



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 603 18 327 T2 2008.12.18

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 1 567 137 B1

(21) Deutsches Aktenzeichen: 603 18 327.1

(86) PCT-Aktenzeichen: PCT/IT03/00626

(96) Europäisches Aktenzeichen: 03 772 659.3

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 2004/041260

(86) PCT-Anmeldetag: 14.10.2003

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: 21.05.2004

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 31.08.2005

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: 26.12.2007

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 18.12.2008

(51) Int Cl.⁸: A61K 31/05 (2006.01)
A61P 31/16 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

RM20020562 06.11.2002 IT

(84) Benannte Vertragsstaaten:

AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,
GR, HU, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK,
TR

(73) Patentinhaber:

Sigma-Tau Industrie Farmaceutiche Riunite
S.p.A., Rom/Roma, IT

(72) Erfinder:

GARACI, Enrico, I-00040 Pomezia, IT; PALAMARA,
Anna T., I-00040 Pomezia, IT

(74) Vertreter:

HOFFMANN & EITLE, 81925 München

(54) Bezeichnung: VERWENDUNG VON RESVERATROL ZUR HERSTELLUNG EINES ARZNEIMITTELS ZUR BE-
HANDLUNG VON GRIPPE

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelebt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

[0001] Die hier beschriebene Erfindung bezieht sich auf die Verwendung von Resveratrol als aktives Ingrediens bei der Herstellung eines Medikaments, das eine inhibitorische Wirkung auf Influenzavirusreplikation ausübt und für die Behandlung von Influenzavirusinfektionen verwendbar ist.

Hintergrund der Erfindung

[0002] Resveratrol, d. h. 3,4,5-Trihydroxystilben, wurde in jüngerer Zeit intensiv im Hinblick auf die bekannten vorteilhaften Eigenschaften von Rotwein, von dem es eines der Gründungsingredienten ist, untersucht (Life Sci., 71, 2145–52, 2002).

[0003] Resveratrol befindet sich in den Schalen von blauen Trauben in Mengen, die von 50 bis 100 µg/g reichen, und seine Konzentration in Rotwein liegt im Bereich von 1,5 bis 3 mg/l.

[0004] Zahlreiche Studien haben eine antikarzinogene Aktivität von Resveratrol bewiesen, deren Wirkmechanismen wie folgt unterteilt werden können: Inhibition der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB, der fähig ist, die Expression von verschiedenen Genen zu regulieren, die bei inflammatorischen und karzinogenen Prozessen involviert sind (Lancet, 341, 1103–1104, 1993; Science, 275, 218–220, 1997; Proc. Natl. Acad. Sc., 94, 14138–14143, 1997; Life Science 61, 2103–2110, 1997; Brit. J. Pharm., 126, 673–680, 1999; J. Imm. 164, 6509–6519, 2000); Inhibition von verschiedenen Proteinen einschließlich Proteinkinase C (Bioch., 38, 13244–13251, 1999), Ribonukleotidreduktase (FEBS Lett. 421, 277–279, 1998) und Cyclooxygenase-2 (COX-2) in Säugerepithelzellen (Ann. N. Y. Acad. Sci., 889, 214–223, 1999; Carcinog. 21, 959–963, 2000); Aktivierung der Caspase 2, 3, 6 und 9 (FASEB J., 1613–1615, 2000) und Modulierung des Gens p53, das ein bekannter Tumorsuppressor ist (Cancer Research, 59, 5892–5895, 1999; Clin. Bioch., 34, 415–420, 2001).

[0005] Unter den günstigen Wirkungen von Resveratrol sollte seine antioxidierende Aktivität bzw. Antioxidans-Aktivität genannt werden, die durch oben genannte Fähigkeit, schädigenden Wirkungen entgegenzuwirken, welche durch verschiedene Substanzen und/oder Zustände, die intrazellulären oxidativen Stress verursachen, produziert werden, nahegelegt wird (Free Radic. Res., 33, 105–114, 2000).

[0006] Resveratrol kann eine vaskuläre Relaxation mittels einer Produktion von Stickoxid auf dem vaskulären Endothellevel induzieren (Cancer Res. 59, 2596–01, 1999), die Synthese von Thromboxan in Thrombozyten (Clin. Chim. Acta, 235, 207–219, 1995; Int. J. Tissue. React. 17, 1–3, 1995) und von Leukotrienen in Neutrophilen inhibieren und die Oxi-

dation und Aggregation von Low-Density-Lipoproteinen (LDL) verhindern (Lancet, 341, 1103–1104, 1993; Life Sci., 64, 2511–2521, 1999).

[0007] Auf der Basis von In-vitro-Experimentsystemen wurde kürzlich eine inhibitorische Aktivität von Resveratrol gegen das Herpes-Simplex-DNA-Virus bewiesen (Antiv. Res., 43, 145–155, 1999).

[0008] Daten, die von den Autoren der vorliegenden Erfindung und von anderen Forscherteams erhalten wurden, haben gezeigt, daß viele antioxidierende Substanzen fähig sind, die Replikation des Parainfluenza-Sendai-Virus (SV)-Typ 1, des Herpes-Simplex 1-Virus (HSV-1) und des Virus der erworbenen Immundefizienz (HIV) in vitro zu inhibieren (AIDS Res. Hum. Retroviruses, 1997: 1537–1541; Biochem. Biophys. Res. Commun., 1992; 188, 1090–1096; Antivir. Res. 1995, 27, 237.253). Die antivirale Wirksamkeit von antioxidierenden Substanzen wurde auch in einem murinen AIDS (MAIDS)-Modell wie auch bei HSV1-Keratitis bewiesen (AIDS Res. Hum. Retroviruses, 1996: 12, 1373–1381; Exp. Eye. Res., 200: 70, 215–220).

[0009] Influenza ist ein epidemiologisches Problem von weltweitem Ausmaß mit ernsten allgemeinen Gesundheitsproblemen als Resultat und mit größeren wirtschaftlichen Auswirkungen auf die Gesundheitsfürsorge. Das für Influenza verantwortliche Virus ist weitverbreitet und hochinfektiös. Unglücklicherweise sind die derzeit verfügbaren Therapien noch nicht vollständig wirksam und führen oft zur Selektion von resistenten viralen Stämmen (Fields, Kap. 47, 1533–79, 2001) und, was wichtiger ist, die Reihenimpfung stellt zusätzlich zu den Nachteilen, die einer Prävention auf Vakzinbasis eigen sind, keinen ausreichenden Schutz bereit, und zwar aufgrund der extremen antigenen Variabilität des Virus (Fields, Kap. 47, 1533–79, 2001).

[0010] Unter den verschiedenen Strategien zum Attackieren der viralen Replikation haben jüngere Studien (J. of Virol., 74, 1781–1786, 2000) die wichtige Rolle von Protein M1 im Transportsystem von spezifischen Virus-Ribonukleoproteinen zum Cytoplasma beschrieben. Dies scheint eine fundamentale Stufe im Replikationszyklus des Virus zu sein, und zwar so sehr, daß eine Inhibition der Virusreplikation durch Retention des Nukleoproteins im Kern der infizierten Zelle durch die inhibierte Synthese von Protein M verfolgt werden kann. Dieses Phänomen kann einer Inhibition von Zellproteinen mit einer Kinasefunktion zuzuschreiben sein. In der Tat wurde kürzlich bewiesen, daß eine Inhibition der Kinasen eine Retention des NP des Zellnukleus (Nature, Cell. Biol. 3, 301–5, 2001; J. of Virol., 74, 1781–86, 2000) zusammen mit einer starken inhibitorischen Wirkung gegen eine Replikation des Influenzavirus verursacht.

[0011] Von GSH ist bekannt, daß es das Hauptantioxidans in dem zellulären Redoxsystem ist und es wurde mit der Replikation verschiedener Viren assoziiert. In der Tat bewiesen frühere Studien, die von den Erfindern der vorliegenden Erfindung durchgeführt wurden, daß es während der viralen Infektion möglich ist, eine Reduktion bei den GSH-Konzentrationen als Resultat der Infektion selbst zu beobachten (Rotilio et al., "Oxidative stress an cell activation in viral infection", 143–53, 199; Palamara et al., Antiviral Research, 27, 237–53, 1995).

[0012] Eine aberrante Regulation des bekannten Mechanismus der Apoptose ist der zugrundeliegende Faktor, der für zahlreiche humane Erkrankungen verantwortlich ist, zum Beispiel für eine Reihe von Autoimmunerkrankungen, infektiösen oder neurologischen Erkrankungen wie zum Beispiel AIDS und Krebs.

[0013] In früheren Studien wurde beschrieben, daß Resveratrol die Eliminierung von Tumorzellen durch Induktion der Apoptose der Zellen erlaubt. Jüngere Studien, die von Tinhofer I. et al. (FASEB J., 18, 1613–15, 2001) durchgeführt wurden, zeigten, daß die ersten Ereignisse der Apoptose, die durch Resveratrol induziert werden, durch Änderung des Mitochondrienmembranpotentials ($\Delta\phi_m$), durch die Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und durch Aktivierung der Caspasen 2, 3, 6 und 9 gekennzeichnet sind. Es ist auch bekannt, daß das Influenzavirus Apoptose in verschiedenen prozentualen Graden induziert, und zwar entsprechend dem Virusstamm und der Multiplizität der Infektion.

Zusammenfassung der Erfindung

[0014] Es wurde nun gefunden, daß Resveratrol eine inhibitorische Wirkung auf die Influenzavirusreplikation ausübt. In völlig überraschender Weise wurde auch gefunden, daß Resveratrol seine inhibitorische Wirkung auf die Influenzavirusreplikation nicht durch die erwartete antioxidierende Aktivität bzw. Antioxidans-Aktivität ausübt, sondern durch einen besonderen Mechanismus der Inhibition von Proteinkinase C, ein Zellenzym, das eine Hauptrolle im Influenzavirus-Replikationsprozeß spielt. Der Hauptvorteil, der durch die Verwendung von Resveratrol erzielt wird, würde daher in seiner Fähigkeit bestehen, das Virus indirekt anzugreifen, d. h. durch Wechselwirken mit einer funktionellen Zellstruktur des Virus anstatt mit dem Viruspartikel selbst. Dieser Ansatztyp könnte daher zu einer Inhibition des Virus führen, wobei das Auftreten des Resistenzphänomens gegen die gängigsten antiviralen Arzneimittel vermieden wird.

[0015] Dementsprechend besteht eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung in der Verwendung von Resveratrol für die Herstellung eines Medikaments, das für die Prävention und/oder Behandlung von Influen-

zavirusinfektionen einsetzbar ist. In einer bevorzugten Anwendung der vorliegenden Erfindung wird Resveratrol gegen das humane Influenzavirus eingesetzt. In einer breiteren Anwendung der Erfindung umfassen ihre Aufgaben auch die Verwendung von Resveratrol für die Herstellung eines Medikaments, das für die Behandlung von Influenzavirusinfektionen auf dem veterinären Gebiet einsetzbar ist.

[0016] Die Erfindung wird nun detailliert auch anhand der Beispiele und Figuren erläutert, wobei:

[0017] [Fig. 1](#) die Wirkung von Resveratrol auf die Replikation des Influenzavirus PR8 in MDCK-Zellen veranschaulicht, und, um präzise zu sein, in [Fig. 1A](#) im Falle einer Verabreichung nach Infektion, in [Fig. 1B](#) im Falle einer Verabreichung vor Infektion und in [Fig. 1C](#) im Fall einer Verabreichung vor und nach Infektion;

[0018] [Fig. 2](#) die Wirkung von Resveratrol auf konfluente Monolager von nicht-infizierten MDCK-Zellen und, um präzise zu sein, die Anzahl von lebenden Zellen veranschaulicht;

[0019] [Fig. 3](#) die Charakterisierung der antiviralen Aktivität von Resveratrol darstellt, und um präzise zu sein, in [Fig. 3A](#) die Behandlung während einer viralen Adsorption und in [Fig. 3B](#) die Wirkung auf die Viruspartikel darstellt;

[0020] [Fig. 4](#) die Charakterisierung der antiviralen Aktivität von Resveratrol darstellt und, um präzise zu sein, in [Fig. 4A](#) im Fall einer Verabreichung unmittelbar nach der Infektion und Entfernung zu verschiedenen Zeiten und in [Fig. 4B](#) im Fall der Zugabe zu verschiedenen Zeiten bezüglich einer Infektion darstellt;

[0021] [Fig. 5](#) die Apoptose bei MDCK-Zellen darstellt, die mit Resveratrol behandelt wurden (Rauten: nicht infiziert, Quadrate: infiziert);

[0022] [Fig. 6](#) die Korrelation zwischen der antiviralen Wirkung von Resveratrol und dem intrazellulären Redoxzustand darstellt;

[0023] [Fig. 7](#) die Wirkung von Resveratrol auf die Synthese von viralen Proteinen des Influenzavirus PR8 darstellt;

[0024] [Fig. 8](#) das PCR-Resultat für mRNA von späten viralen Proteinen darstellt;

[0025] [Fig. 9](#) die Wirkung von Resveratrol in vivo nach Infektion mit dem Influenzavirus PR8 darstellt.

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

[0026] Zu Zwecken der Veranschaulichung der Wirksamkeit der vorliegenden Erfindung wurden

In-vitro-Studien unter Verwendung von Influenzavirus A/PR8/34, Subtyp H1N1, (im folgenden kurz als Virus PR8) bezeichnet, durchgeführt. Dieser Stamm wurde lediglich als Beispiel eingesetzt, wobei zu verstehen ist, daß die vorliegende Erfindung auf das Influenzavirus im allgemeinen Sinne des Ausdrucks anwendbar ist.

Materialien und Methoden

[0027] Resveratrol ist ein Produkt, das auf dem Markt üblicherweise verfügbar ist oder das unter Verwendung der bekannten Verfahren, die in der Literatur beschrieben sind, erhalten werden kann. Die Substanz wurde in DMSO gelöst verwendet (80 mg/ml). Die Konzentrationen, die für die Experimente verwendet wurden, wurden durch Reihenverdünnungen in RPMI 1640 erhalten. Alle Kontrollproben wurden mit DMSO in denselben Dosen behandelt, die verwendet wurden, um das Resveratrol zu lösen. Bei diesen Konzentrationen produzierte das DMSO keine toxischen Wirkungen auf die Zellen.

Zellkulturen

[0028] Für die Untersuchung der Influenzavirusreplikation wurden MDCK-Zellen (Hundenieren-Epithelzellen) verwendet. Die Zellen wurden in T-25-Phiolen oder in 6- und 24-Well-Libno-Platten in RPMI-Kulturmöglichkeit, das mit L-Glutamin, Penicillin-Streptomycin und 10% fötalem Kälberserum (FCS) versetzt war, kultiviert und bei 37°C in einer 5% CO₂-Atmosphäre gehalten. Die konfluenten Zellmonolayer wurden mit 0,25% Trypsinlösung abgelöst, zentrifugiert und in frischem Medium wieder ausgesät. Die Zellzählung wurde mit einem Hämocytometer durchgeführt und die Zelllebensfähigkeit wurde mittels Ausschluß mit Trypan-Blau-Lebensfähigkeit-Färbung (0,02%) bestimmt.

Produkt des Virus

[0029] Das Virus wurde durch Inokulation einer viralen Suspension, die geeigneterweise verdünnt worden war, in die 10 Tage embryonierte Hühnerei-Allantoidkavität produziert. Nach Inkubieren der Eier bei 37°C für 72 Stunden wurde die Allantoidflüssigkeit, die die neugebildeten viralen Partikel enthielt, durch Zentrifugieren bei +4°C geklärt und bei -80°C gelagert.

Titration bzw. Bestimmung des Virus

[0030] Die Titration des Virus erfolgte unter Verwendung der Hämoagglutinin-Technik, die auf der diesem Virus eigenen Fähigkeit basiert, Blutzellen zu agglutinieren.

[0031] Das unverdünnte Virus in der Allantoid-Flüssigkeit wurde durch skalare Verdünnung mit Phos-

phat-gepufferter Salzlösung (PBS) in 96-Well-Platten durchgeführt, wobei eine 0,5%ige Suspension von humanen Blutzellen der 0 Rh+-Gruppe später zugesetzt wurde. Die Platten wurden lange genug bei Umgebungstemperatur gehalten, damit eine Hämoagglutinationsreaktion erfolgen konnte. Der Virustiter der Probe, ausgedrückt in Hämoagglutinierungseinheiten (HAU), wurde durch die letzte Verdünnung dargestellt, die zur vollständigen Hämoagglutination führte. Die Freisetzung von Virus an den Teil infizierten Zellen wurde nach derselben Arbeitsweise an den Überständen der infizierten Proben evaluiert, die 24 und 48 h nach Infektion genommen worden waren.

Virale Infektion bzw. Virusinfektion

[0032] Die konfluenten Monolager von MDCK-Zellen wurden mit PBS gewaschen und mit dem Virus infiziert (Infektionsmultiplizität [m. o. i.] 0,2). Das Virus wurde insbesondere geeigneterweise in RPMI ohne FCS verdünnt und im Mindestvolumen zu der Zelle gegeben. Nach einstündiger Inkubation bei 37°C (Absorptionszeitraum des Virus) wurde das Inokulum entfernt und die Monolager wurden nach Waschen mit PBS zur Entfernung des Überschusses an nicht-adsorbiertem Virus in frischem Medium, das 2% FCS enthielt, gehalten. Resveratrol wurde bei verschiedenen Konzentrationen (1, 5, 10, 15, 20 und 40 µg/ml) nach den folgenden Behandlungsplänen zugesetzt: a) 24 h vor Infektion (vor); b) unmittelbar nach Adsorption des Virus an den infizierten Zellen (nach); und c) 24 h vor und unmittelbar nach Adsorption des Virus an den infizierten Zellen (vor und nach). In allen Fällen wurde die Substanz für die gesamte Dauer des Experiments inkubieren gelassen. 24 und 48 h nach der Infektion wurde das in den Überstand freigesetzte Virus durch Evaluierung der Hämoagglutinierungseinheiten bestimmt. Wie in [Fig. 1](#) gezeigt ist, inhibierte Resveratrol, das nach Infektion zugesetzt wurde, die virale Replikation in einer dosisabhängigen Art. Bei der Konzentration von 20 µg/ml wurde der Virustiter um 87% im Vergleich zu infizierten und unbehandelten Kontrollen verringert, ohne daß toxische Wirkungen auf die nicht-infizierten Zellen detektiert wurden. Zu Zwecken einer Bestimmung des möglichen Toxizitätsgrades auf die MDCK-Zellen, wurden die letztgenannten nach Konfluenz der Monolager bei verschiedenen Konzentrationen (5, 10, 15, 20 und 40 µg/ml) mit Resveratrol behandelt. Die erhaltenen Resultate beweisen, daß bei den Dosen, die eine signifikante Inhibierung des Influenzavirus verursachten (10–20 µg/ml), eine leichte Reduktion bei der Zellzahl beobachtet wurde, wahrscheinlich infolge der Verlangsamung der Zellproliferation ([Fig. 2A](#)). Bei diesen Dosen wurden allerdings keine morphologischen Veränderungen der Zellen beobachtet. Bei der Konzentration von 40 µg/ml, bei der die virale Replikation bzw. die Virusreplikation vollständig blockiert war, wurden allerdings toxische Wirkungen mit einer Erhöhung der Zellmor-

talität beobachtet (**Fig. 2B**). Auf der Basis dieses Resultats wurde in den folgenden Experimenten die Dosis von 20 µg/ml verwendet, welche eine maximale antivirale Aktivität ohne Nebenwirkungen produzierte.

Charakterisierung der antiviralen Aktivität

[0033] Mit dem Ziel einer Identifizierung der Phasen des viralen Replikationszyklus, der durch Resveratrol kontrolliert bzw. bekämpft wird, wurde die Substanz nach unterschiedlichen Behandlungsplänen bezüglich der verschiedenen Phasen des Lebenszyklus des Virus zugesetzt. In der ersten Phase wurde die Substanz zu Zwecken der Beurteilung, ob Resveratrol mit dem Eintritt des Virus in die Zellen wechselwirkt bzw. diesen stört, in einer Konzentration von 20 µg/ml ausschließlich während der viralen Adsorptionsphase (für eine Stunde bei 37°C) zugegeben und dann entfernt. Eine Messung der Virusreplikation nach 24 h erwies sich mit der Replikation vergleichbar, die in den Kontrollzellen erhalten wurde, was beweist, daß ein Eintritt des Virus durch das Arzneimittel bzw. den Wirkstoff nicht inhibiert wurde (**Fig. 3**). Um darüber hinaus zu beurteilen, ob Resveratrol fähig ist, direkt das Virus zu inaktivieren, wurde das letztgenannte mit der Substanz in einer Konzentration von 40 µg/ml für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Später wurde das so behandelte Virus 1:500 verdünnt und zum Infizieren der Zellen verwendet. Bei diesen Bedingungen wurde keine Verringerung der viralen Replikation beobachtet. Diese Resultate legten nahe, daß Resveratrol das Viruspartikel nicht direkt inaktiviert. In einer zweiten Phase wurden die Zellen infiziert und mit Resveratrol behandelt, wiederum unter Verwendung derselben Konzentration (20 µg/ml), allerdings wurde die Substanz zu verschiedenen Zeiten nach Infektion zugesetzt (0, 3, 6 und 9 h). Die virale Replikation, die als HAU/ml 24 h nach Infektion beurteilt wurde, zeigte, daß diese nur signifikant inhibiert wurde, wenn Resveratrol innerhalb von 3 h einer Infektion zugesetzt wurde (**Fig. 4B**). Wenn dagegen Resveratrol, das unmittelbar nach einer Infektion zugesetzt wurde, zu verschiedenen Zeiten entfernt wurde (0, 3, 6, 9 und 24 h), wurde eine Replikationsinhibition nur beobachtet, wenn die Behandlung wenigstens 9 Stunden andauerte. Außerdem zeigen die in **Fig. 4** gezeigten Resultate auch, daß die antivirale Aktivität, sobald sie erreicht war, bei Unterbrechung der Behandlung nicht reversibel war.

[0034] Die virale Replikation bzw. die Virusreplikation wurde auch durch Analyse des Auftretens von Virusantigenen an der Oberfläche der infizierten Zelle durch Immunfluoreszenz analysiert. Die Analyse von viralen Proteinen durch Immunfluoreszenz erfolgte mit einem Fluoreszenzmikroskop unter Verwendung eines Filters, das im grünen Bereich emittiert (FITC)(Lines 100x). MDCK-Zellen, die für 24 h an Deckgläser kultiviert worden waren, wurden infiziert

und 18 h nach Infektion wurden sie mit Methanol-Aceton 1:1 bei 4°C für 15 min fixiert. Später wurden die Zellen zweimal in PBS gewaschen und mit einer 0,1%-Lösung von PBS-TRITON für 5 min permeabilisiert. Eine Blockade der aspezifischen Stellen erfolgte mit 1% Milch, gelöst in PBS, für 30 min bei Umgebungstemperatur. Später wurden spezifische monoklonale Antikörper (Maus-Anti-Influenza-NP und Maus-Anti-Influenza-M) gegen virale Proteine zugesetzt, in PBS für 30 min 1:50 bei Umgebungstemperatur verdünnt. Der primäre Antikörper wurde mit einem sekundären Antikörper, der an Fluoreszein konjugiert war (Anti-Maus-TITO, Sigma), detektiert.

Analyse der Synthese von viralen Proteinen und Korrelation mit antiviraler Aktivität von Resveratrol

[0035] Virale Proteine wurden durch Western-Blotting analysiert. Zu verschiedenen Zeiten nach einer viralen Infektion wurden die Zellen unter Verwendung spezieller Lysebuffer lysiert. Dann wurden gleiche Mengen an Proteinen auf Polyacrylamidgel in SDS aufgeladen. Nach einer Elektrophorese wurden die Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert und mit polyklonalem Antikörper gegen Influenza (Anti-Influenza-polyklonal-Antikörper) behandelt. Nach Inkubation und geeigneten Waschschritten wurden die Filter mit einem sekundären Antikörper, der an Peroxidase konjugiert war, behandelt, und die viralen Proteine wurden mit Hilfe der Chemilumineszenz-Technik (ECL) "highlighted", wobei ein Peroxidase-Substrat (Luminol) verwendet wurde, was bei Reaktion mit dem Enzym ein Licht emittiert und eine Impression auf der Autoradiographieplatte erzeugt. Die Zellen wurden mit Resveratrol bei verschiedenen Konzentrationen (5, 10, 15 und 20 µg/ml) behandelt. Um eine bessere Abbildung der viralen Proteine zu ermöglichen, wurde der Elektrophoreselauf unter Verwendung eines 10% Polyacrylamidgels (**Fig. 7A**) und eines Gradientengels (**Fig. 7B**) durchgeführt. Resveratrol inhibierte bei Konzentrationen von 15 und 20 µg/ml die Synthese des späten Influenzavirus-Hämoagglutinin (H0-H1, H2) und der Matrixproteine (M) fast vollständig. Dagegen wurde die Expression von frühem Nukleokapsid-Proteinen (Nukleoprotein [NP] und Polymerase-Protein [P]) inhibiert, obgleich zu einem geringeren Ausmaß als die der späten Proteine.

Analyse der Synthese von Messenger-RNAs

[0036] Zum Zwecke der Identifizierung des Mechanismus der Inhibition von viralen Proteinen bzw. Virusproteinen wurden MDCK-Zellen, die infiziert und mit Resveratrol mit den oben beschriebenen unterschiedlichen Konzentrationen behandelt worden waren, mit Hilfe der PCR-Technik analysiert, die von Tohita et al. (J. General Virol. 78, 563–566, 1997) beschrieben wurde. MDCK-Zellen, die mit dem Virus infiziert waren und/oder mit Resveratrol behandelt wor-

den waren, wurden mit dem Reagens GIBCO BRL TRIZOL homogenisiert. Nach 5-minütiger Inkubation bei Umgebungstemperatur wurde Chloroform zugesetzt (0,2 ml pro Probe) und die Proben wurden bei 15 bis 30°C für 3 Minuten inkubiert. Dann wurden sie 10 000 Upm für 15 min bei +4°C zentrifugiert und die wäßrige Phase, die die RNA enthielt, wurde gewonnen. Es wurden 0,5 ml Isopropanol zugesetzt und die Proben wurden bei 15–30°C für 10 min inkubiert und dann zentrifugiert. Die erhaltenen Überstände wurden entfernt und das RNA-Präzipitat wurde mit 75% Ethanol bei 8000 Upm für 5 min bei 2–8°C behandelt. Schließlich wurde das Präzipitat an der Luft getrocknet und in 20 µl Wasser-DEPC (Diethylpyrocarbonat) gelöst.

[0037] Die erhaltene RNA wurde unter Verwendung von reverser Transkriptase transkribiert. Die Retrontranskription erfolgt mit 5 µl RNA jeder Probe in einem Gemisch, bestehend aus Random-Primern, den vier Desoxynukleotiden (dNTP=dATP, dCTP, dGTP, dTTP), Dithiothreitol (DTT) und RT-Puffer (Life Technologies). Die Synthese von komplementärer DNA (cDNA) erfolgte durch Belassen des Gemisches für 10 min bei 22°C, dann 60 min bei 42°C; und schließlich wurde die Reaktion für 10 min bei 75°C inaktiviert. Die so erhaltene cDNA wurde dann in einer PCR verwendet.

[0038] Taq-Polymerase wurde in der PCR verwendet. Eine PCR wurde in ihren drei Phasen der Denaturierung, des Annealing und der Verlängerung bei den entsprechenden Temperaturen von 95, 48 und 72°C durchgeführt. Der Zyklus wurde 20-mal wiederholt. Die für die virale RNA-Amplifikation verwendeten Oligonukleotide waren: für das virale Gen, das für das Hämoagglutinin-Protein (HA) codiert, 5'-Primer: 5'-ACCAAAATGAAGGCAAACC-3', 3'-Primer: 5'-TTACTGTTAGACGGGTGAT-3'; für das virale Gen, das für das Matrixprotein (M) codiert, 5'-Primer: 5'-ATGAGTCTTCTAACCG-3', 3'-Primer: 5'-ACTG-CTTGTCATGT-3'. Das PCR-Produkt wurde in einer Elektrophorese (100 Volt) an einem 1% Agarosegel in einem Puffer, in den Ethidiumbromid gegeben worden war, um die DNA mit einem UV-Transluminoator zu zeigen, laufen gelassen.

[0039] Die erhaltenen Proben wurden bei 4, 8 bzw. 20 h nach viraler Infektion evaluiert. Messenger-RNAs für die viralen Proteine HA und M wurden bei 4 h weder in der Kontrollgruppe noch in der mit Resveratrol behandelten Gruppe beobachtet. Die Resultate zeigen, daß die Synthese der mRNAs 20 h nach Infektion durch Behandlung mit Resveratrol nicht beeinträchtigt wird. Die Beobachtung bei 4 h zeigt, daß Resveratrol nur eine Verzögerung bei der Messenger-Synthese für diese Proteine verursacht ([Fig. 8](#)). Diese Resultate legen nahe, daß Resveratrol in Dosen von 20 µg/ml eine Verzögerung der Freisetzung von Messenger RNAs für die späten viralen

Proteine (HA und M), evaluiert 8 Stunden nach Infektion, verursacht.

Lokalisierung des Proteins NP

[0040] In Anbetracht der Tatsache, daß die Inhibition von Proteinkinase C in Zellen, die durch das Influenzavirus infiziert sind, eine substantielle Verringerung der Protein M-Expression zusammen mit einer Retention des Nukleoproteins des Kerns der infizierten Zellen verursacht (J. Virol. 74, 1781–86, 2000), wurden MDCK-Zellen, die mit dem Virus PR8 infiziert worden waren und mit Resveratrol in einer Konzentration von 20 µg/ml behandelt worden waren oder nicht, mit spezifischen Anti-M- und Anti-NP-Antikörpern gefärbt und unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Die Resultate zeigten, daß, während bei den nicht-infizierten Zellen NP sowohl intern als auch im Cytoplasma und M1 vorwiegend im Cytoplasma beobachtet wird, NP in Zellen, die mit Resveratrol behandelt worden waren, im Kern zurückgehalten wird, und M, welches signifikant inhibiert wird, kann gleichermaßen nur im Kern (Nukleus) beobachtet werden. Dieses Phänomen kann einer Inhibition von Zellproteinen mit einer Kinasefunktion zugeschrieben werden. Die Daten legen dann nahe, daß der antiviale Wirkmechanismus mit der Inhibition von Proteinen mit einer Kinasefunktion, die oben beschrieben wurden, in Relation stehen kann (FEBS Letters, 45, 63–7, 1999).

Assay auf reduziertes und oxidiertes Glutathion

[0041] Der Glutathion-Assay wurde als Resultat der Bildung von S-Carboxymethyl-Derivaten von freien Thiolen mit Iodessigsäure, gefolgt von einer Umwandlung der terminalen NH₂-Gruppen in 2,4-Dinitrophenyl-Derivate nach der Reaktion von 1-Fluor-2,4-dinitrobenzol durchgeführt (Anal. Biochem., 106, 55–62, 1980).

[0042] Die MDCK-Zellen wurden mittels der Schabetechnik abgelöst. Später wurden die Zellen mit 1200 Upm für 5 Minuten zentrifugiert. Die Zellen wurden zweimal in PBS gewaschen und das Präzipitat, das nach einem Zentrifugieren erhalten wurde, wurde in 200 µl Puffer resuspendiert. Die Zelllysate, die durch wiederholte Zyklen des Gefrierens und Auftauens erhalten wurden, wurden durch Präzipitation in 5% Metaphosphorsäure deproteinisiert. Nach Zentrifugieren bei 22 300 g wurden die Thiole mit niedrigem Molekulargewicht, die im Überstand vorlagen, mit 10% Iodessigsäure, V/V, derivatisiert und mit NaHCO₃ in Pulverform neutralisiert. Nach 1 h Inkubation im Dunklen wurde eine Lösung von 1,5% 1-Chlor-2,4-dinitrobenzol, V/V, zugesetzt (1,5 ml/98,5 ml absolutes Ethanol). Nach Zugabe des Sanger-Reagenzes wurden die Proben für 12 h im Dunklen inkubiert und die Abtrennung der verschiedenen Glutathion-Spezies erfolgte mittels einer

μBondapak-NH₂-HPLC-Säule, 3,9 × 300 mm, (Millipore). Um den Gesamt-GSH-Gehalt zu messen, wurde auf eine Standardkurve Bezug genommen, die mit gereinigtem GSH erhalten worden war. Der GSH-Gehalt wird in GSH nmol/mg Proteine, die in der Lysatprobe vorhanden sind, ausgedrückt. Die Proteinkonzentration wurde unter Verwendung der Lowry-Methode errechnet (Biol. Chem., 193, 265–75, 1951). Dieses Verfahren nützt die Fähigkeit von Proteinen, das Folin-Ciocalteau-Reagens in alkalischer Lösung mit Cu²⁺-Ionen zu reduzieren, und zwar dank des Vorliegens der Phenol-Gruppen einer Reihe von Aminosäuren, zum Beispiel Tryptophan, Tyrosin, Cystein und Histidin. Tryptophan und Tyrosin reagieren durch ihre besonders reaktiven Phenol-Gruppen, Cystein durch die -SH-Gruppe und Histidin mit dem Imidazol-Ring. Das reduzierende Reaktionsprodukt wird durch die Bildung von gefärbten Verbindungen durch Reaktion mit den aromatischen Aminosäuren der Proteine detektiert. In der Tat nimmt die Lösung eine besonders intensive blaue Farbe an, die eine Spitzenabsorption bei 695 nm hat. Auf der Basis der Verhältnisse der Absorption wird die Konzentration der Proteine daher in Relation zu einer gradlinigen Eichkurve erhalten, welche unter Verwendung verschiedener Konzentrationen von Trommelrinderalbumin als Standard erhalten worden war.

[0043] Zu Zwecken einer Evaluierung ermöglichen Korrelation zwischen der antiviralen Aktivität und der Modulation des Redoxzustandes, wurde die die Konzentration des zellulären GSH von MDCK-Zellen, die mit verschiedenen Resveratrol-Konzentrationen behandelt worden waren und mit dem Virus infiziert worden waren oder nicht, durch eine HPLC-Analyse 24 h nach Infektion beurteilt. Überraschenderweise produzierte Resveratrol, das nicht-infizierten MDCK-Zellen zugesetzt worden war, eine Verringerung bei den intrazellulären GSH-Konzentrationen im Vergleich zu unbehandelten Zellen (**Fig. 6**). Der Zuwachs von Resveratrol zu infizierten Zellen stellte die durch die Infektion reduzierten GSH-Konzentrationen nicht wieder her, obgleich eine Inhibierung der Virusreplikation erfolgte.

Analyse der Apoptose

[0044] Für die Analyse der Apoptose wurden MDCK-Zellen mit dem Virus PR8 infiziert. Nach Virusabsorption wurden die Zellen mit Resveratrol in verschiedenen Konzentrationen (5, 10, 15 und 20 µg/ml) behandelt. 24 Stunden nach der Infektion wurden die Zellen unter Verwendung einer 0,25%igen Trypsin-Lösung abgelöst und dann für 5 min bei 1200 Upm zentrifugiert. Das so erhaltene Präzipitat wurde nach Markierung mit Propidiumiodid mittels der FACS-Technik analysiert.

[0045] Zu Zwecken der Beurteilung, ob die Induktion von Zelltod durch Apoptose bei der antiviralen

Wirkung von Resveratrol involviert war, wurden MDCK-Zellen mit dem Virus infiziert oder nicht und mit der Substanz in den verschiedenen Konzentrationen behandelt. Zelltod durch Apoptose wurde durch FACS nach Markierung mit Propidiumiodid evaluiert. Wie in **Fig. 5** gezeigt ist, verursachte Resveratrol einen gewissen Grad von Zelltod durch Apoptose bei nicht-infizierten Zellen in einem Bereich von 8 bis 32% entsprechend der Dosen (5 bzw. 20 µg/ml). Die Infektion selbst induzierte eine Apoptose in 12% der infizierten Zellen. Obgleich der Zusatz steigender Dosen eine Erhöhung der Mortalität verursachte, wurde keine signifikante Differenz zwischen infizierten Zellen und nicht-infizierten Zellen, die mit antiviralen Dosen des Wirkstoffs behandelt worden waren (35 bzw. 37% Apoptose), beobachtet.

[0046] Zur weiteren Bestätigung der Resultate der vorliegenden Erfindung und als Beispiele werden die folgenden In-vivo-Untersuchungen beschrieben.

Beispiel

[0047] Es wurden 4 Wochen alte weibliche Inzucht-Balb/c-AnCrIBR-Mäuse verwendet. Resveratrol wurde in PBS gelöst den Tieren auf intraperitonealem Weg zu verschiedenen Zeiten nach Infektion mit dem Influenzavirus verabreicht. Die Resveratrol-Konzentrationen wurden so gewählt, daß ein Bereich von Dosen im Tierblut ähnlich dem wirksamen Bereich in vitro (10 bis 20 µg/ml) erreicht wurde.

[0048] Die Mäuse wurden nach einer leichten Anästhesie mit Ether intranasal (i. n.) mit einer Suspension, die das Influenzavirus A/PR enthielt, mit einer Infektionsmultiplizität von 2 HAU/Maus inokuliert. Auf der Basis von verschiedenen experimentellen Daten produziert das Influenzavirus bei dieser Infektionsmultiplizität hämorrhagische Pneumonie, die zum Tod von 80% der Tiere eine Woche nach Infektion führt. Zu Zwecken einer Überwachung durch Infektionstrends wurden sowohl virologische wie auch immunologische Parameter zusätzlich zu einer Untersuchung der Überlebenskurven überwacht.

[0049] Als virologischer Parameter wurde die Viruslast bestimmt. Zu verschiedenen Zeiten nach Infektion wurden die Lungen von infizierten Mäusen und Kontrollmäusen als Proben entnommen, gewogen und in RPMI, das Antibiotika enthielt, homogenisiert. Nach dem Zentrifugieren wurden die Überstände in geeigneter Weise verdünnt und die Viruslast wurde mit Hilfe des CPE-50%-Tests analysiert. Auf der Basis dieses Verfahrens wurden konfluente MDCK-Zellen mit den Überständen, die im RPMI, das mit Antibiotika und 2% FCS zersetzt war, reihenverdünnt worden waren, infiziert und für 3 Tage bei 37°C in 5% CO₂-Atmosphäre inkubiert. Schließlich wurden für jede Verdünnung die Wells, die positive Wirkungen zeigten, gezählt und mit denen verglichen, die nega-

tive cytopatische Wirkungen gemäß der Formel von Reed und Muench zeigten, verglichen. Der CPE-50%-Titer wurde in Einheiten/ml berechnet.

[0050] Als immunologische Parameter wurden die Konzentrationen an inflammatorischen Cytokinen unter Verwendung des ELISA-Verfahrens evaluiert. Für das Experiment wurde eine Platte mit 96 Wells verwendet. Die Platte wurde mit monoklonalen Antikörpern auf die zu untersuchenden Cytokine beschichtet, über Nacht bei 4°C inkubiert. Später wurden 200 µl/Well 1% BSA in Carbonat-Puffer 30 min bei 37°C zugesetzt. Es folgten Waschschritte mit 0,25% TBS + Tween 20 und die Proben wurden für 4 Stunden bei 37°C zugetropft. Als Referenzkurve wurden rekombinante Cytokine in scalarer Verdünnung verwendet. Dann wurden Waschschritte durchgeführt und es wurde ein polyklonaler Anti-Cytokin-Antikörper, der sich von dem ersten unterschied, zugesetzt und über Nacht bei +4°C stehengelassen. Nach Waschschritten mit 0,5 TBS + Tween 20, 2 nM MgCl₂ wurde der dritte Antikörper, konjugiert an das Enzym alkalische Phosphatase, für 4 h bei 37°C zugesetzt. Schließlich wurde ein Substrat für das Enzym (100 µl/Well) zugegeben und die Ablesung erfolgte unter Verwendung des ELISA-Lesegeräts und eines 405 nm-Filters. Die folgenden Antikörper wurden analysiert: 1) monoklonaler Ratten-Anti-Maus-TNF-alpha/rekombinantes Maus-IL-6; 2) rekombinanter Maus-TNF-alpha/rekombinantes Maus IL-6; 3) polyklonaler Kaninchen-Anti-Maus-TNF-alpha/polyklonaler Ziege-Anti-Maus-IL-6; 4) Ziege-Anti-Kaninchen-IgG-alkalische Phosphatase/Anti-Ziege-IgG-alkalische Phosphatase.

[0051] Die Wirksamkeit von Resveratrol wurde in einem experimentellen Influenzavirus-Infektionsmodell bei der Maus untersucht. In diesem Modell verursacht eine intranasale Inokulation des Virus schwere hämorrhagische Pneumonie, die innerhalb von 7 bis 10 Tagen der Infektion zum Tod der Tiere führt. Das experimentelle Konzept sieht die Evaluierung der therapeutischen Wirksamkeit der Studiensubstanz in Betracht, wie sie auf der Basis des Überlebens der infizierten Tiere beurteilt wird. Zu diesem Zweck wurde Resveratrol den Tieren mit verschiedenen Dosen auf einer täglichen Basis für 7 Tage beginnend wenige Stunden nach einer Infektion verabreicht. Die erhaltenen Resultate zeigen, daß, während die Mortalität der nicht-behandelten Tiere so hoch wie 80% war, die Verabreichung von Resveratrol (1 mg/kg) die Mortalität signifikant verringerte und daß 60% der Tiere die Infektion überlebten ([Fig. 9](#)).

Patentansprüche

1. Verwendung von Resveratrol als aktives Ingrediens bei der Herstellung eines Medikaments, das eine inhibitorische Wirkung auf Influenzavirusreplikation ausübt und für die Prävention und/oder Behand-

lung von Influenzavirusinfektionen verwendbar ist.

2. Verwendung nach Anspruch 1, wobei das Virus das humane Influenzavirus ist.

3. Verwendung nach Anspruch 1, wobei das Medikament für die Behandlung von Virusinfektionen auf dem veterinären Gebiet einsetzbar ist.

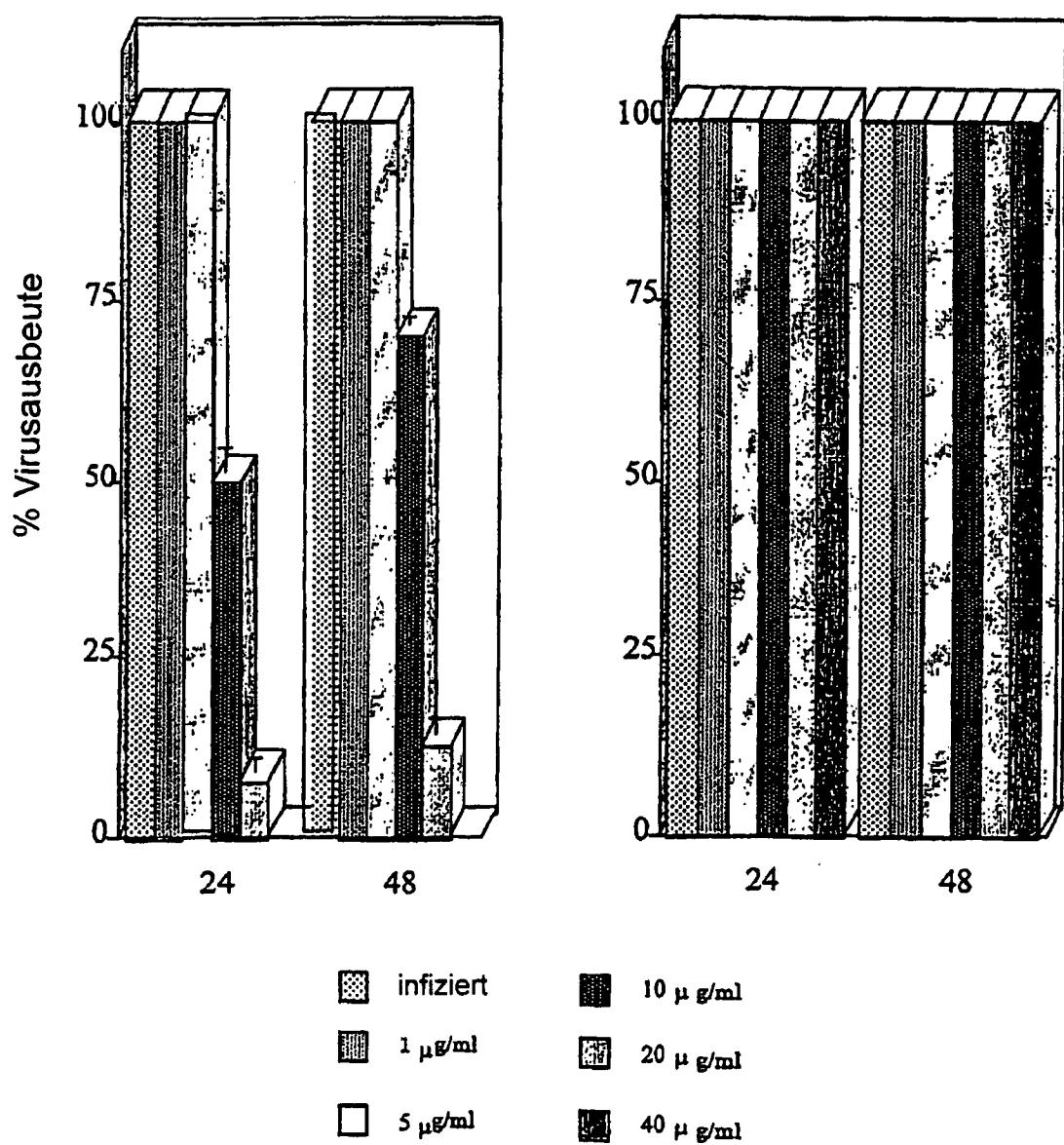
Es folgen 12 Blatt Zeichnungen

Figur 1

Wirkung von Resveratrol auf Influenza pr8-Virusreplikation
in MDCK-Zellen

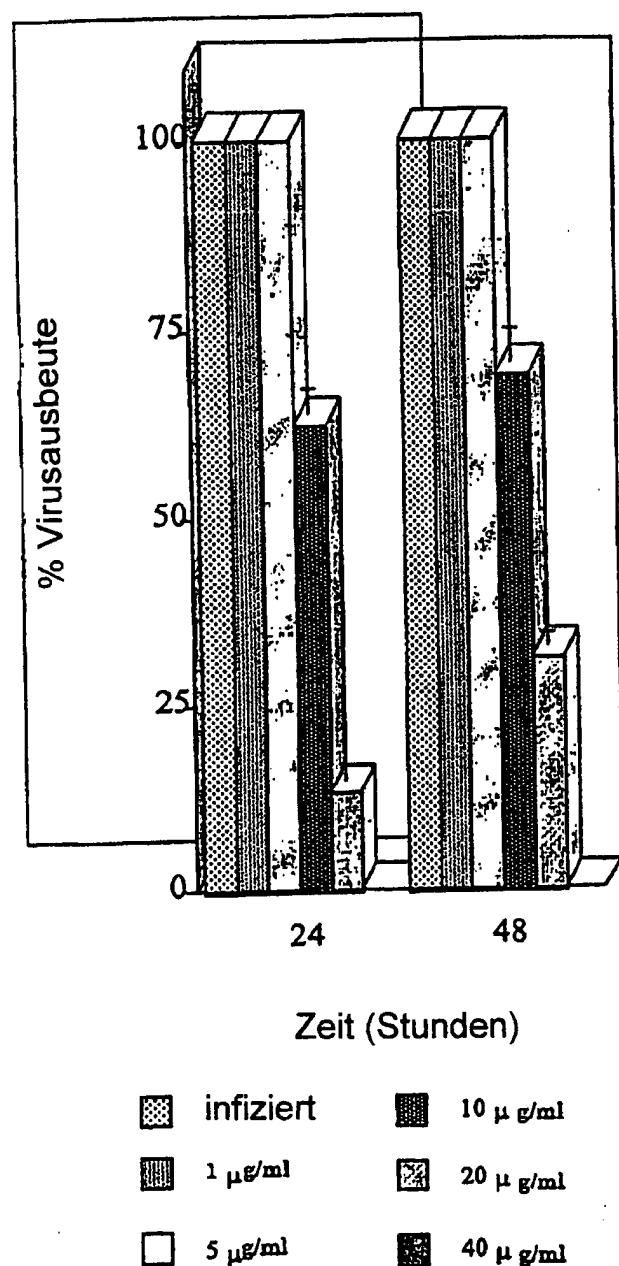
A) Nach Infektion

B) Vor Infektion



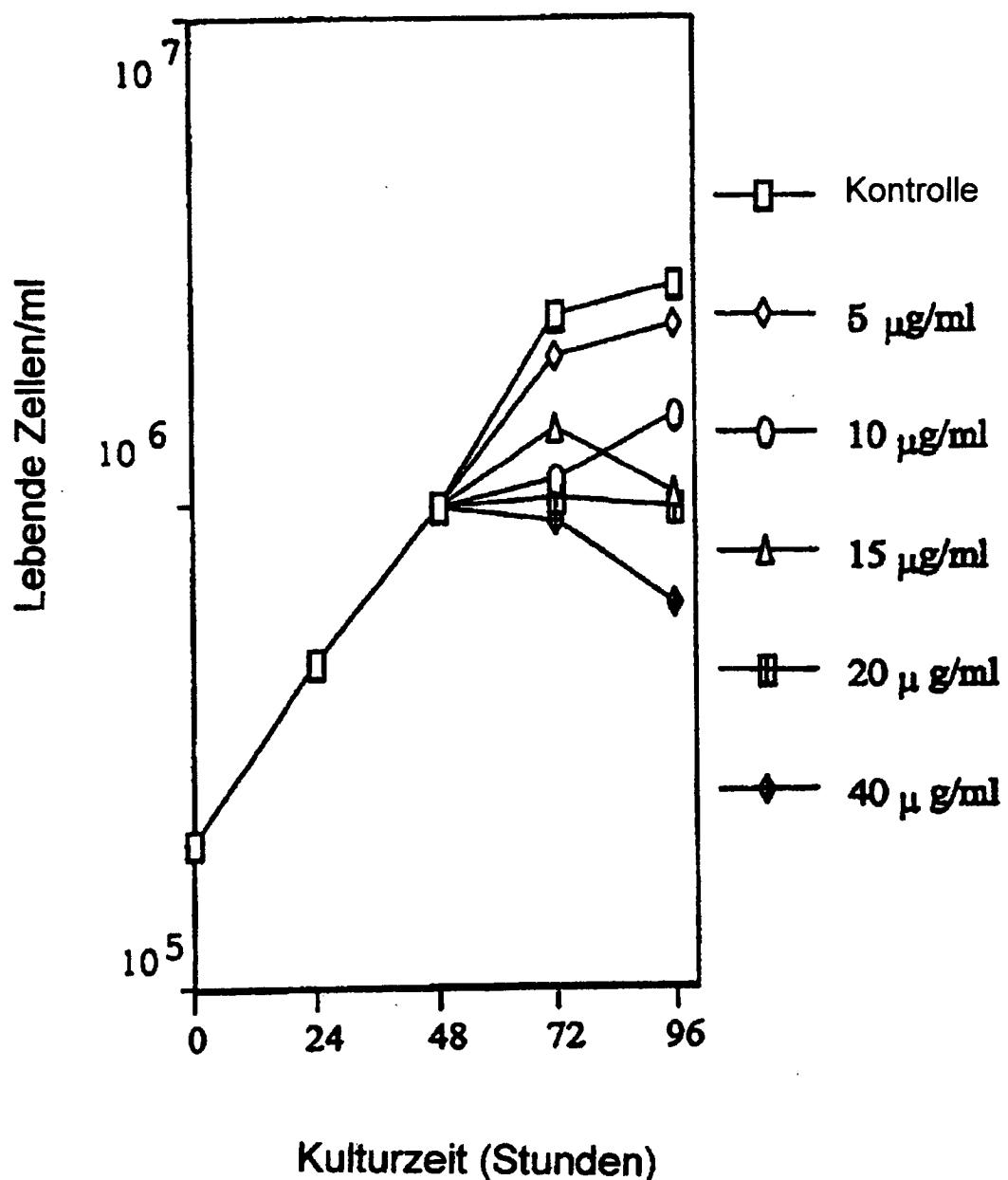
Figur 1 (Fortsetzung)

C) Vor und nach Infektion

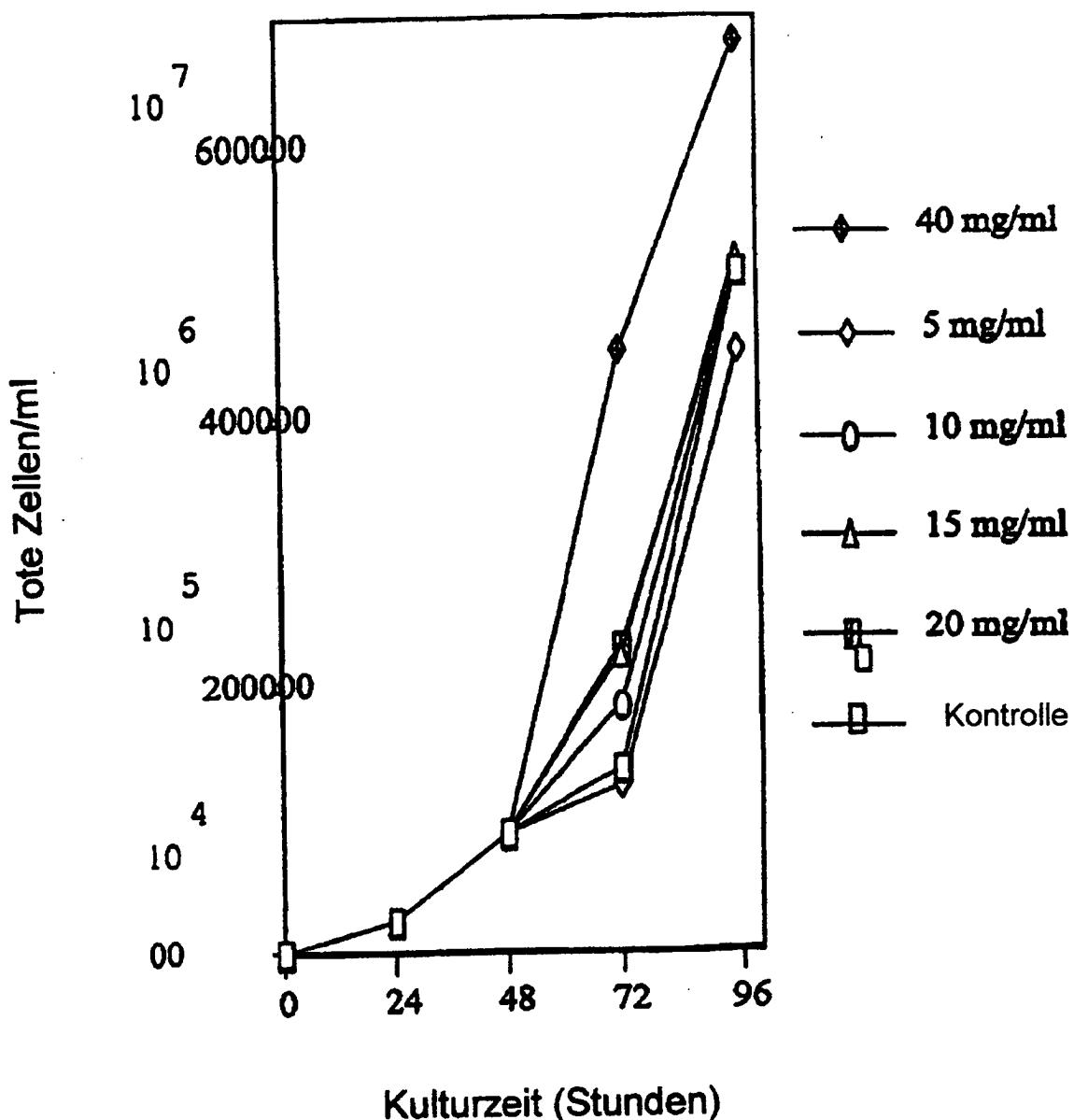


Figur 2A

Wirkung von Resveratrol auf konfluente Monolayer von nicht-infizierten MDCK-Zellen



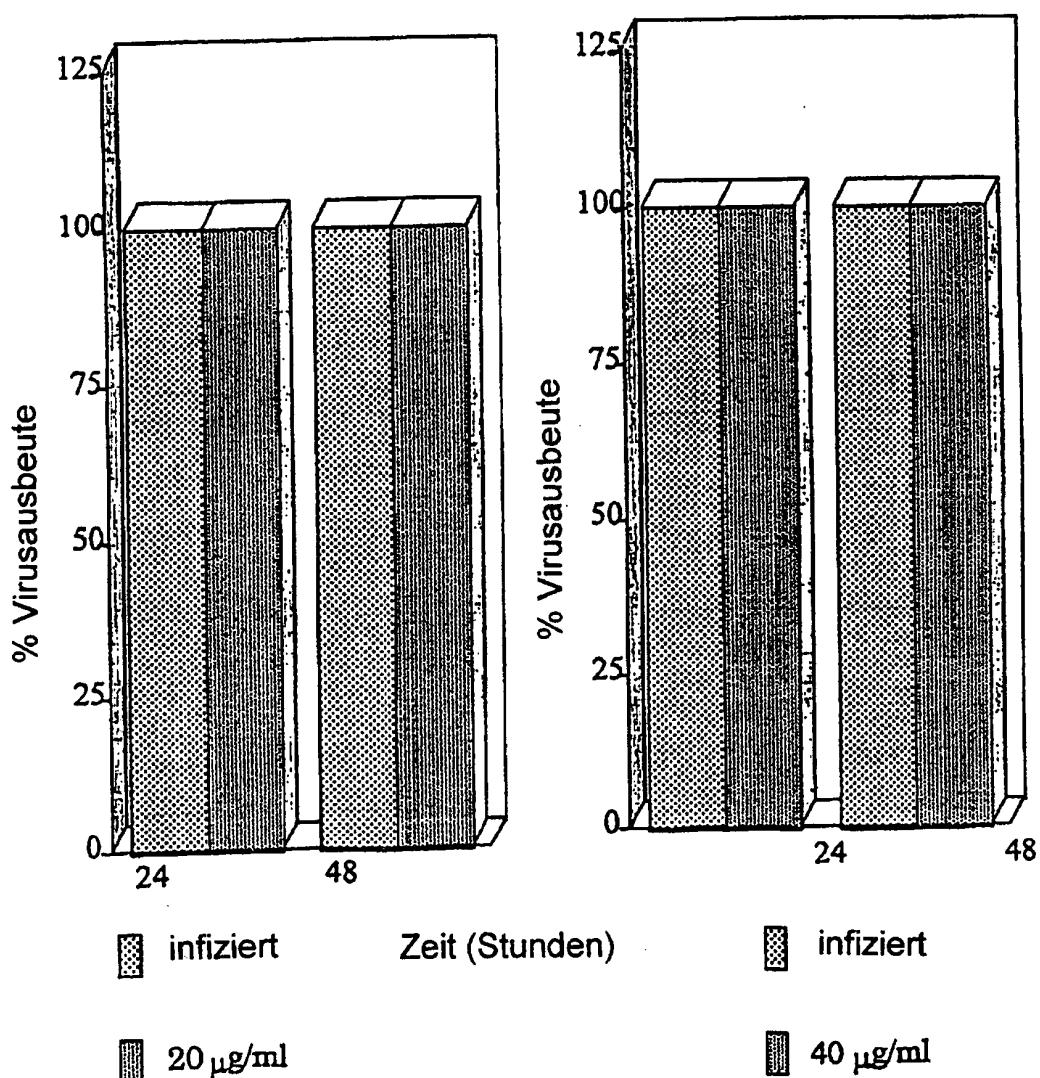
Figur 2B (Fortsetzung)



Figur 3

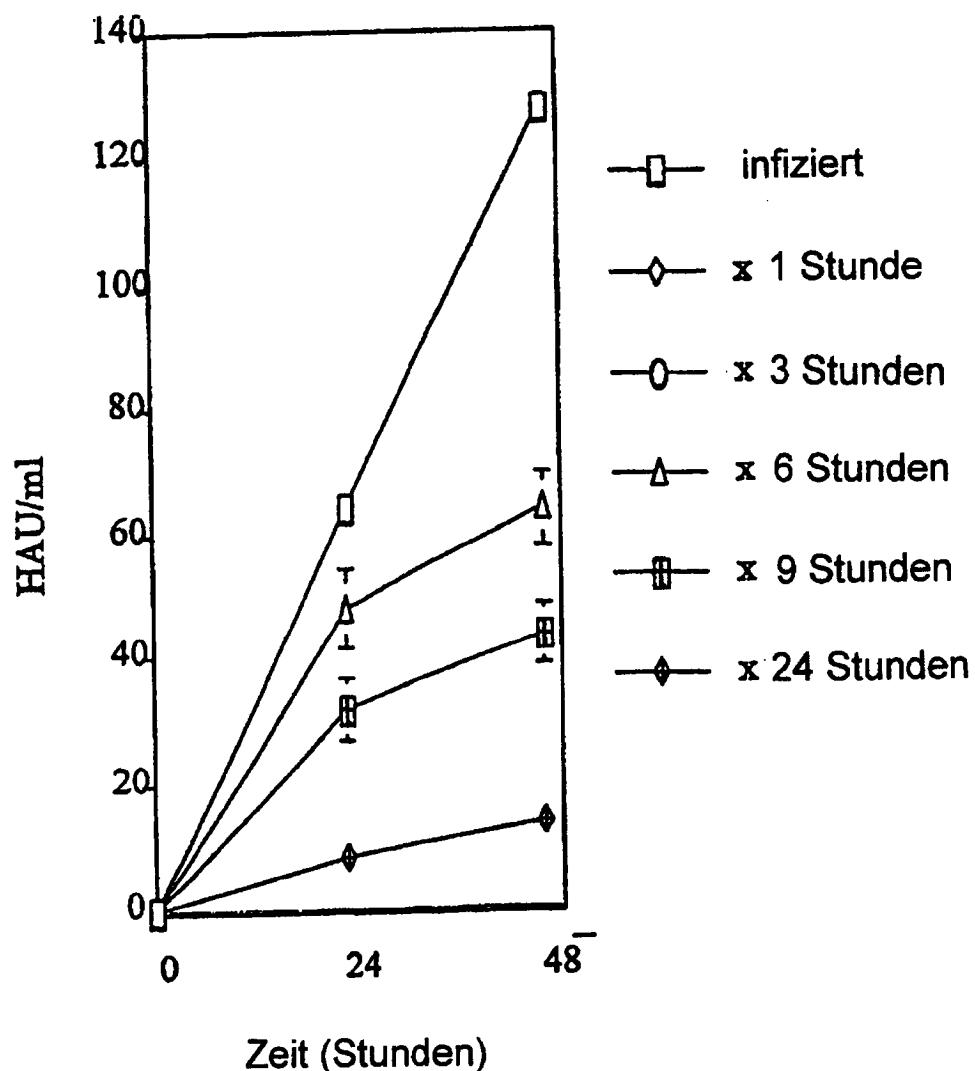
Charakterisierung der antiviralen Aktivität von Resveratrol

A) Behandlung während Virusabsorption B) Wirkung auf Viruspartikel



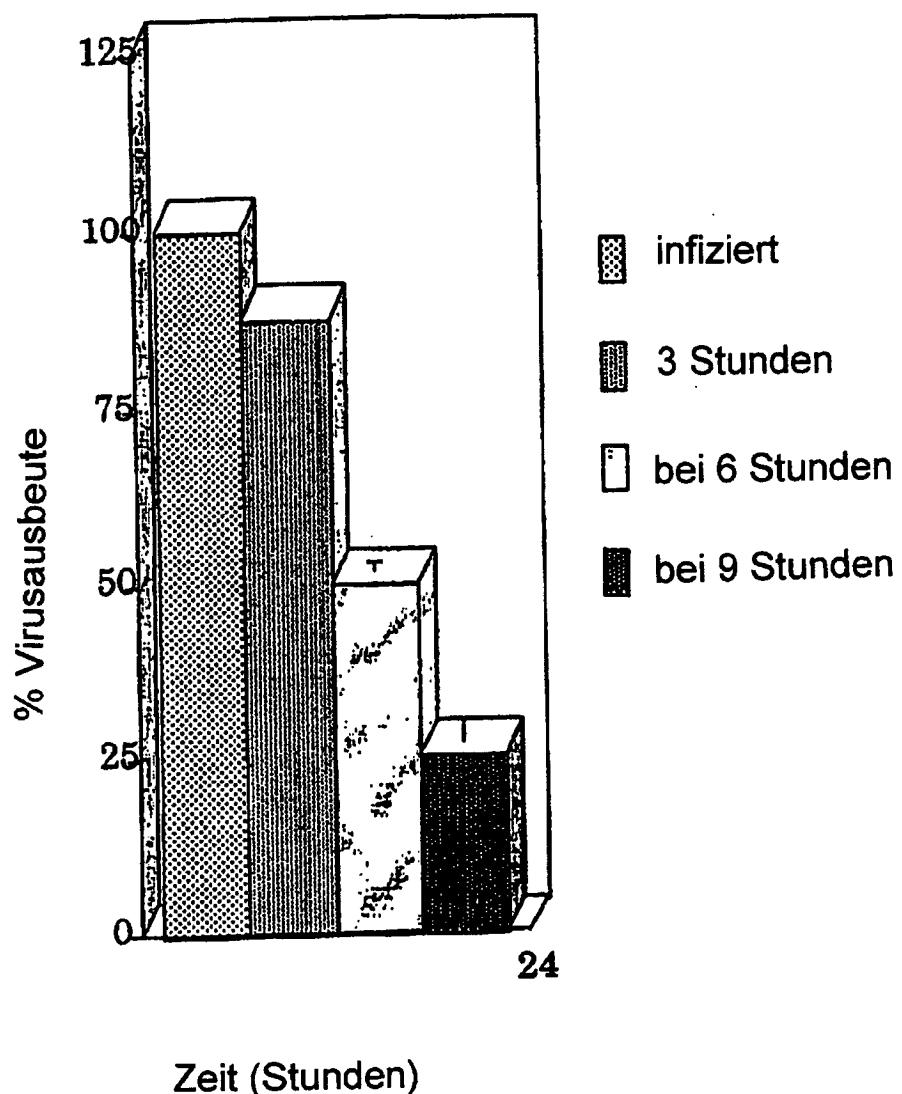
Figur 4A

Charakterisierung der antiviralen Aktivität von Resveratrol

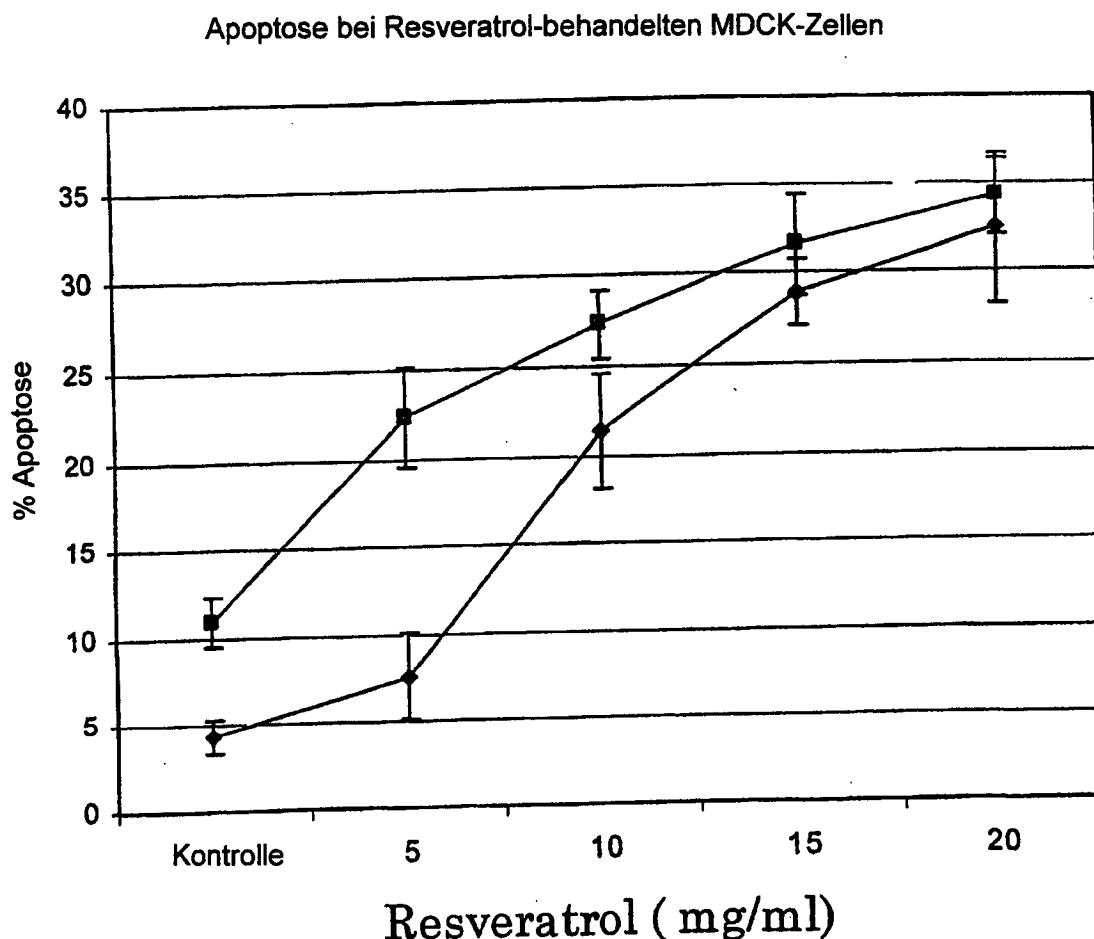


Figur 4B

Charakterisierung der antiviralen Aktivität von Resveratrol

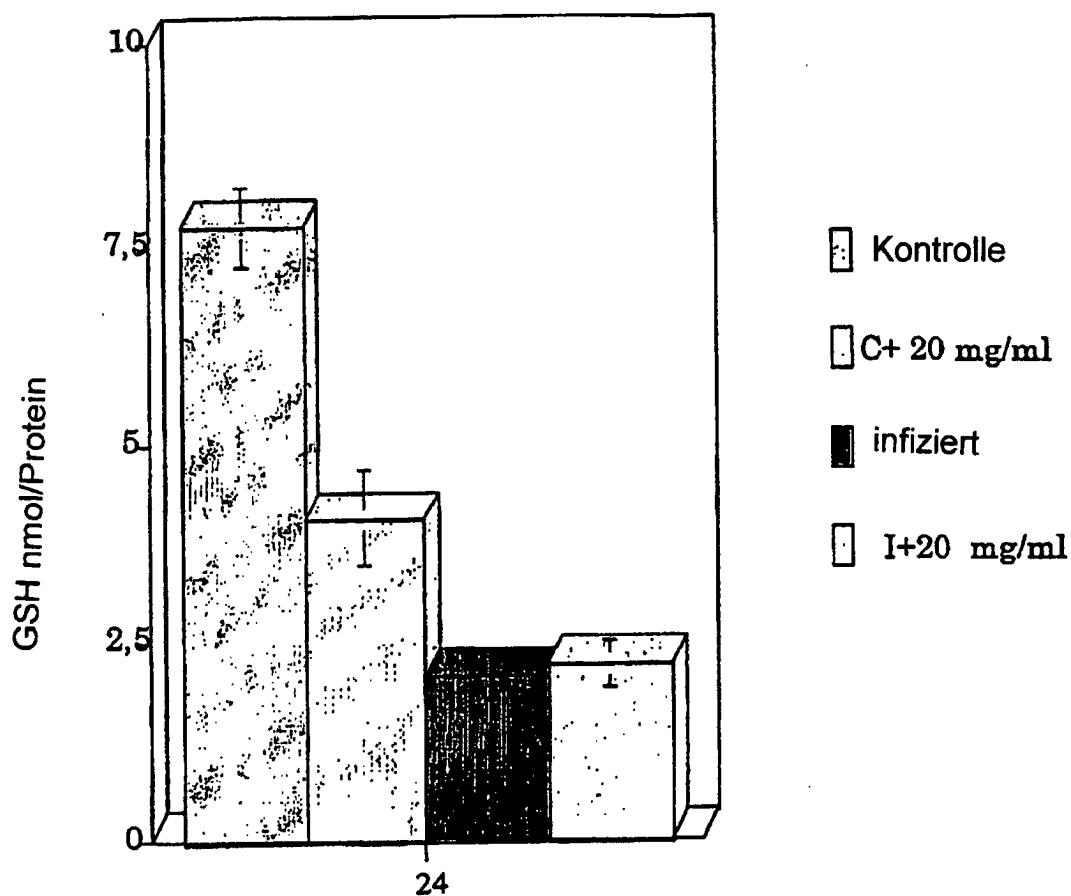


Figur 5



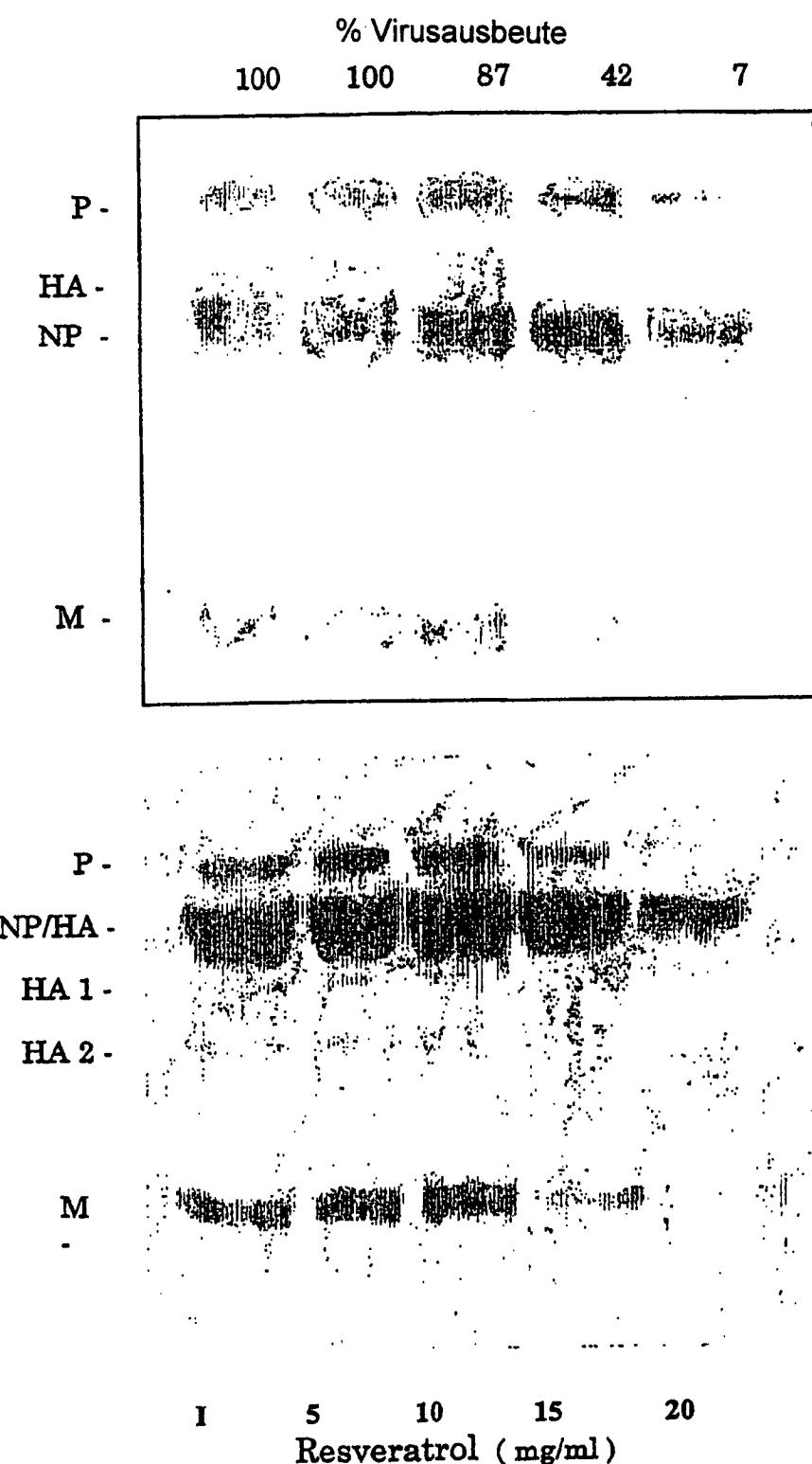
Figur 6

Korrelation der antiviralen Wirkung von Resveratrol mit dem intrazellulären Redoxzustand



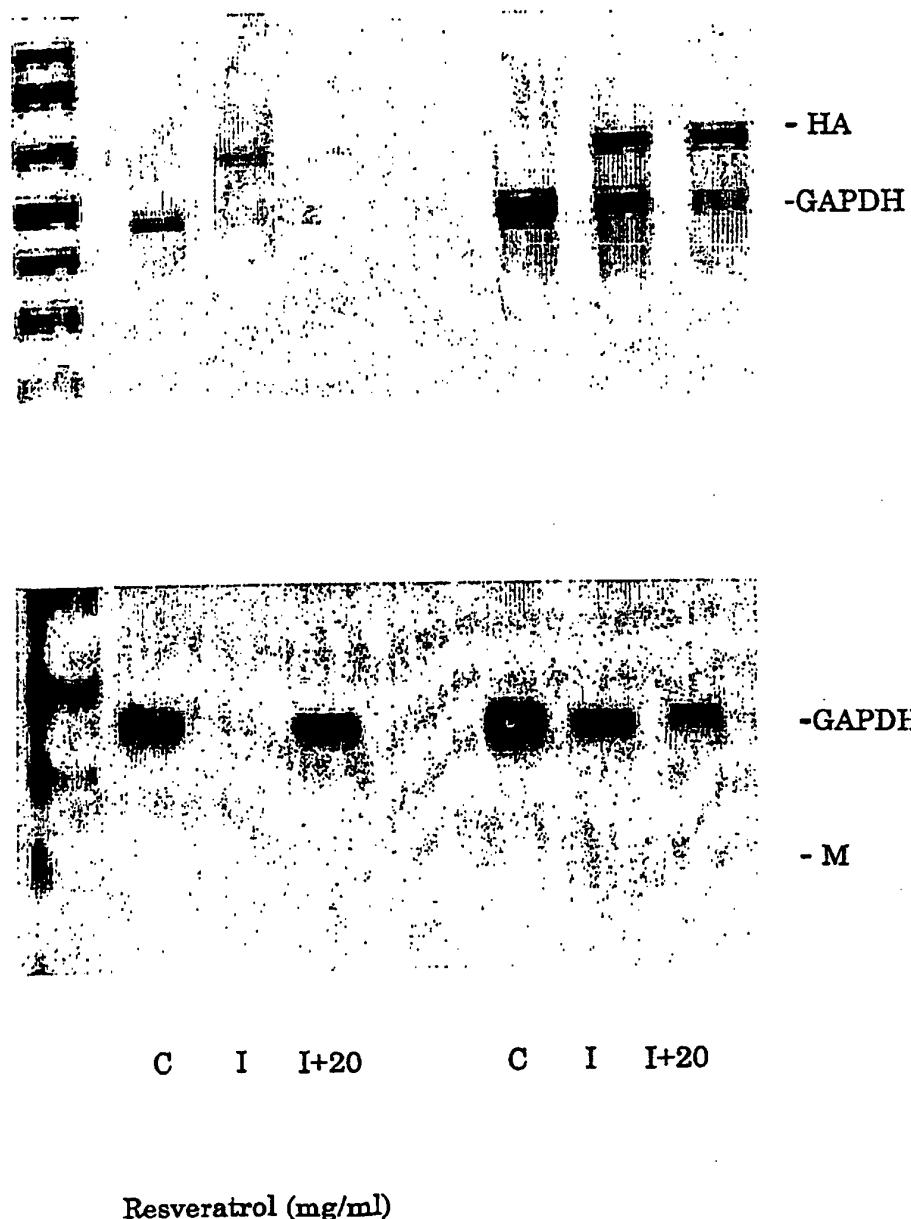
Figur 7

Wirkung von Resveratrol auf die Synthese von
Influenza- α -pr8-Virusproteinen



Figur 8

RT-PCR für mRNA für späte virale Proteine



Figur 9

Wirkung von Resveratrol, verabreicht nach viraler Influenza-pr8-Infektion, in vivo

