

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 01810827. X

[51] Int. Cl.

A61K 31/352 (2006.01)

A61K 31/145 (2006.01)

A61K 31/166 (2006.01)

A61P 31/12 (2006.01)

A61P 31/14 (2006.01)

A61P 31/16 (2006.01)

[45] 授权公告日 2006 年 8 月 9 日

[11] 授权公告号 CN 1268329C

[22] 申请日 2001.4.5 [21] 申请号 01810827. X

[30] 优先权

[32] 2000. 4. 7 [33] DE [31] 10017480.9

[86] 国际申请 PCT/DE2001/001292 2001.4.5

[87] 国际公布 WO2001/076570 德 2001.10.18

[85] 进入国家阶段日期 2002.12.6

[71] 专利权人 麦丁诺瓦学术研究医疗革新有限责
任公司

地址 德国马堡

[72] 发明人 S·卢德维格 S·普莱施卡

审查员 王晶晶

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 张元忠 徐雁漪

权利要求书 1 页 说明书 9 页

[54] 发明名称

起 Raf/MEK/ERK 信号级联的级联抑制剂作用的物质在制备治疗 DNA 和 RNA 病毒感染的药物中的应用

[57] 摘要

本发明涉及起 Raf/MEK/ERK 信号级联的级联抑制剂、特别是 MEK 抑制剂作用的物质在制备用于预防和抗病毒治疗 DNA 和 RNA 病毒，特别是治疗核内复制型负链 RNA 病毒，例如流感病毒和博纳病病毒的药物中的应用。

1. MEK 抑制剂在制备用于预防或治疗人和动物中负链 RNA 病毒感染的药物中的应用。

2. 权利要求 1 的应用，其中所述应用是在制备用于治疗核内复制型负链 RNA 病毒感染的药物中的应用。

3. 权利要求 1 的应用，其中所述应用是在制备用于治疗流感病毒和博纳病毒感染的药物中的应用。

4. 权利要求 1 的应用，其中所述 MEK 抑制剂选自：

2-(2-氨基-3-甲氧基苯基)-4-氧代-4H-(1) 苯并吡喃，
U0126, PD18453 和 PD98059。

起 Raf/MEK/ERK 信号级联的级联抑制剂作用的物质
在制备治疗 DNA 和 RNA 病毒感染的药物中的应用

5 本发明是基于下述首次发现：感染核内复制型负链病毒，特别是甲型流感病毒和博纳病病毒(BDV)将导致 Raf/MEK/ERK 级联被激活，并且令人惊奇的是，抑制该级联，特别是通过 MEK 抑制剂抑制该级联可显著地抑制该类病毒的复制，同时对细胞没有毒性作用。

因此，抵抗其增殖取决于 Raf/MEK/ERK 级联活性的 DNA 和 RNA 病毒
10 的改进治疗优选将目标定在该信号传导路径上。已经发现，该信号传导路径可通过非毒性药理抑制剂来阻断。根据本发明，Raf/MEK/ERK 信号传导路径的无毒药理抑制剂是级联抑制剂，特别是 MEK 抑制剂。

现有技术

病毒感染对于人和动物的健康非常危险。特别是，甲型流感病毒
15 感染仍然是广泛的人类流行病，并且年复一年地不但导致很多死亡，而且还是整个经济的巨大费用成本的因素，例如由于疾病导致不能工作[12]。

博纳病病毒(BDV)感染具有同等严重程度的经济影响，其特别感染
20 马和绵羊，但是也已经从人中分离出了该病毒，并且与神经疾病有关[3, 13]。

控制 RNA 病毒的问题是由高误差比例的病毒聚合酶所引起的病毒
适应性，因此生产合适的疫苗以及开发抗病毒物质非常困难。

据表明，使用直接抗病毒功能的抗病毒物质将很快导致选择突变
25 后的抗药变种。这方面的一个实例是抗流感剂金刚烷胺及其衍生物，它们直接抗跨膜蛋白，并在少数继代内即已导致生成抗药变种。抑制流感病毒表面蛋白神经氨酸苷酶、并已经以商品名 RELANZA 由 Glaxo Wellcome 在德国销售的新的抗流感剂也已经在患者中产生了变种[10]。因此，对该治疗剂所寄予的希望不可能实现。

由于在大多数情况下具有小的基因组，和由此所导致的有限的编
30 码复制所需功能的能力，所有病毒都在很大程度上依赖其宿主细胞的功能。通过影响病毒复制所需的这样的细胞功能，能够给受感染细胞中的病毒复制带来负面影响。病毒不能通过适应来替代所缺少的细胞

功能。通过突变来逃避选择压力是不可能的。对于例如甲型流感病毒，具有抗细胞激酶和甲基转移酶的相对非特异性的抑制物质已显示了这一点[18]。

5 缺点，特别是这些抑制物质的缺点是，它们具有相对非特异性且宽谱的作用，并且它们的细胞攻击点仅是不充分地限定的。因此，它们不适于用作治疗剂。问题是：直到今天，没有在该点具有选择性作用，对细胞没有毒性，以及抑制病毒复制、特别是 RNA 病毒例如博纳病毒或甲型流感病毒复制的细胞酶的抑制物质。

关于病毒感染后引起的细胞过程，经发现有多种 DNA 和 RNA 病毒在受感染的宿主细胞中激活确定的信号转导途径，即所谓的 Raf/MEK/ERK 激酶级联[2, 4, 14, 17]。

该激酶级联属于细胞中最重要的信号途径，并且在增殖和分化过程中起重要作用。

生长因子引起的信号是通过顺序磷酸化从丝氨酸/苏氨酸激酶 Raf 传送到双重特异性激酶 MEK (MAP 激酶/ERK 激酶)，最后传递到激酶 ERK (细胞外信号调控的激酶)。虽然作为 Raf 的激酶底物，只有 MEK 是已知的，并且已经鉴定了唯一底物 MEK 的同种型 ERK，但是 ERK 可将多种底物磷酸化。至此为止属于例如转录因子的磷酸化，其导致细胞基因表达的直接修饰[5, 15, 20]。

20 关于细胞决定过程中的该信号途径的研究已经鉴定了几种在 MEK 水平上、即在该级联的“瓶颈”、在其他位置中抑制该信号传导途径的药理活性抑制剂[1, 5, 7, 9]。

MEK 抑制剂 PD98059 (2-2'-氨基-3'-甲氧基苯基)-氧杂萘-4-酮[7]通过激酶 Raf 抑制 MEK 的激活。

25 已经描述了 MEK 抑制剂 U0126 (1,4-二氨基-2,3-二氟基-1,4-二[2-氨基苯硫基]丁二烯)作为部分抑制 AP-1 依赖性基因表达的激活[9]和 T 细胞增殖[6]的物质。

与 PD98059 不同，U0126 不仅抑制 MEK 激活，还抑制该激酶自身的活性[8]。

30 最后，已经描述了 MEK 抑制剂 PD184352 (2-(2-氯-4-碘-苯基氨基)-N-环丙基甲氧基-3,4-二氟-苯甲酰胺) [19]，在小鼠模型中经口施用后，其可有效地抑制结肠癌生长，在最高达 6 g/kg 体重的累积剂

量下没有表现出任何显著的毒性征状。

发明目的

本发明是基于下述目的：提供用于预防或治疗核内复制型负链病毒的物质，这样的物质不是直接抗病毒的机能，而是选择性地抑制细胞酶，并经由该选择性作用抑制病毒复制。

令人惊奇的是，已经发现，该本发明目的可通过本发明级联抑制剂或特别是含有权利要求 1 的 MEK 抑制剂的药物来实现。

本发明级联抑制剂，特别是 MEK 抑制剂是其特征如下的物质：其在“Raf/MEK/ERK 激酶信号传导途径的抑制剂的级联测定”中在体外抑制该信号传导级联，并在“体内 MEK 和 MAP 激酶测定”中在体内抑制该信号传导级联。

Raf/MEK/ERK 激酶信号传导途径的抑制剂的级联测定

对于该级联测定，通过在 ERK 的 6x 组氨酸融合蛋白 (His-ERK) 和 MEK 的谷胱甘肽 S-转移酶融合蛋白 (GST-MEK) 存在下测定激酶介导的整合到髓鞘碱性蛋白 (MBP) 中的放射性 ^{32}P 来测定抑制剂对 Raf/MEK/ERK 信号传导途径的影响。

该反应混合物在 100 μl 的总体积内含有在 20 mM HEPES, pH 7.4、10 mM MgCl_2 、1 mM MnCl_2 、1 mM EGTA、和 50 mM ^{32}P - γ -ATP 的缓冲液中的重组蛋白。该反应在 30 $^\circ\text{C}$ 进行 15 分钟，并通过加入 20 μl 5 \times Laemmli 缓冲液来停止。通过 SDS-PAGE 分离出该放射性标记的蛋白，并通过磷图像 (Phosphoimagers) 使其可见。以 5-20 μM 的浓度测定级联抑制剂在该测定中的抑制能力。为了区别在该测定中的组合物是 MEK 抑制剂还是 ERK 抑制剂，在上述条件下，在不存在 GST-MEK 下，用 MBP 和 His-ERK 在第二个实验方法中测试物质。在第一个方法中有效、但是在第二个方法中没有任何作用的组合物是 MEK 抑制剂。在第二个方法中有效、但是在第一个方法中没有任何作用的组合物是 ERK 抑制剂。在这两个方法中都没有效，而在下面的体内 MEK 和 MAP 激酶测试中有效的物质是 Raf 抑制剂。所有描述的抑制剂根据本发明都是级联抑制剂。

体内 MEK 和 MAP 激酶测定

将细胞散布在 10 cm 培养皿中，并用 10% 胎牛血清生长至细胞培养基达到 80% 融合。将血清从细胞中除去，保持 8-12 小时。加入级

联抑制剂，特别是 MEK 抑制剂，30 分钟后，用例如 100 ng/ml TPA 或 100 ng/ml PDGF 对细胞进行致有丝分裂刺激。与致有丝分裂刺激剂培养 10 分钟后，用 PBS 洗涤细胞，并在三硝基甲苯溶解缓冲液 (20 mM Tris pH 7.4, 50 mM Na-β-甘油磷酸酯, 20 mM 焦磷酸钠, 137 mM NaCl, 5 10% (v/v) 甘油, 1% (v/v) 三硝基甲苯 X-100, 2 mM EDTA, 1 mM Pefabloc, 1 mM 钒酸钠, 5 mM 苜脒, 5 μg/ml 抑肽酶, 5 μg/ml 亮抑蛋白酶肽) 中溶解。用 MEK 特异性抗血清将内源性 MEK 从这些细胞裂解物中免疫沉淀出来，并在 32P-γ-ATP、0.1 mM ATP 和作为底物蛋白的重组激酶失活 His-ERK K>M 存在下，在 10 mM MgCl₂、25 mM β-甘油磷酸酯、25 mM HEPES pH 7.5、5 mM 苜脒、0.5 mM DTT 和 1 mM 钒酸钠的缓冲液中于 30°C 在免疫复合物激酶测定中培养 15 分钟。同时用 ERK 特异性抗血清将内源性 ERK 从该裂解物中免疫沉淀出来，并在与 MEK 相同的条件下用纯化的 MBP 培养。在 SDS-PAGE 凝胶上分离蛋白，并通过磷图像显形。在该测定中，级联抑制剂，特别是 MEK 抑制剂以抑制途径作用于 MEK 激活 (如通过 His-ERK K>M 的磷酸化测定的) 以及 ERK 激活 (如通过 MBP 的磷酸化测定的)。

级联抑制剂、特别是 MEK 抑制剂的本发明应用特别涉及下列物质：

- a) 2-(2-氨基-3-甲氧基苯基)-4-氧代-4H-(1) 苯并吡喃 (还描述在 WO 98/37881 中)
- 20 b) 1,4-二氨基-2,3-二氧基-1,4-二[2-氨基苯硫基]丁二烯 (简称 U0126)
- c) 2-(2-氯-4-碘-苯基氨基)-N-环丙基甲氧基-3,4-二氟-苯甲酰胺 (简称 PD18453)
- d) 2-(2'-氨基-3'-甲氧基苯基)-氧杂萘-4-酮 (简称 PD98059)
- 25 e) 特征如下的物质：起着本发明级联抑制剂的作用，并特别源自丁二烯衍生物或黄素衍生物或苯甲酰胺衍生物类化学物质，
- f) 起级联抑制剂、特别是 MEK 抑制剂作用的上述物质的所有衍生物，
- g) 起级联抑制剂、特别是 MEK 抑制剂作用的其它物质 (在 [11, 16] 意义上，上述组合物或其衍生物的前期物质、盐或“前药”，其在关于 Raf/MEK/ERK 信号途径抑制剂的级联测定或“体内 MEK 和 MAP 激酶测定”中的有效性得到证实)。
- 30

本发明涉及这些物质作为用于感染 DNA 或 RNA 病毒，特别是核内

复制型负链 RNA 病毒例如甲型流感病毒或博纳病病毒的患者的药物的应用。

在另一类型本发明应用中，其提出使用包含这些物质的药物来预防 DNA 或 RNA 病毒，特别是核内复制型负链 RNA 病毒例如甲型流感病毒和博纳病病毒感染。

术语患者涉及人和脊椎动物。因此本发明药物可用于人和脊椎动物。本发明治疗有效物质作为可药用组合物的一部分对患者给药，所述组合物呈经口、直肠、非胃肠道-静脉内、肌内或皮下、脑池内、阴道内、腹膜内、血管内、局部(粉剂、膏剂或滴剂)或喷雾给药的形式。

可药用组合物可包含作为盐、酯、酰胺和“前药”的修饰形式，只要在可靠的医药评价后它们不引起患者的过度毒性、刺激性或过敏反应即可。

术语“前药”是指为了被更好地接受而转化的、例如在血液中通过水解而转化的组合物。[11]和[16]中给出了前药的详细讨论。

用于局部施用本发明组合物的剂型包括膏剂、粉剂、喷雾剂或吸入剂。按照需要，在无菌条件下将活性组分与生理可接受载体和可能的防腐剂、缓冲剂或驱动物质混合。

实施例

实施例 1 表明，对于 MEK 抑制剂 U0126，随着细胞培养基中 U0126 浓度的增加，新产生的感染性甲型流感病毒颗粒的数目显著减少。

为了使甲型流感病毒增殖，在具有相同细胞数目的平行实验中，将允许真核细胞培养物(Madine-Darby 犬肾(MDCK)细胞)用生理盐溶液洗涤，并用等量的感染性甲型流感病毒干 WSN-HK (具有 7 个流感干 A/WSN/33 基因片段和流感干 A/HK/8/68 的 NA 基因的重配物(Reassortante))以 0.0025 个感染性病毒颗粒/细胞的比例于室温感染 1 小时。

感染前 30 分钟，将 MDCK 细胞在不同浓度下与 MEK 抑制剂 U0126 (0 μ M、30 μ M、40 μ M、50 μ M，溶解在 DMSO 中)作用的适当细胞培养基中于 37 $^{\circ}$ C 和 5% CO₂ 条件下培养。作为溶剂参照，将 MDCK 细胞与具有相应不同量的 DMSO 的细胞培养基培养。在感染期间，将相应浓度的 MEK 抑制剂 U0126 或作为溶剂的 DMSO 加到接种物中。

然后取出接种物,将感染的细胞在不同浓度下与 MEK 抑制剂 U0126 (0 μM 、30 μM 、40 μM 、50 μM , 溶解在 DMSO 中)作用的适当细胞培养基中于 37 $^{\circ}\text{C}$ 和 5% CO_2 条件下培养 48 小时。作为溶剂参照,将 MDCK 细胞与具有相应不同量的 DMSO 的细胞培养基培养。感染 24 小时后,取出 200 μl 培养基上清液,向该培养基上清液中再加入相同体积的含有抑制剂或 DMSO 的细胞培养基。48 小时后,再取样。使用测定血细胞凝集单位量(HA 效价)(代表病毒颗粒的总产量)和新生成的感染性病毒颗粒量(针对 MDCK 细胞的噬斑测定)的常规病毒法检测各样本的细胞培养物上清液在 24 和 48 小时的值。

从结果中可以看出,在这样的实验中,与不使用 MEK 抑制剂 U0126 的参照或溶剂参照相比,随着 MEK 抑制剂 U0126 浓度的增加,细胞培养基中新生成的感染性病毒颗粒的数目显著减少(对于 50 μM U0126, 约 80%)。对用相应浓度的 DMSO 或溶解在 DMSO 中的 MEK 抑制剂 U0126 处理的 MDCK 细胞进行的目视检验以及通过二碘化丙锭染色进行的细胞毒性测定表明,溶剂和抑制剂对细胞都没有显著的细胞毒害作用。

实施例 2 表明,随着细胞培养基中 MEK 抑制剂 U0126 浓度的增加,新产生的感染性博纳病毒颗粒的数目也显著减少。

将用抑制剂预处理的细胞用 BDV 感染,并在对着病毒核蛋白的间接免疫荧光法中观察感染的展开。一次施用 25 μM MEK 抑制剂(U0126)后,培养 7 天后看不见任何病毒灶,仅看得见单个的未感染细胞。施用 12.5 μM 激酶抑制剂(U0126)后,该作用不清楚,施用 6 μM 激酶抑制剂(U0126)后,与未处理的感染对照细胞相比,没有发现任何病毒灶的不同。因此,抑制剂以剂量依赖方式作用于病毒复制水平。

MEK 抑制剂 U0126 在所述应用中的抑制作用表明级联抑制剂、特别是 MEK 抑制剂可用作特别是抗流感病毒和博纳病毒的抗病毒剂,但是也可以抗其中病毒复制依赖于 Raf/MEK/ERK 级联活性的 RNA 和 DNA 病毒。依据本发明,在本文中,信号传导途径是抗病毒治疗的目标,并且优选使用无毒的药理活性级联抑制剂、特别是 MEK 抑制剂。

参考文献

[1] Alessi, D. R., Cuenda, A., Cohen, P., Dudley, D. T., 和 Saltiel, A. R. (1995). PD 098059 是促分裂原活化蛋白激酶激活的体外和体内特异性抑制剂. *J. Biol. Chem.* 270, 27489-27494.

- [2] Benn, J., Su, F., Doria, M., 和 Schneider, R. J. (1996). 乙肝病毒 Hex 蛋白通过激活细胞外信号调控和 c-Jun N-末端促分裂原活化蛋白激酶来诱导转录因子 AP-1. *J. Virol.* 70, 4978-4985.
- [3] Bode, L., Zimmermann, W., Ferszt, R., Steinbach, F., 和 Ludwig, H. (1995). 博纳病病毒基因组在精神病患者中的转录和表达[参见备注]. *Nat Med* 1, 232-6.
- [4] Bruder, J. T., 和 Kovesdi, I. (1997). 腺病毒感染刺激 Raf/MAPK 信号传导途径并引起白介素-S 表达. *J. Virol.* 71, 398-404.
- 10 [5] Cohen, P. (1997). 关于哺乳动物细胞中 MAP 和 SAP 激酶的生理底物的研究. *Trends in Cell Biol.* 7, 353-361.
- [6] DeSilva, D. R., Jones, E. A., Favata, M. F., Jaffee, B. D., Magolda, R. L., Trzaskos, J. M., 和 Scherle, P. A. (1998). 抑制促分裂原活化蛋白激酶阻断 T 细胞增殖, 但是不引起或预防无变
- 15 应性. *J. Immunol.* 160, 4175-4181.
- [7] Dudley, D. T., Pang, L., Decker S. J., Bridges, A. J., 和 Saltiel, A. R. (1995). 一种促分裂原活化蛋白激酶级联的合成抑制剂. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 7686-7689.
- [8] Duncia, J. V., Santella, J. B. r., Higley, C. A., Pitts, W. J., Wityak, J., Frietze, W. E., Rankin, F. W., Sun, J. H., Earl, R. A., Tabaka, A. C., Teleha, C. A., Blom, K. F., Favata, M. F., Manos, E. J., Daulerio, A. J., Stradley, D. A., Horiuchi, K., Copeland, R. A., Scherle, P. A., Trzaskos, J. M., Magolda, R. L., Trainor, G. L., Wexler, R. R., Hobbs, F. W., 和 Olson, R. E. (1998). MEK 抑制剂: U0126、其类似物、和环合产物的化学和生物活性. *Bioorg Med Chem Lett* 8, 2839-44.
- 20 [9] Favata, M. F., Horiuchi, K. Y., Manos, E. J., Daulerio, A. J., Stradley, D. A., Feeser, W. S., Van Dyk, D. E., Pitts, W. J., Earl, R. A., Hobbs, F., Copeland, R. A., Magolda, R. L., Scherle, P. A., 和 Trzaskos, J. M. (1998). 鉴定新的促分裂原活化蛋白激酶抑制剂. *J. Biol. Chem.* 273, 18623-18632.
- 30 [10] Gubareva, L. V., Matrosovich, M. N., Brenner, M. K.,

- Bethell, R. C., 和 Webster, R. G. (1998). 关于 zanamivir 在感染乙型流感病毒的免疫缺陷儿童中的抗性的证据. *J Infect Dis* 178, 1257-62.
- [11] Higuchi, T., 和 Stella, V. (1987). 用作新的给药系统的前药. In A. C. S. Symposium Series.
- [12] Lamb, R. A., and Krug, R. M. (1996). Orthomyxoviridae: 病毒及其复制. In *Fields Virology*, B. N. e. a. Fields, ed. (Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers), pp. 1353-1395.
- [13] Planz, O., Rentzsch, C., Batra, A., Winkler, T., Buttner, M., Rziha, H. J., and Stitz, L. (1999). 博纳病病毒致病机理: 在缺乏抗病毒抗体情况下精神病患者庇护感染性病毒的粒细胞片断. *J Virol* 73, 6251-6.
- [14] Popik, W., 和 Pitha, P. M. (1998). 作为对猴免疫缺陷病毒与 Jurkat T 细胞表达 CCR5 受体结合的反应, 促分裂原活化蛋白激酶、细胞外信号调控激酶、p38 促分裂原活化蛋白激酶、和 c-Jun N-末端激酶的早期激活. *Virology* 252, 210-217.
- [15] Robinson, M. J., 和 Cobb, M. H. (1997). 促分裂原活化蛋白激酶途径. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9, 180-186.
- [16] Roche, E. B. E. (1987). 药物设计中的生物可逆载体, E. B. Roche, ed.: American Pharmaceutical Association and Pergamon Press.
- [17] Rodems, S. M., 和 Spector, D. H. (1998). 在人巨细胞病毒感染期间, 细胞外信号调控激酶活性在早期得以维持. *J. Virol.* 72, 9173-9180.
- [18] Scholtissek, C., 和 Muller, K. (1991). 用抑制剂量的 3-去氨杂腺苷和 H7 治疗后没有获得流感病毒的抗药变种. *Arch Virol.* 119, 111-118.
- [19] Sebolt-Leopold, J. S., Dudley, D. T., Herrera, R., Van Becelaere, K., Wiland, A., Gowan, R. C., Tecle, H., Barrett, S. D., Bridges, A., Przybranowski, S., Leopold, W. R., 和 Saltiel, A. R. (1999). 阻断 MAP 激酶途径抑制了体内结肠肿瘤的生长. *Nature Med.* 5, 810-816.

[20] Treisman, R. (1996). 通过 MAK 激酶剂量的转录调控. *Curr. Opin. Cell Biol.* 8, 205-215.