	1,2	0,88
2	0,93	0,4	0,73	2,4	0,95
4	1,0	0,8	0,84	4,8	0,94

[Tabell 2]

Forhold av kombinerte legemidler (T-705:GS-4071)	CI verdi ved 50% inhibering
5:1	0,66

Den kombinerte administrering av T-705 og GS-4071 (in vivo aktiv form av oseltamivir) utviste mere utmerkede synergistiske inhiberende effekter på virusproliferasjon enn det

som ble utvist ved enkeltlegemiddel-administrering.

Testeksempel 2
T-705 ble valgt som en testforbindelse. Zanamivir ble valgt som en neuraminidase inhibitor. En test ble gjennomført på samme måte som i metoden beskrevet i testeksempel 1.

Inhiberingsratene for virusproliferasjon av T-705 anvendt alene, zanamivir anvendt alene og kombinasjonen av disse legemidlene er vist i tabell 3. Resultater av analyser ved anvendelse av disse verdier er vist i tabell 4.

[Tabell 3]

Enkel anvendelse av T-705		Enkel anvendelse av zanamivir		Kombinert anvendelse av T-705 og zanamivir	
Konsentrasjon (µg/ml)	Inhiberings-rate	Konsentrasjon (µg/ml)	Inhiberings-rate	Konsentrasjon (µg/ml)	Inhiberings-rate
0,0625	0,062	0,0031	0,062	0,01875	0,10
0,125	0,17	0,00625	0,12	0,0375	0,23
0,25	0,34	0,0125	0,23	0,075	0,38
0,5	0,64	0,025	0,28	0,15	0,69
1	0,77	0,05	0,49	0,3	0,87
2	0,89	0,1	0,60	0,6	0,94
		0,2	0,67		
		0,4	0,75		

[Tabell 4]

Forhold av kombinerte legemidler (T-705:zanamivir)	CI verdi ved 50% inhibering
5:1	0,38

Den kombinerte administrering av T-705 og zanamivir utviste mere utmerkede synergistiske inhiberende effekter på virusproliferasjon enn det som ble utvist ved enkeltlegemiddel administrering.

Testeksempel 3

T-705 ble valgt som en testforbindelse. GS-4071 ble valgt som en neuraminidase inhibitor. En test ble gjennomført på samme måte som i metoden beskrevet i testeksempel 1 ved anvendelse av Victoria/3/75 (H3N2) som influensavirus.

Inhiberingsratene for virusproliferasjon av T-705 anvendt alene, GS-4071 anvendt alene og kombinasjonen av disse legemidler er vist i tabell 5. Resultater av analyser ved anvendelse av disse verdier er vist i tabell 6.

[Tabell 5]

Enkel anvendelse av T-705		Enkel anvendelse av GS-4071		Kombinert anvendelse av T-705 og GS-4071	
Konsentrasjon (µg/ml)	Inhiberings-rate	Konsentrasjon (µg/ml)	Inhiberings-rate	Konsentrasjon (µg/ml)	Inhiberings-rate
0,125	0,026	0,003125	0,086	0,01875	0,15
0,25	0,09	0,00625	0,14	0,0375	0,37
0,5	0,42	0,0125	0,44	0,075	0,72
1	0,76	0,025	0,54	0,15	0,92
2	0,86	0,05	0,68	0,3	1,03
4	0,94	0,1	0,80		
		0,2	0,88		

[Tabell 6]

Forhold av kombinerte legemidler (T-705:GS-4071)	CI verdi ved 50% inhibering
5:1	0,36

Den kombinerte administrering av T-705 og GS-54071 (in vivo aktiv form av oseltamivir) utviste mere utmerkede synergistisk inhiberende effekter på virusproliferasjon enn det utvist ved enkeltlegemiddel administrering.

Testeksempel 4

T-705 ble valgt som en testforbindelse. Zanamivir ble valgt som en neuraminidase inhibitor. En test ble gjennomført på samme måte som i metoden beskrevet i testeksempel 3.

Inhiberingsratene for virusproliferasjon av T-705 anvendt alene, zanamivir anvendt alene og kombinasjonen av disse legemidler er vist i tabell 7. Resultater av analyse ved anvendelse av disse verdier er vist i tabell 8.

[Tabell 7]

Enkel anvendelse av T-705		Enkel anvendelse av zanamivir		Kombinert anvendelse av T-705 og zanamivir	
Konsentrasjon (µg/ml)	Inhiberings-rate	Konsentrasjon µg/ml)	Inhiberings-rate	Konsentrasjon (µg/ml)	Inhiberings-rate
0,125	0,026	0,0125	0,074	0,01875	0,032
0,25	0,092	0,025	0,14	0,0375	0,12
0,5	0,42	0,05	0,27	0,075	0,27
1	0,76	0,1	0,40	0,15	0,70
2	0,86	0,2	0,60	0,3	0,87
4	0,94	0,4	0,71	0,6	0,94
		0,8	0,81		

Tabell 8]

Forhold av kombinerte legemidler (T-705:zanamivir)	CI verdi ved 50% inhibering
5:1	0,25

Den kombinerte administrering av T-705 og zanamivir utviste mere utmerkede synergistisk inhiberende effekter på virusproliferasjon enn det utvist ved enkelt-legemiddel administrering.

Som det fremgår fra resultatene, utviste den kombinerte administrering av et pyrazinderivat representert ved den generelle formel [1] eller et salt derav og forskjellige

neuraminidase inhibitorer synergistiske anti-influensavirus aktiviteter og er effektive for behandling (f.eks. terapi eller forebygging) av influensa.

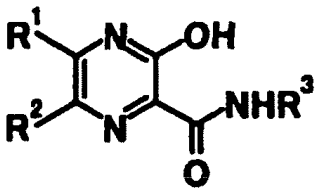
INDUSTRIELL ANVENDBARHET

Et farmasøytisk preparat som omfatter et pyrazinderviat eller et salt derav og en eller flere neuraminidase inhibitorer har synergistiske sterke anti-influensavirus aktiviteter og er anvendbart for behandling (f.eks. terapi eller forebygging) av influensa. Anvendelse av disse forbindelser i kombinasjon er anvendbart for behandling (f.eks. terapi eller forebygging) av influensa.

Patentkrav

1. Farmasøytisk preparat for behandling av influensavirusinfeksjon, som omfatter et pyrazinderivat representert ved den etterfølgende generelle formel eller et salt derav og en eller flere neuraminidase inhibitorer:

[Formel 1]



hvor R^1 og R^2 er like eller forskjellige og representerer hver et hydrogenatom eller et halogenatom; og R^3 representerer et hydrogenatom.

2. Farmasøytisk preparat ifølge krav 1, hvor R^1 er et hydrogenatom og R^2 er et fluoratom.

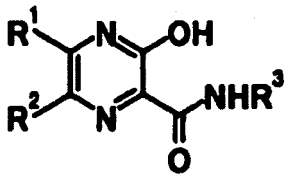
3. Farmasøytisk preparat ifølge krav 1 eller 2, hvor neuraminidase inhibitoren er oseltamivir eller zanamivir.

4. Farmasøytisk preparat ifølge krav 1 eller 2, hvor neuraminidase inhibitoren er oseltamivir.

5. Farmasøytisk preparat ifølge krav 1 eller 2, hvor neuraminidase inhibitoren er zanamivir.

6. Pyrazinderivat representert ved den etterfølgende generelle formel eller et salt derav og en eller flere neuraminidase inhibitorer i kombinasjon for anvendelse i behandling av influensavirusinfeksjon:

[Formel 2]



hvor R^1 og R^2 er like eller forskjellig og representerer hver et hydrogenatom eller et halogenatom; og R^3 representerer et hydrogenatom.

7. Pyrazinderivat ifølge krav 6, hvor R^1 er et hydrogenatom og R^2 er et fluoratom.

8. Pyrazinderivat ifølge krav 6 eller 7, hvor neuraminidase inhibitoren er oseltamivir eller zanamivir.

9. Pyrazinderivat ifølge krav 6 eller 7, hvor neuraminidase inhibitoren er oseltamivir.

10. Pyrazinderivatet ifølge krav 6 eller 7, hvor neuraminidase inhibitoren er zanamivir.