

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

A61K 31/726 (2006.01)

A61P 31/12 (2006.01)



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 00816173.9

[45] 授权公告日 2009 年 12 月 9 日

[11] 授权公告号 CN 100566722C

[22] 申请日 2000.11.23 [21] 申请号 00816173.9

[30] 优先权

[32] 1999.11.26 [33] SE [31] 9904289-7

[86] 国际申请 PCT/SE2000/002313 2000.11.23

[87] 国际公布 WO2001/037846 英 2001.5.31

[85] 进入国家阶段日期 2002.5.24

[73] 专利权人 阿登诺维尔制药公司

地址 瑞典赫尔辛堡

[72] 发明人 戈兰·韦德尔 尼克拉斯·阿恩贝格

[56] 参考文献

CN1227493A 1999.9.1

DE19547972A 1997.7.10

CN1150020A 1997.5.21

CN1172807A 1998.2.11

EP502550A 1992.9.9

CN1125441A 1996.6.26

审查员 陈少芳

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 张广育 刘 玥

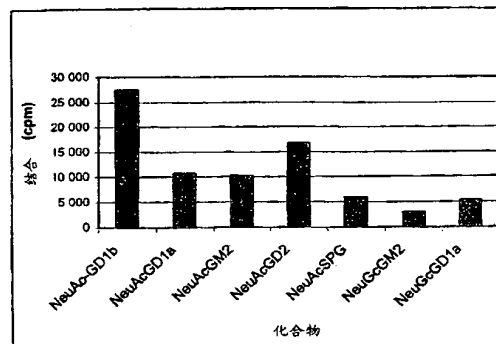
权利要求书 1 页 说明书 8 页 附图 3 页

[54] 发明名称

治疗腺病毒眼感染的方法和组合物

[57] 摘要

可以通过给予有效治疗量的干扰病毒和唾液酸受体间相互作用的物质而治疗或缓解腺病毒感染，特别是眼腺病毒感染，如角结膜炎。



1. 一种干扰病毒和唾液酸受体间相互作用的物质在生产治疗腺病毒感染药物组合物中的用途, 所述腺病毒感染是由 Ad8、Ad19 和 Ad37 腺病毒引起的流行性角结膜炎, 所述物质选自唾液酸、硫酸葡聚糖、肝素、硫酸乙酰肝素、N-羟乙酰神经氨酸、N-乙酰神经氨酸、多聚乙酰神经氨酸、3'-N-乙酰神经氨酰 N-乙酰乳糖胺、6'-N-乙酰神经氨酰 N-乙酰乳糖胺、N-乙酰神经氨酰-3-岩藻糖基乳糖、N-乙酰神经氨酰乳糖、粘蛋白、血清类粘蛋白或其混合物。

2. 根据权利要求 1 的用途, 其中所述用途是肝素在生产治疗由 Ad8、Ad19 和 Ad37 腺病毒引起的流行性角结膜炎的药物组合物中的用途。

3. 根据权利要求 1 的用途, 其中所述用途是 N-乙酰-神经氨酰乳糖在生产治疗由 Ad8、Ad19 和 Ad37 腺病毒引起的流行性角结膜炎的药物组合物中的用途。

4. 根据权利要求 1 的用途, 其中所述用途是粘蛋白在生产治疗由 Ad8、Ad19 和 Ad37 腺病毒引起的流行性角结膜炎的药物组合物中的用途。

治疗腺病毒眼感染的方法和组合物

本发明涉及腺病毒眼感染和生殖器感染领域，特别涉及用于它们的治疗和预防的组合物，以及化合物在生产该组合物中的用途。

发明背景

腺病毒属于多面体 DNA 病毒类，其特征是具有二十个相同面的二十面体衣壳及总体的六边形形状。在腺病毒中，衣壳是裸露的，表示它没有许多其它病毒中常见的脂质被膜。这一事实可以解释它对大多数消毒剂的抵抗力以及抗脱水的能力。

侵害人类的腺病毒表现出 51 种不同的血清型，可以取决于不同的症状而分为六组。六个亚属 A 到 F 的趋向是由腺病毒纤维的结构差异而确定的。腺病毒纤维对细胞的科萨奇腺病毒受体 (CAR) 具有特异性，此受体也称作第一步受体。因此当证明 A, C, D, E 和 F 亚属的代表性腺病毒都与 CAR 结合时是令人惊讶的。

在病毒颗粒中，起初是由六邻体、五邻体基底和纤维与易感细胞相互作用。衣壳蛋白也与被感染宿主的免疫系统相互作用。腺病毒通过纤维远端部分—纤维结与第一步受体结合。这种具有 174-191 个氨基酸残基的球形结构的等电点是 4.5-9.1。

内化步骤可能涉及第二受体—配体相互作用。配体是腺病毒顶角壳粒的可变部分，宿主细胞上的受体为 α -v-整联蛋白异二聚体。

已知 D 组导致生殖器和眼感染，后者可以涉及结膜（结膜炎），或在更严重的感染中，也涉及角膜（角结膜炎）。已知腺病毒眼感染在全球范围内发生基于社区和办公室的流行。确信主要传播途径为直接眼—手—眼，或间接眼—手—手—眼。也发生性传播。其它传染源被认为有游泳池、眼诊所或眼科。

人口密集区明显容易发生疾病的流行，因此过去十年中在亚洲国家观察到了一些流行。终止已经发生的流行可以很困难。一些基于眼诊所或眼科的流行的例子经过数月后才彻底根除。

角膜炎的爆发主要是由以下腺病毒血清型导致的：Ad8, Ad19 和 Ad4，以及 1 型疱疹病毒。另外，结膜炎主要由 Ad3, Ad4 和 Ad7 引起，但也由肠道病毒 70 和其它腺病毒引起。

已经开发了抗病毒化合物用于治疗疱疹病毒导致的眼感染。尝试用局部抗疱疹的抗病毒药物治疗腺病毒眼感染是不成功的。所以目前应用的治疗针对缓解症状并限制疾病传播。缓解疗法包括冷敷、黑眼镜、血管收缩剂,以及,尽管没有被广泛接受,也使用环孢菌素 A 和皮质类固醇。还没有证明单独或结合使用抗生素和皮质类固醇的有效性以及与可能发生副作用的危险的相关性。

腺病毒相关眼感染的综述见 Gordon et al., Adenovirus Keratoconjunctivitis, Ocular Infection and Immunology, Ed, J. S. Pepose Mosby, 1996, 877-894.

先有技术

已知肝素或肝素盐可以用于过敏性结膜炎的预防和治疗 (DE 195 47 972 A1)。在 1995 年提交的此专利申请中,公开了肝素通过激活清除因子和脂蛋白脂酶从内皮细胞的分泌而促进脂解作用。而且,也讨论了肝素在过敏性和变态反应性反应中的作用。然而,没有提到将发现对病毒结合的抑制。

EP 502 550 公开了作为抗炎药的包含多聚乙酰神经氨酸和多聚乙酰神经氨酸的部分水解产物的药物制剂。

也已经表明, MUC1 和其它唾液酸糖结合物抑制腺病毒介导的到上皮细胞的基因转移 (Arcasoy et al., Am J Resp Cell and Molec Biol, 17(4): 422)。

WO 95/34595 描述包含树枝型聚合物的抗病毒化合物,如具有多个末端基团的聚酰胺型胺类或聚赖氨酸树枝型聚合物,其中至少一个末端基团具有在其上键合的含有阴离子或阳离子的部分,具体地为含有磺酸的、含有羧酸的或含有三甲基铵的部分等。提及的唯一腺病毒是腺病毒-8,且通常未发现提及眼的腺病毒感染,或具体提及角结膜炎。

WO 00/48624 公开了血清类粘蛋白用于生产治疗急性胰腺炎的药物的用途。

WO 97/29763 公开了刺激乳酸细菌生长以预防和/或治疗泌尿生殖和肠病症的组合物。在许多成分中,论及了糊精、葡聚糖和唾液酸。

WO 98/48817 涉及通过使细胞与唾液酸或唾液酸糖苷接触而抑制内皮细胞增殖的方法和组合物。该方法据说可用于治疗由血管发生导

致或促进的疾病或不良的作用，且未发现提及腺病毒感染。

U. S. 6, 235, 313 公开了其中含有唾液酸、神经氨酸等的生物附着性小球体及其作为药物载体的用途。

ES 2, 127, 110 公开了唾液酸用于治疗“干眼综合征”的眼的用途。

然而目前还没有临床上有效的抗病毒药能够抑制在眼表面和生殖粘膜复制并产生临床疾病的许多血清型的腺病毒。已经证明腺病毒感染是难治的，因此需要改进这方面的方法和组合物。所以本发明的目的是提供满足这一需要的有效药物组合物。

发明概述

上述目的是通过所附权利要求中公开的组合物和化合物的用途而实现的。已经很惊讶地发现此组合物预防病毒与眼细胞的结合，对于一些类型的腺病毒已经证实了此结果。

附图简述

在下面的详述中将参考实施例和附图对本发明进行更详细的描述，其中

图 1 表示用神经氨酸酶治疗某些依赖于唾液酸而感染人类上皮 A549 细胞的腺病毒（图 1A - Ad8；图 1B - Ad9；图 1C - Ad19p；图 1D - Ad19a；图 1E - Ad37）；

图 2 表示：A) 通过用 (2-3) 连接的唾液酸的特异性神经氨酸酶预处理细胞而抑制 Ad37 与 A549 细胞的结合，以及 B) 通过用 a) 与 (2-3) 和 (2-6) 连接的唾液酸结合的一种凝集素即麦胚凝集素 (WGA) 和 b) (2-3) 连接的唾液酸的特异性高丽槐 (MA) 凝集素预孵育细胞而抑制 Ad37 与 A544 细胞的结合，但 (2-6) 连接的唾液酸的特异性西洋接骨木凝集素不能抑制；

图 3 表示 ^{125}I 标记的 Ad37 与鞘糖脂在微量滴定孔中的结合。

发明详述

本发明惊讶地发现导致流行性角结膜炎 (EKC) 的腺病毒的结合可以通过干扰它们与唾液酸的结合而受到抑制。这是基于以下发现，即唾液酸似乎是导致 EKC 腺病毒的第一步受体。为了阻断病毒与结膜、角膜和生殖器上皮细胞的结合，将有效治疗量的干扰病毒和唾液酸受体之间相互作用的物质给予感染位点。

因此本发明关注用于治疗腺病毒感染，尤其是眼和生殖器腺病毒

感染的多种药物组合物，其特征在于所述组合物包含干扰病毒和唾液酸受体之间相互作用的物质，所述物质以有效治疗量存在。这种干扰病毒和唾液酸受体之间相互作用的物质选自于酸性分子和负电性分子，特别是唾液酸化的糖，它们的类似物及其衍生物，以及葡糖胺聚糖，如肝素和硫酸乙酰肝素，它们的类似物及其衍生物。

优选地，干扰病毒和唾液酸受体之间相互作用的物质选自唾液酸、硫酸葡聚糖、肝素、硫酸乙酰肝素、N-羟乙酰神经氨酸、N-乙酰神经氨酸、多聚乙酰神经氨酸、3'-N-乙酰神经氨酰 N-乙酰乳糖胺、N-乙酰神经氨酰-3-岩藻糖基乳糖、N-乙酰神经氨酰乳糖、粘蛋白、血清类粘蛋白，其混合物或衍生物。

根据本发明的一种优选实施方案，药物组合物包含有效治疗量的唾液酸作为干扰病毒和唾液酸受体之间相互作用的物质。

根据另一种实施方案，干扰病毒和唾液酸受体之间相互作用的物质选自 3'-N-乙酰神经氨酰 N-乙酰乳糖胺、N-乙酰神经氨酰-3-岩藻糖基乳糖、N-乙酰神经氨酰乳糖、多聚乙酰神经氨酸、及其混合物或衍生物。

根据另一种实施方案，干扰病毒和唾液酸受体之间相互作用的物质选自硫酸葡聚糖、葡糖胺聚糖，如肝素和硫酸乙酰肝素。

根据另一种实施方案，干扰病毒和唾液酸受体之间相互作用的物质是带负电的糖蛋白，如粘蛋白、血清类粘蛋白，优选粘蛋白。

此药物组合物被配制为凝胶、液体或糊剂，或包含在缓释产品中，成形并适于插入眼睑下或阴道内。对于眼部应用，组合物优选为透明的，以便尽量少影响视野。本发明的药物组合物可以包含其它有效治疗物质。

此组合物可以进一步包含通常用于眼和生殖医学领域的适当载体和佐剂，如 cetrimid, aq. ster., 卡波姆，稀释氢氧化钠、凡士林等。

概括地说，本发明涉及唾液酸受体阻断化合物在生产治疗腺病毒感染药物组合物中的用途。

具体地，本发明涉及一种化合物在生产治疗腺病毒感染，特别是角结膜炎的药物组合物中的用途，所述化合物选自唾液酸、硫酸葡聚糖、肝素、硫酸乙酰肝素、N-羟乙酰神经氨酸、N-乙酰神经氨酸、多

聚乙酰神经氨酸、3'-N-乙酰神经氨酸 N-乙酰乳糖胺、N-乙酰神经氨酸-3-岩藻糖基乳糖、N-乙酰神经氨酸乳糖、粘蛋白、血清类粘蛋白，及其混合物或衍生物。

具体地，本发明涉及下列任意一种物质在生产治疗腺病毒感染的药物组合物中的用途：多聚乙酰神经氨酸、3'-N-乙酰神经氨酸 N-乙酰乳糖胺、N-乙酰神经氨酸-3-岩藻糖基乳糖及 N-乙酰神经氨酸乳糖。

此外，本发明也涉及下列任意一种物质在生产治疗角结膜炎和生殖器腺病毒感染的药物组合物中的用途：多聚乙酰神经氨酸、3'-N-乙酰神经氨酸 N-乙酰乳糖胺、N-乙酰神经氨酸-3-岩藻糖基乳糖及 N-乙酰神经氨酸乳糖。

唾液酸受体的一价类似物将涵盖位于病毒颗粒的十二个角的十二条纤维中的大多数，可以有效阻断病毒颗粒与宿主细胞受体的结合。二价或多价类似物将通过与一些纤维的相互作用，使许多病毒颗粒聚集为网格。这将以更高的效率妨碍或抑制病毒感染，即每微摩尔配体产生更多抑制。在本发明者进行的实验中，发现多价配体，即粘蛋白对抑制腺病毒粘连非常有效。

所以在本发明的一种实施方案中，使病毒粒聚集为网格的多价配体被用作干扰因素。因此可以基于这些配体生产治疗病毒感染，特别是腺病毒感染和生殖器感染的有效药物。

因此本发明的一种实施方案包含多价物质，如包含一种附着至少两个，优选三个或更多结合基团的连接体。多价物质优选具有 3 到 5 个结合基团，与一个中间结或连接体连接。这种化合物现在可以合成为所阐述的结合结构。

实施例

实施例 1 对 Ad37 结合的干扰

用硫酸葡聚糖和葡糖胺聚糖，如肝素和硫酸乙酰肝素研究对腺病毒 37 亚型 (Ad37) 与第一步细胞受体结合的干扰。已经表明这种带负电的分子可以妨碍病毒的结合。而且，已经证明 Ad37 不与 D 亚属腺病毒的特征性受体 CAR 结合。实际上，已经表明 Ad37 与不表达 CAR 的中国仓鼠卵巢细胞结合。这种结合可以被 (2-3) 连接的唾液酸的神经氨酸酶抑制，而不被 (2-6) 连接的唾液酸的神经氨酸酶抑制。另外，从高丽槐得到的 (2-3) 连接的唾液酸的神经氨酸酶抑制和与所有类型唾

液酸结合的麦胚凝集素阻断了结合。然而，(2-6)连接的唾液酸的特异性西洋接骨木凝集素不能阻断结合。因此证明 Ad37 的细胞受体是(2-3)连接的唾液酸。见图 2。

使用肝素得到的结果见表 1。

表 1. 用肝素对腺病毒与 Chang C 结膜细胞结合的非特异性电荷依赖性抑制

腺病毒类型	使结合抑制 50%的肝素浓度(μM)	以百分数表示的 对结合的最大抑制 %(670 μM 肝素)
8	30	92
19a	25	90
37	20	87

在一项扩展实验中,比较了已知引起流行性角结膜炎(EKC)的 Ad8, Ad19a 和 Ad37 型腺病毒和不引起 EKC 的 Ad9 和 Ad19p. 研究了与人上皮 A549 细胞的结合。用 10 个单位的神经氨酸酶处理(去掉唾液酸)的细胞明显抑制 Ad8, Ad19a 和 Ad37 的结合和随后由它们引起的感染。而在对照的 Ad9 和 Ad19p 中没有观察到这一作用。这表示 Ad8, Ad19a 和 Ad37 可以通过与细胞表面的唾液酸结合而感染 A549 细胞,而 Ad9 和 Ad19p 不能。这些结果见图 1。

实施例 2. 唾液酸化糖蛋白的抑制作用

用下列糖蛋白研究了糖蛋白抑制 Ad37 与 Chang C 结膜细胞结合的作用: 胎球蛋白、粘蛋白、血清类粘蛋白和血型糖蛋白 A。结果见表 2。

表 2. 用唾液酸化糖蛋白对 Ad37 与 Chang 细胞结合的特异性抑制

糖蛋白类型	使 Ad37 结合抑制 50%的糖蛋白浓度(μM)	以百分数表示的 Ad37 结合的最大抑制 (500 μM)
胎球蛋白	420	62
粘蛋白	8	89
血清类粘蛋白	75	77

血型糖蛋白 A

>500

45

这些结果表明用非常低浓度的糖蛋白可以获得显著抑制, 如 $8\mu\text{M}$ 粘蛋白就足以达到 50% 的抑制, $500\mu\text{M}$ 的浓度产生 89% 的抑制。

实施例 3. 不同糖抑制 Ad37 结合的能力

本发明者使用 37 型腺病毒和 Chang C 结膜细胞, 通过判断不同糖得到的抑制而证明了此创造性概念。

表明浓度为 160mmol 的乳糖、半乳糖、甘露糖或乙酰半乳糖胺、乙酰葡萄糖胺和乙酰甘露糖胺不干扰 Ad37 与唾液酸表达细胞的结合。然而, N-羟乙酰神经氨酸、N-乙酰神经氨酸、多聚乙酰神经氨酸、3'-N-乙酰神经氨酰 N-乙酰乳糖胺、6'-N-乙酰神经氨酰 N-乙酰乳糖胺、N-乙酰神经氨酰-3-岩藻糖基乳糖和 N-乙酰神经氨酰乳糖都可有效抑制 Ad37 与唾液酸表达细胞的结合。结果见表 3。

表 3. 用唾液酸糖对 Ad37 与 Chang 细胞结合的特异性抑制

糖类型	以百分数表示的	
	使 Ad37 结合抑制 50% 的糖浓度 (mM)	Ad37 结合的最大抑制 (160 mM)
N-羟乙酰-神经氨酸	40	91
N-乙酰-神经氨酸	18	82
3'-N-乙酰-神经氨酰-N-乙酰乳糖胺	5	—*
6'-N-乙酰-神经氨酰-N-乙酰乳糖胺	7	—*
N-乙酰神经氨酰-3-岩藻糖基乳糖	5	—*
多聚乙酰神经氨酸	8	79
N-乙酰-神经氨酰乳糖	5	95

*未判断

所有数据均体现为抑制 50% 的腺病毒结合和最大程度抑制腺病毒结合所需要的剂量。

这些结果明确表明用非常低的糖浓度可以达到显著抑制。很明显, 剂量小于 10mM 的 3'-N-乙酰神经氨酰 N-乙酰乳糖胺、6'-N-乙酰神经氨酰 N-乙酰乳糖胺、N-乙酰神经氨酰-3-岩藻糖基乳糖、N-乙酰神经氨酰乳糖和多聚乙酰神经氨酸可以导致 50% 的抑制。另外, 用浓度为

160mM 的特异性糖，尤其是 N-乙酰神经氨酰乳糖几乎可以达到完全抑制。

其它还未检验的候选糖包括 2-O-甲基- α - β -N-乙酰神经氨酸和 N-乙酰神经氨酸甲酯。

N-羟乙酰神经氨酸和 N-乙酰神经氨酸为单糖。N-乙酰神经氨酰-岩藻糖基-乳糖以下式表示： α -Neu-5-Ac-(2-3)- β -D-Gal(1-4)-(α -Fuc-(1-3))-Glc。3'-N-乙酰-神经氨酰-N-乙酰-乳糖胺以下式表示： α -NeuNAc-(2-3)- β -D-Gal-(1-4)-D-GlcNAc。6'-N-乙酰-神经氨酰-N-乙酰-乳糖胺以下式表示： α -Neu-5Ac-(2-6)- β -D-Gal-(1-4)-D-GlcNAc。N-乙酰-神经氨酰-乳糖是 α -Neu-5Ac-(2-3)- β -D-Gal-(1-4)-D-Glc 和 α -Neu-5Ac-(2-6)- β -D-Gal-(1-4)-D-Glc 的混合物。

图 3 所示薄层层析初步结果提示：下列结构对 Ad37 病毒结合有效：



根据这个资料，可以开发干扰病毒和唾液酸受体间相互作用的药物组合物。具体地说，可以根据上述结构构建可以与一些病毒颗粒相互作用而导致病毒聚集的多价物质。

尽管本发明的描述是关于构成本发明者目前所知的最佳方式的优选实施方案，应该理解，对于本领域的普通技术人员是很明显的是，可以进行各种改变和修饰而不离开所附权利要求所阐述的本发明的范围。

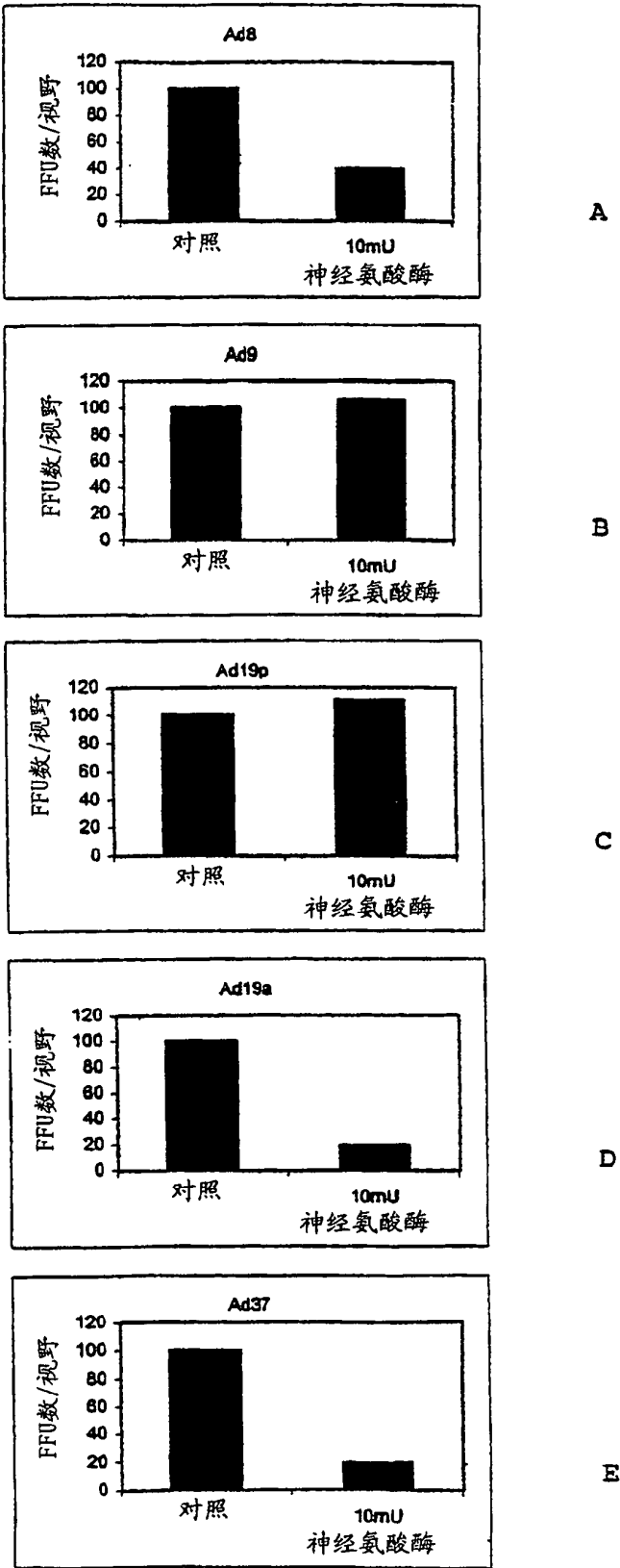
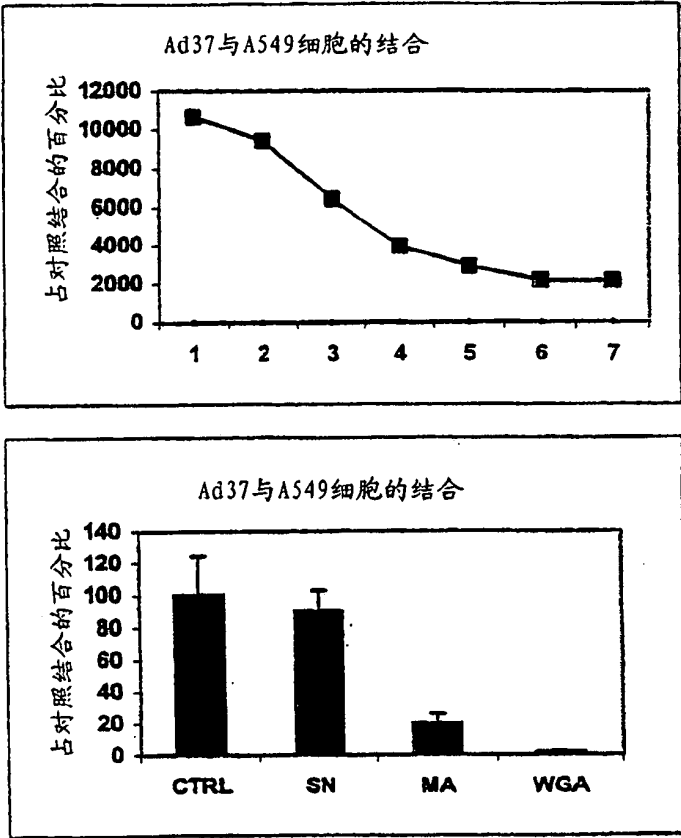


图 1



A

B

图 2

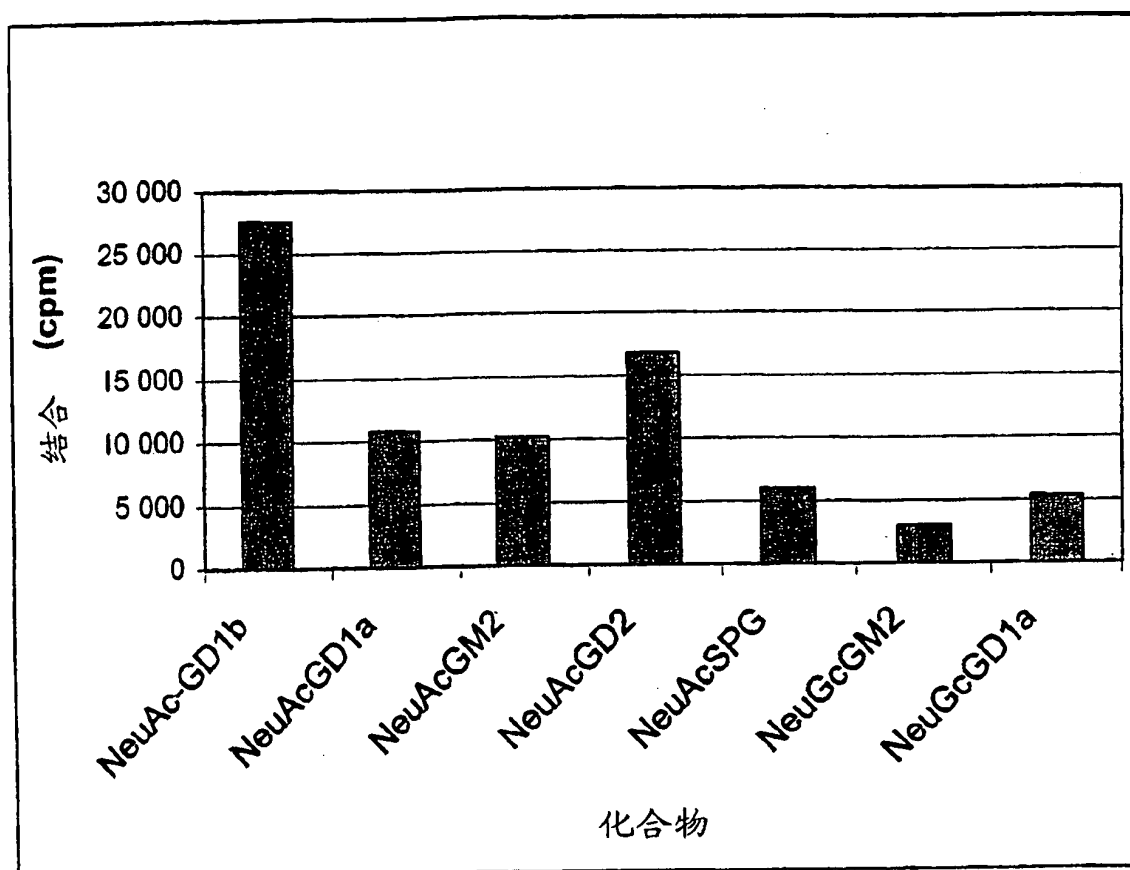


图 3