



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103648491 B

(45)授权公告日 2017.07.14

(21)申请号 201280023188.0

(22)申请日 2012.04.10

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 103648491 A

(43)申请公布日 2014.03.19

(30)优先权数据

11305410.0 2011.04.08 EP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2013.11.14

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2012/056467 2012.04.10

(87)PCT国际申请的公布数据

W02012/136851 EN 2012.10.11

(73)专利权人 法国国家健康医学研究院

地址 法国巴黎

专利权人 克洛德贝纳尔里昂第一大学

(72)发明人 文森特·洛托 贝诺伊特·沙塞

帕特里斯·安德尔

劳伦·梅涅尔-沙克林

安妮·奥布兰-热克斯

(74)专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 曹立莉

(51)Int.Cl.

A61K 31/122(2006.01)

A61K 45/06(2006.01)

A61K 31/337(2006.01)

A61K 31/352(2006.01)

A61K 31/404(2006.01)

A61K 31/426(2006.01)

A61K 31/4465(2006.01)

A61K 31/4745(2006.01)

A61K 31/475(2006.01)

A61K 31/55(2006.01)

A61K 31/555(2006.01)

A61K 31/58(2006.01)

A61K 31/7068(2006.01)

A61K 31/7076(2006.01)

A61K 38/06(2006.01)

(56)对比文件

W0 98/30228 A1,1998.07.16,权利要求1-18,实施例1-31.

CN 1832939 A,2006.09.13,权利要求1-96,实施例1-8.

US 2007/0270362 A1,2007.11.22,权利要求1-48,实施例.

审查员 贺伊博

权利要求书1页 说明书12页 附图15页

(54)发明名称

用于抑制流感病毒复制的方法和药物组合
物

(57)摘要

本发明涉及用于抑制流感病毒复制的方法和药物组合物。更具体地,本发明涉及一种选自由以下各项组成的组中的化合物:吉西他滨,Obatoclax甲磺酸盐,多西他赛,HA-14,阿特波龙,GSK3B抑制剂VIII,GSK3B抑制剂XV,靛玉红3'-一肟,L谷胱甘肽还原型,醋酸氟轻松,替罗非班,盐酸拓扑替康,氯法拉滨,长春碱,甲萘醌晶体及其衍生物或类似物,其用于治疗需要其的受

试者的流感感染。

1. Obatoclax甲磺酸盐在制备用于治疗需要其的受试者的A型流感病毒感染的药物中的用途,其中所述A型流感病毒选自H1N1、H3N2和H5N1。

2. 根据权利要求1所述的用途,其中所述受试者是人。

3. 根据权利要求2所述的用途,其中所述受试者是人婴儿、人儿童或老年人。

4. 根据权利要求1所述的用途,其中所述Obatoclax甲磺酸盐联合选自以下的另外合适治疗剂使用:神经氨酶抑制剂、M2抑制剂、RNA聚合酶抑制剂、干扰素、流感疫苗、流感抗原多肽或针对流感抗原多肽的中和抗体。

5. 根据权利要求1所述的用途,其中Obatoclax甲磺酸盐联合有效量的选自以下的化合物使用:吉西他滨、多西他赛、HA-14、阿特波龙、GSK3B抑制剂VIII、GSK3B抑制剂XV、靛玉红3'-一肟、还原型L谷胱甘肽、醋酸氟轻松、替罗非班、盐酸拓扑替康、氯法拉滨、长春碱、甲萘醌晶体。

6. 根据权利要求1所述的用途,其中Obatoclax甲磺酸盐施用至呼吸道。

用于抑制流感病毒复制的方法和药物组合物

发明领域

[0001] 本发明涉及用于抑制流感病毒复制的方法和药物组合物。

[0002] 发明背景

[0003] 流感病毒是世界上存在最普遍的病毒之一，影响人和牲畜。流感导致经济负担、发病率甚至死亡率，这是显著的。

[0004] 流感病毒是RNA包封病毒，具有直径为约125nm的粒度。它基本上由与核蛋白相关的核糖核酸(RNA)的内部核壳或核芯组成，由具有脂质双层结构和外部糖蛋白的病毒包膜包围。病毒包膜的内层主要由基质蛋白组成并且外层大部分由宿主来源的脂质材料组成。流感病毒包括两个表面抗原、糖蛋白神经氨酸酶(NA)和血细胞凝集素(HA)，它们在粒子表面看起来为长钉，10至12nm长。正是这些表面蛋白，尤其是血细胞凝集素决定了流感亚型的抗原特异性。病毒菌株根据起源的宿主物种、地理部位和分离年份、序列号进行分类，并且对于A型流感，通过HA和NA的亚型的血清学性能。对A型流感病毒，已鉴定了16个HA亚型(H1-H16)和9个NA亚型(N1-N9)。所述HA和NA亚型的病毒已从水栖鸟类回收，但自从1918年来在人种群中仅三个HA亚型(H1, H2, 和H3)和两个NA亚型(N1和N2)已建立了稳定的谱系。对于B型流感病毒仅识别了HA的一个亚型和NA的一个亚型。

[0005] A型流感病毒连续进化并经历抗原变异性。缺乏通过病毒RNA聚合酶的有效校对导致高比率的转录错误，这能够导致表面糖蛋白中的氨基-酸替代。这称为“抗原漂移”。分段的病毒基因组允许第二类型的抗原变异。如果两种流感病毒同时感染宿主细胞，则称为“抗原位移”的遗传重组可以产生具有新表面或内部蛋白的新型病毒。这些抗原变化(“漂移”和“位移”二者)是不可预测的并且从免疫学角度看可以具有显著影响，因为它们最终导致出现新型流感菌株，并且使得该病毒能够逃离免疫系统，引起熟知的、几乎每年的流行病。这两种遗传修饰已引起负责在人中流行的新型病毒变体。

[0006] 流感病毒几乎每个冬季都引起疾病流行，其中A型或B型病毒的传染率在六周时间内高达40%。流感传染导致各种疾病状态，从亚临床感染到弱上呼吸道感染至严重病毒性肺炎。典型流感疾病流行引起肺炎和下呼吸道疾病的发病率增加，如由增加的住院或死亡率证实的。该疾病的严重度主要由宿主的年龄、其免疫状态和感染部位决定。

[0007] 老年人(65岁以上)特别脆弱，在发达国家中占有所有流感相关死亡的80-90%。具有潜在慢性疾病的个体也最有可能经受这样的并发症。幼儿也可能遭受严重疾病。因此这些群体尤其需要被保护。除了这些“处于危险”群体之外，卫生当局还建议对接触老年人的健康成人注射疫苗。

[0008] 对于流感的目前治疗选择包括注射疫苗，以及利用抗病毒药物的化疗或化学预防。利用流感疫苗针对流感的接种经常推荐用于高危群体，如儿童和老年人，或者患有哮喘、糖尿病或心脏病的人。然而，有可能接种后仍然得流感。疫苗每个季节重新配制用于一些特定流感菌株但可能不能包括在那个季节世界上主动感染人的所有菌株。制造商花约六个月来配制和生产对于处理季节性疾病流行所需的成百万的剂量；偶尔地，新的或忽略的菌株在该时间期间变得显著并感染尽管已被接种的人(如2003-2004流感季节的

H3N2Fujian流感)。还有可能在正好接种之前被感染并且正是用推测疫苗预防的菌株得病,因为疫苗要花约两周才有效。而且,这些流感疫苗的有效性是可变的。由于病毒的高突变率,所以特定流感疫苗通常不超过几年就不提供保护。配制一年的疫苗在下一年可能无效,因为流感病毒随时间快速变化,并且不同的菌株变为主要的。

[0009] 抗病毒药物(例如,神经氨酸酶抑制剂或M2抑制剂)也可以用来治疗流感,但病毒可对标准抗病毒药物发展抗性。因此,对于用于治疗流感感染的药物如对病毒效价具有降低的敏感性的药物仍然存在需要。

[0010] 发明概述

[0011] 本发明涉及用于抑制流感病毒复制的方法和药物组合物。

[0012] 更具体地,本发明涉及一种用于抑制受感染细胞中的流感病毒的复制能力的方法,包括以下步骤:使所述受感染细胞与选自以下各项组成的组中的至少一种化合物接触:吉西他滨,Obatoclax甲磺酸盐,多西他赛,HA-14,阿特波龙,GSK3B抑制剂VIII,GSK3B抑制剂XV,靛玉红3'-一肟,L谷胱甘肽还原型,醋酸氟轻松,替罗非班,盐酸拓扑替康,氯法拉滨,长春碱,甲萘醌晶体及其衍生物或类似物。

[0013] 本发明还涉及一种选自以下各项组成的组中的化合物:吉西他滨,Obatoclax甲磺酸盐,多西他赛,HA-14,阿特波龙,GSK3B抑制剂VIII,GSK3B抑制剂XV,靛玉红3'-一肟,L谷胱甘肽还原型,醋酸氟轻松,替罗非班,盐酸拓扑替康,氯法拉滨,长春碱,甲萘醌晶体及其衍生物或类似物,其用于治疗需要其的受试者的流感感染。

[0014] 发明详述

[0015] 本发明的发明人现已鉴别了不同化合物,其抑制流感病毒的复制,并且可以用作用于治疗流感感染的药物。所述化合物显示在表1中并且本身是本领域技术人员已知的:

[0016]

名称	FDA 状态	IUPAC 名称
阿特波龙	未批准	14-硝基-8,18-二氮杂四环[9.7.0.0 ^{2,7} .0 ^{12,17}] 十八-1(11),2(7),3,5,12(17),13,15-七烯-9-酮
长春碱	批准	(1R,9R,10S,11R,12R,19R)-11-(乙酰基氧基)-12-乙基-4-[(13S,15S,17S)-17-乙基-17-羟基-13-(甲氧基羰基)-1,11-二氮杂四环[13.3.1.0 ^{4,12} .0 ^{5,10}]]十九-4(12),5(10),6,8-四烯-13-基]-10-羟基-5-甲氧基-8-甲基-8,16-二氮杂五环[10.6.1.0 ^{1,9} .0 ^{2,7} .0 ^{16,19}]]十九-2(7),3,5,13-四烯-10-甲酸甲酯

[0017]

甲萘醌晶体	批准	2-甲基-1,4-二氢萘-1,4-二酮
GSK 抑制剂 VIII	未批准	N-(4-甲氧基苄基)-N'-(5-硝基-1,3-噻唑-2-基)脲
吉西他滨	批准	4-氨基-1-[(2R,4R,5R)-3,3-二氟-4-羟基-5-(羟甲基)-戊-2-基]-1,2-二氢嘧啶-2-酮
GSK-3 抑制剂 XV	未批准	吡啶并呋唑并-环戊二烯基钕络合物, 外消旋混合物
多西他赛	批准	(1S,2S,3R,4S,7R,9S,10S,12R,15S)-4-(乙酰基氧基)-15-{[(2R,3S)-3-{[(叔丁氧基)羰基]氨基}-2-羟基-3-苯基丙酰基]氧基}-1,9,12-三羟基-10,14,17,17-四甲基-11-氧代-6-氧杂四环[11.3.1.0 ^{3,10} .0 ^{4,7}]十七-13-烯-2-基苯甲酸酯
Obatoclax 甲磺酸盐 (GX15-07)	未批准	(2E)-2-[(5E)-5-[(3,5-二甲基-1H-吡咯-2-基)亚甲基]-4-甲氧基吡咯-2-亚基]吡啶; 甲磺酸
靛玉红-3'-一肟	未批准	3-[(3E)-3-(羟基亚氨基)-2,3-二氢-1H-吡啶-2-亚基]-2,3-二氢-1H-吡啶-2-酮
醋酸氟轻松	批准	(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12R,13S,19S)-12,19-二氟-11-羟基-8-(2-羟基乙酰基)-6,6,9,13-四甲基-5,7-二氧杂五环[10.8.0.0 ^{2,9} .0 ^{4,8} .0 ^{13,18}]二十-14,17-二烯-16-酮
L-谷胱甘肽	批准	(2S)-2-氨基-4-{[(1R)-1-[(羧甲基)氨基甲酰基]-2-硫

[0018]

还原型		基乙基]氨基甲酰基}丁酸
替罗非班	批准	(2S)-2-(丁烷-1-磺酰胺基)-3-{4-[4-(哌啶-4-基)丁氧基]苯基}丙酸
HA-14	未批准	[2-氨基-6-溴-4-(1-氟基-2-乙氧基-2-氧代乙基)]-4H-苯并吡喃-3-甲酸乙酯
盐酸拓扑替康	批准	(19S)-8-[(二甲基氨基)甲基]-19-乙基-7,19-二羟基-17-氧杂-3,13-二氮杂五环[11.8.0.0 ^{2,11} .0 ^{4,9} .0 ^{15,20}]全氟-1(21),2,4(9),5,7,10,15(20)-七烯-14,18-二酮
氯法拉滨	批准	(2R,3R,4S,5R)-5-(6-氨基-2-氯-9H-嘌呤-9-基)-4-氟-2-(羟甲基) 烷-3-醇

[0019] 因此,本发明涉及一种用于抑制受感染细胞中的流感病毒的复制能力的方法,包括以下步骤:使所述受感染细胞与选自以下各项组成的组中的至少一种化合物接触:吉西他滨,Obatoclax甲磺酸盐,多西他赛,HA-14,阿特波龙,GSK3B抑制剂VIII,GSK3B抑制剂XV,靛玉红3'-一肟,L谷胱甘肽还原型,醋酸氟轻松,替罗非班,盐酸拓扑替康,氯法拉滨,长春碱,甲萘醌晶体及其衍生物或类似物。

[0020] 如本文在提及病毒表型时使用的,术语“抑制复制能力”是指相对于没有上述化合物下生长的病毒,在所述化合物存在下病毒生长至较低效价。在一个实施方式中,当相比于在没有所述化合物下生长的所述流感病毒,所述化合物的存在将流感病毒在人细胞中的复制的能力抑制至少约10%,或至少约20%,或至少约30%,或至少约40%,或至少约50%,或至少约60%,或至少约70%,或至少约80%,或至少约90%,或至少约100%,或至少约200%,或至少约300%,或至少约400%,或至少约500%。

[0021] 根据本发明,所述受感染细胞是真核受感染细胞,包括禽类和哺乳动物细胞。优选地,所述受感染细胞是哺乳动物细胞。典型地所述哺乳动物细胞包括但不限于来自人、猫、牛、马、绵羊、猪、山羊和兔的细胞。

[0022] 本发明还涉及一种选自以下各项组成的组中的化合物:吉西他滨,Obatoclax甲磺酸盐,多西他赛,HA-14,阿特波龙,GSK3B抑制剂VIII,GSK3B抑制剂XV,靛玉红3'-一肟,L谷胱甘肽还原型,醋酸氟轻松,替罗非班,盐酸拓扑替康,氯法拉滨,长春碱,甲萘醌晶体及其衍生物或类似物,其用于治疗需要其的受试者的流感感染。

[0023] 如本文使用的,术语“流感感染”具有其在本领域的一般含义并且指由流感病毒的感染引起的疾病。在本发明的一些实施方式中,流感感染与A或B型流感病毒有关。在本发明

的一些实施方式中,流感感染与A型流感病毒有关。在本发明的一些具体实施方式中,流感感染由是H1N1,H2N2,H3N2或H5N1的A型流感病毒引起。

[0024] 受试者可以是易感染流感感染的人或任何其他动物(例如鸟类和哺乳动物)(例如家畜如猫和狗;牲畜和农场动物如马,牛,猪,鸡等)。典型地所述受试者是哺乳动物包括非灵长类动物(例如,骆驼,驴,斑马,牛,猪,马,山羊,绵羊,猫,狗,大鼠和小鼠)和灵长类动物(例如,猴,黑猩猩和人)。在某些实施方式中,受试者是非人动物。在一些实施方式中,受试者是农场动物或宠物。在另一个实施方式中,受试者是人。在另一个实施方式中,受试者是人幼儿。在另一个实施方式中,受试者是人儿童。在另一个实施方式中,受试者是人成人。在另一个实施方式中,受试者是老年人。在另一个实施方式中,受试者是未成熟的人婴儿。

[0025] 例如,治疗性治疗包括流感感染的进展、严重度和/或持续时间的减少或减轻,或流感感染的一种或多种症状(具体地,一种或多种可辨别的症状)的减轻,这是由于施用至少一种本发明的化合物导致的。在具体的实施方式中,治疗性治疗包括减轻流感感染的至少一种可测量的身体参数。在其他实施方式中,治疗性治疗包括抑制流感感染的进展,或者物理地通过例如使可辨别症状稳定,生理地通过例如使身体参数稳定,或者这二者。在其他实施方式中,治疗性治疗包括流感感染的减少或稳定。抗病毒药物可以用于群体环境以治疗已患有流感的人,从而减少症状的严重度并减少它们患病的天数。

[0026] 在一个特定实施方式中,本发明的化合物可以用于预防性治疗。如本文使用的,术语“预防”或“预防性使用”和“预防性治疗”是指目的是防止而不是治疗或治愈疾病的任何医学或公众健康程序。如本文使用的,术语“防止”,“预防”和“阻止”是指减少没有患病但已经或可能接近患有该疾病的受试者的受试者获得或发展指定病症的风险,或减少或抑制所述病症的复发。

[0027] 如本文使用的,预防性使用包括在其中已经检测到爆发的情形中使用以防止在处于严重流感并发症的高风险的大量人彼此亲密接触生活的地方(例如在医院,日间看护中心,监狱,养老院等)中感染的传染或传播。它还包括在需要保护以免于流感但在免疫接种后没有得到保护(例如由于较差免疫系统)的人群中,或当他们不可获得疫苗时,或当它们由于副作用而不能得到疫苗时使用。它还包括在接种后两周期间使用,因为在该时间期间疫苗仍是无效的。预防性使用也可以包括治疗具有流感但没有患病或不被认为处于并发症的高风险的人,以减少被流感感染并使其转到与他亲密接触的高风险人(例如健康护理人员,养老院工作人员等)的机会。

[0028] 通常,本发明的化合物以有效量施用至受试者。如本文使用的,“有效量”是指足以引起期望生物学反应的量。在本发明中,所期望的生物学反应是一直流感病毒的复制,减少流感病毒的量或者减少或减轻流感病毒感染的严重度、持续时间、进展或发作,防止与流感病毒感染相关的症状的复发、发展、发作或进展,或增强或改善针对流感感染使用的另一疗法的预防或治疗效果。施用至受试者的化合物的精确量将取决于施用模式、感染的类型和严重度以及受试者的特性,如总体健康、年龄、新版、体重和对药物的耐受性。技术人员将能够根据这些和其他因素确定剂量。当与其他抗病毒剂共同施用,例如当与抗流感药物共同施用,第二药剂的“有效量”将取决于所使用的药物的类型。合适剂量对于批准的药剂是已知的并且可以由技术人员共计受试者的病症、所治疗病症的类型和所使用的本文所述的化合物的量。在其中没有明确注释量的情况下,应认为是有效量。例如本文中所述的化合

物可以在大约0.01至100mg/kg体重/天的剂量范围施用至受试者用于治疗性或预防性治疗。

[0029] 一般地,剂量方案可以依据各种各样的因素选择,包括所治疗的疾病和疾病的严重程度;采用的具体化合物的活性;采用的具体组合物;受试者的年龄、体重、总体健康、性别和饮食;施用的时间、施用途和采用的具体化合物的排泄速率;受试者的肾和肝功能;以及采用的特定化合物及其盐,治疗的持续时间;与所采用的具体化合物组合或同时使用的药物以及医学领域熟知的类似因素。技术人员可以容易地确定和规定对治疗、预防、抑制(完全或部分地)或停止疾病进程所需的本文所述化合物的有效量。

[0030] 本文所述的化合物的剂量的范围可以为约0.01至约100mg/kg体重/天,约0.01至约50mg/kg体重/天,约0.1至约50mg/kg体重/天,或约1至约25mg/kg体重/天。应理解,每天的总量可以以单个剂量施用或可以以多个剂量施用,如每天两次(例如,每12小时),每天三次(例如,每8小时),或每天四次(例如,每6小时)。

[0031] 对于治疗性治疗,本文所述的化合物可以在症状(例如,鼻充血,喉咙痛,咳嗽,疼痛,疲劳,头痛和发冷/出汗)发作的例如48小时内(或40小时内,或少于2天,或少于1.5天,或在24小时内)施用至受试者。治疗性治疗可以持续任何合适持续时间,例如,持续5天,7天,10天,14天等。

[0032] 对于群体爆发期间的预防性治疗,本文所述的化合物可以先证者的症状发作的例如2天内施用至受试者,并且可以持续任何适当持续时间,例如持续7天,10天,14天,20天,28天,35天,42天等。

[0033] 各种类型的施用方法可以在本发明中采用,并且在以下详细描述。

[0034] 在一个特定实施方式中,本发明的化合物与另外的合适治疗剂,例如抗病毒或疫苗联合使用。当采用“联合疗法”时,使用第一量的本发明的化合物和第二量的另外的合适治疗剂(例如抗病毒剂或疫苗可以实现有效量。

[0035] 如本文使用的,术语“联合”或“共同施用”可以互换使用用来指使用超过一种疗法(例如,一种或多种预防和/或治疗剂)。使用该术语不限制施用至受试者的疗法(例如预防和/或治疗剂)的顺序。

[0036] 共同施用涵盖第一和第二量的共同施用的化合物以基本上同时方式,如以单个药物组合物,例如具有固定比率的第一和第二量的胶囊或片剂,或以多个用于各自的单独胶囊或片剂施用。另外,这样的共同施用还涵盖以任意顺序的相继方式施用各种化合物。

[0037] 可以本发明的化合物共同施用的具体实例包括神经氨酶抑制剂。神经氨酶抑制剂的实例包括奥司他韦,奥司他韦羧酸盐(GS4071;参见例如Eisenberg等,Antimicrob Agents Chemother. (1997) 41:1949-52),扎那米韦,帕拉米韦(RWJ-27021;BXC-1812, BioCryst),2,3-二脱氢-2-脱氧-N-乙酰基神经氨酸(DANA),2-脱氧-2,3-脱氢-N-三氟乙酰基神经氨酸(FANA),A-322278,和A-315675(参见美国专利No.6,455,571,Maring等和Kati等,Antimicrob Agents Chemother. (2002) 46:1014-21)。

[0038] 可以与本发明的化合物共同施用的具体实例包括M2抑制剂。M2抑制剂的实例包括氨基金刚烷化合物如金刚烷胺(1-氨基-金刚烷),金刚烷乙胺(1-(1-氨基乙基)金刚烷),螺[环丙烷-1,2'-金刚烷]-2-胺,螺[吡咯烷-2,2'-金刚烷],螺[哌啶-2,2'-金刚烷],2-(2-金刚烷基)哌啶,3-(2-金刚烷基)吡咯烷,2-(1-金刚烷基)哌啶,2-(1-金刚烷基)吡咯烷,和2-

(1-金刚烷基)-2-甲基-吡咯烷;以及M2-特异性单克隆抗体(参见例如US20050170334;以及Zebedee和Lamb, J. Virol. (1988) 62:2762-72)。

[0039] 可以与本发明的化合物共同施用的具体实例包括RNA聚合酶抑制剂。如本文使用的,术语RNA聚合酶抑制剂是指抑制病毒RNA聚合物复合体或其亚单位(即PB1, PB2和PA)之一的聚合物、蛋白酶和/或核酸内切酶活性的抗病毒剂。示例性RNA聚合酶抑制剂包括抗病毒核苷类似物,如利巴韦林,韦拉米啉,6-氟-3-羟基-2-吡嗪羧酰胺(T-705),2'-脱氧-2'-氟鸟苷,吡唑霉素,3-脱氮鸟嘌呤,卡波定(carbodine)(参见例如Shannon等, Antimicrob Agents Chemother. (1981) 20:769-76),和环戊烯基胞嘧啶(cyclopentenyl cytosine)(参见例如Shigeta等, Antimicrob Agents Chemother. (1988) 32:906-11);以及核酸内切酶抑制剂加氟他胺(flutimide)(参见例如Tomassini等, Antimicrob Agents Chemother. (1996) 40:1189-93)。

[0040] 可以与本发明的化合物共同施用的具体实例包括流感特异的干扰寡核苷酸。流感特异的干扰寡核苷酸的实例包括siRNA(参见例如Zhou等, Antiviral Res. (2007) 76:186-93),反义寡核苷酸,磷硫酰寡核苷酸,核糖酶类(参见例如Draper的美国专利No. 6,258,585),吗啉代低聚物和肽核酸(参见例如Schubert and Kurreck, Handb Exp Pharmacol. (2006) 173:261-87)。

[0041] 可以与本发明的化合物共同施用的具体实例包括干扰素。“干扰素”或“IFN”,如本文使用的,意图包括文献中所定义的任何分子,包括例如任何类型的IFN(I型和II型)并且尤其是,IFN- α , IFN- β , IFN- ω 和IFN- γ 。术语干扰素,如本文使用的,还意图涵盖其盐、功能衍生物、变体、突变蛋白、融合蛋白、类似物和活性片段。在一个优选的实施方式中,干扰素是干扰素- α 。干扰素- α 包括但不限于重组干扰素- α 2a(如ROFERON®干扰素,可获自Hoffman-LaRoche, Nutley, N.J.),干扰素- α 2b(如Intron-A干扰素,可获自Schering Corp., Kenilworth, N.J., USA),共有序列干扰素,和纯化的干扰素- α 产物。

[0042] 在一些实施方式中,本文所述的化合物可以与流感疫苗共同施用。所有种类的流感疫苗通常是三价疫苗。它们通常含有来源于两种A型流感病毒菌株和一种B型流感菌株的抗原。在大多数情况下标准的0.5ml注射剂量含有来自每种菌株的15ug血凝素抗原组分,如通过单径向免疫扩散(SRD)测得的。要并入到每个季节的流感疫苗中的流感病毒菌株由世界卫生组织联合国家卫生部门和疫苗生产商确定。

[0043] 在一些实施方式中,联合疗法包括用流感抗原多肽(例如流感血凝素和基质2胞外结构域多肽)的主动免疫接种或用针对流感抗原多肽(例如针对流感血凝素和基质2胞外结构域多肽得到的抗体)的一种或多种中和抗体的被动免疫接种。

[0044] 本发明的化合物可以配制成药物组合物,其还包含药用载体、稀释剂、佐剂或媒介物。在一个实施方式中,本发明涉及一种药物组合物,其包含上述的本发明化合物,以及药用载体、稀释剂、佐剂或媒介物。在一个实施方式中,本发明是一种药物组合物,其包含有效量的本发明化合物或其药用盐,以及药用载体、稀释剂、佐剂或媒介物。药用载体包括,例如,相对于意图的施用形式并且符合常规制药实践选择的药物稀释剂、赋形剂或载体。

[0045] 药用载体可以含有不会过度抑制所述化合物的生物学活性的惰性成分。药用载体应是生物相容的,例如,无毒,非炎性的,非免疫原型或在施用至受试者后没有其他不期望的反应或副作用。可以采用标准的药物制剂技术。

[0046] 药用载体、佐剂或媒介物,如本文使用的,包括任何和所有溶剂、稀释剂或其他液体媒介物、分散或混悬助剂、表面活性剂、等张剂、增稠或乳化剂、防腐剂、固体粘合剂、润滑剂等,只要适用于所期望的特定剂型。Remington's Pharmaceutical Sciences,第16版, E.W.Martin (Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1980) 公开了用于配制药用组合物的各种载体和用于制备其的已知技术。除非任何常规载体介质与本文所述的化合物不相容,如通过产生任何不希望的生物学作业或其他方面以劣化方式与该药用组合物的任何其他组分相互作用,其使用被考虑为在本发明的范围内。

[0047] 可用作药用载体的材料的一些实例包括但不限于离子交换剂、氧化铝、硬脂酸铝、卵磷脂、血清蛋白(如人血清蛋白),缓冲物质(如twin80,磷酸盐,甘氨酸,山梨酸,或山梨酸钾),饱和植物脂肪酸的部分甘油酯混合物,水,盐或电解质(如鱼精蛋白硫酸盐,磷酸氢二钠,磷酸氢钾,氯化钠,或锌盐),胶体二氧化硅,三硅酸镁,聚乙烯吡咯烷酮,聚丙烯酸酯,蜡,聚乙烯-聚氧丙烯-嵌段聚合物,甲基纤维素,羟丙基甲基纤维素,羊毛脂,糖类如乳糖,葡萄糖和蔗糖;淀粉类如玉米淀粉和马铃薯淀粉;纤维素及其衍生物如羧甲基纤维素钠,乙基纤维素和醋酸纤维素;西黄蓍胶粉;麦芽;明胶;滑石;赋形剂如可可脂和栓剂蜡;油类如花生油,棉籽油;葵花籽油;芝麻油;橄榄油;玉米油和大豆油;二醇;如丙二醇和聚乙二醇;酯类如油酸乙酯和月桂酸乙酯;琼脂;缓冲剂如氢氧化镁和氢氧化钠;海藻酸;无热原水;等张盐水;林格溶液(Ringer's solution);乙醇,和磷酸盐缓冲液,以及其他无毒的相容润滑剂如十二烷基硫酸钠和硬脂酸镁,以及着色剂、脱模剂、甜味剂、调味剂和芳香剂,根据配方的调节在组合物中也可以存在防腐剂和抗氧化剂。

[0048] 本文所述的组合物可以经口、肠胃外、吸入喷雾、局部、直肠、经鼻、含服、阴道或经由植入储筒施用,这取决于要治疗的感染的严重程度。如本文使用的术语“肠胃外”包括但不限于皮下、静脉内、肌肉内、眼内、滑液内、胸骨内、鞘内、肝内、病变内和颅内注射或灌注技术。具体地,所述组合物经口、腹膜内或静脉内地施用。

[0049] 本文所述的组合物的无菌注射形式可以是水性或油性混悬液。这些混悬液根据本领域已知的技术施用合适的分散剂或润湿剂以及混悬剂配制。无菌注射制剂也可以是在无毒胃肠外可接受的稀释剂或溶剂中的无菌注射液或混悬液,例如作为在1,3-丁二醇中的溶液。在可接受的媒介物和溶剂中,可采用水、林格溶液和等张氯化钠溶液。另外,无菌的固定油常规用作溶剂或混悬介质。为此目的,可以采用任何温和的固定有,包括合成的单甘油酯或二甘油酯。脂肪酸,如油酸及其甘油酯衍生物可用于注射制剂,如天然药用油类,如橄榄油或蓖麻油,特别是为它们的聚氧乙基化形式。这些油溶液或混悬液也可以含有长链醇稀释剂或分散剂,如羧甲基纤维素或类似分散剂,其通常用于药用剂型包括乳液和混悬液的配制。其他通常使用的表面活性剂如吐温、司盘和其他乳化剂或生物利用度增强剂,其通常用于制造药用固体、液体和其他剂型,也可以用于配制的目的。

[0050] 本文所述的药物组合物可以以任何口服可接受剂型施用,包括但不限于胶囊、片剂、水性混悬剂或溶液。在用于口服使用的皮那几的情况下,通常使用的载体包括但不限于乳糖和玉米淀粉。还通常添加润滑剂,如硬脂酸镁。对于以胶囊形式的口服施用,有用的稀释剂包括乳糖和干燥玉米淀粉。当水性混悬剂需要用于口服使用时,活性成分与如何剂和混悬剂组合。如果期望,也可以添加某些甜味剂、调味剂或着色剂。

[0051] 可替换地,本文所述的药物组合物可以以用于直肠施用的栓剂形式施用。这些可

以通过混合该试剂与适当非刺激性赋形剂制备,该赋形剂在室温是固体蛋在直肠温度是液体并因此将在直肠中熔化以释放药物。这样的材料包括但不限于可可油、蜂蜡和聚乙二醇。

[0052] 本文所述的药物组合物也可以局部施用,特别是当治疗的靶标包括通过局部施加溶液访问的区域或器官,包括眼睛、皮肤或下肠道的疾病。合适局部制剂溶液制备用于这些区域或器官的每一个。

[0053] 用于下长度的局部施加可以以直肠栓剂制剂(参见上述)或以合适灌肠剂制剂实现。也可以使用局部透皮贴剂。

[0054] 对于局部施加,药物组合物可以配制在含有混悬或溶解在一种或多种载体中的活性组分的合适软膏剂中。用于本发明的化合物的局部施用的载体包括但不限于矿物油、液体矿脂、白矿脂、聚乙二醇、聚氧乙烯、聚氧丙烯化合物、乳化蜡和水。可替换地,药物组合物可以配制在含有混悬或溶解在一种或多种药用载体中的活性组分的合适洗剂或霜剂中。合适载体包括但不限于矿物油、脱水山梨醇单硬脂酸酯、聚山梨酯60、十六烷基酯蜡、棕榈油、2辛基十二烷醇、苧醇和水。

[0055] 对于眼部使用,药物组合物可以配制为在等张、pH调节无菌盐水中的微粉化混悬剂,或具体地为在等张、pH调节无菌盐水中的溶液,有或没有防腐剂如苯扎氯铵。可替换地,对于眼部使用,药物组合物可以配制在软膏剂中如矿脂。

[0056] 药物组合物也可以施用至呼吸道。呼吸道包括上气道,包括口咽和喉,后面是下气道,其包括气管,接着是分支到支气管和细支气管。肺部递送组合物可以通过患者吸入分散剂递送以使分散剂中的活性剂可以到达它例如通过肺泡区域直接进入血液循环而可以被容易吸收的肺部。肺部递送可以通过不同方式实现,包括使用雾化的、气溶胶化的、胶束和干粉末基制剂;通过吸入的施用可以经口和/或经鼻的。递送可以利用液体雾化剂、气溶胶基吸入剂、和干粉分散装置实现。优选计量剂量装置。使用喷雾器或吸入器的益处之一是污染的可能最小化,因为所述装置是自容纳的。干粉分散装置,例如递送可以容易配制为干粉的的药物。本发明的药物组合物可以作为冻干或喷雾干燥粉末本身或联合合适粉末载体稳定地储存。用于吸入的本发明的药物组合物的递送可以通过给药计时元件介导,其可以是计时器、剂量计数器、测时装置或时间指示器,当整合懂啊装置中上其在施用气溶胶药物期间对患者能够剂量跟踪、顺应性监测、和/或剂量触发。用于气溶胶递送的药物装置的实例包括计量的剂量吸入器(MDI)、干粉吸入器(DPI)和喷气雾化器。

[0057] 用于本发明方法的化合物可以配制成单位剂型。术语“单位剂型”是指适合作为用于经历治疗的受试者的单位剂量的物理上离散的单位,其中每个单位含有预定量的经计算产生期望治疗效果的活性材料,可选地结合合适药物载体。单位剂型可以是用于单个日剂量或多个日剂量之一(例如,每天约1至4或更多次)。当使用多个日剂量时,单位剂型可以对每个剂量是相同或不同的。

[0058] 本发明将通过以下附图和实施例进一步举例说明。然而,这些实施例和附图不以任何方式解释为限制本发明范围。

[0059] 附图:

[0060] 附图1:MDCK或A549细胞用增大浓度的吉西他滨(Δ)、金刚烷胺(抗病毒分子对照)($\blacksquare$)或DMSO($\blacklozenge$)处理,然后立即用H1N1(分别是MOI0.01或MOI0.1)、H3N2(MOI0.6)或H5N1(分别是MOI0.001或MOI0.01)感染。感染后24h和48h,收获上清并使用荧光测定测试神经氨

酸酶活性。给出荧光曲线,显示分子对病毒复制的作用。

[0061] 附图2:MDCK或A549细胞用增大浓度的阿特波龙(Δ),金刚烷胺(抗病毒分子对照)(■)或DMSO(◆)处理,然后立即用H1N1(分别是MOI0.01或MOI0.1),H3N2(MOI0.6)或H5N1(分别是MOI0.001或MOI0.01)感染。感染后24h和48h,收获上清并使用荧光测定测试神经氨酸酶活性。给出荧光曲线,显示分子对病毒复制的作用。

[0062] 附图3:MDCK或A549细胞用增大浓度的Obatoclax甲磺酸盐(Δ),金刚烷胺(抗病毒分子对照)(■)或DMSO(◆)处理,然后立即用H1N1(分别是MOI0.01或MOI0.1),H3N2(MOI0.6)或H5N1(分别是MOI0.001或MOI0.01)感染。感染后24h和48h,收获上清并使用荧光测定测试神经氨酸酶活性。给出荧光曲线,显示分子对病毒复制的作用。

[0063] 附图4:MDCK或A549细胞用增大浓度的长春碱(Δ),金刚烷胺(抗病毒分子对照)(■)或DMSO(◆)处理,然后立即用H1N1(分别是MOI0.01或MOI0.1),H3N2(MOI0.6)或H5N1(分别是MOI0.001或MOI0.01)感染。感染后24h和48h,收获上清并使用荧光测定测试神经氨酸酶活性。给出荧光曲线,显示分子对病毒复制的作用。

[0064] 附图5:MDCK或A549细胞用增大浓度的甲萘醌晶体(Δ),金刚烷胺(抗病毒分子对照)(■)或DMSO(◆)处理,然后立即用H1N1(分别是MOI0.01或MOI0.1),H3N2(MOI0.6)或H5N1(分别是MOI0.001或MOI0.01)感染。感染后24h和48h,收获上清并使用荧光测定测试神经氨酸酶活性。给出荧光曲线,显示分子对病毒复制的作用。

[0065] 附图6:MDCK或A549细胞用增大浓度的GSK抑制剂VIII(Δ),金刚烷胺(抗病毒分子对照)(■)或DMSO(◆)处理,然后立即用H1N1(分别是MOI0.01或MOI0.1),H3N2(MOI0.6)或H5N1(分别是MOI0.001或MOI0.01)感染。感染后24h和48h,收获上清并使用荧光测定测试神经氨酸酶活性。给出荧光曲线,显示分子对病毒复制的作用。

[0066] 附图7:MDCK或A549细胞用增大浓度的GSK抑制剂XV(Δ),金刚烷胺(抗病毒分子对照)(■)或DMSO(◆)处理,然后立即用H1N1(分别是MOI0.01或MOI0.1),H3N2(MOI0.6)或H5N1(分别是MOI0.001或MOI0.01)感染。感染后24h和48h,收获上清并使用荧光测定测试神经氨酸酶活性。给出荧光曲线,显示分子对病毒复制的作用。

[0067] 附图8:MDCK或A549细胞用增大浓度的多西他赛(Δ),金刚烷胺(抗病毒分子对照)(■)或DMSO(◆)处理,然后立即用H1N1(分别是MOI0.01或MOI0.1),H3N2(MOI0.6)或H5N1(分别是MOI0.001或MOI0.01)感染。感染后24h和48h,收获上清并使用荧光测定测试神经氨酸酶活性。给出荧光曲线,显示分子对病毒复制的作用。

[0068] 附图9:MDCK或A549细胞用增大浓度的靛玉红-3'-一肟(Δ),金刚烷胺(抗病毒分子对照)(■)或DMSO(◆)处理,然后立即用H1N1(分别是MOI0.01或MOI0.1),H3N2(MOI0.6)或H5N1(分别是MOI0.001或MOI0.01)感染。感染后24h和48h,收获上清并使用荧光测定测试神经氨酸酶活性。给出荧光曲线,显示分子对病毒复制的作用。

[0069] 附图10:MDCK或A549细胞用增大浓度的醋酸氟轻松(Δ),金刚烷胺(抗病毒分子对照)(■)或DMSO(◆)处理,然后立即用H1N1(分别是MOI0.01或MOI0.1),H3N2(MOI0.6)或H5N1(分别是MOI0.001或MOI0.01)感染。感染后24h和48h,收获上清并使用荧光测定测试神经氨酸酶活性。给出荧光曲线,显示分子对病毒复制的作用。

[0070] 附图11:MDCK或A549细胞用增大浓度的L-谷胱甘肽还原型(Δ),金刚烷胺(抗病毒分子对照)(■)或DMSO(◆)处理,然后立即用H1N1(分别是MOI0.01或MOI0.1),H3N2

(MOI0.6)或H5N1(分别是MOI0.001或MOI0.01)感染。感染后24h和48h,收获上清并使用荧光测定测试神经氨酸酶活性。给出荧光曲线,显示分子对病毒复制的作用。

[0071] 附图12:MDCK或A549细胞用增大浓度的替罗非班(Δ),金刚烷胺(抗病毒分子对照)($\blacksquare$)或DMSO($\blacklozenge$)处理,然后立即用H1N1(分别是MOI0.01或MOI0.1),H3N2(MOI0.6)或H5N1(分别是MOI0.001或MOI0.01)感染。感染后24h和48h,收获上清并使用荧光测定测试神经氨酸酶活性。给出荧光曲线,显示分子对病毒复制的作用。

[0072] 附图13:MDCK或A549细胞用增大浓度的HA-14(Δ),金刚烷胺(抗病毒分子对照)($\blacksquare$)或DMSO($\blacklozenge$)处理,然后立即用H1N1(分别是MOI0.01或MOI0.1),H3N2(MOI0.6)或H5N1(分别是MOI0.001或MOI0.01)感染。感染后24h和48h,收获上清并使用荧光测定测试神经氨酸酶活性。给出荧光曲线,

[0073] 显示分子对病毒复制的作用。

[0074] 附图14:MDCK或A549细胞用增大浓度的盐酸拓扑替康(Δ),金刚烷胺(抗病毒分子对照)($\blacksquare$)或DMSO($\blacklozenge$)处理,然后立即用H1N1(分别是MOI0.01或MOI0.1),H3N2(MOI0.6)或H5N1(分别是MOI0.001或MOI0.01)感染。感染后24h和48h,收获上清并使用荧光测定测试神经氨酸酶活性。给出荧光曲线,显示分子对病毒复制的作用。

[0075] 附图15:MDCK或A549细胞用增大浓度的氯法拉滨(Δ),金刚烷胺(抗病毒分子对照)($\blacksquare$)或DMSO($\blacklozenge$)处理,然后立即用H1N1(分别是MOI0.01或MOI0.1),H3N2(MOI0.6)或H5N1(分别是MOI0.001或MOI0.01)感染。感染后24h和48h,收获上清并使用荧光测定测试神经氨酸酶活性。给出荧光曲线,显示分子对病毒复制的作用。

实施例:

[0076] 材料和方法

[0077] 细胞和病毒

[0078] A549人肺表皮细胞系和Madin-Darby犬肾细胞(ECACC,)在补充有100U.ml青霉素/链霉素(GibCo,15140130)和10%胎牛血清(PAN,3302-P221126)的DMEM培养基(GibCo,41966052)中在37℃和5%CO₂下生长。

[0079] 传染性A/H1N1/New Caledonia/P10,A/H3N2/Wyoming和A/H5N1/Vietnam菌株在没有FCS的补充有1 μ g.ml⁻¹改良的胰蛋白酶TPCK(Sigma,T3053)的DMEM中的MDCK细胞中繁殖。病毒原液使用琼脂覆盖介质在MDXCK细胞上通过标准菌斑测定滴定。

[0080] 分子

[0081] 所有的分子以20mM原液浓度溶解在DMSO中。

[0082] 病毒感染

[0083] 细胞(MDCK或A549)用D-PBS1X(GibCo,14190)洗涤两次。分子以指定浓度添加。MDCK和A549细胞然后用H1N1(分别是MOI0.01和0.1),用H3N2(MOI0.6)或用H5N1(分别是MOI0.001和0.01)在补充有0.2 μ g.ml⁻¹胰蛋白酶TPCK的DMEM(感染介质)中感染并在37℃和5%CO₂下在感染介质中温育24h或48h。

[0084] 通过神经氨酸酶活性测量的效价

[0085] 流感病毒神经氨酸酶能够裂解甲基-伞形酮-N-乙酰基神经氨酸(4-MUNANA,Sigma M8639),以剂量依赖性方式改变其发射波长。

[0086] 在96-黑色板(Corning,3631)中,将25 μ l感染上清稀释在含有钙和镁的25 μ l D-PBS1X(GibCo,14040)和50 μ l的20 μ M4-MUNANA中。在37℃温育1h后,添加100 μ l的甘氨酸,0.1M25%乙醇pH10.7,利用TECAN infinite M1000仪器在365nm激发波长和450nm发射波长下进行测量。

[0087] 结果

[0088] 所有结果描述在图1-15中。

[0089] 参考文献:

[0090] 在整个本申请中,各个参考文献描述了本发明所属领域的状态。这些参考文献的公开内容通过引用在此并入到本公开中。

吉西他滨

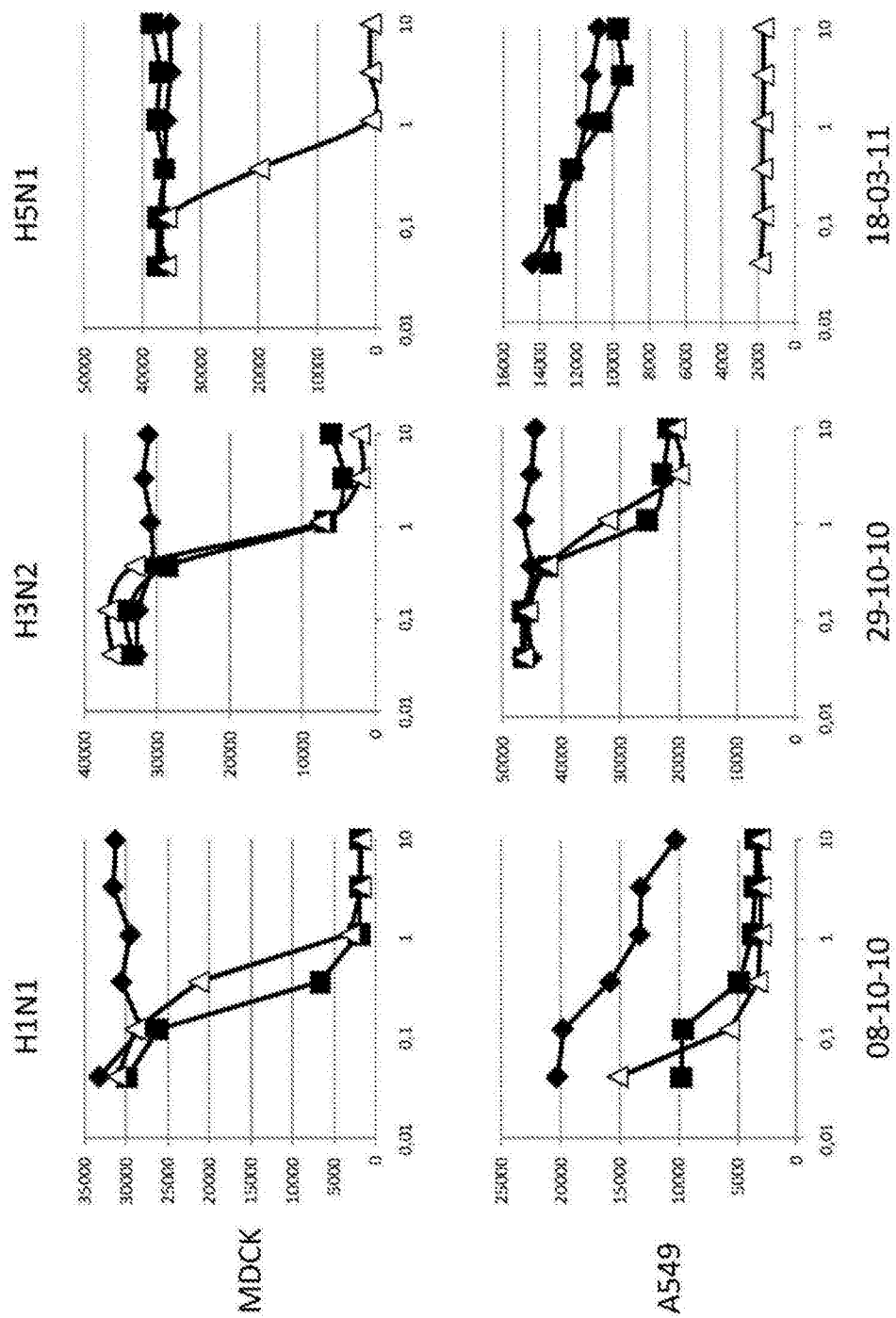


图1

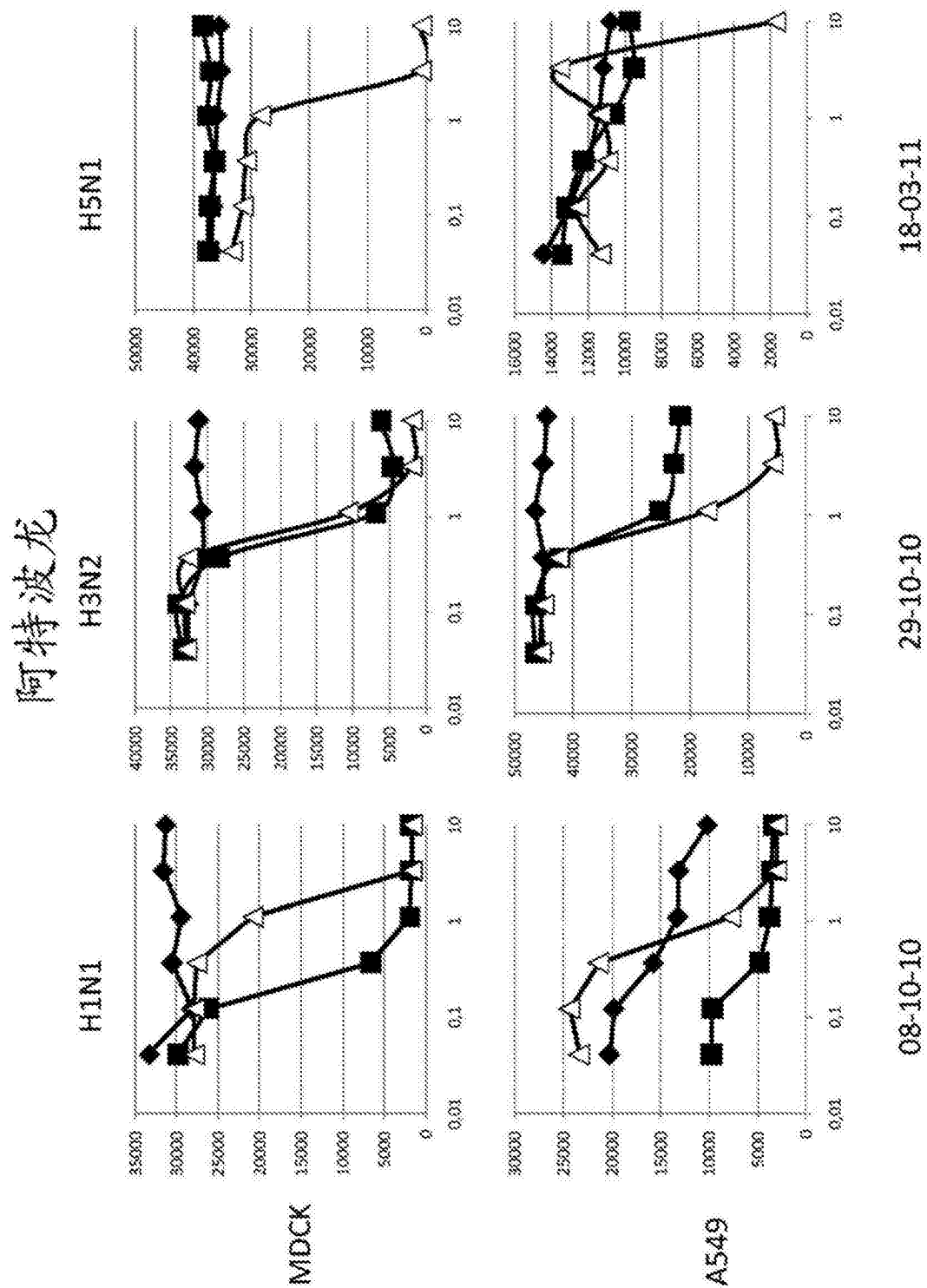


图2

Obatoclox 甲磺酸盐

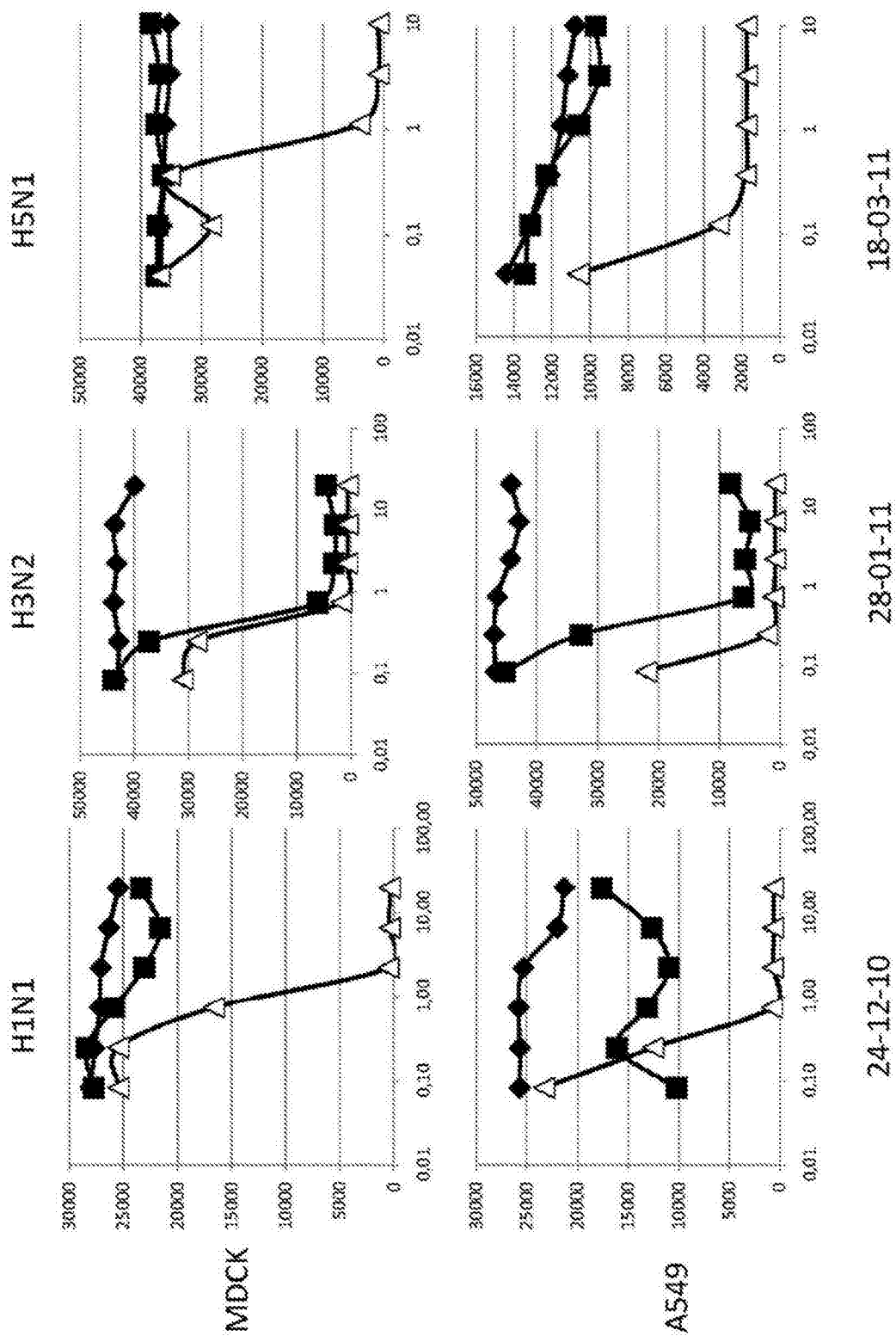


图3

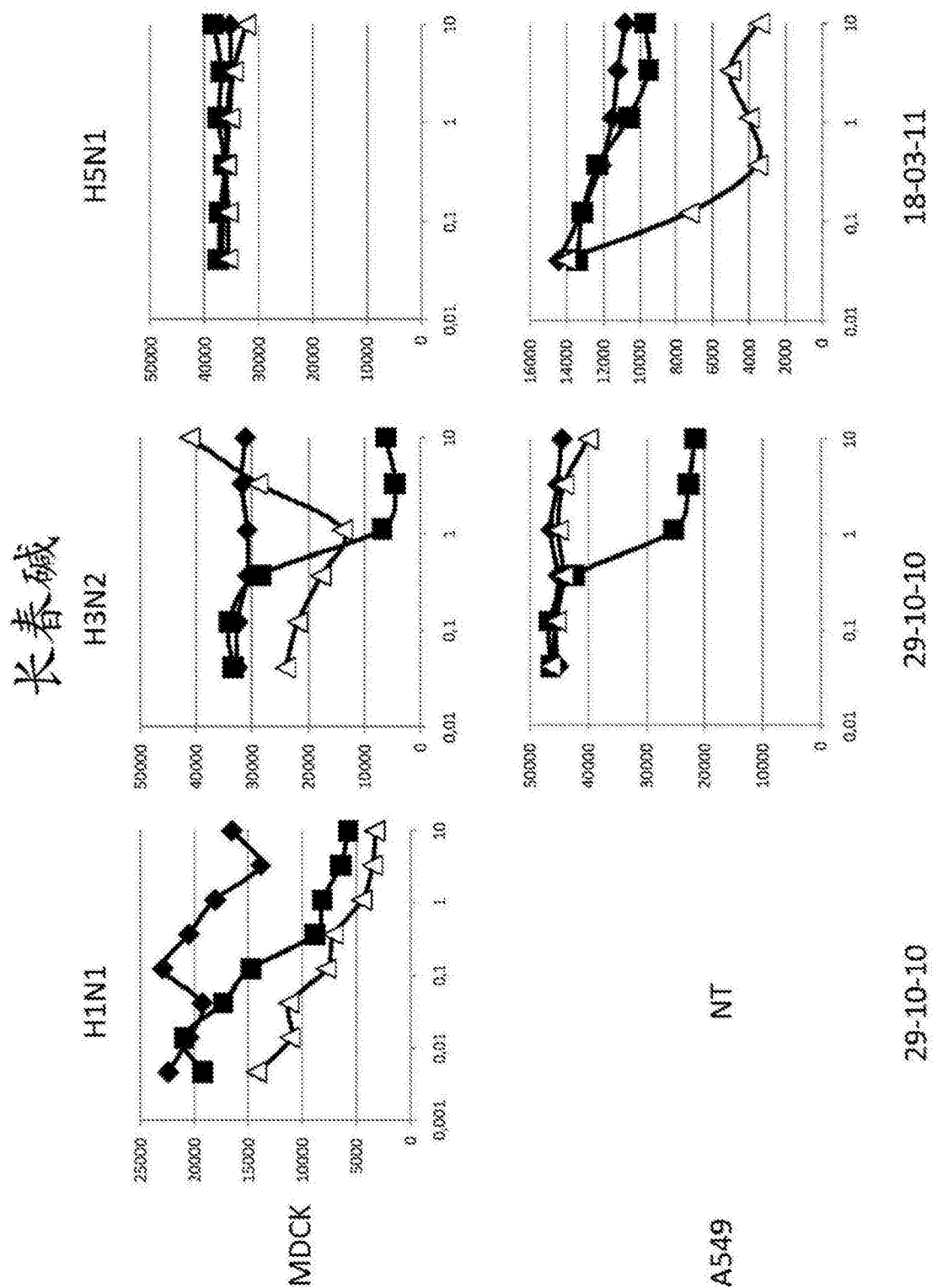


图4

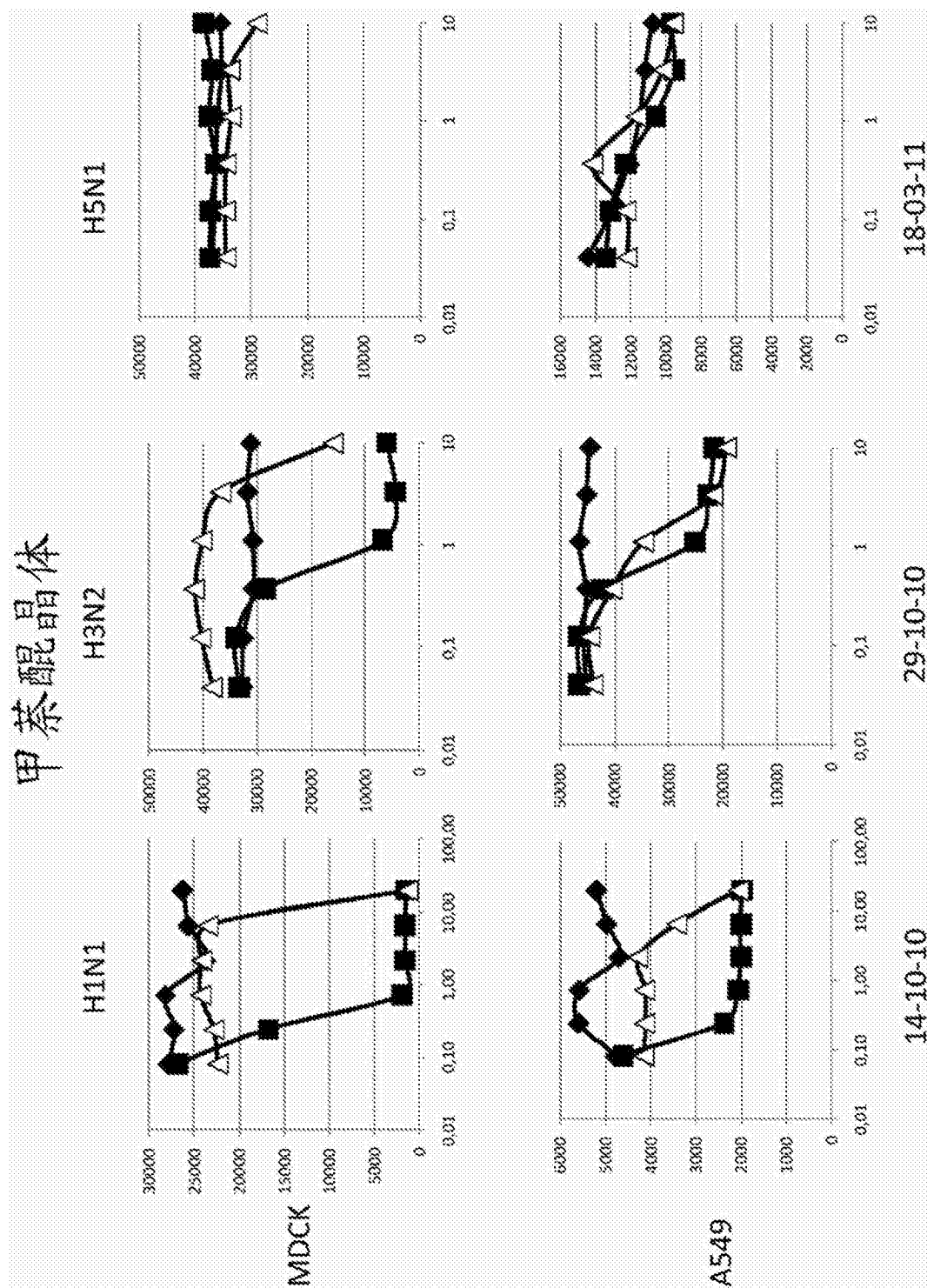


图5

GSK抑制剂VIII

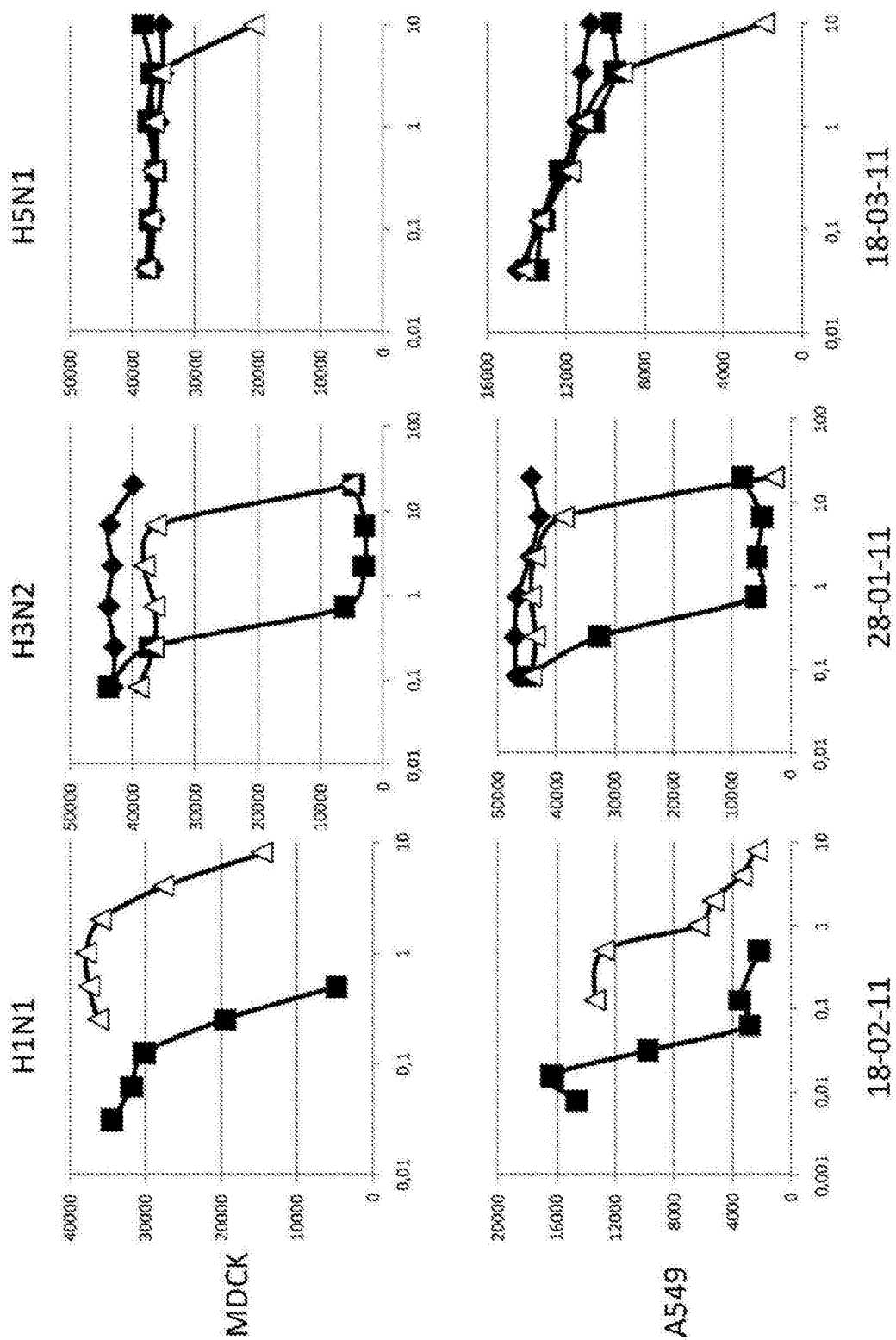


图6

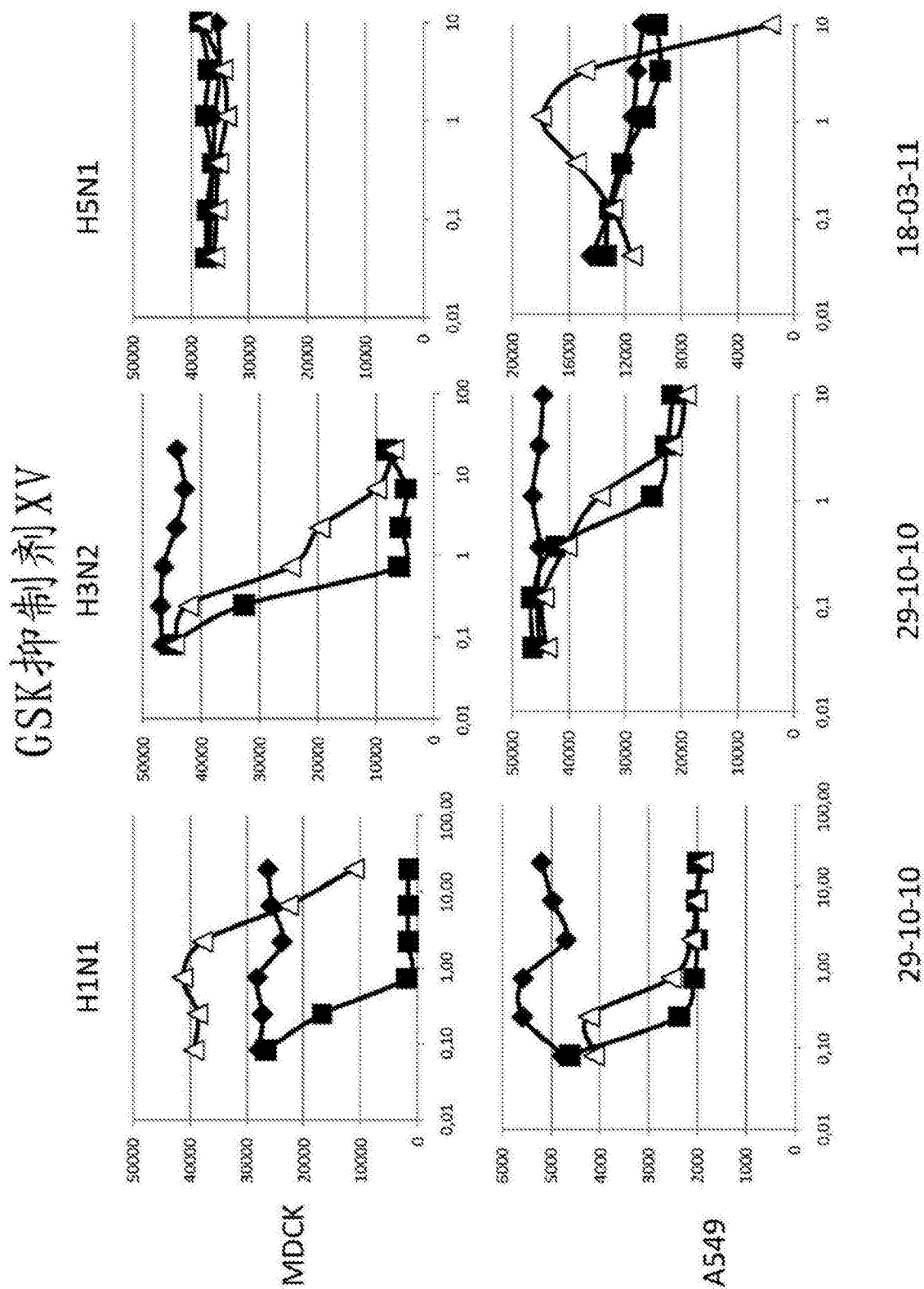


图7

多西他赛

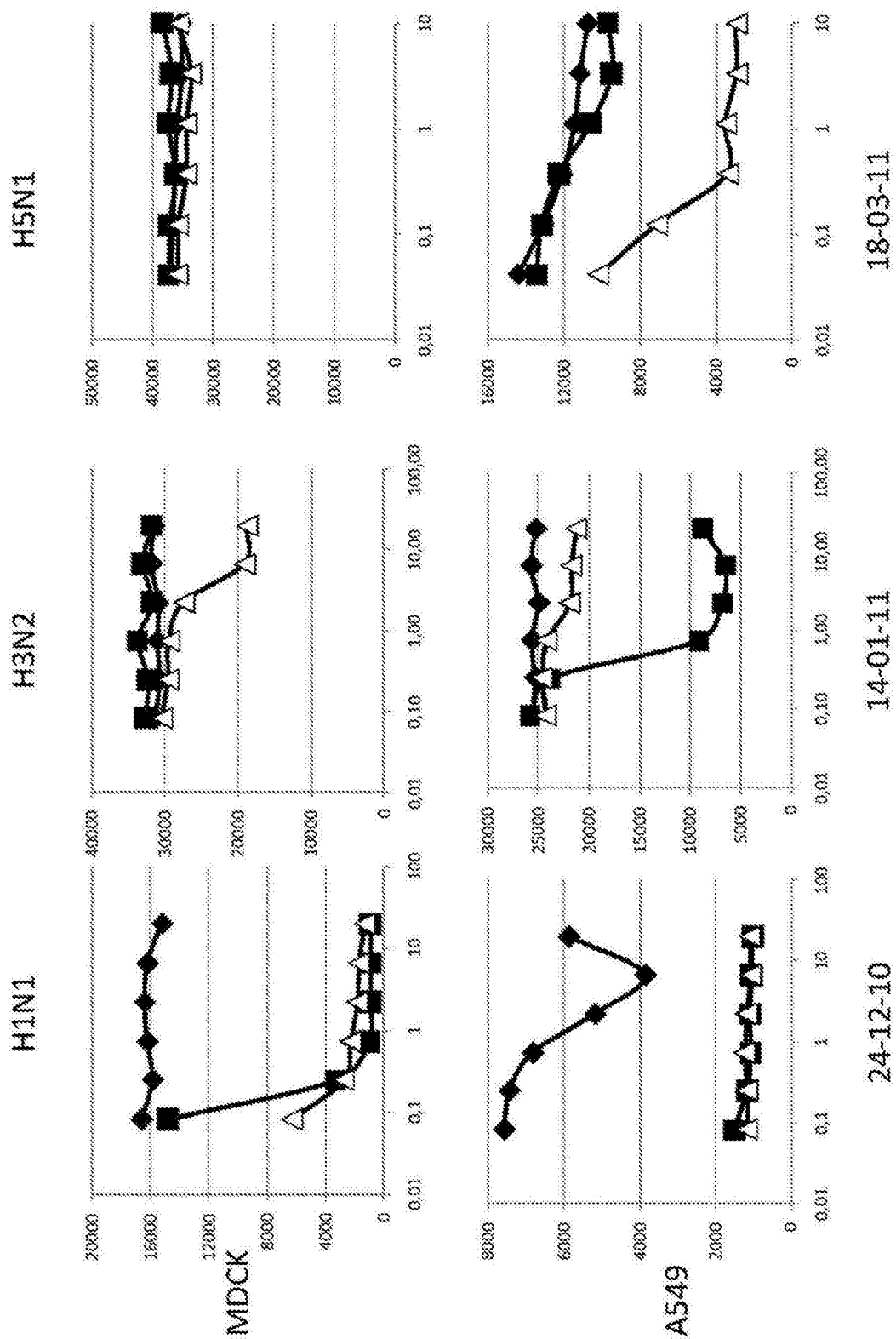


图8

靛玉红3'-一脒

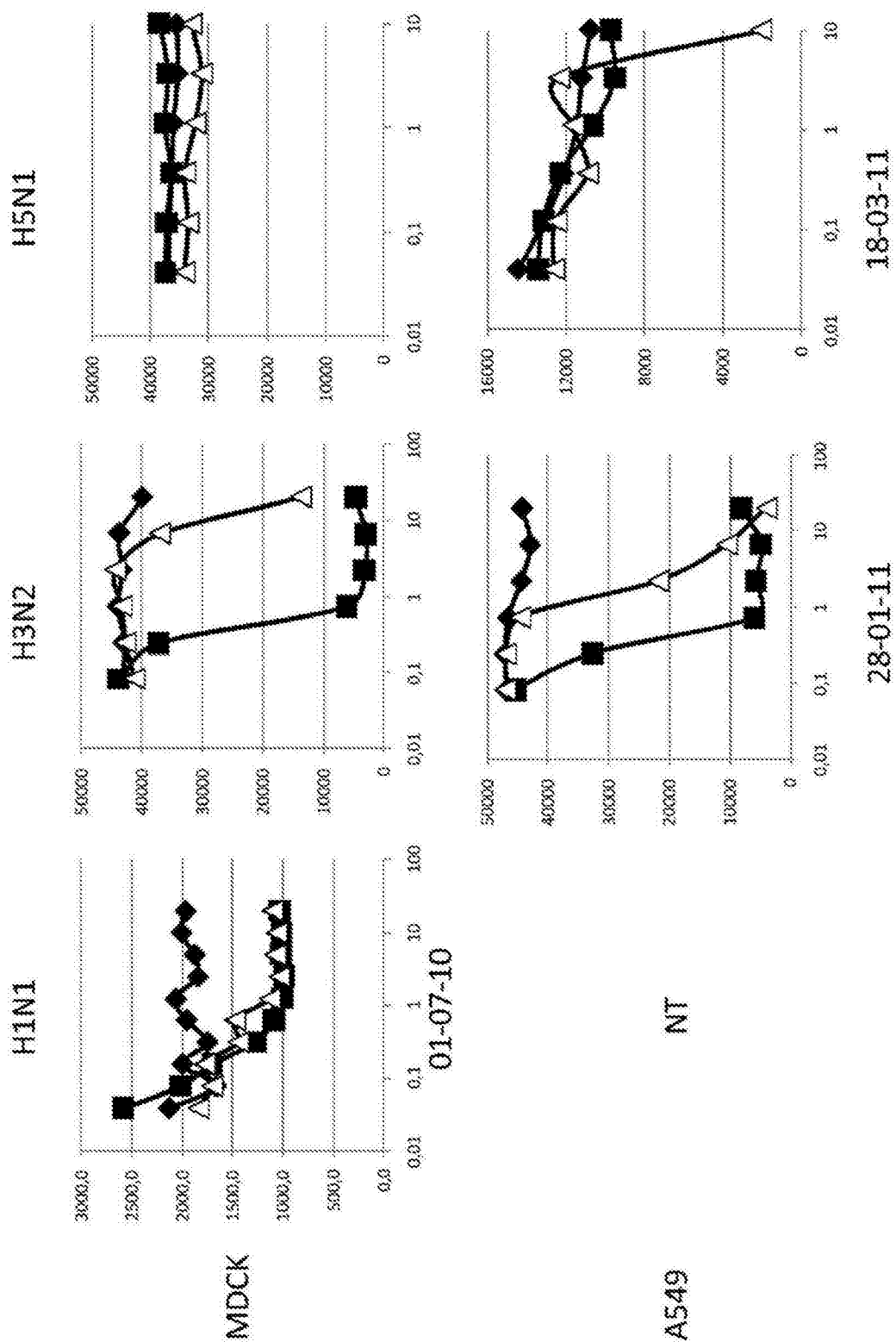


图9

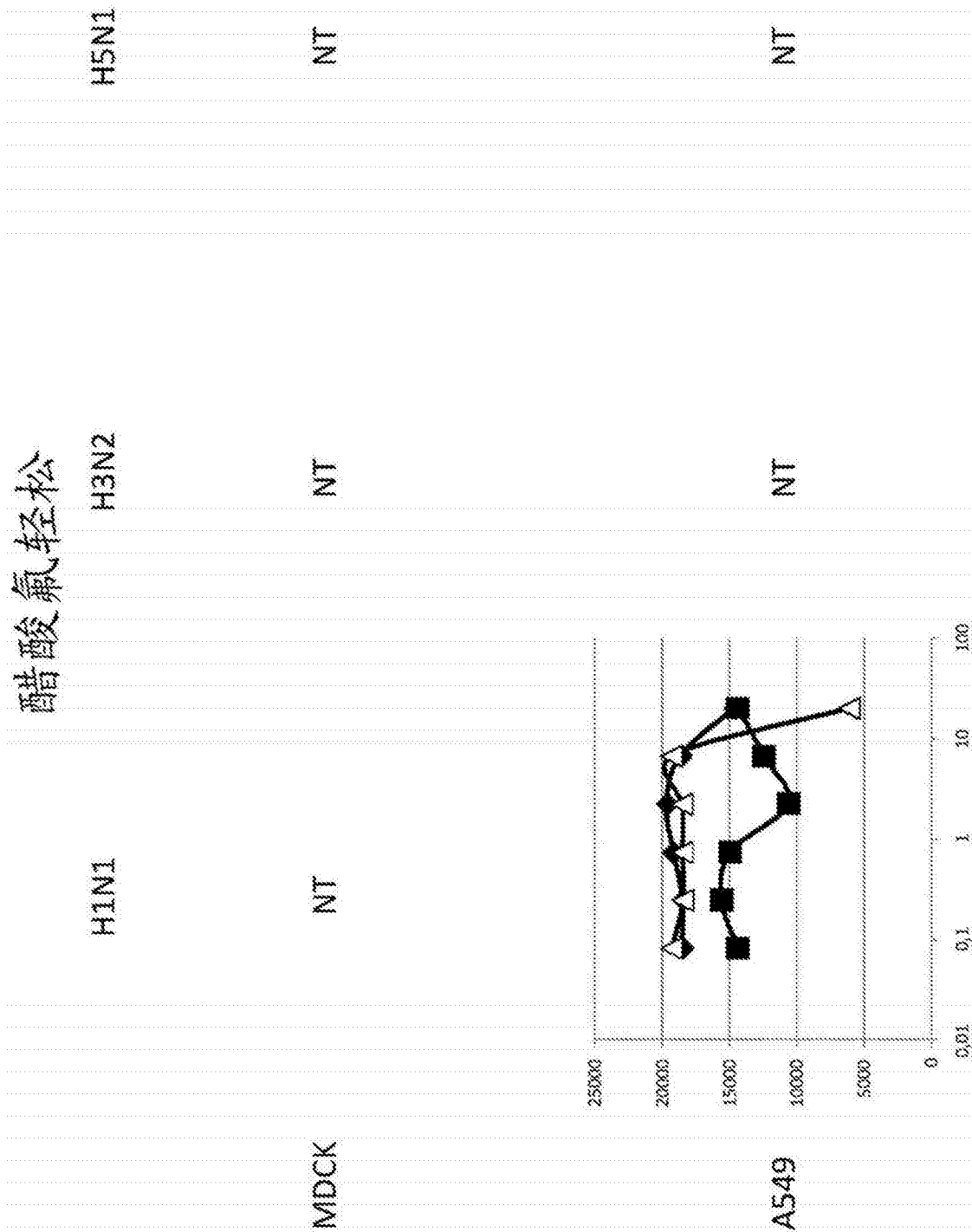


图10

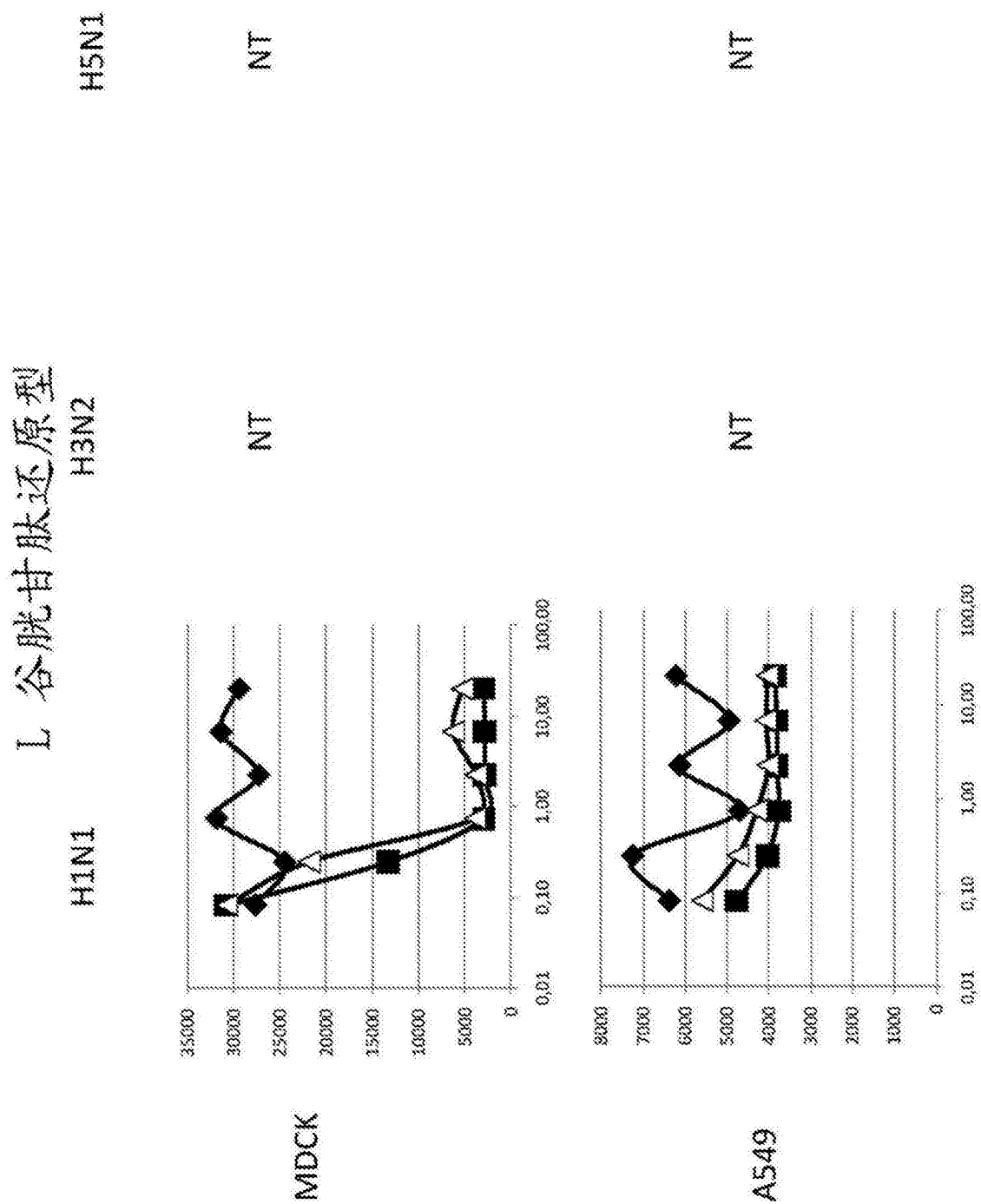


图11

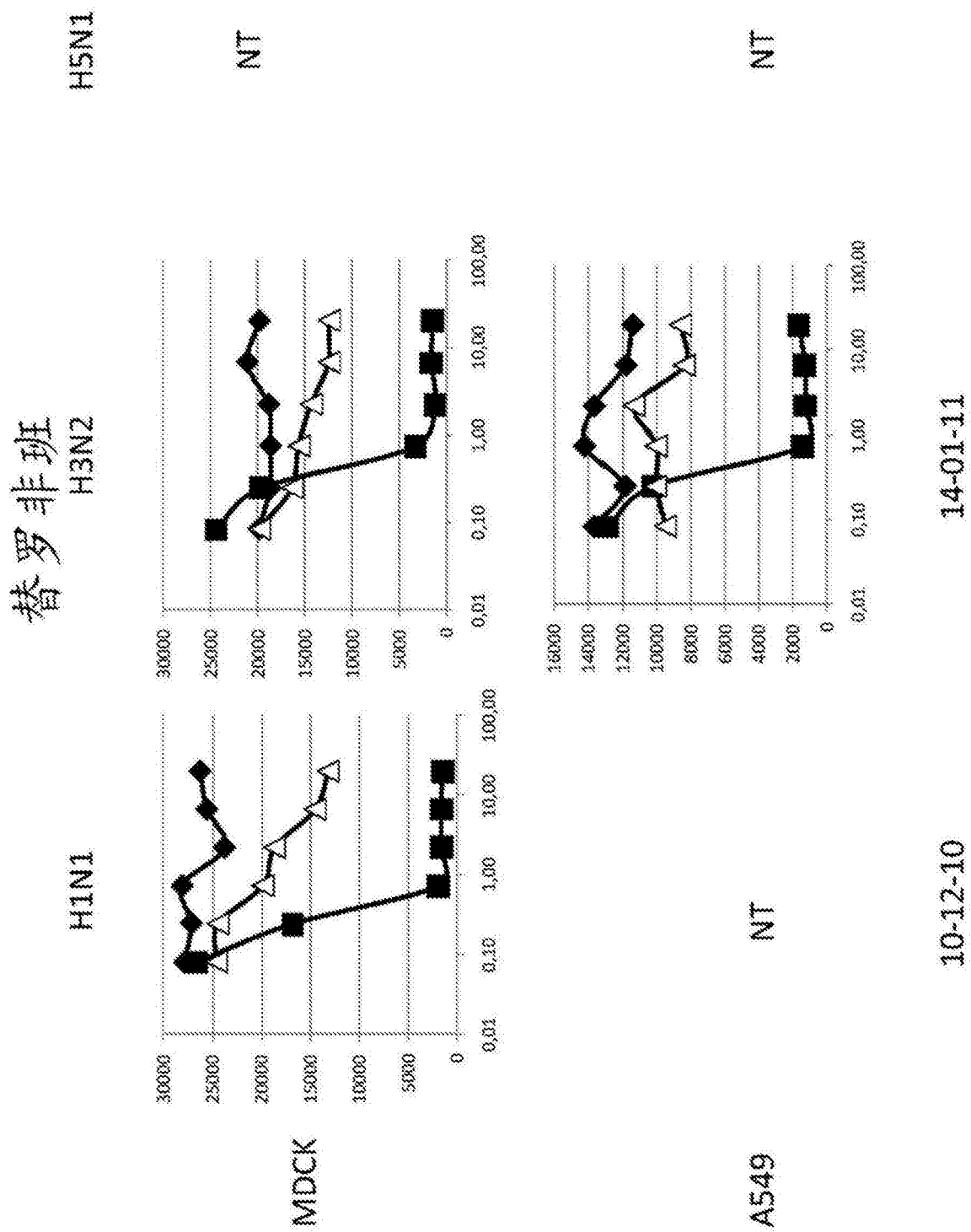


图12

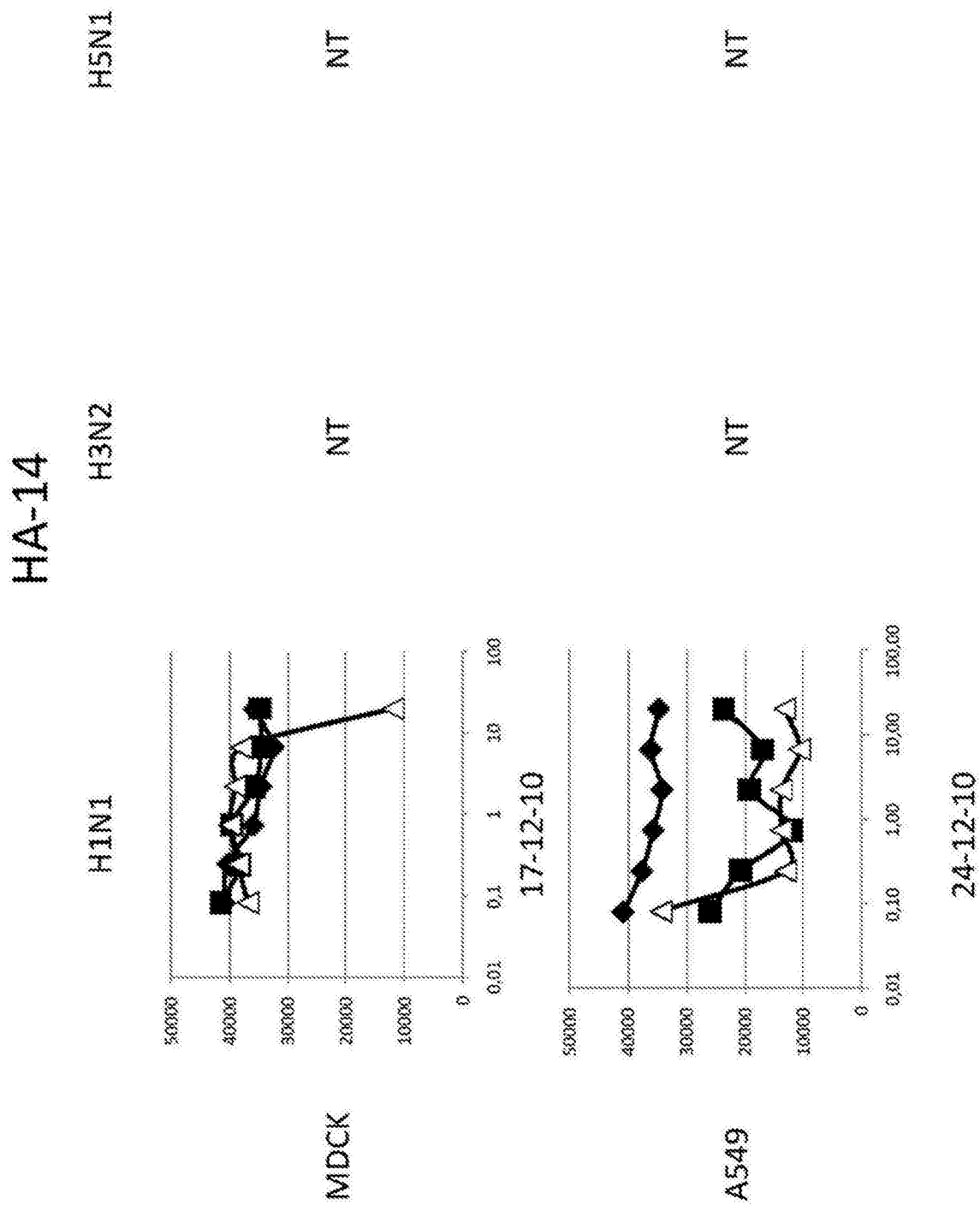


图13

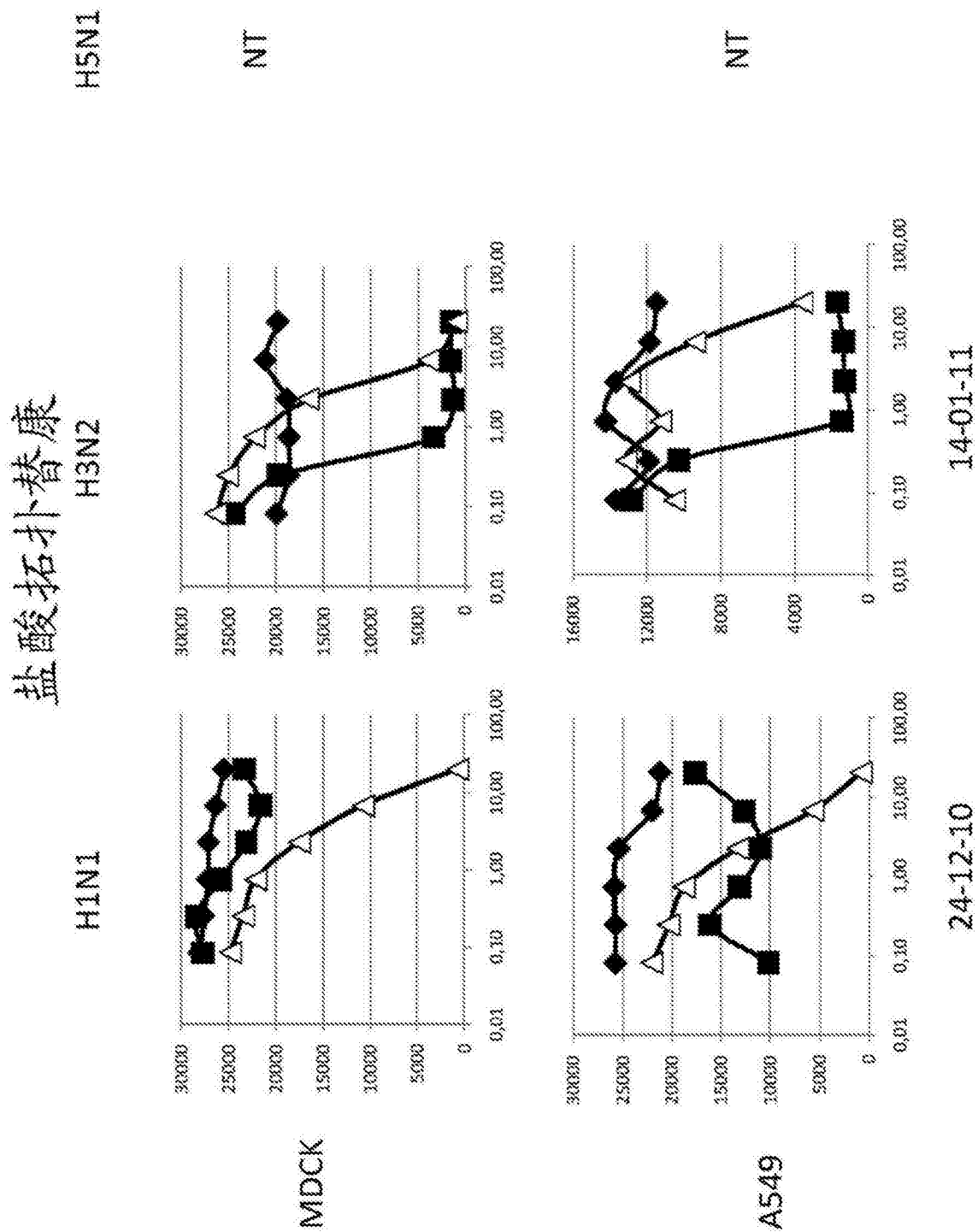


图14

氯法拉滨

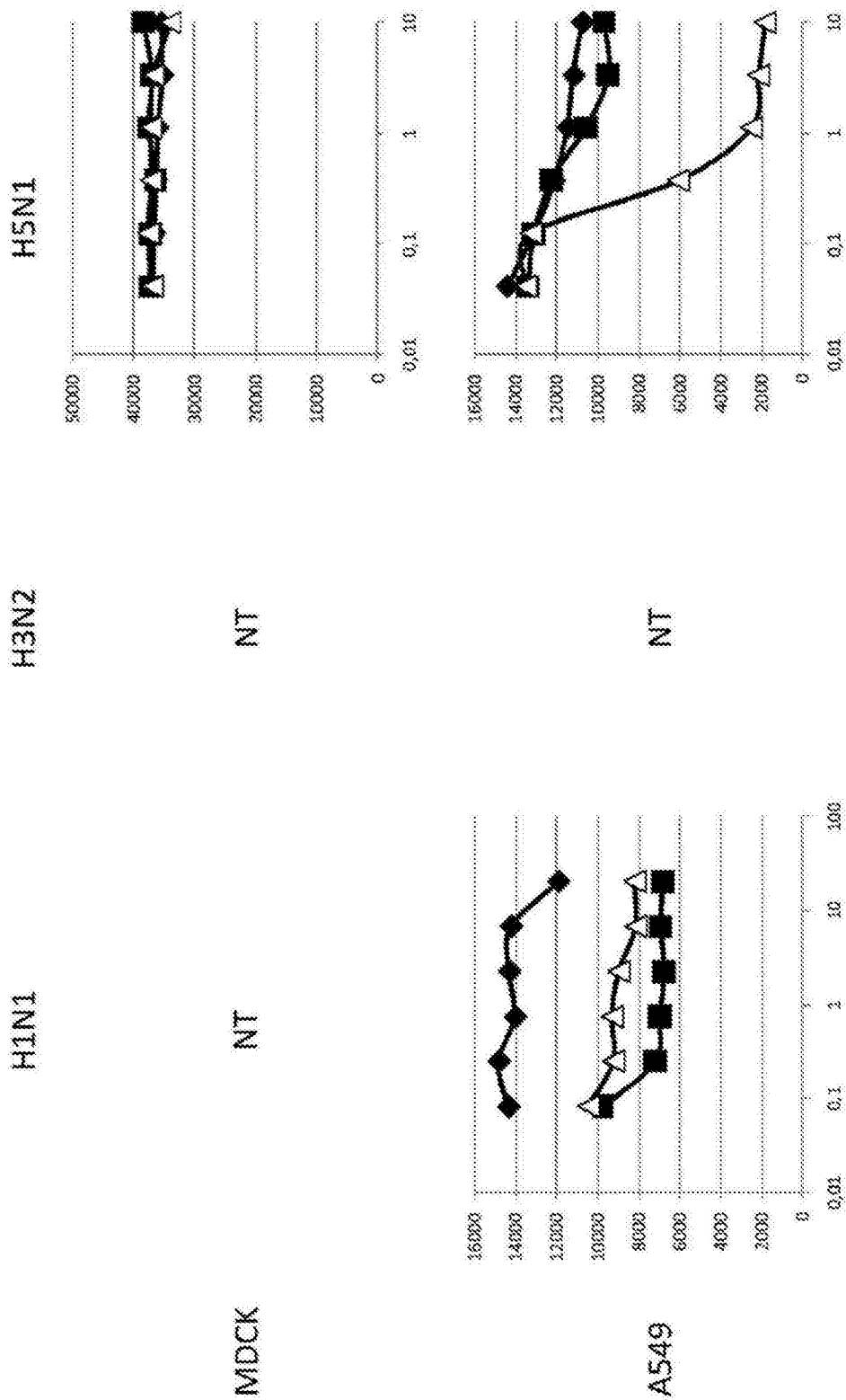


图15