



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114007598 A

(43) 申请公布日 2022.02.01

(21) 申请号 202080044394.4

(22) 申请日 2020.04.16

(30) 优先权数据

LU101183 2019.04.16 LU

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.12.16

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2020/060692 2020.04.16

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/212478 EN 2020.10.22

(71) 申请人 归属疗法有限公司

地址 德国图宾根市

(72) 发明人 0·普朗兹

(74) 专利代理机构 北京瑞恒信达知识产权代理  
事务所(普通合伙) 11382

代理人 侯淑红

(51) Int.Cl.

A61K 31/196 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

A61P 31/16 (2006.01)

A61P 31/14 (2006.01)

权利要求书2页 说明书27页 附图25页

(54) 发明名称

用于治疗病毒和细菌感染的新型MEK抑制剂

(57) 摘要

本发明涉及用于治疗病毒感染或病毒和细菌共感染的方法中的PD-0184264。本发明还提供了用于治疗病毒感染和预防和/或治疗细菌共感染的包含此类抑制剂的组合物。

1. 用于治疗病毒性疾病的方法中的PD-0184264或其药学上可接受的盐,其中当治疗开始时所述患者已具有病毒感染的症状至少24小时。

2. 根据权利要求1所述供使用的PD-0184264或其药学上可接受的盐,其中当治疗开始时所述患者已具有病毒感染的症状至少36小时、至少48小时或至少72小时。

3. 根据权利要求1或2所述供使用的PD-0184264或其药学上可接受的盐,其进一步用于预防或治疗细菌共感染。

4. 根据权利要求1-3中任一项所述供使用的PD-0184264或其药学上可接受的盐,其中所述病毒感染是由负链或正链RNA病毒引起的呼吸道感染。

5. 根据权利要求4所述供使用的PD-0184264或其药学上可接受的盐,其中所述负链RNA病毒是流感病毒。

6. 根据权利要求5所述供使用的PD-0184264或其药学上可接受的盐,其中所述病毒是甲型流感病毒或乙型流感病毒。

7. 根据权利要求6所述供使用的PD-0184264或其药学上可接受的盐,其中所述甲型流感病毒选自H1N1、H2N2、H3N2、H5N6、H5N8、H6N1、H7N2、H7N7、H7N9、H9N2、H10N7、N10N8或H5N1。

8. 根据权利要求1-4中任一项所述供使用的PD-0184264或其药学上可接受的盐,其中所述乙型流感病毒选自IBV型Yamagata或Victoria。

9. 根据权利要求1-4中任一项所述供使用的PD-0184264或其药学上可接受的盐,其中所述病毒感染由正链RNA病毒引起。

10. 根据权利要求9所述供使用的PD-0184264或其药学上可接受的盐,其中所述病毒是冠状病毒。

11. 根据权利要求10所述供使用的PD-0184264或其药学上可接受的盐,其中所述病毒为SARS-CoV、SARS-CoV2或MERS。

12. 根据权利要求1-11中任一项所述供使用的PD-0184264或其药学上可接受的盐,其中所述病毒对标准抗病毒治疗具有抗性。

13. 根据权利要求12所述供使用的PD-0184264或其药学上可接受的盐,其中所述标准抗病毒治疗是施用奥司他韦、扎那米韦、帕拉米韦、金刚烷胺、金刚乙胺、法匹拉韦、巴洛韦、马波沙尼和/或匹莫韦。

14. 根据权利要求12所述供使用的PD-0184264或其药学上可接受的盐,其中所述病毒是H1N1病毒A H275Y突变体。

15. 根据权利要求1-14中任一项所述供使用的PD-0184264或其药学上可接受的盐,其中所述患者在施用PD-0184264之前已用标准抗病毒方法治疗。

16. 根据权利要求1-15中任一项所述供使用的PD-0184264或其药学上可接受的盐,其中PD-0184264或其药学上可接受的盐与神经氨酸酶抑制剂或其药学上可接受的盐组合施用。

17. 根据权利要求16所述供使用PD-0184264或其药学上可接受的盐,其中所述神经氨酸酶抑制剂选自奥司他韦、磷酸奥司他韦、扎那米韦、拉尼米韦或帕拉米韦或其药学上可接受的盐。

18. 根据前述任一权利要求所述供使用的PD-0184264或其药学上可接受的盐,所述患

者优选为脊椎动物,最优选为人。

19. 根据权利要求1-18中任一项所述供使用的PD-0184264或其药学上可接受的盐,其中PD-0184264以100至900mg,优选600mg的剂量每日一次施用于人类患者。

20. 根据权利要求19所述供使用PD-0184264或其药学上可接受的盐,其中PD-0184264连续1至21天,优选连续7至14天施用于人类患者。

21. 根据权利要求19或20所述供使用PD-0184264或其药学上可接受的盐,其中PD-0184264以口服剂型施用于人类患者。

## 用于治疗病毒和细菌感染的新型MEK抑制剂

### 背景技术

[0001] 甲型流感病毒是造成显著发病率和死亡率的严重呼吸道疾病的病原体。流感病毒感染过程中的大多数致命病例实际上是由不同细菌引起的继发性肺炎的结果,所述细菌例如金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*, *S. aureus*)、肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 和流感嗜血杆菌 (*Haemophilus influenzae*) (Morens等人,2008;Chertow等人,2013)。细菌共感染最显著的问题是突然增加的致病性 (Iwao等人,2012;Paddock等人,2012;Parker等人,2012) 和针对不同病原体的有效抗感染剂的有限储备。流感病毒的高度可变性和新菌株的持续出现 (Neumann等人,2009;Taubenberger等人,2010;Parry,2013)、细菌菌株的特有特征 (Grundmann等人,2006;Moran等人,2006;Gillet等人,2007;Shilo等人,2011) 以及流感病毒 (Hayden等人,1992;Bright等人,2006;Pinto等人,2006;De Clercq等人,2007;Pinto等人,2007) 和细菌二者 (Grundmann等人,2006;Moran等人,2006;Shilo等人,2011) 对可用药物/抗生素的快速抗性发展是治疗方案不佳的主要原因。

[0002] W02001/076570提供了通过MEK抑制剂治疗或预防(-) RNA病毒,特别是流感病毒引起的感染的概念。W02014/056894提供了用于治疗或预防流感病毒感染的特异性MEK抑制剂,例如AZD-6244、AZD-8330、RDEA-119、GSK-1120212 (曲美替尼,Trametinib)、GDC-0973 (钴美替尼,Cobimetinib)、CI-1040、PD-0325901、RO-5126766、MSC1936369 (AS-703026)。W02015/173788A1公开了MEK抑制剂在治疗流感病毒和细菌共感染的方法中的用途。

[0003] 2009年H1N1大流行清楚地表明甲型流感病毒 (IAV) 对全球健康系统具有强烈的影响 (Mackey和Liang,2012;Monto等人,2011;Robertson和Inglis,2011)。这通过2019/2020冠状病毒 (Covid19) 大流行得到证实。除了预防性接种,仅有少数抗病毒药物被批准用于流感,并且迄今为止没有已知的针对Covid19的药物。这突出了对其它有效的抗病毒剂的迫切需要,以更好地控制感染。值得注意的是,在大流行病的早期,当没有疫苗可用时,抗病毒剂是独立治疗方法。此外,IAV对目前批准的抗病毒剂的抗性的出现强调了对新的和广泛可用的抗病毒药物的迫切需要 (Moss等人,2010)。

[0004] 然而,尽管一些有前景的MEK抑制剂是已知的,并被提供用于治疗或预防病毒感染,特别是流感病毒感染,但是仍然需要针对此种应用提供进一步的、理想改进的MEK抑制剂。

[0005] 此外,在感染后尽快开始病毒感染的抗病毒治疗是非常重要的。例如,使用奥司他韦开始流感治疗的时间窗仅长达24小时。在通常情况下,患者在这段时间后去看医生,导致标准抗病毒治疗无效。此外,由于可能的药物相互作用,抗病毒治疗可能是禁忌的,尤其是在老年人中,他们通常必须连续服用一种或多种药物。通常,不容易停止服用这种药物。因此,在这些患者适于抗病毒治疗之前,已经超过了开始抗病毒治疗的时间范围。

[0006] 鉴于现有技术,显然需要有效治疗病毒性疾病,特别是由RNA病毒如流感病毒 (IV) 或冠状病毒 (CoV) 引起的呼吸道疾病,尤其是治疗后期开始治疗的病毒性疾病的新化合物和组合物。此外,需要治疗病毒性感染,其中病毒对抗病毒治疗具有抗性,以及需要预防和/或治疗细菌共感染。

[0007] 发明简述

[0008] 本发明技术问题的解决方案是提供PD-0184264 (CI-1040的代谢物), 其用于治疗或预防病毒性疾病, 例如流感或冠状病毒感染、细菌感染或包括细菌感染和病毒性疾病的共感染。这种解决方案也反映在此后描述的具体实施方式和权利要求中, 并且在实施例和附图中示出。本申请的发明人惊奇地发现MEK抑制剂CI-1040的代谢物PD-0184264比CI-1040本身具有更高的抗病毒和抗细菌活性。此外, 还表明即使治疗在感染后超过24小时开始, 因此, 优选地, 患者具有病毒感染症状至少24小时、至少36小时、至少48小时或至少72小时, PD-0184264仍然是有效的。

[0009] 优选地, 所述治疗在疾病发作后至少24小时和48小时内开始。

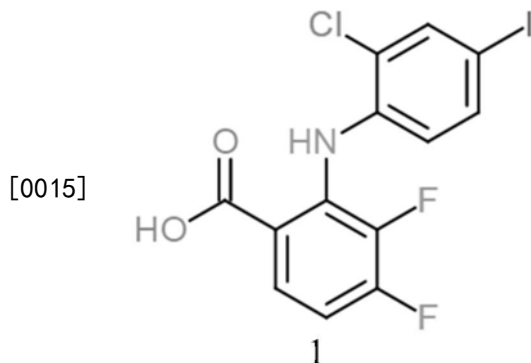
[0010] 优选地, 所述病毒感染由正链或负链RNA病毒引起。优选地, 所述负链RNA病毒是流感病毒, 更优选地, 所述病毒是流感病毒A (IAV) 或流感病毒B (IBV), 甚至更优选地, 所述流感病毒A选自H1N1、H2N2、H3N2、H5N6、H5N8、H6N1、H7N2、H7N7、H7N9、H9N2、H10N7、N10N8或H5N1, 或所述流感病毒B选自IBV型Yamagata和Victoria。优选地, 所述正链RNA病毒是冠状病毒, 例如严重急性呼吸道病毒 (SARS-CoV和SARS-CoV2) 或中东呼吸综合征冠状病毒 (MERS)。

[0011] 在一些实施方案中, 所述病毒对抗病毒治疗具有抗性, 其中更优选地, 所述抗病毒治疗是施用奥司他韦、扎那米韦、帕拉米韦、金刚烷胺、金刚乙胺、法匹拉韦、巴洛沙韦、马波沙韦或匹莫韦。

[0012] 在一个实施方案中, 所述对抗病毒治疗具有抗性的病毒是H1N1H275Y突变体。

[0013] 因此, 使用PD-0184264通过提供对病毒感染, 特别是流感病毒感染, 以及对病毒, 特别是流感病毒, 细菌共感染更有效的治疗选项解决了本申请潜在的技术问题, 其具有扩大的治疗窗口, 允许第一症状被确定后超过24小时及高达至少72小时开始治疗。

[0014] 尽管MEK抑制剂CI-1040已经在治疗或预防流感病毒感染和流感病毒或细菌共感染中有效, 但是本发明人发现CI-1040的代谢物 (PD-0184264, 式1) 在靶向流感病毒或包含流感病毒和细菌感染的共感染中比CI-1040本身更有效。PD-0184264是CI-1040的几种代谢物之一 (Wabnitz等人, 2004; LoRusso等人, 2005), 但是既不知晓也无法推测代谢物比CI-1040更有效。令发明人非常惊讶的是, 他们的确发现一种代谢物 (PD-0184264, 以下结构1) 更有效, 并且如实施例所示的比CI-1040具有更高的治疗潜力。PD-0184264的潜力不可预料, 这是因为PD-0184264实际上在体外对MEK激酶的抑制效果比CI-1040弱 (参见实施例9)。此外, 体外测定显示PD-0184264的抗病毒作用比CI-1040弱 (参见实施例10), 而体内测定令人惊奇地显示PD-0184264的抗病毒作用比CI-1040强得多 (参见实施例11)。



[0016] 因此,本发明涉及用于预防和/或治疗细菌感染和/或病毒性疾病的方法中的PD-0184264或其药学上可接受的盐。优选地,所述引起病毒性疾病的病毒是RNA病毒。当所述RNA病毒是负链RNA病毒时,优选流感病毒,更优选甲型流感病毒或乙型流感病毒。当所述RNA病毒是正链RNA病毒时,所述病毒优选冠状病毒,例如SARS、SARS-CoV2或MERS。

[0017] 本发明还涉及用于预防和/或治疗细菌感染的方法中的PD-0184264或其药学上可接受的盐。所述细菌感染优选由选自以下的细菌介导:葡萄球菌科(Staphylococcaceae)、链球菌科(Streptococcaceae)、军团菌科(Legionellaceae)、假单胞菌科(Pseudomonadaceae)、杆菌科(Bacillaceae)、衣原体科(Chlamydiaceae)、支原体科(Mycoplasmataceae)、肠杆菌科(Enterobacteriaceae)、假单胞菌目(Pseudomonadales)和/或巴氏杆菌科(Pasteurellaceae)。

[0018] 本发明还涉及PD-0184264或其药学上可接受的盐,其用于预防和/或治疗包括细菌感染和病毒性疾病的共感染的方法中。

[0019] 优选地,PD-0184264或其药学上可接受的盐用于预防和/或治疗包括细菌感染和病毒性疾病的共感染的方法中,其中所述细菌感染由选自以下的细菌介导:葡萄球菌科、链球菌科、军团菌科、假单胞菌科、杆菌科、衣原体科、支原体科、肠杆菌科、假单胞菌目和/或巴氏杆菌科。

[0020] 优选地,PD-0184264或其药学上可接受的盐用于预防和/或治疗包括细菌感染和病毒性疾病的共感染的方法中,其中所述病毒是负链RNA病毒,优选流感病毒,更优选甲型流感病毒或乙型流感病毒。

[0021] 优选地,PD-0184264或其药学上可接受的盐用于预防和/或治疗病毒性疾病的方法中,其中PD-0184264或其药学上可接受的盐与神经氨酸酶抑制剂或其药学上可接受的盐组合施用。

[0022] 优选地,PD-0184264或其药学上可接受的盐用于预防和/或治疗包括细菌感染和病毒性疾病的共感染的方法中,其中PD-0184264或其药学上可接受的盐与神经氨酸酶抑制剂或其药学上可接受的盐组合施用。

[0023] 在一个替代的实施方案中,PD-0184264或其药学上可接受的盐用于预防和/或治疗病毒性疾病的方法中或用于预防和/或治疗包括细菌感染和病毒性疾病的共感染的方法中,其中神经氨酸酶抑制剂选自奥司他韦、磷酸奥司他韦、扎那米韦、拉尼米韦或帕拉米韦或其药学上可接受的盐。

[0024] 本发明还提供一种药物组合物,其包含PD-0184264或其药学上可接受的盐和神经氨酸酶抑制剂或其药学上可接受的盐。

[0025] 优选地,PD-0184264用于预防和/或治疗病毒性疾病的方法中和/或用于预防和/或治疗细菌性疾病的方法中和/或用于预防和/或治疗包括细菌感染和病毒性疾病的共感染的方法中,其中PD-0184264与一种或多种MEK抑制剂组合。

[0026] 优选地,PD-0184264或其药学上可接受的盐用于预防和/或治疗患者,优选脊椎动物,更优选鸟或哺乳动物,最优选人的细菌感染、病毒感染或共感染。

[0027] 本发明进一步涉及治疗患者中细菌感染的方法,其包括给予有需要的患者治疗有效量的PD-0184264或其药学上可接受的盐。

[0028] 另外,本发明涉及一种治疗患者中病毒性疾病的方法,该方法包括给予有需要的

患者治疗有效量的PD-0184264或其药学上可接受的盐。在优选的实施方案中,PD-0184264以100mg-900mg,优选600mg的口服剂型每日一次施用于患者。

[0029] 在进一步的实施方案中,本发明涉及治疗患者中的包括细菌感染和病毒性疾病的共感染的方法,该方法包括给予有需要的患者治疗有效量的PD-0184264或其药学上可接受的盐。

[0030] 优选地,所述病毒是负链RNA病毒,更优选地,所述病毒是流感病毒,最优选地,所述流感病毒是甲型流感病毒或乙型流感病毒。

[0031] 优选地,所述细菌感染由选自葡萄球菌科、链球菌科、军团菌科、假单胞菌科、杆菌科、衣原体科、支原体科、肠杆菌科、假单胞菌目和巴氏杆菌科的细菌介导。

## 附图说明

[0032] 附图示出:

[0033] 图1:用PD-0184264或CI-1040治疗感染甲型流感的小鼠。

[0034] 实施例1的实验结果表示为病毒滴度(log10) pfu/ml (左) 或病毒滴度% (右)。

[0035] 图2:显示PD-0184264和CI-1040对MRSA细菌生长的影响图。

[0036] 在不同的时间点,如图的横坐标所示,测量无细胞细菌培养物的光密度作为细菌生长的指示,以% (OD600) 在图中纵坐标所示。数据代表实施例2中描述的三个生物学重复的平均值。

[0037] 图3:用不同浓度的PD-0184264抑制细菌MRSA生长。

[0038] 不同浓度(如所示的)PD-0184264施用于金黄色葡萄球菌USA300 (MRSA) 的过夜培养物。6小时后,测试光密度。图中所示的数据代表实施例2中描述的三个生物学重复实验中的一个。

[0039] 图4:CI-1040和PD-0184264对细菌生长的影响。

[0040] (A) 不同浓度的CI-1040对细菌生长的影响;(B,C) 不同浓度的PD-0184264对金黄色葡萄球菌菌株6850 (B) 或菌株USA300 (C) 的影响。

[0041] 图5:将PD-0184264施用于单一或共感染的细胞会保护细胞。

[0042] 人肺上皮细胞(A549)用PD-0184264(在所示浓度下)或溶剂(DMSO)预处理,并用人流感病毒株A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) 感染。考虑到PD-0184264的抗病毒作用和强的抗菌作用(图2-4),我们分析了是否在IAV(甲型流感病毒)和/或金黄色葡萄球菌感染引起的细胞破坏性细胞病变效应(CPE)方面,也能从宏观上观察到该化合物的这一特征。在用IAV (H1N1) (中图)或金黄色葡萄球菌6850(上图)单次感染后,观察到细胞单层的轻微破坏。该CPE在与两种病原体共感染时显著增加(下图),但在PD-0184264浓度增加的情况下受到抑制。

[0043] 图6:PD-0184264与普通抗生素的抗菌作用的比较。

[0044] 为了将MEK抑制剂PD0184164的抗菌特性与普通抗生素的作用进行比较,我们用溶剂、MEK抑制剂U0126和PD-0184264或不同浓度的抗生素庆大霉素处理细菌过夜。与溶剂处理的细菌相比,用第一代MEK-抑制剂U0126孵育仅导致细菌滴度的轻微降低,而用PD-0184264处理导致细菌负荷非常显著的降低。这两种菌株都是如此。

[0045] 图7:(a)比较PD-0184264与其它MEK抑制化合物或抗生素庆大霉素的抗菌作用的

不同时间点加药试验(time-of-addition assays)的结果。

[0046] (b) 与庆大霉素、红霉素处理或未处理相比较,金黄色葡萄球菌对MEK抑制剂PD0184264的抗性的测试结果。

[0047] 图8:细菌激酶PknB的结构域结构(TOP) (Rakette等人,2012)和PknB的自磷酸化位点与哺乳动物MAP激酶p38、JNK和直接MEK靶ERK的活化位点的序列同源性(Miller等人,2010)。

[0048] 图9:确定抑制剂处理对不同抗生素的最小抑制浓度(MIC)的影响。

[0049] 图10:当用PD-0184264处理时,金黄色葡萄球菌菌株6850和MRSA菌株USA300的耐逆性。

[0050] 图11:用PD-0184264处理会削弱不同血清型肺炎链球菌的生长。

[0051] (A) 通过OD600测定PD-0184264对肺炎链球菌菌株TIGR4(血清型4)和D39 wt(血清型2)的培养物的影响;(B) PD-0184264对肺炎链球菌菌株TIGR4(血清型4)和D39 wt(血清型2)的培养物的影响,以CFU/ml表示;(C) PD-0184264对枯草芽孢杆菌培养物的影响,以CFU/ml表示。

[0052] 图12:表1:抗生素。

[0053] 图13:

[0054] 显示用PD-0184264处理细胞会明显降低单一细菌(金黄色葡萄球菌)或病毒(流感IV)感染和共感染时病原体诱导的CPE(细胞病变效应)的图。

[0055] 图14:显示用CI-1040(a)或PD-0184264(b)处理时细胞内细菌负荷变化的图。

[0056] 当在进行感染期间的稍后时间给予CI-1040或PD-0184264时获得了可比较的结果(c)。

[0057] 图15:显示细胞存活率(A,B)和膜破裂(C,D)的图。

[0058] (A,B) 显示PD-0184264浓度增加情况下A549的细胞存活率。在(C)和(D)中,进行LDH-测定以确定由于抑制剂处理引起的膜破裂。

[0059] 图16:显示CI-1040和PD-0184264对MEK路径抑制作用的无细胞激酶试验。

[0060] 通过ELISA分析测定磷酸化靶蛋白ERK的量来确定激酶的活性。进行了三个独立的实验系列,显示了相似的结果。此处给出了一个代表性的实验。

[0061] 图17:PD-0184264在体外试验中对流感病毒H1N1pdm09的抗病毒活性。

[0062] (A) 用病毒(MOI=0.001)感染A549细胞以确定病毒滴度的降低。(B) 用RBI病毒(MOI=0.001)感染A549细胞,并用不同浓度的PD-0184264(100 $\mu$ M、50 $\mu$ M、10 $\mu$ M、5 $\mu$ M、1 $\mu$ M、0.5 $\mu$ M和0.1 $\mu$ M)处理以确定EC<sub>50</sub>值。(C) 用不同浓度的PD-0184264(100 $\mu$ M、50 $\mu$ M、10 $\mu$ M、5 $\mu$ M、1 $\mu$ M、0.5 $\mu$ M和0.1 $\mu$ M)处理A549细胞24小时,然后用WST染色四小时以确定CC<sub>50</sub>值。

[0063] 图18:PD-0184264导致小鼠肺中病毒滴度的体内降低。

[0064] H1N1 pdm09病毒感染后,雌性C57BL/6小鼠口服2.8、8.4或25mg/kg PD-0184264(左图)或25、75或150mg/kg CI-1400(右图)。感染24小时后,处死动物,用标准方法确定病毒滴度。

[0065] 图19:PD-0184264具有比CI-1040更好的生物利用度。

[0066] (A) 用75mg/Kg CI-1040(深灰色区域)或75mg/Kg PD-0184264静脉内途径处理雄性NMRI小鼠。在给药后15分钟、30分钟、1小时、2小时、4小时、6小时、8小时和24小时(测试第

2天)收集血液,分析血浆中的存在的药物。(B)使用口服灌胃用150mg/kg CI-1040(深灰色区域)或150mg/kg PD-0184264经口处理雄性NMRI小鼠。在给药后15分钟、30分钟、1小时、2小时、4小时、6小时、8小时和24小时(测试第2天)收集血液,分析血浆中存在的药物。

[0067] 图20:用PD-0184264处理后小鼠的存活情况。

[0068] 八只雌性C57BL/6小鼠用H1N1pdm09感染并通过口服途径用25mg/kg PD-0184264(ATR-002,中灰线)或仅用溶剂(浅灰线)处理。如图所示,在感染后24、48或72小时开始处理,持续五天(灰色条)。当发现体重减少20%时,必须处死小鼠(灰色虚线)。Graphpad Prism 8软件用于图解两个图。使用Logrank (Mantel-Cox) 试验确定P-值。

[0069] 发明详述

[0070] 以下描述包括对理解本发明有用的信息。不承认本文提供的任何信息是现有技术或与目前要求保护的发明相关,或者任何具体或隐含引用的出版物是现有技术。

[0071] 如上所述,本发明涉及用于治疗病毒性疾病或包括细菌感染和病毒感染的共感染的方法中的PD-0184264。如实施例所示,PD-0184264似乎对细菌激酶PknB有作用,因此至少部分可以发挥其抑菌作用。

[0072] 同样,如所附实施例所显示的,PD-0184264在病毒和细菌感染情况以及细菌和病毒共感染情况中显示效果。令人惊讶的是,这种作用强于CI-1040,CI-1040是现有技术中已知的用于治疗细菌和病毒感染的MEK抑制剂。当如实施例9所示比较CI-1040和PD-0184264对MEK激酶的抑制作用时,人们实际上会预期相反的结果,这是因为在现有技术中使用MEK抑制剂来实现所述效果。

[0073] 当在体外试验中比较PD-0184264和CI-1040的抗病毒作用时,同样如此。在此,如从实施例10中可以看出的,CI-1040比PD-0184264更有效。具体地,在体外试验中,需要高10倍浓度的PD-0184264才能达到相同的抑制效果。令人惊讶的是,发现尽管体外抑制弱,但是如从实施例11中所示的,PD-0184264在体内优于CI-1040。如图18所示,在肺中,2.8mg/kg PD-0184264已经显示病毒滴度降低,而25mg/kg PD-0184264显示病毒滴度降低至少90%。相反,CI-1040仅在150 $\mu$ M时显示类似的降低。此外,实施例1显示肺中的病毒滴度因PD-0184264而降低。在实施例1中,小鼠以流感病毒感染,并分别用150mg/kg、75mg/kg或25mg/kg CI-1040或PD-0184264处理。如图1所示,25mg/kg PD-0184264已经具有与150mg/kg CI-1040相同的效果。因此,令本发明人非常惊讶的是,尽管以前的体外数据没有提供任何激励以继续研究PD-0184264,但是PD-0184264在体内却显示了强烈的抗病毒作用。这种令人惊讶的效果可能是基于PD-0184264与CI-1040相比更高的生物利用度,其在实施例12中显示。

[0074] 实施例2、4和6-8还显示PD-0184264的强抗菌作用,也与CI-1040和其它MEK抑制剂进行了对比。在实施例2中,分析了PD-0184264对细菌生长的影响。图2显示PD-0184264抑制细菌生长,而CI-1040对细菌生长没有影响。在图3中,显示细菌生长以浓度依赖性方式被PD-0184264抑制,显示从50 $\mu$ M PD-0184264开始几乎完全抑制生长。类似地,图4也显示细菌生长以浓度依赖性方式被PD-0184264抑制,10 $\mu$ M PD-0184264已经显示显著降低生长,而CI-1040对细菌生长没有影响。在实施例4中,比较了PD-0184264与MEK抑制剂U0126或抗生素庆大霉素的抗菌作用。图6显示PD-184264具有与庆大霉素类似的抗生素作用,而现有技术已知的MEK抑制剂U0126对细菌生长没有影响。图7A有同样的结果,在该图中监测了细菌生长过程。在图7B中,另外显示PD-0184264不诱导对PD-0184264的抗性,而细菌容易产生对

庆大霉素和红霉素的抗性。因此,PD-0184264不诱导细菌中的抗性。在实施例6中,分析PD-0184264对细菌对抗生素敏感性的影响。如图9和表2所示,用PD-0184264处理确实导致细菌对不同抗生素的敏感性增加,这在青霉素和庆大霉素的情况下最突出。另外,图10显示PD-0184264会降低细菌的耐逆性。实施例7提供证据表明PD-0184264的作用不限于金黄色葡萄球菌,而且对其它细菌如肺炎链球菌(参见图11A和B)和枯草芽孢杆菌(参见图11C)也有作用。

[0075] 实施例3和8强调PD-0184264在细菌和病毒共感染情况下的效力。实施例3分析了是否也可以从宏观上观察到PD-0184264在由病毒和/或细菌感染引起的细胞病变效应(CPE)方面的效力。图5显示PD-0184264以浓度依赖的方式降低了特别是由细菌和病毒共感染引起的细胞病变效应,显示在15 $\mu$ M的PD-0184264时已经具有效应。在实施例8中也进行了同样的分析,在图13中再次显示了PD-0184264在细菌和病毒共感染情况中的阳性作用。实施例8进一步分析了PD-0184264在共感染情况下对胞内细菌滴度的影响。图14显示PD-0184264降低胞内细菌滴度,而CI-1040没有作用。另外,实施例8和图15显示PD-0184264不产生细胞毒性作用。

[0076] 此外,在实施例13中,显示PD-0184264处理H1N1流感毒株感染的小鼠导致存活率有显著不同,即使药物在感染后72小时才施用(参见图20)。

[0077] 该结果与Haasbach论文(Haasbach等人,2017)和申请人进一步实验中使用CI-1040获得的数据相当。在这些实验中,发现CI-1040具有超过已知抗病毒剂,特别是Tamiflu(奥司他韦)的扩大的治疗窗,允许在Tamiflu无效时的时间段给药。使用小鼠模型,本发明人证明CI-1040可以降低体内流感病毒肺滴度。令人惊讶的是,当Tamiflu<sup>®</sup>治疗无效时,发现CI-1040的治疗窗扩展到感染后至少48小时。

[0078] 根据FDA标签,奥司他韦(Tamiflu<sup>®</sup>)目前被指定用于治疗已经有不超过2天症状的患者的流感。这对应于在之前的研究中在小鼠模型中观察到的,其中如果奥司他韦在流感病毒感染后超过48小时施用,则奥司他韦不再有效。相反,PD-0184264甚至在感染后72小时也有效。因此,已经表明PD-0184264,像CI-1040,具有比奥司他韦更长的治疗窗。因此,在小鼠模型中观察到的作用可能外推至人患者,这意味着PD-0184264或其药学上可接受的盐或衍生物能够在病毒感染症状发作后超过2天给予患者。当将CI-1040和PD-0184264的作用方法与奥司他韦的作用方法比较时,这也是有意义的。如上所述,认为奥司他韦会阻断病毒粒子从感染细胞的逃逸(elution)。因此,其仅在病毒粒子尚未离开细胞时才有效。相反,发现CI-1040和PD-0184264会阻断病毒复制必需的MEK通路,从而使病毒RNP复合物保留在细胞核中。关于MEK抑制作用的分子模式,本发明人先前已表明原型抑制剂U0126对激酶的抑制会导致病毒RNP复合物的核质转运被阻断(Pleschka等人,2001)。这可以由CI-1040和PD-0184264证实。基于实施例13中的数据和进一步的初步研究,预期PD-0184264将具有与CI-1040相同的作用,因为它是CI-1040的代谢物,并且靶向与CI-1040相同的通路。

[0079] 因此,本发明的方法和用途还涉及治疗已经表现出症状至少24小时、至少36小时或至少48小时的患者的病毒感染。这些时间当然包括有症状的患者中其间的所有时间范围,例如25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46或47小时。在优选的实施方案中,患者在治疗前至少48小时已出现症状。例如,治疗可以在疾病发

作后24至48小时开始。在本文中,应注意,“有症状的”和“疾病发作”能够互换使用。然而,治疗也可以在感染后至少60小时、至少72小时或至少96小时开始。在当已经发现不同的抗病毒剂无效时给予PD-0184264或其药学上可接受的盐或衍生物的情况下,当用先前的抗病毒药物治疗已经完成时,PD-0184264或其药学上可接受的盐或衍生物可在24小时后给予。

[0080] 此外,非常可能的是,与CI-1040一样,PD-0184264也对抗流感病毒(其对抗病毒治疗具有抗性)有效。这是CI-1040和PD-0184264的特征,其解决了许多标准抗病毒治疗的问题,并允许在用标准抗病毒剂治疗失败后给予CI-1040和PD-0184264。本文所用的标准抗病毒治疗定义为用已被批准用作抗病毒的药物进行的治疗,该药物在其生命周期的任何阶段都有效抑制病毒病原体的发展。实例包括进入抑制剂、脱壳抑制剂、逆转录抑制剂、聚合酶抑制剂、内切核酸酶抑制剂、蛋白质成熟抑制剂、整合酶抑制剂、转录抑制剂、翻译抑制剂、蛋白酶抑制剂、病毒颗粒组装抑制剂或病毒颗粒释放抑制剂。在流感病毒中,已知有两种不同的抗病毒治疗标准方法:神经氨酸酶抑制剂和M2蛋白抑制剂。

[0081] 因此,在一个实施方案中,病毒对抗病毒治疗有抗性。如本文所述,抗病毒治疗可涉及神经氨酸酶抑制剂如奥司他韦、扎那米韦、拉尼米韦和帕拉米韦的施用,和/或M2抑制剂如金刚烷胺和金刚乙胺的施用。因此,抗病毒治疗可以施用奥司他韦、扎那米韦、金刚烷胺和/或金刚乙胺。在另一个实施方案中,抗病毒治疗涉及施用奥司他韦、扎那米韦、帕拉米韦、金刚烷胺、金刚乙胺、法匹拉韦、巴洛沙韦、马波沙韦和/或匹莫韦。

[0082] PD-0184264可用于治疗和/或预防本文所述的医学病症的方法中。因此,术语“治疗”包括将PD-0184264优选以药物的形式施用于患有包括细菌感染和病毒性疾病的共感染的患者,以缓解或改善伴随这种感染的症状。类似地,包括优选以药物的形式,给予患有细菌感染的患者PD0184264,或用于缓解或改善伴随这种感染的症状。另外,包括优选以药物的形式给予患有病毒感染的患者PD-0184264,或用于缓解或改善伴随这种感染的症状。包含细菌感染和病毒性疾病的共感染、病毒性疾病和细菌感染是通过PD-0184264或其药学上可接受的盐治疗或预防的医学病症。

[0083] 此外,如本文使用的术语“预防”或“防止”可互换,指目的在于防止本文所述的医学病症的任何医学或公共健康程序。如本文所使用的术语“预防”(prevent、prevention、preventing)是指降低获得或发展给定病症的风险,即包括如本文所述的病毒感染和细菌感染的共感染、单独的细菌感染或单独的病毒感染。“预防”还指降低或抑制患者中包括流感病毒感染和细菌感染的共感染、单独的细菌感染或单独的病毒感染的复发。

[0084] 本发明的PD-0184264在治疗共感染中是有效的,如实施例3和8所示。如本文所使用的“共感染”包括病毒性疾病,优选流感病毒感染,和细菌感染。这种共感染可以通过用细菌和流感病毒同时感染宿主例如患者和/或单个细胞而产生。宿主例如患者和/或细胞也可以同时被一种或多种病毒颗粒和一种或多种细菌感染。然而,这种共感染也可以顺序发生。在这种情况下,患者和/或细胞首先被一种或多种病毒颗粒感染,随后同一患者和/或细胞被一种或多种细菌感染,反之亦然。两次感染之间的时间间隔可以至多14天、13天、12天、11天、10天、9天、8天、7天、6天、5天、4天、3天、2天、1天、12小时、6小时、3小时、1.5小时或至少30分钟。在这方面,由于PD-0184264扩大的治疗窗,预期延长给予可更有效地预防继发性细菌感染。

[0085] 这种情况也可能是重复感染,其中第二次感染叠加在早期感染上,特别是通过对

第一次感染的治疗具有抗性的外源或内源性不同微生物制剂。

[0086] 在共感染的流感病毒感染中,流感病毒感染可以由甲型流感病毒或乙型流感病毒介导,优选地,所述甲型流感病毒是H1N1、H2N2、H3N2、H5N6、H5N8、H6N1、H7N2、H7N7、H7N9、H9N2、H10N7、N10N8或H5N1。在一个实施方案中,所述甲型流感病毒是H1N1。在其它实施方案中,所述甲型流感病毒是H3N2、H5N1和H7N9。在另外的实施方案中,所述甲型流感病毒是H3N2、H5N1、H1N1、H5N6、H7N2和H7N9。

[0087] 本发明还涉及“细菌感染”,其能够在前述存在于宿主(例如患者和/或细胞)中的共感染中发生。细菌感染可以由任何细菌介导;优选地,它由选自葡萄球菌科、链球菌科、军团菌科、假单胞菌科、杆菌科、衣原体科、支原体科、肠杆菌科、假单胞菌目和巴氏杆菌科的细菌介导。

[0088] 细菌感染可以由选自以下的细菌介导:葡萄球菌,优选金黄色葡萄球菌、对甲氧西林敏感和耐甲氧西林的金黄色葡萄球菌、表达杀白细胞毒素(Panton-Valentine leucocidin,PVL)的金黄色葡萄球菌和/或链球菌科,优选链球菌、化脓链球菌或肺炎链球菌;军团菌,优选嗜肺军团菌;假单胞菌,优选铜绿假单胞菌;芽孢杆菌,优选枯草芽孢杆菌;嗜衣原体,优选嗜衣原体肺炎;支原体,优选肺炎支原体;克雷伯氏菌,优选肺炎克雷伯氏菌;莫拉氏菌,优选卡他莫拉氏菌和/或嗜血杆菌,优选流感嗜血杆菌。优选地,所述细菌选自金黄色葡萄球菌、肺炎链球菌或流感嗜血杆菌。最优地,所述细菌是金黄色葡萄球菌。

[0089] 本发明还涉及“病毒性疾病”或“病毒感染”,其可以在上述共感染的情况下发生,或者可以作为存在于宿主(例如患者和/或细胞)中的唯一感染发生。病毒性疾病或病毒感染可以由任何病毒介导;优选地,它由引起呼吸道感染的病毒如RNA病毒介导。优选的病毒是流感病毒或冠状病毒。优选地,所述流感病毒感染由甲型流感或乙型流感病毒介导,其中甲型流感病毒是优选的。特别优选的是甲型流感病毒亚型H1N1、H2N2、H3N2、H5N6、H5N8、H6N1、H7N2、H7N7、H7N9、H9N2、H10N7、N10N8和/或H5N1。优选地,所述冠状病毒感染由SARS-CoV、SARS-CoV2或MERS-CoV介导。

[0090] 在一个备选实施方案中,PD-0184264与一种或多种MEK抑制剂联合施用。MEK抑制剂包括例如U0126、PLX-4032、AZD6244、AZD8330、AS-703026、GSK-1120212、RDEA-119、RO-5126766、RO-4987655、CI-1040、PD-0325901、GDC-0973、TAK-733、PD98059、ARRY-438162、ARRY-162、ARRY-300、PF-3644022和PD184352。额外的MEK抑制剂可与PD-0184264同时、之前或之后施用。

[0091] 优选地,PD-0184264用于本发明的预防和/或治疗共感染的方法中,其中PD-0184264与一种或多种靶向流感病毒或细菌的抑制剂组合。PD-0184264可以与靶向流感病毒的一种或多种抑制剂同时、之前或之后施用。

[0092] 通常,靶向流感病毒的抑制剂是在流感病毒治疗中有效的任何抑制剂或药物。已知不同的物质在降低流感病毒感染中是有效的。其中有例如针对病毒神经氨酸酶的抑制剂、靶向病毒离子通道蛋白(M2)的化合物和通过干扰病毒聚合酶复合物(PB1,PB2,PA或NP)的组分靶向病毒聚合酶或核酸内切酶活性的化合物。本发明还涉及所述抑制剂的药学上可接受的盐。然而,优选的抑制剂是MEK抑制剂,特别优选PD-0184264,如本文所述。

[0093] “MEK抑制剂”通过抑制MEK(促分裂原活化蛋白激酶)来抑制细胞或患者中的促有丝分裂信号级联Raf/MEK/ERK。这种信号级联被许多病毒,特别是流感病毒劫持,以加强病

毒复制。因此,在MEK瓶颈处特异性阻断Raf/MEK/ERK通路会损害病毒,尤其是流感病毒的生长。另外,MEK抑制剂在人体中显示出低的毒性和小的不良副作用。也没有诱导病毒耐药性的倾向(Ludwig,2009)。特别优选的抑制剂是PD-0184264。

[0094] “神经氨酸酶抑制剂”是一种针对流感病毒的抗病毒药物,其通过阻断病毒神经氨酸酶蛋白的功能而发挥作用,从而防止病毒从感染的宿主细胞中释放,因为新产生的病毒不能从其复制的细胞中出芽。还包括神经氨酸酶抑制剂的药学上可接受的盐。优选的神经氨酸酶抑制剂是奥司他韦、扎那米韦、帕拉米韦、拉尼米韦或这些物质中的任何一种的药学上可接受的盐,例如磷酸奥司他韦、羧酸奥司他韦等。最优选的神经氨酸酶抑制剂是磷酸奥司他韦、扎那米韦、奥司他韦或帕拉米韦。

[0095] 靶向病毒离子通道蛋白(M2)的化合物是例如金刚烷胺和/或金刚乙胺,而通过干扰病毒聚合酶复合物(PB1、PB2、PA或NP)的组分靶向聚合酶或核酸内切酶活性的化合物是例如NP阻断剂nucleozin或聚合酶抑制剂T705(法匹拉韦)。

[0096] 另外,PD-0184264可与一种或多种靶向细菌的抑制剂组合。实施例6显示PD-0184264会增加细菌对抗生素的敏感性。靶向细菌的抑制剂可以是任何有效减少细菌感染的抑制剂。在本发明中,PD-0184264作为靶向细菌的抑制剂是非常优选的,但是本领域技术人员已知的另一种靶向细菌的抑制剂是抗生素。优选的抗生素可以从表1(图12)获得。因此,在一个实施方案中,抗生素选自表1(图12)中列出的抗生素。在另一个实施方案中,抗生素选自表1(图12)中所列的一类抗生素。在另一个实施方案中,抗生素选自表1(图12)中列出的抗生素的通用名。更优选的抗生素选自庆大霉素、利福平、溶葡萄球菌素、红霉素、左氧氟沙星、万古霉素、特考拉宁、青霉素和氧西林。

[0097] 可用本发明抑制剂,特别是MEK抑制剂或抑制剂组合治疗的“患者”优选为脊椎动物。在本发明的上下文中,术语“患者”包括需要治疗如本文所述的共感染或单独的细菌或病毒感染的个体。优选地,所述患者是单独患有共感染或细菌或病毒感染或处于其风险中的患者。优选地,所述患者是脊椎动物,更优选哺乳动物。哺乳动物包括但不限于农场动物、运动动物、宠物、灵长类、小鼠和大鼠。优选地,哺乳动物是人、马、狗、猫、牛、猪、小鼠、大鼠等,特别优选地,它是人。在一些实施方案中,所述患者是人类患者,其任选地大于1岁且小于14岁,年龄在50岁至65岁之间,年龄在18岁或50岁之间,或年龄在65岁以上。在其它实施方案中,所述患者是人类患者,其选自以下患者:至少50岁的患者,居住在慢性护理机构的患者,患有肺或心血管系统慢性疾病的患者,由于慢性代谢疾病、肾功能障碍、血红蛋白病或免疫抑制而在前一年需要定期医学随访或住院治疗的患者,年龄小于14岁的患者,年龄在6个月至18岁之间接受长期阿司匹林治疗的患者和流感季节期间妊娠中期或晚期的妇女。

[0098] 在本发明的方法中,PD-0184264可通过口服、静脉内、胸膜内、肌内、局部或通过吸入给药。优选地,PD-0184264通过吸入、局部或口服给药。在优选实施方案中,PD-0184264以100mg-900mg,优选600mg的口服剂量每天给药一次,持续7-21天。

[0099] 具体地,如实施例14所述,在单递增剂量/多递增剂量(SAD/MAD)方案后,PD-0184264以100mg的起始剂量和在七步中高达三个递增给药步骤给药。给药方案为一次剂量PD-0184264,从100mg逐渐增加至900mg(SAD),随后七次剂量PD-0184264,在七天内每日从100mg逐渐增加至600mg(MAD)。安全审查委员会(SRC)认为每个剂量组是安全的,允许释放

下一个更高剂量(分别高达SAD 900mg和MAD 600mg)。观察到的药代动力学曲线支持进一步临床开发的计划的每日一次方案。

[0100] 在试验期间,总共仅观察到很少的不良事件,并且没有观察到严重的不良事件。因此,PD-0184264被认为是安全且耐受性良好的。药代动力学暴露和MEK抑制的确定得到验证,并确认维持临床相关的血液水平。

[0101] 本发明还设想了不同的组合物,优选药物组合物。本发明涉及一种包含用于预防和/或治疗包括细菌感染和病毒性疾病的共感染的方法中的PD-0184264的组合物。类似地,本发明涉及包含用于预防和/或治疗细菌感染和/或病毒性疾病的方法中的PD0184264的组合物。本发明还提供了一种组合物,其包含PD-0184264和一种或多种靶向病毒(特别是流感病毒)和/或细菌的抑制剂,用于预防和/或治疗包括细菌感染和病毒感染(特别是流感病毒感染)的共感染的方法中。此外,本发明涉及一种组合物,其包含PD-0184264和一种或多种靶向细菌的抑制剂,用于预防和/或治疗细菌感染或病毒感染的方法中。

[0102] 如上所述,包含PD-0184264和最终一种或多种靶向细菌的抑制剂和/或一种或多种靶向病毒(特别是流感病毒)的抑制剂的组合物可以是药物组合物。所述药物组合物的优选实施方案包含PD-0184264和靶向流感病毒的抑制剂,特别是神经氨酸酶抑制剂。在另一个实施方案中,所述药物组合物包含PD-0184264和另外的MEK抑制剂。优选地,此种组合物还包含载体,优选药学上可接受的载体。所述组合物可以是口服给药的悬浮液或片剂,鼻喷雾剂,用于吸入装置的制剂,例如作为无菌注射水性或油性悬浮液或栓剂的无菌注射制剂(静脉内、胸膜内、肌内)。

[0103] 将本发明使用的包含PD-0184264和任选一种或多种靶向流感病毒的抑制剂和/或一种或多种靶向细菌的抑制剂的药物组合物施用于哺乳动物或鸟患者。合适的哺乳动物的实例包括但不限于小鼠、大鼠、牛、山羊、绵羊、猪、狗、猫、马、豚鼠、犬、仓鼠、水貂、海豹、鲸、骆驼、黑猩猩、恒河猴和人,优选人。合适的鸟类的实例包括但不限于火鸡、鸡、鹅、鸭、水鸭、绿头鸭、棕鸟、北细尾鸟、海鸥、天鹅、珍珠鸡或水禽等。人类患者是本发明的一个具体实施方案。

[0104] 优选以治疗有效量给予所述抑制剂。PD-0184264或每种活性化合物/抑制剂的“治疗有效量”可随包括但不限于以下的因素变化:所用化合物的活性,活性化合物在患者体内的稳定性,待缓解病症的严重性,所治疗患者的总重量,给药途径,化合物被身体吸收、分布和排泄的难易度,所治疗患者的年龄和敏感性,不良事件等,这对本领域技术人员而言是显而易见的。随着时间的推移,各种因素的变化,给药量可以调整。

[0105] 本文所述的抑制剂、方法和用途既适用于人类治疗又适用于兽医应用。如本文所述,本文所述的化合物,特别是具有所需治疗活性的PD-0184264和任选一种或多种靶向流感病毒的抑制剂和/或一种或多种靶向细菌的抑制剂可以在生理学上可接受的载体中施用于患者。根据引入方式,所述化合物可以以如下讨论的各种方式配制。制剂中治疗活性化合物的浓度可在约0.1-100重量%范围内变化。所述药剂可以单独施用或与其它治疗方案组合施用。实施例1表明口服25和75mg/kg的PD-0184264在体内是有效的。因此,PD-0184264可以以10-100mg/kg PD-0184264,优选25-75mg/kg PD-0184264的剂量施用。优选的给药方式是每日一次,剂量为100至900mg,包括任何介于例如200、300、400、500、600、700和800mg之间的剂量。在优选的实施方案中,每天给药一次,剂量为600mg,口服给药。PD-0184264可以

连续施用1至21天或更长时间,优选7至14天。

[0106] 本发明方法中的药物化合物可以以任何合适的单位剂型给药。合适的口服制剂可以是片剂、胶囊、悬浮液、糖浆、口香糖、糯米纸囊剂、酞剂等形式。药学上可接受的载体,例如粘合剂、赋形剂、润滑剂和甜味剂或调味剂,可以包含在口服药物组合物中。如果需要,也可以包含用于改变味道、颜色和特殊形状的常规试剂。

[0107] 对于注射制剂,药物组合物可以是在合适的小瓶或管中与合适的赋形剂混合的冻干粉末。在临床使用前,药物可通过将冻干粉末溶解在合适的溶剂系统中而重构,以形成适于静脉内或肌内注射的组合物。

[0108] PD-0184264与抗病毒剂如神经氨酸酶抑制剂(如奥司他韦)的组合会产生协同作用。这种协同作用可以是增加的抗病毒作用,导致例如降低的病毒滴度或延长的治疗窗。因此,本发明还涉及包含治疗有效量的PD-0184264以及治疗有效量的神经氨酸酶抑制剂的药物组合物,所述神经氨酸酶抑制剂选自奥司他韦、磷酸奥司他韦、拉尼米韦、扎那米韦和帕拉米韦。

[0109] 在一个实施方案中,所述组合物可以是具有治疗有效量(例如,0.1mg至2000mg,0.1mg至1000mg,0.1mg至500mg,0.1mg至500mg,0.1mg至200mg,30mg至300mg,0.1mg至75mg,0.1mg至30mg)的如上所述的神经氨酸酶抑制剂的口服给药形式(例如,片剂或胶囊或糖浆等)。

[0110] 在进一步的实施方案中,PD-0184264用于本发明的预防和/或治疗共感染的方法中,其中当PD-0184264与体外测试系统接触时,会降低病毒和细菌感染,其中与接触前的体外测试系统相比,所述测试系统包括感染如下的培养细胞:

[0111] a) 流感病毒

[0112] b) 细菌。

[0113] 在另一个实施方案中,PD-0184264用于本发明的预防和/或治疗细菌感染的方法中,其中当PD-0184264与体外测试系统接触时,会降低细菌感染,其中与接触前的体外测试系统相比,所述测试系统包括感染细菌的培养细胞。

[0114] 因此,本发明还涉及一种体外测试系统,其中所述测试系统包括感染了如下的培养细胞:

[0115] a) 流感病毒;和

[0116] b) 细菌。

[0117] 因此,本发明还提供一种体外测试系统,其中所述体外测试系统包括感染细菌的培养细胞。

[0118] 在体外测试系统包括病毒和细菌感染的情况下,这些感染可以顺序或同时发生。

[0119] “培养细胞”是指在天然环境中,例如在植物或动物中不存在的细胞。相反,培养细胞可以是原代细胞培养物,其包括从天然环境或细胞系分离的细胞。优选地,培养细胞是人肺上皮细胞。优选地,将培养细胞以约 $1 \times 10^5$ 、 $2 \times 10^5$ 、 $3 \times 10^5$ 、 $4 \times 10^5$ 、 $5 \times 10^5$ 、 $6 \times 10^5$ 、 $7 \times 10^5$ 、 $8 \times 10^5$ 、 $9 \times 10^5$ 、 $10 \times 10^5$ 、 $11 \times 10^5$ 、最优选 $8 \times 10^5$ 个细胞的密度接种在0.5ml、1ml、1.5ml、2ml、2.5ml、3ml、3.5ml、4ml的培养基(如DMEM)中。最优选以 $8 \times 10^5$ 的密度接种在2ml DMEM中。

[0120] 用病毒和细菌感染这些培养细胞,或者在其它实施方案中仅用细菌感染这些培养

细胞。如上所述,共感染可以以顺序或同时的方式发生。例如,培养细胞可以首先用流感病毒感染,30分钟后用细菌/细菌感染。3小时后,还可以向培养物中另外加入抗生素,以除去细胞外细菌。在这种情况下,抗生素将再次被洗掉。在其它实施方案中,细胞仅用细菌感染。

[0121] 本文所用术语“接触”是指使包含流感病毒和细菌的细胞在空间上紧密接近PD-0184264。这可以例如意味着经由注射器将抑制剂施加到载有培养细胞的培养基中。

[0122] 在一个实施方案中,减少病毒感染会减少噬斑形成单位(PFU)/ml,减少细菌感染会减少菌落形成单位(CFU)/ml。“噬斑形成单位”是每单位体积能够形成噬斑颗粒(例如病毒颗粒)的数量的量度。其是功能测量不是颗粒绝对量的测量:缺陷或不能感染靶细胞的病毒颗粒将不产生噬斑,因此将不被计数。例如,浓度为1,000PFU/ $\mu$ l的流感病毒溶液表示1 $\mu$ l溶液携带足够的病毒颗粒以在细胞单层中产生1000个感染斑块。在本发明的情况下,当与PD-0184264处理前的培养物相比,用抑制剂处理的细胞培养物在处理后的培养物中显示减少的噬斑形成单位。

[0123] 可能的“噬斑形成单位(PFU)/ml的减少”按以下方法分析。首先,例如通过从培养皿中吸取一些细胞并将它们铺板以计数形成的细菌噬斑来分析用流感病毒和细菌共同感染的培养细胞产生噬斑形成单位(PFU)/ml的能力。然后,将该结果与施用抑制剂后由相同培养物的细胞产生的噬斑形成单位(PFU)/ml的数目进行比较。如果用抑制剂处理后的噬斑形成单位(PFU)/ml的数量与施用抑制剂前产生的数量相比有所减少,则噬斑形成单位也会减少。

[0124] “菌落形成单位(CFU)/ml”估计样本中活细菌的数目。存在不同的方法。例如,为了产生菌落形成单位,将样品(例如,小体积的培养细胞)铺展在营养琼脂平板的表面,并在培养计数前干燥。活细菌是指在受控条件下通过二元裂变进行繁殖的能力。细胞培养中菌落的视觉外观要求显著的生长—当计数菌落时,不确定菌落是由一个细胞还是1,000个细胞产生的。因此,液体结果以CFU/ml(菌落形成单位/毫升)表示,固体结果以CFU/g(菌落形成单位/克)表示,以反映这种不确定性(而不是细胞/ml或细胞/g)。

[0125] “菌落形成单位(CFU)/ml”可以用下列方法分析。首先,通过例如从培养皿中吸取一些细胞并将它们铺板以进行计数,分析用流感病毒和细菌共感染或单独的细菌感染的培养细胞产生菌落形成单位(CFU)/ml的能力。然后将该结果与应用抑制剂后由相同培养物的细胞产生的菌落形成单位(CFU)/ml的数目进行比较。如果菌落形成单位(CFU)/ml的数目减少到施用抑制剂前产生的数目,则有所减少。

[0126] 通常,本领域技术人员知晓这些分析细菌和病毒感染的公知技术。如何测量噬斑形成单位(PFU)/ml和菌落形成单位(CFU)/ml进一步描述于文献(Tuchscher等人,2011,Hrincius等人,2010)中。

[0127] 为了本发明的目的,如上定义的活性化合物还包括其药学上可接受的盐。本文所用的短语“药学上或美容上可接受的盐”是指对于所需给药形式安全且有效的本发明化合物的盐。药学上可接受的盐包括与下述的阴离子形成的盐:例如衍生自盐酸、磷酸、乙酸、草酸、酒石酸等,以及与下述的阳离子形成的盐:例如衍生自钠、钾、铵、钙、氢氧化铁、异丙胺、三乙胺、2-乙基氨基乙醇、组氨酸、普鲁卡因等。

[0128] 本发明还具有以下特征:

[0129] 1.用于预防和/或治疗病毒性疾病的方法中的PD-0184264或其药学上可接受的

盐。

[0130] 2. 根据第1项所述的供使用的PD-0184264或其药学上可接受的盐,其中所述病毒是负链RNA病毒。

[0131] 3. 根据第1项或第2项所述的供使用的PD-0184264或其药学上可接受的盐,其中所述病毒是流感病毒。

[0132] 4. 根据第1-3项中任一项所述的供使用的PD-0184264或其药学上可接受的盐,其中所述流感病毒是甲型流感病毒或乙型流感病毒。

[0133] 5. 用于预防和/或治疗细菌感染的方法中的PD-0184264或其药学上可接受的盐。

[0134] 6. 根据第1项所述的供使用的PD-0184264或其药学上可接受的盐,其中所述细菌感染由选自葡萄球菌科、链球菌科、军团菌科、假单胞菌科、杆菌科、衣原体科、支原体科、肠杆菌科、假单胞菌目和/或巴氏杆菌科的细菌介导。

[0135] 7. 用于预防和/或治疗包括细菌感染和病毒性疾病的共感染的方法中的PD-0184264或其药学上可接受的盐。

[0136] 8. 根据第7项所述的供使用的PD-0184264或其药学上可接受的盐,其中所述细菌感染由选自葡萄球菌科、链球菌科、军团菌科、假单胞菌科、杆菌科、衣原体科、支原体科、肠杆菌科、假单胞菌目和/或巴氏杆菌科的细菌介导。

[0137] 9. 根据第7项或第8项所述的供使用的PD-0184264或其药学上可接受的盐,其中所述病毒是负链RNA病毒。

[0138] 10. 根据第7-9项中任一项所述的供使用的PD-0184264或其药学上可接受的盐,其中所述病毒感染由流感病毒引起。

[0139] 11. 根据第7-10项中任一项所述的供使用的PD-0184264或其药学上可接受的盐,其中所述病毒感染由甲型流感病毒或乙型流感病毒引起。

[0140] 12. 根据第1-4和7-11项中任一项所述的供使用的PD-0184264或其药学上可接受的盐,其中PD-0184264或其药学上可接受的盐与神经氨酸酶抑制剂或其药学上可接受的盐组合施用。

[0141] 13. 根据第12项中所述的供使用的PD-0184264或其药学上可接受的盐,其中所述神经氨酸酶抑制剂选自奥司他韦、磷酸奥司他韦、扎那米韦、拉尼米韦或帕拉米韦或其药学上可接受的盐。

[0142] 14. 一种药物组合物,其包含PD0184264或其药学上可接受的盐。

[0143] 15. 一种药物组合物,其包含PD-0184264或其药学上可接受的盐和神经氨酸酶抑制剂或其药学上可接受的盐。

[0144] 16. 根据前述项目的任何用途,其包含另外的MEK抑制剂。

[0145] 17. 根据前述任一项所述的供使用的PD-0184264或其药学上可接受的盐,其用于患者,优选脊椎动物。

[0146] \*\*\*

[0147] 必须注意,如本文使用的单数形式“一”、“一个”和“所述”包括复数指代,除非上下文另有明确指示。因此,例如,提及“一种试剂”包括一种或多种此类不同试剂,提及“所述方法”包括对本领域普通技术人员已知的可以被修改或替代本文所述方法的等同步骤和方法。

[0148] 本公开中引用的所有出版物和专利均以引用方式整体并入。如果通过引用并入的材料与本说明书相矛盾或不一致,本说明书将取代任何此类材料。

[0149] 除非另有说明,一系列元素之前的术语“至少”应理解为该系列中的每个元素。本领域技术人员将认识到或能够使用不超过常规实验确定本文所述的本发明的具体实施方案的许多等同方案。此类等同物意欲包含在本发明中。

[0150] 除非上下文另有要求,在整个说明书和随后的权利要求书中,术语“包括”及其变体如“包含”和“含有”应理解为暗示包括所述的整体或步骤或整体或步骤的组,但不排除任何其它整体或步骤或整体或步骤的组。当在本文中使用时,术语“包含”可以用术语“含有”代替,或者有时在本文中使用时术语“具有”。

[0151] 本文中使用的“由……组成”排除权利要求要素中未指定的任何要素、步骤或成分。本文中使用的“基本上由……组成”不排除实质上不影响权利要求的基本和新颖特征的材料或步骤。

[0152] 在本文的每种情况下,术语“包含”、“基本上由……组成”和“由……组成”中的一个可用其它两个术语中的任一个来代替。

[0153] 本说明书的全文中引用了若干文献。本文引用的每篇文献(包括所有专利、专利申请、科学出版物、制造商的说明书、使用说明书等),无论上文还是下文,均通过引入方式全文并入本文作为参考。本文中没有任何内容被解释为承认本发明无权凭借在先发明而早于这些公开。

## 实施例

[0154] 以下实施例说明本发明。这些实施例不应被解释为限制本发明的范围。这些包含的实施例是为了解释的目的,本发明仅由权利要求书限定。

[0155] 实施例1:用PD-0184264处理小鼠导致肺中病毒滴度降低

[0156] 8周龄的C57BL/6小鼠(每组五只)用 $1.5 \times 10^5$  PFU ( $5 \times \text{MLD}_{50}$ ) 流感病毒株A/Regensburg/D6/2009(RB1,H1N1pdm09)感染。在感染前一小时开始,以8小时间隔用150mg/kg CI-1040、75mg/kg CI-1040、25mg/kg CI-1040、75mg/kg PD0184264、25mg/kg PD0184264或溶剂(对照):50 $\mu$ l DMSO/150 $\mu$ l Cremophor/800 $\mu$ l PBS处理小鼠。所有动物口服200 $\mu$ L的体积。感染后24小时处死小鼠,称肺重,转移到裂解介质D管(MP Bio)中,并将10倍肺体积的BSS(缓冲盐溶液)应用到样品中。使用FastPrep FP 120(Savant)将组织切碎。为了除去细胞碎片,将匀浆在2000rpm下离心15分钟,收集上清液。使用AVICEL®空斑试验确定匀浆中病毒滴度。结果在图1中以病毒滴度(log<sub>10</sub>) pfu/ml(左)或病毒滴度%(右)表示。病毒滴度由两个研究人员独立测定。给出了所有滴定的平均值。

[0157] 实施例2:CI-1040或PD-0184264的施用对包括MRSA在内的细菌生长具有体外抑制作用

[0158] 为了研究CI-1040或PD-0184264对细菌生长的影响,向金黄色葡萄球菌(MRSA)菌株(USA300)的无细胞过夜培养物中补充50 $\mu$ M的CI-1040或PD-0184264或相同体积(40 $\mu$ l)的作为溶剂的DMSO(图2)。对细菌生长监测360分钟。PD-0184264对细菌生长具有强烈影响,在整个观察期间几乎完全不存在细菌生长。如图2所示,与溶剂对照相比,CI-1040在实验开始后120分钟开始轻微抑制MRSA的生长,这表明PD-0184264和CI-1040除了阻断细胞中的MEK

外,还阻断负责细菌生长的细菌组分。

[0159] 为了研究抑制细菌生长所需的PD-0184264的浓度,以不同浓度将PD-0184264(如图3所示)施用至金黄色葡萄球菌USA300(MRSA)的过夜培养物。MRSA细菌以0-100 $\mu$ M范围内不同浓度的MEK抑制剂孵育,并在孵育后六小时监测细菌生长。抑制50%细菌生长所需的浓度范围为15-25 $\mu$ M。

[0160] 这些数据可以在稍微不同的实验环境中验证,在处理后的稍后时间点确定实际细菌滴度,而不是OD。将金黄色葡萄球菌6850的日间培养物(over-day culture)设定为20CFU/ml,并如所示的以不同浓度的CI-1040在37 $^{\circ}$ C和5%CO<sub>2</sub>下处理过夜。然后,测量光密度(OD600)。用PBS洗涤剩余的培养物,并将连续稀释液用于BHI琼脂平板。细菌滴度以每毫升菌落形成单位(CFU/毫升)表示。结果代表三次独立生物学实验的平均值+SD,其中两次技术重复,示于图4A中。此外,将金黄色葡萄球菌6850(图4B)或MRSA菌株USA 300(图4C)的日间培养物设定为20CFU/ml,并如所示的以不同浓度的PD-0184264在37 $^{\circ}$ C和5%CO<sub>2</sub>下处理过夜。早上,测量光密度(OD600)。用PBS洗涤剩余的培养物,并将连续稀释液用于BHI琼脂平板。使用菌落计数器“protocol3”确定细菌滴度,并以对数标度表示为每毫升菌落形成单位(CFU/ml)。结果代表三次独立生物实验的平均值 $\pm$ SD。通过单因素方差分析和Dunnett多重比较检验分析统计学显著性,其中两次技术重复。CI-1040(图4A)和PD-0184264(图4B,C)在这些针对金黄色葡萄球菌菌株6850(图4A,B)和MRSA菌株USA 300(图4C)的试验中也是有效的。使用20 $\mu$ M的PD-0184264(图4B,C)可以检测到滴度显著降低高达1.5-2个数量级。

[0161] 实施例3:向单一或共感染的细胞施用PD-0184264可保护细胞免受IAV和/或金黄色葡萄球菌的细胞病变作用

[0162] 考虑到PD-0184264的抗病毒和强抗菌作用(以上实施例2中的图2-4),我们分析了该化合物的这一特征是否也可以在IAV(甲型流感病毒)和/或金黄色葡萄球菌感染引起的细胞破坏致细胞病变效应(CPE)中宏观观察到。用PD-0184264(指定浓度)或溶剂(DMSO)预处理人肺上皮细胞(A549),并在37 $^{\circ}$ C下以感染复数(MOI=0.001)感染人流感病毒株A/Puerto Rico/8/34(H1N1)。30分钟后,除去病毒稀释液,用PBS冲洗细胞,并在指示浓度的抑制剂或溶剂对照存在下,补充含有或不含金黄色葡萄球菌6850(MOI=0.1)的侵入培养基DMEM/INV(含有1%人血清白蛋白,25nM HEPES)。细菌感染后3小时,用含有10%FBS、2 $\mu$ g/ml溶葡萄球菌素的DMEM/FBS处理细胞20分钟,以除去胞外细菌。用PBS再次洗涤后,用含有抑制剂或溶剂的感染培养基DMEM/BA(0.2%BA,1mM MgCl<sub>2</sub>,0.9mM CaCl<sub>2</sub>,100U/ml青霉素,0.1mg/ml链霉素)补充细胞。在37 $^{\circ}$ C下孵育24小时后,通过光学显微镜检查细胞形态。如图5所示,在IAV(H1N1)或金黄色葡萄球菌6850单次感染后,观察到细胞单层的轻微破裂。与两种病原体共感染后,这种CPE显著增加(下图)。然而,随着MEK抑制剂用量的增加,这种表型可以浓度依赖性的方式逆转,因为细胞单层保持完整,细胞形状不太圆。PD-0184264的这种细胞保护作用完美地反映了其抗病毒和抗菌性能(图5)。

[0163] 实施例4:PD-0184264与常用抗生素抗菌作用的比较

[0164] 为了比较MEK抑制剂PD0184164的抗菌性能与普通抗生素的作用,我们用溶剂、MEK抑制剂U0126和PD-0184264或不同浓度的抗生素庆大霉素处理细菌过夜。将金黄色葡萄球菌6850或MRSA菌株USA 300的日间培养物设定为20CFU/ml,并如所示的在37 $^{\circ}$ C和5%CO<sub>2</sub>下用MEK抑制剂U0126和PD-0184264或抗生素庆大霉素处理过夜。早上,测量光密度(OD600)。

用PBS洗涤剩余培养物一次,连续稀释液用于BHI琼脂平板。使用菌落计数器“protocol3”测定细菌滴度,并以每毫升菌落形成单位(CFU/ml)表示。图6中所示的结果代表三个独立生物实验的平均值 $\pm$ SD,其中两次技术重复。通过单因素方差分析和Dunnett多重比较检验来分析统计学显著性。与溶剂处理的细菌相比,用第一代MEK抑制剂U0126孵育仅导致细菌滴度的轻微降低,而如图4所示用PD-0184264处理会导致细菌载量显著降低。这两种细菌菌株都是如此。如所预期的,浓度高于 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 的庆大霉素会强烈抑制两种细菌菌株的生长,尽管在金黄色葡萄球菌6850的情况下,抗生素的抗菌作用更高。在 $0.5\mu\text{g}/\text{ml}$ 庆大霉素下,两种菌株都没有检测到细菌滴度的降低。总之,MEK抑制剂PD-0184264对细菌生长的影响几乎与低浓度的抗生素庆大霉素一样有效。

[0165] 为了进一步比较PD-0184264与其它MEK抑制化合物或抗生素庆大霉素的抗菌作用,进行了不同时间点加药试验(图7a)。将金黄色葡萄球菌6850的过夜培养物分成六个次培养物,其含有15ml BHI培养基和单独的溶剂DMSO或15ml BHI培养基和MEK抑制剂U0126与PD-0184264中之一或两种不同浓度的抗生素庆大霉素( $0.5$ 或 $2\mu\text{g}/\text{ml}$ )。添加不同化合物后,立即测量OD600,并将系列稀释液用于BHI琼脂平板,以计算细菌滴度。剩余的培养物在 $37^\circ\text{C}$ 下在仅有物质或溶剂存在下用 $5\%\text{CO}_2$ 进一步孵育。在接种后3小时和6小时,重复该过程两次。使用菌落计数器“protocol 3”确定细菌滴度,并以每毫升菌落形成单位(CFU/ml)表示。与所有其它化合物相比,以MEK抑制剂PD-0184264处理对细菌生长的抑制作用最强。然后,更换培养基,并在不添加任何物质的情况下,进一步孵育培养物。所有培养物均达到先前溶剂处理的培养物的浊度,这表明MEK抑制剂PD-0184264具有抑菌作用而不是杀菌作用。

[0166] 对各种常用抗生素的耐药性发展经常发生,这是临床中的主要问题。为了测试MEK抑制剂PD0184264是否会导致金黄色葡萄球菌产生耐药性,将培养物在抑制剂庆大霉素、红霉素的存在下持续处理约三周,或者不处理。具体而言,在存在或不存在物质的条件下,将培养物生长24小时,测量OD600,然后将培养物设定为 $20\text{CFU}/\text{ml}$ ,再次生长24小时,重复该过程17天。数据代表三次独立实验的平均值 $\pm$ SD。通过单因素方差分析和Dunnett多重比较试验(\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ; \*\*\*\* $p < 0.0001$ )进行统计学显著性分析。与大环内酯抗生素红霉素相比,庆大霉素在治疗第一周出现耐药性。值得注意的是,用MEK抑制剂处理没有诱导耐药性(参见图7b所示的结果)。

[0167] 实施例5:细菌激酶PknB可能是PD-0184264在细菌中的靶点

[0168] 推测抑制剂PD-0184264对哺乳动物中存在的激酶MEK具有特异性。其直接抗菌作用引起了关于原核生物中作用模式的问题,即是否存在类似MEK、也可被PD-0184264特异性靶向的细菌成分。此时,细菌丝氨酸/苏氨酸激酶PknB成为研究的焦点。该激酶显示与哺乳动物细胞中的MEK靶点细胞丝氨酸/苏氨酸激酶,更准确地说与MAP激酶如p38、JNK和ERK(Miller等人,2010,Rakette等人,2012)(图8)具有高度结构和功能相似性。有趣的是,显示该激酶通过自磷酸化而被激活,因此,强烈提示它具有类似MEK的活性。

[0169] 实施例6:PD-0184264增加金黄色葡萄球菌对抗生素的敏感性并降低细菌的抗应激性

[0170] 由于表达三个青霉素结合域(PASTA)(见图8,上图),PknB参与抗生素敏感性的调节。可以显示,缺乏激酶会导致对不同抗生素,尤其是各种 $\beta$ -内酰胺类抗生素敏感性的增加(Tamber等人,2010)。为了研究用MEK抑制剂PD-0184264处理细菌是否可能对细菌激酶有影

响,并导致与激酶敲除相似的表型,用溶剂(DMSO)或20 $\mu$ M PD-0184264处理细菌培养物过夜,然后用于测定不同抗生素的最小抑制浓度(MIC)。将金黄色葡萄球菌6850的日间培养物设定为20CFU/ml,并用溶剂DMSO或MEK抑制剂PD-0184264在37 $^{\circ}$ C和5%CO<sub>2</sub>下过夜。早上,测量光密度(OD600)。简言之,用PBS洗涤溶剂和抑制剂处理的培养物一次,并将1:1稀释液用于BHI琼脂平板。接种后不久,将不同抗生素(Thermo Fischer Scientific)的MIC试验条置于平板中间,然后在37 $^{\circ}$ C下孵育18至24小时。在37 $^{\circ}$ C下孵育18小时后,通过对平板目视分析确定MIC浓度。在该浓度下,不再看到生长抑制,该浓度被称为每种抗生素的MIC。用PD-0184264处理确实导致细菌对不同抗生素敏感性的增加,这在青霉素和庆大霉素的情况下最为突出(图9,表2),该结果与缺乏激酶的突变菌株产生的公开数据完全一致(Tamber等人,2010)。

[0171] 表2:用PD0184264进行过夜处理后确定MIC

	最低抑菌浓度(MIC) [mg/L]			
	金黄色葡萄球菌 6850		金黄色葡萄球菌 USA300	
	未经处理的	PD0184264	未经处理的	PD0184264
[0172] 青霉素	16	0.25-0.5	>256	8
美罗培南	0.06	0.03	0.12-0.25	0.06
利奈唑胺	2	1	2	1
环丙沙星	0.25	0.12-0.25	8	4-8
庆大霉素	2	0.12	1	0.12

[0173] 在PD-0184264处理后,观察到抗生素敏感性增加,这与缺乏激酶的细菌表型匹配(Tamber等人,2010),强烈提示抑制剂可能直接靶向PknB。由于已知激酶在细菌抗应激性中起重要作用,在用抑制剂PD-0184264处理细菌后,监测细菌在热应激下的生长。用溶剂或20 $\mu$ M PD-0184264过夜处理金黄色葡萄球菌菌株6850和MRSA菌株USA300。第二天,制备具有相同数量细菌的次培养物(通过OD600确认并铺在BHI琼脂上),并进一步在42 $^{\circ}$ C孵育6小时。然后,将连续稀释液铺在BHI琼脂平板上,计算细菌滴度。如图10所示,与溶剂处理的病原体相比,PD-0184264处理的细菌在这些条件下强烈受损。这在甲氧西林敏感性菌株6850(黑色条带)以及MRSA菌株USA300(灰色条带)中均观察到。在抑制剂存在的情况下,受损的应激耐受性是PD-0184264直接靶向激酶PknB的另一个指示,其是抗应激性的重要介体。总之,该数据提供了强有力的间接证据,即PD-0184264通过抑制细菌激酶PknB来诱导其抗菌作用。

[0174] 实施例7:PD-0184264的施用对肺炎链球菌和枯草芽孢杆菌的生长具有抑制作用

[0175] 除了金黄色葡萄球菌,还存在其它已知的细菌会在患者感染流感病毒(IV)后引起继发性细菌性肺炎。在此情况下,最丰富的病原体是肺炎链球菌。这些细菌代表社区获得性肺炎的最常见原因。与金黄色葡萄球菌相比,肺炎链球菌的继发感染发生在IV后的晚期,因此对应于流感后肺炎的晚期。

[0176] 与金黄色葡萄球菌类似,大多数肺炎链球菌菌株表达真核类丝氨酸/苏氨酸激酶,

如PknB,它们在不同属之间是高度保守的。另外,这些激酶与细胞MAP激酶(例如ERK、JNK、p38)具有高度同源性。用不同金黄色葡萄球菌菌株获得的实施例2-6中所示的结果已经证明PD-0184264处理对细菌生长的抑制作用,这表面观察到的表型中涉及细菌激酶,例如PknB。引人注目的是,金黄色葡萄球菌PknB的同系物也存在于肺炎链球菌中,这表明这些细菌也可能对PD0184264敏感。因此,分析了PD-0184264对肺炎链球菌的不同菌株的影响。肺炎链球菌菌株可分为不同血清型,其毒力和总体致病性不同。为了测试血清型或菌株非依赖性效应,我们使用了包囊菌株D39和TIGR4,二者都具有毒性,但属于不同的血清型。研究发现,PD-0184264处理会损害不同血清型肺炎链球菌的生长。具体地,如所示的,将肺炎链球菌菌株TIGR4(血清型4)和D39 WT(血清型2)的日间培养物设定为光密度(OD600)为1,在BHI培养基中以1:2000稀释,并用溶剂(DMSO)或不同浓度的特定MEK抑制剂PD0184264(PD; CI-1040的活性代谢物)过夜处理。然后,再次测量OD600(结果如图11A所示),并将系列稀释液用于BHI琼脂平板,以确定细菌滴度(结果如图11B所示)。因此,可以证明两种血清型对PD-0184264都敏感(图11a,b)。

[0177] 枯草芽孢杆菌也是如此,在10 $\mu$ M PD-0184264存在的情况下,观察到活细菌计数显著减少,并且在较高浓度下完全消失(参见图11c中的结果)。具体地,为了测试对枯草芽孢杆菌的潜在抗菌作用,将枯草芽孢杆菌的过夜培养物与溶剂或不同浓度的MEK抑制剂PD-0184264(如所示的)一起孵育18小时。之后,通过测量OD600并将连续稀释液铺在BHI琼脂平板上,以确定细菌载量。图11中所示的数据代表三个独立实验的平均值+SD。

[0178] 总之,这些数据表明PD-0184264在抗菌治疗中具有广泛的适用性。

[0179] 实施例8:PD-0184264而非CI-1040降低细胞内细菌滴度

[0180] 流感病毒(IV)感染导致抗病毒细胞因子的表达增强,最重要的是,I型IFN可激活关键的下游抗病毒反应,并可能增强随后的细菌感染。为了观察用CI-1040或PD-0184264处理是否会使细胞对继发性金黄色葡萄球菌感染敏感,在存在或不存在抑制剂的情况下,用流感病毒IV和金黄色葡萄球菌感染永生化的A549人肺泡基底上皮细胞(A549)。具体地,用10 $\mu$ M的特异性MEK抑制剂PD-0184264或DMSO作为溶剂对照对A549细胞预处理1小时。然后,用PBS漂洗细胞,并在37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>下用流感病毒(IV)(MOI,如所示的)感染30分钟。随后,用PBS洗涤细胞,并在存在或不存在抑制剂的情况下,用金黄色葡萄球菌6850(MOI,如所示的)感染3小时。为了避免细菌过度生长,在37 $^{\circ}$ C下用溶葡萄球菌素(2 $\mu$ g/mL)进行抗生素清洗步骤20分钟,以除去未内化的细菌。然后,将细胞清洗一次,并在抑制剂或溶剂的存在下进一步孵育直至感染后24小时。在孵育期结束时,通过光学显微镜分析细胞单层。显微镜检查显示,与单一感染相比,两种病原体的过度感染导致细胞病变效应(CPE)高度增加(图13,上图)。在PD-0184264存在的情况下,CPE被完全消除(图13,下图),表明病毒复制减少。

[0181] 为了观察PD-0184264和CI-1040处理是否有可比性,用10 $\mu$ M CI-1040、PD-0184264或溶剂(DMSO)预处理A549细胞60分钟,然后在37 $^{\circ}$ C下用0.001的MOI感染流感IV(H7N7)。结果分别示于图14A和14B中。30分钟后,除去病毒稀释液,用PBS冲洗细胞,并在10 $\mu$ M CI-1040、PD-0184264或溶剂对照存在下,补充含有或不含金黄色葡萄球菌6850(6850)(MOI 0.1)的侵入培养基。细菌感染后3小时,用溶葡萄球菌素(2 $\mu$ g/mL)处理细胞20分钟,以除去胞外细菌。然后清洗细胞并补充含有抑制剂或溶剂的感染培养基。在24小时的总孵育期之后(病毒感染后),分析细胞内细菌滴度。结果代表三个独立实验的平均值+SD。通过单因素

方差分析和Tukey多重比较检验 (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ; \*\*\*\* $p < 0.0001$ ) 来评价统计学意义。从图14A中可以看出,用CI-1040处理不会使细胞对金黄色葡萄球菌的继发感染敏感,因为没有检测到细胞内细菌负荷的变化。令人惊讶的是,PD-0184264的施用甚至会导致细胞内细菌滴度降低,如图14B所示。持续感染期间的后期施用CI-1040或PD-0184264获得了可比较的结果,如图14C所示。

[0182] 为了排除病毒和细胞内细菌复制的减少是PD-0184264对A549细胞的细胞毒性作用的结果,在浓度增加的情况下,对细胞活力进行24和48小时监测。另外,进行LDH-测定,以确定由于抑制剂处理导致的膜破裂。结果表明,用PD-0184264处理A549细胞不会诱导细胞毒性。用递增浓度的PD-0184264 (1、5、10、20、50或100 $\mu\text{M}$ ) 处理A549细胞24小时(如图15A和C所示)或48小时(如图15B和D所示)。孵育后,取上清液,根据制造商的说明书,使用CytoSelect LDH细胞毒性检测试剂盒测量LDH释放(如图15C、D所示)。另外,通过用台盼蓝染色对活细胞进行计数。将细胞活力标准化为DMSO处理的细胞,并显示为%活力。数据显示三个独立实验的平均值 $\pm$ SD。通过单因素方差分析和Dunnett多重比较检验 (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; 27\*\*\* $p < 0.001$ ) 计算统计学显著性。

[0183] 实施例9:确定CI-1040和PD-0184264的 $\text{IC}_{50}$ 值

[0184] 将抑制剂等分试样溶解在100% DMSO (母溶液10mM) 中。为了分析 $\text{IC}_{50}$ 值,在微量滴定板中制备以下系列稀释液:50 $\mu\text{M}$ 、25 $\mu\text{M}$ 、5 $\mu\text{M}$ 、2.5 $\mu\text{M}$ 、0.5 $\mu\text{M}$ 、0.25 $\mu\text{M}$ 、0.05 $\mu\text{M}$ 、0.025 $\mu\text{M}$ 、0.005 $\mu\text{M}$ 。将1 $\mu\text{L}$ 的每种稀释液加入49 $\mu\text{L}$ 激酶反应混合物中,得到以下试验浓度:1 $\mu\text{M}$ 、500nM、100nM、50nM、10nM、5nM、1nM、0.5nM、0.1nM。

[0185] 将3 $\mu\text{l}$ 活性c-Raf1、2 $\mu\text{l}$  MEK1wt和3 $\mu\text{l}$  ERK2wt纯化蛋白溶液与激酶缓冲液和1 $\mu\text{l}$  DMSO或DMSO/抑制剂(终体积为45 $\mu\text{l}$ ) 混合。将混合物在室温下黑暗中孵育30分钟。在预孵育后,确保抑制剂与MEK蛋白结合,通过加入5 $\mu\text{l}$  10 mM ATP并用移液管混合来开始激酶反应。样品在26 $^{\circ}\text{C}$ 热混合器(Eppendorf)中以500rpm孵育30分钟。为了终止激酶反应,加入5.5 $\mu\text{l}$  120% SDS溶液,随后将该混合物在50 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育10分钟。然后将每个样品用190 $\mu\text{l}$ 封闭缓冲液(1% BSA的TBST溶液)稀释。将100 $\mu\text{l}$ 的每种样品加入到96孔微量滴定板的涂覆有抗ERK抗体的孔中。

[0186] 将激酶反应样品(100 $\mu\text{l}$ /孔)在室温下在96孔微量滴定板的涂覆有抗-ERK抗体并以BSA封闭的孔中孵育60分钟。随后用100 $\mu\text{l}$  TBST洗涤缓冲液将板洗涤 $3 \times 5$ 分钟。为了检测磷酸化的ERK,添加抗磷酸化ERK (p44/p42) 抗体(1:3000,封闭缓冲液中100 $\mu\text{l}$ /孔),并在4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。

[0187] 在三个洗涤步骤( $3 \times 100\mu\text{l}$ /孔)后,加入HRP偶联的抗小鼠IgG特异性抗体(TBST中1:1000),并在室温下孵育60分钟。在另外三个洗涤步骤( $3 \times 100\mu\text{l}$ /孔TBST)后,加入100 $\mu\text{l}$ /孔过氧化物酶底物ABTS,并在30 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育30分钟。通过加入2.5 $\mu\text{l}$  20% SDS终止底物反应。在405nm波长处在ELISA-读数器中测定混合物的光密度(OD)。

[0188] 无细胞激酶试验显示,与PD-0184264相比,抑制50%的MEK活性所需的CI-1040(图16)要少12.5倍,PD-0184264实际上是一种较弱的MEK激酶抑制剂。因此,没有人会预期PD-0184264具有强的抗病毒和抗菌作用。然而,如之前实施例所示,PD-0184264在体内表现出比CI-1040更强的抗病毒和抗菌活性。

[0189] 实施例10:PD-0184264在体外试验中的抗病毒活性

#### [0190] 药物

[0191] CI-1040 [2-(2-氯-4-碘苯基氨基)-N-(环丙基甲氧基)-3,4-二氟苯甲酰胺;批号:CC-5395.0-16]和PD-0184264 (PD0184264) [2-(2-氯-4-碘苯基氨基)-N-3,4-二氟苯甲酸;批号:CC-5595.4-10]在ChemCon GmbH (Freiburg, 德国) 合成。对于细胞培养实验,在DMSO (Merck-Millipore; 德国) 中制备10mM的CI-1040 ( $M=478,66\text{g/mol}$ ) 和PD-0184264 ( $M=409,55\text{g/mol}$ ) 母液。

#### [0192] 病毒和细胞

[0193] 用MOI为0.001的甲型流感病毒株RB1 [A/Regensburg/D6/09 (H1N1pdm09)] 进行病毒抑制实验。

#### [0194] 子代病毒抑制试验

[0195] 在37℃、5%CO<sub>2</sub>的气氛中,用RB1感染A549细胞30分钟。孵育后,抽取病毒稀释液,用PBS冲洗细胞,并在37℃、5%CO<sub>2</sub>下在10μM CI-1040或不同浓度的PD-0184264 (100μM, 50μM, 10μM, 5μM, 1μM, 0.5μM和0.1μM, 最终DMSO的浓度=1%) 的存在下,补充500μl IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's培养基)/BA(牛白蛋白)-培养基 (0.2%BA, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 0.9mM CaCl<sub>2</sub>, 100U/ml青霉素, 0.1mg/ml链霉素) 和0.6μl TPCK处理的胰蛋白酶24小时。溶剂对照是含有1%DMSO的IMDM/BA培养基。如前所述 (Haasbach等人, 2011, Matrosovich等人, 2006), 收集细胞培养上清液,以使用AVICEL®空斑试验测定MDCK II细胞上的子代病毒滴度。

#### [0196] WST分析

[0197] 将A549细胞接种在96孔平底组织平板 (Greiner, 德国) 中并生长过夜。然后,用溶解在补充有5%胎牛血清 (Sigma-Aldrich; 德国) 的100μl IMDM (ThermoFisher, 德国) 中的不同浓度的PD-0184264 (100μM, 50μM, 10μM, 5μM, 1μM, 0.5μM和0.1μM) 处理细胞,最终DMSO浓度=1%,并在37℃和5%CO<sub>2</sub>下孵育24小时。然后,将10μl WST-1试剂 (Roche, 德国) 加入培养基中,并孵育四小时。在此期间,稳定的四唑盐WST-1被培养物中具有代谢活性的细胞裂解成可溶的甲瓩。在该孵育期后,用ELISA读数器在405nm处定量形成的甲瓩染料。测量的吸光度与活细胞的数量直接相关。

#### [0198] 结果

[0199] 在标准病毒抑制试验中研究了PD-0184264对RB1的抗病毒活性 (图17A)。当用100μM PD-0184264 ( $P>0.0001$ ) 处理细胞时,发现病毒滴度降低 $98.87\pm 0.03\%$ 。使用50μM的PD-0184264 ( $91.50\pm 2.08\%$ ;  $P>0.0001$ ) 具有类似的降低。相反,当使用10μM PD-0184264时,仅发现病毒滴度轻微降低 ( $58.97\pm 4.45\%$ )。1μM PD-0184264几乎不导致子代病毒的减少。因此,与用10μM CI-1040 ( $96.78\pm 0.65\%$ ;  $P>0.0001$ ) 减少病毒相比,PD-0184264的浓度需要高近10倍才能实现子代流感病毒的类似减少。这也与和CI-1040相比PD-0184264的EC<sub>50</sub>值一致。对于PD-0184264,EC<sub>50</sub>值为0.804μM (图17B)。在另一项研究中,CI-1040对RB1的EC<sub>50</sub>值可以确定为0.026μM (Haasbach等人, 2017)。PD-0184264CC<sub>50</sub>值 $>1576$  (图17C),比CI-1040 ( $>312.3\mu\text{M}$ ; Haasbach等人, 2017) 高。因此,PD-0184264的S.I. = 1960 (选择性指数)。

#### [0200] 概述/讨论

[0201] 结果表明,与CI-1040相比,PD-0184264在细胞培养物 (即体外) 中的抗病毒活性降低。在体外试验中,PD-0184264的浓度几乎要高10倍才能实现与CI-1040相同的病毒减少效

果。这两种化合物之间的 $EC_{50}$ 值差异甚至更显著。在此,PD-0184264的 $EC_{50}$ 值比CI-1040的 $EC_{50}$ 值高31倍(Haasbach等人,2017)。与开发CI-1040相比,PD-0184264对A549细胞上的RB1的S.I.也降低。

[0202] 实施例11:PD-0184264导致小鼠肺中病毒滴度的体内降低

[0203] (A) H1N1 pdm09感染后,雌性C57BL/6小鼠口服2.8、8.4或25mg/Kg PD-0184264(左侧)或25、75或150mg/Kg CI-1400(左侧)。感染后24小时处死动物,取肺制备10%悬浮液。使用标准方法测定病毒滴度。将用两种MEK抑制剂处理的小鼠的病毒滴度与单独用溶剂处理的小鼠(对照)的病毒滴度进行比较。对照小鼠肺中的病毒水平设定为100%(黑色柱)。Graphpad Prism 7软件用于图解这两个图。

[0204] 药物

[0205] CI-1040[2-(2-氯-4-碘苯基氨基)-N-(环丙基甲氧基)-3,4-二氟苯甲酰胺;批号:CC-5395.0-16]和PD-0184264(PD0184264)[2-(2-氯-4-碘苯基氨基)-N-3,4-二氟苯甲酸;批号:CC-5595.4-10]在ChemCon GmbH(Freiburg,德国)合成。

[0206] 对于25mg/kg的口服施用,将2.5mg PD-0184264溶解于50 $\mu$ l DMSO(Sigma-Aldrich,德国)中,并用0.15ml Cremophor EL(Merck-Millipore,德国)和0.8ml PBS(Gibco,德国)进一步稀释。对于8.4mg/kg和2.8mg/kg的施用,将0.84mg或0.28mg PD-0184264以50 $\mu$ l DMSO(Sigma-Aldrich,德国)溶解,并用0.15ml Cremophor EL/0.8ml PBS进一步稀释。将202.5mg CI-1040溶解与0.5ml DMSO/0.15ml Cremophor EL/0.8ml PBS中,并用Cremophor EL和PBS进一步稀释。

[0207] 动物

[0208] 使用给药时体重为21.0-24.0g的八周龄的雌性C57B1/6小鼠(Charles River Laboratories,德国)用于抗病毒研究。动物正常喂养。

[0209] 自由饮水。

[0210] 应用药物

[0211] 在试验第1天,通过口服灌胃给药,单剂量给药。应用速度为每剂15秒,给药体积为200 $\mu$ L。

[0212] 肺病毒滴定分析

[0213] 感染后24小时处死小鼠,称肺重,转移到裂解介质D管(MP Bio)中,并以10倍于肺体积的量施用BSS。使用FastPrep FP 120(Savant)将器官切碎。为了除去细胞碎片,将匀浆在2000rpm下离心15分钟,收集上清液。如前所述,使用AVICEL®空斑试验测定匀浆中的病毒滴度(Haasbach等2011,Mastrosovich等2006)。

[0214] 概述/讨论

[0215] 图18显示了实验结果。与对照实验相比,只有浓度为75mg/kg或更高浓度的CI-1040显示了降低病毒滴度的作用。相比之下,在浓度为2.8mg/kg时,PD-0184264已经显示肺中病毒滴度降低至约70%。在浓度为8.4mg/kg时,病毒滴度降低至约20%,而在浓度为25mg/kg时,病毒滴度降低至约10%。因此,需要将PD-0184264的浓度降低6倍,以实现与150mg/kg CI-1040相似的效果,这突出了PD-0184264抗病毒作用的巨大潜力。

[0216] 实施例12:PD-0184264与CI-1040相比具有更高的生物利用度(A)用75mg/Kg CI-1040(深灰色区域)或75mg/Kg PD-0184264通过静脉内途径处理雄性NMRI小鼠。在给药后15

分钟、30分钟、1小时、2小时、4小时、6小时、8小时和24小时(测试第2天)收集血液,分析血浆中药物的存在。(B)使用口服灌胃方式用150mg/Kg CI-1040(深灰色区域)或150mg/Kg PD-0184264/os处理雄性NMRI小鼠。在给药后15分钟、30分钟、1小时、2小时、4小时、6小时、8小时和24小时(测试第2天)收集血液,分析血浆中药物的存在。每个数据点代表三个血浆样品的平均值。Graphpad Prism 7软件用于图解这两个图。

#### [0217] 药物

[0218] CI-1040[2-(2-氯-4-碘苯基氨基)-N-(环丙基甲氧基)-3,4-二氟苯甲酰胺;批号:CC-5395.0-15]和PD-0184264(PD0184264)[2-(2-氯-4-碘苯基氨基)-N-3,4-二氟苯甲酸;批号:CC-5595.4-10]在ChemCon GmbH(Freiburg,德国)合成。对于静脉内应用,将30.65mg CI-1040溶解在0.075ml DMSO(Sigma-Aldrich,瑞士)中,并用0.225ml Cremophor EL(Merck-Millipore,德国)和2.7ml PBS(Gibco,德国)进一步稀释。将34.88mg PD-0184264溶解在0.075ml DMSO中,并用0.225ml Cremophor EL/2.7ml PBS进一步稀释。对于口服应用,将202.5mg CI-1040溶解在0.5ml DMSO/1.5ml Cremophor EL/8.0ml PBS中。将81.0mg PD-0184264溶解在0.2ml DMSO/0.6ml Cremophor EL/3.2ml PBS中。

#### [0219] 动物

[0220] 使用给药时体重为23.9-36.5g的八周大的雄性NMRI小鼠(Charles River Laboratories,德国)用于药代动力学研究。动物正常喂养,自由饮水。

#### [0221] 血液取样和血浆制备

[0222] 在LPT GmbH(Hamburg,德国)进行实验。在异氟烷麻醉下,收集足够的全血,以在给药后以下时间点获得每组3只动物的至少 $2 \times 100\mu\text{L}$  Li-肝素血浆:0(给药前)、15分钟、30分钟、1小时、2小时、4小时、6小时、8小时和24小时(试验第2天)。全血样品使用Iso-therm-Rack系统(Eppendorf AG,Germany)立即冷却,直到取出后0.5小时内离心。离心后立即将样品储存在 $20^{\circ}\text{C}$ 下,直至进一步分析。在Prolytic GmbH(Frankfurt,德国)使用标准程序进行血浆分析。

#### [0223] 药物应用

[0224] 在测试第1天,药物通过口服灌胃或通过尾静脉推注单剂量给药。注射速度为15s/剂,给药体积为 $200\mu\text{L}$ 。

#### [0225] 结果

[0226] 药代动力学实验表明,与AUC值为 $1953.68\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$  PD-0184264的CI-1040相比,静脉注射(图19A)和口服给药(图19B)后在小鼠血浆中发现PD-0184264的暴露更高,远高于CI-1040的值。注意,静脉注射和口服给药CI-1040后八小时,血浆中几乎没有检测到药物。相比之下,口服给药PD-0184264后,在8h数据点处,仍然发现高的浓度。

#### [0227] 概述/讨论

[0228] 单次静脉注射后,PD-0184264和CI-1040的血浆暴露存在显著差异,这已经导致CI-1040可能迅速降解的假设。发明人假设药物以单指数方式下降。通常,这种假设是有效的。在低浓度下,药物通常以单指数方式下降。最终消除速率常数不随时间或循环药物浓度的不同而变化。然而,在这点上,我们不知道其它过程例如肠肝循环是否在药代动力学曲线的末期起着重要作用。

[0229] 总之,PD-0184264在体内显示出比CI-1040更高的抗病毒活性,这可能是基于该药

物更高的生物利用度。

[0230] 实施例13:PD-0184264具有扩大的治疗窗

[0231] 药物及药物应用

[0232] 对于25mg/Kg的口服应用,将10mg PD-0184264溶解在50 $\mu$ l DMSO (Sigma-Aldrich, 德国)中,并用0.15ml Cremophor EL (Merck-Millipore, 德国)和0.8ml PBS (Gibco, 德国)进一步稀释。应用溶剂50 $\mu$ l DMSO (Sigma-Aldrich, 德国)用0.15ml Cremophor EL (Merck-Millipore, 德国)和0.8ml PBS (Gibco, 德国)稀释。药物通过口服灌胃以每天两次 (BID) 给药,时间间隔为八小时。感染后24、48或72小时开始处理 (治疗)。应用速度为15秒/剂,给药体积为50 $\mu$ l。

[0233] 动物

[0234] 使用给药时体重为17.0-21.0g的八周大的雌性C57Bl/6小鼠 (Charles River Laboratories, 德国)用于存活研究。动物正常喂养。自由饮水。

[0235] 病毒感染

[0236] 对于感染,通过腹腔注射200 $\mu$ l氯胺酮 (ketamine) /二甲苯胺噻嗪 (rompun) 麻醉动物。将等量的2%二甲苯胺噻嗪 (Bayer) 和10%氯胺酮 (Sanofi) 母液以1:10的比例与PBS混合。用 $3 \times 10^5$  pfu的A/Regensburg/D 6/2009流感H1N1pdm09 (5xMLD50) 菌株鼻内感染小鼠。在50 $\mu$ l BSS中稀释足够的病毒剂量,并将25 $\mu$ l接种到每个鼻孔中。所有动物研究均得到了吐宾根机构动物护理和使用委员会 (the Institutional Animal Care and Use Committee of Tuebingen) 的批准。

[0237] 临床观察

[0238] 根据管理机构的规定,每天对动物进行观察并称重。在出现临床症状之前,每天观察小鼠两次,在疾病发作之后每天观察三次。当发现小鼠体重减少20%时,必须将其处死。没有动物死于笼中,所有动物都通过CO<sub>2</sub>处理后颈部脱臼处死。

[0239] 结果

[0240] 雌性C57BL/6小鼠用H1N1pdm09感染。感染后24、48或72小时开始用25mg/kg PD-0184264处理。用作对照的小鼠仅接受溶剂。这些动物必须在感染后第四天至第八天之间处死,因为它们显示体重减轻 $\geq 20\%$ 。当感染后24小时开始处理时,八分之二的动物必须在第十天处死,而八分之六的小鼠受到保护。体重减少没有差异,然而在感染后第十天,小鼠体重再次增加,直到观察期结束。溶剂和PD-0184264处理的小鼠之间存活率的差异具有统计学显著性 (Log-Rank Mantel-Cox Test  $P=0.0001$ )。当感染后48小时开始处理时,八分之三的动物必须在第八天至第十天之间处死,八分之五的小鼠受到保护。同样,体重减轻没有差异。在感染后第9天,小鼠再次增加体重,直到观察期结束。存活率的差异再次具有显著性 (Log-Rank Mantel-Cox Test  $P=0.0004$ )。即使在感染后72小时开始处理,存活率的差异也具有显著性 (Logrank Mantel-Cox Test  $P=0.0002$ )。此处,八分之六的动物必须在第七天至第十天之间处死,而八分之二的小鼠受到保护。从感染后第九天开始,小鼠体重增加。

[0241] 概述/讨论

[0242] 用25mg/kg PD-0184264处理H1N1pdm09感染的小鼠,即使在感染后72小时施用药物,存活率仍有显著差异。

[0243] 实施例14:健康人类患者中PD-0184264的I期临床试验

[0244] 进行随机、双盲、安慰剂对照剂量递增研究,在70名健康志愿者中证明了PD-0184264的安全性和耐受性。遵循适应性设计,在单递增剂量/多递增剂量(SAD/MAD)方案后,PD-0184264以100mg的起始剂量和在七步中高达三个递增给药步骤给药。给药方案为一次剂量PD-0184264,从100mg逐渐增加至900mg(SAD),随后七次剂量PD-0184264,在七天内每日从100mg逐渐增加至600mg(MAD)。安全审查委员会(SRC)认为每个剂量组是安全的,允许释放下一个更高剂量(分别高达SAD 900mg和MAD 600mg)。观察到的药代动力学曲线支持进一步临床开发的计划的每日一次方案。

[0245] 在试验期间,仅观察到少数不良事件,未观察到严重不良事件。因此,PD-0184264被认为是安全且耐受性良好的。药代动力学暴露和MEK抑制的测定得到证实,并确认维持临床相关血液水平。

[0246] 参考文献

[0247] Bright,R.A.,Shay,D.K.,Shu,B.,Cox,N.J.and Klimov,A.I. (2006).Adamantane resistance among influenza A viruses isolated early during the 2005-2006 influenza season in the United States.JAMA:The Journal of the American Medical Association 295,891-894

[0248] Chertow,D.S.and Memoli,M.J. (2013).Bacterial coinfection in influenza: a grand rounds review.JAMA:The Journal of the American Medical Association 309,275-282.

[0249] De Clercq,E.and Neyts,J. (2007).Avian influenza A(H5N1)infection: targets and strategies for chemotherapeutic intervention.Trends in pharmacological sciences 28,280-285.

[0250] Gillet,Y.,Vanhems,P.,Lina,G.,Bes,M.,Vandenesch,F.,Floret,D.and Etienne,J. (2007).Factors predicting mortality in necrotizing community acquired pneumonia caused by Staphylococcus aureus containing Panton-Valentine leukocidin.Clinical infectious diseases:an official publication of the Infectious Diseases Society of America 45,315-321.

[0251] Grundmann,H.,Aires-de-Sousa,M.,Boyce,J.and Tiemersma,E. (2006).Emergence and resurgence of methicillin-resistant Staphylococcus aureus as a public-health threat.Lancet 368,874-885.

[0252] Haasbach,E.et al (2017).The MEK-inhibitor CI-1040 displays a broad anti-influenza virus activity in vitro and provides a prolonged treatment window compared to standard of care in vivo.Antiviral research 142,178-184.

[0253] Hayden,F.G.and Hay,A.J. (1992).Emergence and transmission of influenza A viruses resistant to amantadine and rimantadine.Current topics in microbiology and immunology 176,119-130.

[0254] Hrinčius,E.et al. (2010):CRK adaptor protein expression is required for efficient replication of avian influenza A viruses and controls JNK mediated apoptotic responses.Cellular microbiology 12,831-843

[0255] lwao,Y.,lshii,R.,Tomita,Y.,Shibuya,Y.,Takano,T.,Hung,W.C.,et al.

(2012).The emerging ST8 methicillin-resistant Staphylococcus aureus clone in the community in Japan:associated infections,genetic diversity,and comparative genomics.J Infect Chemother 18,228-240.

[0256] LoRusso,P.,Adjei,A.,Varterasian,M.,Gadgeel,S.,Reid,J.,Mitchell,D.,et al.(2005).Phase I and Pharmacodynamic Study of the Oral MEK Inhibitor CI-1040 in Patients With Advanced Malignancies.Journal of Clinical Oncology 23(23), 5281-5293.

[0257] Ludwig,S.(2009).Targeting cell signaling pathways to fight the flu: towards a paradigm change in anti-influenza therapy.Journal of Antimicrobial Chemotherapy,64,1-4.

[0258] Mackey,T.K.,Liang,B.A.,2012.Lessons from SARS and H1N1/A:employing a WHO-WTO forum to promote optimal economic-public health pandemic response.J Public Health Policy 33,119-130.

[0259] Matrosovich M,Matrosovich T,Garten W,Klenk HD(2006).New low-viscosity overlay medium for viral plaque assays.Virol J.3:63.

[0260] Miller,M.,Donat,S.,Rakette,S.,Stehle,T.,Kouwen,T.R.,Diks,S.H., Dreisbach,A.,Reilman,E.,Gronau,K.,Becher,D.,Peppelenbosch,M.P.,van Dijl,J.M., Ohlsen,K.(2010).Staphylococcal PknB as the first prokaryotic representative of the proline-directed kinases.PLoS One,5,e9057

[0261] Monto,A.S.,Black,S.,Plotkin,S.A.,Orenstein,W.A.,2011.Response to the 2009 pandemic:effect on influenza control in wealthy and poor countries.Vaccine 29,6427-6431.

[0262] Moran,G.J.,Krishnadasan,A.,Gorwitz,R.J.,Fosheim,G.E.,McDougal,L.K., Carey,R.B.,et al.(2006).Methicillin-resistant S.aureus infections among patients in the emergency department.The New England Journal of medicine 355, 666-674.

[0263] Morens,D.M.,Taubenberger,J.K.and Fauci,A.S.(2008).Predominant role of bacterial pneumonia as a cause of death in pandemic influenza:implications for pandemic influenza preparedness.The Journal of infectious diseases 198, 962-970.

[0264] Moss,R.B.,Davey,R.T.,Steigbigel,R.T.,Fang,F.,2010.Targeting pandemic influenza:a primer on influenza antivirals and drug resistance.J Antimicrob Chemother 65,1086-1093.

[0265] Neumann,G.,Noda,T.and Kawaoka,Y.(2009).Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus.Nature 459,931-939.

[0266] Paddock,C.D.,Liu,L.,Denison,A.M.,Bartlett,J.H.,Holman,R.C.,Deleon-Carnes,M.,et al.(2012).Myocardial injury and bacterial pneumonia contribute to the pathogenesis of fatal Influenza B Virus infection.The Journal of infectious diseases 205,895-905.

- [0267] Parker,D.and Prince,A.(2012).Immunopathogenesis of Staphylococcus aureus pulmonary infection.Seminars in immunopathology 34,281-297.
- [0268] Parry,J.(2013).H7N9 avian flu infects humans for the first time.Bmj 346,f2151.
- [0269] Pinto,L.H.and Lamb,R.A.(2006).The M2 proton channels of influenza A and B viruses.The Journal of biological chemistry 281,8997-9000.
- [0270] Pinto,L.H.and Lamb,R.A.(2007).Controlling influenza virus replication by inhibiting its proton channel.Molecular bioSystems 3,18-23.
- [0271] Pleschka,S.,Wolff,T.,Ehrhardt,C.,Hobom,G.,Planz,O.,Rapp,U.R.,Ludwig,S.,2001.Influenza virus propagation is impaired by inhibition of the Raf/MEK/ERK signalling cascade.Nat Cell Biol 3,301-305.
- [0272] Rakette,S.,Donat,S.,Ohlsen,K and Stehle,T(2012).Structural analysis of Staphylococcus aureus serine/threonine kinase PknB.PLoS One 7(6),e39136.
- [0273] Robertson,J.S.,Inglis,S.C.,2011.Prospects for controlling future pandemics of influenza.Virus Res 162,39-46.
- [0274] Shilo,N.and Quach,C.(2011).Pulmonary infections and community associated methicillin resistant Staphylococcus aureus:a dangerous mix? Paediatric respiratory reviews 12,182-189.
- [0275] Tamber,S.,Schwartzman,J.and Cheung,A.L.(2010).Role of PknB kinase in antibiotic resistance and virulence in community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus strain USA300.Infection and Immunity 78,3637-3646.
- [0276] Taubenberger,J.K,and Kash,J.C.(2010).Influenza virus evolution,host adaptation,and pandemic formation.Cell host&microbe 7,440-451.
- [0277] Wabnitz,A.,Mitchell,D,and Wabnitz,D.(2004).In Vitro and in Vivo Metabolism of the Anti-Cancer Agent CI-1040,a MEK Inhibitor,in Rat,Monkey,and Human.Pharmaceutical Research 21(9),1670-1679.
- [0278] Tuchscher,L.et al.(2011).Staphylococcus aureus phenotype switching: an effective bacterial strategy to escape host immune response and establish a chronic infection.EMBO molecular medicine 3,129-141

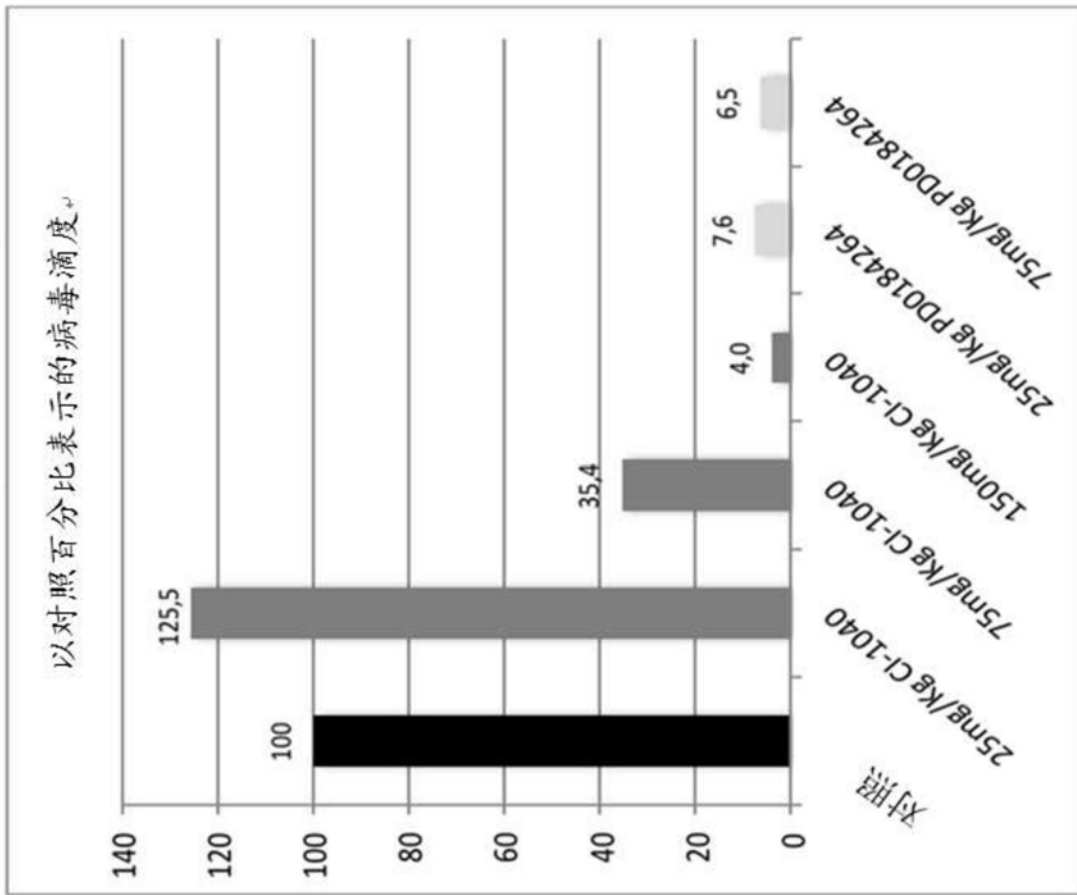


图1

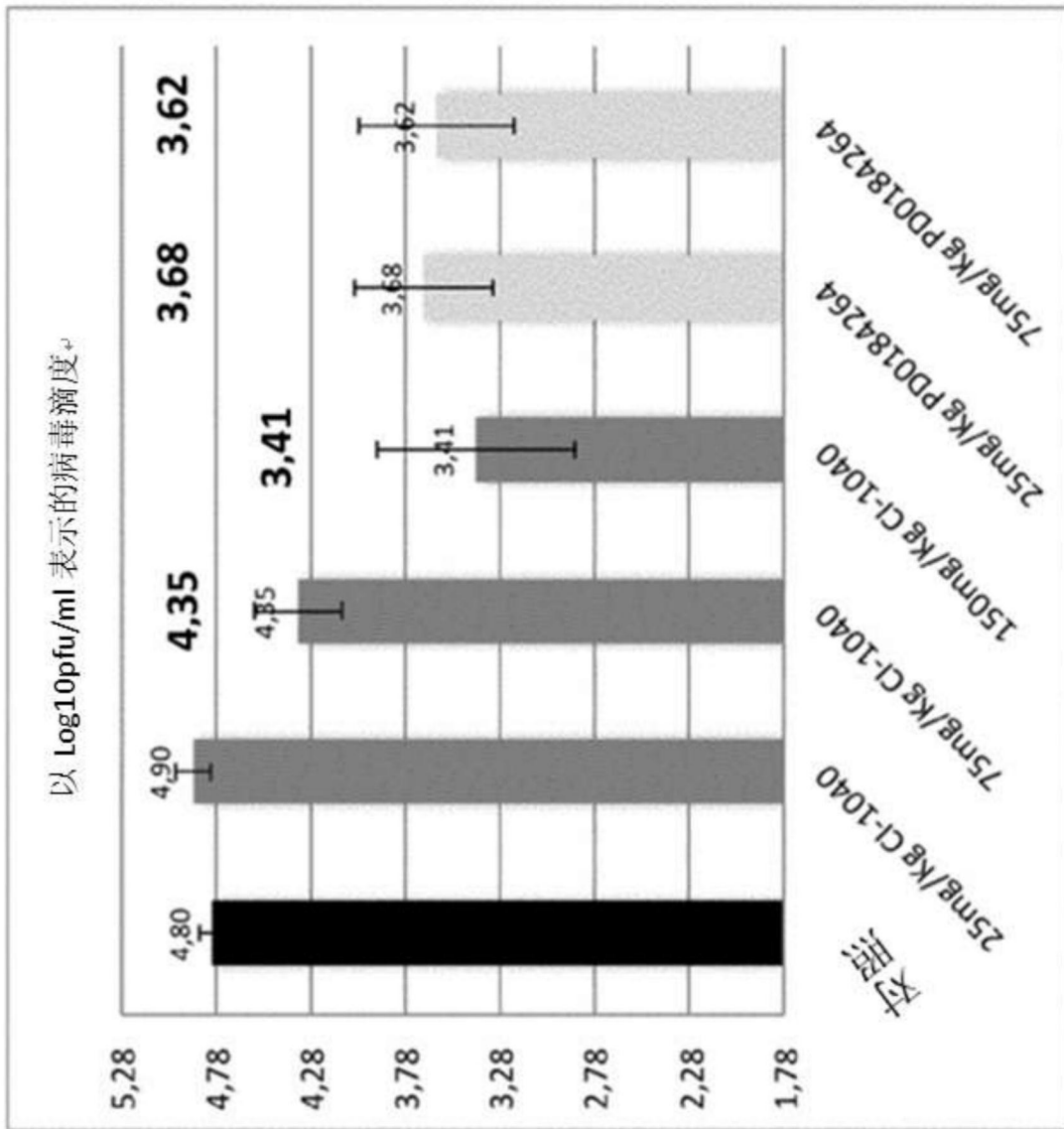


图1 (续)

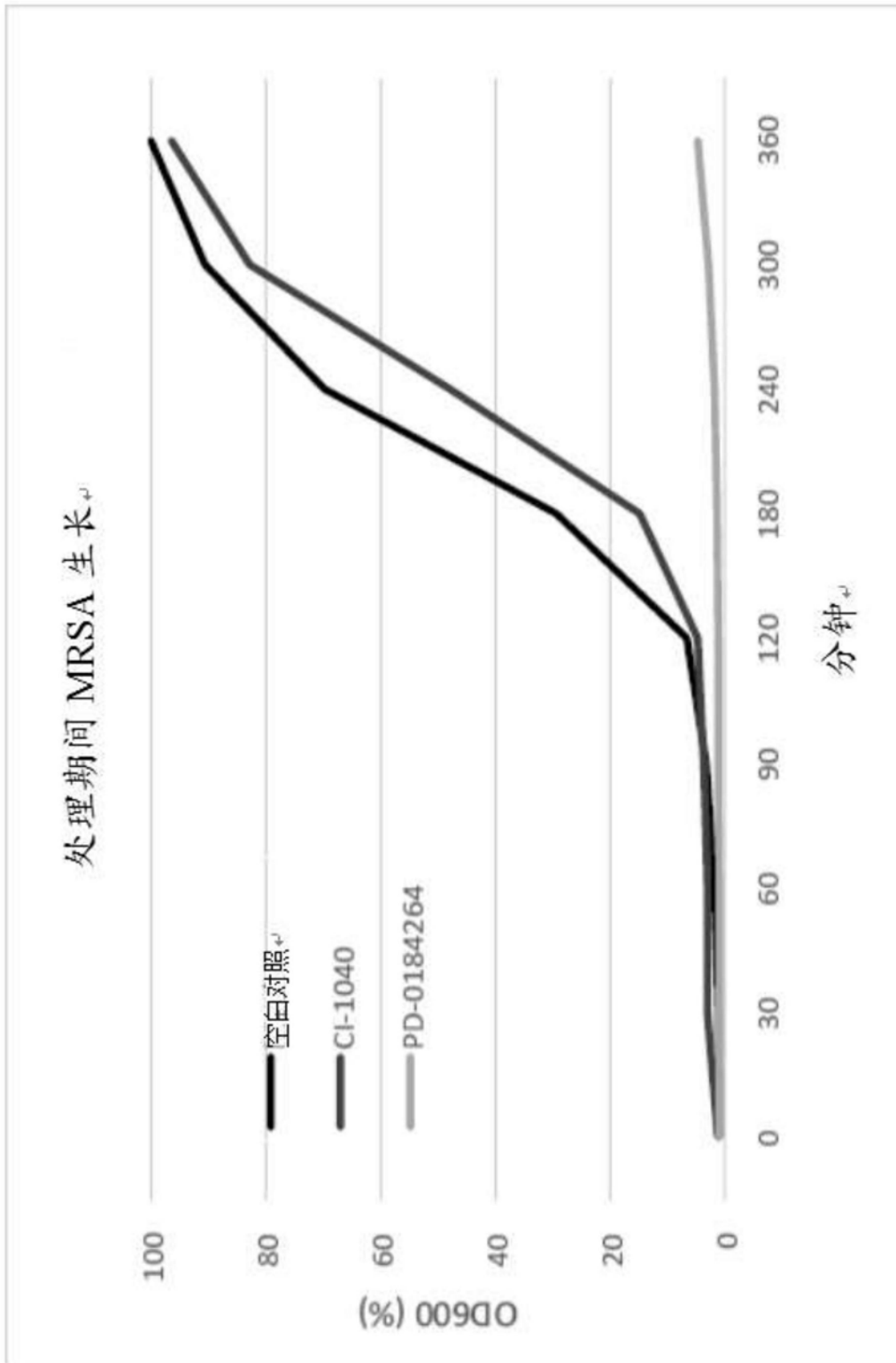


图2

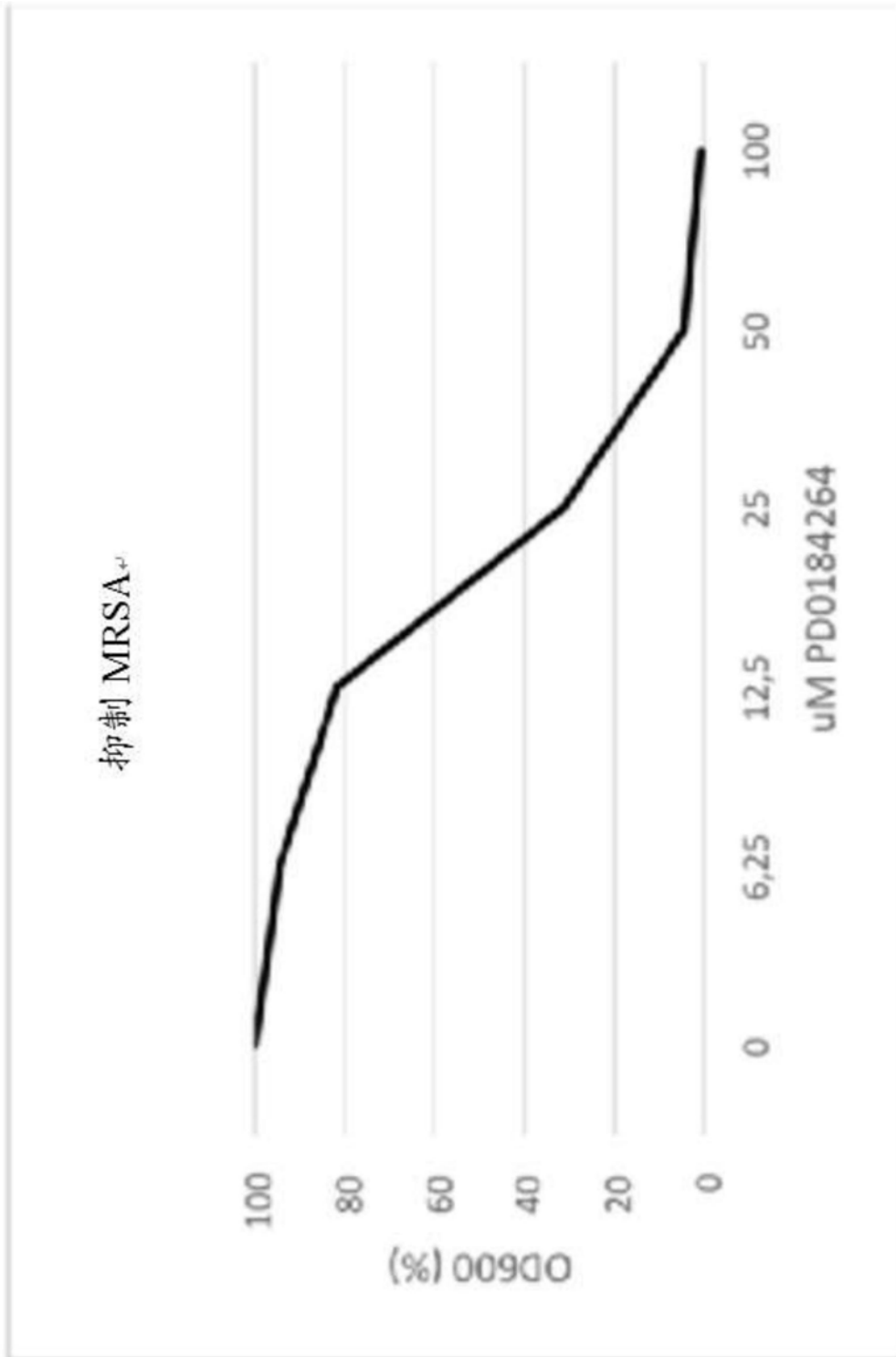


图3

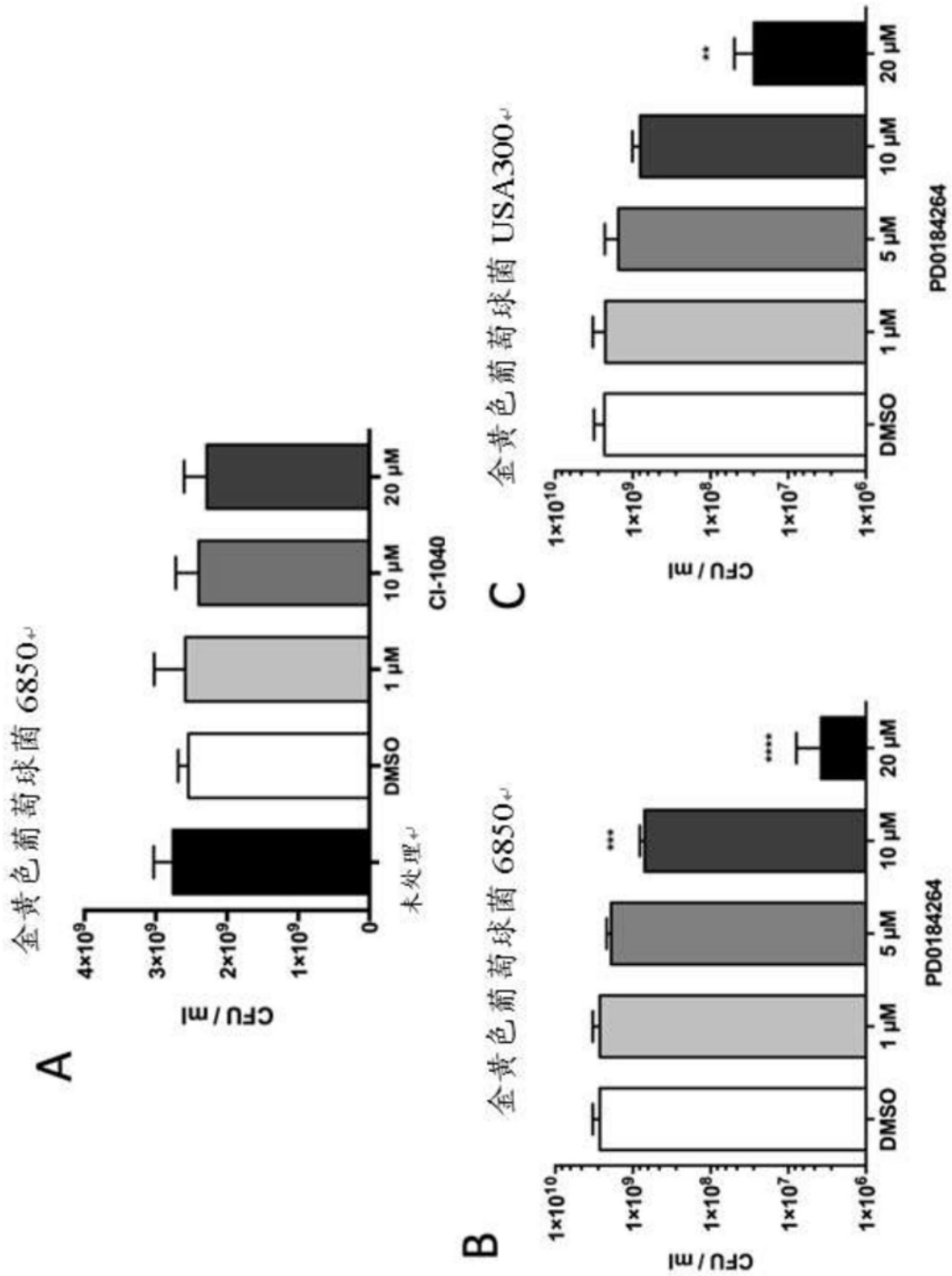


图4

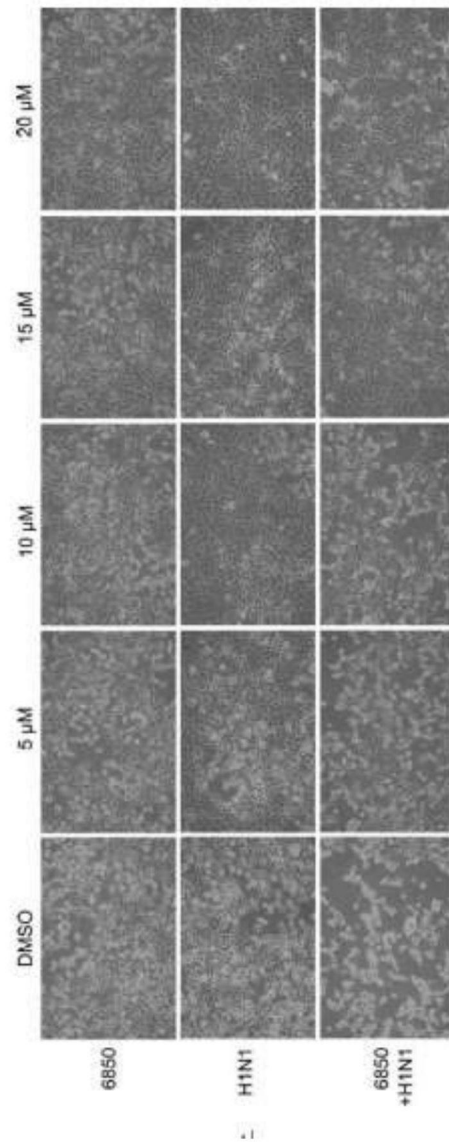
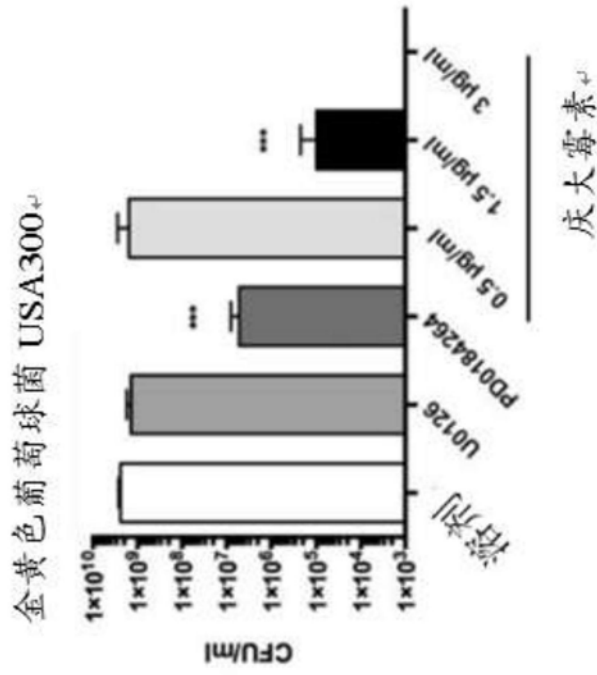
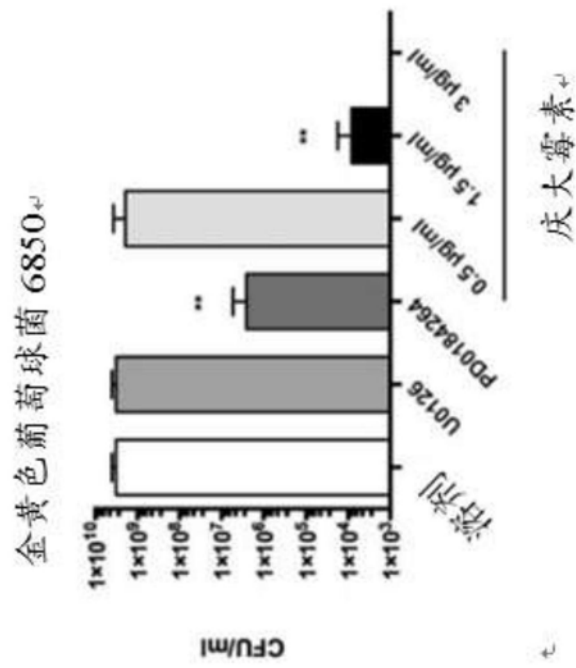


图5



七



七

图6

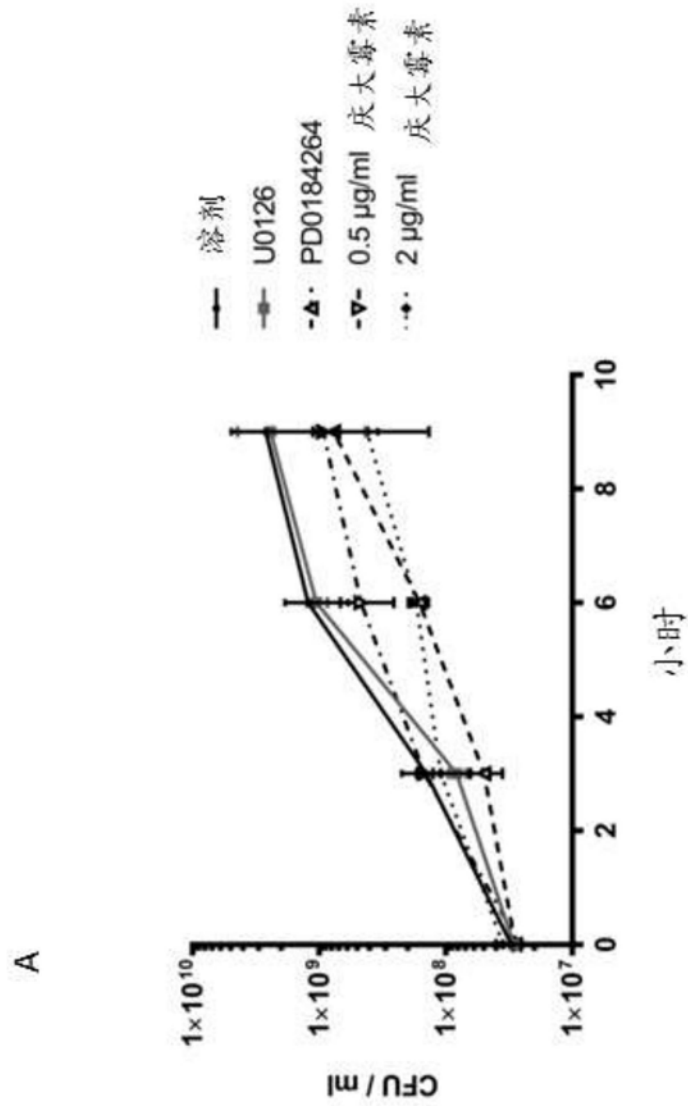


图7

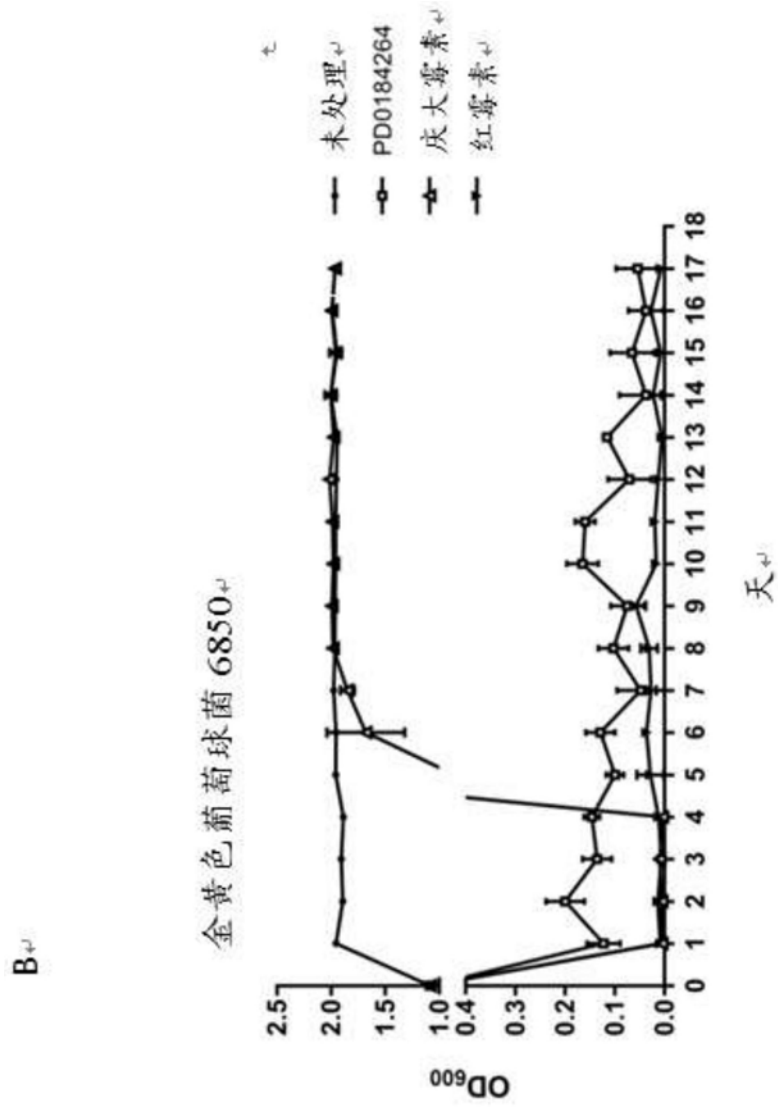


图7(续)

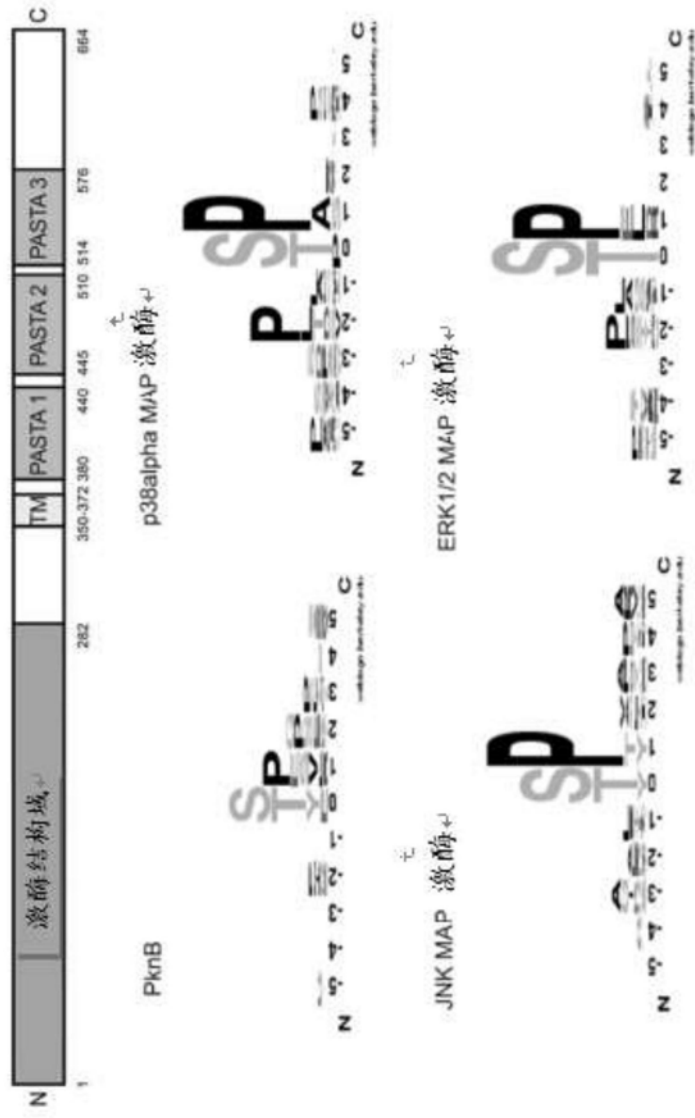


图8

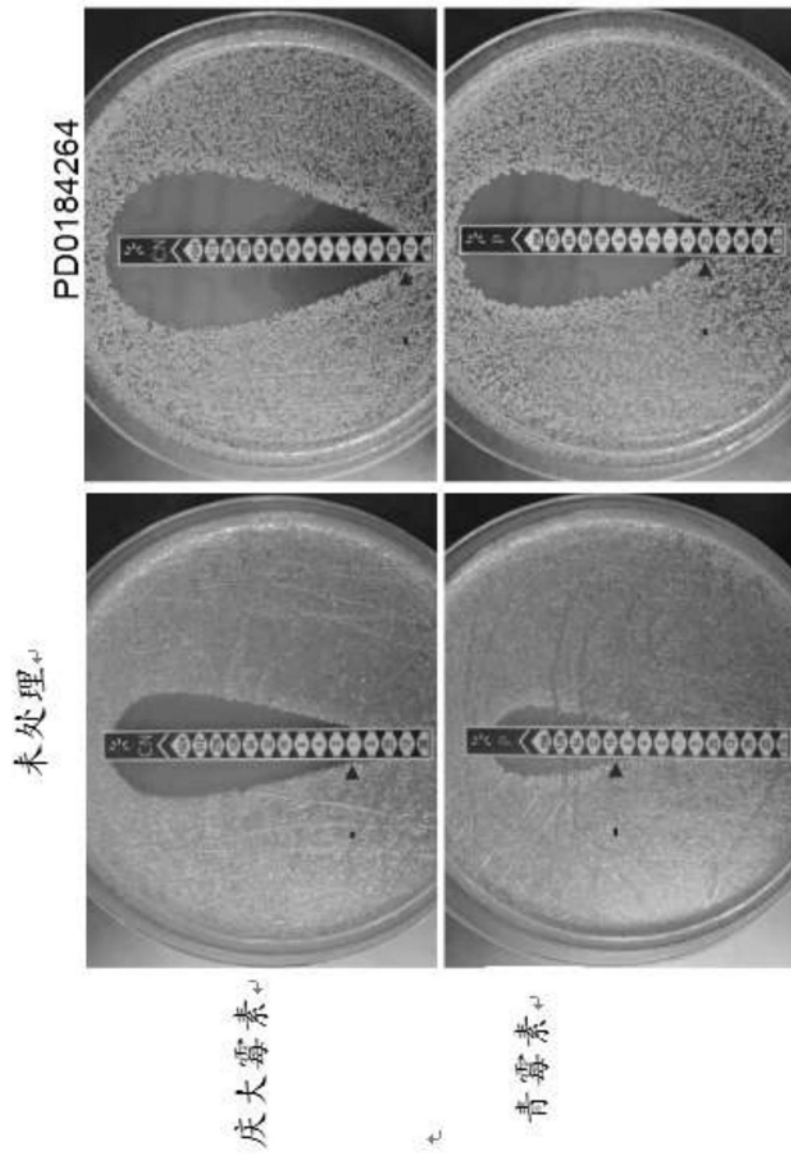


图9

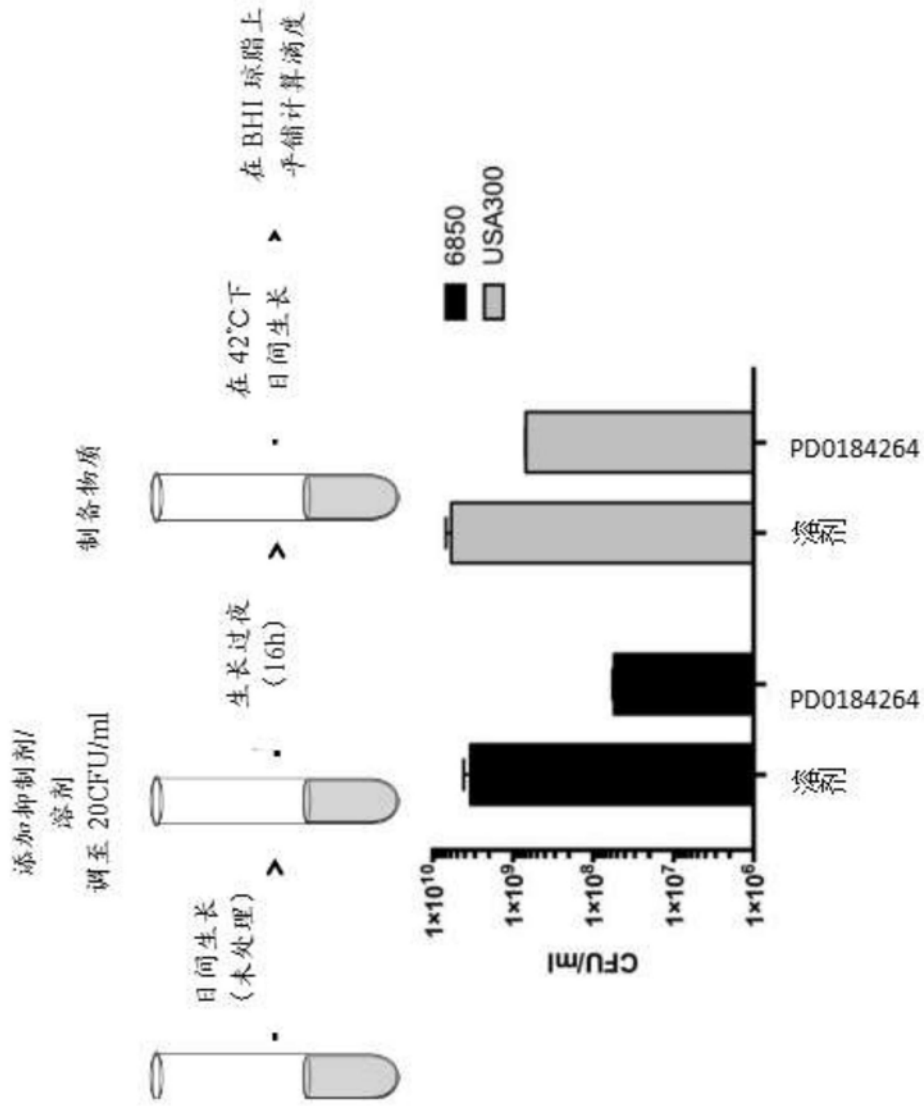


图10

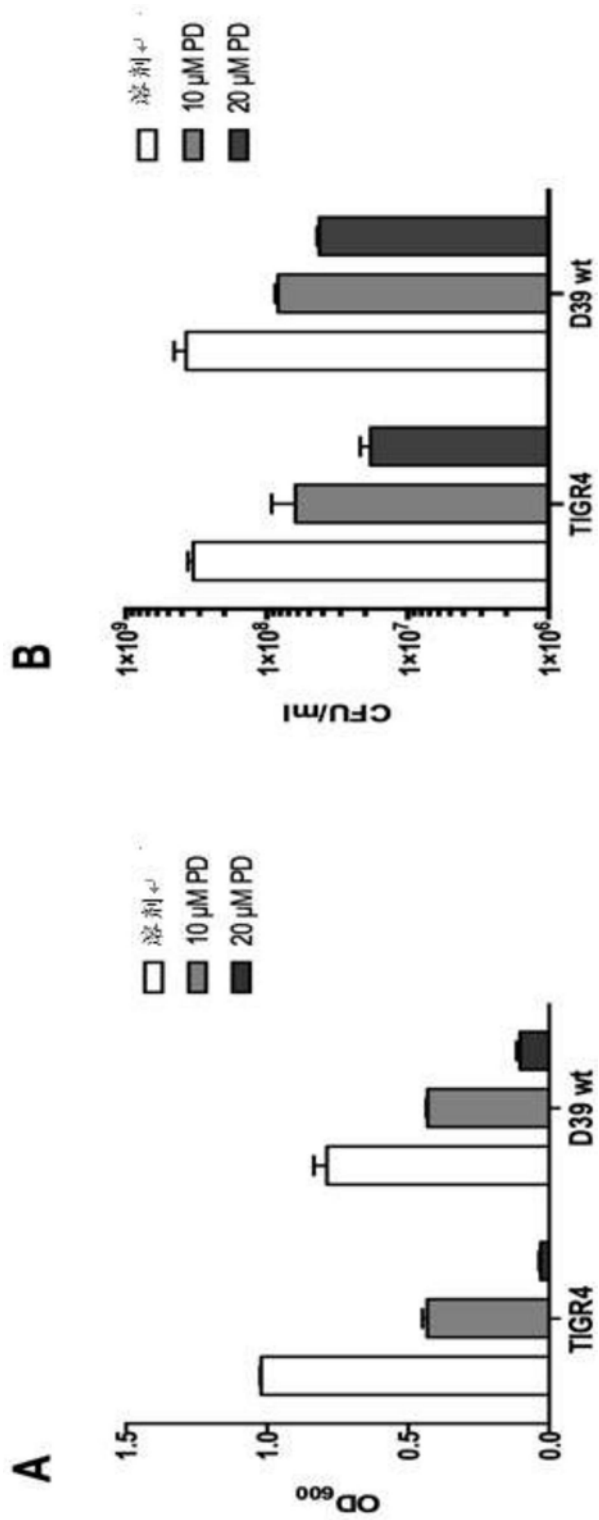


图11

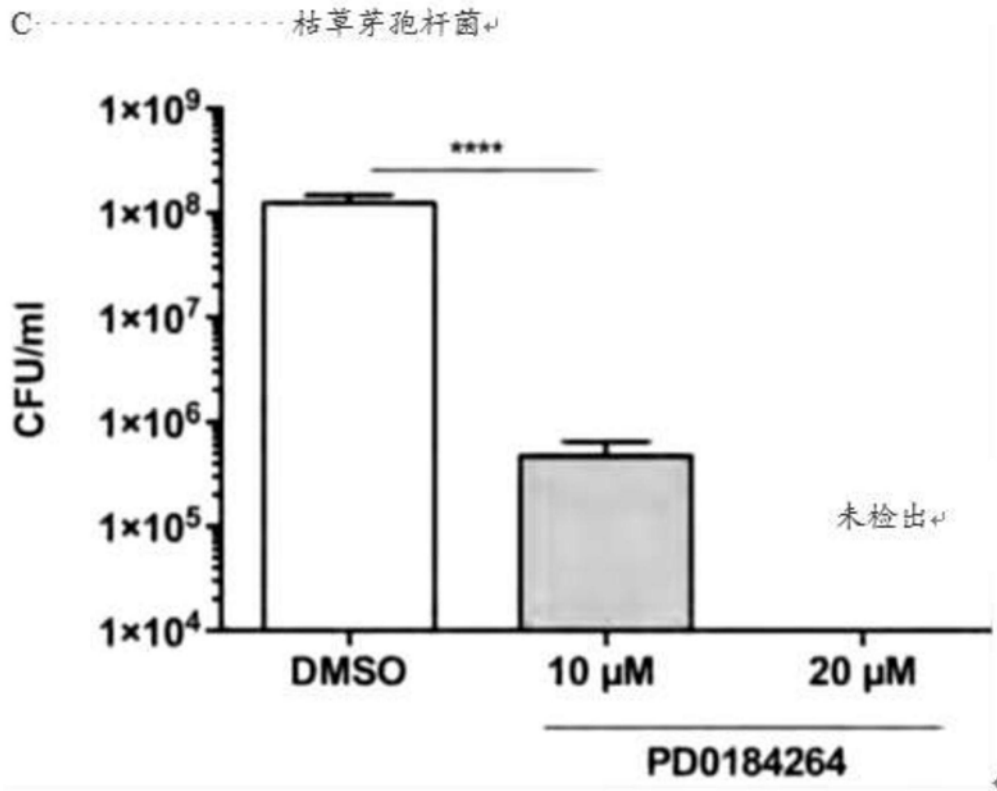


图11(续)

抗菌素种类	通用名
氨基糖苷类	阿米卡星、庆大霉素、卡那霉素、新霉素、茶替米星、妥布霉素、帕龙霉素，大观霉素
安沙霉素	格尔德霉素、赫比霉素、利福昔明、链霉素
碳头孢烯类	氯碳头孢
碳青霉烯类	厄他培南、多利培南、亚胺培南/西司他丁、美罗培南
头孢菌素类 (第一代)	头孢羟氨苄、头孢唑林、头孢噻吩 (Cefalotin) 或头孢噻吩 (Cefalothin)、头孢氨苄
头孢菌素类 (第二代)	头孢克洛、头孢孟多、头孢西丁、头孢丙烯、头孢呋辛
头孢菌素类 (第三代)	头孢克圪、头孢地尼、头孢地拖轮、头孢哌酮、头孢噻污、头孢泊污、头孢他啶、头孢布烯、头孢唑肟、头孢曲松
头孢菌素类 (第四代)	头孢吡肟
头孢菌素类 (第五代)	头孢洛林酯、头孢吡普
糖肽	替考拉丁、万古霉素、提拉万辛
林可酰胺类	克拉霉素、林可霉素
脂肽	达托霉素
大环内酯类	阿奇霉素、克拉霉素、地红霉素、红霉素、罗红霉素、曲林霉素、泰利霉素、螺旋霉素
单胺菌素	氨基曲南
硝基咪唑	咪唑唑酮、硝基咪唑妥因
恶唑烷酮	利奈唑胺、波西唑胺、雷德唑胺、托瑞唑胺
青霉素类	阿莫西林、氨苄西林、阿洛西林、羧苄西林、氯唑西林、双氯唑西林、氟氯西林、美洛西林、甲氧西林、奈西林、苯唑西林、青霉素 G、青霉素 V、哌拉西林、青霉素 G、替莫西林、替卡西林

图12(表1)

青霉素组合	阿莫西林/克拉维酸盐、氨苄西林/舒巴坦钠、哌拉西林/他唑巴坦、替卡西林/克拉维酸盐
多肽	杆菌肽、多粘菌素、多粘菌素 B
喹诺酮类/氟喹诺酮	环丙沙星、依诺沙星、加替沙星、双氟沙星、左氧氟沙星、洛美沙星、氧氟沙星、萘啶酸、诺氟沙星、氧氟沙星、曲伏沙星、格林帕沙星、司帕沙星、替莫沙星
磺胺类	磺胺米隆、磺胺乙酰胺、磺胺嘧啶、磺胺嘧啶银、磺胺二甲氧嘧啶、磺胺甲基噻唑、磺胺甲恶唑、磺胺酰亚胺（非通用，archaic）、柳氮磺吡啶、磺胺异恶唑、甲氧苄氨嘧啶-磺胺甲基异恶唑（复方新诺明）（TMP-SMX）、磺胺甲基孕酮（非通用，archaic）
四环素	脱霉菌环素、强力霉素、米诺环素、土霉素、四环素
溶血素	是一种拟葡萄球菌金属内肽酶。它可以作为抗金黄色葡萄球菌的抗菌剂。

图12(续/表1)

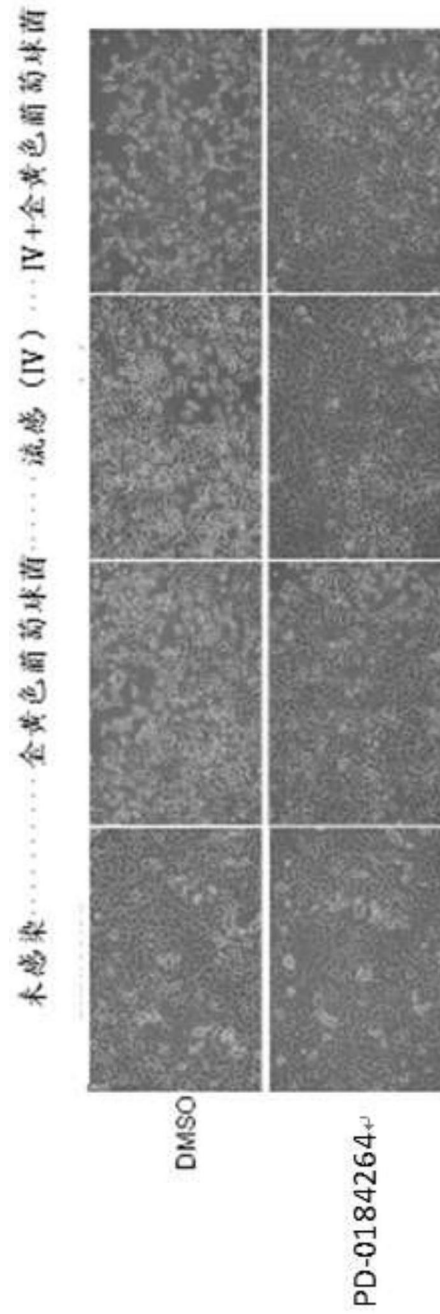


图13

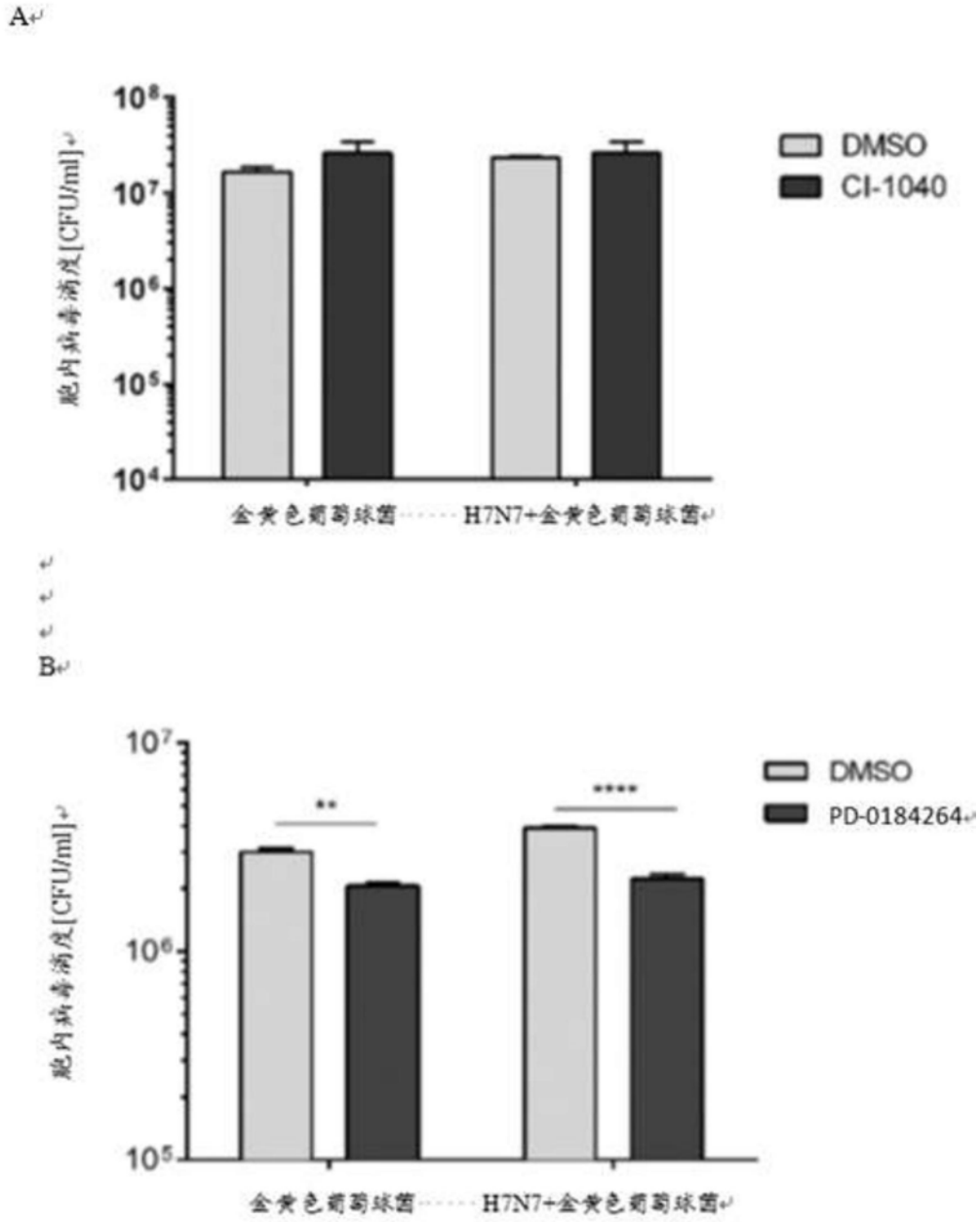


图14

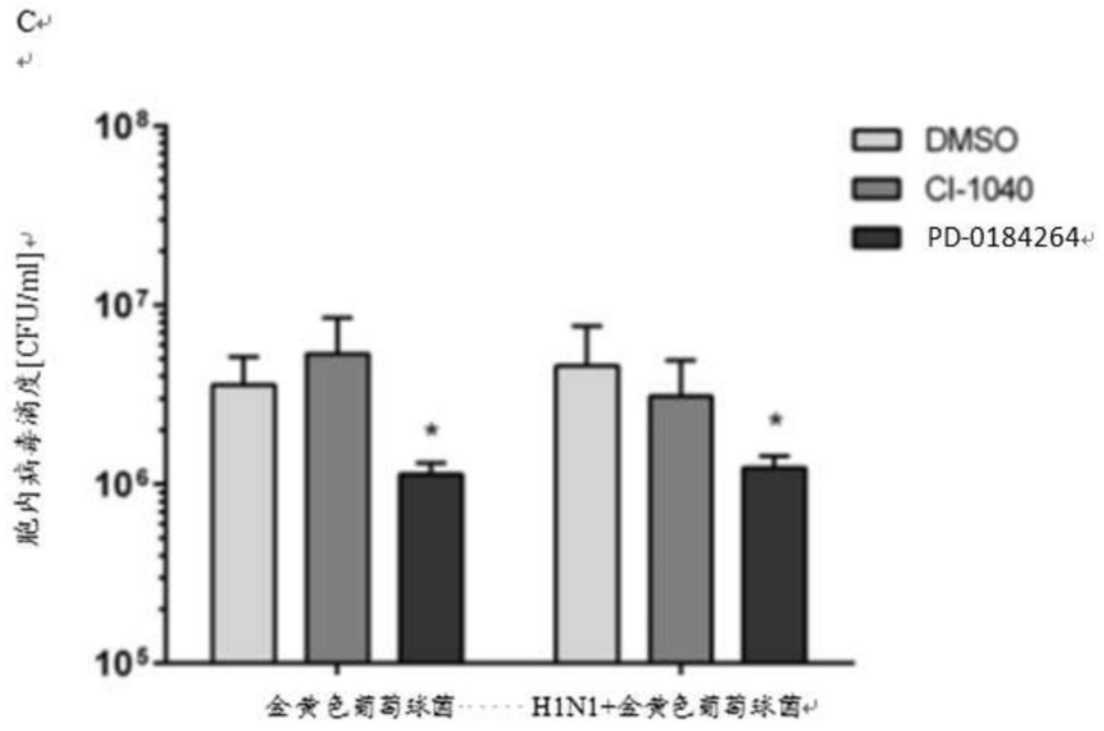


图14(续)

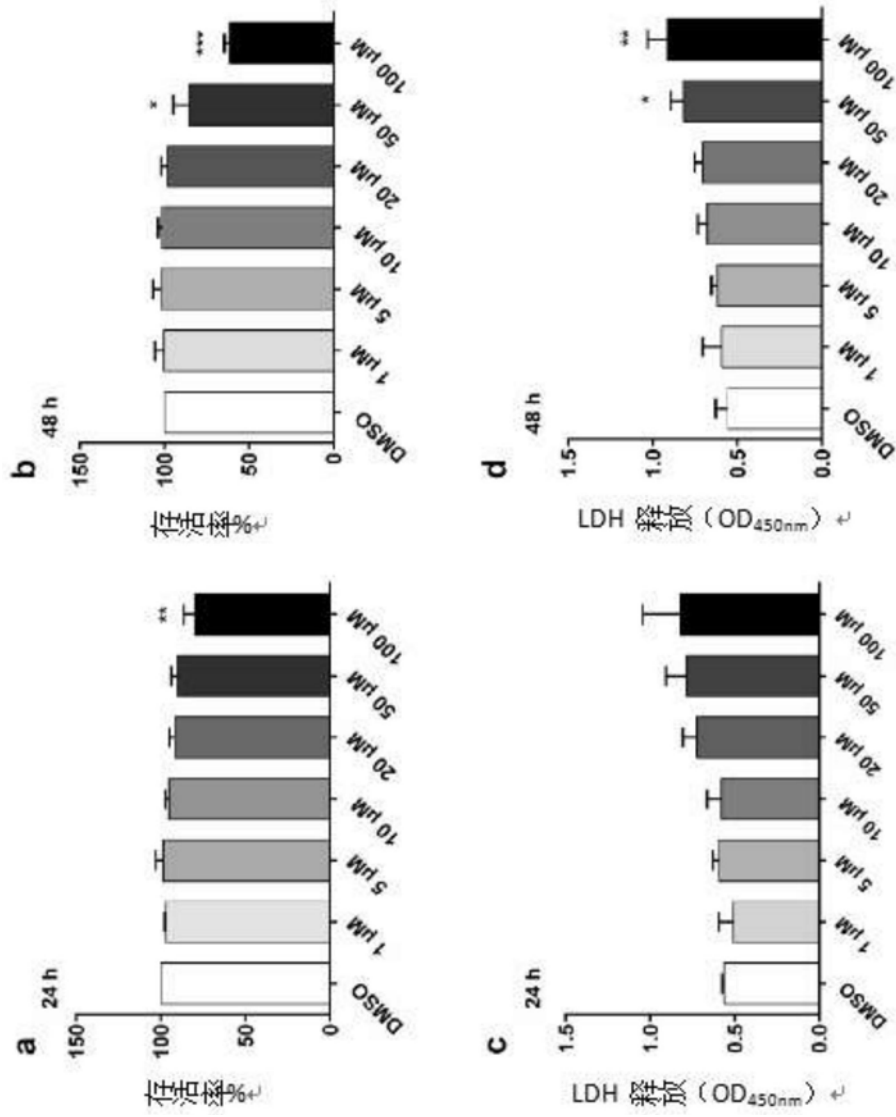


图15

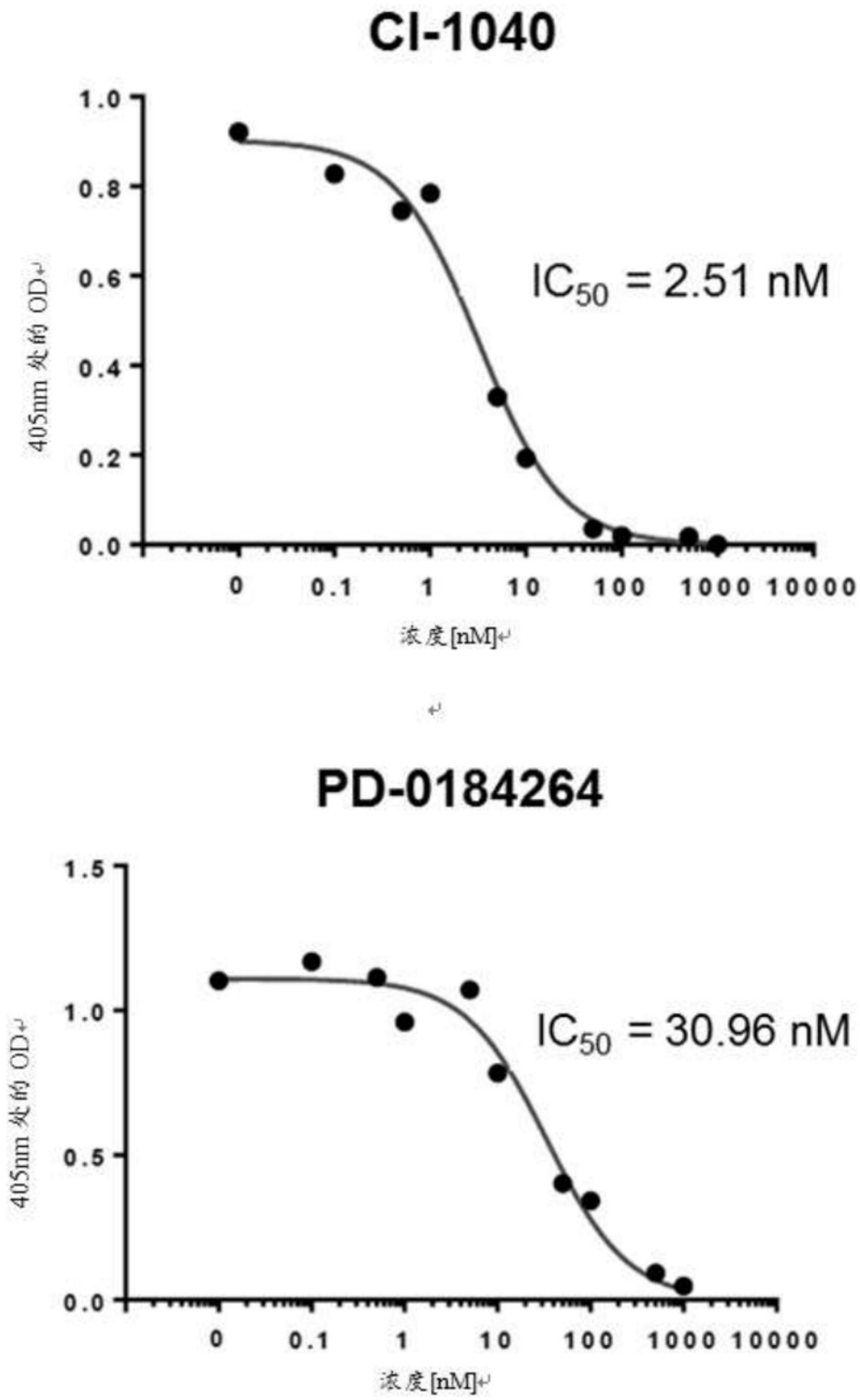


图16

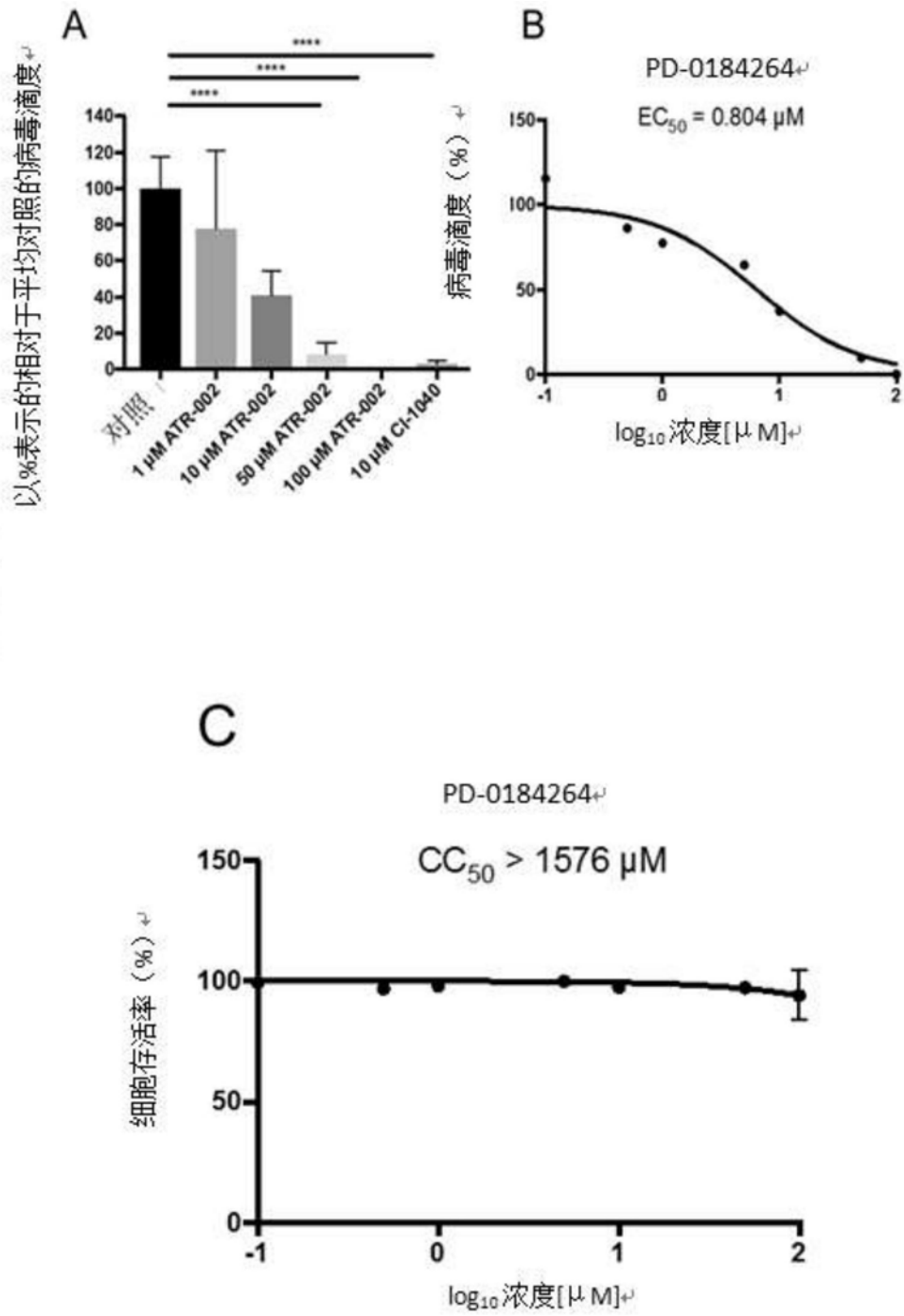


图17

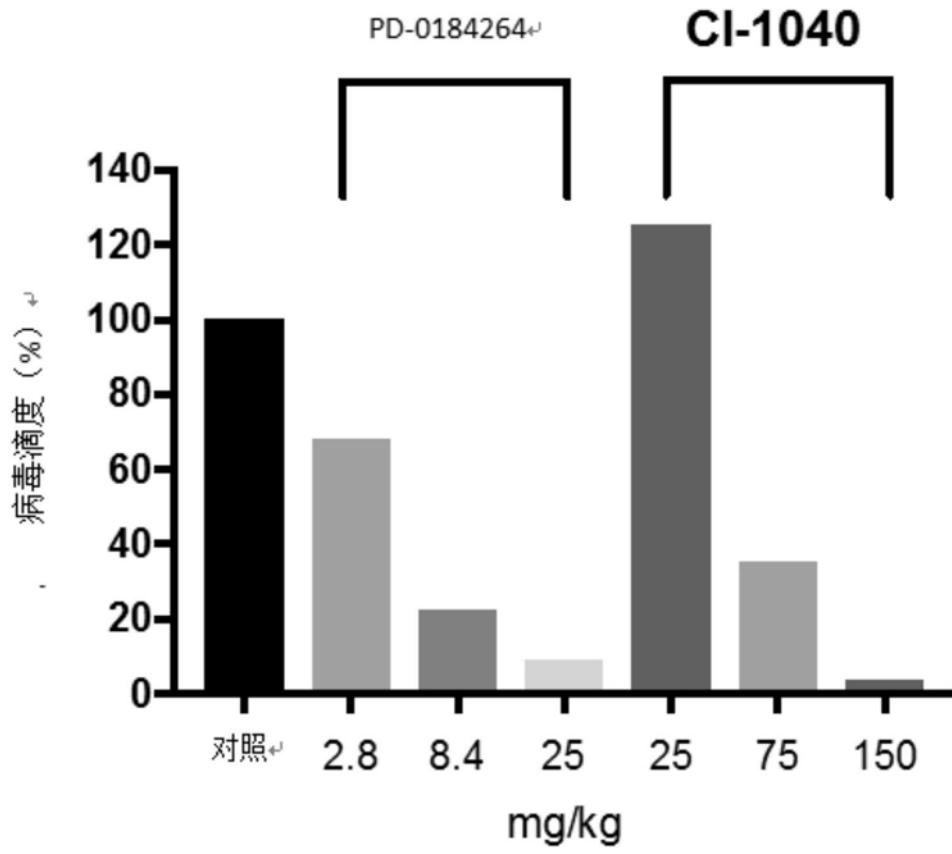


图18

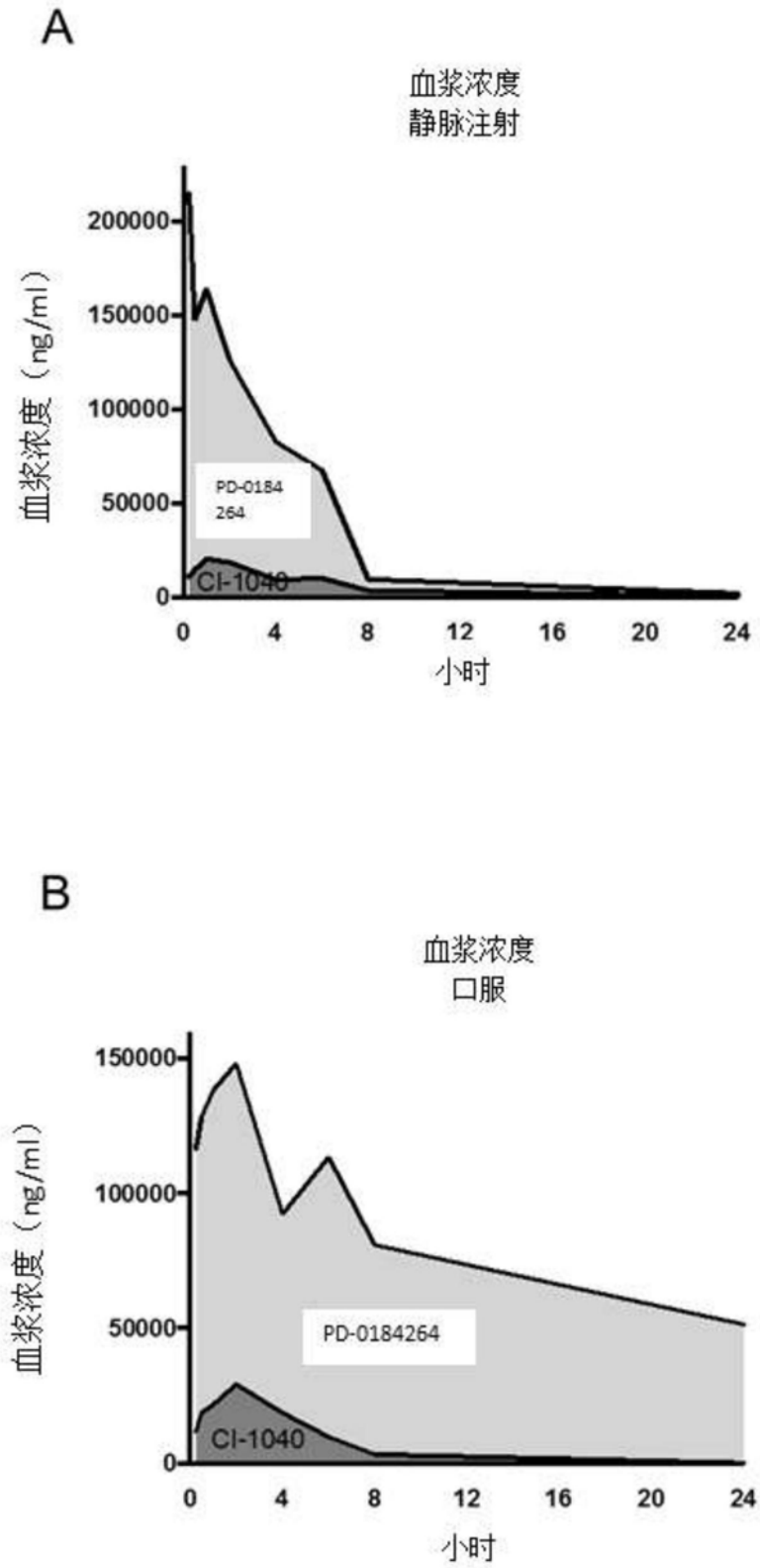


图19

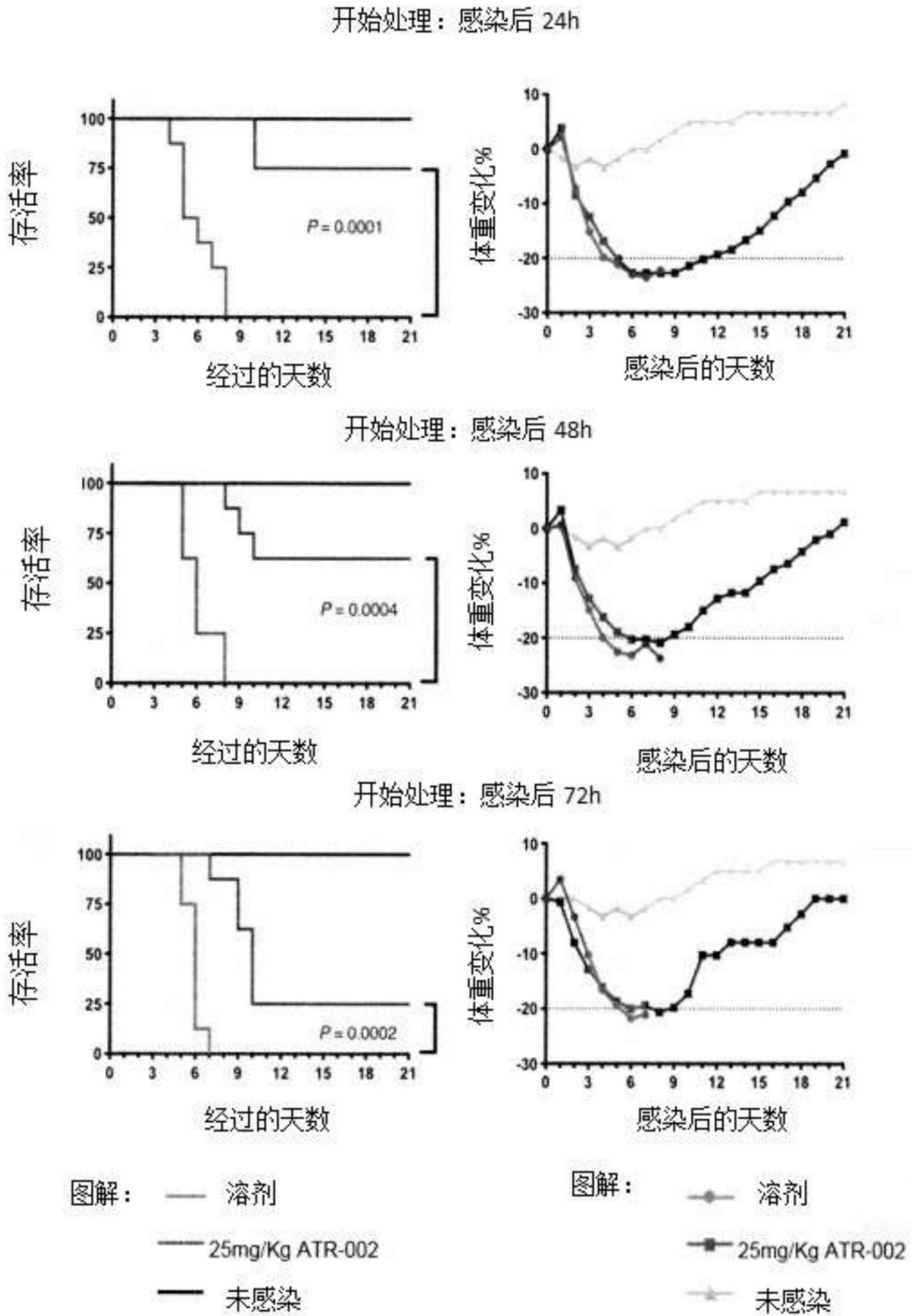


图20