

(21)申請案號：103127581

(22)申請日：中華民國 102 (2013) 年 01 月 09 日

(51)Int. Cl. : C07C317/36 (2006.01)

A61K31/145 (2006.01)

A61P31/16 (2006.01)

(71)申請人：國立交通大學(中華民國) NATIONAL CHIAO TUNG UNIVERSITY (TW)

新竹市大學路 1001 號

(72)發明人：楊進木 YANG, JINN MOON (TW)；許凱程 HSU, KAI CHENG (TW)

(74)代理人：陳昭誠

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：4 項 圖式數：6 共 60 頁

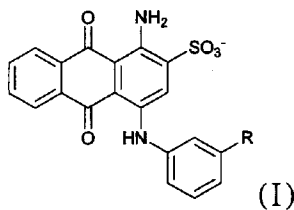
(54)名稱

化合物在製備神經氨酸酶抑制劑之用途

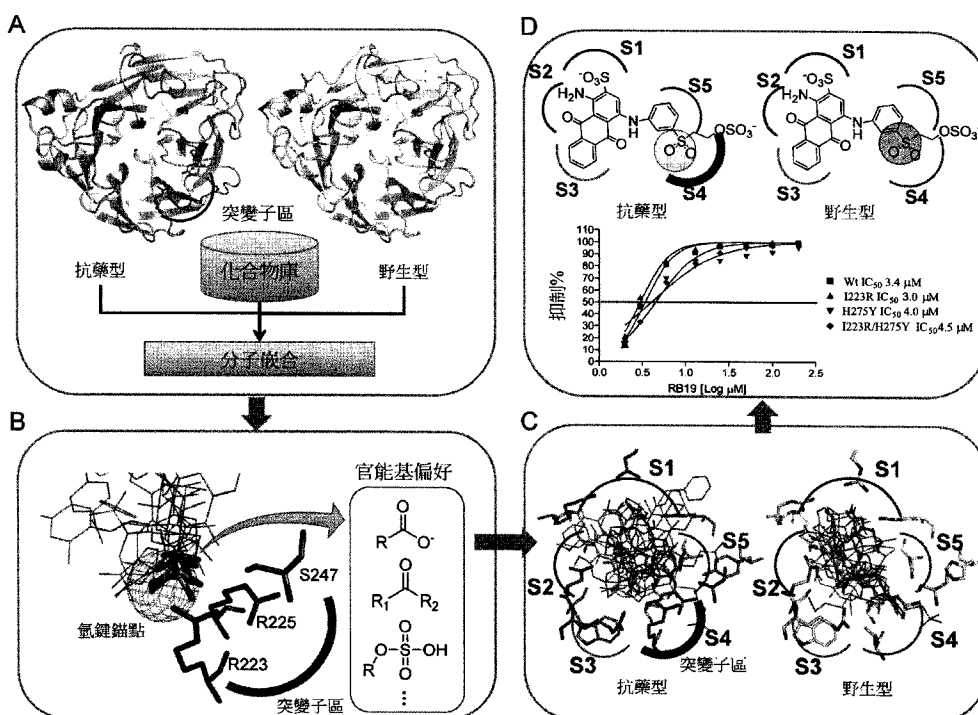
USES OF COMPOUNDS FOR PREPARING A NEURAMINIDASE INHIBITOR

(57)摘要

本發明提供一種式(I)化合物的用途，其係用於製備神經氨酸酶抑制劑：



且其中該神經氨酸酶包括野生型神經氨酸酶及突變型神經氨酸酶。本發明進一步提供式(I)化合物於製備治療流行性感冒藥物之用途。



第1圖

## 發明摘要

※申請案號：

103127581 (由102100677分割)

※申請日：

102.1.9

※IPC分類：

C07C 317/36 (2006.01)

A61K 31/145 (2006.01)

A61P 31/16 (2006.01)

【發明名稱】(中文/英文)

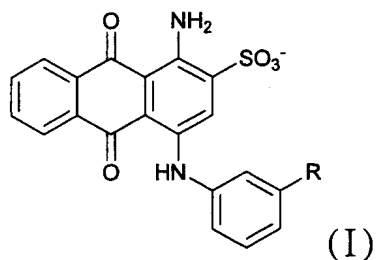
化合物在製備神經氨酸酶抑制劑之用途

USES OF COMPOUNDS FOR PREPARING A

NEURAMINIDASE INHIBITOR

【中文】

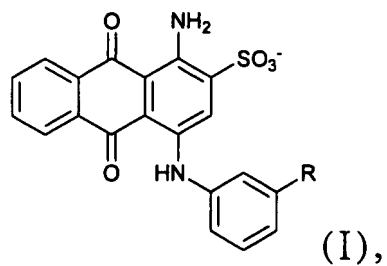
本發明提供一種式(I)化合物的用途，其係用於製備神經氨酸酶抑制劑：



且其中該神經氨酸酶包括野生型神經氨酸酶及突變型神經氨酸酶。本發明進一步提供式(I)化合物於製備治療流行性感冒藥物之用途。

【英文】

The present invention provides uses of compounds of formula (I) for preparing a neuraminidase inhibitor:



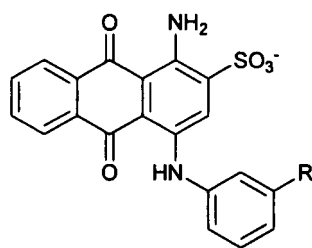
in which the neuraminidase includes a wide type neuraminidase and a mutant type neuraminidase. The present invention further provides uses of compounds of formula (I) for preparing a drug for treatment of influenza.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（1）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：無。

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：



(I)

# 發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

## 【發明名稱】(中文/英文)

化合物在製備神經氨酸酶抑制劑之用途  
USES OF COMPOUNDS FOR PREPARING A  
NEURAMINIDASE INHIBITOR

## 【技術領域】

本發明係關於一種藥物篩選方法，尤其是，一種針對野生型與突變型標靶之平行藥物篩選方法。

## 【先前技術】

流行性感冒病毒簡稱為流感病毒，是一種會造成人類或動物急性呼吸道感染的核糖核酸(ribonucleic acid, RNA)病毒。在分類學上，流感病毒屬於正黏液科病毒(Orthomyxoviridae)，依核心蛋白(nucleoprotein)與基質蛋白(matrix protein)之序列，主要可分為 A、B 及 C 三型，其中 A 型流感病毒的致病率最高。2009 年 4 月，全球爆發了豬源 A 型 H1N1 流感病毒(swine-origin influenza A (H1N1) virus, S-OIV)引起的新亞型流感，此突變種 A 型流感病毒基因包括人類流感病毒、豬流感病毒及禽流感病毒基因片段，且至今仍在流行。

神經氨酸酶(neuraminidase, NA)是存在於流感病毒外套膜(envelope)表面上的一種醣蛋白，在病毒進行複製感染的過程中，可協助成熟流感病毒脫離宿主細胞感染新的細胞，故在流感病毒的擴散中扮演重要角色。因此，神經氨酸酶已成為開發抗流感藥物的重要標靶之一。目前臨床上

常使用的抗流感藥物瑞樂沙(zanamivir, Relenza®)和克流感(oseltamivir, Tamiflu®), 便屬於神經氨酸酶抑制劑, 可用於防止病毒的擴散, 達到抗流感的效果。然而, 瑞樂沙及克流感價格昂貴; 並且, 由於流感病毒具有易突變之特性, 已經發現對瑞樂沙、克流感產生抗藥性, 甚至具有多重抗藥性之突變型病毒株。舉例而言, 已有報導關於 NA 的許多突變, 有些會改變結合區的特性並破壞藥物結合。例如, H275Y, 其為常見的抗藥突變, 它會使 GS4071 活性大幅降低。另一個例子為 I223R 與 H275Y 雙突變, 它會使得瑞樂沙活性降低約 20 倍, 使得 GS4071 活性降低約 29,915 倍。因此, 透過有效的藥物篩選方法, 尋求對野生型及突變型(抗藥型)標靶同時具有抑制活性之藥物, 實為目前亟欲解決的課題。

### 【發明內容】

一種藥物篩選方法, 包括: 從化合物數據庫篩選出能與野生型標靶結合的第一群化合物; 自該第一群化合物中篩選出能與突變型標靶之突變區(mutant site)結合的第二群化合物; 分析該野生型標靶及該突變型標靶之結合區(binding site)的特徵, 以獲得該結合區之物化特性(physico-chemical properties); 根據該結合區之物化特性, 自該第二群化合物中確認出候選藥物; 以及, 對該候選藥物進行抑制活性之生物分析。

根據一具體實施例, 係利用分子嵌合工具從化合物數據庫篩選出該第一群化合物。根據一具體實施例, 係利用

分子嵌合工具，自該第一群化合物中篩選出該第二群化合物。

根據一具體實施例，該候選藥物係能與該野生型標靶及該突變型標靶結合。於一具體實施例中，該候選藥物係對該野生型標靶及該突變型標靶有抑制潛力。

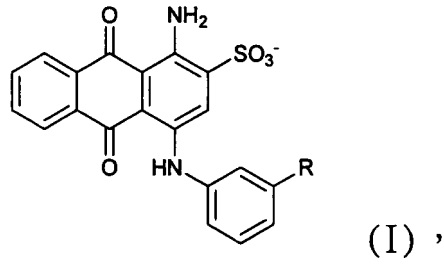
根據一具體實施例，係將由分子嵌合工具獲得之第二群化合物與該結合區之嵌合模型用於分析該結合區的特徵。根據一具體實施例，分析該結合區的特徵係藉由區域官能基地圖呈現。於一具體實施例中，係將由分子嵌合工具獲得之第二群化合物與該結合區之嵌合模型用於分析該結合區的特徵，並建立區域官能基地圖。於一具體實施例中，係利用由分子嵌合工具獲得之第二群化合物與該結合區之嵌合模型，並藉由區域官能基地圖，分析該結合區的特徵。

根據一具體實施例，該野生型標靶及該突變型標靶為酵素。於一具體實施例中，該突變型標靶之突變區位於該突變型標靶之結合區。於一具體實施例中，該野生型標靶及該突變型標靶為神經氨酸酶。於一具體實施例中，該突變型標靶為突變型神經氨酸酶，該突變型神經氨酸酶之突變區位於其結合區。根據一具體實施例，該野生型標靶及該突變型標靶為神經氨酸酶，該藥物係用以抑制神經氨酸酶。於一具體實施例中，該藥物係用以治療與神經氨酸酶相關之疾病或異常。

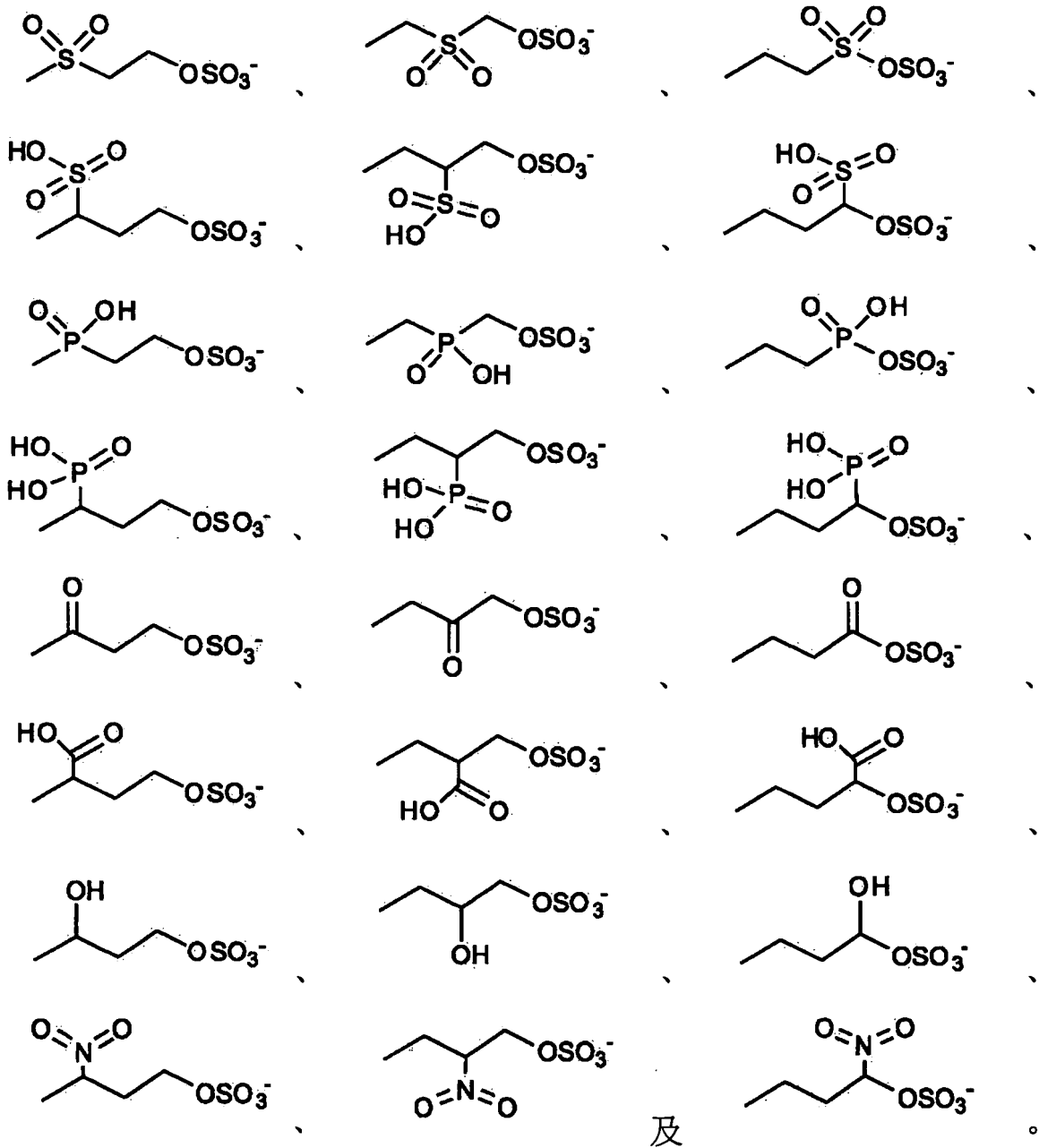
根據本案之藥物篩選方法，能有效篩選同時能抑制突

變型標靶和野生型標靶(抗藥型標靶)的化合物。

一種式(I)化合物用於製備神經氨酸酶抑制劑之用途

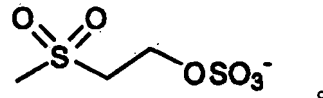


式中，R 係選自下列者所組成之群組：



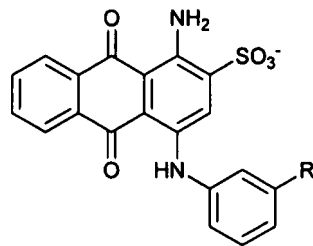


於一具體實施例中，R 係



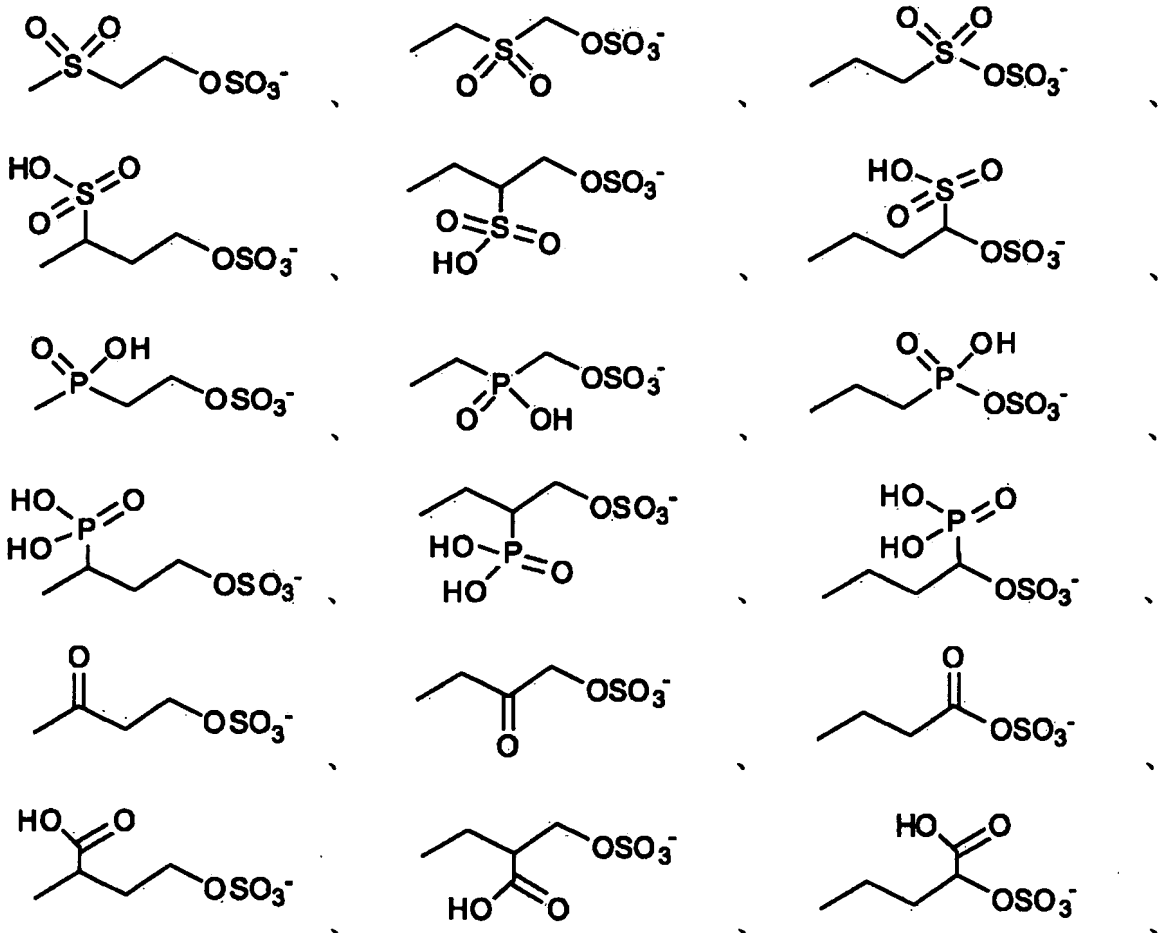
根據一具體實施例，該神經氨酸酶包括野生型神經氨酸酶及突變型神經氨酸酶。

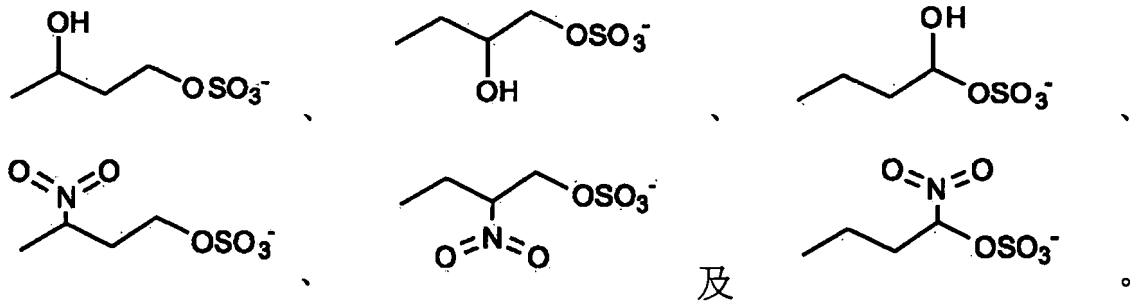
一種式(I)化合物用於製備治療流行性感冒之藥物之用途



(I),

式中，R 係選自下列者所組成之群組：

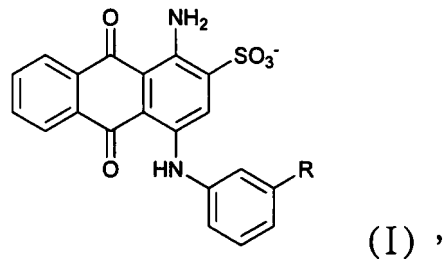




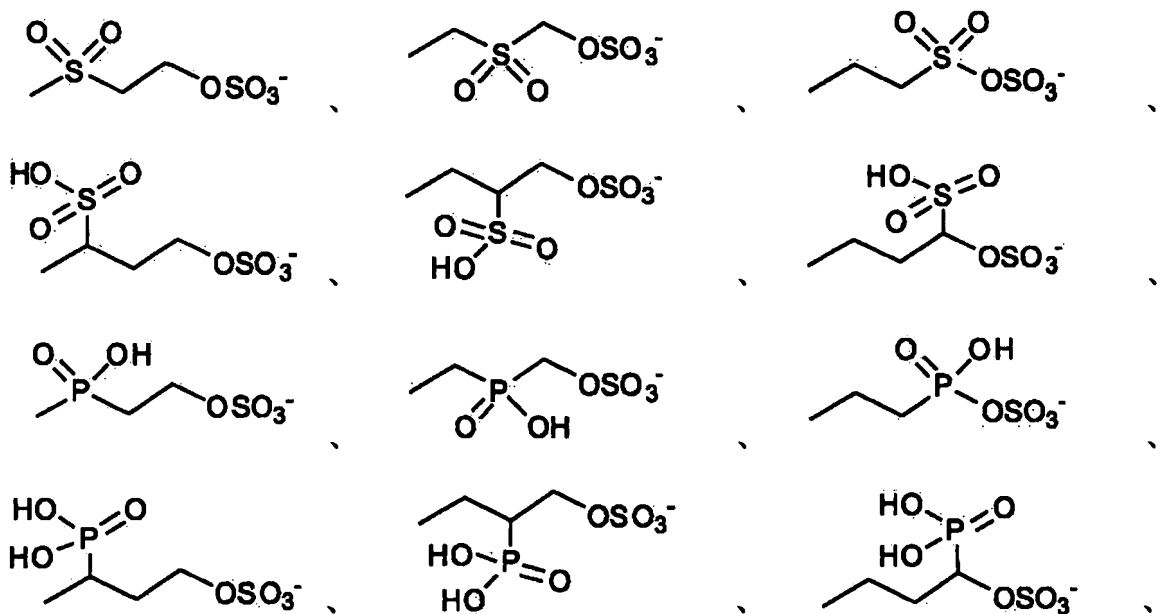
於一具體實施例中，R 係 。

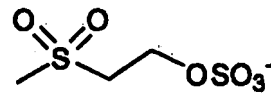
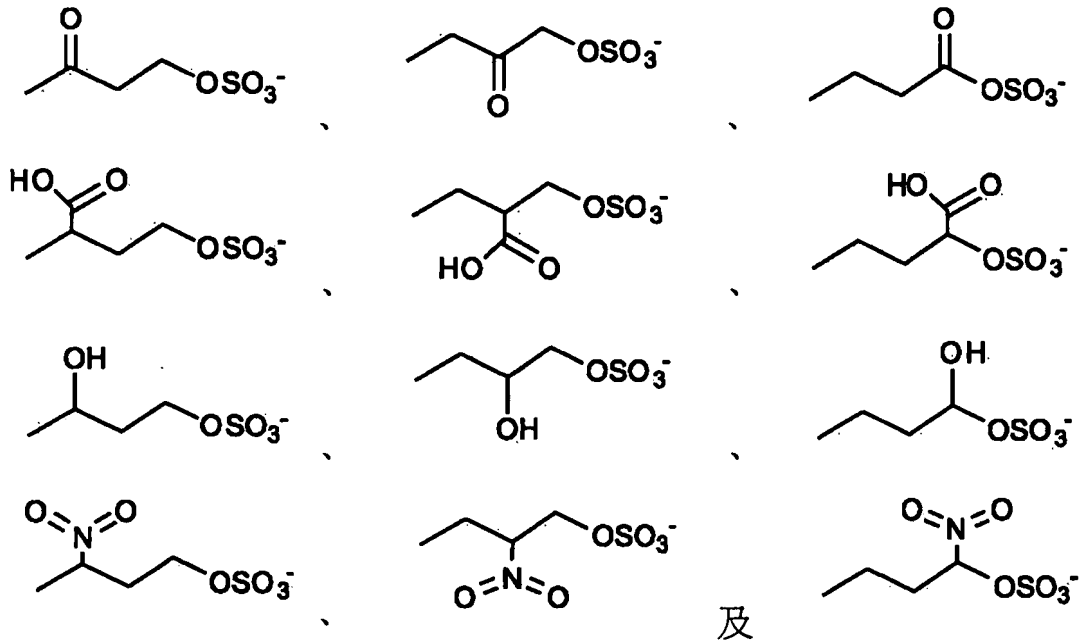
根據一具體實施例，該神經氨酸酶包括野生型神經氨酸酶及突變型神經氨酸酶。

一種抑制神經氨酸酶之方法，包括對個體投予醫療有效量之式(I)化合物



式中，R 係選自下列者所組成之群組：

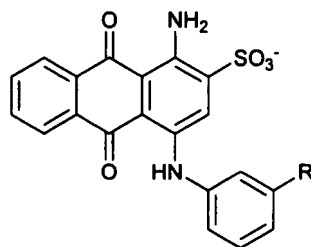




於一具體實施例中，R 係

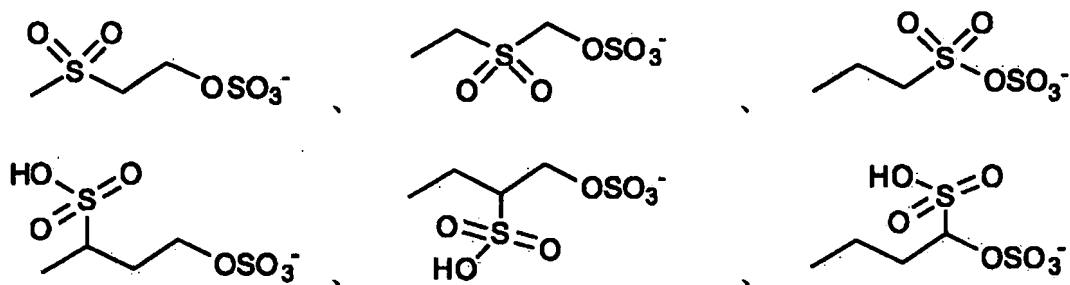
根據一具體實施例，該神經氨酸酶包括野生型神經氨酸酶及突變型神經氨酸酶。

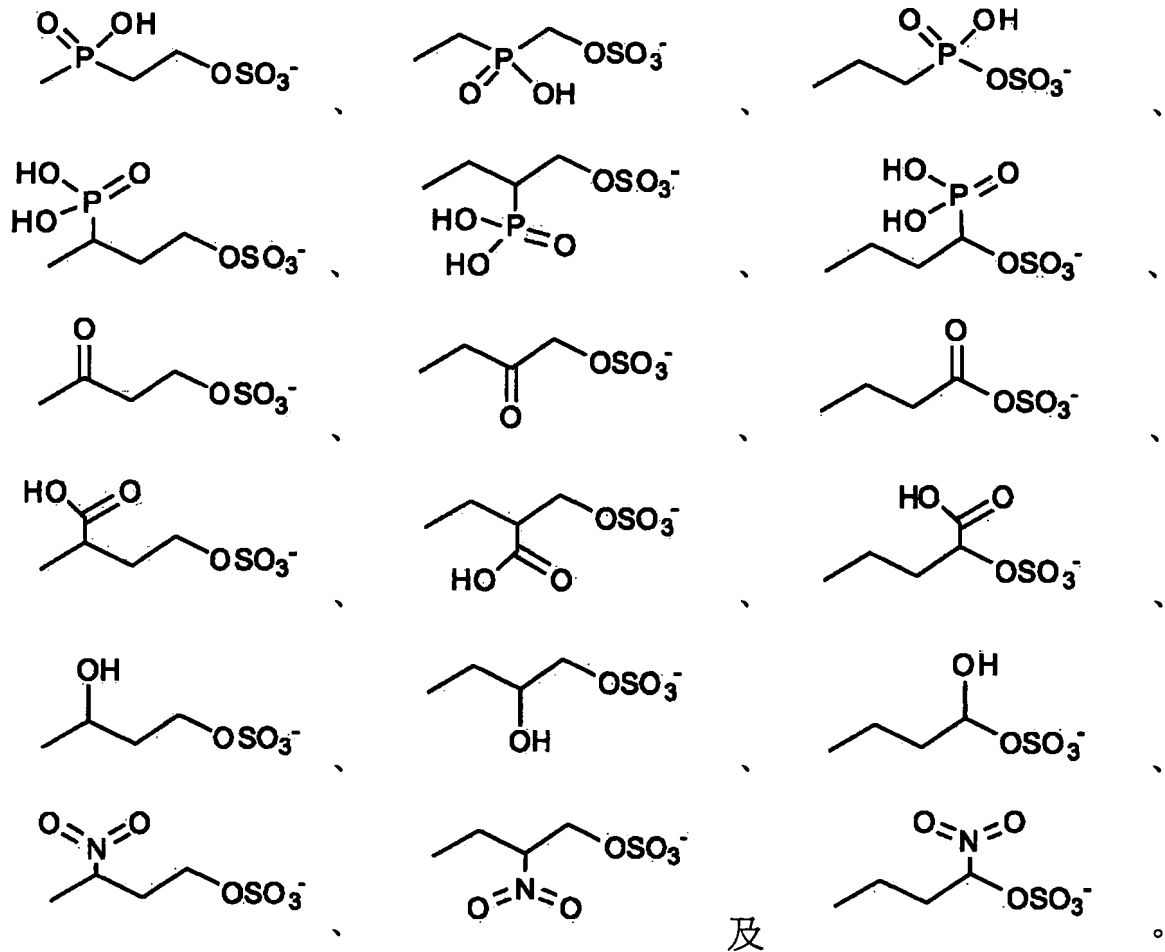
一種治療流行性感冒之方法，包括對個體投予醫療有效量之式(I)化合物

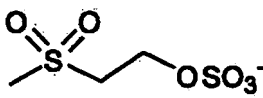


(I)，

式中，R 係選自下列者所組成之群組：





於一具體實施例中，R 係 。

根據一具體實施例，式(I)化合物對神經氨酸酶具有抑制活性。於一具體實施例中，該神經氨酸酶包括野生型神經氨酸酶及突變型神經氨酸酶。

### 【圖式簡單說明】

第 1 圖 係根據一具體實施例之平行篩選策略之流程圖。(A)平行篩選 WT NA 和 MDR NA 之抑制劑。使用 GEMDOCK 將化合物庫之化合物嵌合至 WT NA 及 MDR NA。(B)使用區域官能基地圖分析(特徵化)結合區(包括突變子區)。在 NA 之區域官能基地圖中，氫鍵錨點表示與極性官能基交互作用的極性環境。(C)選擇潛力抗藥型抑制

劑。選出同時與 WT NA 和 MDR NA 之 5 個子區之特徵匹配的化合物。(D)進行生物分析以驗證所選出的化合物對 WT NA 和 MDR NA 之效果；

第 2 圖 係根據一具體實施例之 WT NA 和 MDR NA 的特徵比較之示意圖。(A)抗藥型(MDR) NA 之結合區殘基；(B)野生型(WT) NA 之結合區殘基。結合區分為 5 個子區 S1 ( R118, R293 和 R368 )、S2( E119, D151, W179 和 E228 )、S3 ( R152, W179 和 I223 )、S4 ( I223, R225 和 S247 ) 以及 S5 ( S247 和 E277 )，這些殘基係出現於 N1 系列；(C)抗藥型(MDR) NA，靜電力勢能呈現之分子表面；(D)野生型(WT) NA，靜電力勢能呈現之分子表面；

第 3 圖 係根據一具體實施例之突變子區(A)和 WT 之子區(B)中的殘基、官能基偏好和交互作用類型之錨點的示意圖。錨點包括保留的交互作用殘基、官能基偏好和交互作用類型。氫鍵錨點表示突變子區為極性且偏好與極性官能基形成氫鍵。反之，WT 之子區具有凡得瓦力錨點；

第 4 圖 係根據一具體實施例之 RB19、瑞樂沙和 GS4071 之結合構型比較的示意圖。(A)RB19 在 WT NA 之嵌合構型，以虛線表示氫鍵交互作用；(B)GS4071 (黑色)和瑞樂沙(白色)在 WT NA (淺白色)和 MDR NA (深灰色)中之構型。GS4071 和瑞樂沙的構型係取自重疊(superimposing)N1 結晶結構(PDB 代碼 3B7E 和 2HU4)；(C)當發生突變(如 H275Y/I223R 雙重突變)時，RB19、瑞樂沙和 GS4071 之 IC<sub>50</sub> 的倍數變化(敏感性(活性)降低的倍數)；(D)RB19 在 MDR NA 的嵌合構型；

第 5 圖 係根據一具體實施例之突變區的交互作用偏

好之示意圖。蛋白質-化合物交互作用圖譜。當篩選化合物與殘基產生交互作用，則圖譜項目為灰色，反之，圖譜項目為黑色。框架顯示 WT NA 和 MDR NA 間之交互作用偏好的主要差異；以及

第 6 圖 係根據一具體實施例顯示 RB19 在 MDCK 細胞中對流感病毒感染和複製之抑制。(A)RB19 抑制流感引起的細胞病變效果。在抗病毒的中和測試中，經 A/WSN/33 感染後 64 小時使 MDCK 細胞裂解，如 VC(病毒對照組)欄所示。以濃度為  $50 \mu\text{M}$ (最左欄)開始的兩倍系列稀釋濃度，將試劑 RB19 加入經 A/WSN/33 感染的細胞；(B)RB19 抑制流感病毒溶斑形成。在 6 孔盤中使用大約 50 至 100 PFU/孔之 A/WSN/33 (H1N1) 或 A/Udorn/72 (H3N2) 的 A 型流感病毒感染 MDCK 細胞。在病毒吸附階段後，將 3 毫升的凝膠(agar)覆蓋於含有各種濃度之 RB19 的培養基。RB19 的濃度顯示在頂部；(C)添加不同濃度之 RB19 至經病毒感染細胞中，觀察病毒產量的降低。以 MOI 0.001 之 A/WSN/33(H1N1)感染 MDCK 細胞，在 A/WSN/33 複製週期的吸附階段加入各種濃度的 RB19。在感染後 48 小時，收集培養上清液，使用神經氨酸酶活性評估病毒效價以監測病毒產量。

### 【實施方式】

藥物篩選方法係包括：從化合物數據庫篩選出能與野生型標靶結合的第一群(Group I)化合物；自該第一群化合物中篩選出能與突變型標靶之突變區結合的第二群(Group II)化合物；分析該野生型標靶及該突變型標靶之結合區的特徵，以獲得該結合區之物化特性；根據該結合區之物化

特性，自該第二群化合物中確認出候選藥物；以及，對該候選藥物進行抑制活性之生物分析。

根據一具體實施例，係利用分子嵌合工具從化合物數據庫篩選出對野生型標靶有結合之潛力的第一群化合物。根據一具體實施例，係利用分子嵌合工具自該第一群化合物中篩選出對突變型標靶之突變區有結合之潛力的第二群化合物。根據一具體實施例，係利用分子嵌合工具從化合物數據庫篩選出能 (capable of) 與野生型標靶結合的第一群化合物。根據一具體實施例，係利用分子嵌合工具自該第一群化合物中篩選出能與突變型標靶之突變區結合的第二群化合物。

突變區係指有突變發生之區域。根據部分具體實施例，突變型標靶之突變區係位於突變型標靶之結合區中。根據部分具體實施例，標靶之結合區具有一個或一個以上的子區 (subsite)，突變區為結合區中有突變發生之子區。突變型標靶中有突變發生的地方，會出現與野生型標靶不同的胺基酸。當標靶為，例如，蛋白質(如，但不限於：受體、抗體、酵素，等等)時，某些位置胺基酸的突變，可能會影響標靶與配體之結合。舉例而言，某些位置胺基酸的突變，會影響藥物與標靶之結合，因而使抗藥性發生機率大增。

分子嵌合工具 (molecule docking tool) (有時稱為分子嵌合程式 (molecule docking program)) 的種類，並沒有特別限制。根據一具體實施例，係利用分子嵌合工具從化合物數

據庫篩選出可以與野生型標靶結合的第一群化合物。根據一具體實施例，係利用分子嵌合工具自該第一群化合物中篩選出可以與突變型標靶之突變區結合的第二群化合物。分子嵌合工具的實例包括，但不限於：GEMDOCK、DOCK、FlexX、GOLD、ConsDock、AutoDock、GLIDE、ICM-Docking、CDOCKER、LibDock、LigandFit，等等。根據一具體實施例，係使用 GEMDOCK(台灣交通大學楊進木教授所研發，可由 <http://gemdock.life.nctu.edu.tw/dock/download.php> 下載獲得)作為分子嵌合工具。根據一具體實施例，係利用 GEMDOCK 從化合物數據庫篩選出能夠與野生型標靶結合的第一群化合物。根據一具體實施例，係利用 GEMDOCK 自該第一群化合物中篩選出能夠與突變型標靶之突變區結合的第二群化合物。

對野生型標靶之結合區(binding site)及突變型標靶之結合區進行特徵分析(有時稱為特徵化(characterization))，係用以獲得該等結合區之物化特性與相關之訊息(例如，但不限於：交互作用的種類(如：靜電力、氫鍵、凡得瓦力等)；與該交互作用相關之官能基、殘基；結合區/結合子區之官能基偏好(moiety preference)；結合區/結合子區的形狀、大小；等等)。根據一具體實施例，係藉由特徵化該野生型標靶之結合區及該突變型標靶之結合區，以獲得該結合區之物化特性與相關之訊息。

對野生型標靶之結合區及突變型標靶之結合區之物化特性的分析，可用於進一步篩選出候選藥物。根據一具



體實施例，藉由分析該野生型標靶之結合區及該突變型標靶之結合區的特徵，以獲得該等結合區之物化特性，並根據該等結合區之物化特性，自該第二群化合物中確認出候選藥物。物化特性與相關之訊息包括，但不限於：官能基種類、殘基極性、殘基電性、交互作用、結合子區的形狀、結合子區的大小，等等。舉例而言，可藉由對化合物與結合區之交互作用及相關資訊(例如，結合區之空間形狀等)的分析，進一步篩選出候選藥物。根據一具體實施例，自該第一群化合物中篩選出第二群化合物後，係藉由分析第二群化合物與結合區之交互作用及相關資訊(例如，結合區之空間形狀等)，進一步篩選出候選藥物，其中，該結合區包括野生型標靶之結合區及突變型標靶之結合區。根據一具體實施例，爲了達到篩選出對野生型標靶及突變型標靶兩者皆有效果的藥物之目的，係藉由分析化合物(例如，第二群化合物)分別與野生型標靶結合區及突變型標靶結合區間之交互作用及/或相關訊息(例如，結合區之空間形狀等)，以利用該等資訊進一步篩選出想要的候選藥物。

可利用任何適當的方式進行/呈現(demonstrate)野生型標靶之結合區及/或突變型標靶之結合區的特徵分析。特徵分析所使用之工具/程式的實例包括，但不限於：區域官能基地圖，等等。根據一具體實施例，係使用區域官能基地圖(site-moiety map, SiMMap)(台灣交通大學楊進木教授所研發，可由 <http://simfam.life.nctu.edu.tw/>下載獲得)進行/呈現(demonstrate)野生型標靶之結合區的特徵分析及/或突

變型標靶之結合區的特徵分析。可將前述分子嵌合工具所獲得的，化合物與標靶結合區之嵌合模型與相關資訊，用於協助結合區特徵化(特徵分析)的進行。舉例而言，可將分子嵌合工具所獲得之，第二群化合物與該等結合區之嵌合模型與相關資訊，用於結合區之特徵化(特徵分析)，並建立區域官能基地圖。該區域官能基地圖呈現該等結合區之物化特性與相關特性(例如，但不限於：交互作用；與該交互作用相關之官能基、殘基；結合區/結合子區偏好之官能基；殘基極性、電性；結合區/結合子區的形狀、大小；等等)，其可用以進一步篩選出候選藥物。根據一具體實施例，係將由分子嵌合工具獲得之，第二群化合物與該等結合區(野生型標靶之結合區及突變型標靶之結合區)之嵌合模型，用於分析該等結合區的特徵。於一具體實施例中，係利用由 GEMDOCK 所獲得之，該第二群化合物與該等結合區(野生型標靶之結合區及突變型標靶之結合區)之嵌合模型，用於分析該等結合區的特徵。根據一具體實施例，分析該等結合區的特徵係藉由區域官能基地圖呈現。於一具體實施例中，係將由分子嵌合工具獲得之，第二群化合物與該等結合區之嵌合模型，用於分析該等結合區的特徵，並建立區域官能基地圖。於一具體實施例中，係利用由分子嵌合工具獲得之第二群化合物與該等結合區之嵌合模型，並藉由區域官能基地圖，分析該等結合區的特徵。

根據結合區之物化特性等相關資訊，所篩選出的候選藥物，係對該野生型標靶及該突變型標靶有結合之潛力

者。根據一具體實施例，係根據結合區之物化特性等相關資訊，篩選出能夠與該野生型標靶及該突變型標靶結合者為候選藥物。根據一具體實施例，所篩選出的候選藥物，對該野生型標靶標靶及該突變型標靶有結合之潛力，並且，該候選藥物具有與該突變型標靶之突變區產生交互作用之潛力。根據一具體實施例，係篩選出能與該野生型標靶及該突變型標靶結合，並且能與該突變型標靶之突變區產生交互作用者為候選藥物。根據一具體實施例，自該第二群化合物中篩選出的候選藥物，其物化特性係與該等結合區（野生型標靶之結合區及突變型標靶之結合區）之物化特性互補。根據一具體實施例，自該第二群化合物中篩選出的候選藥物，係對該野生型標靶及該突變型標靶有抑制潛力。根據一具體實施例，係自該第二群化合物中篩選出能抑制該野生型標靶及該突變型標靶者為候選藥物。根據一具體實施例，係自該第二群化合物中篩選出能抑制該野生型標靶及該突變型標靶，且能與該突變型標靶之突變區產生交互作用者為候選藥物。

自該第二群化合物中篩選出候選藥物後，可藉由進一步的生物分析，測定候選藥物之抑制活性。根據一具體實施例，對該候選藥物進行生物分析，以確認對該野生型標靶及該突變型標靶具抑制活性的藥物。可使用任何的生物分析方法，只要能達到測定抑制活性的目的即可。

本文中藥物篩選方法所使用之標靶，可為任何適用於該方法之物質，舉例而言，使用具有結合區之生物標靶，

例如，但不限於：蛋白質(例如，但不限於：受體、抗體、酵素，等等)。根據一具體實施例，利用上述藥物篩選方法能篩選出對野生型標靶及突變型標靶有抑制潛力的候選藥物。根據一具體實施例，利用上述藥物篩選方法能篩選出能抑制野生型標靶及突變型標靶的藥物。某些發生於生物標靶結合區之突變係與抗藥性有關。根據一具體實施例，藉由上述藥物篩選方法可篩選出對野生型標靶及突變型標靶有抑制潛力的候選藥物。因此，藉由上述藥物篩選方法可篩選出對野生型及具抗藥性之對象(例如，病原體)同時具有抑制能力的候選藥物。根據一具體實施例，利用上述藥物篩選方法能篩選出同時能抑制野生型標靶及突變型標靶的藥物。因此，藉由上述藥物篩選方法能篩選出能抑制野生型及具抗藥性之對象(例如，病原體)的藥物，對藥物的研發有極大助益。

上述藥物篩選方法能用於篩選各種疾病或異常之預防劑或治療劑。尤其是，上述藥物篩選方法有利於篩選與具高突變率之致病因子相關的疾病或異常的預防劑或治療劑。疾病或異常的實例包括，但不限於：流行性感冒、癌症、後天免疫缺乏症候群、肺結核、肺炎，等等。

使用前述藥物篩選方法能夠篩選出同時對野生型標靶及突變型標靶具有抑制潛力的候選藥物。使用前述藥物篩選方法能夠篩選出同時對野生型標靶及突變型標靶具有抑制效果的藥物。如前所述，某些突變的發生，會導致抗藥性。舉例而言，神經氨酸酶之 I223R 與 H275Y 雙突變，

會導致對目前使用的治療藥物瑞樂沙與克流感(本文中，有時 GS4071 與克流感可交互使用)產生抗藥性。又例如，以表皮生長因子受體(EGFR)為標靶，用於治療非小細胞肺癌的藥物艾瑞莎(gefitinib)及得舒緩(erlotinib)，也已觀察到因為抗藥性突變而失效的臨床案例。因此，極需能篩選對野生型及突變型標靶兩者具有抑制潛力之藥物的方法。以流行病學之觀點而言，使用能抑制野生型標靶及抗藥型標靶兩者的藥物，可大大降低突變標靶(突變株)再次發生突變的機率。另外，對臨床用藥而言，使用對野生型及突變型標靶兩者皆具有抑制潛力之藥物，可免去檢驗/確認致病株的繁複程序，大大降低延遲治療之發生率。同時，使用對野生型及突變型標靶兩者皆具有抑制潛力之藥物，也能降低因使用多種藥物所造成之藥物交互作用或對非預期標靶造成抑制等副作用之發生率。使用本藥物篩選方法，能夠篩選出對野生型病毒株及抗藥型病毒株兩者皆具有效果的藥物，對藥物的研發有極大助益。

根據一具體實施例，藥物篩選方法之標靶為神經氨酸酶。神經氨酸酶(neuraminidase, NA)是由相同次單位(subunit)所組成的四聚體(tetramer)。在流感病毒中，其位於外套膜的表面。在病毒脫離宿主的過程中，神經氨酸酶會催化末端唾液酸(sialic acid)殘基的斷離，以促使子代病毒自被感染的宿主細胞脫離。因此，神經氨酸酶是抗流感病毒藥物研發的標靶之一。然而，已發現一些對目前使用之抗流感病毒藥物產生抗藥性之突變型病毒株。舉例而言，出現

H275Y、I223R 及/或 H275Y 之突變，使得流感藥物 GS4071、瑞樂沙等之活性大幅降低。

使用前述藥物篩選方法能夠篩選出對神經氨酸酶具有抑制潛力的候選藥物。使用前述藥物篩選方法能夠篩選出對神經氨酸酶具有抑制效果的藥物。更具體而言，使用前述藥物篩選方法能夠篩選出能抑制野生型及突變型神經氨酸酶的藥物。某些神經氨酸酶之突變，造成抗藥性的發生。因此，使用前述藥物篩選方法能夠篩選出對野生型病毒株及抗藥型病毒株兩者皆具有效果的藥物。根據一具體實施例，本案之藥物篩選方法能夠篩選出對野生型病毒株及具多重抗藥性之病毒株兩者皆具有效果的藥物，對藥物研發及臨床應用極具價值。

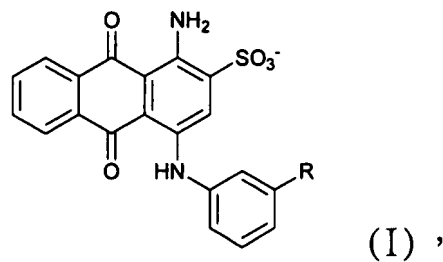
根據本案，使用前述藥物篩選方法能夠篩選出用以治療與神經氨酸酶相關之疾病或異常(例如，流行性感冒)的藥物。根據一具體實施例，使用前述藥物篩選方法能夠篩選出用以治療與野生型神經氨酸酶及/或突變型神經氨酸酶相關之疾病或異常的藥物。於一具體實施例中，使用前述藥物篩選方法能夠篩選出用以治療與野生型神經氨酸酶及/或抗藥型神經氨酸酶相關之疾病或異常的藥物。於一具體實施例中，使用前述藥物篩選方法能夠篩選出用以治療與野生型神經氨酸酶及/或具多重抗藥性之神經氨酸酶相關之疾病或異常的藥物。

使用前述藥物篩選方法，能篩選出同時對野生型病毒株及突變型病毒株具有抑制效果的藥物，因此，對藥物研

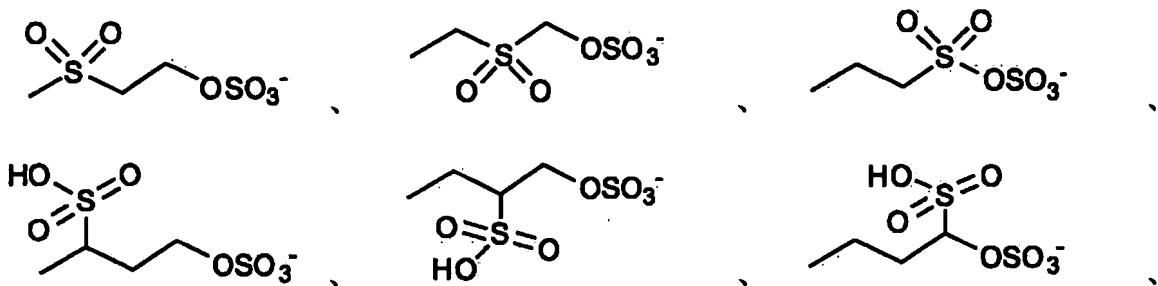
發及臨床應用有極大助益。根據一具體實施例，使用前述藥物篩選方法，能篩選出對野生型病毒株及抗藥型病毒株兩者皆具有抑制效果的藥物。於一具體實施例中，使用前述藥物篩選方法，能篩選出對野生型病毒株及具多重抗藥性之病毒株兩者皆具有抑制效果的藥物。

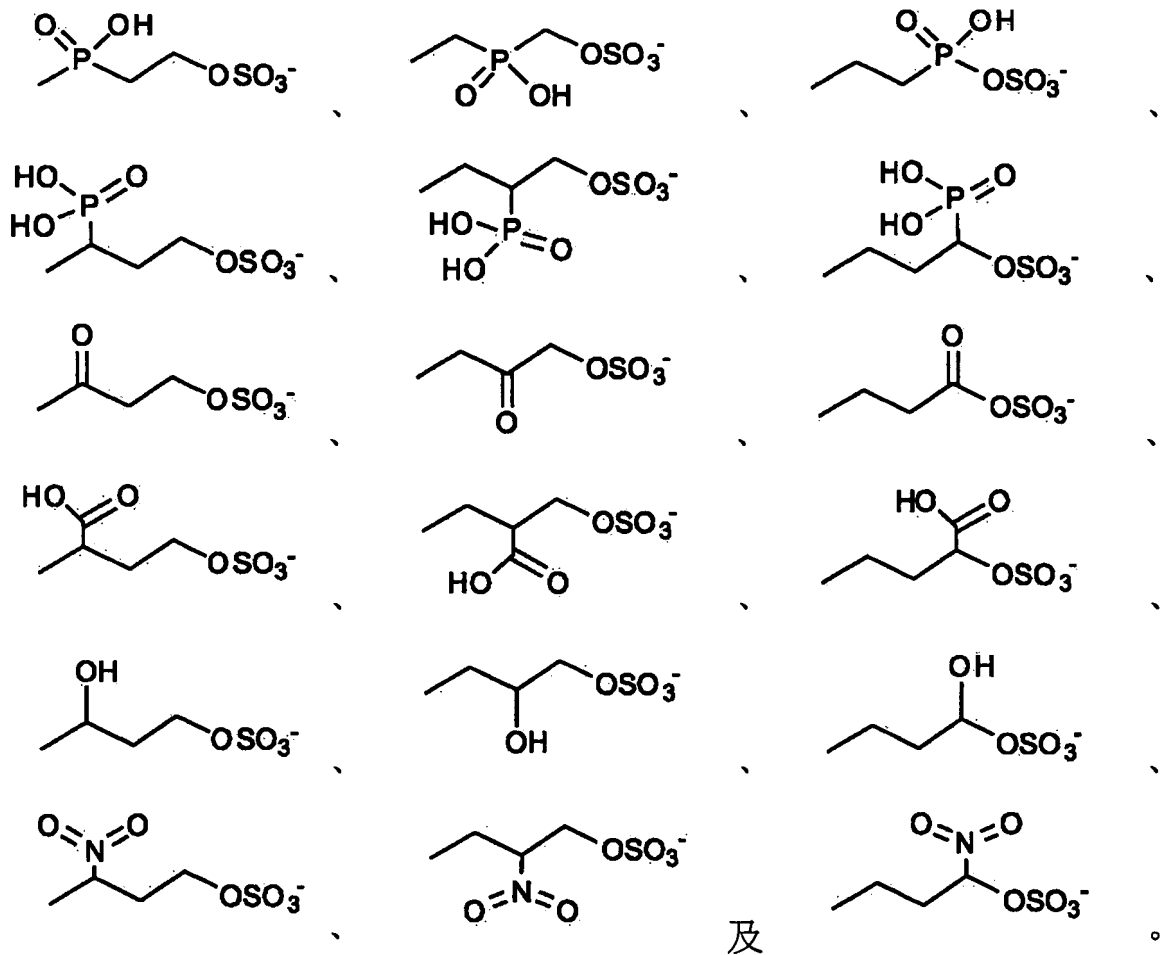
根據一具體實施例，使用前述藥物篩選方法，能篩選出同時對野生型流感病毒株及突變型流感病毒株造成之流行性感冒具有治療效果的藥物。於一具體實施例中，使用前述藥物篩選方法，能篩選出對野生型流感病毒株及抗藥型流感病毒株造成之流行性感冒皆具有治療效果的藥物。於一具體實施例中，使用前述藥物篩選方法，能篩選出對野生型流感病毒株及具多重抗藥性之流感病毒株造成之流行性感冒皆具有治療效果的藥物。

一種式(I)化合物用於製備神經氨酸酶抑制劑之用途



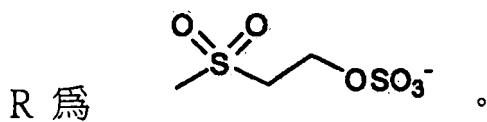
式中，R 係選自下列者所組成之群組：





上述用於製備神經氨酸酶抑制劑之式(I)化合物，包括其鹽、其衍生物及其類似物。

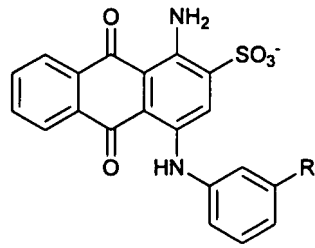
神經氨酸酶包括野生型神經氨酸酶及突變型神經氨酸酶。於一具體實例中，式(I)化合物對野生型及突變型神經氨酸酶具有抑制活性。於一具體實例中，式(I)化合物之



根據一具體實施例，式(I)化合物對野生型病毒株及突變型病毒株具有抑制效果。於一具體實例中，式(I)化合物對野生型病毒株及抗藥型病毒株具有抑制效果。於一具體實例中，式(I)化合物對野生型病毒株及具多重抗藥性之病毒株具有抑制效果。

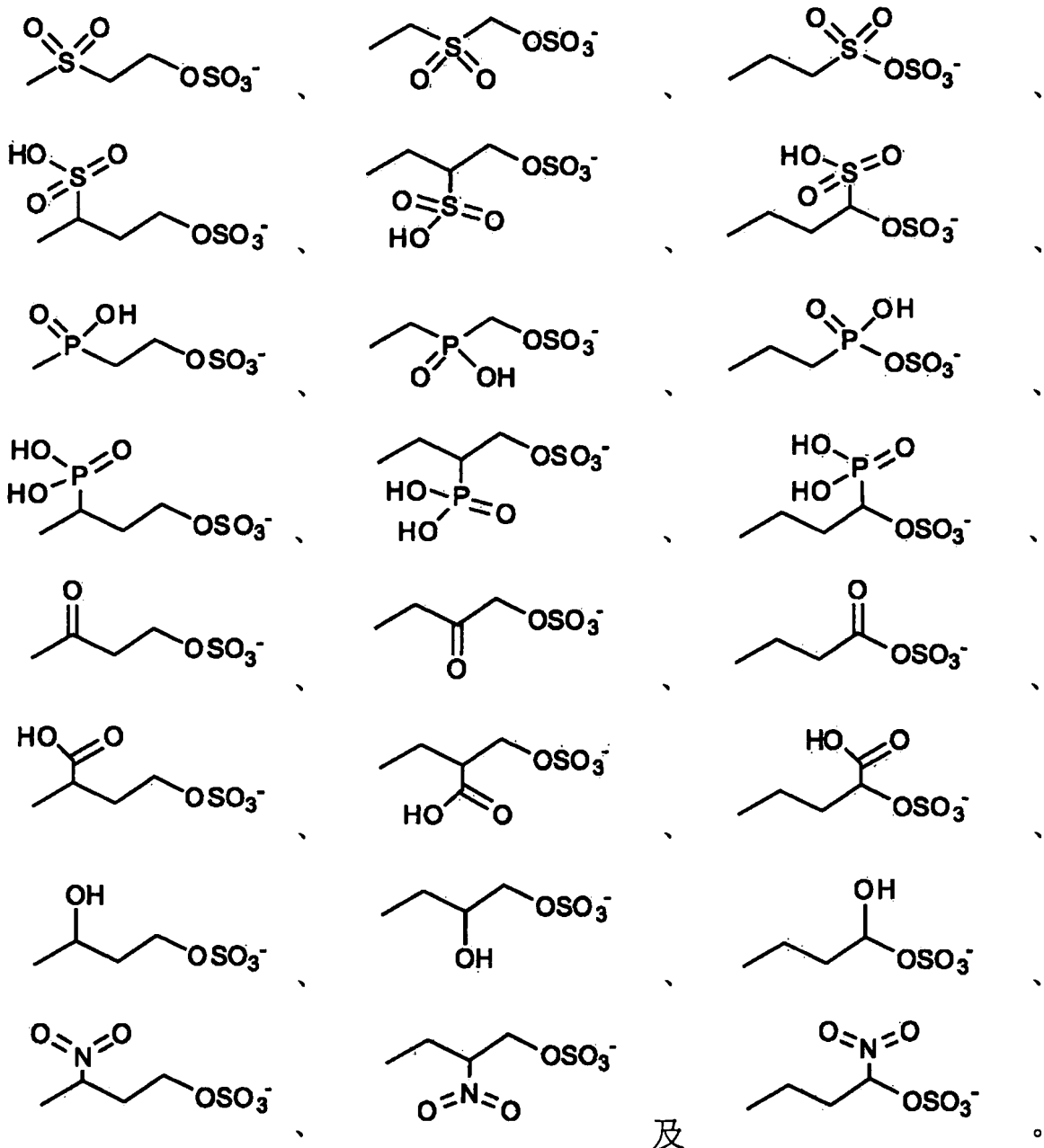


一種式(I)化合物用於製備治療流行性感冒之藥物之用途



(I),

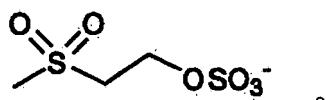
式中，R 係選自下列者所組成之群組：



上述用於製備治療流行性感冒之藥物的式(I)化合

物，包括其鹽、其衍生物及其類似物。

式(I)化合物對神經氨酸酶具有抑制活性。神經氨酸酶包括野生型神經氨酸酶及突變型神經氨酸酶。於一具體實例中，式(I)化合物對野生型及突變型神經氨酸酶具有抑制活性。於一具體實例中，式(I)化合物之 R 為



根據一具體實施例，式(I)化合物對野生型病毒株及突變型病毒株具有抑制效果。於一具體實例中，式(I)化合物對野生型病毒株及抗藥型病毒株具有抑制效果。於一具體實例中，式(I)化合物對野生型病毒株及具多重抗藥性之病毒株具有抑制效果。

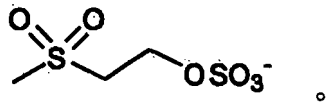
根據一具體實施例，式(I)化合物係用於製備治療 A 型流感病毒感染造成之流行性感冒的藥物。A 型流感病毒包括人類 A 型流感病毒、牛 A 型流感病毒、馬 A 型流感病毒、豬 A 型流感病毒及禽 A 型流感病毒。於一具體實例中，A 型流感病毒包括，但不限於：H1N1、H3N2 及 H5N1 病毒株。

根據一具體實施例，式(I)化合物同時對野生型流感病毒株及突變型流感病毒株造成之流行性感冒具有治療效果。於一具體實例中，式(I)化合物同時對野生型流感病毒株及抗藥型流感病毒株造成之流行性感冒具有治療效果。於一具體實例中，式(I)化合物同時對野生型流感病毒株及具多重抗藥性之流感病毒株造成之流行性感冒具有治療效果。



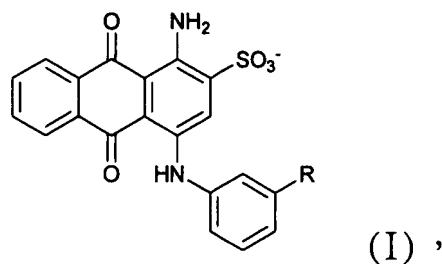
其衍生物及其類似物。

神經氨酸酶包括野生型神經氨酸酶及突變型神經氨酸酶。於一具體實例中，式(I)化合物對野生型及突變型神經氨酸酶具有抑制活性。於一具體實例中，式(I)化合物對野生型神經氨酸酶及具多重抗藥性之神經氨酸酶具有抑制效果。於一具體實例中，式(I)化合物之R為

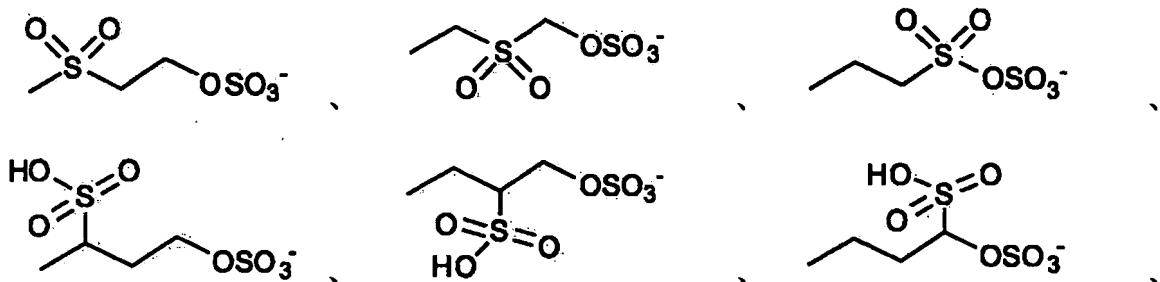


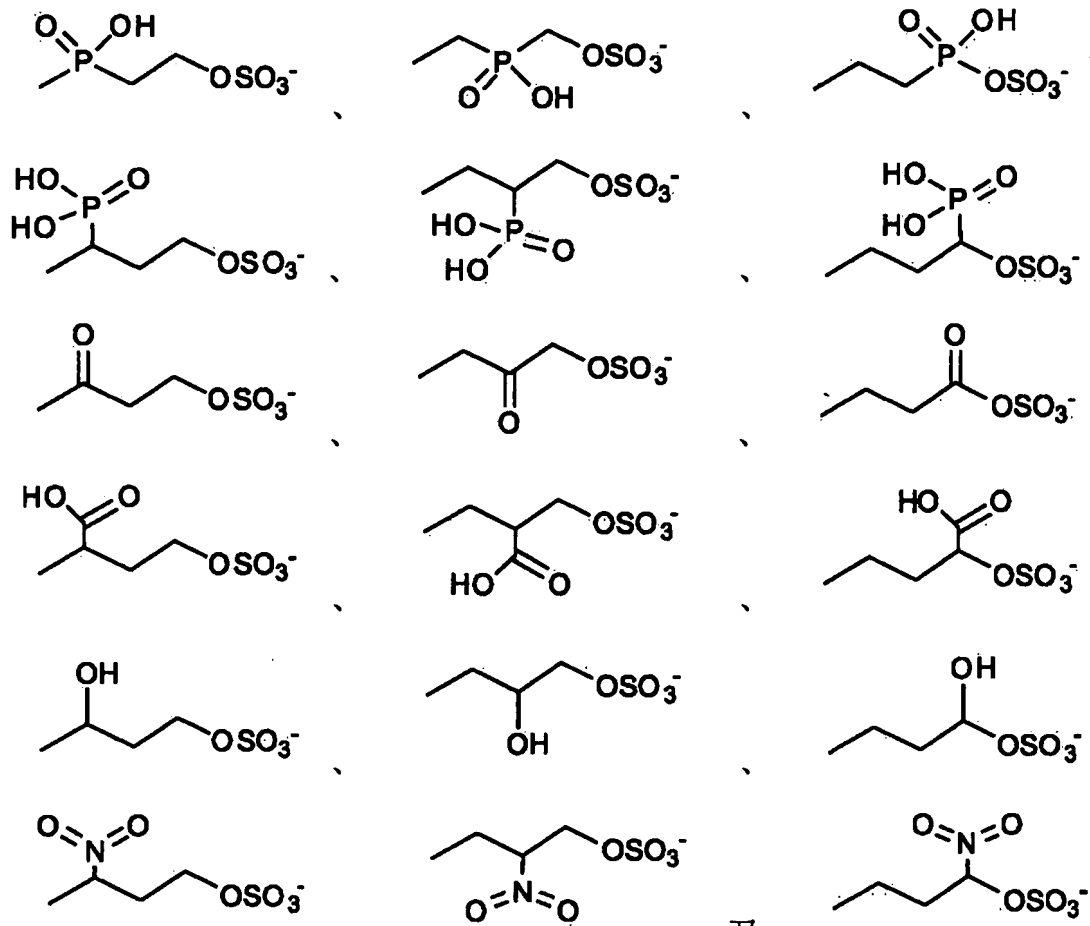
根據一具體實施例，式(I)化合物對野生型病毒株及突變型病毒株具有抑制效果。於一具體實例中，式(I)化合物對野生型病毒株及抗藥型病毒株具有抑制效果。於一具體實例中，式(I)化合物對野生型病毒株及具多重抗藥性之病毒株具有抑制效果。

一種治療流行性感冒之方法，包括對個體投予醫療有效量之式(I)化合物



式中，R係選自下列者所組成之群組：



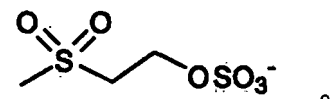


及

上述用於治療流行性感冒之式(I)化合物，包括其鹽、其衍生物及其類似物。

式(I)化合物對神經氨酸酶具有抑制活性。神經氨酸酶包括野生型神經氨酸酶及突變型神經氨酸酶。於一具體實例中，式(I)化合物對野生型及突變型神經氨酸酶皆具有抑

制活性。式(I)化合物，較佳地，該 R 為



根據一具體實施例，式(I)化合物對野生型病毒株及突變型病毒株具有抑制效果。於一具體實例中，式(I)化合物對野生型病毒株及抗藥型病毒株具有抑制效果。於一具體實例中，式(I)化合物對野生型病毒株及具多重抗藥性之病毒株具有抑制效果。

根據一具體實施例，式(I)化合物係用於治療 A 型流感病毒感染造成之流行性感冒。A 型流感病毒包括人類 A 型流感病毒、牛 A 型流感病毒、馬 A 型流感病毒、豬 A 型流感病毒、禽 A 型流感病毒。於一具體實施例中，A 型流感病毒包括，但不限於：H1N1、H3N2 及 H5N1 病毒株。

根據一具體實施例，式(I)化合物對野生型流感病毒株及突變型流感病毒株造成之流行性感冒皆具有治療效果。於一具體實施例中，式(I)化合物對野生型流感病毒株及抗藥型流感病毒株造成之流行性感冒皆具有治療效果。於一具體實施例中，式(I)化合物對野生型流感病毒株及具多重抗藥性之流感病毒株造成之流行性感冒具有治療效果。

一種醫藥組成物，包括上述式(I)化合物。於一具體實

例中，式(I)化合物之 R 為 。

上述用於醫藥組成物之式(I)化合物，包括其鹽、其衍生物及其類似物。醫藥組成物中，式(I)化合物、其鹽、其衍生物或其類似物之用量為在完整醫學判斷範圍下，足以顯著正面改善所欲治療之病症、疾病或異常的量(可稱為醫療有效量)，並可為了避免嚴重之副作用而適度調整之。亦即，醫藥組成物中，式(I)化合物、其鹽、其衍生物或其類似物之有效量，將隨欲達成之特定目標、接受治療之對象年齡與健康條件、原有疾病之嚴重性、治療時程、併行療法之性質及所採用之特定藥物而變化。

於具體實施態樣中，上述醫藥組成物具有抑制野生型

神經氨酸酶及突變型神經氨酸酶之活性。於一具體實例中，上述醫藥組成物具有抑制野生型神經氨酸酶及抗藥型神經氨酸酶之活性。於一具體實例中，上述醫藥組成物具有抑制野生型神經氨酸酶及多重抗藥型神經氨酸酶之活性。於一具體實例中，上述醫藥組成物對野生型流感病毒株及突變型流感病毒株具有抑制效果。於一具體實例中，上述醫藥組成物對野生型流感病毒株及抗藥型流感病毒株具有抑制效果。於一具體實例中，上述醫藥組成物對野生型流感病毒株及具多重抗藥性之流感病毒株具有抑制效果。

根據一具體實施例，上述醫藥組成物係用於治療流行性感冒，尤其是，A型流感病毒感染造成之流行性感冒。A型流感病毒包括人類A型流感病毒、牛A型流感病毒、馬A型流感病毒、豬A型流感病毒及禽A型流感病毒。於一具體實例中，A型流感病毒包括，但不限於：H1N1、H3N2及H5N1病毒株。

根據一具體實施例，上述醫藥組成物對野生型流感病毒株及突變型流感病毒株具有抑制效果。於一具體實例中，上述醫藥組成物對野生型流感病毒株及抗藥型流感病毒株造成之流行性感冒具有治療效果。於一具體實例中，上述醫藥組成物對野生型流感病毒株及具多重抗藥性之流感病毒株造成之流行性感冒具有治療效果。

## 實施例

以下係藉由特定的具體實施例說明本發明之實施方

式，但該等實施例並非用於限制本發明之範疇。熟習此技藝之人士可由本說明書所揭示之內容瞭解本發明之其他優點與功效。本發明也可藉由其他不同的具體實施例加以施行或應用，本說明書中的各項細節亦可基於不同觀點與應用，在不悖離本創作之精神下進行各種修飾與變更。

除非文中另有說明，否則說明書及所附申請專利範圍中所使用之單數形式「一」及「該」包括複數個體。

除非文中另有說明，否則說明書及所附申請專利範圍中所使用之術語「或」包括「及/或」之含義。

第 1 圖顯示根據一具體實施例之用於鑑定野生型(WT)神經氨酸酶(NA)及突變型神經氨酸酶(實施例中例示抗藥型(例如，具多重抗藥性(MDR))之神經氨酸酶)之抑制劑的平行篩選策略(parallel screening strategy)的架構。簡要地說，首先，使用嵌合工具，GEMDOCK，將選自公共化合物數據庫之 257,275 個化合物嵌合至 WT NA 及 MDR NA 之結合區(第 1 圖 A)。GEMDOCK 為已成功地應用於鑑定抑制劑及某些標靶之結合區的分子嵌合工具。在嵌合程序後，進行野生型標靶及突變型標靶之結合區的特徵分析。舉例來說，在程序後，利用嵌合的化合物，以使用區域官能基地圖(site-moiety map, SiMMap)特徵化結合區(包括，突變子區(mutant subsite))，該區域官能基地圖係透過錨點(anchor)呈現結合區之官能基偏好與物理-化學特性(有時簡稱物化特性)間的關係(第 1 圖 B)。

根據先前研究，將神經氨酸酶之結合區分為五個子



區，包含 S1 (R118, R293 和 R368, 於 N1 系列)、S2 (E119, D151, W179 和 E228)、S3 (R152, W179 和 I223)、S4 (I223, R225 和 S247) 以及 S5 (S247 和 E277)。WT NA 的子區特徵已有相關報告，再藉由結合突變子區的特徵，選出與 WT NA 之子區和 MDR NA 之子區的特徵同時匹配的化合物(第 1 圖 C)。接著，在測試化合物存在或不存在下藉由 WT NA 和 MDR NA 酵素活性之生物分析(bioassay)來驗證所選出的化合物(第 1 圖 D)。以下將作更詳盡的說明。

#### **NA 結構及篩選圖庫的準備(Preparation of NA structures and screening library)**

爲了平行篩選策略，從蛋白質數據銀行(Protein Data Bank)下載開放型 H5N1 NA 結構 (PDB 代碼 2HTY)。選擇不與配體複合的結構，這是因爲配體-結合的結構可能已被誘導契合(induced fit)並限制鑑別抑製劑的多樣性。爲了定義 NA 的結合區，利用結構校準工具(structural alignment tool)，利用瑞樂沙(zanamivir)-鍵結結構 (PDB 代碼 2HU4) 校準此未鍵結結構(亦即 2HTY)。以圍繞瑞樂沙 10Å 半徑球體範圍內的殘基定義結合區。

使用同源建模法伺服器(homology-modeling server)取得具有 I223R 和 H275Y 雙點突變的 NA 結構。呈至伺服器的蛋白質序列是來自帶有雙點突變之菌株 NIBRG14 (H5N1)，其是用來提供用於生物分析之 MDR NA。選擇未鍵結的 NA 結構 (亦即，2HTY) 作爲結構模板。依據上

述程序產生突變體結構的結合區。

用來進行虛擬篩選之化合物庫包括取自美國國家癌症研究所 (NCI) 和 Sigma-Aldrich 公司 (聖路易斯, 密蘇里州) 的數據庫。選擇分子量介於 200 至 650 道爾頓 (dalton) 之範圍的小分子化合物進行下文所述之虛擬篩選 (即利用分子嵌合工具進行篩選)。據統計, 約 80% 的藥物介於此分子量範圍, 顯示這範圍內的化合物可能具有較佳的藥物動力學 (吸收、分布、代謝、排泄), 較可能成為藥物。選定之化合物數為 257,275。

#### **虛擬篩選 (Virtual screening)**

使用嵌合工具 GEMDOCK, 將各個化合物嵌合至 NA 的結合區。此工具係使用基於分段線性勢能 (piecewise linear potential) 之評分函數迅速測量結合區與化合物之間的分子間勢能。GEMDOCK 的評分函數包含靜電力勢能、立體排斥勢能和氫鍵勢能, 蛋白質-化合物複合物的分子間勢能, 以該三種勢能的總和計算。嵌合後, 基於他們的分子間勢能排出候選化合物的名次。將各個化合物嵌合至 WT NA 的結合區; 接著, 再將名次較高的 12,800 (約 5%) 個化合物 (Group I) 嵌合至 MDR NA 的結合區, 以獲得能量潛力排名。

#### **特徵化 (Characterization) – 區域官能基地圖及交互作用圖譜分析 (Site-moiety map and interaction profile analysis)**

如上所述, 將化合物嵌合至 WT NA 的結合區, 接著, 從名次較高的化合物 (Group I) 中, 再利用嵌合工具選出與

突變型 NA 之 S4 子區 (突變子區) 產生交互作用的 600 個化合物 (Group II)。進一步分析該等子區的官能基偏好和交互作用偏好。利用這些化合物和 WT NA 結合區及 MDR NA 結合區，建立區域官能基地圖。理論上，要建立區域官能基地圖，至少需要 500 個化合物。首先，使用蛋白質-化合物交互作用圖譜以呈現化合物和蛋白質殘基之間的交互作用。所用的三種圖譜類型為靜電力 (E)、氫鍵 (H) 及凡得瓦力 (V) 交互作用圖譜。對於每個圖譜，以矩陣的大小  $P \times C$  表示交互作用，其中， $P$  和  $C$  各自表示化合物數量和產生交互作用之蛋白質殘基數量。使用上述 GEMDOCK 的分段線性電位函數來檢測交互作用。接著使用 iGEMDOCK (為 GEMDOCK 圖形介面版) 呈現圖譜 (亦可使用，例如：EXCEL 等工具來呈現圖譜)。若在化合物和殘基之間有靜電力或氫鍵交互作用，則將 E 和 H 圖譜項目設定為 1 (第 5 圖中的灰色區域)；否則則將項目設定為 0 (第 5 圖中的黑色區域)。對於 V 圖譜，若該 V 交互作用能量小於 -4 千卡/莫耳 (kcal/mol)，則項目設定為 1。

我們使用 Z-評分，識別圖譜中具有一致性交互作用 (consensus interaction) 的區域為錨點，該錨點通常在生物學功能中扮演關鍵角色。對於各個圖譜，根據方程式： $Z_i = \frac{f_i - \mu}{\sigma}$ ，得到蛋白質殘基  $i$  之 Z 評分數值 ( $Z_i$ )，其中， $f_i$  表示化合物和殘基  $i$  之間所觀察到的交互作用頻率，且  $\mu$  和  $\sigma$  表示從 1000 個隨機選擇圖譜獲取的交互作用頻率之平均值和

標準差。化合物和殘基  $i$  之間的交互作用的 Z-評分  $\geq 1.645$ (這是一個常用的統計閾值 (95% 信賴區間))，被視為一致性交互作用。此方法中，具一致性交互作用之空間鄰近殘基及與其產生交互作用的官能基組成錨點。此處，將位於 S4 子區的錨點，用於特徵化 WT NA 和 MDR NA 的子區 (第 3 圖)。

### 突變子區

WT NA 和 MDR NA 的結構比較顯示在 S4 子區的體積和極性有顯著差異，其主要是由 I223R 突變所引起的 (第 2 圖)。當 I223 被 R223 取代時，因為精胺酸的長側鏈，使得 S4 子區的體積變小。此外，在突變子區中，殘基 R223 及其相鄰的精胺酸 (R152 和 R225) 形成帶正電荷的區域 (第 2 圖 C)；反之，WT S4 子區則為疏水性的 (第 2 圖 D)。該 S4 子區的體積變小及特徵改變表示，含有長親脂性側鏈 (例如，奧司他韋 (Oseltamivir, 克流感) 或芳香環 (例如，碳環類似物 53) 之抑制劑不適合作為 MDR NA 之抑制劑。

區域官能基地圖分析顯示，S4 突變子區由三個殘基 R223，R225 和 S247 構成氫鍵錨點 (第 3 圖)。該錨點偏好極性官能基，例如羧酸、醯胺、酮和硫酸。相反地，位在 WT 子區的錨點類型則為凡得瓦力 (van der Waals) 交互作用，且此錨點偏好環官能基，例如芳基、苯基、雜環基和烯烴。該官能基偏好的差異可能是因區域的體積變小及正電荷所造成。根據這些觀察，在 S4 子區，帶有大極性官能基 (例如，硫酸衍生物和磷酸衍生物) 的抑制劑，會是對維

持對抗 WT NA 和 MDR NA 兩者之活性有利的。該等官能基與 WT 子區接觸能夠提供凡得瓦力。此外，當雙重突變發生時，這些官能基能與極性環境產生氫鍵交互作用。

### ***突變體子區的交互作用偏好 (Interaction preference of the mutant subsite)***

了解蛋白質子區的交互作用偏好有助於開發抑制劑，及配體結合機制的研究。為了解突變子區的交互作用偏好，使用 iGEMDOCK（其為 GEMDOCK 圖形介面版）分析前列 600 個化合物 (Group II) 對 WT NA 和 MDR NA 之交互作用的圖譜 (第 5 圖)。此工具為圖形化環境 (graphical environment)，用於增強 GEMDOCK 對於蛋白質-化合物交互作用可視化及篩選後分析。由分析發現，前列化合物的很多原子與突變子區形成氫鍵，而 WT 子區則有相對少的氫鍵交互作用 (表 1)。I223 的短側鏈造成大腔室，因而比突變子區更有利與巨大官能基 (有時稱為基團) 產生凡得瓦力交互作用。GS4071 的強活性是由最佳化與 WT 子區之凡得瓦力交互作用而獲得。

這些交互作用圖譜顯示，兩種子區的交互作用偏好之間的差異主要是取決於氫鍵交互作用 (第 5 圖與表 1)。例如，MDR 子區殘基 R223 和 WT 子區殘基 I223 產生氫鍵的化合物分別為 95% 和 0% (表 1)。形成氫鍵之高偏好應為後文中所述之化合物 RB19 對雙重突變 NA 的潛力活性原因。此外，我們發現一些化合物與突變子區的 R152 和 R223 有靜電力交互作用，顯示設計帶有負電荷的基團 (例如硫酸

單酯，磷酸和羧酸）的抑制劑可以藉由形成鹽橋而增強效力。

表 1 野生型子區及突變型子區之交互作用偏好

交互作用類型	靜電力交互作用			氫鍵交互作用			凡得瓦力交互作用			
	殘基	R(I)223	R225	S247	R(I)223	R225	S247	R(I)223	R225	S247
交互作用 % (突變)		31%	9%	0%	95%	18%	46%	75%	57%	31%
交互作用 % (野生型)		0%	4%	0%	0%	27%	28%	21%	57%	25%

### 抗-抗藥型抑制劑的鑑定 (Identification of anti-resistance inhibitors)

基於符合交互作用和空間形狀之互補性，我們選出同時符合 WT NA 和 MDR NA 之結合區之特徵的化合物，以於後續將這些化合物用於評估其抗-NA 活性。從 Stoll 等人的研究 (Stoll V, Stewart KD, Maring CJ, Muchmore S, Giranda V, et al. (2003) Influenza neuraminidase inhibitors: Structure-based design of a novel inhibitor series. *Biochemistry* 42: 718-727.) 可直接得知 S1、S2、S3 和 S5 的子區的特徵。S1 子區是帶正電的環境，且該化合物與該子區為產生靜電力交互作用而為匹配其特徵的。S2 子區的環境是帶負電的。若化合物與該環境產生靜電力，則該化合物被視為匹配該子區。對於該兩子區，在化合物和該子區之間為氫鍵交互作用亦被視為特徵匹配。S3 子區是混合疏水性和極性區域，且也可為氫鍵或凡得瓦力交互作用區

域。S5 子區是疏水性的，且形成凡得瓦力接觸之化合物便與此子區特徵一致。

使用平行匹配評分以測量對 WT NA 和 MDR NA 同時具有抑制活性的化合物。對化合物  $c$ ，其平行匹配評分的計算為：

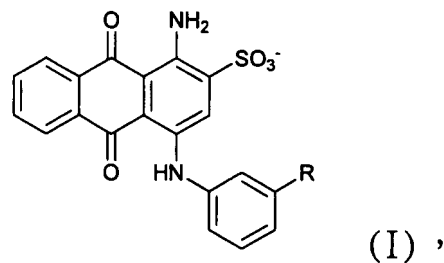
$$PMS(c) = \sum_{s=1}^S WS_s(c) + \sum_{s=1}^S MS_s(c) + (-0.001) \frac{WE(c)}{M^{0.5}} + (-0.001) \frac{ME(c)}{M^{0.5}}$$

式中， $WS_s(c)$  和  $MS_s(c)$  各自表示 WT NA 和 MDR NA 之子區  $s$  中化合物  $c$  的匹配評分， $S$  表示子區數目， $WE(c)$  and  $ME(c)$  各自表示化合物  $c$  在 WT NA 和 MDR NA 之分子間勢能，而  $M$  為化合物  $c$  之原子數目。此處，若化合物  $c$  匹配子區  $s$  的特徵，則  $WS_s(c)$  或  $MS_s(c)$  設定為 1，否則，將評分設定為 0。 $M^{0.5}$  這一項可減少以能量為基礎的評分函數會偏好選取分子量較大之化合物的缺點。基於上述平行匹配評分，將化合物排名。為了找到沒有受到雙重突變影響的化合物，對化合物進行篩選以排除沒有與 S4 突變子區的特徵匹配的化合物，並於後續對所選出的化合物進行生物分析測試。

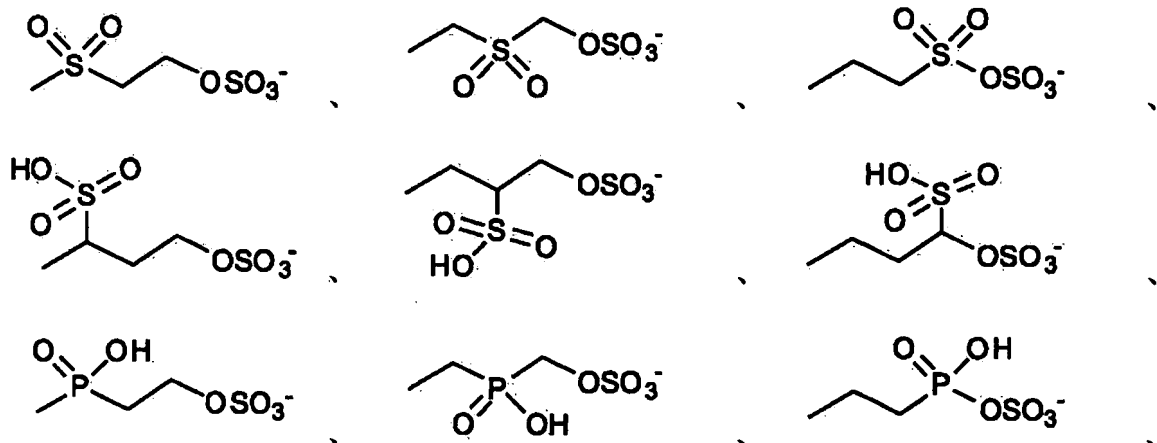
如斯托爾(Stoll)等人所定義的，將結合區分為 5 個子區 (S1-S5) (第 2 圖)。S1 子區 (R118, R293 和 R368) 為帶正電荷的區域，且許多抑製劑，例如瑞樂沙(zanamivir) 和奧司他韋羧酸鹽 (GS4071) 與此子區透過羧酸官能基產生交互作用。S2 子區由殘基 E119、D151、W179 和 E228 組成，且為帶負電荷的環境，其透過氫鍵與瑞樂沙的胍啶(quanidine)交互作用。S3 子區的三個殘基 R152、W179 和

I223 具有長側鏈。蛋白質-化合物複合物 (PDB 代碼 3B7E, 2HU4 及 1MWE) 的晶體結構顯示, 唾液酸、瑞樂沙和 GS4071 的乙醯基 (acetamido moiety) 一致地與該子區的 R152 形成氫鍵。WT NA 的 S4 子區 (I223, R225 和 S247) 及 S5 子區 (S247 和 E277) 是疏水性的。該兩個子區和 GS4071 之間的凡得瓦力交互作用是此抑制劑之結合所須的。應注意, 當雙重突變發生時, S4 子區從疏水性變成極性環境。由於這些子區對 NA 抑制劑結合扮演重要的角色, 能同時與 WT NA 和 MDR NA 之子區產生交互作用的化合物被認為是具潛力的抗-抗藥型抑制劑。

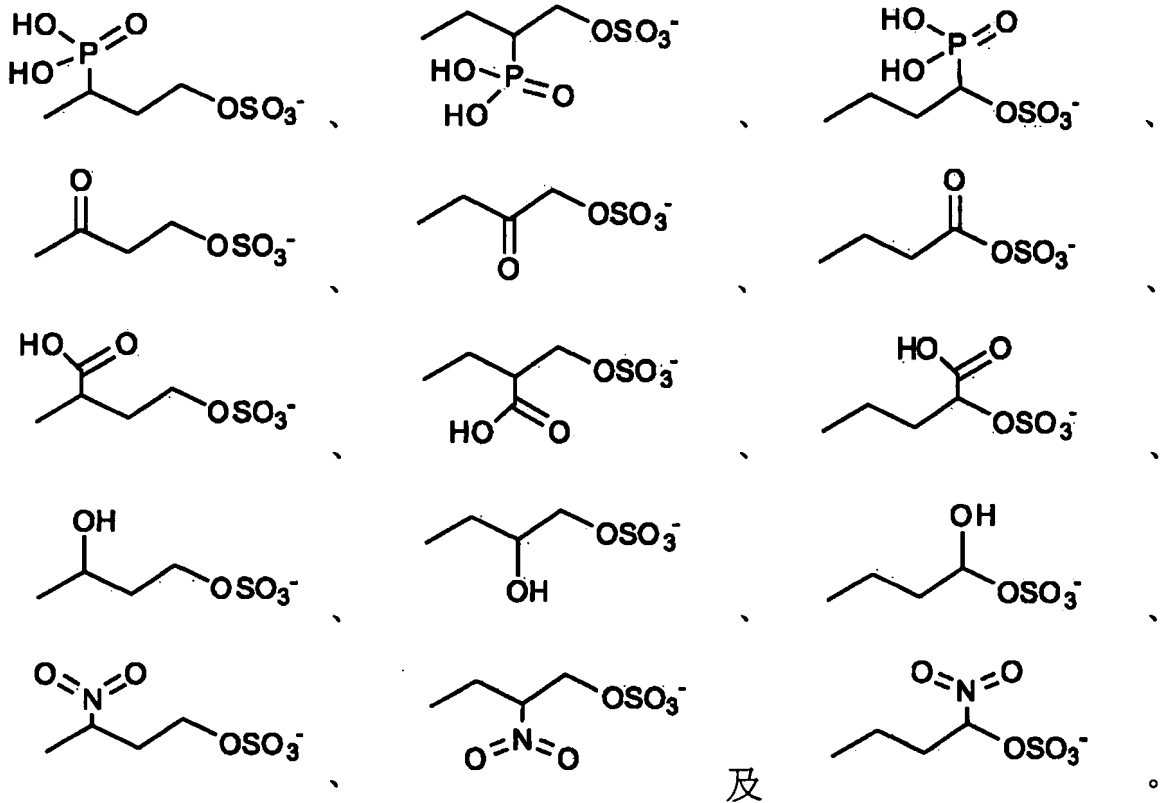
使用平行匹配評分 (parallel matching scores), 確認式 (I) 化合物是對 WT NA 和 MDR NA 兩者具抑制活性的潛力藥物



式中, R 係選自下列者所組成之群組:





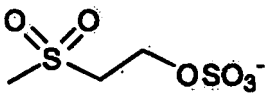


根據一具體實施例，可對式(I)化合物的結構進行修飾，以提升其效力。於一具體實施例中，利用能促進式(I)化合物與結合區之子區中殘基間的交互作用的基團來修飾式(I)化合物，可促進效力之提升。於一具體實施例中，利用可與結合區之子區中的殘基形成較多氫鍵的基團來修飾式(I)化合物可促進效力之提升。於一具體實施例中，可利用各種基團(例如，胍啶基、胺基、其類似物及/或及衍生物等)對式(I)化合物的結構進行修飾，以提升其效力。

#### 用於生物分析之化合物選擇 (Compound selection for bioassay)

選出同時與 WT NA 和 MDR NA 的所有子區特徵匹配的化合物，因為就算酵素發生突變，這些化合物仍持其效力。若其交互作用基團為物理-化學上互補於子區且若其形成適當的交互作用，則該化合物被視為是匹配子區的。例

如，基於該區域官能基地圖的分析，MDR NA 和 WT NA 的 S4 子區各自偏好氫鍵和凡得瓦力交互作用。選出同時與 WT NA 和 MDR NA 的所有子區特徵匹配的化合物後，對所選出的化合物進行生物分析測試。

式 (I) 化合物中，R 為  者係雷馬素艷藍

R (Remazol Brilliant Blue R, RB19, 蔥醌染料)。RB19 的磺基與 S4 突變子區形成氫鍵交互作用，因而 RB19 被視為匹配該 S4 子區的特徵。RB19 為具有抗-WT NA 及抗-MDR NA 之活性的抗-抗藥型抑制劑。此化合物能抑制流感 NIBRG14 (H5N1) 的 NA， $IC_{50}$  值為  $5.7 \mu M$  (微莫耳濃度) (請參閱後文中之表 2)，且其嵌合構型顯示與 5 個子區之交互作用與瑞樂沙和 GS4071 類似 (第 4 圖 A 和第 4 圖 B)。RB19 的磺酸鹽官能基，其具有類似於瑞樂沙和 GS4071 的羧酸基的物理-化學特性，與 S1 子區中的 R118 和 R368 形成靜電力交互作用。帶負電荷的官能基和帶正電荷的殘基之間的靜電力交互作用和已知的與唾液酸、瑞樂沙和 GS4071 之配體複合的 NA (PDB 代碼 3B7E, 2HU4, 和 1MWE) 一致。在 S2 子區中，RB19 的二甲基胺與 D151 產生氫鍵交互作用，扮演類似於瑞樂沙之胍啶基的角色。根據一具體實施例，可對 RB19 的結構進行修飾，以提升其效力。於一具體實施例中，對 RB19 的結構進行修飾，增加其與結合區的結合能力，能提升其效力。於一具體實施例中，利用能促進 RB19 與結合區之子區中殘基間的交互作用的基團來

修飾 RB19，可促進效力之提升。於一具體實施例中，利用可與結合區之子區中的殘基形成較多氫鍵的基團來修飾 RB19 可促進效力之提升。根據一具體實施例，對 RB19 的結構進行修飾(例如，增加胍啶基、胺基、其類似物及/或及衍生物等)，能提升其效力。舉例而言，於 RB19 增加胍啶基，其能與 S2 子區中之殘基 E119、D151、W179 和 E228 形成六個氫鍵，因而能提升其效力。

在 S3 子區內，RB19 的四氫蔥(tetrahydroanthracene)官能基上的酮佔領的位置與瑞樂沙和 GS4071 之乙醯胺基相似。此酮基透過氫鍵與 R152 交互作用(第 4 圖 A)；同樣地，瑞樂沙和 GS4071 的乙醯胺基與 R152 產生一個氫鍵。此外，四氫蔥與 S2 和 S3 子區之殘基 E117、D151、R152、W179 和 E228 的長側鏈產生凡得瓦力接觸，這個與 GS4071 和瑞樂沙的乙醯胺基不同的官能基，對作為 NA 抑制劑是有利的。類似於 GS4071 的 3-戊氧基，RB19 的芳香環上的磺(sulfone)基亦與 S4 子區中之殘基形成凡得瓦力接觸(第 4 圖 A 和第 4 圖 B)。此外，RB19 的硫酸單酯與 S5 子區的 S247 形成氫鍵交互作用。

進一步檢驗 RB19 的 MDR NA 抑制活性。此外，使用帶有各自單一突變的 NA(亦即，NA<sup>I223R</sup> 和 NA<sup>H275</sup>)來評估 RB19 的效力。利用昆蟲細胞蛋白質表現技術來表現這些 NA 以進一步測定它們對 RB19 的敏感度。首先以 GS4071 和瑞樂沙測試這些突變 NA。實驗結果顯示，GS4071 對突變 NA<sup>I223R</sup> 及 H275、NA<sup>I223R</sup> 和 NA<sup>H275</sup> 具有 8 倍至大於 20,000 倍

降低的敏感性，而瑞樂沙具有高達 2 至 36 倍降低的敏感性。相對地，RB19 對 NA<sup>WT</sup>、NA<sup>I223R 及 H275</sup>、NA<sup>I223R</sup> 和 NA<sup>H275</sup> 活性的 IC<sub>50</sub> 值則分別為 3.4、4.5、3.0 和 4.0  $\mu$  M (表 2)。表 2 中所示之倍數變化，同時也代表了敏感性(活性)降低的倍數(如第 4 圖 C 所示)。

RB19 的嵌合構型顯示，氫基和 S4 突變子區的 R223 之間產生兩個氫鍵交互作用(第 4 圖 D)，這應為 RB19 對 MDR NA 之類似抑制的原因。當環境從高疏水性改變成低極性子區時，該氫基能保持其與 S4 子區的交互作用。相反地，S4 突變子區無法容納 GS4071 的 3-戊氧基或瑞樂沙的甘油側鏈(第 4 圖 B)。因此，這兩種抑制劑對突變型 NA 效力降低。至於 GS4071，在 R223 和 3-戊氧基之間(2.4 Å)以及在 E277 和 3-戊氧基之間(2.0 Å)觀察到兩個衝突(clash)。瑞樂沙的甘油基相對遠離 R223，且該甘油基和 E277 之間的氫鍵被保留，因而導致抑制活性降低。由於 I223R 突變，因此四氫蔥的酮基的氫鍵配偶體從 S3 子區之 R152 改變至 S4 子區之 R223。

化合物 RB19 包括剛性核心框架：1,4-二胺基-9,10-二氧代蔥(dioxoanthracene)-2-磺酸鹽及可彎曲的側鏈；2-(3-甲基苯基)磺醯基乙基硫酸氫，其兩者均對作為抗-抗藥型抑制劑有利。同樣地，該兩者亦均為設計抗-抗藥型抑制劑的良好起始點。在 WT NA 和 MDR NA 兩者中，核心框架分別與 S1、S2 和 S3 子區形成靜電力、氫鍵和凡得瓦力交互作用(第 4 圖 A 和第 4 圖 D)。由於 S1、S2 和 S3 子區的

殘基 R118、D151 和 R368 在所有 NA 亞型中是高度保留的，並與受質唾液酸直接交互作用，在這些區上的突變可能會引起 NA 活性的喪失。這表示，該等子區有降低的獲取抗性的可能性，且該核心框架預期與這些保留區域交互作用。不像 S1、S2 和 S3 子區的高保留，S4 子區具有相對較低的殘基保留，並具有抗藥性突變例如 H275Y 和 I223R。2-(3-甲基苯基)磺醯乙基硫酸氫官能基具有應用於抗-抗藥型藥物設計的潛力，因為它的可撓側鏈可以容忍 S4 殘基的突變所引起的體積變化。可彎曲側鏈與 WT S4 子區形成凡得瓦力接觸。當發生突變時，它改變其導向，與 MDR S4 子區產生氫鍵。這些交互作用維持 RB19 的抑制活性，這和在 WT NA 中所觀察到的相似。這些結果也顯示，RB19 和兩個框架對作為 MDR NA 抑製劑有利。同樣地，RB19 和兩個框架對於新穎 MDR NA 抑製劑的設計為良好的起點。

### 藥物及試劑(Drugs and Reagents)

將索取或購買的選定化合物溶解在二甲亞砜 (DMSO) 中，並儲存於 -20°C。奧司他韋羧酸鹽 (GS4071) 是 Kak-Shan Shia 博士在台灣國家衛生研究院所合成的。螢光物質 2'-(4-甲基)- $\alpha$ -d-N-乙醯神經胺酸 (MU-NANA) 是自 Sigma-Aldrich 公司購得。

### 病毒及細胞(Viruses and Cells)

使用的流感病毒株是 A/WSN/33 (H1N1) 和 A/Udorn/72 (H3N2)。將兩種對 GS4071 具有抗藥性之臨床分離株，

A/TW/70058/09 (H1N1) 和 A/TW/70066/09 (H1N1) 用於抗病毒分析。Madin-Darby 犬腎 (MDCK) 細胞係購自美國典型培養物保藏中心 (American Type Culture Collection) (Manassas, 維吉尼亞), 並保持在 Dulbecco 改良的含有 10% 胎牛血清的 Eagle 培養基 (DMEM) 中。

**產生帶有 H275Y 及 I223R 點突變之抗-奧司他韋和抗-瑞樂沙的 NA**

從我們先前的研究取得用於病毒株 NIBRG14 (H5N1) 的 N1 神經胺酸酶基因。使用含有來自病毒株 NIBRG14 (H5N1) 之 NA 基因的重組質體 pGEM-T easy, 作為用於 NA 之 I223R 基因定點突變 PCR 的標的。為了建構 I223R 和 H275Y 雙重突變表現質體, 將含有單點突變 H275Y 的 NA 基因 (H5N1) 的重組質體 pGEM-T easy, 作為用於 NA 之基因定點突變 PCR 的標的。

為了產生特定 I223R 突變, 設計兩組引子如下示:

I223R-F (5'-GAG TTG GAG GAA CAA CAG ACT GAG AAC TCA AGA GTC TG-3') (SEQ ID NO. 1), 以及

I223R-R (5'-CAG CTC TTG AGT TCT CAG TCT GTT GTT CCT CCA ACT C-3') (SEQ ID NO. 2)。

使用 0.4(毫莫耳濃度(mM))的 dNTP, 0.3  $\mu$  M 的引子對, 2 奈克(ng)模板 DNA, 和適當量的 AccuPrime™ Turbo Pfu DNA 聚合酶和緩衝液 (Invitrogen 公司, Carlsbad, CA) 藉由 PCR 創建突變位點。PCR 的熱循環程序如下: 95°C 5 分鐘, 隨後 94°C 30 秒進行 20 個循環, 55°C 1 分鐘, 及 68°C 8

分鐘，且在 68°C 進行最後延展(extension)7 分鐘。經 PCR 增幅後，加入 DpnI 以除去質體模板。將經增幅的 DpnI-不敏感性突變質體導入大腸桿菌，以選擇設計的突變序列。

### 在昆蟲細胞中製造 NA

如習知所述方法，將 NA 表現結構(含有 BacPAK8 病毒線性 DNA)共轉染至 Sf9 昆蟲細胞。收集來自經感染細胞的培養液，然後儲存作為產生供酵素分析用之 NA 的病毒母液(virus stock)。產生重組桿狀病毒-Bac-NA<sub>wr</sub>，Bac-NA<sup>I223R</sup>，Bac-NA<sup>H275Y</sup>，及 Bac-NA<sup>I223R 及 H275Y</sup>-並表現源自流感 N1 神經胺酸酶(NIBRG14(H5N1))\_ENREF\_41 之野生型、I223R、H275Y、及雙重突變 I223R/H275Y 突變體。在 22°C 以 2.5 毫克/毫升(mg/ml)鏈黴蛋白酶(pronase)處理全部細胞裂解物 1 小時。

### 與細胞相關及細胞的病毒產量(Cell-associated and cellular virus yield)

以 MOI 0.001 的 A/WSN/33 感染 MDCK 細胞後，將各種濃度的化合物加入細胞培養基。48 小時後，取走培養基上清液，並刮下各孔中經感染的細胞，及藉由在 16000 g 離心 5 分鐘收集細胞。為了測定在以抑制劑處理後細胞外和與細胞相關的病毒效價，分析上清液和裂解物的神經氨酸酶活性。

### 神經胺酸酶抑制劑之抗病毒活性的評估

為了要測量經鑑定的抑制劑對抑制經流感病毒感染的 MDCK 細胞中的細胞病變效應(CPE)的能力，進行 Hung

等人所述的 CPE 抑制分析程序(Hung HC, Tseng CP, Yang JM, Ju YW, Tseng SN, et al. (2009) Aurintricarboxylic acid inhibits influenza virus neuraminidase. Antiviral Research 81: 123-131)。測定使病毒之 CPE 減少 50% 所需之測試化合物的濃度( $IC_{50}$ )。在這些實驗中，以 GS4071 作為正對照組。如前文之 Hung 等人所述的方法，使用溶斑分析(plaque assay)測定抑制流感病毒複製的效果。然後測定減少斑數量 50% 所需的抑制劑濃度 ( $EC_{50}$ )。使用 MTS 分析測定抑制劑的細胞毒性。藉由 ELISA 測量在 OD 490 nm 的光密度值。

### 神經胺酸酶抑制分析(Neuraminidase Inhibition Assay)

為了使病毒感染性失活，如前文之 Hung 等人所述的方法，以甲醛 (0.02%) 使經病毒感染的 MDCK 細胞之細胞培養基上清液失活。使用螢光物質 MU-NANA 測量 NA 的酵素活性。為了評估經鑑定化合物的抑制效果，將失活的病毒上清液與測試化合物在 30°C 預培養 30 分鐘。在含有經稀釋病毒的上清液 (含有活性流感 NA) 和每孔 MES 緩衝液 (32.5 mM MES, 4mM 的氯化鈣, pH 6.5) 中有 100  $\mu$  M 的螢光物質的 96 孔盤中進行分析。然後使酵素反應在 37°C 進行 1 小時，並藉由加入含有 25% 的乙醇和 0.1 M 甘胺酸 (pH 為 10.7) 的停止溶液而終止反應。使用具有激發波長和發射波長分別為 330 奈米(nm)和 445 nm 的 Fluoroskan 螢光分光光度計 (Labsystems, Helsinki, 芬蘭) 測定產物 4-MU 的螢光強度。使用 GS4071 作為正對照組，測定 NA 活性的  $IC_{50}$  值。



## 使用細胞實驗測試 RB19 的效果

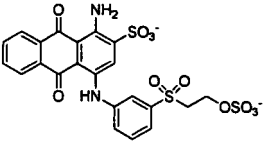
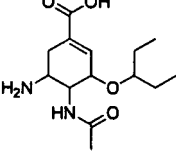
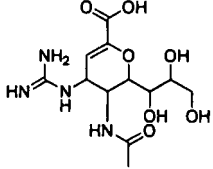
進行溶斑減少分析 (plaque-reduction assay) 以檢測 RB19 抑制流感病毒複製的效果。由於實驗室水平的生物安全限制，使用 A/WSN/33 (H1N1) 和 A/Udorn/72 (H3N2) 病毒株取代 NIBRG14 (H5N1) 病毒株來進行驗證。在溶斑減少分析中，將低 MOI 用於產生約 50 至 100 個溶斑形成單位/每孔細胞。在兩種不同流感病毒株之病毒溶斑減少分析中於各種濃度評估 RB19。在這些實驗中，RB19 減少因 MDCK 細胞感染造成的溶斑形成單位 (PFU)，且呈劑量依賴性表現 (第 6 圖 A 和第 6 圖 B)。病毒溶斑形成的  $EC_{50}$  值估計為流感 A/WSN/33 (H1N1) 和 A/Udorn/72 (H3N2) 分別為  $2.7 \mu M$  和  $2.8 \mu M$ 。

再檢測 RB19 對子代病毒的產量的影響。以 MOI 為 0.001，使用 A/WSN/33 感染培養的 MDCK 細胞，隨後添加各種濃度的 RB19。收集感染後 48 小時的培養上清液和細胞裂解物。病毒效價 (virus titer) 反映存在於所收集樣品中的 NA 活性。如以螢光訊號顯示的 NA 活性所示，以 RB19 處理的細胞大幅降低病毒產量 (第 6 圖 C)。此外，這些結果證實，來自經 RB19 處理的感染細胞培養的細胞裂解物，比上清液中存在有較高的 NA 活性。這些結果顯示，RB19 處理可能導致抑制了流感病毒粒子釋放到培養基，表示 NA 活性是此新穎抗流感化合物的主要標的。

由於 RB19 在酵素分析和細胞分析中為有效的，因此再使用最近兩個臨床分離株，A/TW/70058/09 (H1N1) 和

A/TW/70066/09 (H1N1) (其對 GS4071 有抗性), 檢測 RB19 的抗流感活性。從病毒溶斑減少分析數據顯示, RB19 對流感 A/TW/70058/09 (H1N1) 和流感 A/TW/70066/09 (H1N1) 複製的抑制之  $EC_{50}$  值分別為  $9.8 \mu M$  和  $11.9 \mu M$ 。因此, 目前的抗藥性問題可藉由 RB19 及/或其新穎類似物來緩解。

表 2 RB19、GS4071 及瑞樂沙對野生型 NA 及突變型的抑制

NA 類型 <sup>a</sup>	IC <sub>50</sub> (nM) (倍數變化) <sup>b</sup>		
	RB19	GS4071	瑞樂沙
NA <sup>WT</sup>			
NA <sup>WT</sup>	$5.70 \times 10^3$	0.13	0.65
Bac-NA <sup>WT</sup>	$3.4 \times 10^3$ (1)	0.26 (1)	0.54 (1)
Bac-NA <sup>I223R</sup>	$3.0 \times 10^3$ (1)	8.22 (32)	4.28 (8)
Bac-NA <sup>H275Y</sup>	$4.0 \times 10^3$ (1.2)	417.2 (1,604)	1.26 (2)
Bac-NA <sup>H275Y&amp;I223R</sup>	$4.5 \times 10^3$ (1.3)	7,777.95 (29,915)	10.7 (20)

<sup>a</sup>NA 具有不同的突變。Bac-NA<sup>WT</sup>、Bac-NA<sup>I223R</sup>、Bac-NA<sup>H275Y</sup> 及 Bac-NA<sup>H275Y&I223R</sup> 係藉由分別表現來自 NIBRG14 (H5N1) 野生型、H275Y、I223R、H275Y 及 I223R 突變而得。

<sup>b</sup> 倍數變化係藉由比較突變型及 Bac-NA<sup>WT</sup> 之 IC<sub>50</sub> 值而得。

在藥物治療期間導致治療失敗者常是因為出現抗藥性突變。例如, 在以奧司他韋和瑞樂沙治療後檢測到病人之 NA 的雙重突變, 其導致對 NA-抑制藥物之敏感度的降

低。又例如，吉非替尼(gefitinib)和埃羅替尼(erlotinibare)是經常用來標的表皮生長因子受體以治療非小細胞肺癌者。雖然藥物是有效的，但是許多病人由於抗藥性突變最後仍是復發。這些實例顯示，需要有利的藥物篩選方法以利篩選能同時對突變型/抗藥型標靶有效的藥物，該篩選方法亦對研發可用於抗藥型標靶的新穎抑制劑是有利的。

藉由上述之新穎的藥物篩選方法，能篩選出能抑制 WT NA 和 MDR NA 兩者的化合物。

藉由上述藥物篩選方法，篩選出式(I)化合物，尤其是 RB19，為具潛力的藥物，可用以作為有效的 NA 抑制劑，並用於預防或治療相關疾病或異常。同時，式(I)化合物，對設計有效之 NA 抑制劑是良好的開端，能用於對抗對奧司他韋具抗藥性之流感病毒（具 H275Y）、對抗對瑞樂沙具抗藥性之流感病毒（具 I223R），以及對抗具多重藥物抗藥性之流感病毒（具 I223R 和 H275Y）。

#### 【符號說明】

無。

【序列表】(請換頁單獨記載)

序列表 (SEQUENCE LISTING)

<110> 國立交通大學

<120> 藥物篩選方法

<160> 2

<170> PatentIn Version 3.5

<210> 1

<211> 38

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223> PCR 引子

<400> 1

gagttggagg aacaacagac tgagaactca agagtctg 38

<210> 2

<211> 37

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

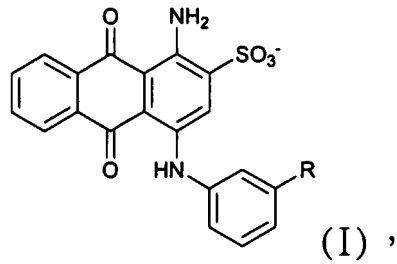
<223> PCR 引子

<400> 2

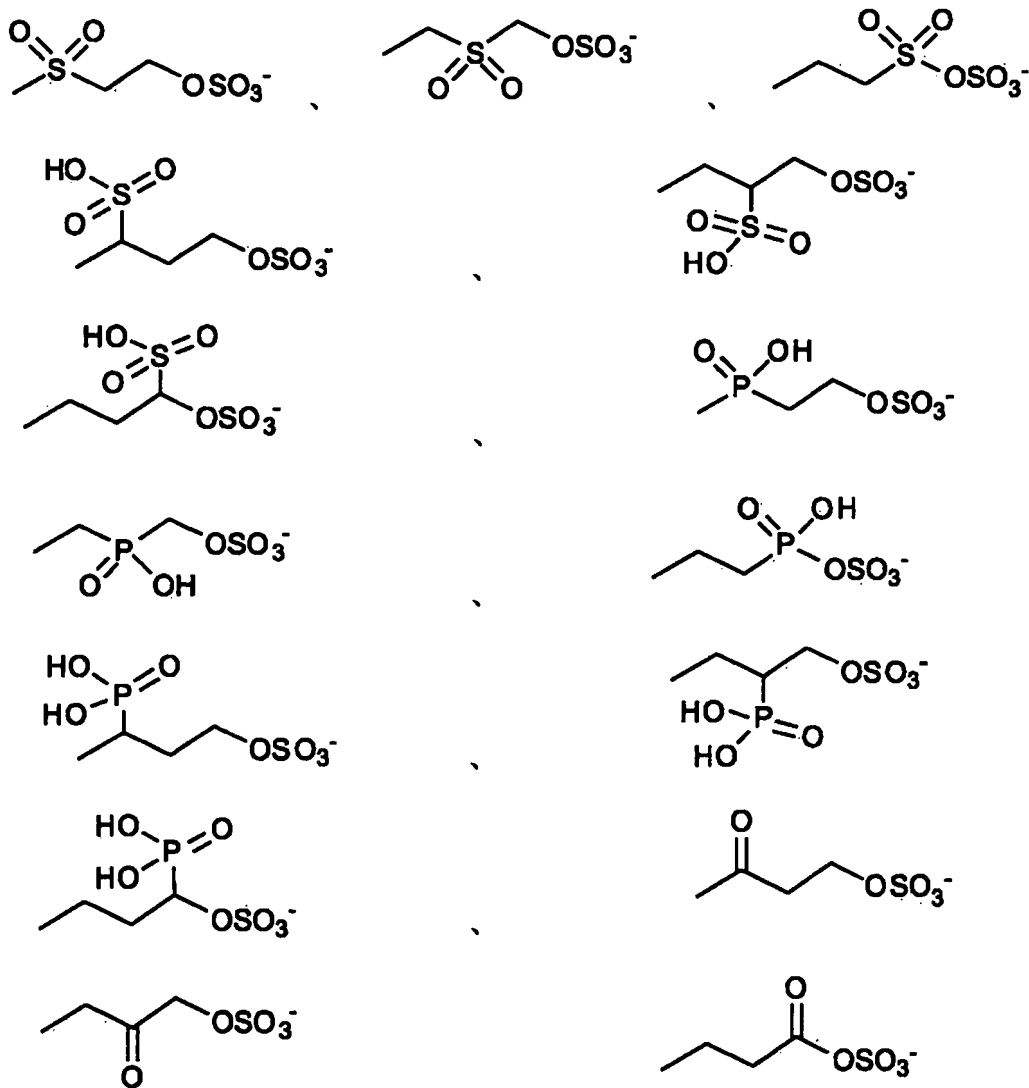
cagctcttga gttctcagtc tgttggtcct ccaactc 37

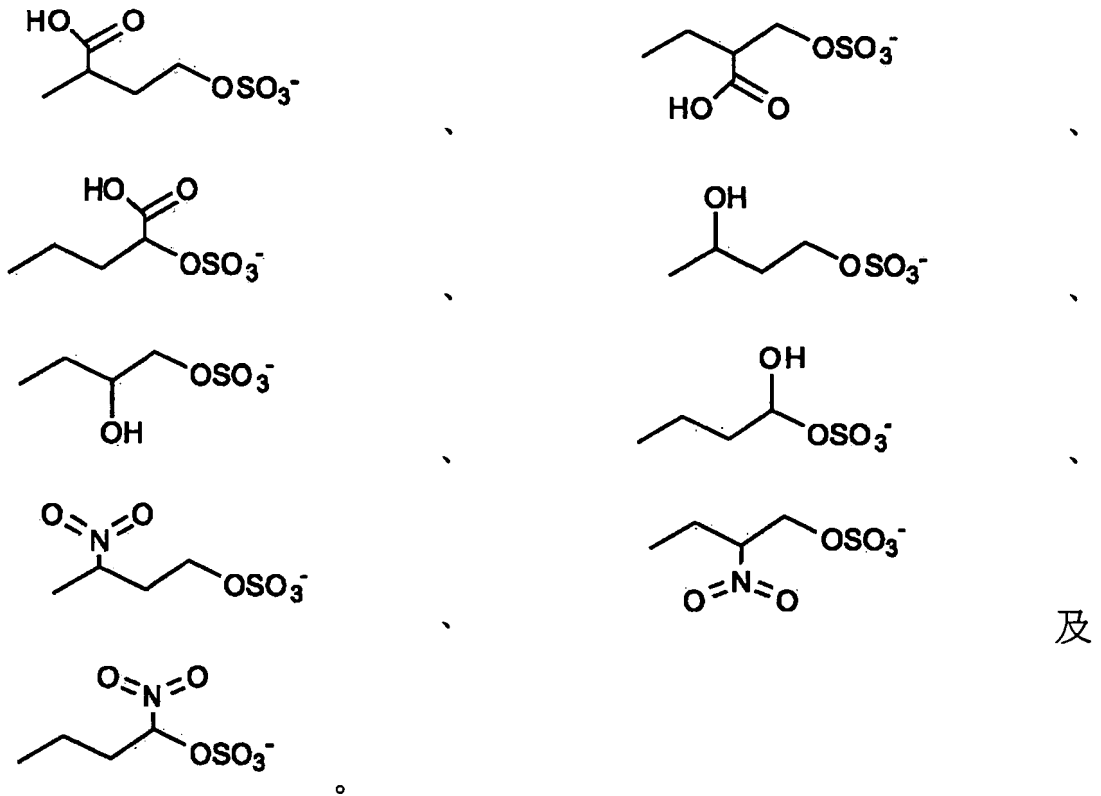
## 申請專利範圍

1. 一種式(I)化合物的用途，係用於製備神經氨酸酶抑制劑：

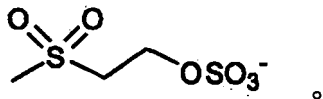


式中，R 係選自下列者所組成之群組：

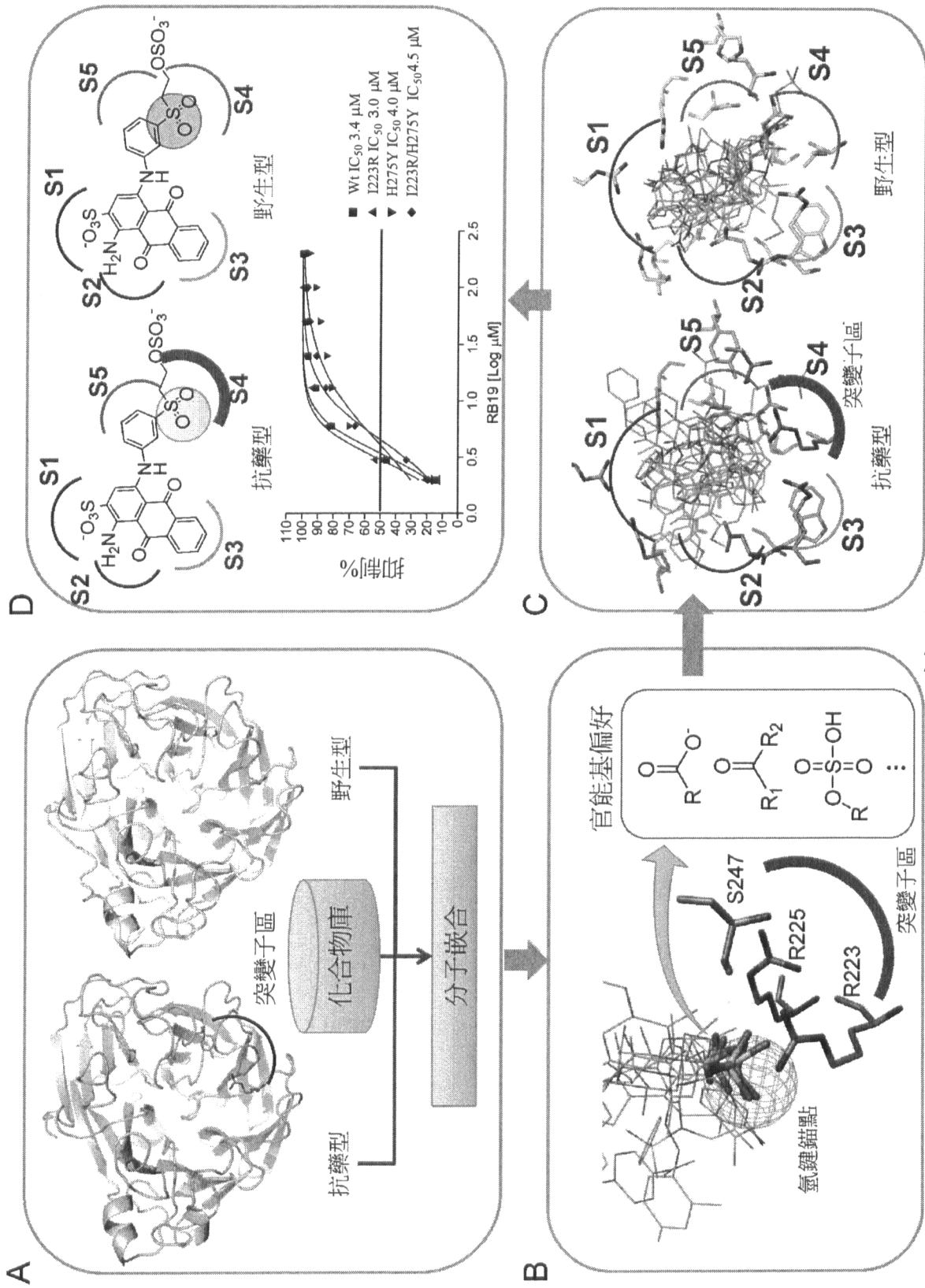




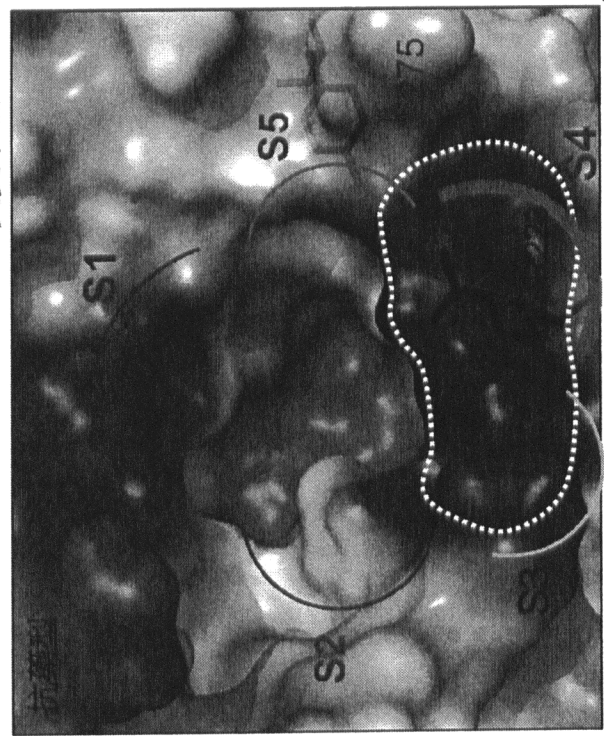
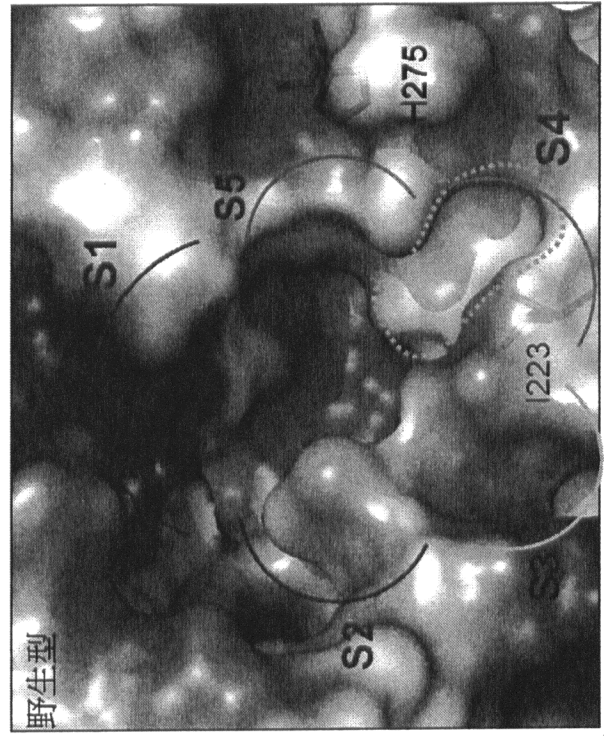
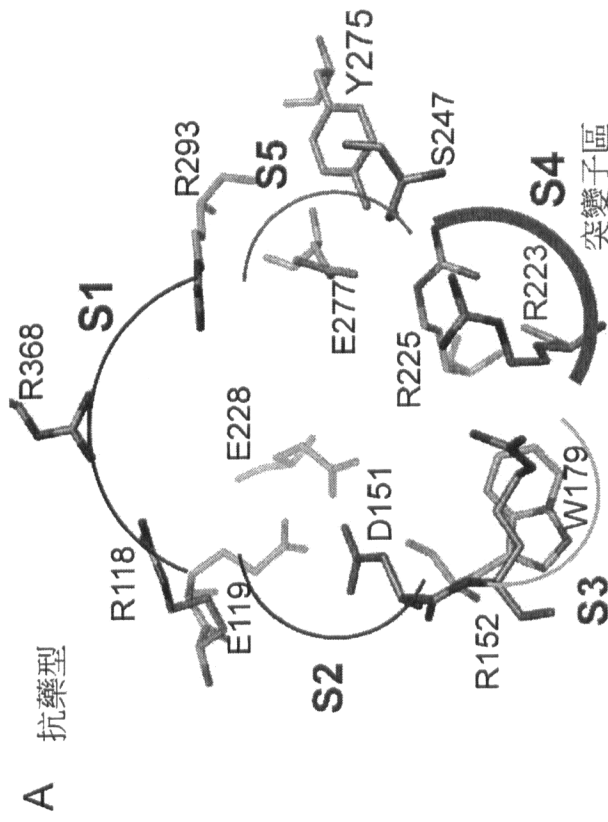
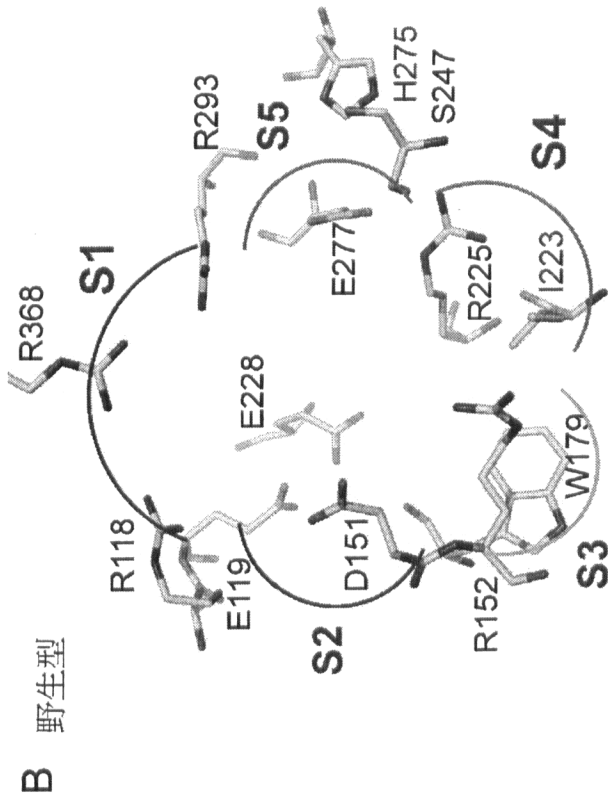
2. 如申請專利範圍第 1 項所述之用途，其中，該神經氨酸酶包括野生型神經氨酸酶及突變型神經氨酸酶。
3. 如申請專利範圍第 1 項所述之用途，其中，R 係



4. 如申請專利範圍第 1 項所述之用途，其中，該神經氨酸酶抑制劑係用於製備治療流行性感冒之藥物。

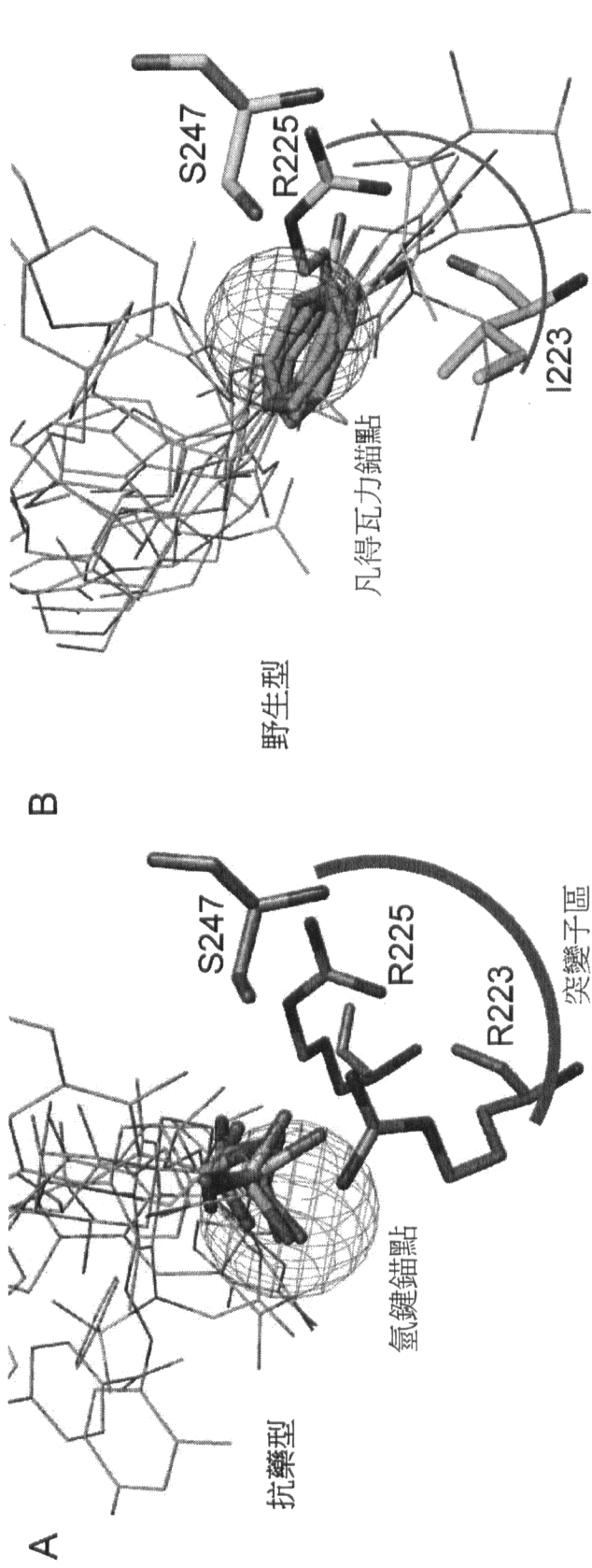


第1圖



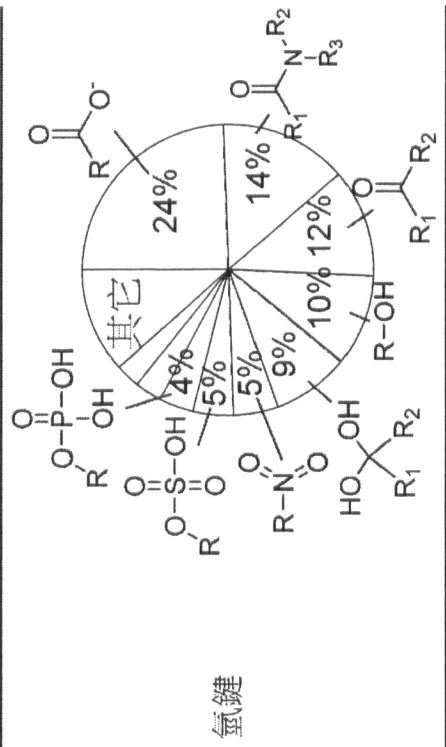
第2圖





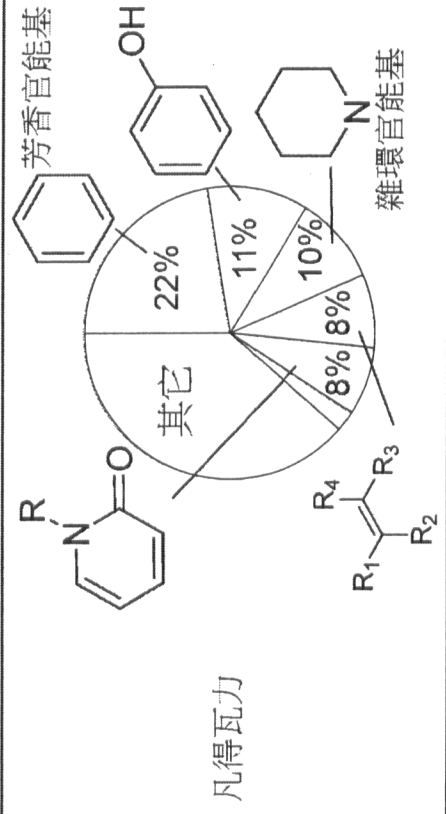
錨點類型

官能基偏好

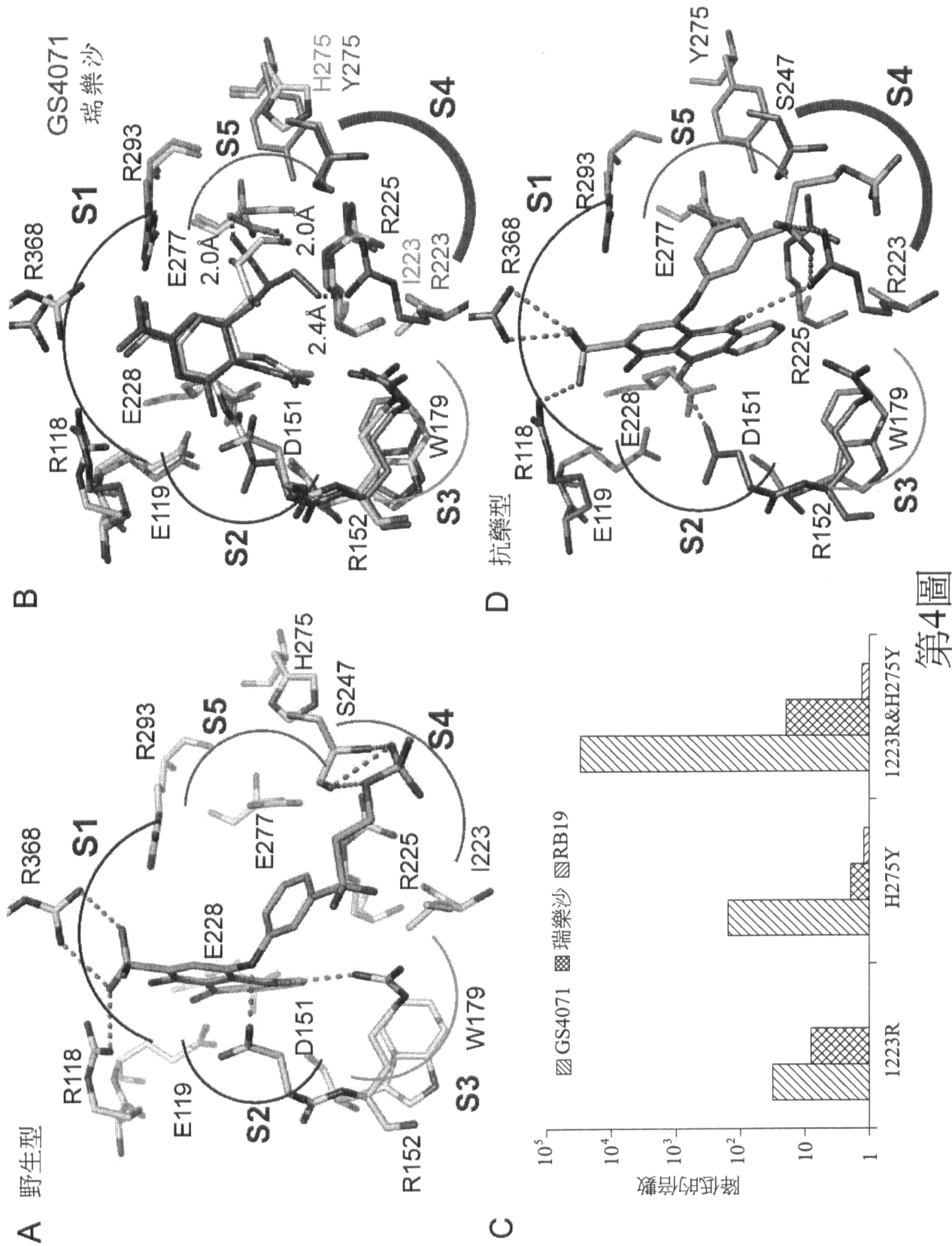


錨點類型

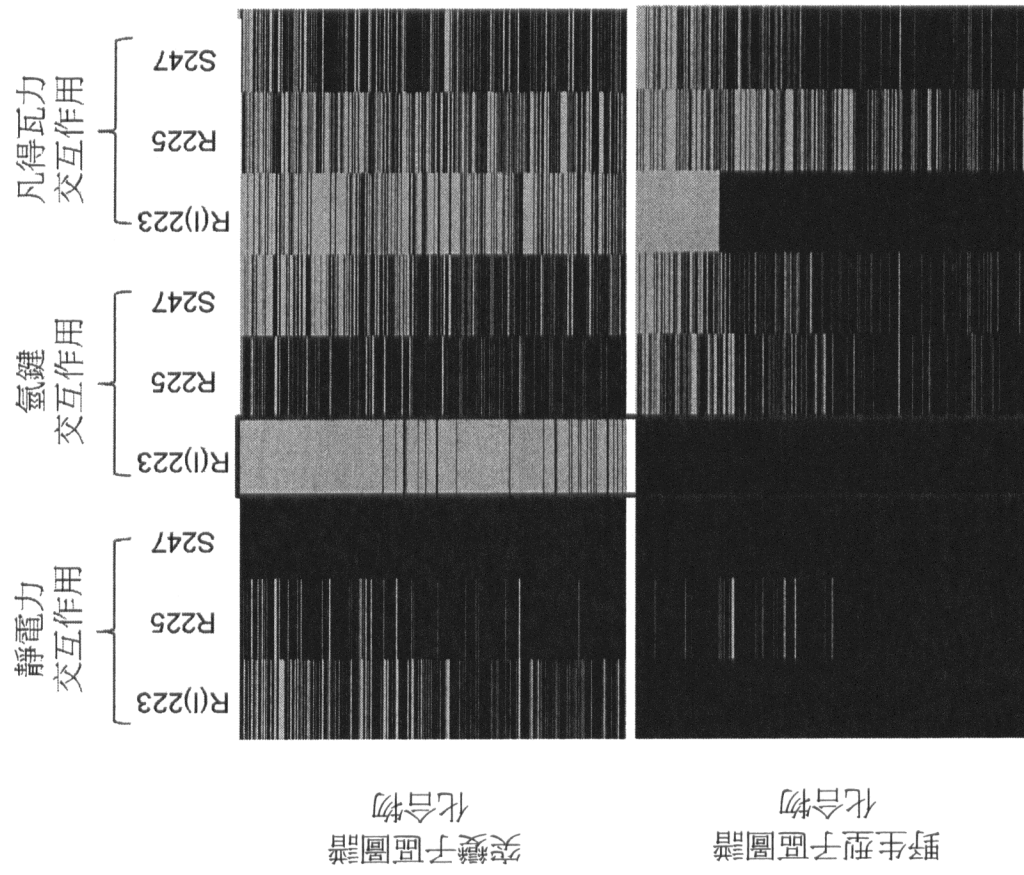
官能基偏好



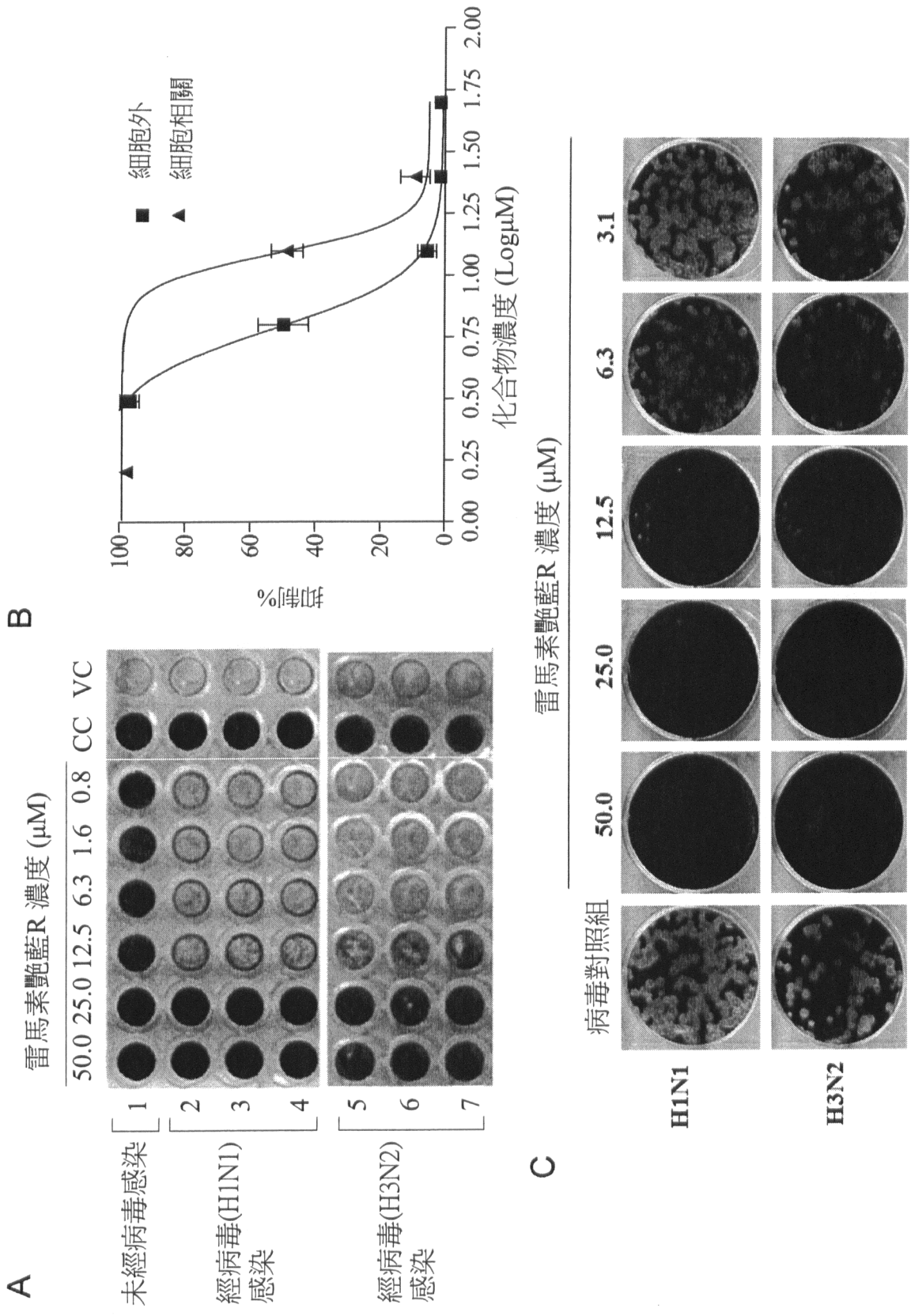
第3圖



第4圖



第5圖



第6圖