



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109529026 A

(43)申请公布日 2019.03.29

(21)申请号 201811368987.7

A61K 9/00(2006.01)

(22)申请日 2013.02.19

A61P 31/16(2006.01)

(30)优先权数据

A61P 31/14(2006.01)

61/600,545 2012.02.17 US

A61P 11/00(2006.01)

61/727,627 2012.11.16 US

(62)分案原申请数据

201380009763.6 2013.02.19

(71)申请人 安迅生物制药公司

地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 朗·莫斯 李铁军

(74)专利代理机构 北京安信方达知识产权代理

有限公司 11262

代理人 王玮玮 郑霞

(51)Int.Cl.

A61K 38/47(2006.01)

权利要求书1页 说明书25页

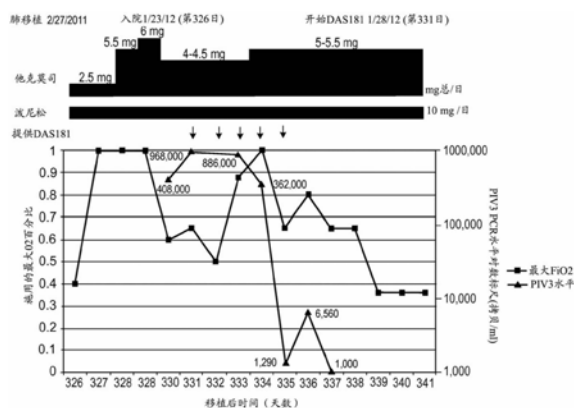
序列表4页 附图19页

(54)发明名称

用于治疗流感和副流感患者的方法、化合物和组合物

(57)摘要

本申请涉及用于治疗流感和副流感患者的方法、化合物和组合物。提供了一种通过向免疫功能低下患者的呼吸道施用包含治疗有效量的具有唾液酸酶活性的蛋白的组合物,减少或治疗该患者中的副流感或流感病毒感染的方法。



1. 一种治疗患者的方法,所述方法包括向所述患者的呼吸道施用包含治疗有效量的具有唾液酸酶活性的多肽的液体组合物。
2. 如权利要求1所述的方法,其中所述患者感染了流感病毒或副流感病毒。
3. 如权利要求1所述的方法,其中所述患者患有减少的呼吸功能。
4. 如权利要求1所述的方法,其中所述液体组合物为水性组合物。
5. 如权利要求1所述的方法,其中所述患者的呼吸功能不适于使用干粉吸入器。
6. 如权利要求1所述的方法,其中所述液体使用雾化器、蒸发器、气管内插管、鼻腔喷雾器、加压定量吸入器或呼吸启动的加压定量吸入器来施用。
7. 如权利要求1所述的方法,其中所述液体组合物中的多肽的浓度为0.1-10.0mg/mL。
8. 一种减少或治疗免疫功能低下患者中的副流感或流感病毒感染的方法,所述方法包括向所述患者的呼吸道施用包含治疗有效量的具有唾液酸酶活性的蛋白的组合物。
9. 一种用于减少患有PIV感染的患者中的PIV的病毒载量的方法,所述方法包括向所述患者施用包含DAS181的组合物。
10. 一种用于改善患有PIV感染的患者中的肺功能的方法,所述方法包括向所述患者施用包含DAS181的组合物。

用于治疗流感和副流感患者的方法、化合物和组合物

[0001] 本申请是申请日为2013年2月19日,申请号为201380009763.6,发明名称为“用于治疗流感和副流感患者的方法、化合物和组合物”的申请的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明涉及用于治疗流感和副流感患者的方法、化合物和组合物。

[0003] 背景

[0004] 人副流感病毒(PIV)是呼吸道疾病的常见原因。四种人类PIV的临床和流行病学特征不同。PIV-1和PIV-2感染与喉气管支气管炎或声带和上部和中部呼吸道的其他部分周围的肿胀相关。PIV-3通常与细支气管炎和肺炎相关。PIV-4通常比其他类型的人PIV导致轻的症状。

[0005] 流感病毒(IFV),可导致主要影响鼻、喉、支气管和肺部的感染。感染特征为突发性高热、肌肉酸痛、头痛和严重不适、干咳、喉咙痛和鼻炎。一些流感病毒很容易通过感染者咳嗽或打喷嚏时产生的飞沫和小颗粒从人传染人。大多数受感染的人一到两周内恢复,而无需药物治疗。然而,在很年轻、老人和具有其他严重医疗状况的那些人中,感染可导致潜在状况的严重并发症、肺炎和死亡。此外,流感病毒的某些菌株和类型可甚至在健康的成年人中导致严重的疾病。

[0006] 干粉吸入器通常被用于施用药物至呼吸道,例如,肺部。然而,对于一些患者,例如,儿童,特别是5岁以下的儿童,老人,免疫功能低下的患者,以及重度患者,干粉吸入器可以是难以有效地使用。

发明内容

[0007] 本文描述了使用具有唾液酸酶活性的蛋白例如融合蛋白(例如,DAS181)的液体(例如,雾化的)制剂治疗患者的方法和制剂。方法和制剂可被用于治疗PIV或流感病毒(IFV)感染的患者。本文还描述了,使用具有唾液酸酶活性的蛋白例如融合蛋白(例如,DAS181)治疗免疫功能低下患者中PIV感染的方法。此类免疫功能低下可用于制剂或液体(例如,雾化的)制剂进行治疗。

[0008] 具有唾液酸酶活性的有用的蛋白包括DAS181,DAS181是由与将唾液酸酶锚定至呼吸道上皮的双调蛋白糖胺聚糖结合序列融合的唾液酸酶功能域组成的46-kDa重组融合蛋白。通过从宿主细胞表面裂解唾液酸(SA),DAS181灭活由PIV和IFV两者识别的宿主细胞受体,并由此潜在地使宿主细胞抗PIV和IFV感染。

[0009] 本文描述了用于治疗患者中PIV或IFV感染的方法,方法包括:向患者的呼吸道施用包含治疗有效量的包含具有唾液酸酶活性的蛋白的液体组合物(例如,雾化的组合物)的组合物。本文还描述了用于治疗处于PIV或IFV感染风险中的受试者的方法,方法包括:向受试者的呼吸道施用包含包含具有唾液酸酶活性的蛋白的液体组合物(例如,雾化的组合物)或干粉制剂的组合物(例如治疗有效量的组合物)。在各种情况:患者是免疫功能低下的患者;患有原发性免疫缺陷;免疫功能低下的患者患有继发性免疫缺陷;免疫功能低下的患者

正在或已经用免疫抑制疗法治疗;免疫功能低下的患者正在或已经用化疗药物治疗;免疫功能低下的患者是移植患者;蛋白包含或由与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2至少90%(95%、98%)同一或完全同一的氨基酸序列组成;蛋白质是DAS181;组合物还包含一种或更多种另外的化合物;施用是通过使用干粉吸入器;施用是通过使用鼻腔喷雾器(nasal spray);施用是通过使用雾化器(nebulizer);施用是通过使用气管内插管(ET管),和干粉吸入器;蛋白包含唾液酸酶或其活性部分。在一些情况下:唾液酸酶或其活性部分包含与以下至少90%、95%、98%、99%或100%同一的氨基酸序列:粘性放线菌(*Actinomyces viscosus*)唾液酸酶或其催化结构域,产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*)唾液酸酶或其催化结构域,产脲节杆菌(*Arthrobacter ureafaciens*)唾液酸酶或其催化结构域,绿色小单孢菌(*Micromonospora viridifaciens*)唾液酸酶或其催化结构域,人Neu2唾液酸酶或其催化结构域,或人Neu4唾液酸酶或其催化结构域;以及在其他情况下,唾液酸酶或其活性部分与粘性放线菌唾液酸酶或其催化结构域至少90%同一。在一些情况下:肽包含锚定结构域,其中锚定结构域是糖胺聚糖(GAG)结合域(例如,GAG结合结构域与以下至少90%、95%、98%、99%或100%同一:人血小板第4因子的GAG结合结构域、人白细胞介素8的GAG结合结构域、人抗凝血酶Ⅲ的GAG结合结构域、人类载脂蛋白E的GAG结合结构域、人血管相关迁移蛋白的GAG结合结构域、或人双调蛋白的GAG结合结构域)。

[0010] 在某些情况下,患者具有的肺功能不足以有效地使用干粉吸入器或完全不能使用干粉吸入器,例如依赖机械通风设备的患者。在一些情况下,患者是感染了PIV的免疫功能低下的患者并用液体制剂治疗(例如,使用雾化器)或用干燥制剂治疗(例如,使用干粉吸入器)。

[0011] 在一些情况下,免疫功能低下的患者可以包括患有以下的患者:恶性肿瘤、白血病、胶原血管疾病、先天性或获得性免疫缺陷,包括AIDS、接受免疫抑制治疗的器官移植接受者、以及接受免疫抑制治疗的其他患者。

[0012] 本发明的其他特征和优势从以下详细说明书和附图、以及权利要求书将是明显的。

附图说明

[0013] 图1是一组描绘了病毒的生长和培养的照片。将LLCMK-2细胞在感染前24小时播种,并且然后以0.02mL或0.2mL的病毒培养物阳性样本接种。细胞在感染之前是仅亚汇合的。接种后3和5天记录感染进展。接种后3天可检测到细胞死亡和CPE,且接种5天后具有显著进展。0.02mL和0.2mL两者的初始接种物足以引发感染。NV=非病毒。PI=感染后。

[0014] 图2是描绘DFA分析的结果的照片组。细胞在盖玻片上生长,以TFID50感染,然后感染后固定72小时。在固定后,使用Light Diagnostics PIV3DFA法染色细胞。荧光在显微镜下使用对染色特异性的通道可视化,并使用ProgRes CapturePro软件(Jenoptik)拍摄照片。

[0015] 图3是描绘了使用DFA试剂的代表性噬斑的照片组。噬斑测定法在24孔板中进行,且然后使用DFA试剂如材料和方法中描述的染色。显示了来自每个稀释度的代表噬斑,且将从计数孔中的所有噬斑获得的最终滴度显示在图像的右侧。为了获得滴度,将可计数孔取平均值并乘以稀释度。将噬斑表示为绿色,而将细胞核表示为蓝色。TNTC=不计其数。PI=

感染后。

[0016] 图4是描绘了使用DFA试剂的代表性噬斑的照片组。噬斑测定法在24孔板中进行,且然后使用DFA试剂如材料和方法中描述的染色。显示了来自每个稀释度的代表噬斑,且将从计数孔中的所有噬斑获得的最终滴度显示在图像的右侧。为了获得滴度,将可计数孔取平均值并乘以稀释度。将噬斑表示为绿色,而将细胞核表示为蓝色。TNTC=不计其数。PI=感染后。

[0017] 图5是描绘第6天和第7天时标准噬斑减少测定的一对图。噬斑减少测定在6孔板中用渐增浓度的DAS181进行,并且在感染后6天或7天固定,此时噬斑可被可视化。DAS181在整个试验中保持在覆盖层中。计数噬斑,并作图,以确定EC50值。

[0018] 图6是使用荧光分析描绘代表性噬斑形成的一组照片。感染后48小时,将细胞固定并用PIV3DFA试剂可视化噬斑形成。将噬斑表示为绿色,而将细胞核表示为蓝色。

[0019] 图7是描绘以一式三份进行的噬斑减少测定的图,且确定每个测定的EC50值。使用这些值建立约4nM的平均EC50值。

[0020] 图8是一组描绘了抑制TCID50的照片。将LLCMK-2细胞在感染前24小时播种,并然后用已知的TCID50感染。感染后两小时,将板用0.05%戊二醛固定,且然后用 α PIV抗体染色。暗斑块表示病毒的传播。

[0021] 图9是一组描绘病毒传播分析的照片。以0.1的MOI感染细胞,且然后测定感染后24、48和72小时用或不用DAS181处理(10nM)的病毒传播。将细胞固定并然后用PIV3特异DFA试剂染色且在显微镜下可视化。PIV3感染的存在以绿色来表示,而细胞核以蓝色来表示。

[0022] 图10是描绘用10nM DAS181处理的病毒释放的图。感染(MOI=0.1)后,用10nM DAS181处理细胞(或模拟处理),并然后通过噬斑测定法测量从细胞释放的感染病毒。将组织培养上清液(有和没有DAS181)在第1天、第2天和第3天进行测试,以及将滴度对时间作图。

[0023] 图11是描绘第6天PIV3病毒释放研究的图。以低MOI(0.01)感染细胞,并然后用10nM DAS181处理或模拟处理。病毒释放通过采集组织培养上清液来测量且传染性病毒通过噬斑测定来测定。

[0024] 图12是一组描绘患者样品的最初接种的照片。从EIND患者采集的怀疑包含PIV3的样品被用于接种LLCMK2细胞。监测培养物的CPE和病毒感染的证据。在感染后第5天,用0.2mL患者样品接种的孔展示基本上CPE和细胞死亡,指示病毒感染。从这些孔中收集病毒用于进一步扩增。PIV3的存在由DFA测定来证实(图13)。NV对照显示无PIV3抗原的阳性染色,而受感染的PIV3样品显示,视野内的所有细胞均是PIV3阳性的(以绿色表示)。细胞核以蓝色来表示。

[0025] 图13是描绘鉴定病毒类型的照片组。测试接种的病毒培养物中呼吸道病毒的存在,且具体地由DFA分析PIV3的存在。将感染的细胞布点在载玻片上并用适当的抗体(识别一组呼吸道病毒或对PIV3特异性的)染色。荧光在显微镜下使用对染色特异性的通道可视化,并使用PROGRES CapturePro软件(Jenoptik)拍摄照片。

[0026] 图14是描绘使用DFA试剂的代表性噬斑的照片组。噬斑测定法在24孔板中进行,且然后使用DFA试剂如材料和方法中描述的染色。显示了来自一个稀释度的代表性噬斑,证明在48小时时病毒噬斑的迅速传播。为了获得滴度,将可计数孔取平均值并乘以稀释度。噬斑

以绿色来表示,而视野中的所有细胞以蓝色来表示。

[0027] 图15是描绘噬斑减少测定法(PRA)的图。以一式三份进行噬斑减少测定,且对每个测定确定EC50值。使用这些值建立~28nM的平均EC50值。

[0028] 图16是一组描绘抑制TCID50的照片。将LLCMK-2细胞在感染前24小时播种,并然后用已知的TCID50感染。感染后2小时,洗涤板以除去残留的病毒,并然后用含连续稀释的DAS181的琼脂糖/介质覆盖。感染后3天,将板用0.05%戊二醛固定,且然后用aPIV3抗体染色。绿色荧光指示病毒穿过单层的传播,而所有的细胞通过蓝色染色来指示。

[0029] 图17是描绘3天PIV3病毒释放研究的图。以低MOI(0.01)感染细胞,并然后用100nM DAS181处理或模拟处理。病毒释放通过采集组织培养上清液来测量且传染性病毒通过噬斑测定来测定。

[0030] 图18是描绘病毒载量减少的图(给药天数以红色指示)。

[0031] 图19是描绘病毒载量的变化的图。

[0032] 图20是描绘作为处理日期的函数的病毒载量变化的图。

[0033] 图21是一组描绘泼尼松和他克莫司处理、施氧和PIV3载量的图。

具体实施方式

[0034] 以下描述显示,DAS181,具有唾液酸酶活性的融合蛋白有效对抗PIV和PIV感染患者中的临床分离株的研究。具有唾液酸酶活性的各种蛋白描述于美国专利号8,084,036中;且DAS181描述于美国专利号7,807,174中,其两者通过引用以其整体并入本文。

[0035] DAS181是包括唾液酸酶的催化结构域、和锚定域的融合蛋白。在一些情况下,分离的DAS181具有氨基末端甲硫氨酸(Met)且在一些情况下其没有。本文中,术语DAS181是指本文以SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2提供的序列的任一形式或两种形式的混合物。本文描述的数个实例使用DAS181或包含DAS181的组合物。

[0036] DAS181和具有唾液酸酶活性的其他蛋白,例如在美国专利号8,084,036或美国专利号7,807,174中描述的蛋白可被包括在以液体制剂或干制剂被递送至呼吸道的药物组合物中。

[0037] 本文描述的蛋白可配制成包含各种赋形剂的药物组合物。在一些情况下,制剂可包括提供另外的有益效应的另外的活性成分。

[0038] 本发明包括使用包含至少一种唾液酸酶活性的治疗化合物和组合物的方法。与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2至少90%、95%、98%、或99%同一的蛋白是可用的那些蛋白中的。在一些情况下,不同于SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2中那些氨基酸的氨基酸是保守性取代。保守性取代可定义为以下五组之一中的交换:

[0039] I. 小的、脂肪族、非极性或弱极性残基:Ala、Ser、Thr、Pro、Gly

[0040] II. 极性的、带负电荷的残基和其酰胺:Asp、Asn、Glu、Gln

[0041] III. 极性、带正电荷的残基:His、Arg、Lys

[0042] IV. 大的、脂肪族非极性残基:Met、Leu、Ile、Val、Cys

[0043] V. 大的芳香族残基:Phe、Try、Trp

[0044] 在上述各组中,以下取代被认为是“高度保守的”:Asp/Glu、His/Arg/Lys、Phe/Tyr/Trp、和Met/Leu/Ile/Val。半保守取代定义为以上组(I)-(IV)的两个之间的交换,其限

于包含以上(I)、(II)和(III)的大组(A),或包含以上(IV)和(V)的大组(B)。另外,当本申请中指定疏水性氨基酸时,其是指氨基酸Ala、Gly、Pro、Met、Leu、Ile、Val、Cys、Phe、和Trp,而亲水性氨基酸是指Ser、Thr、Asp、Asn、Glu、Gln、His、Arg、Lys、和Tyr。

[0045] 通过雾化器施用的剂型除活性成分外通常包含大量的水。还可存在少量的其他成分诸如pH调节剂、乳化剂或分散剂、防腐剂、表面活性剂、或缓冲剂和其他稳定剂和增溶剂。

[0046] 鼻腔制剂可作为滴剂、喷雾剂、气雾剂或任何其他鼻内剂型施用。任选地,递送系统可以是单位剂量递送系统。每剂量递送的溶液或悬浮液的体积可为从约5至约2000微升,从约10至约1000微升,或从约50至约500微升的任何体积。用于这些不同剂型的递送系统可以是以单位剂量或多剂量包装的滴瓶、塑料挤压装置、原子化器(atomizer),雾化器或药物气雾剂。

[0047] 本发明的液体制剂可以包括以下而被改变:(1)其他酸和碱以调节pH值;(2)其他张力赋予剂诸如山梨糖醇、甘油和右旋糖;(3)其他抗微生物防腐剂,诸如其他对羟基苯甲酸酯类、山梨酸酯、苯甲酸酯、丙酸酯、氯丁醇、苯乙醇、苯扎氯铵、和汞制剂;(4)其他粘度赋予剂诸如羧甲基纤维素钠、微晶纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、聚乙烯醇和其他的胶;(5)合适的吸收促进剂;(6)稳定剂,诸如抗氧化剂,诸如亚硫酸氢盐和抗坏血酸盐、金属螯合剂诸如依地酸钠和药物溶解度增强剂诸如聚乙二醇;和(7)其他剂诸如氨基酸。

[0048] 本发明的一个实施方案包括以各种剂量水平,诸如在约.01mg至约100mg之间的DAS181(或具有唾液酸酶活性的另一种多肽)的剂量水平的液体药物组合物。这样的剂量水平的实例可包括约.05mg、.06mg、0.1mg、0.5mg、1mg、5mg、10mg、20mg、50mg或100mg/天的剂量水平。前述剂量可每天施用一次或更多次,持续一天、二天、三天、四天、五天、六天、七天、八天、九天,十天、十一天、十二天、十三天、或十四天或更多天。还可施用更高剂量或更低剂量。通常,剂量可在约1ng/kg和约10mg/kg之间、在约10ng/kg和约1mg/kg之间、以及在约100ng/kg和约100微克/kg之间。在本文描述的各种实例中,用本文描述的各种剂量的组合物处理小鼠,所述剂量包括0.0008mg/kg、0.004mg/kg、0.02mg/kg、0.06mg/kg、0.1mg/kg、0.3mg/kg、0.6mg/kg、1.0gm/kg、2.0mg/kg、3.0mg/kg、4.0mg/kg和5.0mg/kg的剂量。

[0049] “唾液酸酶”是从底物分子除去唾液酸残基的酶。唾液酸酶(N-乙酰神经氨酸糖基水解酶,EC3.2.1.18)是一组从唾液酸-糖缀合物(sialo-glycoconjugates)中水解除去唾液酸残基的酶。唾液酸是具有9碳骨架的 α -酮酸,其常见于附着于糖蛋白和糖脂的寡糖链的最外位置。一个主要类型的唾液酸是为大多数其他类型的生物合成前体的N-乙酰神经氨酸(Neu5Ac)。底物分子可以是,作为非限定性实例,寡糖、多糖、糖蛋白、神经节苷脂或合成的分子。例如,唾液酸酶可裂解在唾液酸残基和底物分子剩余部分之间具有 $\alpha(2,3)$ -Gal、 $\alpha(2,6)$ -Gal或者 $\alpha(2,8)$ -Gal连接的键。唾液酸酶还可裂解在唾液酸残基和底物分子剩余部分之间的任何的或者所有的连接。在自然界中发现了在Neu5Ac与碳水化合物侧链的倒数第二个半乳糖残基之间两种主要的连接,Neu5Ac $\alpha(2,3)$ -Gal和Neu5Ac $\alpha(2,6)$ -Gal。Neu5Ac $\alpha(2,3)$ -Gal和Neu5Ac $\alpha(2,6)$ -Gal两者分子都可被流感病毒识别为受体,虽然人类病毒表现为偏好Neu5Ac $\alpha(2,6)$ Gal,而禽类和马科的病毒主要识别Neu5Ac $\alpha(2,3)$ -Gal。唾液酸酶可以是天然存在的唾液酸酶、工程化唾液酸酶(诸如,但不限于,其氨基酸序列基于天然存在的唾液酸酶的序列,包括与天然存在的唾液酸酶序列是实质上同源的序列的唾液酸酶)。如本文所用的,“唾液酸酶”还可意指天然存在的唾液酸酶的活性部分,或包含基于天然存在的

唾液酸酶活性部分的序列的肽或蛋白。

[0050] “融合蛋白”是包含来自至少两个不同来源的氨基酸序列的蛋白。融合蛋白可包括源自天然存在的蛋白或与自天然存在的蛋白的全部或部分基本上同源的氨基酸序列,并且另外可包括,从一至很大数目的源自天然存在的蛋白或与天然存在的蛋白的全部或部分基本上同源的氨基酸。可替代地,融合蛋白可包括源自天然存在的蛋白或与自天然存在的蛋白的全部或部分基本上同源的氨基酸序列,并且另外可包括,从一至很大数目的为合成序列的氨基酸。

[0051] “唾液酸酶催化结构域蛋白”是包括唾液酸酶的催化结构域,或与唾液酸酶的催化结构域基本上同源的氨基酸序列的蛋白,但不包括催化结构域所源自的唾液酸酶的全部氨基酸序列,其中唾液酸酶催化域蛋白保留与催化结构域所源自的完整唾液酸酶基本上相同的活性。唾液酸酶催化结构域蛋白可包括不源自唾液酸酶的氨基酸序列,但这不是必须的。唾液酸酶催化结构域蛋白可包含源自一种或更多种其他已知的蛋白的氨基酸序列或与一种或更多种其他已知的蛋白的氨基酸序列基本上同源的氨基酸序列,或可包含非源自其他已知的蛋白的氨基酸序列与其他已知的蛋白的氨基酸序列基本上同源的一种或更多种氨基酸。

[0052] “治疗有效量”意指,当向受试者以单一剂型施用组合物或化合物时,期望的治疗、预防、或其他生物效应或响应所需的组合物或化合物的量。根据条件诸如组合物或化合物的性质、被治疗的状况的性质、受试者的年龄和尺寸,组合物或化合物的特定量将有很大的不同。

[0053] “治疗”意指改善或以其他方式有益地改变病症、疾患或疾病的一个或更多个症状的任何方式。治疗还涵盖本文的组合物或化合物的任何药物用途,诸如用于减少呼吸道中的粘液。

[0054] “呼吸道”意指从鼻子到肺泡的空气通道,包括鼻、咽喉、咽、喉、气管、支气管,并且其还包括肺部,并有时被医师称为呼吸系统。

[0055] “吸入器”意指用于以通过鼻子或嘴被吸入(自然或机械地推动入肺中)的喷雾或干粉的形式给予药剂的装置,并且包括但不限于,被动或主动通风器(带有或不带有气管内插管的机械)、雾化器、干粉吸入器、定量吸入器、和加压定量吸入器。

[0056] “吸入剂”是通过鼻子或嘴吸入的任何物质。

[0057] 如本文所用的“赋形剂”意指单独或组合被用作药剂的活性成分的载体的一种或更多种无活性物质或化合物。如本文所使用的“赋形剂”还可指被包含在药物组合物中以改进其有益效果或与活性成分具有协同作用的一种或更多种物质或化合物。

[0058] 特别地,本公开内容涉及以下实施方案:

[0059] 1. 一种治疗患者的方法,所述方法包括向所述患者的呼吸道施用包含治疗有效量的具有唾液酸酶活性的多肽的液体组合物。

[0060] 2. 如实施方案1所述的方法,其中所述患者感染了流感病毒或副流感病毒。

[0061] 3. 如实施方案1所述的方法,其中所述患者患有减少的呼吸功能。

[0062] 4. 如实施方案1所述的方法,其中所述液体组合物为水性组合物。

[0063] 5. 如实施方案1所述的方法,其中所述患者的呼吸功能不适于使用干粉吸入器。

[0064] 6. 如实施方案1所述的方法,其中所述液体使用雾化器、蒸发器、气管内插管、鼻腔

喷雾器、加压定量吸入器或呼吸启动的加压定量吸入器来施用。

[0065] 7. 如实施方案1所述的方法, 其中所述液体组合物中的多肽的浓度为0.1-10.0mg/mL。

[0066] 8. 如实施方案6所述的方法, 其中所述液体组合物中的多肽的浓度在0.5mg/mL和2.0mg/mL之间。

[0067] 9. 如实施方案1所述的方法, 其中所述多肽与SEQ ID NO:1至少90%同一。

[0068] 10. 如实施方案1所述的方法, 其中所述蛋白包括SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2。

[0069] 11. 如实施方案1所述的方法, 其中向所述患者施用0.001-5mg/kg的所述多肽/剂量。

[0070] 12. 如实施方案1所述的方法, 其中在30天或更少时间内向所述患者施用0.1mg-100mg的所述肽。

[0071] 13. 如实施方案11所述的方法, 其中所述施用为每日的, 持续1-30天。

[0072] 14. 如实施方案1所述的方法, 其中一天施用0.1mg-10mg多肽。

[0073] 15. 如实施方案1所述的方法, 其中一天施用0.1mg-10mg多肽的有效剂量。

[0074] 16. 如实施方案1所述的方法, 其中所述施用包括施用具有1-10微米的MMAD的液体组合物的气雾剂颗粒。

[0075] 17. 如实施方案1所述的方法, 其中所述患者需要呼吸辅助。

[0076] 18. 如实施方案17所述的方法, 其中所述患者被插管。

[0077] 19. 一种减少或治疗免疫功能低下患者中的副流感或流感病毒感染的方法, 所述方法包括向所述患者的呼吸道施用包含治疗有效量的具有唾液酸酶活性的蛋白的组合物。

[0078] 20. 一种治疗处在感染副流感或流感病毒的风险中的免疫功能低下患者的方法, 所述方法包括向所述患者的呼吸道施用治疗有效量的具有唾液酸酶活性的蛋白。

[0079] 21. 如实施方案19或实施方案20所述的方法, 其中所述免疫功能低下患者患有原发性免疫缺陷。

[0080] 22. 如实施方案19或实施方案20所述的方法, 其中所述免疫功能低下患者患有继发性免疫缺陷。

[0081] 23. 如实施方案19或实施方案20所述的方法, 其中所述免疫功能低下患者正在或已经用免疫抑制疗法来治疗。

[0082] 24. 如实施方案19或实施方案20所述的方法, 其中所述免疫功能低下患者正在或已经用化学治疗剂来治疗。

[0083] 25. 如实施方案23所述的方法, 其中所述免疫功能低下患者是移植患者。

[0084] 26. 如实施方案1或实施方案2所述的方法, 其中所述蛋白与SEQ ID NO:1至少90%同一。

[0085] 27. 如实施方案19或实施方案20所述的方法, 其中所述蛋白包括SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2。

[0086] 28. 如实施方案19或实施方案20所述的方法, 其中所述组合物包含一种或更多种另外的化合物。

[0087] 29. 如实施方案19-28所述的方法, 其中所述施用为通过使用鼻喷雾器。

[0088] 30. 如实施方案19-28所述的方法, 其中所述施用为通过使用吸入器。

[0089] 31.如实施方案19或实施方案20所述的方法,其中所述蛋白包含唾液酸酶或其活性部分。

[0090] 32.如实施方案31所述的方法,其中所述唾液酸酶或其活性部分包含与以下至少90%同一的氨基酸序列:产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*)唾液酸酶或其催化结构域、粘性放线菌(*Actinomyces viscosus*)唾液酸酶或其催化结构域、产脲节杆菌(*Arthrobacter ureafaciens*)唾液酸酶或其催化结构域、绿色小单孢菌(*Micromonospora viridifaciens*)唾液酸酶或其催化结构域、人Neu2唾液酸酶或其催化结构域、或人Neu4唾液酸酶或其催化结构域。

[0091] 33.如实施方案32所述的方法,其中所述唾液酸酶或其活性部分与粘性放线菌唾液酸酶或其催化结构域至少90%同一。

[0092] 34.如实施方案31所述的方法,其中所述肽包含锚定域,其中所述锚定域是糖胺聚糖(GAG)结合结构域。

[0093] 35.如实施方案34所述的方法,其中所述GAG结合结构域包含与以下至少90%同一的氨基酸序列:人血小板第4因子的GAG结合结构域、人白细胞介素8的GAG结合结构域、人抗凝血酶Ⅲ的GAG结合结构域、人类载脂蛋白E的GAG结合结构域、人血管相关迁移蛋白的GAG结合结构域、或人双调蛋白的GAG结合结构域。

[0094] 36.如实施方案19-28所述的方法,其中所述施用为通过雾化器、蒸发器、气管内插管、鼻腔喷雾器、干粉吸入器、加压定量吸入器或呼吸启动的加压定量吸入器。

[0095] 37.如实施方案19或实施方案20所述的方法,其中所述组合物是液体形式。

[0096] 38.如实施方案19或实施方案20所述的方法,其中所述组合物是干粉形式。

[0097] 39.一种用于减少患有PIV感染的患者中的PIV的病毒载量的方法,所述方法包括向所述患者施用包含DAS181的组合物。

[0098] 40.如实施方案39所述的方法,其中向所述患者的呼吸道施用所述组合物。

[0099] 41.如实施方案40所述的方法,其中使用雾化器或干粉吸入器施用所述组合物。

[0100] 42.如实施方案39所述的方法,其中所述患者为免疫功能低下的。

[0101] 43.一种用于改善患有PIV感染的患者中的肺功能的方法,所述方法包括向所述患者施用包含DAS181的组合物。

[0102] 44.如实施方案43所述的方法,其中向所述患者的呼吸道施用所述组合物。

[0103] 45.如实施方案44所述的方法,其中使用雾化器或干粉吸入器施用所述组合物。

[0104] 46.如实施方案43所述的方法,其中所述患者为免疫功能低下的。

[0105] 实施例

[0106] 实施例1-临床分离株

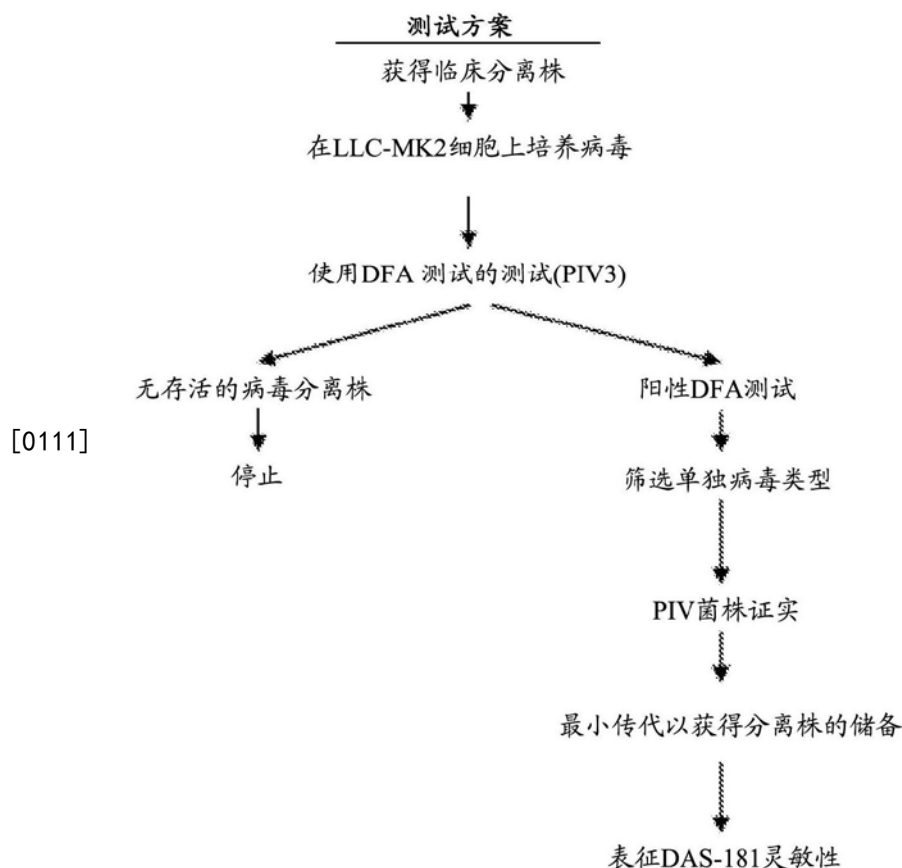
[0107] 以下描述了体外研究,显示DAS181可抑制PIV的临床分离株。研究是有意义的,因为PIV的临床分离株比PIV的实验室菌株更接近类似感染患者的PIV。对这种病毒建立的50%(EC50)抑制病毒复制需要的有效浓度为~4nM DAS181。

[0108] 病毒生长分析还显示,没有DAS181时,无论以0.01或0.1的MOI感染,病毒进展迅速穿过细胞培养物单层。在这两种情况下,没有用DAS181处理时,在感染后第3天,观察到显著细胞病变效应(CPE)和细胞死亡。然而,在10nM的DAS181的存在下,细胞层在整个感染的过程中保持完整,并通过噬斑法测量的病毒的释放显著减少。总之,这些数据指示,DAS181有

效对抗PIV3的这一临床分离株,并且保护不受病毒诱导的细胞毒性和细胞死亡。

[0109] 研究设计和结果

[0110] 将在干冰上收集的标本保存于-80℃,直到分析。当准备进行分析时,将样品使用LLC-MK2细胞进行病毒测试,并评估病毒感染(病毒类型和毒株)。当确认感染时,将病毒传代2次,直到病毒储备的扩增是足够的。建立了病毒的生长特性和DAS181的有效抑制剂量的表征。



[0112] 在短暂低速离心去除细胞,获得仅上清后,将标本(BAL和组织培养阳性上清液)用于接种在LLCMK2细胞上。进行直接荧光分析(DFA),用于使用呼吸道病毒DFA筛选对任何病毒种类的初始鉴定。以适当的标记和鉴定程序将分离的病毒上清(0.02或0.2mL)接种到6孔板中。

[0113] 将来自包含初始病毒接种物的孔中的上清液,放置于包含病毒生长培养基(VGM)的新鲜细胞的多个孔中。对细胞如以上描述的监测CPE。在感染后3天,每种分离株收集一个孔用于DFA分析。

[0114] 监测LLC-MK2细胞的初始病毒接种物的CPE多天(取决于病毒株和生长特性而变化)。记录了观察结果诸如细胞死亡、合胞体形成、细胞变圆或增大、以及细胞生长方面的总体变化。接种后大约3-5天(或当细胞显示出CPE时),将细胞冷冻在-70℃至-80℃,以允许病毒释放。将病毒扩增到更大的生长容器后,将病毒冷冻在-70℃至-80℃下以长期贮存。

[0115] 病毒样品的传代:上述初始分离的重复孔被用于继续病毒生长。在大量的细胞裂解/死亡时,将上清液转移至新的细胞。来自病毒的各世代的病毒也冷冻在-70℃和-80℃之间以保存病毒储备。为扩增,用未感染的细胞传代病毒,直到可获得大量体积的高滴度的病

毒。为冷冻病毒添加1%DMSO,并将病毒以等份冷冻在在-70℃和-80℃之间。

[0116] 确认呼吸道病毒抗原:初始DFA分析被用于筛选呼吸道病毒病原体(包括腺病毒、甲型流感、乙型流感、副流感病毒1型、副流感病毒2型、副流感3型和呼吸道合胞病毒)的存在。DFA分析根据制造商的说明来进行(目录号#3137, Millipore, Temecula, CA)。在以筛选试验的阳性结果以指示呼吸道病毒抗原的存在后,使用对单独病毒株及亚型特异性的上述试剂盒的组件证实病毒株。对于病毒株的分析,将细胞点样到载玻片(或在玻璃盖玻片上生长),以允许按照制造商的说明书适当的分析。

[0117] 病毒分离株的鉴定:在如上述的传代病毒后,对产生有效感染的标本进行确定的DFA分析,以确认鉴定的病毒亚型。在整个病毒研究中的不同时间段进行持续的确认,允许监测病毒类型的变化。

[0118] 病毒储备的冷冻和组织(Organization):一旦病毒株被鉴定和证实,从原始分离株扩增病毒储备,并以多个等份冷冻在-70℃下以确保低传代。SOP和噬斑试验修改如下所述来做出。低传代病毒被用于所有随后分析,以保持尽可能接近原始分离株的特性(表型和基因型两者)。

[0119] 病毒储备的滴定:在感染后2-7天之间通过用0.05%戊二醛或4%甲醛固定,且然后与PIV亚型特异性抗体和DFA试剂温育,来对LLC-MK2细胞单层进行病毒储备滴定和测定。染色后,对噬斑计数,并且滴度根据计数来确定。

[0120] TCID50的抑制:在感染前1天,将LLC-MK2细胞以 3×10^6 个细胞/板的密度接种于6孔板中。次日,将细胞用1×PBS洗涤一次,并然后以对病毒储备鉴定的TCID50来感染。感染后2小时,将细胞用包含范围从1000nM至0.1nM的不同浓度的DAS181(10X系列稀释液)的琼脂糖来覆盖。还评估了无药物对照,以及非病毒(NV)的对照。感染后3-5天(当细胞显示出实质的细胞病变效应时),将细胞固定,并且然后用PIV2/3的特异抗体来染色。用抗体染色后,将板用1×PBS+0.05%吐温20洗涤3X。然后将板用TBP/BCIP底物染色10-15分钟,或直至染色可见。拍摄代表性照片,并且做出关于病毒的传播以及由DAS181处理提供的抑制水平的观察结果。

[0121] 噬斑减少测定:进行改进的噬斑减少测定(PRA)以确定DAS181足以抑制感染50%的水平(EC50)。在感染前日将细胞以 3×10^6 个细胞/板的密度播种在24孔板中。第二天,将细胞用1×PBS洗涤,并且然后用 ≤ 100 pfu/孔感染2小时。最初2小时后,将培养基吸出,并且将细胞用1×PBS再次洗涤。板用包含DAS181的适当浓度(1000nM至0.1nM)的2×Eagle氏最小必需培养基(EMEM)的琼脂糖(比例1:1)来覆盖。DAS181的各个浓度在重复孔中进行测定,并且所得的噬斑计数从2孔来平均。允许噬斑形成2天,此时将板用0.05%戊二醛或4%甲醛来固定。固定后,将板根据制造商的说明书用适当的抗体或DFA试剂进行染色。

[0122] 使用噬斑测定的病毒生长曲线(+/-DAS181):随时间+/-DAS181的病毒释放通过感染前一天在24孔板中(3×10^6 个细胞/板)播种细胞进行评估。第二天,将细胞以低的感染复数(MOI)(在0.01和0.1之间)感染,并且感染后2小时,除去培养基,并补充有或没有抑制病毒需要的确定的浓度下的DAS181的新鲜的培养基。每24小时收获病毒上清液,直到对照处理的孔中~80%-90%细胞死亡明显,并然后重新补充包含DAS181的培养基。将上清液冷冻在-80℃下,并且然后对于每个样品的病毒滴度通过用于PIV的标准噬斑测定进行评估。病毒的传播,除了如以上描述的用于噬斑减少测定的细胞在玻璃盖玻片上生长并然后固定且

染色外,还使用本实验设置来评估。

[0123] 使用定量实时RT-PCR的病毒生长曲线:上述的测定法设置(第8.3节)还尝试通过定量实时逆转录(RT-PCR)用于病毒定量。如以上收获病毒上清液,并然后制备RNA。等体积的病毒上清液被用作起始材料,并将对照RNA(GAPDH)掺入每个样品,以控制从每个样品分离的RNA的量由于样品之间纯化差异的差异。然后在一步法RT-PCR反应中分析RNA。

[0124] PIV3样品的初始接种:将培养物用0.02mL或0.2mL的患者样品(BAL或先前鉴定的阳性组织培养上清液)接种。允许细胞生长5天,并且每日观察CPE或病毒感染的其他证据。在感染后第3天与第5天,拍摄照片并在用组织培养物上清液接种的细胞中观察到CPE(图1)。BAL样品没有产生生产性病毒感染,而病毒培养上清液早在感染后第3天显示CPE的迹象。用0.2mL病毒上清液接种的细胞比用0.02mL接种的细胞成比例地显示更多CPE。在感染后第5天,0.2mL病毒上清液感染的细胞基本上进展,并显示出约50%细胞死亡,指示病毒传播贯穿培养物。用0.02mL病毒上清液接种的样品在这一天进一步进展,但与用0.2mL接种的样品相比时,基本上更少感染。BAL样品在这时仍未显示病毒感染的迹象。进一步观察(到14天)证实,对于该样品没有分离到生产性病毒感染。PIV3的存在由DFA测定来证实(图2)。NV对照显示对于PIV3抗原没有阳性染色,而受感染的PIV3样品显示,视野内的所有细胞均是PIV3阳性的。

[0125] 噬斑检测以确定滴度:分离自该患者的PIV3在LLC-MK2细胞上被最低限度地传代,并且然后使用改进的噬斑测定来滴定。鉴于这种病毒不像PIV3参考菌株那样容易且一致的噬斑,测试了该标准测定的多种变化形式。与以前PIV参考菌株噬斑测定相比,该病毒花费更长时间产生当用适当的抗体染色时肉眼可见的噬斑。在感染后第6天,虽然噬斑大小是可变的,且许多的尺寸还小得多,噬斑可被可视化。在第7天,虽然仍注意到尺寸变化(数据未示出),噬斑很容易可视化。相比之下,参考菌株使用该方法在感染后第3天容易且一致地可视化。为了获得噬斑分析和噬斑减少测定两者的准确和一致的结果,将两者修改以减少一致噬斑计数需要的培养中的时间,以及增加可视化该特定病毒分离株中固有的较小噬斑的能力。修改的测定基于与如标准噬斑测定/噬斑减少测定描述的相同的原理。然而,因为PIV的噬斑形成不需要大的表面积,改变测定格式以在24孔板设置中完成。病毒被连续稀释(10⁻¹-10⁻⁶)并且重复孔被感染用于噬斑分析,且然后将病毒洗涤并以如正常噬斑测定程序描述的2×MEM:琼脂糖混合物来覆盖。允许感染进展48小时,且然后将细胞固定并使用与用于鉴定和确认病毒类型相同的DFA试剂来染色(图4)。

[0126] 临床PIV3分离株的DAS181测试:在标准噬斑减少测定中,需要DAS181处理一段长时间,多达7天,用于可见噬斑发展。随着孔中药理活性的损失,培养中剩余的时间增加,抑制病毒所需的DAS181的量增加。该时间被认为太长难以达到一致、准确的抑制信息(图5)。对于修改的噬斑减少测定,将病毒在VGM中稀释以50pfu/孔感染细胞。感染后两小时,洗涤板,并用包含连续稀释的DAS181(1000nM-0.1nM)或无DAS181的对照的2X VGM:琼脂糖覆盖层来覆盖。允许病毒感染继续48小时,并然后将细胞固定并用上述的DFA试剂来染色。用于每个稀释度的代表性噬斑示于图6中。当DAS181浓度增加时噬斑大小还减少。显示每个稀释度的总计数的曲线图,并且指示对于每个曲线的EC50值(图7)。将噬斑减少测定在三个不同日期进行3次,以确保跨越多个日期和传代的准确的EC50值。从这些数据,确定这一病毒的平均EC50值是~4nM。

[0127] 临床PIV3分离株的TCID50的DAS181抑制: 鉴于病毒生产使用噬斑减少测试被DAS181极大地抑制, 我们还测试了药物抑制以较高感染复数的病毒的能力。为了实现这一点, 以对PIV3临床分离株鉴定的近似TCID50感染细胞, 并然后在感染后2小时用系列稀释的DAS181 (0.1nM-100nM) 来处理和用琼脂糖覆盖。感染后五天, 将细胞固定并用特异于PIV3的抗体来染色。使用缀合了碱性磷酸酶的第二抗体可视化病毒抗原, 并然后用TBP/BCIP底物来染色 (图8)。用暗紫色染色表示病毒抗原。1nM-10nM之间观察到病毒感染的抑制, 而用0.1nM DAS181处理的细胞显示出与无药对照类似的病毒传播。支持噬斑减少测定的是, 这些结果提示, 限制病毒感染的传播需要的DAS181的抑制浓度介于1nM-10nM之间。在每个感染的孔中观察到针尖噬斑的形成; 然而在0.1nM以上的DAS181的所有测试浓度下基本上抑制了传播。

[0128] 病毒传播和释放的DAS181抑制: 为更好地量化病毒感染的抑制, 进行病毒生长分析。首先, 使用DFA分析在整个感染的过程 (72小时) 中监测病毒传播以监测病毒传播。为要做到这一点, 细胞在玻璃盖玻片生长, 并以0.1的MOI来感染。感染后2小时除去病毒, 并且用DAS181处理细胞 (或用PBS处理模拟), 且然后每24小时测定病毒传播。盖玻片用PIV3DFA试剂来染色, 并评估病毒感染的存在。在感染后的所有时间, 用10nM DAS181的处理显著抑制病毒传播 (图9)。还评估了与图9中使用的相同的细胞随时间的病毒释放。每24小时从DAS181处理或模拟处理的孔收集组织培养物上清液, 并然后冷冻在-80℃下直到分析。通过如上所述的噬斑测定评估病毒滴度 (PFU/mL), 并然后对时间绘图。与未经处理的细胞相比时, 从DAS181处理的细胞释放的病毒的量随时间显著减少 (大于2个对数) (图10)。

[0129] 为了评估经感染较长过程的病毒释放, 以较低的MOI (0.01) 感染细胞, 并然后如上述来评估。观察到类似的趋势, 即DAS181处理的细胞在感染的整个时间过程产生显著更少感染病毒 (图11)。在感染后第3天, 病毒感染在未经处理的细胞中已基本上进展, 并且所有细胞显示CPE。在感染后第4天, 未经处理的细胞开始逐个死亡 (~50%), 且在第6天未处理的孔显示~90%-95%细胞死亡。在DAS181处理的细胞中, 直到感染后第4天没有观察到病毒CPE, 在此时小百分比的细胞显示病毒感染的迹象 (变圆或细胞死亡)。在感染后第6天, 病毒感染已轻微地传播, 但大部分细胞仍然存活并显示出CPE的最小迹象。在DAS181处理的样品中病毒释放在感染后第4天也增加, 虽然这比未处理样品中仍相当少。

[0130] 结论

[0131] DAS181在1-10nM之间的所有浓度有效抑制PIV3的这种临床菌株。确定的EC50为~4nM, 其小于抑制本测定中已测试的大部分流感病毒株需要的EC50。在细胞培养中, 经感染过程DAS181处理随时间有效地降低病毒释放大于2个log。当以低MOI感染时, 在感染后第3天由PIV3感染诱导的细胞毒性和细胞死亡是大量的。标准噬斑测定和噬斑减少测定的修改允许增加这些测定法的一致性和可行性。这些数据扩展了DAS181有效抑制PIV的不同分离株的能力的现有知识以及显示DAS181抑制PIV临床菌株。

[0132] 材料和方法

[0133] 细胞和病毒: 原始LLC-MK2细胞接收自ATCC (Manassas, VA) 并已传代最小次数 (小于4) 以获得多个来源小瓶。在收到目标样本之前, 将细胞解冻并在以测试的样品接种之前传代至少2次。

[0134] 细胞培养维持和病毒生长培养基: 细胞每3-4天分裂, 并每2-3天供给Eagles-MEM

(目录号#11095-098, Life Technologies, Carlsbad, CA)、10%FBS(目录号#14-502F, Lonza, Riverside, CA)、1X Glutamax(目录号#35050, GIBCO, Carlsbad, CA)、和1X抗生素/抗真菌溶液(目录号#A5955, Sigma, St. Louis, MO)。根据标准方案将细胞保持在充足的培养基中,并除非取出用于维持或测试,37℃下在包含5%CO₂的加湿室中生长。细胞用PBS(目录号#14040, GIBCO, Carlsbad, CA)来洗涤,并且使用TrypLE Express(目录号12605-010, GIBCO, Carlsbad, CA)进行胰酶消化。细胞的单独烧瓶根据标准方案保持,并标明传代日期、科学家姓名中的大写字母、细胞传代次数和细胞名称。病毒感染在适当的测试装置,包括如实验限定的6或24孔板(Corning, Lowell, MA)中进行。感染之前,在扩增过程中将细胞维持在聚苯乙烯培养瓶(Corning, Lowell, MA)中。病毒生长培养基由以下组成:E-MEM(以上所列)、1X Glutamax(以上所列)、3.0mg/mL稀释至3.0μg/mL的终浓度的乙酰化胰蛋白酶(目录号#T6763, Sigma)、1%ITS(目录号#41400, Millipore, Temecula, CA)。噬斑测定覆盖培养基由以下组成:以上所列的E-MEM培养基(2X浓度)和dH₂O中1.8%诺布尔琼脂(目录号#10907, USB Corp., Cleveland, OH)的1:1(体积:体积)混合物以达到1X培养基和0.9%琼脂糖的终浓度。用于这些研究的DAS181的批号为批号#20080715,以25.5mg/mL的浓度制备于09年1月20日。

[0135] RNA提取和扩增:使用QIAamp病毒RNA纯化试剂盒(目录号#52904, Qiagen, Valencia, CA)或MagMAX™-96总RNA分离试剂盒(目录号#AM1830, Ambion, Foster City, CA)根据制造商的说明书进行RNA提取。病毒RNA的扩增和定量使用TaqMan®一步RT-PCR Master混合试剂盒(目录号#4309169)根据制造商的说明书来尝试。启动了这些分析,虽然确定对这些研究当前确立的测定形式不可靠,并且因此这些数据不包括在本报告中。

[0136] 抗体和染色剂:对于TCID₅₀板染色,使用αPIV2/3(目录号#20-PG90, Fitzgerald, Acton, MA)抗体,随后驴抗山羊二抗(目录号#V1151, Promega, Madison, WI)。使用1-步NBT/BCIP底物(目录号#34042, Thermo Scientific, Rockford, IL)可视化抗体染色。

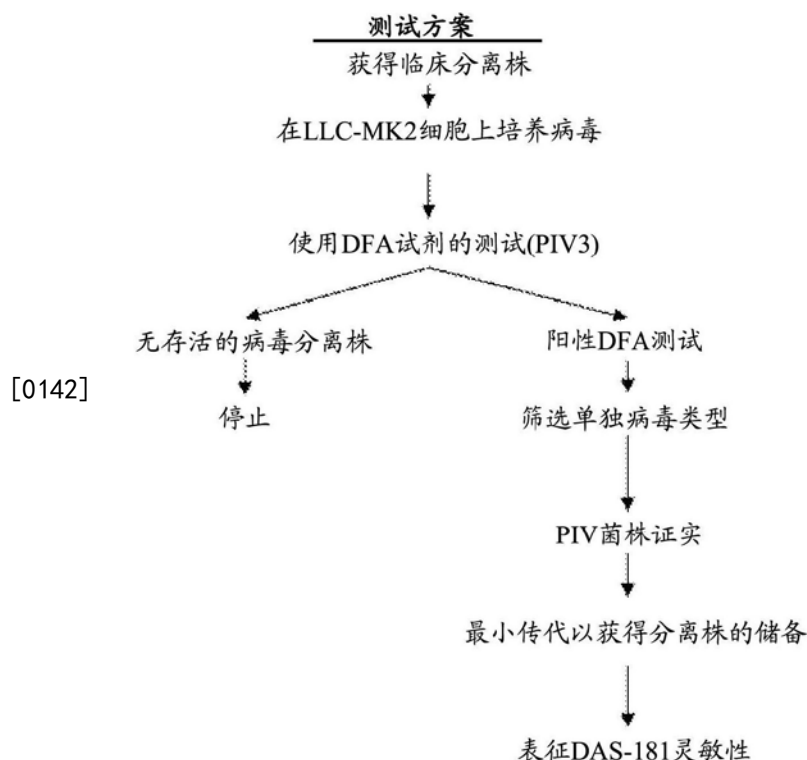
[0137] 实施例2-PIV3临床分离株

[0138] 研究设计和结果

[0139] 在单独研究中,研究了PIV3的第二临床分离株。与参考(实验室改编)菌株相比,该临床分离株在培养中生长更快,并在24小时内形成容易传播穿过培养物的噬斑。该病毒还生长到非常高的滴度,指示PIV3的这种特殊的菌株是非常恶性的。对于该病毒确定的EC₅₀为~28nM。

[0140] 病毒生长分析还显示,没有DAS181时,当以0.01的MOI感染时,病毒进展迅速穿过细胞培养物单层。没有用DAS181处理时,在感染后第3天,观察到显著CPE和细胞死亡。然而,在100nM的DAS181的存在下,细胞层在整个感染的过程中仍然主要保持完整,并通过噬斑法测量的病毒的释放显著减少。总之,这些数据指示,DAS181有效对抗PIV3的这一临床分离株,并且保护不受病毒诱导的细胞毒性和细胞死亡。

[0141] 样本贮存于-80℃下直至分析。当准备进行分析时,将样品使用LLC-MK2细胞进行病毒测试,并评估病毒感染(病毒类型和毒株)。当确认感染时,将病毒传代2次,直到病毒储备的扩增是足够的。建立了病毒的生长特性和DAS181的有效抑制剂量的表征。



[0142]

[0143] **临床样本的接种**:将样本(鼻拭子)用于接种在LLC-MK2细胞上,随后短暂低速离心去除细胞,并获得仅上清。仅在DAS181处理前收集的鼻拭子允许生产性感染。进行DFA,用于使用呼吸道病毒DFA筛选对任何病毒种类的初始鉴定。以适当的标记和鉴定程序将分离的病毒上清(0.02mL或0.2mL)接种到6孔板中。PIV3抗原的存在用对病毒类型特异性的DFA试剂进行测试。

[0144] **初始接种物的分离**:将来自包含初始病毒接种物的孔中的上清液,放置于包含病毒生长培养基(VGM)的新鲜细胞的多个孔中。对细胞如以上所述的监测CPE。在感染后3天,每种分离株收集一个孔用于DFA。

[0145] **病毒扩增**:监测LLC-MK2细胞的初始病毒接种物的CPE持续多天。记录了观察结果诸如细胞死亡、合胞体形成、细胞变圆或增大、以及在细胞生长方面的总体变化。接种后大约3-5天(或当细胞显示出CPE时),将细胞冷冻在-70℃至-80℃,以允许病毒释放。将病毒扩增到更大的生长容器后,将病毒取等份并冷冻在-70℃至-80℃之间以长期贮存。

[0146] **确认呼吸道病毒抗原**:初始DFA被用于筛选呼吸道病毒病原体(包括腺病毒、甲型流感、乙型流感、副流感病毒1型、副流感病毒2型、副流感3型和呼吸道合胞病毒)的存在。DFA分析根据制造商的说明来进行(目录号#3137, Millipore, Temecula, CA)。在以筛选试验的阳性结果以指示呼吸道病毒抗原的存在后,使用对单独病毒株及亚型特异性的上述试剂盒的组件证实病毒株。对于病毒株的分析,将细胞点样到载玻片(或在玻璃盖玻片上生长),以允许按照制造商的说明书适当的分析。

[0147] **病毒储备的冷冻和组织**:一旦病毒株被鉴定和证实,从原始分离株扩增病毒储备,并以多个等份冷冻在-70℃下以确保低传代。低传代病毒被用于所有随后分析,以保持尽可能接近原始分离株的特性(表型和基因型两者)。

[0148] **病毒储备的滴定**:在感染后2天通过用0.05%戊二醛或4%甲醛固定,且然后与PIV亚型特异性DFA试剂温育,来对LLC-MK2细胞单层进行病毒储备滴定和测定。染色后,对噬斑

计数,并且滴度根据计数来确定。

[0149] TCID₅₀的抑制:在感染前1天,将LLC-MK2细胞以 3×10^6 个细胞/板的密度接种于6孔板中。次日,将细胞用1×PBS洗涤一次,并然后以对病毒储备鉴定的TCID₅₀来感染。感染后2小时,将细胞用包含范围从1000nM至0.1nM的不同浓度的DAS181 (10X系列稀释液)的琼脂糖来覆盖。还评估了无药物对照,以及非病毒(NV)的对照。感染后3-5天(当细胞显示出实质的CPE时),将细胞固定,并且然后用PIV3特异性DFA试剂来染色。用抗体染色后,将板用1X PBS+0.05%吐温20洗涤3X。然后分析板的病毒传播。拍摄代表性照片,并且做出关于病毒的传播以及由DAS181处理提供的抑制水平的观察结果。

[0150] 噬斑减少测定:进行改进的噬斑减少测定(PRA)以确定DAS181足以抑制感染50%的水平(EC₅₀)。在感染前日将细胞以 3×10^6 个细胞/板的密度播种在24孔板中。第二天,将细胞用1×PBS洗涤,并且然后用 ≤ 100 PFU/孔感染2小时。最初2小时后,将培养基吸出,并且将细胞用1X PBS再次洗涤。板用包含DAS181的适当浓度(1000nM至0.1nM)的2X EMEM的琼脂糖(比例1:1)来覆盖。DAS181的各个浓度在重复孔中进行测定,并且所得的噬斑计数从2孔来平均。允许噬斑形成2天,此时将板用0.05%戊二醛或4%甲醛来固定。固定后,将板根据制造商的说明书用适当的抗体或DFA试剂进行染色。

[0151] 使用噬斑测定的病毒生长曲线(+/-DAS181):随时间+/-DAS181的病毒释放通过感染前日在24孔板中(3×10^6 个细胞/板)播种细胞进行评估。第二天,将细胞以0.01的感染复数(MOI)感染,并且感染后2小时,除去培养基,并补充有或没有抑制病毒需要的确定的浓度(100nM)下的DAS181的新鲜的培养基。每24小时收获病毒上清液,直到对照处理的孔中~80%-90%细胞死亡明显,并然后重新补充包含DAS181的培养基。将上清液冷冻在-80℃下,并且然后对于每个样品的病毒滴度通过噬斑测定进行评估。

[0152] PIV3样品的初始接种:将培养物用0.02mL或0.2mL的患者样品(BAL或先前鉴定的阳性组织培养上清液)接种。允许细胞生长5天,并且每日观察CPE或病毒感染的其他证据。在感染后第5天,拍摄照片并在用0.2mL组织培养物上清液接种的细胞中观察到CPE(图12)。用0.2mL病毒上清液接种的细胞比用0.02mL接种的细胞成比例地显示更多CPE,因此这些孔持续用于病毒繁殖。在感染后第5天,0.2mL病毒上清液感染的细胞基本上进展,并显示出约50%细胞死亡,指示病毒传播贯穿培养物。用0.02mL病毒上清液接种的样品在这一天稍微进展,但与用0.2mL接种的样品相比时,基本上更少感染。

[0153] 由DFA测试接种的病毒培养物中呼吸道病毒的存在,且具体地PIV3的存在。将感染的细胞布点在载玻片上并用识别一组呼吸道病毒或特异于PIV3的抗体染色(图13)。

[0154] 噬斑检测以确定滴度:分离自该患者的PIV3在LLC-MK2细胞上被最低限度地传代,并且然后使用改进的噬斑测定来滴定。与以前PIV参考菌株噬斑测定和PIV3的另一临床分离株相比,该病毒生长更快并当用适当的抗体/染色剂染色时产生肉眼可见的噬斑。在感染后第2天,噬斑可被可视化,并且许多在此时已显著传播。用于该病毒的修改的测定基于与如标准噬斑测定/噬斑减小测定描述的相同的原理。然而,因为PIV的噬斑形成不需要大的表面积,测定格式在24孔板设置中完成。病毒被连续稀释(10^{-1} - 10^{-6})并且重复孔被感染用于噬斑分析,且然后将病毒洗涤并以如正常噬斑测定程序描述的2×MEM:琼脂糖混合物来覆盖。允许感染进展36-48小时,且然后将细胞固定并使用与用于鉴定和确认病毒类型相同的DFA试剂来染色(图14)。由这一接种产生的感染性病毒鉴定的滴度为 8×10^6 PFU/mL。

这比PIV3的其他临床分离株基本上更高(与 2×10^5 PFU/mL相比)。

[0155] 临床PIV3分离株的DAS181测试:对于噬斑减少测定,将病毒在VGM中稀释以50PFU/孔感染细胞。感染后2小时,洗涤板,并用包含连续稀释的DAS181(1000nM-0.1nM)或无DAS181的对照的2X VGM:琼脂糖覆盖层来覆盖。允许病毒感染继续48小时,并然后将细胞固定并用上述的DFA试剂来染色。进行的第一噬斑减少测定不产生准确的EC50值,由于,当与随后测定法中的曲线图相比时,病毒感染的剂量依赖性损失显示较低EC50值,并因此不被包括在平均EC50计算中。经确定,因为这种病毒的生长性能与迄今测试的PIV3的其他菌株不同的多,这个最初实验是异常值。在建立病毒的生长性能之后,进行三种不同的噬斑减少测定,并指示对于每个实验的EC50值(图15)。将噬斑减少测定在三个不同日期进行3次,以确保跨越多个日期和传代的准确的EC50值。对于该病毒确定的平均EC50值是~28nM。

[0156] 临床PIV3分离株的TCID50的DAS181抑制:鉴于病毒生产使用噬斑减少测试被DAS181极大地抑制,我们还测试了药物抑制以较高感染复数的病毒的能力。为了实现这一点,以对PIV3临床分离株鉴定的近似TCID50感染细胞,并然后在感染后2小时用系列稀释的DAS181(0.1nM-1000nM)来处理并用琼脂糖覆盖。感染后3天,将细胞固定并用特异于PIV3的抗体来染色(图16)。病毒抗原以绿色来表示。10nM-100nM之间观察到病毒感染的抑制,而用0.1nM-1nM DAS181处理的细胞显示出与无药对照类似的病毒传播。支持噬斑减少测定的是,这些结果提示,限制病毒感染的传播需要的DAS181的抑制浓度介于10nM-100nM之间。在每个感染的孔中观察到针尖噬斑的形成;然而在1nM以上的DAS181的所有测试浓度下基本上抑制了传播。与用较高浓度的DAS181处理的孔相比,在无DAS181或具有0.1nM DAS181的孔中,细胞单层显示显著增高的CPE,指示DAS181还具有对于细胞毒性的保护效应(数据未示出)。

[0157] 病毒传播和释放的DAS181抑制:为更好地量化病毒感染的抑制,进行病毒生长分析。首先,使用DFA和噬斑测定在整个感染的过程(72小时)中监测病毒传播以确定释放到上清液中的病毒的量。为做到这一点,以0.01的MOI感染细胞,并然后在感染后2小时除去病毒且细胞用100nM DAS181处理(或用PBS处理模拟)。每隔24小时,对细胞监测CPE并收集病毒上清液且冷冻用于后续滴度分析。在感染后的所有时间,用100nM DAS181的处理保护细胞单层免于病毒感染的细胞毒性效应(数据未示出)。病毒释放在整个感染的过程中还被抑制了~1个log,虽然在感染后第3天释放到上清液中的病毒滴度(PFU/mL)是可比较的(图17)。在感染后第3天,模拟处理的细胞显示大约95%细胞死亡,如通过病毒滴度的下降所指示的,而用DAS181处理的孔仍具有约70%的细胞单层存活。这些结果可解释该测定中为什么病毒滴度最终变得可比较,并可能由于该特定分离株的病毒感染的快速进展。

[0158] 结论

[0159] DAS181在10-1000nM之间的所有浓度有效抑制PIV3的这种临床菌株。确定的EC50为28nM。在细胞培养中,在活动性感染周期期间,经感染过程DAS181处理随时间有效地降低病毒释放大约一个log。当以低MOI感染并保留用DAS181未处理时,由PIV3感染诱导的细胞毒性和细胞死亡在感染后第3天是大量的,而以DAS181的处理成功保护细胞单层免受病毒诱导的细胞毒性。这些数据扩展了DAS181有效抑制PIV的不同分离株的能力的现有的知识,并进一步显示DAS181有效对抗PIV3的临床分离株,甚至被认为是最毒力菌株的那些。

[0160] 材料和方法

[0161] 细胞和病毒:原始LLC-MK2细胞接收自ATCC (Manassas,VA) 并已传代最小次数(小于4)以获得多个来源小瓶。在收到目标样本之前,将细胞解冻并在以测试的样品接种之前传代至少2次。将包含PIV3的样本接种到LLC-MK2细胞,并传代2次,以获得大体积的病毒上清液。收集在细胞培养中经历了最小传代的病毒上清液,以维持病毒的特性。

[0162] 细胞培养维持和病毒生长培养基:细胞每3-4天分裂,并每2-3天供给Eagles-MEM (目录号#11095-098,Life Technologies,Carlsbad,CA)、10%FBS (目录号#14-502F, Lonza,Riverside,CA)、1X Glutamax (目录号#35050,GIBCO,Carlsbad,CA)、和1X抗生素/抗真菌溶液(目录号#A5955,Sigma,St.Louis,MO)。根据标准方案将细胞保持在充足的培养基中,并除非取出用于维持或测试,37℃下在包含5%CO₂的加湿室中生长。细胞用PBS (目录号#14040,GIBCO,Carlsbad,CA) 来洗涤,并且使用TrypLE Express (目录号12605-010, GIBCO,Carlsbad,CA) 进行胰酶消化。细胞的单独烧瓶根据标准方案保持,并标明传代日期、科学家姓名中的大写字母、细胞传代次数和细胞名称。病毒感染在适当的测试装置,包括如实验限定的6或24孔板(Corning,Lowell,MA) 中进行。感染之前,在扩增过程中将细胞维持在聚苯乙烯培养瓶(Corning,Lowell,MA) 中。病毒生长培养基由以下组成:E-MEM(以上所列)、1X Glutamax(以上所列)、3.0mg/mL稀释至3.0μg/mL的终浓度的乙酰化胰蛋白酶(目录号#T6763,Sigma)、1%ITS(目录号#41400,Millipore,Temecula,CA)。噬斑测定覆盖培养基由以下组成:以上所列的E-MEM培养基(2X浓度)和dH2O中1.8%诺布尔琼脂(目录号#10907, USB Corp.,Cleveland,OH) 的1:1(体积:体积)混合物以达到1X培养基和0.9%琼脂糖的终浓度。用于这些研究的DAS181的批号为批号#20080715,以25.5mg/mL的浓度制备于09年1月20日。

[0163] 抗体和染色剂:对于TCID50板染色,根据制造商的说明书使用直接荧光抗体分析试剂盒(目录号#3137,Millipore,Temecula,CA)。

[0164] 以下实施例3-10描述了使用DAS181的雾化器和液体制剂或DAS181的干粉吸入器和干制剂,用DAS181治疗EIND患者的子集的结果。

[0165] 实施例3-用雾化的DAS181治疗患者1

[0166] 对确诊为PIV3感染的18个月的婴儿(女)开始用DAS181治疗。该婴儿还伴随诊断为急性淋巴细胞白血病(ALL)。基于现有的动物毒理学数据起草初始保守给药计划。由于患者的年龄,药物仅可以以雾化的形式递送,在该病例中使用的雾化器被描述于表1中。

[0167] 表1:雾化器特性

[0168]

雾化器	Aerogen Pro X
MMAD	2.1μm
细颗粒部分(FPF,1-5μm)	68.2%
平均输出	0.35mL/min,以6至60L/min的流速。

[0169] 当患者插管时,制定初始给药计划。建议基于可用的毒理学信息以2分钟剂量开始。以0.35mL/min输出,可吸入(1-5μm)速率为0.24mL/min,相应于递送0.16mg DAS181/min。对于2分钟剂量,预计递送0.32mg DAS181可吸入气雾剂(总计递送0.46mg DAS181)。

[0170] 随访给药计划:

[0171] 如果没有观察到不良反应的症状,且患者是临床稳定的,则雾化的持续时间增加

至4min,并且随后两天再次监测症状。

[0172] 最初给药三天后,当通过PIV3特异性定量PCR测量时,PIV病毒载量基本上下降。患者最初被确定为具有非常高的病毒载量(在气管吸出物中 10^9 拷贝/ml),并且该水平在给药的最后一天后的两天内降低了5个log(至 10^4 拷贝/ml)。然而,患者在停止初始给药后具有病毒载量的反弹,指示初始剂量不足以清除感染。在此期间,患者临床上改善,显示略微更清楚的胸部X射线。在这些初始剂量的DAS181后,还观察到呼吸机支持方面的改善。由于缺乏清除病毒,以及患者的临床状态,建议继续用DAS181对患者给药。

[0173] 患者再次给药4分钟。观察到轻度临床改善,但通过定性DFA和定量PCR两者评估患者仍是PIV阳性。给予患者第五个DAS181剂量。患者的临床状况继续改善,并且5个剂量后患者被拔管。

[0174] DAS181的单一、间歇性剂量后,尽管存在临床改善,患者的PIV病毒载量仅略有下降(~ 1 个log)。建议用DAS181的另一疗程治疗患者。因为患者被拔管,如以上描述,稍微修改了给药计划。

[0175] 在未插管的年幼孩子中,关于患者顺应性、易用性和患者舒适度,面罩是递送雾化药物的最简单的方法。考虑口腔和鼻腔的药物损失以及使用面罩的递送效率,以估计适当的给药。需要较长的剂量以补偿递送效率的损失。

[0176] 有关具有 $3\mu\text{m}$ 至 $5\mu\text{m}$ 的粒径的DAS181干粉的开发数据显示,递送的药物的30%至35%将沉积到口腔和口咽。文献数据还显示,当在理想的情况下对儿童使用雾化器和面罩时,肺沉积为喷射的剂量的约48%。应当注意,关于婴儿肺部中药物沉积的文献有很大的不同,并且高度依赖于流量、婴儿合作、面罩适合/设计、以及给药时间。总结递送效率的影响因素,预期递送效率的至少50%减少。基于此,建议使用具有面罩设置的标准雾化器以8分钟给药开始。与当患者插管时给药相比,另外的给药时间补偿口腔/鼻腔和面罩设置的潜在损失。给药溶液制备不存在变化。对于8分钟剂量,预期递送共1.8mg DAS181,并且预期1.25mg DAS181是可吸入形式。

[0177] 用五(8分钟)每天一次剂量的DAS181治疗患者。这轮给药后,PIV3病毒载量再次实质上下降(大于3个log),如通过在每个剂量之前立即以及给药后数天内采自患者的鼻洗液样品中的病毒载量的定量评估证明的。在最后一次剂量后,病毒载量的减少继续下降5天,如图18中显示的(给药天数以红色来指示),并且给药后继续良好下降。患者最终出院并且病毒载量下降至检测不到。

[0178] 来自这一病例的结果显示用于雾化的DAS181溶液对插管患者和使用面罩患者两者的可行的递送方法。估计的给药计划是准确的,并且DAS181的可比量使用两种方法来递送。此外,这些数据支持在婴幼儿中使用DAS181,当以这种递送方法使用时,显示安全、有效的药物递送、和药物的抗病毒效果。

[0179] 实施例4-用雾化的DAS181治疗患者2

[0180] 患者为具有用于AML的外周血造血干细胞移植的一名61岁男性。移植后疗程并发皮肤GVHD、RSV肺炎、病因不明的肺结节和一系列的膀胱症状,认为是由于GVHD,为此用类固醇治疗他。次年,他以咳嗽、呼吸困难和胸痛住进外面的医院。他经历了BAL,开始西多福韦用于可能的腺病毒肺炎,并且7月1日以渐进性呼吸衰竭转院。通过PCR发现他具有血液腺病毒($86,000$ 拷贝/ml),并且鼻咽样品中具有腺病毒($C_t=38.4$)和PIV-3($C_t=32.3$)。继续西

多福韦 (1mg/kg, 3x/周)。将他插管, 此时BAL显示没有腺病毒或其他病原体, 但通过DFA和通过PCR呈PIV-3阳性 ($C_t=18.8$)。在治疗前, 他的状况逐渐恶化, 对呼吸机支持 ($FI_{O_2}= \sim 90\%$, 10mm PEEP) 的需要渐增。气管吸出物以 $C_t=13$, 推测非常高的病毒载量呈PIV3阳性。

[0181] DAS181通过内嵌 (in-line) 雾化器每日给予一次。溶液中DAS181的浓度是1.29mg/mL。在第1天, 递送1.5mL, 而在第2天, 将剂量增加至2.5mL。在第3-5天, 基于患者的临床响应选择最终剂量, 推荐剂量是介于2.5mL-5mL之间。进行每日病毒载量、实验室分析和临床观察结果。

[0182] 雾化的DAS181 (1.5mL) 治疗一天后, 患者耐受药物良好, 且病毒载量下降约1个log。以0.35mL/min的输出速率, 这个量给予约4min。所产生的剂量是在可吸入范围约1.3mg DAS181。

[0183] 第二次剂量 (在可吸入范围的2.5mL, 2.2mg DAS181) 后, 患者仍然存活, 并记录到略微好转, 因为他的氧合略微提高 (0.9 FI_{O_2} 和10的PEEP, 饱和度93%, 代替1.0和12, 饱和度88%-90%) 并且他的肺顺应性提高 (对18压力控制的430潮气量相对于对20压力控制的380)。他的胸片继续有弥漫性浸润, 但可已在双侧肺上部不太密集。两剂之后病毒载量下降大于一个log, 如表2中以下所示。

[0184] 表2

[0185]

给药日	病毒载量 (病毒RNA拷贝/mL)
处理前	6.27×10^{10}
给药后1天	9.41×10^9
给药后2天	1.96×10^9

[0186] DAS181的第二剂后, 患者家属决定, 他们希望撤下所有维持生命的措施。因此, 没有施用另外剂量的DAS181。

[0187] 实施例5-用雾化的DAS181治疗患者3

[0188] 这名患者是被评估可能患有间质性肺病的一名47岁女性。这名患者被诊断为可能的过敏性肺炎, 并接受类固醇治疗。患者以呼吸衰竭入院。采集自该患者的BAL通过定量PCR (呼吸道病毒组) 呈PIV-3阳性。所有其他诊断测试均为阴性。这名患者中观察到弥漫性肺炎, 并且对她进行ECMO用于氧合。

[0189] 由于患者恶化的肺功能状态, 为这名患者建议的给药是通过雾化器施用DAS181。第一剂量为1.5mL的1.3mg/mL浓度的DAS181储备溶液, 在可吸入范围内的1.3mg DAS181的总剂量。将第二剂量基于患者的状态和实验室读取值增加至2.5mL (2.5mL的储备溶液等于2.2mg的在可吸入范围内DAS181)。第3-5天的给药剂量在2.5mL-5.0mL之间。根据制造商的说明书和临床场所的建议使用Aerogen Pro-X雾化器系统。

[0190] 用DAS181给药5天后, 在疗程的大多数时间患者保持用ECMO。前3剂后, 她的胸部X射线出现改善。怀疑一些急性呼吸窘迫综合征 (ARDS) 发生, 并且推断多种因素促成了她的肺差的状态。疗程结束后, 患者除去ECMO, 并且似乎能够使用面罩辅助供氧进行呼吸, 这是患者临床状态的明显改善。

[0191] 表3总结了获自这名患者的实验结果。病毒学结果来自于每天给药之前立即收集自受试者的咽喉拭子样品 (接种到3mL的标准Copan病毒运输介质中的2拭子)。

[0192] 表3

给药日	接受的剂量	PIV3 病毒载量
第 1 天	1.5 mL	8100
第 2 天	2.5 mL	20100
[0193] 第 3 天	2.5 mL	6350
第 4 天	2.5 mL	BLQ
第 5 天	2.5 mL	BLQ
第 6 天(给药后第 1 天)	无	未测试

[0194] 图19描绘了上表中呈现的数据。

[0195] 实施例6-用雾化的DAS181治疗患者4

[0196] 患者4是患有SCIDS (T-/B+ NK^-) 的基础疾病、并发骨髓移植后GVHD的7个月大的男性,其显示为持续性PIV3感染。在DAS181治疗之前,PIV3感染持续了大约6周,并且患者始终具有持续的氧气需求。患者进展到需要机械通气,并还被诊断出肺炎,肺炎用类固醇和抗生素的21天疗程来治疗。患者接受IVIG,但副流感病毒感染持续。将患者拔管,但仍坚持缺氧和不正常的胸部X射线,需要持续补充氧。患者接受自体骨髓移植,并在骨髓移植后接受免疫抑制GVHD后病情越来越严重。用DAS181治疗之前通过呼吸膜阵列PCR证实PIV3感染。此外,通过直接荧光分析 (DFA) 证实PIV3。

[0197] 建议通过雾化器递送溶解的DAS181干粉的初始5天的过程,选择给药的另外5天的随访治疗过程。FDA批准授权该EIND。药物通过具有Aeroneb雾化器的面罩来施用。

[0198] 施用DAS181的首次剂量 (1.5mL; 1.9mg DAS181) 并无任何不良反应。随后,施用接下来的四个剂量 (1.5mL; 1.9mg DAS181)。在给药的这前五天期间,患者开始显示临床改善的轻度迹象。肺中存在湿啰音,但由DAS181的第3次剂量给予解决。然而,患者在整个给药前五天仍然有症状,继续需要补充氧气(通过高流量鼻导管4-6L)。在整个治疗过程中没有观察到与研究药物相关的不良反应。医生建议用DAS181继续治疗,持续另一轮给药。

[0199] 通过面罩施用另外四剂量的DAS181 (1.5mL, 1.9mg DAS181)。由于碱性磷酸酶水平增加,在DAS181治疗的最后3剂量期间隔日施用DAS181。在这段治疗过程中,患者表现为显示实质的临床改善。补充氧气的需求开始改善,在治疗结束时下降到仅0.5L/min。通过胸部X-射线和由一般观察两者,肺功能还报道为实质地改善。在治疗过程中患者还经历了咳嗽减少并且患者的呼吸模式变得更正常。

[0200] 该患者的病毒载量结果获自由DFA (半定量) 和通过qPCR (定量) 的评估。鼻咽样品通过qPCR并根据需要由DFA每日测试。以下表4,总结了获自各评估的病毒载量结果。测量在阴性 (没有观察到的感染) 至4+ (在视野中100%的细胞呈PIV阳性) 之间的DFA读出值。定量PCR结果测量RNA拷贝/mL。鼻咽拭子被用于两种评估。

[0201] 表4

[0202]

日期	DFA 结果	qPCR 结果
第 1 天 (基线 (给药 1 前))	4+	5.44×10^5
第 2 天 (给药 2 前)	无数据	6.61×10^6
第 3 天 (给药 3 前)	无数据	6.14×10^7
第 4 天 (给药 4 前)	2-3+	8.48×10^7
第 5 天 (给药 5 前)	无数据	7.53×10^7
第 6 天 (给药 6 前)	无数据	7.38×10^6
第 7 天 (给药 7 前)	2-3+	1.40×10^8

[0203]

第 8 天 (给药 8 前)	1+	7.50×10^6
第 9 天 (没有施用剂量)	痕量至 1+	3.00×10^7
第 10 天 (给药 9 前)	1+	4.93×10^6
第 12 天 (没有施用剂量)	稀少/痕量	1.03×10^8
第 14 天 (没有施用剂量)	阴性	无数据

[0204] 总体上,患者在整个治疗中显示显著的临床改善,除了注意到碱性磷酸酶增加外,没有报道的药物的不良反应。病毒学结果有些不同,在于DFA评估显示实质减少病毒感染,导致在治疗结束时的阴性DFA结果。然而,定量PCR结果指示,在治疗过程结束时,病毒仍然存在于样品中。此时为什么结果不同是未知的。有差异的结果是由于以下事实是可能的: DFA评估测量积极感染的完整细胞,而PCR测量样品中存在的所有病毒RNA,无论感染与否。

[0205] 实施例7:用干粉DAS181治疗患者5

[0206] 患者5是有克罗恩氏病 (Crohn's disease)、糖尿病和经历左肺移植的间质性肺病的病史的一名59岁老年男子。他除了每月阿达木单抗治疗他的严重克罗恩病外,还保持他克莫司、霉酚酸酯、和泼尼松每日5mg的慢性维持免疫抑制疗法。他的移植后过程并发支气管软化和几种呼吸道感染,包括呼吸道合胞病毒 (RSV) 肺炎和克雷伯菌肺炎 (Klebsiella pneumonia)。在这些呼吸道感染后他几乎返回到他的基线。

[0207] 他发生发热、发冷和脓性痰导致住院。用万古霉素、头孢他啶、和左氧氟沙星的经验疗法,使他退热并且已解决了他的脓性痰;然而,他的劳力性呼吸困难、气喘、和咳嗽改善缓慢。他体温正常,但有2升氧气需求,并且在检查肺时气喘和湿啰音。进行胸部电脑断层扫描,其显示炎性浸润出现在他的左肺下叶。他继续接受万古霉素、头孢他啶、左氧氟沙星。对他进行支气管镜检查,并注意到有淡黄色的分泌物。通过定性PCR检测他的支气管肺泡灌洗 (BAL) 样本呈副流感病毒-3 (PIV3) 阳性;所有其他培养物和病毒研究未公开。

[0208] 建议10mg DAS181的给药方案3-5天,取决于响应和不良反应。通过干粉吸入器施用药物,可基于症候学 and 安全性保证另外的治疗过程。每天收集鼻咽拭子以确定PIV-3定量的病毒载量。还将进行日常实验 (包括全血计数、综合化学、肝功能检查、PT和PTT)。还进行基线和每日肺功能测试。

[0209] 治疗之前立即获得的生命体征指示,患者需要2升通过鼻插管补充的O₂。在施用他的首剂DAS181之前获得的肺功能检查显示1.52升的FEV1和1.70升的FVC。

[0210] 在每次给药前收集以下样品:鼻咽 (N/P) 拭子和口咽 (OP) 洗液用于监测病毒脱落,

并且血液样品用于测试DAS181水平。In-Check DIAL被用于吸入训练。在用旋转吸入器和空胶囊的吸入技术的进一步令人满意的训练后,DAS181经由旋转吸入器施用。患者没有对DAS181的施用立即发生反应。

[0211] 患者接受连续5天的治疗,没有经历任何明显的不良反应。在治疗过程期间,从呼吸和全身的角度来看,他临床上改善了。经2天治疗,他感到较少呼吸困难并且他的咳嗽变得更干燥。在治疗的最后一天,在他的能量和呼吸方面,他觉得回到他的基线的约90%。在开始DAS181后第6天,进行支气管镜检查,并且BAL液体再次呈PIV3阳性,病毒载量为 3.50×10^7 。

[0212] 完成DAS181治疗后两天患者出院回家。治疗后他的生命体征均显示改善,并且治疗2周后当通过电话联系时,他报告感觉良好,无复发的迹象。他的运动耐量已返回至他患病之前的基线水平。总体上,在治疗完成时,患者还改善了关于他的氧气需求。

[0213] 鼻咽拭子和口咽部洗液样品送往PIV3病毒载量测试。将结果总结在下表中:

[0214]	给药后日期	NP 拭子 PIV 拷贝/ml	OP 洗液 PIV 拷贝/ml
	第 1 天 (给药 1 前)	7.87×10^5	5.39×10^4
	第 2 天 (给药 2 前)	1.46×10^5	2.63×10^5
	第 3 天 (给药 3 前)	7.77×10^6	3.46×10^4
	第 4 天 (给药 4 前)	8.87×10^7	2.67×10^4
	第 5 天 (给药 5 前)	1.45×10^5	1.73×10^6
	第 6 天(+1) (给药 5 后第 1 天)	2.01×10^4	4.41×10^5
	第 7 天(+2) (给药 5 后第 2 天)	2.56×10^4	2.20×10^3

[0215] 在定量PIV3病毒载量测量中存在一些天之间的变化性,可能由于由不同的供应商样品收集技术中的差异和测定本身对样品中病毒粒子中的小变化的精细灵敏度。数据暗示病毒载量下降 $\geq 1 \log$,不论样品类型。

[0216] 实施例8:用干粉DAS181治疗患者6

[0217] 患者6是一名有乳腺癌和治疗相关的AML s/p异基因HSCT的病史的51岁女性。尽管她的白血病缓解,她已发展为慢性移植物抗宿主病和梗阻性细支气管炎综合症,需要用霉酚酸酯、伊马替尼、和长期类固醇治疗。她的呼吸困难发展了严重增加,至她无法完成她的基本日常生活活动的程度。她还发展了新的发热和持续性干咳。她被送往医院用于进一步治疗。胸部CT显示弥漫性磨玻璃影,和一些支气管血管结节影。入院鼻咽拭子PCR呈副流感病毒1 (PIV1) 阳性且流感和RSV呈阴性。进行支气管肺泡灌洗并且PIV1的PCR再次呈阳性。她有持续性干咳、劳力性呼吸困难、以及2L补充氧气需求。

[0218] 建议的给药方案为通过干粉吸入器每日递送10mg的DAS181达5天,取决于响应并且如果有不良反应则进行记录。计划获得鼻咽拭子样品用于确定定量副流感病毒PCR和病毒培养物。收集安全性实验,包括全血计数、和综合化学。治疗的同时进行基线和每日肺功能测试。另外5剂DAS181被留作可能性,以待患者的症候学 and 安全性。

[0219] 每次给药之前收集样品,包括:鼻咽 (NP) 拭子,口咽部洗液 (OP) 和血液DAS181 PK 样品。In-Check DIAL被用于吸入训练。还进行肺功能测试 (PFT)。在治疗的第1天,结果为:1秒用力呼气量 (FEV₁) = 0.78;用力肺活量 (FVC) = 1.78。认为用旋转吸入器和空胶囊的吸

入技术的进一步训练令人满意后,临床场所继续经由旋转吸入器施用DAS181胶囊。患者需要3次吸入以吸空胶囊的内含物。患者对施用没有立即反应。

[0220] 患者接受连续5天治疗,没有经历任何明显的不良反应。她在治疗过程中临床改善。经治疗2天,她自觉呼吸急促减少,出院回家。第3-4天她自己施用DAS181治疗。在治疗的最后一天,她感觉好很多,运动耐量轻微增加,但还没有回到她的呼吸基线。分泌物及咳嗽减少。在治疗的最后一天PFT显示为0.83L的FEV1和1.96L的FVC。在她的最后给药后的4天评估她,并且甚至进一步改善她的症状。数天后医师致电患者,她指出,她感觉良好,没有与药物相关的任何不良反应。基本上改善了她的呼吸急促,并且她能够减少用于治疗她的慢性肺移植抗宿主病和梗阻性细支气管炎综合征的她的类固醇剂量。

[0221] 鼻咽和口咽样品被送往用于PIV-1病毒载量检测,其结果如下。

[0222]	给药后日期	N/P 拭子 PIV1 拷贝/ml	O/P 洗液 PIV1 拷贝/ml
	第 1 天 (给药 1 前)	9.60×10^5	3.95×10^4
	第 2 天 (给药 2 前)	5.95×10^5	4.82×10^5
	第 5 天 (给药 5 前)	3.42×10^7	5.30×10^6
	第 9 天 (给药 5 后 4 天)	1.03×10^4	5.70×10^3

[0223] 在用DAS181治疗后,鼻咽和口咽部两者PIV病毒载量显示实质下降,其与她的显著临床改善并行。

[0224] 实施例9:用干粉DAS181治疗患者7

[0225] 患者7是一名具有特发性肺纤维化 (IPF)、接受右肺移植的病史的64岁老年女性。她最初移植后过程并发急性体液性排斥反应,用血浆去除术和IVIG处理,并且不能耐受MMF或依木兰,所以用泼尼松和他克莫司维持。入院前几周,她的丈夫患上了上呼吸道感染,随后他顺利康复。然后患者开始经历渐增的呼吸急促和咳嗽,在家吸O₂,氧饱和度为80%,并随后住进了临床机构。支气管镜检查 (BAL) 未见细菌或真菌感染,或PJP的证据,但通过PCR没有回到PIV3阳性。后来,她发生缺氧加重,并被转入重症监护病房进行高流量吸氧支持和监测。她继续需要高流量氧气支持,并保持在65%的FiO₂,没有改善的证据。她的免疫抑制尽可能被最小化。

[0226] 开始以DAS181给药。患者接受5剂量的DAS181 (经由干粉吸入器10mg/天)。患者接受药物并且反应相当好,病毒学和临床参数两者迅速改善。她没有与药品相关的显著不良反应。观察到PIV3病毒载量的显著改善,并示于图20。

[0227] 给药、同时的相关药物、病毒载量、和支持氧气需求的概述示于图21。如可见的,以DAS181给药后,病毒载量和所需的氧气支持显著减少。

[0228] 实施例10:用干粉DAS181治疗患者8

[0229] 患者8是一名具有霍奇金病 (Hodgkin's disease)、接受异基因HSCT用于复发性疾病的病史的57岁老年男子。他后来复发,并接受供者淋巴细胞输注。他的临床过程并发移植抗宿主病 (GVHD)。

[0230] 他以呼吸急促、咳嗽、咯血和新发肾病综合征的主诉住院。以支气管肺泡灌洗的支气管镜检查是弥漫性肺泡出血显著的。胸部CT扫描是显著弥漫性磨玻璃影,并且通过对BAL液体的PCR证实患者的副流感3型。他的临床状况恶化,并且他需要5升/分钟的氧气 (O₂),并

以饱和93%。他的血氧饱和度下降为以最小的活动80' s。

[0231] 在这名患者的病例下,FDA批准使用DAS181。经批准的给药方案是连续5天施用DAS181干粉。每次给药前收集鼻咽拭子样品以评估病毒载量。以旋转吸入器的吸入技术训练令人满意后,施用DAS181。患者对施用没有立即反应。他接受连续5天治疗,没有经历任何明显的不良反应。患者服用他最后一剂的DAS181,并临床上改善后,从医院出院。

[0232] 评估鼻咽样品的PIV3 RNA拷贝/mL,并且显示病毒载量实质下降,最终导致无法检测的滴度。

[0233]

给药日期(第一天=给药1)	鼻咽拭子PIV3拷贝/mL
第1天(给药1前采集样品)	26,400
第2天(给药2前采集样品)	4,900
第3天(给药3前采集样品)	11,600
第4天(给药4前采集样品)	3,290
第5天(给药5前采集样品)	检测不到

[0234] 如以上表格中可见,用DAS181干粉治疗5天后病毒载量下降至检测不到。病毒载量的这种下降还与临床改善相关,并随后该患者经历出院。在用DAS181治疗之前,患者还需要实质补充氧气支持,其在治疗后得到缓解。

[0235] 实施例11-DAS181的制备

[0236] 制备DAS181用于以气雾剂制剂使用

[0237] 在水中的DAS181 (1.0-10.0mg/mL) 储备溶液可被存储在2℃-8℃下至少一周。以较低浓度每天新鲜制备给药溶液并储存在环境条件下或冷藏直至使用。对于给药溶液,储备溶液可以以生理盐水或其他药学上合适的水性溶液来稀释。

[0238] DAS181是包含来自人双调蛋白的肝素(糖胺聚糖,或GAG)结合结构域、经由其N-末端与粘性放线菌的催化结构域的C-末端融合的融合蛋白(具有氨基末端Met的DAS181中的氨基酸的序列列于SEQ ID NO:1中;缺少氨基末端Met的DAS181中的氨基酸序列列于SEQ ID NO:1)。

[0239] 可如Malakhov等人.2007Antimicrobial Agents Chemotherapy 1470-1479描述的制备和纯化DAS181蛋白,其通过引用以其整体并入本文。简言之,将编码具有氨基末端Met的DAS181的DNA片段克隆进IPTG(异丙基-β-D-硫代半乳糖苷)诱导型启动子的控制之下的质粒载体pTrc99A(Pharmacia)。将得到的构建体在大肠杆菌(E.Coli)的BL21菌株中表达。表达DAS181蛋白的大肠杆菌细胞使用Toyopearl缓冲液1、UFP-500-E55中空纤维筒(GE Healthcare)和Watson-Marlow蠕动泵通过在发酵收获洗涤步骤中的透析过滤来洗涤。重组DAS181蛋白可从细胞大量纯化,如公布的US 2005/0004020和US 2008/0075708中描述的,这些专利申请通过引用以其整体并入本文。

[0240] 其他实施方案

[0241] 应理解,虽然本发明连同其详细的说明已被描述,但前述描述旨在说明并非限制本发明的范围,本发明的范围由所附的权利要求书的范围所限定。其他方面、优势、和修改在以下的权利要求书的范围中。

[0242] SEQ ID NO:1

MGDHPQATPA PAPDASTELP ASMSQAQHLA ANTATDNYRI PAITTAPNGD
LLISYDERPK DNGNGGSDAP NPNHIVQRRS TDGGKTWSAP TYIHQGTETG
KKVGYS DPSY VVDHQTGTIF NFHVKS YDQG WGGSRGGTDP ENRGIIQAEV
STSTDNGWTW THRTITADIT KDKPW TARFA ASGQGIQIQH GPHAGRLVQQ
[0243] YTIRTAGGAV QAVSVYSDDH GKTWQAGTPI GTGMDENKVV ELSDGSLMLN
SRASDGSGFR KVAHSTDGGQ TWSEPVSDKN LPDSVDNAQI IRAFPNAAPD
DPRAKVLLLS HSPNPRPWSR DRGTISMSCD DGASWTTSKV FHEPFVGYTT
IAVQSDGSIG LLSEDA HNGA DYGGIWYRNF TMNWLGEQCG QKPAKRKKKG
GKNGKNRRNR KKNP
[0244] SEQ ID NO:2
GDHPQATPAP APDASTELPA SMSQAQH LAA NTATDNYRIP AITTAPNGDL
LISYDERPKD NGNGGSDAPN PNHIVQRRST DGGKTWSAPT YIHQGTETGK
KVGYS DPSYV VDHQTGTIFN FHVKS YDQGW GGSRRGGTDPE NRGIIQAEVS
TSTDNGWTWT HRTITADITK DKPW TARFAA SGQGIQIQHG PHAGRLVQQY
[0245] TIRTAGGAVQ AVSVYSDDHG KTWQAGTPIG TGMDENKVVE LSDGSLMLNS
RASDGSGFRK VAHSTDGGQT WSEPVSDKNL PDSVDNAQII RAFPNAAPDD
PRAKVLLLSH SPNPRPWSRD RGTISMSCDD GASWTTSKVF HEPFVGYTTI
AVQSDGSIGL LSEDA HNGAD YGGIWYRNFT MNWLGEQCGQ KPAKRKKKGG
KNGKNRRNRK KKNP

序列表

<110> 安迅生物制药有限公司

<120> 用于治疗流感和副流感患者的方法、化合物和组合物

<130> 21865-0018W01

<140> PCT/US2013/026754

<141> 2013-02-19

<150> 61/727,627

<151> 2012-11-16

<150> 61/600,545

<151> 2012-02-17

<160> 2

<170> PatentIn版本3.5

<210> 1

<211> 415

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的多肽

<400> 1

```

Met Gly Asp His Pro Gln Ala Thr Pro Ala Pro Ala Pro Asp Ala Ser
1           5           10           15
Thr Glu Leu Pro Ala Ser Met Ser Gln Ala Gln His Leu Ala Ala Asn
          20           25           30
Thr Ala Thr Asp Asn Tyr Arg Ile Pro Ala Ile Thr Thr Ala Pro Asn
          35           40           45
Gly Asp Leu Leu Ile Ser Tyr Asp Glu Arg Pro Lys Asp Asn Gly Asn
          50           55           60
Gly Gly Ser Asp Ala Pro Asn Pro Asn His Ile Val Gln Arg Arg Ser
65           70           75           80
Thr Asp Gly Gly Lys Thr Trp Ser Ala Pro Thr Tyr Ile His Gln Gly
          85           90           95
Thr Glu Thr Gly Lys Lys Val Gly Tyr Ser Asp Pro Ser Tyr Val Val
          100          105          110
Asp His Gln Thr Gly Thr Ile Phe Asn Phe His Val Lys Ser Tyr Asp
          115          120          125
Gln Gly Trp Gly Gly Ser Arg Gly Gly Thr Asp Pro Glu Asn Arg Gly
          130          135          140
Ile Ile Gln Ala Glu Val Ser Thr Ser Thr Asp Asn Gly Trp Thr Trp

```

145	150	155	160
Thr His Arg Thr Ile Thr Ala Asp Ile Thr Lys Asp Lys Pro Trp Thr			
	165	170	175
Ala Arg Phe Ala Ala Ser Gly Gln Gly Ile Gln Ile Gln His Gly Pro			
	180	185	190
His Ala Gly Arg Leu Val Gln Gln Tyr Thr Ile Arg Thr Ala Gly Gly			
	195	200	205
Ala Val Gln Ala Val Ser Val Tyr Ser Asp Asp His Gly Lys Thr Trp			
	210	215	220
Gln Ala Gly Thr Pro Ile Gly Thr Gly Met Asp Glu Asn Lys Val Val			
225	230	235	240
Glu Leu Ser Asp Gly Ser Leu Met Leu Asn Ser Arg Ala Ser Asp Gly			
	245	250	255
Ser Gly Phe Arg Lys Val Ala His Ser Thr Asp Gly Gly Gln Thr Trp			
	260	265	270
Ser Glu Pro Val Ser Asp Lys Asn Leu Pro Asp Ser Val Asp Asn Ala			
	275	280	285
Gln Ile Ile Arg Ala Phe Pro Asn Ala Ala Pro Asp Asp Pro Arg Ala			
	290	295	300
Lys Val Leu Leu Leu Ser His Ser Pro Asn Pro Arg Pro Trp Ser Arg			
305	310	315	320
Asp Arg Gly Thr Ile Ser Met Ser Cys Asp Asp Gly Ala Ser Trp Thr			
	325	330	335
Thr Ser Lys Val Phe His Glu Pro Phe Val Gly Tyr Thr Thr Ile Ala			
	340	345	350
Val Gln Ser Asp Gly Ser Ile Gly Leu Leu Ser Glu Asp Ala His Asn			
	355	360	365
Gly Ala Asp Tyr Gly Gly Ile Trp Tyr Arg Asn Phe Thr Met Asn Trp			
	370	375	380
Leu Gly Glu Gln Cys Gly Gln Lys Pro Ala Lys Arg Lys Lys Lys Gly			
385	390	395	400
Gly Lys Asn Gly Lys Asn Arg Arg Asn Arg Lys Lys Lys Asn Pro			
	405	410	415

<210> 2

<211> 414

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的多肽

<400> 2

Gly	Asp	His	Pro	Gln	Ala	Thr	Pro	Ala	Pro	Ala	Pro	Asp	Ala	Ser	Thr
1				5					10					15	
Glu	Leu	Pro	Ala	Ser	Met	Ser	Gln	Ala	Gln	His	Leu	Ala	Ala	Asn	Thr
			20					25					30		
Ala	Thr	Asp	Asn	Tyr	Arg	Ile	Pro	Ala	Ile	Thr	Thr	Ala	Pro	Asn	Gly
		35					40					45			
Asp	Leu	Leu	Ile	Ser	Tyr	Asp	Glu	Arg	Pro	Lys	Asp	Asn	Gly	Asn	Gly
	50					55					60				
Gly	Ser	Asp	Ala	Pro	Asn	Pro	Asn	His	Ile	Val	Gln	Arg	Arg	Ser	Thr
65					70				75					80	
Asp	Gly	Gly	Lys	Thr	Trp	Ser	Ala	Pro	Thr	Tyr	Ile	His	Gln	Gly	Thr
			85					90					95		
Glu	Thr	Gly	Lys	Lys	Val	Gly	Tyr	Ser	Asp	Pro	Ser	Tyr	Val	Val	Asp
		100						105					110		
His	Gln	Thr	Gly	Thr	Ile	Phe	Asn	Phe	His	Val	Lys	Ser	Tyr	Asp	Gln
	115						120					125			
Gly	Trp	Gly	Gly	Ser	Arg	Gly	Gly	Thr	Asp	Pro	Glu	Asn	Arg	Gly	Ile
	130					135					140				
Ile	Gln	Ala	Glu	Val	Ser	Thr	Ser	Thr	Asp	Asn	Gly	Trp	Thr	Trp	Thr
145					150				155					160	
His	Arg	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Ile	Thr	Lys	Asp	Lys	Pro	Trp	Thr	Ala
			165					170					175		
Arg	Phe	Ala	Ala	Ser	Gly	Gln	Gly	Ile	Gln	Ile	Gln	His	Gly	Pro	His
		180					185					190			
Ala	Gly	Arg	Leu	Val	Gln	Gln	Tyr	Thr	Ile	Arg	Thr	Ala	Gly	Gly	Ala
	195						200					205			
Val	Gln	Ala	Val	Ser	Val	Tyr	Ser	Asp	Asp	His	Gly	Lys	Thr	Trp	Gln
	210					215					220				
Ala	Gly	Thr	Pro	Ile	Gly	Thr	Gly	Met	Asp	Glu	Asn	Lys	Val	Val	Glu
225					230				235					240	
Leu	Ser	Asp	Gly	Ser	Leu	Met	Leu	Asn	Ser	Arg	Ala	Ser	Asp	Gly	Ser
			245					250					255		
Gly	Phe	Arg	Lys	Val	Ala	His	Ser	Thr	Asp	Gly	Gly	Gln	Thr	Trp	Ser
		260						265					270		
Glu	Pro	Val	Ser	Asp	Lys	Asn	Leu	Pro	Asp	Ser	Val	Asp	Asn	Ala	Gln
	275						280					285			
Ile	Ile	Arg	Ala	Phe	Pro	Asn	Ala	Ala	Pro	Asp	Asp	Pro	Arg	Ala	Lys
	290					295						300			

Val	Leu	Leu	Leu	Ser	His	Ser	Pro	Asn	Pro	Arg	Pro	Trp	Ser	Arg	Asp
305						310				315					320
Arg	Gly	Thr	Ile	Ser	Met	Ser	Cys	Asp	Asp	Gly	Ala	Ser	Trp	Thr	Thr
						325				330					335
Ser	Lys	Val	Phe	His	Glu	Pro	Phe	Val	Gly	Tyr	Thr	Thr	Ile	Ala	Val
						340				345					350
Gln	Ser	Asp	Gly	Ser	Ile	Gly	Leu	Leu	Ser	Glu	Asp	Ala	His	Asn	Gly
						355				360					365
Ala	Asp	Tyr	Gly	Gly	Ile	Trp	Tyr	Arg	Asn	Phe	Thr	Met	Asn	Trp	Leu
						370				375					380
Gly	Glu	Gln	Cys	Gly	Gln	Lys	Pro	Ala	Lys	Arg	Lys	Lys	Lys	Gly	Gly
385						390				395					400
Lys	Asn	Gly	Lys	Asn	Arg	Arg	Asn	Arg	Lys	Lys	Lys	Asn	Pro		
						405				410					

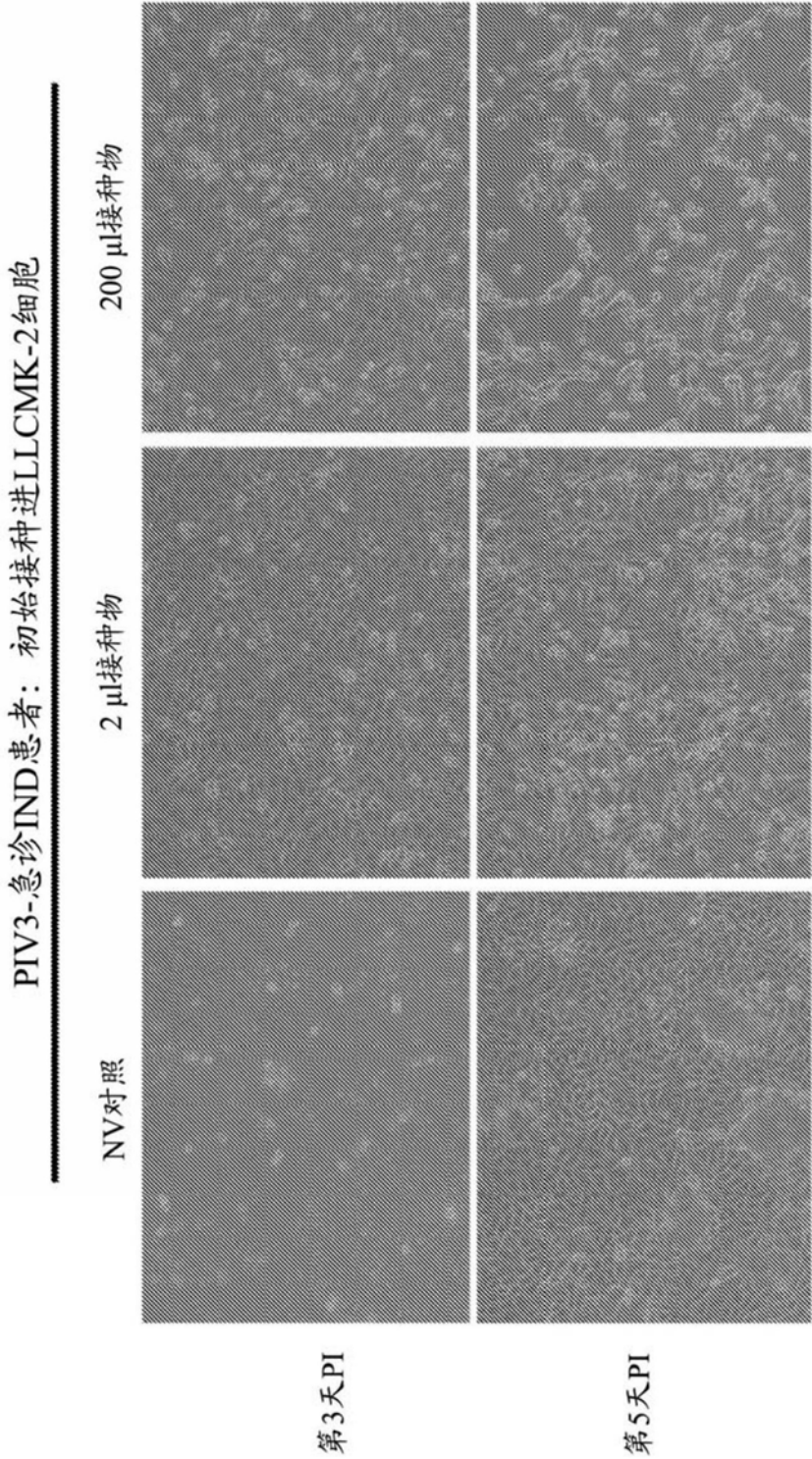


图1

用于PIV3的存在的直接免疫荧光抗体测定
感染后第3天

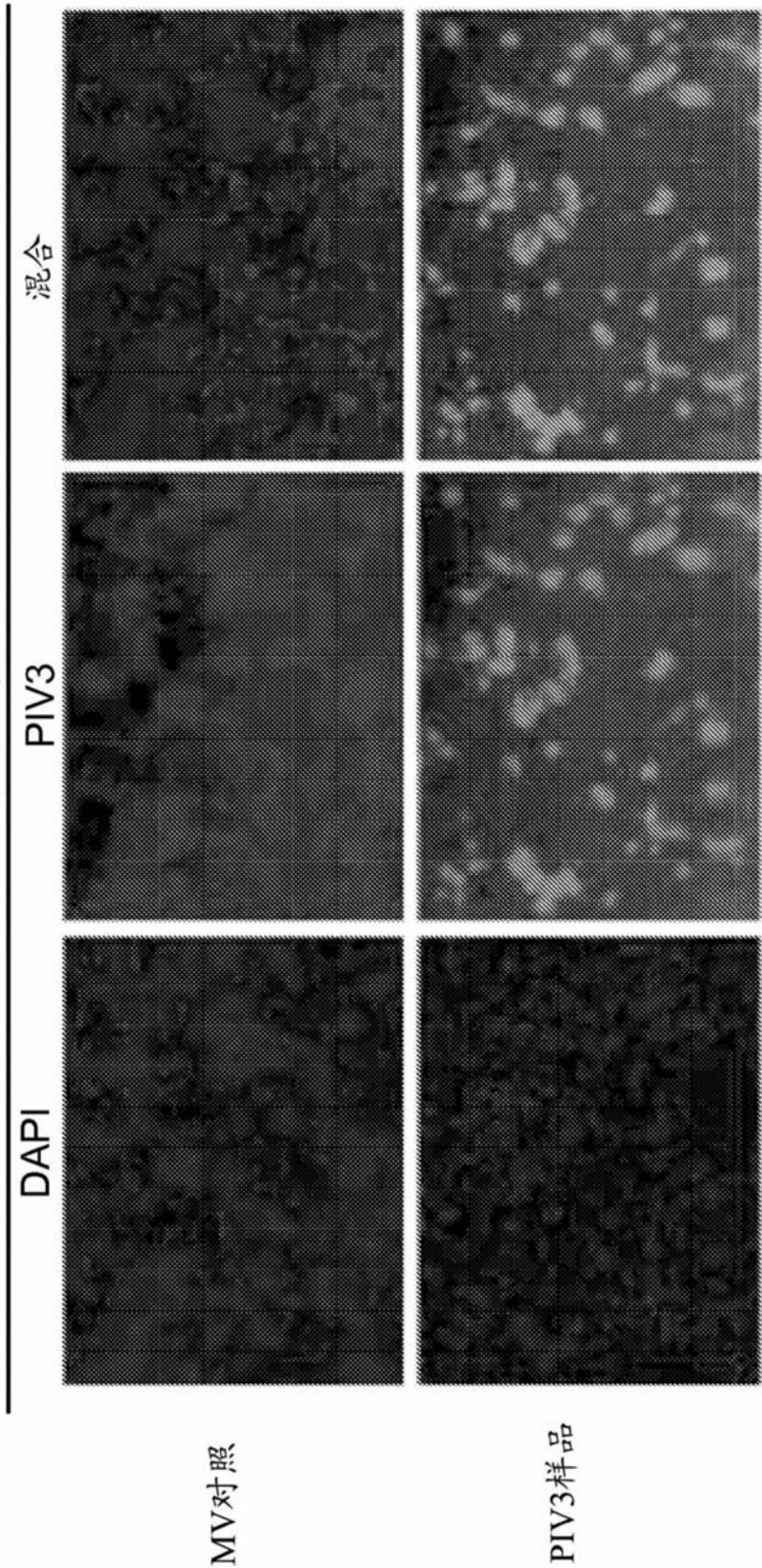


图2

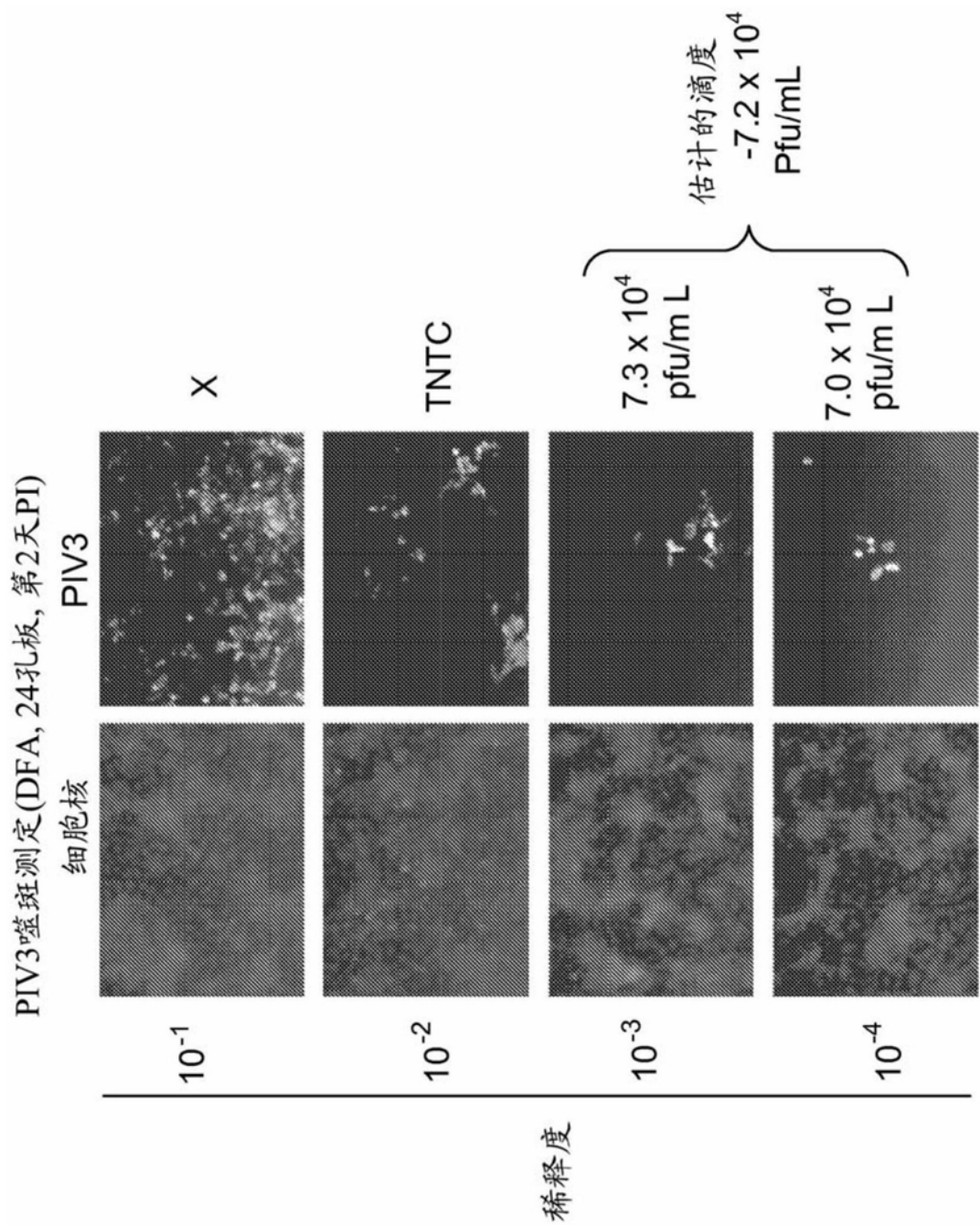


图3

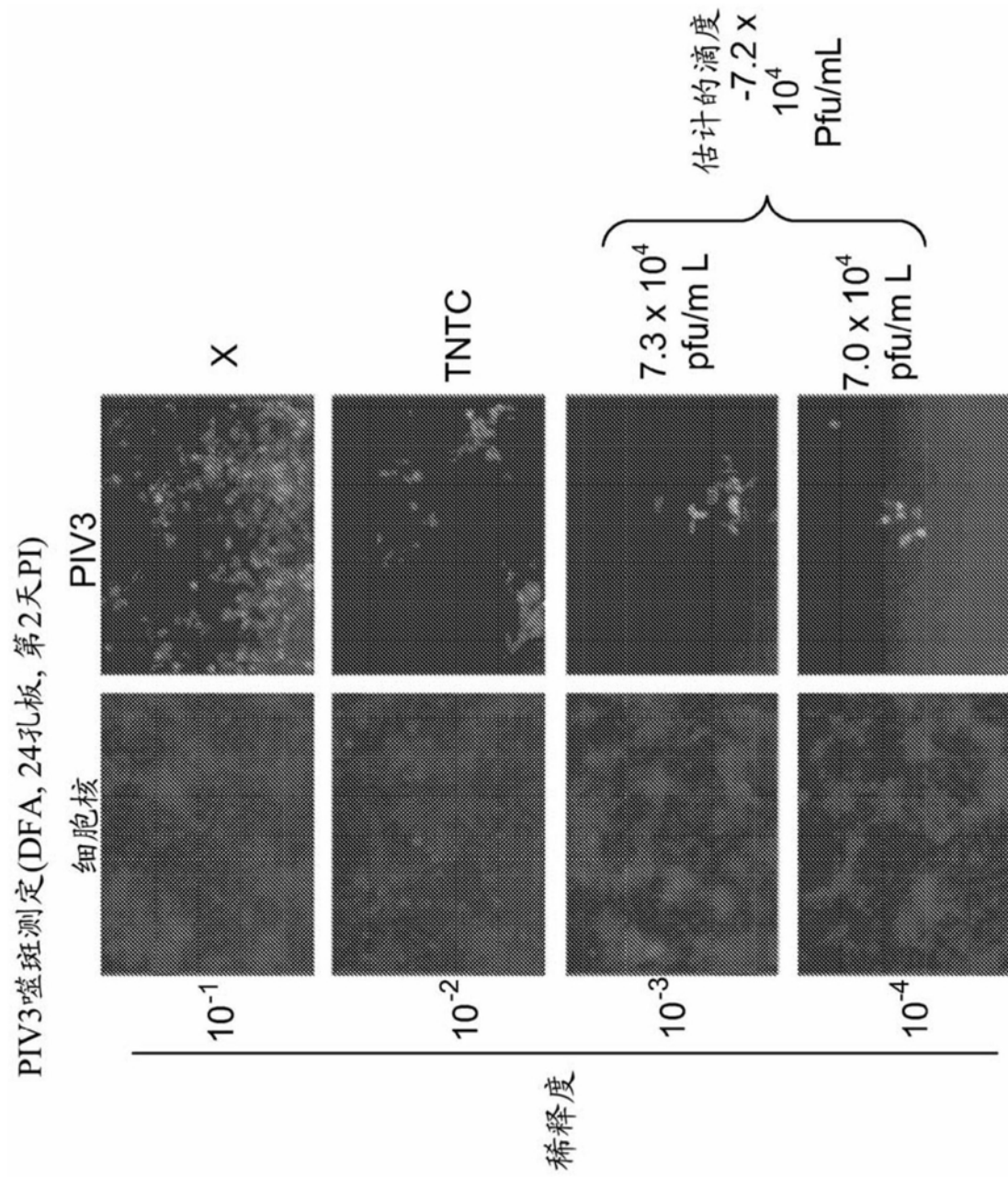
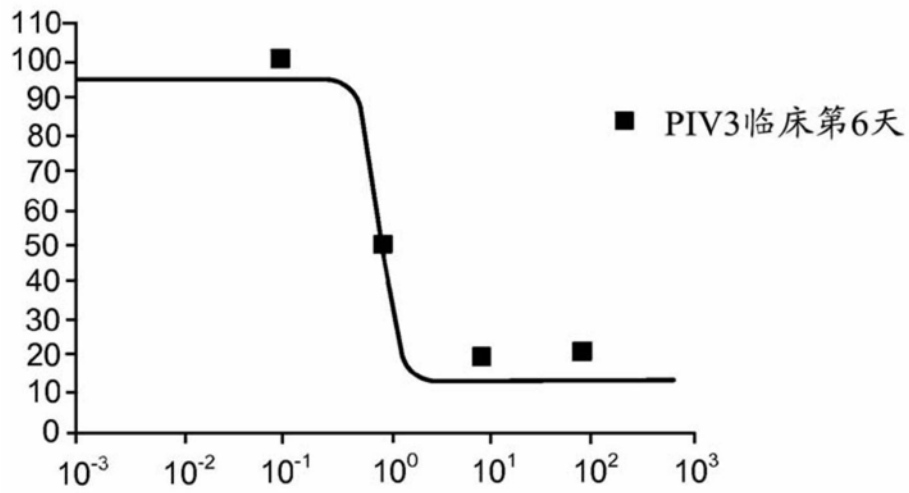


图4

第6天PIV3临床EIND噬斑减少测定



第7天PIV3临床EIND噬斑减少测定

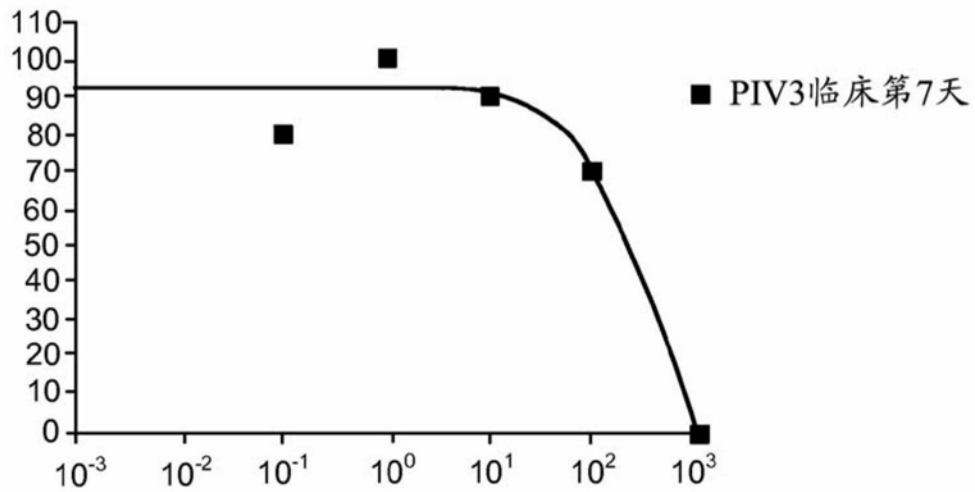


图5

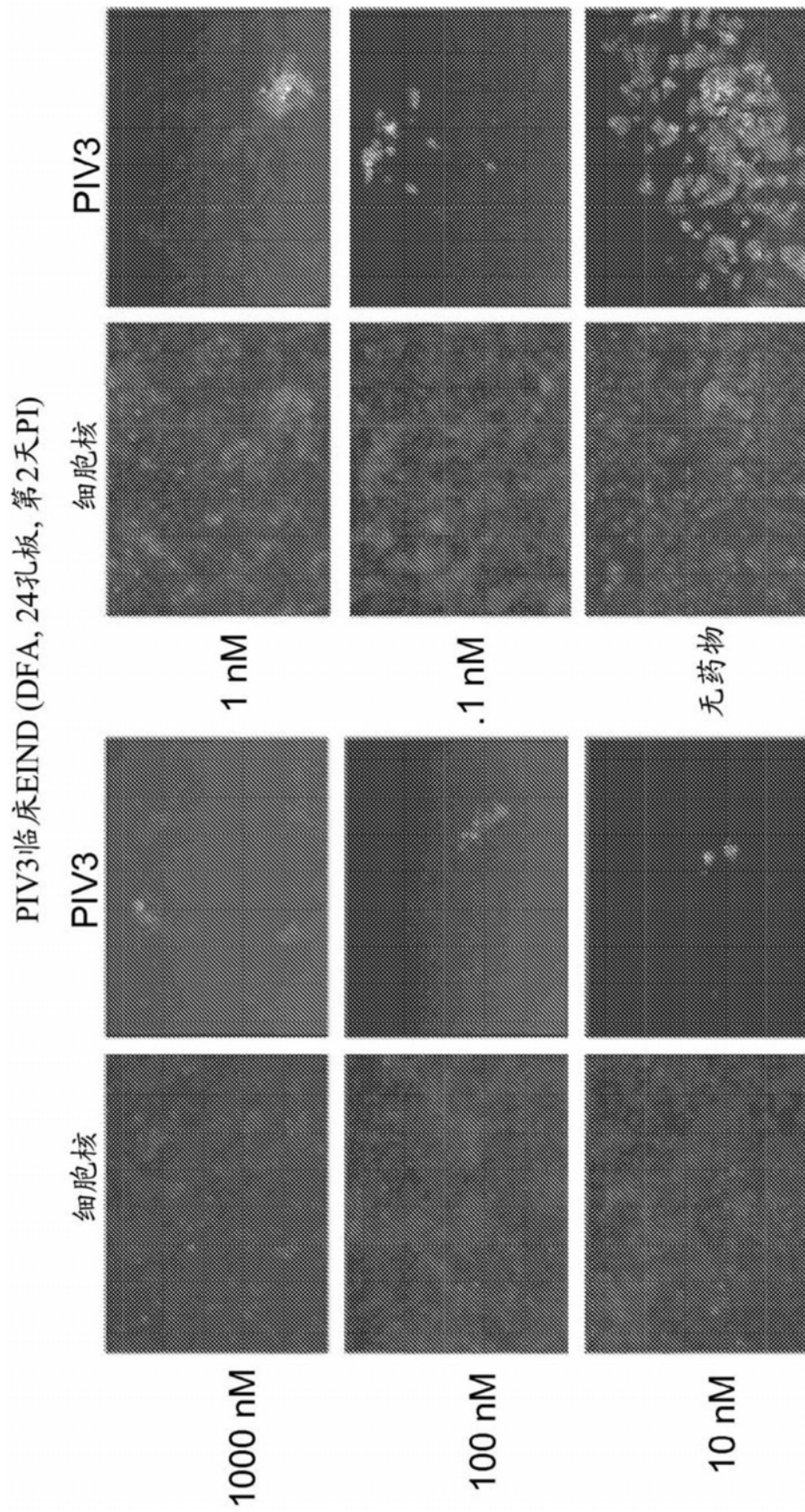


图6

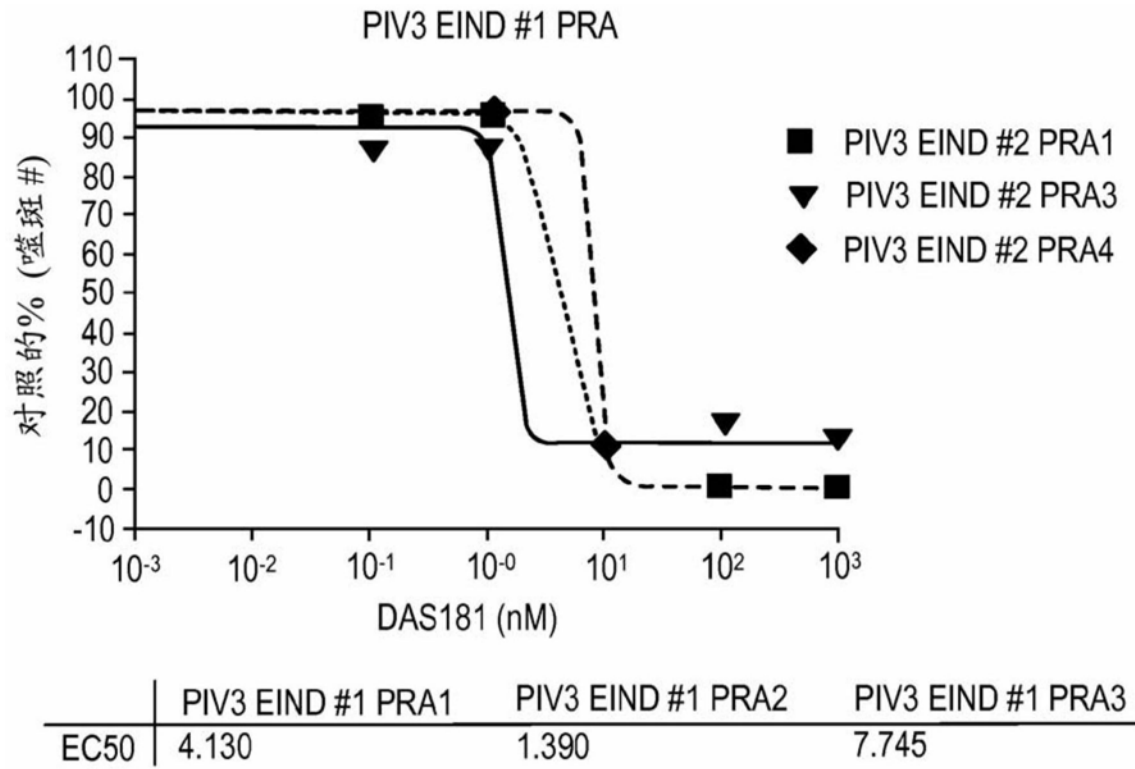


图7

体外DAS-181初步测试：病毒感染的抑制(TCID₅₀)

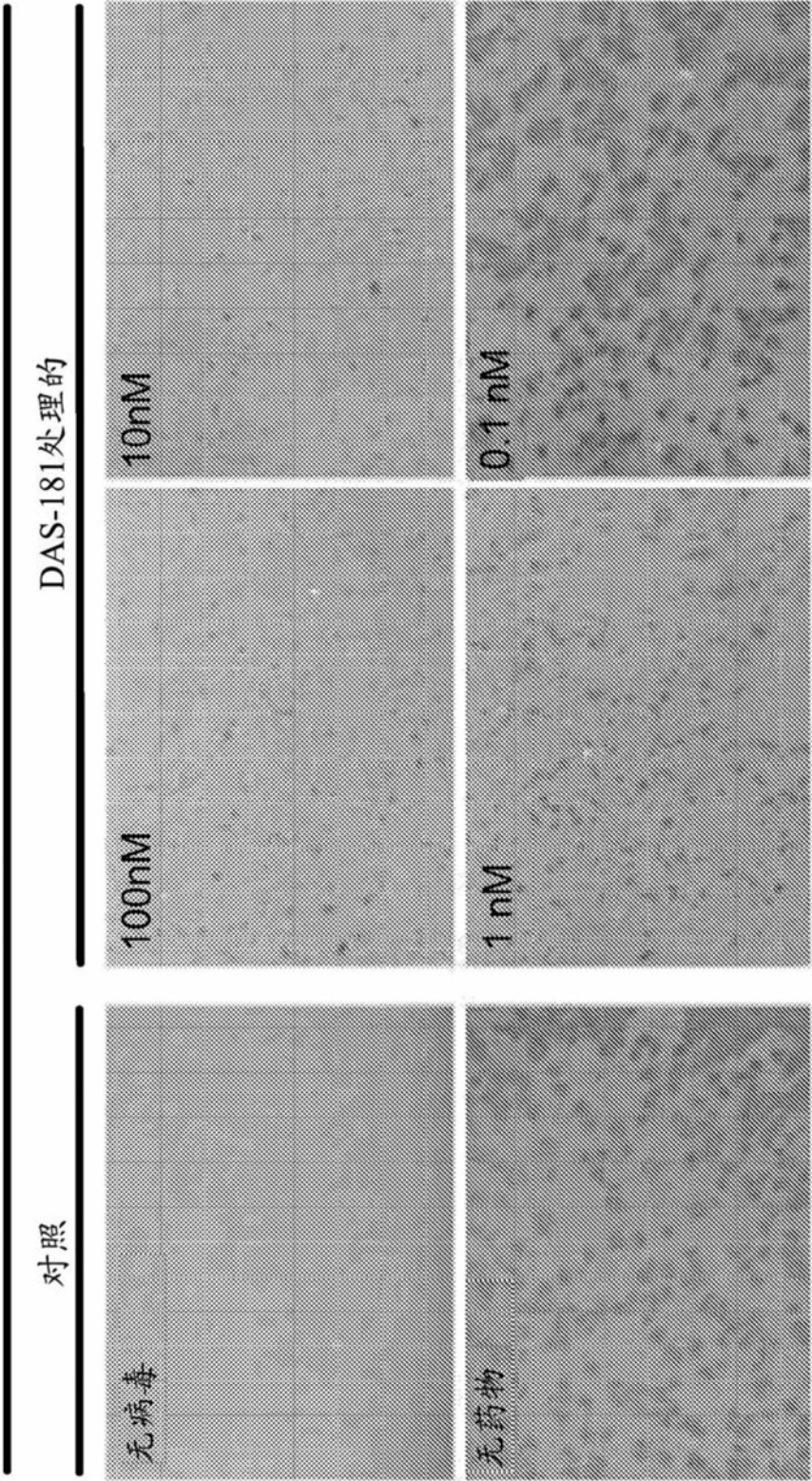


图8

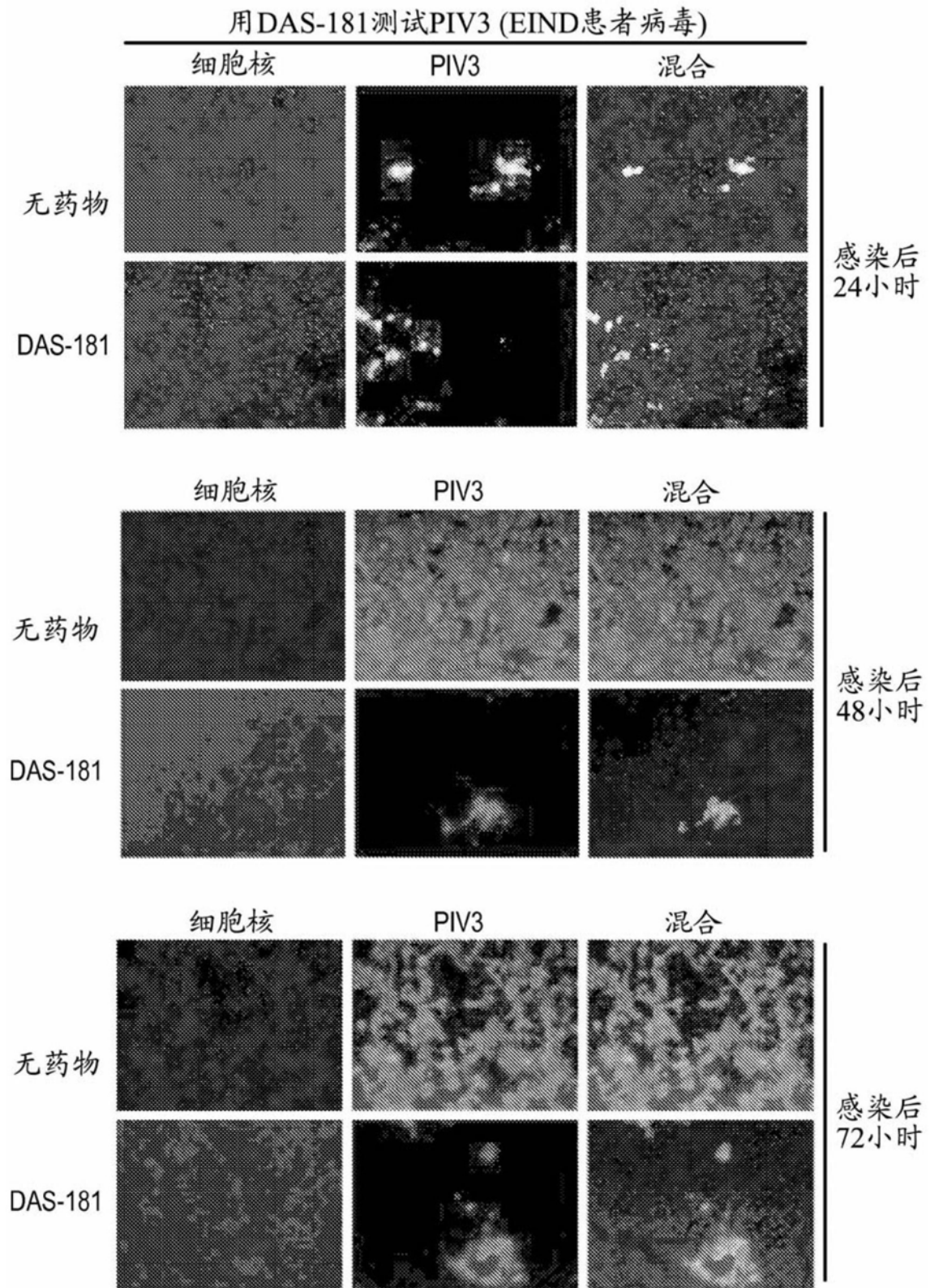


图9

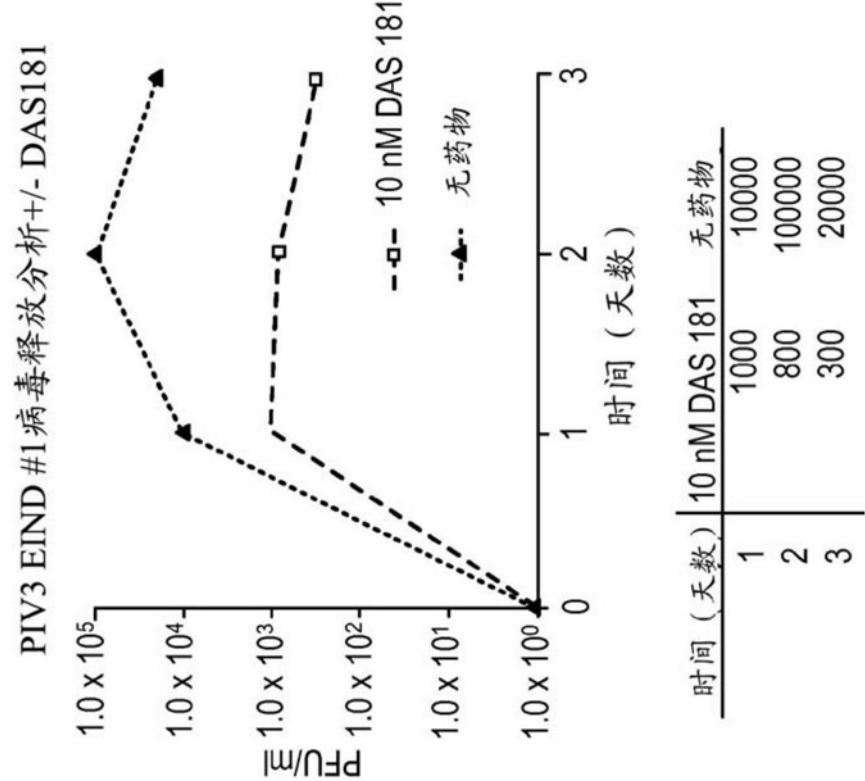


图10

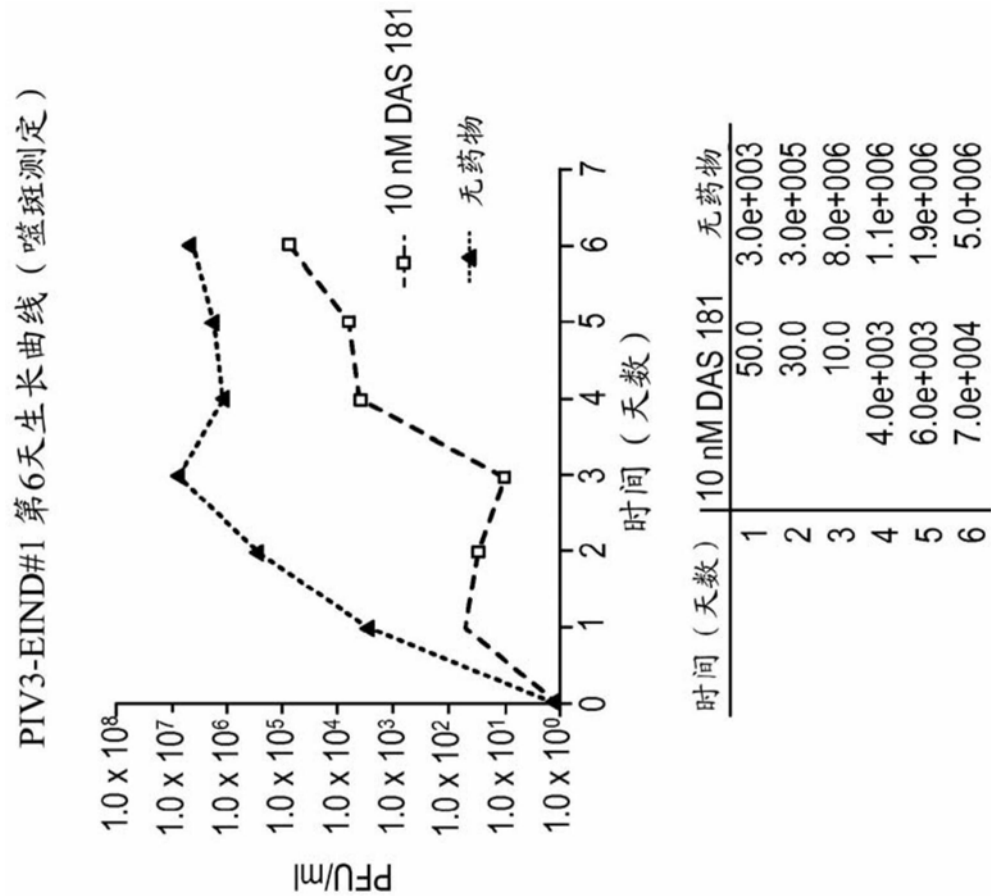
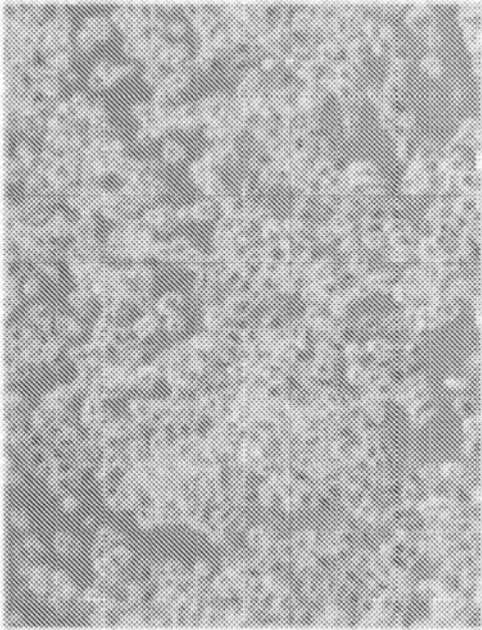


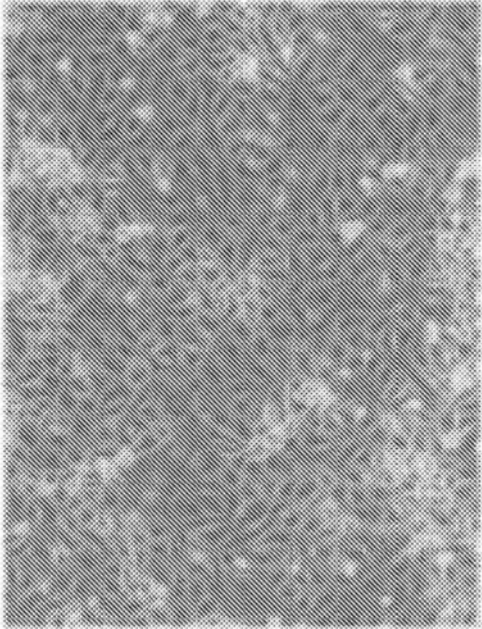
图11

将PIV3 EIND样品接种进LLCMK2细胞

接种的



无病毒对照



感染后5天

图12

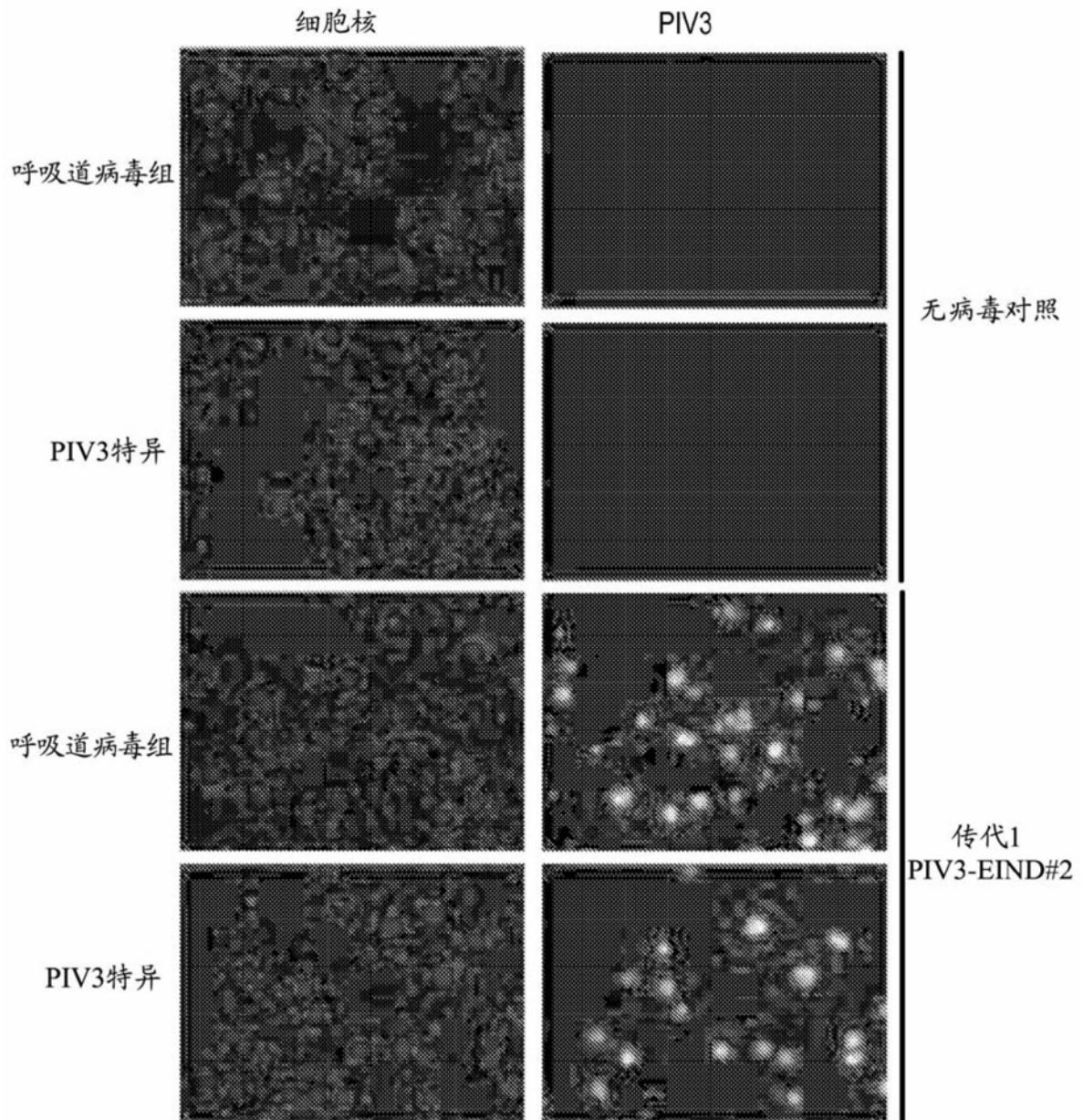
对传代1（PIV3-EIND#2的初始接种物）的DFN测试

图13

PIV3 EIND#2 48 hpi噬斑形成

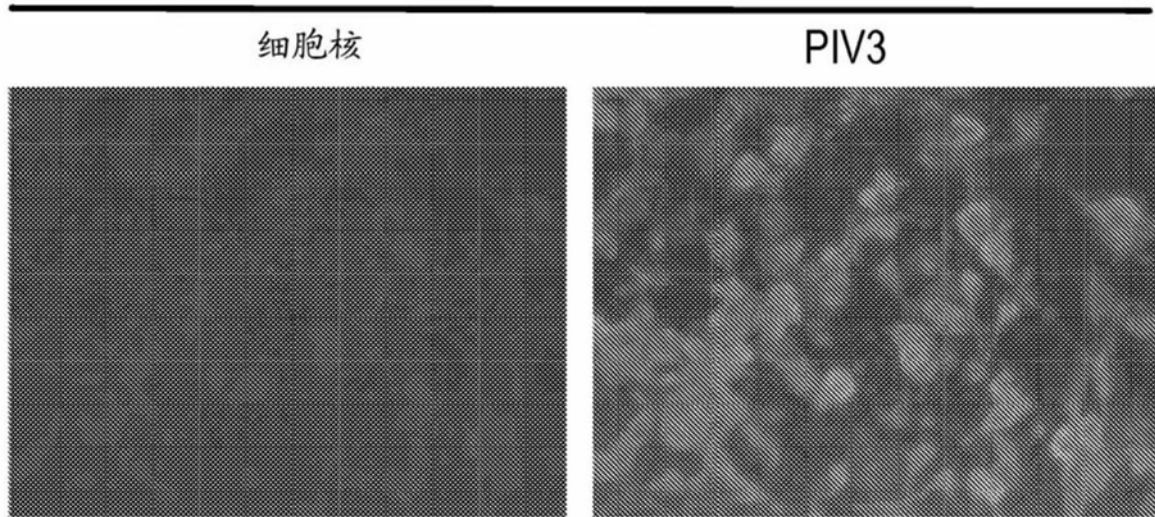
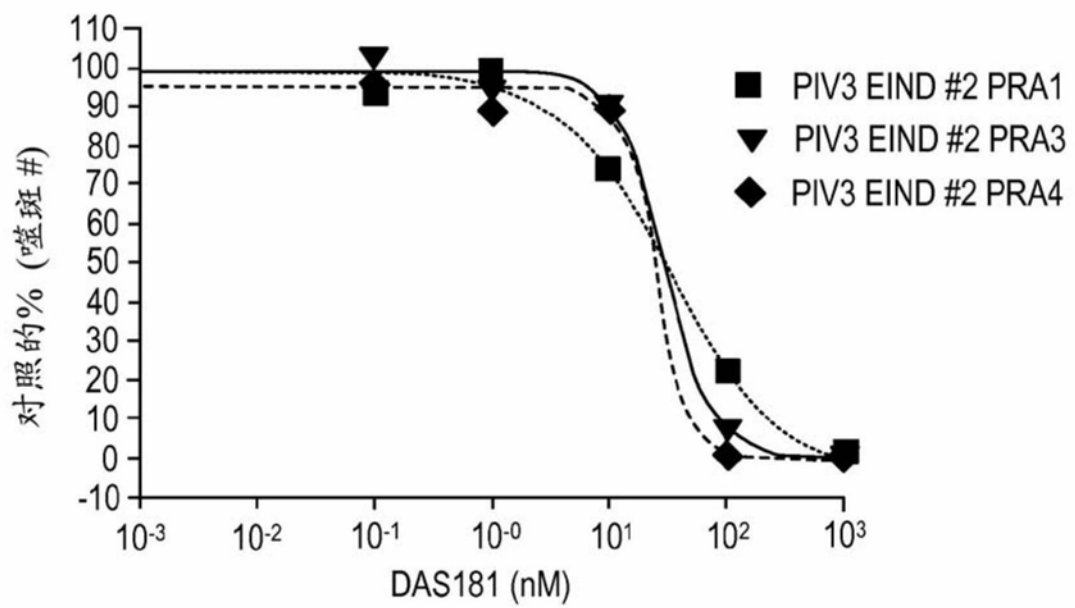


图14

PIV3临床EIND#2 PRA



	PIV3 EIND #2 PRA2	PIV3 EIND #2 PRA3	PIV3 EIND #2 PRA4
EC50	32.12	29.81	24.62

= -28 nM DAS181平均EC50

图15

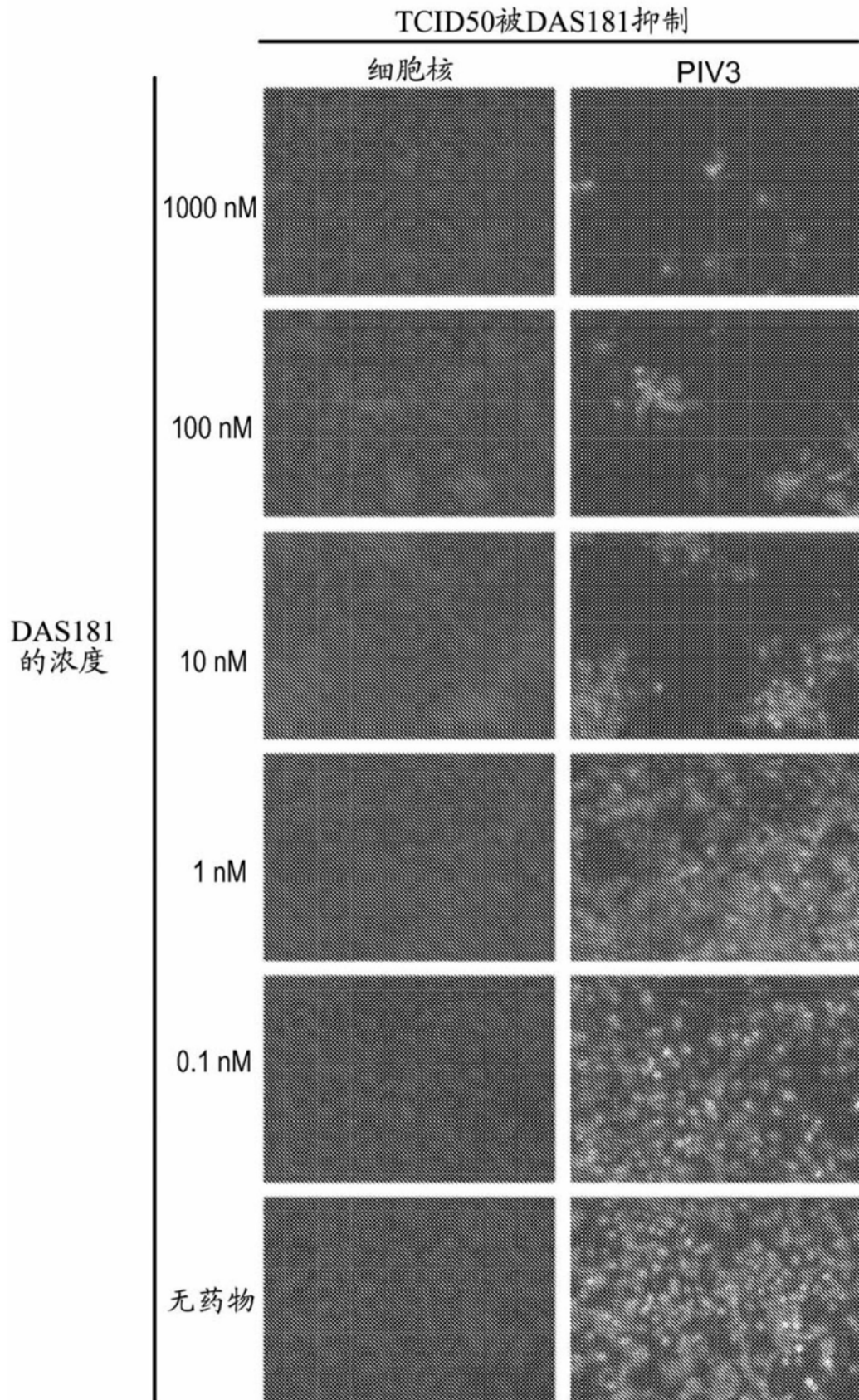


图16

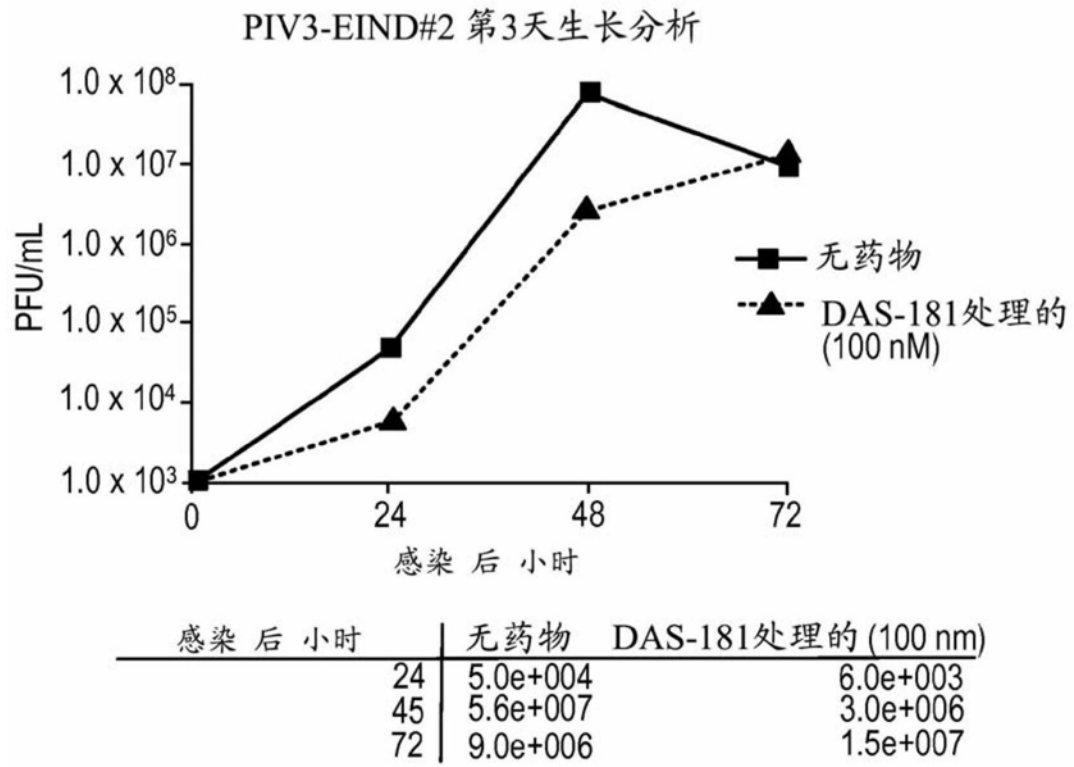


图17

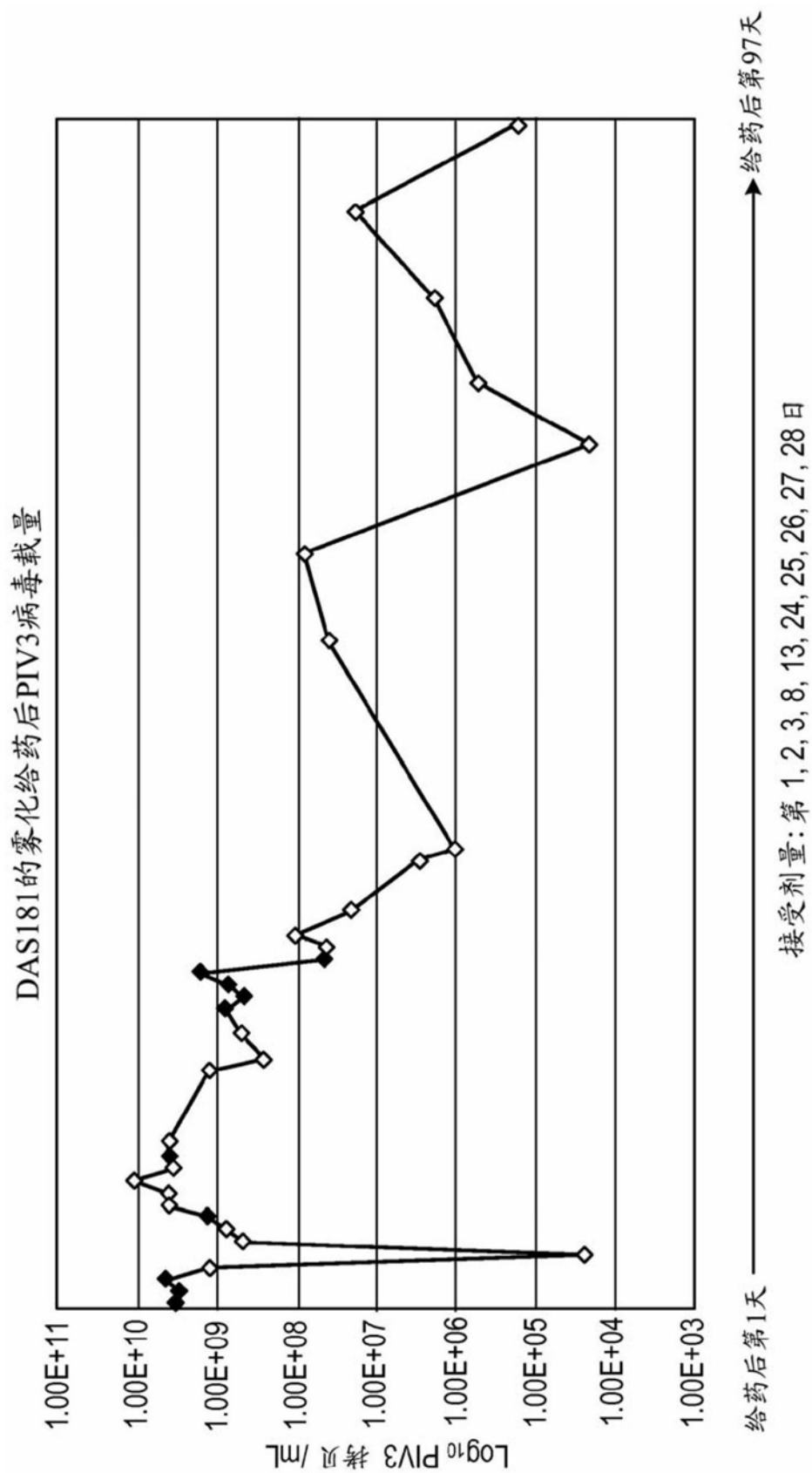


图18

雾化的DAS181给药后PIV3病毒载量

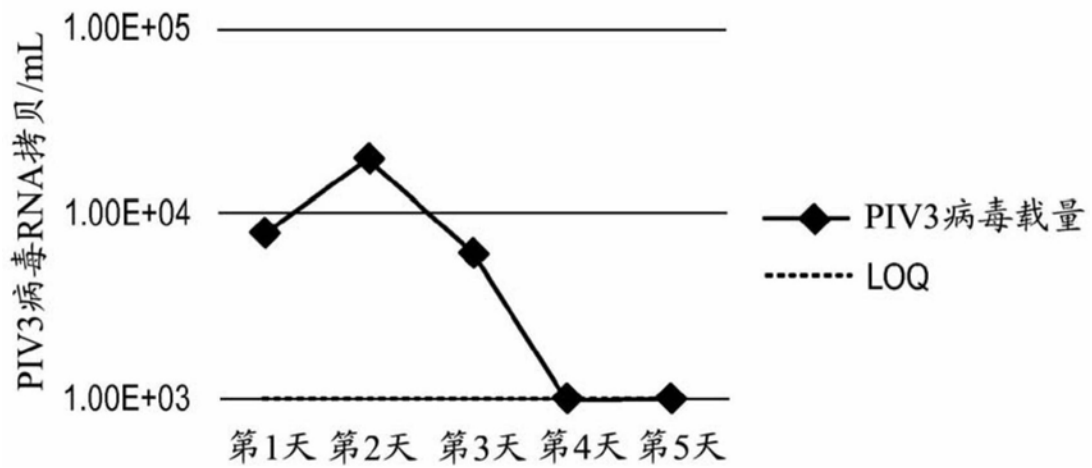


图19

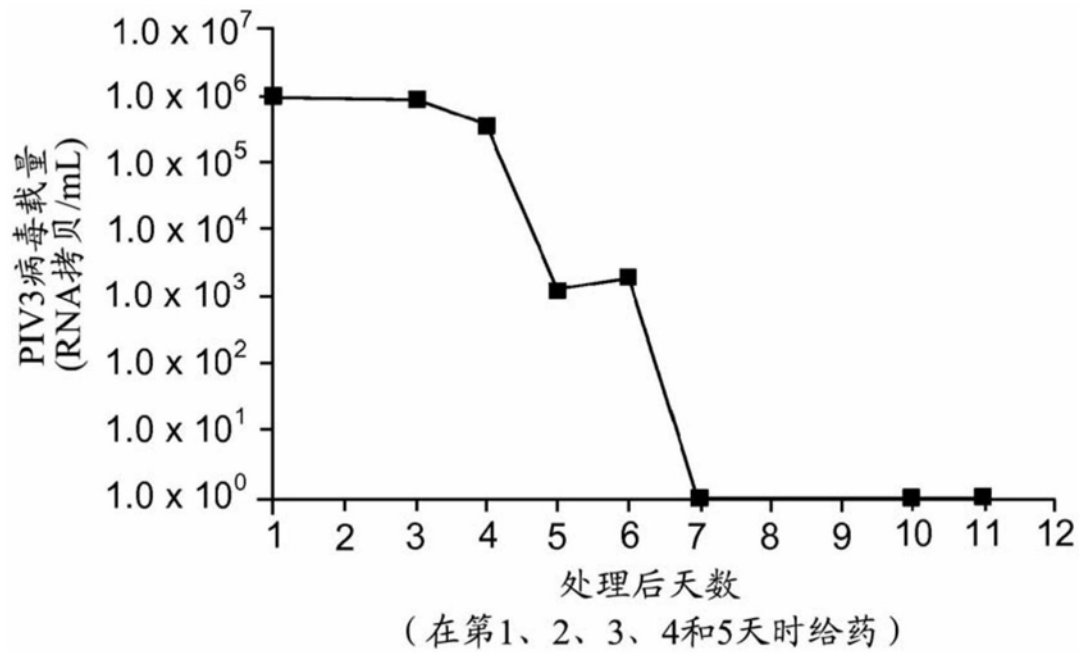


图20

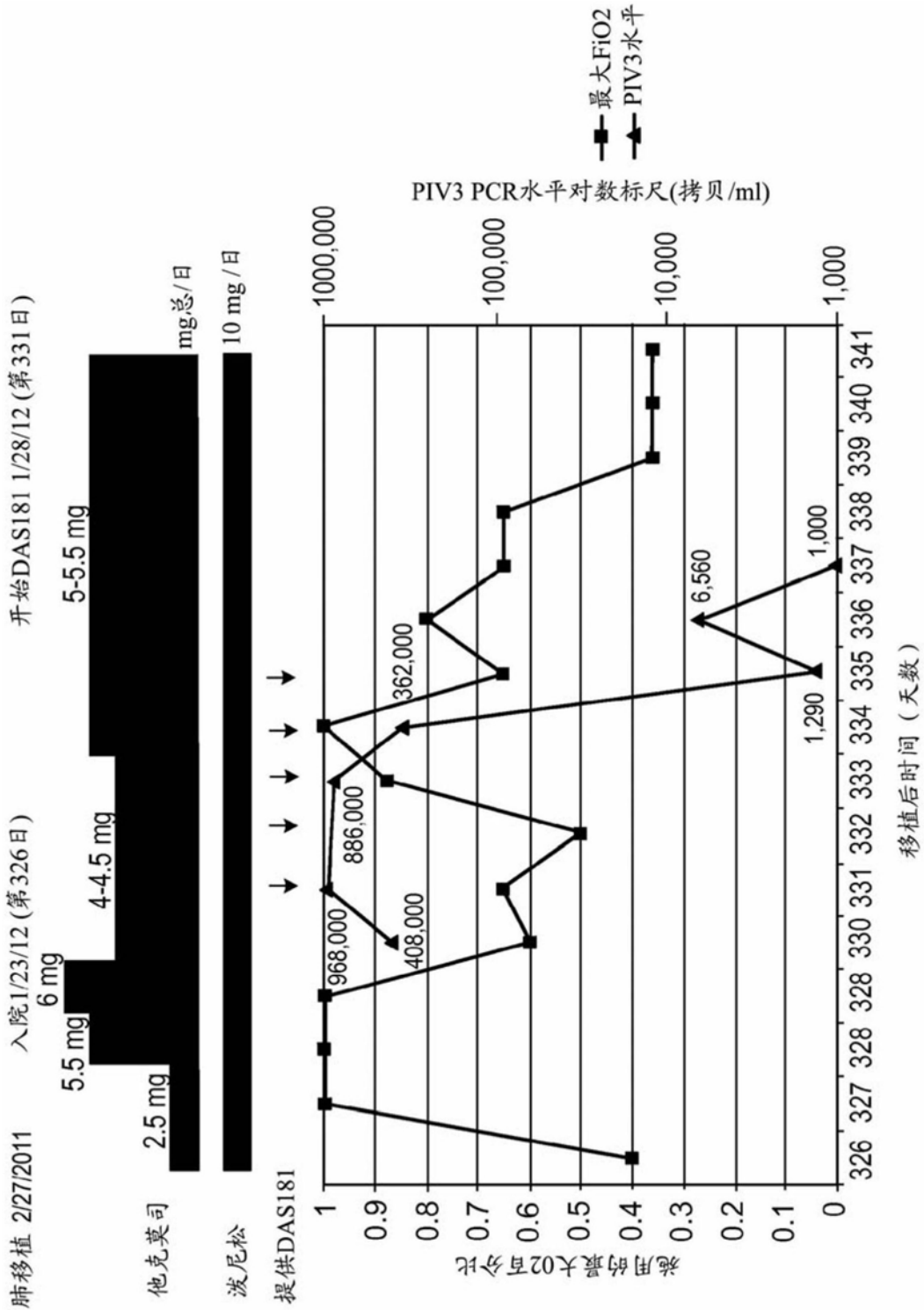


图21