



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102123706 B

(45) 授权公告日 2013.08.14

(21) 申请号 200880130787.6

(22) 申请日 2008.06.17

(85) PCT申请进入国家阶段日
2011.02.17

(86) PCT申请的申请数据
PCT/BR2008/000182 2008.06.17

(87) PCT申请的公布数据
W02009/152589 EN 2009.12.23

(73) 专利权人 米纳斯吉拉斯联合大学
地址 巴西米纳斯吉拉斯

(72) 发明人 M·M·特谢拉 D·D·G·德苏扎

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专
利商标事务所 11038

代理人 焦丽雅

(51) Int. Cl.

A61K 31/4196(2006.01)

A61K 31/4188(2006.01)

A61P 31/12(2006.01)

(56) 对比文件

WO 03072135 A2, 2003.04.09, 说明书全文.

WO 03082199 A2, 2003.10.09, 说明书全文.

JP 特开平 7-304689 A, 1995.11.21, 说明书
全文.

anthony j freeman et
al. Immunopathogenesis of hepatitis C
virus infection. 《Immunology and Cell
Biology》. 2001, 第 79 卷 (第 6 期), 515-536.

审查员 尹瑶菲

权利要求书1页 说明书6页 附图4页

(54) 发明名称

血小板活化因子受体在治疗黄病毒科病毒引
起的感染中的用途

(57) 摘要

本发明涉及 PAF 受体拮抗剂在治疗黄病毒科
病毒引起的感染, 主要是登革热和出血性登革热
以及休克中的用途。

1. 血小板活化因子受体拮抗剂在制备用于治疗黄病毒科病毒引起的感染性疾病的药物中的用途。

2. 根据权利要求 1 的用途,其中所述黄病毒科病毒引起的感染性疾病包括登革热。

3. 根据权利要求 1 的用途,其中所述黄病毒科病毒引起的感染性疾病包括登革热引起的登革出血热和登革休克综合症。

4. 根据权利要求 1 的用途,其中所述药物是向哺乳动物给药。

5. 根据权利要求 1 的用途,其特征是所述药物通过静脉内,肌肉注射,口服,皮下,经皮或腹膜内给药。

6. 根据权利要求 1 的用途,其特征是血小板活化因子受体拮抗剂可选自下列物质: UK-74505、SDZ 64-412、SDZ 64-688、SR27417A、Y-24180、WEB2086、WEB2170、BN50730、BN52501、SM-10661、PCA-4246、ABT-491、BB-882 即来昔帕泛和 TCV-309。

7. 根据权利要求 6 的用途,其特征是所述药物可以与治疗黄病毒科类病毒感染的其他药物一起给药。

血小板活化因子受体在治疗黄病毒科病毒引起的感染中的用途

发明领域

[0001] 本发明提出了一个在医疗救助中使用的已知产品的新药用于治疗由黄病毒科病毒引起疾病,主要用于治疗登革热和出血性登革热 (HDF)。

[0002] 发明背景

[0003] 登革热由包膜病毒中的黄病毒科的病毒引起。黄病毒属是重要的人类病原体,它在世界各地普遍存在。至少有 39 种黄病毒属病毒与人类疾病有关,包括登革热和黄热病。相关病理引起出血、休克、脑炎和发热性疾病。

[0004] 具体到登革热而言,其有四个血清型,且该基因组由约 11000 碱基的单链 RNA 构成。翻译的基因组产生一个大的多蛋白,它由病毒酶和宿主进行共同翻译加工生成三个结构蛋白 (C, M 和 E 蛋白) 和七个非结构蛋白 (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b 和 NS5) 参与病毒复制 (Chambers TJ, Hahn CS, Galler, R, Rice, CM. (1990). 黄病毒基因组结构、表达和复制 (Flavivirus genome organization, expression and replication). *Annu. Rev. Microbiol.*, 44 :649-688)。人类是登革热病毒的主要宿主,其主要通过有传染性的伊蚊属埃及伊蚊的雌性蚊子叮咬传播 (Mukhopadhyay S, Kuhn RJ, Rossmann MG. (2005). 黄病毒属生命周期的结构透视 (A structural perspective of the flavivirus life cycle). *Nat Rev Microbiol.* 3, 13-22)。

[0005] 登革热的临床表现有两个最相关的形式,典型形式和出血形式。恢复可持续几个星期,在此期间,患者表现出乏力的现象。典型登革热可能无症状,或者患者可能存在包括发高烧、头痛、后眼窝痛、肌肉痛、关节痛、恶心和呕吐、腹泻、体位性低血压、腹痛、腰痛和下肢疼痛症状。典型登革热普遍被称为“破骨热”。此外,可能会发生皮肤和粘膜的改变,如瘀斑。即使是在典型形式病例中,也可出现出血,例如鼻出血、牙龈出血和消化道出血。典型形式通常持续 6 至 8 天 (从米纳斯吉拉斯州国家健康秘书处获得的数据)。

[0006] 登革出血热和登革休克综合征是最严重的登革热感染表现,且起初表现出与典型形式相同的症状。出血现象发生在疾病第二或第三天,并主要表现为皮肤和消化道出血;子宫出血、鼻出血、牙龈出血且也可能发生其他部位的出血。内皮细胞损伤和感染继发的白细胞及血小板活化形成了出血性登革热的病理生理基础。白细胞、血小板和内皮细胞的活化导致血小板减少和血管通透性增加。后者导致血细胞比容增加和血压下降和低血容量性休克。因此,与重症登革热相关的主要问题——休克和失血性表现——是感染过程中先天免疫系统的过度激活 (Halstead, SB. (2003). 抗体、巨噬细胞、登革病毒感染、休克和出血:致病串联 (Antibody, macrophages, dengue virus infection, shock and hemorrhage :a pathogenic cascade). *Rev. Infect. Dis.* 11 :S830-S839) (Rothman A. L. (2003). 登革热疾病的免疫学和免疫发病机理 (Immunology and immunopathogenesis of dengue disease). *Adv. Virus Res.* 60 :397-419)。

[0007] 登革热病是目前影响人类的最重要的虫媒病毒病,代表了世界上严重的公共卫生问题。据来自世界卫生组织 (WHO) 的估计,除了欧洲,每年在各个大洲的 100 多个国家有

5000 万至 1 亿人受到感染。约 55 万名病人需要住院,且 20000 人死于登革热。

[0008] 在巴西对于埃及伊蚊扩张的有利的社会环境条件使传染媒介的传播以及疾病的发展成为可能,自从它于 1976 年被重新传入该国。在该国和该大洲采用传统的针对媒介传染病的化学防治方法未能对其重新传入进行充分的控制。其后在 1996 年,巴西卫生部回顾了其政策战略,并提出了一个叫做 Programa de **Erradicação** do Aedes Aegypti-PEAa 的根除计划(埃及伊蚊的根除方案)。在实施计划时,短期和中期根除蚊子在技术上被证明不可行,因为 PEAa 对疾病的流行病学复杂性完全无法反应。

[0009] 在巴西和其他国家获得的结果——没有证据显示在短期内根除传染媒介——这已引起巴西卫生部着手进行对这种政策的进展和障碍的新的评估,以建立一个新的包括其他元素例如社会动员和社区承担的计划,对充分防治一种高度地以家庭为基地的传染媒介来说,这被认为是必不可少的。

[0010] 在上世纪 90 年代,血清型 3 型传入了巴西,在仅仅三个月期间迅速传播到巴西八个州。高流行性风险,伴随出血性登革热(HDF)的发病率升高,显示了新的血清型和病毒品种如何轻易地随着日常移动人口循环的。

[0011] 本领域技术状况是能够提供对传染媒介的控制技术——该传染媒介也传播黄热病——以及与登革热相关症状的治疗方法。

[0012] 巴西专利 PI023907-9 提出了蚊子传播登革热的监测系统,采用陷阱、软件和掌上电脑用于捕获和分析风险地区的昆虫。在陷阱里——叫做蚊子陷阱(mosquitrap)——一种人工合成的气味释放物质 atraedes 放置在装有水的黑色瓶子的底部,用以模仿蚊子的温床,以吸引雌蚊产卵。当被 Atrades 吸引,昆虫进入陷阱,并被瓶壁的黏虫卡捕获。一个星期后,受过训练能够鉴定埃及伊蚊成体的卫生人员计算捕获蚊子的数量。不需要昆虫的实验室鉴定。

[0013] 专利 W02004037272 描述了旨在作为登革热感染抑制剂的药物,其特征是作为活性成分的碳水化合物分子的基本组分是寡糖链。

[0014] 申请号 W02005/069717 的专利提出了一种登革出血热的治疗技术,能立即导致血小板的增加。美国专利 6,696,281 描述了一种针对黄病毒属的含有减毒病毒的疫苗。

[0015] 在 W0 2003/049672 描述了用于治疗黄病毒属介导疾病的方法和化合物。W0 2004/084796 提供了用于黄病毒科感染治疗的组分及其治疗方法。US 6,172053 专利报告了用于治疗病毒性疾病的治疗化合物及其配方。

[0016] 美国专利号 7,148,248 介绍了治疗或抑制炎症或败血症发展的方法。该技术旨在用作白三烯 C4 和 D4 拮抗剂,通过增加毛细血管通透性和血液中白细胞外溢来治疗或抑制炎症或败血症。

[0017] 专利 US 7,151,082 提出用于治疗炎症状况的一种 HMG1 拮抗剂。这项技术包括药物化合物和败血症治疗方法,包括感染性休克和急性呼吸窘迫综合征,以及监测或诊断败血症的严重程度或潜在致死率的方法。

[0018] 对登革热病例的临床操作可归纳为如下顺序:i) 呈现毛细血管脆性试验阳性和/或其他轻度出血表现的病人在实验室有人协助,并进行血小板计数,ii) 检测到血细胞比容增加和/或血小板计数减少(<或等于 $100.000/\text{mm}^3$);治疗包括胃肠外补水联合 dipirone(仅在巴西使用)和对乙酰氨基酚给药;持续评估任何恶化迹象,如果有必要临床

评价至少每小时 6 次和实验室检验 (HT, 血小板计数, 胸部 X 光透视);c) 患者呈现低血压、意识丧失或休克迹象给予胃肠外再补水的流动救助和具体的血清学分析。

[0019] 由于没有登革热的特异疗法,对医疗救助的方案仅限于检查疼痛和发烧,补水的流动救助和镇痛,同时通知 **Vigilância Epidemiológica Distrital** (地区流行病学警戒机构)。

[0020] 对这种疾病发病机制的知识缺乏阻碍了登革热的特异疗法的发展。事实上,通过这样的病毒感染导致该疾病的出血型的主要机制是有争议的。对比假说将病情的严重程度既归因于病毒因素,也归因于宿主因素 (Rosen, L. (1997). 皇帝的新装重访,或登革出血热发病机制的回声 (The Emperor's New Clothes revisited, or the reflections on the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 26 :337-343. Halstead, S. B. (1979). 恒河猴体内被动转移抗体增强的登革病毒感染 (In vivo enhancement of dengue virus infection in rhesus monkeys by passively transferred antibody). *J. Infect. Dis.* 140 :527-533 ;Rothman A. L (2003). 登革热病的免疫学和免疫发病机理 (Immunology and immunopathogenesis of dengue disease). *Adv. Virus Res.* 60 :397-419)。

[0021] 秘鲁和斯里兰卡最近的研究表明了出血型与病毒基因型之间的关联。一些特定的解释这种关联的遗传标记被绘制 (Watts DM, Porter KR, Putvatana P, Vasquez B, Calampa C, Hayes CG, Halstead SB. (1999). 美洲登革热基因型 2 继发感染的失败引起登革出血热 (Failure of secondary infection with American genotype dengue 2 to cause dengue hemorrhagic fever). *Lancet* 354 :1431-1434 ;Messer, WB, Gubler, DJ. Harris, E., Sivananthan, K., da Silva, A. M. (2003). 登革热血清型 3 型,子集病毒 III 的出现和全球蔓延 (Emergence and global spread of dengue serotype 3, subset III virus). *Emerg. Infect. Dis.* 9 :800-809 ;Messer WB, Vitarana UT, Sivananthan K, Elvtigala J, Preethimala LD, Ramesh R, Withana N, Gubler DJ, De Silva AM. (2002). 在斯里兰卡出现登革出血热的疫情前后的登革热流行病学 (Epidemiology of dengue in Sri Lanka before and after the emergence of epidemic dengue hemorrhagic fever). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 66 :765-773)。

[0022] 然而,要考证登革热毒力真正取决于这种遗传因素或其他机制证明是困难的。流行病学研究发现,登革出血热临床毒现风险增加和另一种登革病毒株继发感染之间存在关联 (Halstead 等,1979 ;Guzman 等,1990, Rothman A. L. (2003)。

[0023] 这一流行病学发现表明,宿主免疫应答在决定疾病严重形式的发展中起着重要的病理生理学作用。已经提出的由不同血清型首次感染后促进病重的几种机制包括免疫复合物沉积、抗体与血管内皮交叉的反应、抗体介导的感染的加强、补体系统及其产物的激活,可溶性介质的加剧释放,如细胞因子 (Chatuverdi 等,2000 ;Lin 等,2005 ;Halstead,1979 ;Halstead,1989 ;Morens,1994 ;Theofipoulos 等,1976 ;Bokisch 等,1973 ;Malasit,1987 ;Chungue 等,1994, Falconar,1997 ;Markoff 等,1991 ;Libraty, 等,2002 ;Kurane 等,1994 ;Mangada 等,2004)。

[0024] 其他研究研究了与疾病严重程度相关的因素,包括年龄、遗传和宿主的营养状况 ;虽然解释病重的机制尚未研究 (Rothman,2003)。因此,对登革热感染和疾病的发病机制的

更好了解在探索其特异并有效的治疗方法中是不可缺少的。

[0025] 研究采用登革热的实验模型——该实验模型模拟了严重型的几个方面,包括致死、组织出血、血小板减少和血液浓缩——用于发现本发明所述 PAF 受体拮抗剂的新用途。

[0026] 本分析旨在有助于表明,登革热出血热的病理生理学表现(异常免疫应答伴随血管通透性增加、血细胞比容增加、血压降低、低血容量性休克和血小板减少)与感染性休克中所观察到的表现非常相似(Halstead,2003 ;Rothman,2003 ;Sommers, M. S. (2003). 感染性休克的细胞基础(The cellular basis of septic shock)Crit.Care Nurs Clin.North. Am. 15(1) :13-25)。因此,研究在登革热感染的发病机制中出现的全身炎症应答综合征的有关介质的作用是恰当的。

[0027] 在这些介质中,应加以强调血小板活化因子(PAF)。通过使用对血小板活化因子受体(PAFR)具有拮抗作用的化合物可以阻断PAF的功能。除了这些PAFR拮抗剂,PAF的功能可以通过给予一种叫做PAF乙酰水解的重组酶来阻止。这种酶代谢PAF,从而防止代谢掉的PAF与其PAFR结合。

[0028] 全身给予血小板活化因子的主要效应是血管舒张和增加血管通透性,这会导致低血压和血小板减少。这些发现与登革出血热中的发现类似。此外,先前的研究表明,在登革热感染人巨噬细胞时PAF被释放,因此提出了介质在人类疾病中的假定作用(Yang KD, Lee CS, Shiao MF. 体外异源继发登革2型病毒感染时血小板活化因子更高的产生量(A higher production of platelet activating factor in ex vivo heterologously secondary dengue-2 virus infections).Acta Microbiol Immunol Hung. 1995 ;42(4) :403-7)。

[0029] 血小板减少普遍发现存在于登革病毒感染患者中。事实上,一些研究表明,在所有受感染病人中有70%患者在疾病过程中呈现血小板减少。血小板计数最低的病人似乎存在发展为该疾病更严重型的更高的风险。受体拮抗剂治疗显著地抑制了血小板减少和血液浓缩在受感染动物中的发展。PAF受体拮抗剂治疗也有效阻断了登革病毒引起的实验性感染的致死可能性。这些数据表明,由于观察到其防止登革热感染更严重的形式,PAF受体拮抗剂治疗对于所有这些感染者的治疗可能是有益的。

[0030] 最后,数据表明,PAF受体拮抗剂治疗——即使在感染数天后——能够防止动物死亡并阻碍频繁的临床改变,如血小板减少和血液浓缩。

[0031] 这样的结果支持了PAF受体在登革热感染发病机制中的参与,也支持了炎症介质在该病中的参与。在其各种生物效应中,已知PAF诱导血小板聚集以及白细胞和内皮细胞的活化。这些参数是宿主对登革病毒感染反应的重要特征(Halstead,2003 ;Rothman, 2003)。

[0032] 因此,对于本发明,通过实验以证实PAFR拮抗剂用于登革热感染的治疗的新用途。动物分别用载体或血小板活化因子受体拮抗剂治疗,并评估感染和炎症参数,如以下的实施例所示。

[0033] 实施例 1

[0034] 实验室研究表明,感染登革病毒的小鼠(登革热血清型-2, GeneBank 登录号AY927231)显示的临床表现和实验室变化与严重型登革热病人中的发现类似,包括登革热引起的出血热和休克综合征。可以看出,小鼠在受到更多的病毒接种时,死亡与病毒接种量呈现依赖性(图1所示为CFU-菌落形成单位)。

[0035] 实施例 2

[0036] 登革病毒感染引起的血小板减少和血液浓缩（图 2），这在登革热患者中，主要是发展为更严重疾病形式的患者中经常发现。

[0037] 实施例 3

[0038] 除了上述表现，登革热感染的小鼠表现出了与人类感染相一致的其他改变，包括循环细胞因子，特别是名为肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 和干扰素- γ (IFN- γ) 的细胞因子水平的提高（图 3）。

[0039] 实施例 4

[0040] 登革病毒感染的动物的组织也有明显改变，包括受感染动物的肝脏。图 4 中，受感染的动物的肝实质观察到大量的血细胞（用箭头表示），这与人类出血性登革热观察到的出血是一致的。

[0041] 实施例 5

[0042] 感染后第 7 天或 8 天时出现死亡，此时是机体免疫反应的顶峰。另一方面，感染病毒后第三天动物显示了可察觉的疾病症状形式。图 5 显示，动物对疼痛刺激的敏感度明显提高，这与报道的人类登革热的疼痛是密切相关的。登革热公知为“破骨热”。同样，用 PAF 受体拮抗剂治疗部分预防了受登革病毒感染的动物死亡。

[0043] 实施例 6

[0044] 使用动物模型以验证通过特异性的 PAF 受体拮抗剂进行阻断将能够改善登革热病毒实验性感染的假说。初步研究表明，每日用血小板活化因子受体拮抗剂 (aPAFR) 治疗能够防止该病毒引起的死亡。这明显表明，感染开始后 3 天 (3-10) 或者 5 天 (5-10) 内每日用血小板活化因子受体拮抗剂治疗与感染前 (0-1) 开始治疗同样能够有效地防止动物死亡。感染后 7 天 (7-10) 开始治疗时，这时已观察到一些致死，能够部分有效地防止动物死亡。总之，该数据表明 PAF 受体拮抗剂治疗能够防止受感染动物的死亡，不仅是在预防给药方式中给予，还是在治疗时给予，即在症状出现后给药（图 6）。正如图 5 所示，从感染开始的第三天动物的症状就显著了。

[0045] 尽管 PAF 受体拮抗剂治疗防止死亡以及更相关的临床和病理改变，但是在载体——和 PAFR 拮抗剂——治疗动物中的病毒血症并没有改变。事实上，数据表明，血小板活化因子受体拮抗剂治疗的动物的病毒血症较轻，这可能是继发于与动物较好的综合临床状态相关的更好的免疫应答。

[0046] 实施例 7

[0047] 受登革病毒血清型 2 型感染的动物用血小板活化因子受体拮抗剂治疗后，与进行了相同的接种感染的动物并用载体治疗的动物相比，显示了较轻的临床症状。图 7 的图表显示，受感染动物中血小板减少的数量和接受 PAF 受体拮抗剂的受感染动物中血小板减少的预防。该图还显示由于血管通透性增加而引起的受感染动物血细胞比容增加，这是血液浓缩的标志。PAFR 拮抗剂治疗还防止了在血液浓缩上的变化。

[0048] 附图简述

[0049] 图 1：登革病毒感染诱导的小鼠接种依赖性死亡。死亡通常在感染后第 7 天观察到。该图显示了在感染后给定天数存活的动物数量。

[0050] 图 2：登革病毒感染诱导的细胞因子 TNF- α 和 IFN- γ 血清中水平的提高。细胞因

子在血浆中首次检测到是感染后第 5 天,而在第 7 天,即首次观察到死亡的时间达到峰值。

[0051] 图 3:登革病毒感染诱导的血液中血小板减少(血小板数量下降),以及血细胞比容增加(血液浓缩的一种标记)。在感染后第 3 天首次观察到血小板数量的下降,而在第 5 天首次检测到血液浓缩。

[0052] 图 4:苏木精和曙红染色的来自于未感染小鼠(左)和感染登革病毒的小鼠感染后第 7 天的肝脏切片。注意到组织中明显存在的红血细胞(箭头),这是出血的表现。还注意到肝变性区(依稀染色)。

[0053] 图 5:登革病毒感染诱导了高伤害性感受(hypernociception)增加,这是疼痛的实验性标记,在感染后第 3 天首次观察到。因此,感染导致的首个症状是在第 3 天首次发现的。

[0054] 图 6:用 PAFR 拮抗剂的治疗预防了与登革病毒感染相关的死亡。该图显示了在感染后给定天数存活的动物数量。

[0055] 图 7:用 PAFR 拮抗剂的治疗预防了登革热感染的动物在第 7 天观察到的血小板减少(血小板数量下降)和血液浓缩(血细胞比容增加)。

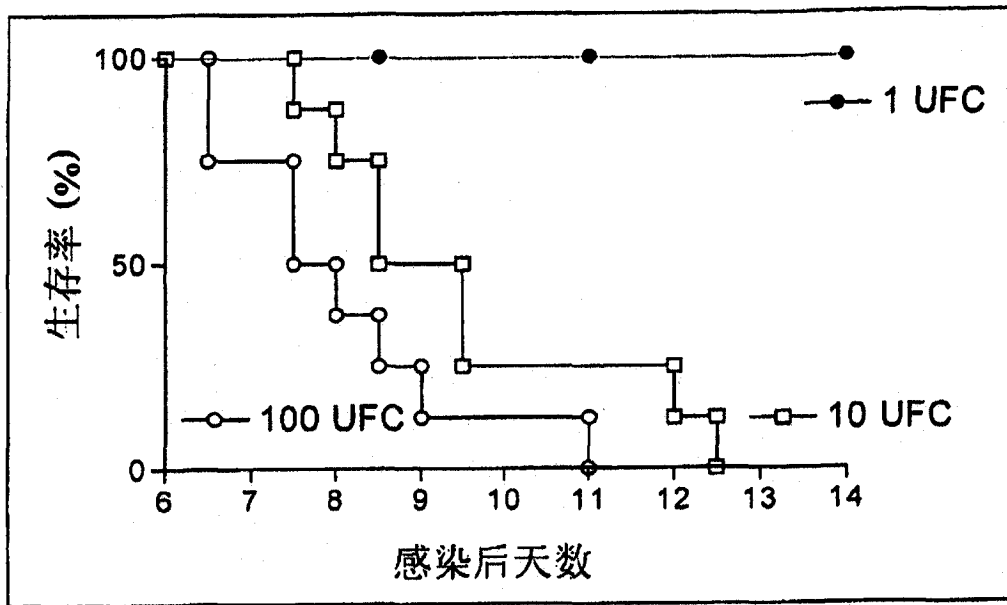


图 1

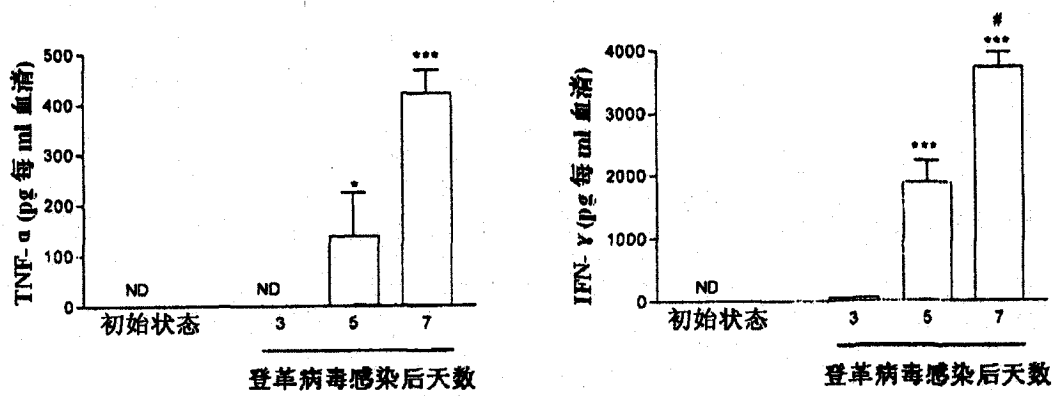


图 2

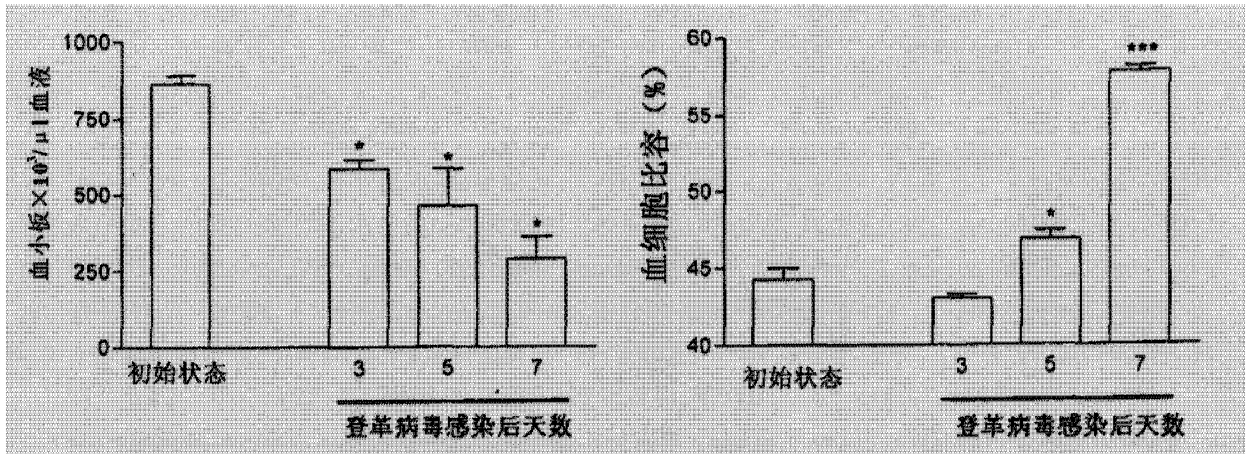


图 3

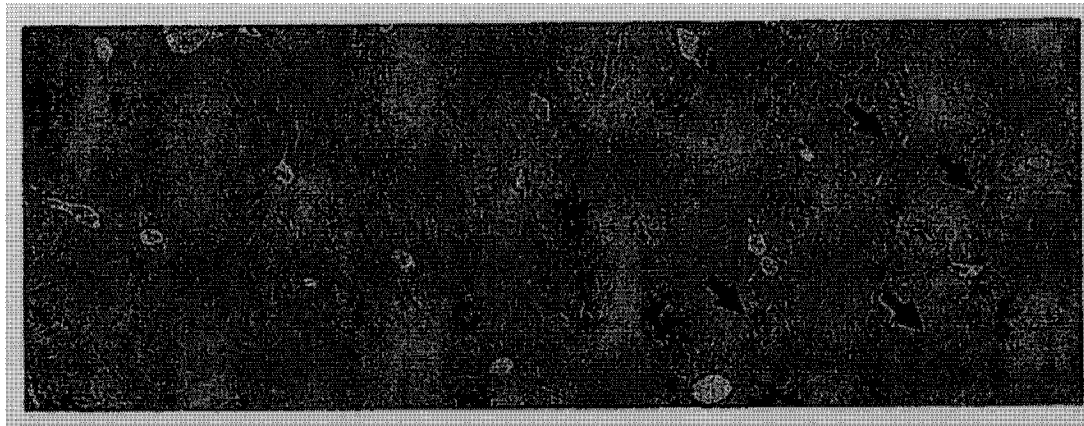


图 4

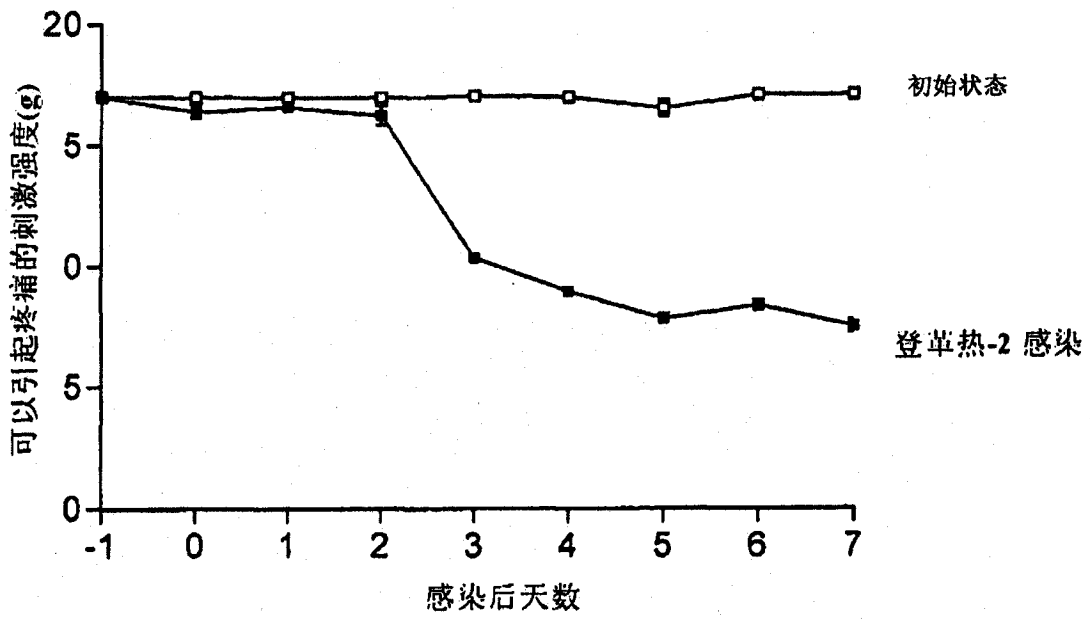


图 5

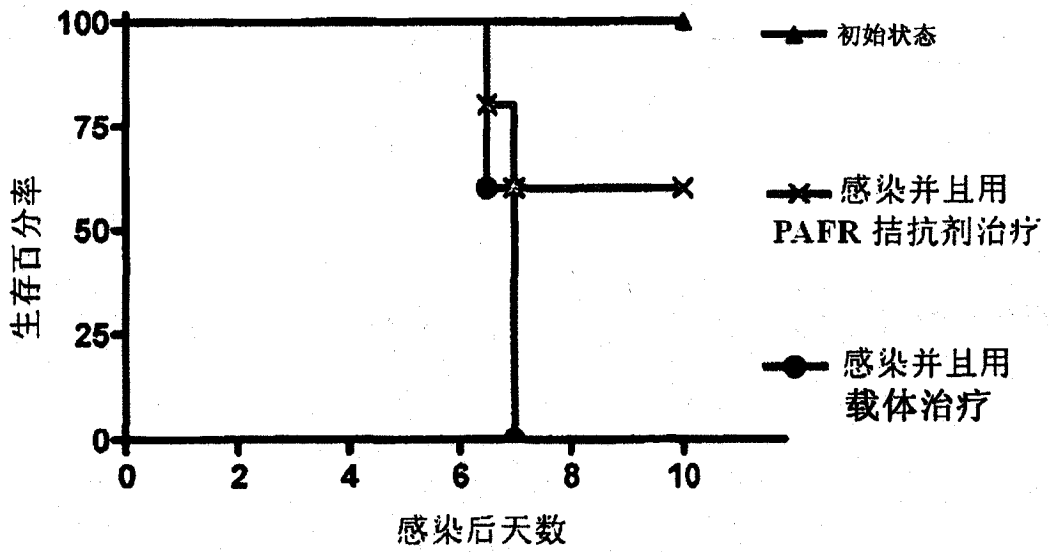


图 6

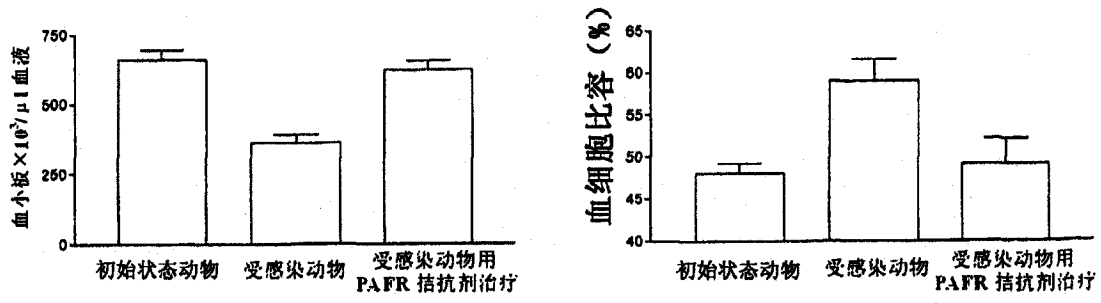


图 7