(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 116367843 A
(43)申请公布日 2023.06.30

(21)申请号 202180066866.0

(22)申请日 2021.08.24

(30)优先权数据
2013221.3 2020.08.24 GB
2019097.1 2020.12.03 GB
2105404.4 2021.04.15 GB

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2023.03.29

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/GB2021/052199 2021.08.24

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2022/043678 EN 2022.03.03

(71)申请人 纳诺莫里克斯有限公司
地址 英国赫特福德郡

(72)发明人 I•乌切格布 A•沙茨林 K•彼拉斯 A•米卢斯卡 E•巴雷托杜兰

(74)专利代理机构 北京北翔知识产权代理有限公司 11285
专利代理师 淳于媛 张广育

(51)Int.Cl.
A61K 31/722(2006.01)
A61P 31/12(2006.01)

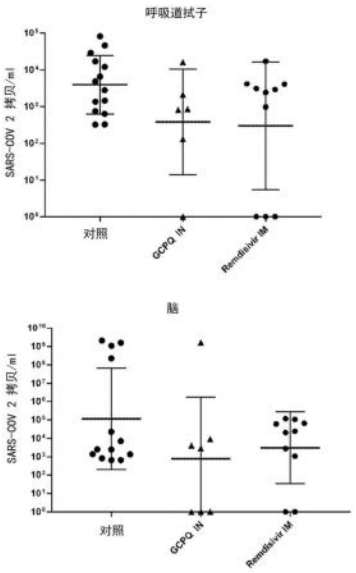
权利要求书4页 说明书15页 附图4页

(54)发明名称

病毒抑制剂

(57)摘要

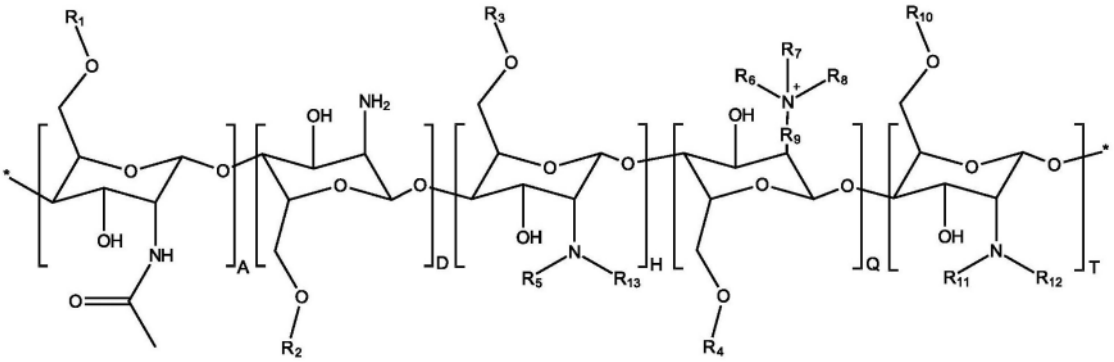
本发明涉及一种分子量小于50kDa的衍生化两亲性碳水化合物，所述化合物基于乙二醇壳聚糖，用于预防或治疗病毒感染。本发明还涉及所述化合物当与药物组合物中的其他组分一起配制时用于预防或治疗病毒感染的用途，并进一步涉及一种减少人体组织中病毒复制的方法。



CN 116367843 A

1.一种分子量小于50kDa的两亲性碳水化合物，或其盐，用于预防或治疗病毒感染，其中

所述两亲性碳水化合物由以下通式表示：



其中：

单元A的水平为0％至26摩尔％；

单元D的水平为1％至95.5摩尔％；

单元H的水平为1％至95.5摩尔％；

单元Q的水平为3％至40摩尔％；

单元T的水平为1％至94.5摩尔％；

R_1、R_2、R_3、R_4和R_{10}独立地为氢或任何直链、支链或环形式的取代的或未取代的烷基，烯基，炔基，芳基，酰基，选自葡萄糖、半乳糖、果糖和胞壁酸的糖取代基，或寡聚氧化C_1-C_3亚烷基单元，任选地被胺、酰胺或醇取代；其中，R_1、R_2、R_3、R_4和R_{10}中的至少一个不为氢；

R_5为疏水的，取代的或未取代的，直链、支链或环形式的C_{4-30}烷基、C_{4-30}烯基、C_{4-30}炔基、C_{4-30}芳基、C_{4-30}酰胺、C_{4-30}醇或C_{3-30}酰基；

R_6、R_7和R_8独立地为任何直链、支链或环形式的任何烷基、烯基、炔基、芳基或酰基；

R_9可以存在或不存在，当存在时，其为取代的或未取代的烷基、取代的或未取代的胺基或取代的或未取代的酰胺基；

R_{11}为取代的或未取代的烷基、取代的或未取代的醚基或取代的或未取代的烯基或氢；并且

R_{12}为取代的或未取代的烷基、取代的或未取代的醚基或取代的或未取代的烯基；

R_{13}为取代的或未取代的烷基、取代的或未取代的醚基或取代的或未取代的烯基或氢。

2.根据权利要求1所述的两亲性碳水化合物，其中所述病毒感染是冠状病毒感染，优选Covid-19。

3.根据权利要求1或2所述的两亲性碳水化合物，其用于通过鼻内给药治疗病毒感染。

4.根据前述权利要求中任一项所述的两亲性碳水化合物，其中单元A的范围为0.5％至20摩尔％，优选0.5％至15摩尔％，更优选0.5％至10摩尔％，甚至更优选0.5％至5摩尔％或0.5％至4摩尔％或0.5％至3摩尔％。

5.根据前述权利要求中任一项所述的两亲性碳水化合物，其中单元D的范围为2％至94.5摩尔％，优选10％至94.5摩尔％，更优选10％至90摩尔％，通常为20至80摩尔％或50％至75摩尔％，更优选55％至75摩尔％，甚至更优选65％至75摩尔％。

6.根据前述权利要求中任一项所述的两亲性碳水化合物，其中单元T的范围为2％至

94.5摩尔%，优选2%至90摩尔%，更优选5%至80摩尔%。

7.根据前述权利要求中任一项所述的两亲性碳水化合物，其中单元Q的范围为3%至30摩尔%，优选5%至30摩尔%，更优选5%至20摩尔%、5%至15摩尔%或5至10摩尔%。

8.根据前述权利要求中任一项所述的两亲性碳水化合物，其中单元H的范围为1%至20摩尔%，优选1%至10摩尔%，更优选1%至5摩尔%。

9.根据前述权利要求中任一项所述的两亲性碳水化合物，其中R_1、R_2、R_3、R_4和R_{10}均为CH_2CH_2OH。

10.根据前述权利要求中任一项所述的两亲性碳水化合物，其中R_5为C_{4-30}烷基或C_{3-30}酰基，优选具有式$CH_3(CH_2)n-CO-$，其中n为4至30。

11.根据前述权利要求中任一项所述的两亲性碳水化合物，其中R_6、R_7和R_8均为甲基。

12.根据前述权利要求中任一项所述的两亲性碳水化合物，其中R_9不存在或不为羟基丙基。

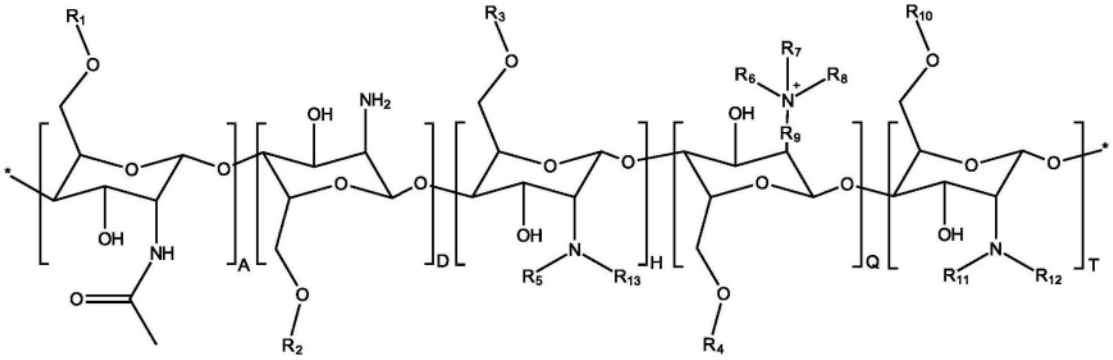
13.根据前述权利要求中任一项所述的两亲性碳水化合物，其中R_{11}为H且R_{12}为甲基，或R_{11}和R_{12}均为甲基。

14.根据前述权利要求中任一项所述的两亲性碳水化合物，其中所述碳水化合物为季铵棕榈酰基乙二醇壳聚糖(GCPQ)。

15.根据前述权利要求中任一项所述的两亲性碳水化合物，其分子量为10至30kDa。

16.根据前述权利要求中任一项所述的两亲性碳水化合物，其中所述两亲性碳水化合物是以纳米粒子的形式。

17.一种用于预防或治疗病毒感染的药物组合物，其包含一种或多种药学上可接受的赋形剂和分子量小于50kDa且由以下通式表示的两亲性碳水化合物，或其盐：



单元A的水平为0%至26摩尔%；

单元D的水平为1%至95.5摩尔%；

单元H的水平为1%至95.5摩尔%；

单元Q的水平为3%至40摩尔%；

单元T的水平为1%至94.5摩尔%；

R_1、R_2、R_3、R_4和R_{10}独立地为氢或任何直链、支链或环形式的烷基，烯基，炔基，芳基，酰基，选自葡萄糖、半乳糖、果糖和胞壁酸的糖取代基，或寡聚氧化C_1-C_3亚烷基单元，任选地被胺、酰胺或醇取代，其中，R_1、R_2、R_3、R_4和R_{10}中的至少一个不为氢；

R_5为疏水的，取代的或未取代的，直链、支链或环形式的C_{4-30}烷基、C_{4-30}烯基、C_{4-30}炔基、C_{4-30}芳基、C_{4-30}酰胺、C_{4-30}醇或C_{3-30}酰基；

R_6、R_7和R_8独立地为任何直链、支链或环形式的任何烷基、烯基、炔基、芳基或酰基；

R_9可以存在或不存在，当存在时，其为取代的或未取代的烷基、取代的或未取代的胺基或取代的或未取代的酰胺基；

R_{11}为取代的或未取代的烷基、取代的或未取代的醚基或取代的或未取代的烯基或氢；并且

R_{12}为取代的或未取代的烷基、取代的或未取代的醚基或取代的或未取代的烯基；

R_{13}为取代的或未取代的烷基、取代的或未取代的醚基或取代的或未取代的烯基或氢。

18.根据权利要求17所述的药物组合物，其中所述两亲性碳水化合物具有权利要求2至16的任一特征。

19.根据权利要求17或18所述的药物组合物，其中所述两亲性碳水化合物以低于所述组合物50w/v%的浓度存在。

20.根据权利要求17-19中任一项所述的药物组合物，其基本上仅由两亲性碳水化合物和一种或多种药学上可接受的赋形剂组成。

21.根据权利要求17-19中任一项所述的药物组合物，其中所述两亲性碳水化合物是以纳米粒子的形式，所述药物组合物是以纳米分散体的形式。

22.根据权利要求17-19中任一项所述的药物组合物，其进一步包含一种或多种其他活性剂。

23.根据权利要求1-16中任一项所述的两亲性碳水化合物或根据权利要求17-22中任一项所述的药物组合物，其用于制备用于预防或治疗病毒感染的药物。

24.一种预防或治疗病毒感染的方法，其中将根据权利要求1-16中任一项所述的两亲性碳水化合物或根据权利要求17-22中任一项所述的药物组合物给药至哺乳动物，优选鼻内给药。

25.根据权利要求24所述的方法，其中所述哺乳动物为人类。

26.根据权利要求24或25所述的预防或治疗病毒感染的方法，其中所述两亲性碳水化合物是以纳米粒子的形式，所述药物组合物是以纳米分散体的形式。

27.根据权利要求25所述的方法，其中给予两亲性碳水化合物24小时后，在哺乳动物的鼻腔中发现至少13.5%的两亲性碳水化合物。

28.根据权利要求27所述的方法，其中所述哺乳动物为人类。

29.一种减少患者体内人类呼吸道上皮细胞中病毒复制的方法，其中将根据权利要求1-16中任一项的两亲性碳水化合物或根据权利要求17-22中任一项的药物组合物给药至哺乳动物，优选鼻内给药。

30.根据权利要求29所述的方法，其中所述两亲性化合物每天给药一次。

31.根据权利要求29所述的方法，其中所述两亲性化合物每天给药两次。

32.根据权利要求29所述的方法，其中所述两亲性化合物以25至200mg化合物/kg人体体重/天给药。

33.根据权利要求29所述的方法，其中给药后病毒复制的减少与给药前相比至少减少2倍。

34.根据权利要求29所述的方法，其中所述两亲性碳水化合物是以纳米粒子的形式存在，所述药物组合物是以纳米分散体的形式存在，所述药物组合物是以喷雾的形式进行鼻

内给药。

35.一种减少患者人脑中病毒复制的方法,其中将根据权利要求1-16中任一项的两亲性碳水化合物或根据权利要求17-22中任一项的药物组合物给药至哺乳动物。

36.根据权利要求35所述的方法,其中所述两亲性化合物每天给药一次。

37.根据权利要求35所述的方法,其中所述两亲性化合物每天给药两次。

38.根据权利要求35所述的方法,其中所述两亲性化合物以25至200mg化合物/kg人体体重/天给药。

39.根据权利要求35所述的方法,其中给药后病毒复制的减少与给药前相比至少减少2倍。

病毒抑制剂

技术领域

[0001] 本发明涉及两亲性碳水化合物及其作为抗病毒药物的用途。

背景技术

[0002] 目前还没有药物治疗方法来治愈各种病毒感染,如持续造成流行病和大流行病的涉及埃博拉(Ebola)病毒、冠状病毒或流感病毒和致命的呼吸道病毒的感染(Li,Q.等人Early Transmission Dynamics in Wuhan,China,of Novel Coronavirus-Infected Pneumonia.N Engl J Med 382,1199-1207,doi:10.1056/NEJMoa2001316(2020))。例如,COVID-19的全部临床谱系从不严重的、自限性的呼吸道疾病到严重的进行性病毒性肺炎、多器官衰竭和死亡,而季节性流感每年在全球造成约389,000人死亡(Li,Q.等人Early Transmission Dynamics in Wuhan,China,of Novel Coronavirus-Infected Pneumonia.N Engl J Med 382,1199-1207,doi:10.1056/NEJMoa2001316(2020)和Paget,J.等人Global mortality associated with seasonal influenza epidemics:New burden estimates and predictors from the GLaMOR Project.J Glob Health 9,020421-020421,doi:10.7189/jogh.09.020421(2019))。

[0003] 病毒与呼吸道上皮细胞表面受体的结合是感染宿主细胞的关键步骤,COVID-19病原体(infectious agent)(SARS-CoV-2)通过病毒刺突(spike)蛋白S1受体结合域(RBD)与血管紧张素转换酶-2(ACE-2)受体相互作用进入细胞(Tai,W.等人Characterization of the receptor-binding domain(RBD)of 2019novel coronavirus:implication for development of RBD protein as a viral attachment inhibitor and vaccine.Cellular&Molecular Immunology,doi:10.1038/s41423-020-0400-4(2020)和Yan,R.等人Structural basis for the recognition of the SARS-CoV-2by full-length human ACE2.Science,doi:10.1126/science.abb2762(2020)以及Wrapp,D.等人Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation.Science367,1260-1263,doi:10.1126/science.abb2507(2020))。

[0004] ACE-2受体在鼻腔上皮细胞中高度表达(Sungnak,W.等人SARS-CoV-2entry factors are highly expressed in nasal epithelial cells together with innate immune genes.Nat.Med.,doi:10.1038/s41591-020-0868-6(2020)),使得抑制病毒进入鼻腔上皮细胞的鼻腔喷雾剂成为用于控制流行病和大流行病的有吸引力的预防措施。病毒受体的结合和内化是通过刺突蛋白S1结合域与ACE-2受体的初始结合发生的,随后发生构象变化,导致病毒颗粒与上皮细胞的膜融合,最终使病毒进入。

[0005] 硫酸化糖聚合物等聚合物已被证明可以抑制人乳头瘤病毒(human papillomavirus)与细胞表面受体的病毒性结合(Soria-Martinez,L.等人Prophylactic Antiviral Activity of Sulfated Glycomimetic Oligomers and Polymers.Journal of the American Chemical Society 142,5252-5265,doi:10.1021/jacs.9b13484(2020))。已发现硫酸化壳聚糖化合物(如N-羧甲基壳聚糖-N,O-硫酸盐)可以抑制病毒特异性蛋白的

合成和HIV-1在培养的T细胞中的复制,以及Rausher小鼠白血病病毒在培养的小鼠成纤维细胞中的复制(Chirkov,S.N.[The antiviral activity of chitosan(review)].Prikl Biokhim Mikrobiol 38,5-13(2002))。此外,已报道6-脱氧-6-溴-N-邻苯二甲酰化壳聚糖(He,X.等人The improved antiviral activities of amino-modified chitosan derivatives on Newcastle virus.Drug and Chemical Toxicology,1-6,doi:10.1080/01480545.2019.1620264(2019)),以及壳聚糖本身(Zheng,M.等人Intranasal Administration of Chitosan Against Influenza A(H7N9)Virus Infection in a Mouse Model.Scientific Reports 6,28729,doi:10.1038/srep28729(2016))通过各种机制后具有抗病毒活性。

[0006] 众所周知,由于涉及病毒细胞裂解和DNA结合的机制,季铵化合物(QAC)具有杀病毒作用(Gerba,C.P.Quaternary ammonium biocides:efficacy in application.Appl Environ Microbiol 81,464-469,doi:10.1128/AEM.02633-14(2015))。然而,WO2013/172725公开了N-(2-羟基丙基)-3-三甲基氯化铵壳聚糖(HTCC),其中壳聚糖QAC的分子量为50-190kDa(基于粘度计),并且季铵基的水平为57%至77%,所述HTCC通过涉及抑制病毒进入细胞的机制,在体外抑制冠状病毒感染(例如HCOV-NL63)(Milewska,A.等人HTCC:Broad Range Inhibitor of Coronavirus Entry.PLoS One 11,e0156552,doi:10.1371/journal.pone.0156552(2016)和默克壳聚糖-低分子量(Sigma Aldrich.Chitosan-Low Molecular Weight)(产品编号448869).https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/448869?lang=en&re gion=GB&gclid=EAIaIQobChMI8J7GkdG76gIVEO7tCh3YZgTwEAAYAi AAEgKVKPD_BwE(2020年7月7日起可访问))和Milewska,A.等人.Novel polymeric inhibitors of HCoV-NL63.Antiviral Res 97,112-121,doi:10.1016/j.antiviral.2012.11.006(2013)以及Ciejka,J.,Wolski,K.,Nowakowska,M.,Pyrc,K.& Szczubialka,K.Biopolymeric nano/microspheres for selective and reversible adsorption of coronaviruses.Mater Sci Eng C Mater Biol Appl 76,735-742,doi:10.1016/j.msec.2017.03.047(2017))。似乎HTCC能阻止病毒与细胞表面的ACE-2受体结合,所述结合通过带正电荷的HTCC与病毒进行静电结合。这导致哺乳动物细胞中的对数减少值为-4。还有研究表明,HTCC可抑制SARS-COV-2进入细胞(Milewska,A.等人HTCC as a highly effective polymeric inhibitor ofSARS-CoV-2and MERS-CoV.bioRxiv https://doi.org/10.1101/2020.03.29.014183(2020))。所公开的HTCC具有相对高的分子量(50-190kDa)和高水平的季铵基取代(57-77摩尔%)。

[0007] HTCC上的季铵基并不是活性的唯一必要因素,因为先前在Milewska,A.等人Novel polymeric inhibitors of HCoV-NL63.Antiviral Res 97,112-121,doi:10.1016/j.antiviral.2012.11.006(2013)中已发现尽管存在季铵基,但以下化合物在抑制冠状病毒进入细胞方面没有活性:O-(2-羟基丙基)-3-三甲基氯化铵聚(乙烯醇)(HTPVA)、N-(2-羟基丙基)-3-三甲基氯化铵葡聚糖、羟丙基纤维素-接枝-聚(N-丙烯酰胺丙基-N,N,N-三甲基氯化铵)(HPC-APTMAC)、N-(3-乙基铵)聚(烯丙基胺)氯化物、用芘标记的聚(甲基丙烯酰氨丙基三甲基氯化铵)、丙烯酸百里基乙基酯(TEA)与甲基丙烯酰氨丙基三甲基氯化铵(MAPTAC)以25:75的比例的共聚物和丙烯酸百里基乙基酯(TEA)与甲基丙烯酰氨丙基三甲基氯化铵(MAPTAC)以17:83的比例的共聚物。此外,同一研究发现,没有季铵基的寡壳聚糖

(oligochitosan)在抑制冠状病毒进入细胞方面没有活性,并且HTCC在抑制一些其他病毒(如人类疱疹病毒1、甲型流感、腺病毒和肠道病毒)方面没有活性。此外,分子量为5-17kDa的壳聚糖已被证明比分子量为130kDa的壳聚糖更有效地防治烟草花叶病病毒的抗病毒剂(Davydova,V.N.等人.[Chitosan antiviral activity:dependence on structure and depolymerization method].Prikl Biokhim Mikrobiol 47,113-118(2011))。

[0008] Meinhardt等人报告的新数据("Olfactory transmucosal SARS-CoV-2invasion as a port of central nervous system entry in individuals with COVID-19.Nat Neurosci,2020)显示,SARS-COV-2的神经系统症状(三分之一以上的个体出现嗅觉和味觉丧失、头痛、疲劳、恶心和呕吐等以及意识障碍)与SARS-CoV-2通过嗅觉神经元进入脑部有关,原因是病毒存在于鼻腔中。这意指局部干预(如使用限制病毒细胞进入鼻腔的GCPQ)可能对疾病的进展和严重程度产生深远影响。

[0009] 角叉菜聚糖(阴离子硫酸化碳水化合物)已被证明可以将疾病的持续时间减少3天,将流感和普通感冒患者21天内的复发次数减少3倍,并通过防止病毒与相关细胞表面受体的相互作用,预防小鼠的甲型流感病毒感染,正如Koenighofer等人("Carrageenan nasal spray in virus confirmed common cold:individual patient data analysis of two randomized controlled trials.Multidisciplinary Resp Med 9,57,2014)和Leibbrandt等人("Iota-carrageenan is a potent inhibitor of influenza A virus infection",PLoS One 5,e14320,2010)所公开的那样。

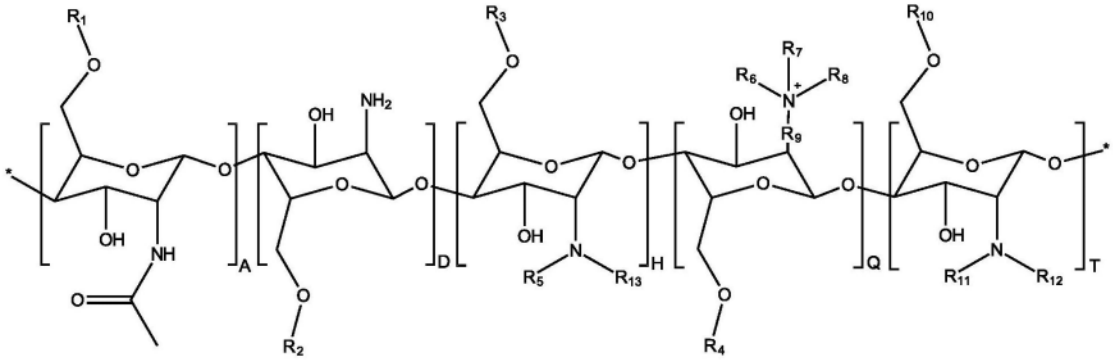
[0010] 因此,很明显,在本领域中,预测哪些聚合物可对细胞中的病毒有活性并不简单,需要考虑各种因素来生产对细胞中的病毒有活性的聚合物,例如通过抑制病毒的复制。

发明内容

[0011] 本发明的目的在于抑制病毒感染和/或限制其严重性,重点在于使用聚合物作为病毒抑制剂及其用于治疗或预防病毒感染的用途。

[0012] 根据本发明的第一方面,提供了一种分子量小于50kDa的式(I)的两亲性碳水化合物,或其盐,用于预防或治疗病毒感染:

[0013]



(I)

[0014] 其中:

[0015] 单元A的水平为0%至26摩尔%;

[0016] 单元D的水平为1%至95.5摩尔%;

[0017] 单元H的水平为1%至95.5摩尔%;

[0018] 单元Q的水平为3％至40摩尔％；

[0019] 单元T的水平为1％至94.5摩尔％；

[0020] R_1、R_2、R_3、R_4和R_{10}独立地为氢或任何直链、支链或环形式的烷基，烯基，炔基，芳基，酰基，选自葡萄糖、半乳糖、果糖和胞壁酸的糖取代基，或寡聚氧化(oligo polyoxa)C_1-C_3亚烷基单元，任选地被胺、酰胺或醇取代；其中，R_1、R_2、R_3、R_4和R_{10}中的至少一个不为氢；

[0021] R_5为疏水的，取代的或未取代的，直链、支链或环形式的C_{4-30}烷基、C_{4-30}烯基、C_{4-30}炔基、C_{4-30}芳基、C_{4-30}酰胺、C_{4-30}醇或C_{3-30}酰基；

[0022] R_6、R_7和R_8独立地为任何直链、支链或环形式的任何烷基、烯基、炔基、芳基或酰基；

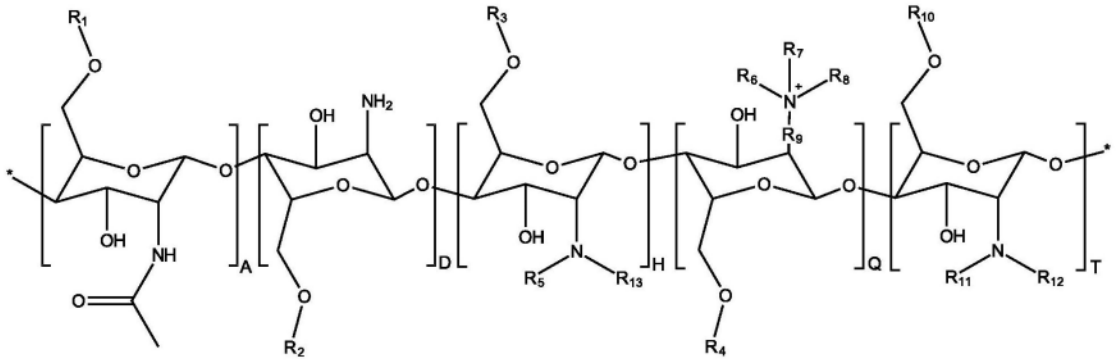
[0023] R_9可以存在或不存在，当存在时，其为取代的或未取代的烷基、取代的或未取代的胺基或取代的或未取代的酰胺基；

[0024] R_{11}为取代的或未取代的烷基、取代的或未取代的醚基或取代的或未取代的烯基或氢；并且

[0025] R_{12}为取代的或未取代的烷基、取代的或未取代的醚基或取代的或未取代的烯基；

[0026] R_{13}为取代的或未取代的烷基、取代的或未取代的醚基或取代的或未取代的烯基或氢。

[0027] 根据本发明的第二方面，提供了一种用于预防或治疗病毒感染的药物组合物，其包含一种或多种药学上可接受的赋形剂和分子量小于50kDa且由以下通式表示的两亲性碳水化合物：

[0028] 

[0029] 上式具有如本发明第一方面定义的基团。

[0030] 根据本发明的第三方面，提供了一种预防或治疗病毒感染的方法，其中将根据本发明的第一或第二方面的化合物或组合物给予患者或健康个体，以达到病毒预防的目的。

[0031] 在本发明中，发明人表明衍生化壳聚糖化合物能够有效地抑制病毒进入细胞。由于与现有技术相比结构上的差异，本领域技术人员不会想到本发明的化合物会赋予抗病毒活性。

[0032] 目前所要求保护的化合物在用于病毒抑制，特别是病毒感染的临床预防方面具有明显的优势。这些化合物具有黏附性(mucoadhesive)，化学性质至少稳定18个月，并且就GCPQ而言，其已经接受了良好实验室规范的毒理学筛选(Good Laboratory Practice toxicology screen)，未观察到的限定水平的不良反应(Siew,A.等人Enhanced oral absorption of hydrophobic and hydrophilic drugs using quaternary ammonium palmitoyl glycol chitosan nanoparticles.Molecular Pharmaceutics 9,14-28,doi:10.1021/mp200469a(2012)和Chooi,K.W.等人Physical characterisation and long-

term stability studies on quaternary ammonium palmitoyl glycol chitosan (GCPQ)--a new drug delivery polymer.J Pharm Sci 103,2296-2306,doi:10.1002/jps.24026(2014)以及Godfrey,L.等人Nanoparticulate peptide delivery exclusively to the brain produces tolerance free analgesia.J Control Release 270,135-144,doi:10.1016/j.jconrel.2017.11.041(2017))。GCPQ也能自组装成纳米粒子,并且这些纳米粒子可被聚集成用于鼻腔给药的微粒(Godfrey,L.等人Nanoparticulate peptide delivery exclusively to the brain produces tolerance free analgesia.J Control Release 270,135-144,doi:10.1016/j.jconrel.2017.11.041(2017))。这些优点意指GCPQ可以作为鼻腔喷雾剂或通过其他方式给予,用于预防和治疗特定的病毒感染。

[0033] US8470371公开了GCPQ,并规定其用于药物递送而不是作为病毒抑制剂。

附图说明

[0034] 图1:GCPQ在体外的细胞毒性。在Vero E6细胞(A)和A549/ACE2细胞(B)上使用XTT测定评估细胞存活率。细胞的相对存活率(未处理对照的百分比)示出在Y轴上。所有的测定均一式三份进行,并示出了带有标准误差的平均值。字母a至d是指表2中所示的GCPQ。

[0035] 图2:GCPQ对SARS-CoV-2的抗病毒活性。使用RT-qPCR评估了病毒的复制。数据以每毫升原始样本的RNA拷贝数(顶部)或与未处理样本相比的对数去除值(LRV)(底部)表示。测定一式三份进行,并示出了带有标准误差的平均值。

[0036] 图3:在存在或不存在GCPQ的情况下,SARS-CoV-2在完全分化的人类呼吸道上皮细胞组织培养物(HAE培养物)中的复制。使用RT-qPCR评估病毒的复制。数据以每毫升病毒的拷贝数表示。测定一式三份进行,并给出了带范围的中位值。

[0037] 图4:雄性小鼠鼻腔给药后30分钟、2小时30分钟和24小时的放射性标记的GCPQ(10mg/kg)的矢状SPECT/CT图像(a-c),可用于递送预防性GCPQ粉末的鼻腔给药装置(Naltos装置),由Alchemy Pharmatech Ltd.许可。

[0038] 图5:GCPQ在转基因小鼠中对在人细胞角蛋白18启动子下表达人ACE2蛋白的SARS-CoV-2的抗病毒活性(n＝6-14)。在施用GCPQ和Remdisivir 6天后,在每日单次剂量GCPQ(20mg/kg)、不存在GCPQ(对照)和每日单次剂量的肌肉注射Remdisivir(25mg/kg)的情况下,从呼吸道拭子和脑组织中测量活性。使用RT-qPCR对病毒的复制进行了量化。数据以每毫升原始样本中的SARS-CoV-2拷贝数表示。

具体实施方式

[0039] 本发明中使用的两亲性碳水化合物是一种壳聚糖衍生物。参照本发明的式,所有的百分比均指摩尔%。在式I中,可以理解A+D+H+Q+T将等于100%。还应理解的是,A、D、H、Q和T可以在两亲性碳水化合物中形成任何排列。因此,这种排列方式可以是完全随机的,也可以是块状共聚物的形式,如ADHQTADHQT等。

[0040] 在本发明中,A的范围为0%至26摩尔%。因此单元A可以不存在。如果单元A存在,则两亲性碳水化合物显示出一定程度的乙酰化。优选A的范围为0.5%至20摩尔%,更优选0.5%至15摩尔%,甚至更优选0.5%至10摩尔%,甚至更优选0.5%至5摩尔%或0.5至4摩尔%或0.5至3摩尔%。

[0041] 在另一个优选的实施方案中，A的范围为2至20摩尔%，优选2至15摩尔%，更优选2至10摩尔%，甚至更优选2至5摩尔%或2至4摩尔%。

[0042] 在另一个优选的实施方案中，A的范围为1至20摩尔%，优选1至15摩尔%，更优选1至10摩尔%，甚至更优选1至5摩尔%或2至5摩尔%。

[0043] 在本发明中，D的范围为1至95.5摩尔%。在本发明的一个优选实施方案中，D的范围为2%至94.5摩尔%，优选10%至94.5摩尔%，更优选10%至90摩尔%，通常为20至80摩尔%或50%至75摩尔%，更优选55%至75摩尔%，甚至更优选65%至75摩尔%。

[0044] 在本发明中，T的范围为1至94.5摩尔%。在本发明的一个优选实施方案中，T为2%至94.5摩尔%，优选2%至90摩尔%，更优选5%至80摩尔%。在另一个优选的实施方案中，T的范围为5%至70摩尔%，例如5%至60摩尔%或5%至50摩尔%。在另一个实施方案中，T的范围为10%至30摩尔%，更优选10至20摩尔%或20%至30摩尔%。

[0045] 在本发明中，季铵单元(单元Q)的含量不超过40摩尔%。因此，Q的范围为3%至40摩尔%。在本发明的一个优选实施方案中，Q的范围为3%至30摩尔%。优选地，Q的范围为5%至30摩尔%，例如5%至20摩尔%、5%至15摩尔%或5至10摩尔%，或例如5至20摩尔%、10至20摩尔%或15至20摩尔%。

[0046] 在本发明中，H的范围为1至95.5摩尔%。在本发明的一个优选实施方案中，H的范围为1%至40摩尔%、1%至30摩尔%或1%至20摩尔%，更优选1%至10摩尔%，甚至更优选1%至5摩尔%。在一些实施方案中，H的范围为0.5%至20摩尔%或1%至20摩尔%，例如，1至10摩尔%或1至5摩尔%。

[0047] 两亲性碳水化合物可以是盐的形式。例如，所述盐可以包含氯化物、碘化物、乙酸盐或葡萄糖醛酸盐。

[0048] 两亲性碳水化合物的分子量小于50kDa。优选地，两亲性碳水化合物的分子量为1-40kDa或1-30kDa，例如5-30kDa或10-30kDa。分子量优选用凝胶渗透色谱-多角度光散射法(GPC-MALLS)测量。分子量为样本中存在的所有聚合物链的平均测量值。

[0049] 所述两亲性碳水化合物能够在水性介质中自组装成纳米粒子。

[0050] R_1、R_2、R_3、R_4和R_{10}独立地为氢或任何直链、支链或环形式的烷基，烯基，炔基，芳基，酰基，选自葡萄糖、半乳糖、果糖和胞壁酸的糖取代基，或寡聚氧化C_1-C_3亚烷基单元，任选地被胺、酰胺或醇取代。优选地，这些基团独立地选自氢、取代的或未取代的烷基、取代的或未取代的醚基，或取代的或未取代的烯基。

[0051] 通常，R_1、R_2、R_3、R_4和R_{10}可为C_1-C_4直链烷基。通常，R_1、R_2、R_3、R_4和R_{10}可为C_1-C_4直链乙二醇基基团。通常，R_1、R_2、R_3、R_4和R_{10}为以下糖取代基中的任一个：葡萄糖、半乳糖、果糖和胞壁酸。R_1、R_2、R_3、R_4和R_{10}可为寡聚氧化C_1-C_3亚烷基单元，如乙二醇寡聚体。所有的R_1、R_2、R_3、R_4和R_{10}可为CH_2CH_2OH。

[0052] R_1、R_2、R_3、R_4和R_{10}也可为亲水的。

[0053] 通常，R_5为疏水的，取代的或未取代的，直链、支链或环形式的C_{4-30}烷基、C_{4-30}烯基、C_{4-30}炔基、C_{4-30}芳基、胺、C_{4-30}酰胺、C_{4-30}醇或C_{3-30}酰基。基团R_5优选选自取代的或未取代的基团，所述基团是酰基如C_{3-30}酰基，烷基如C_{4-30}烷基，烯基如C_{4-30}烯基，炔基如C_{4-30}炔基，芳基如C_{5-20}芳基，具有一个以上C_4-C_8环结构的多环疏水基团如固醇(例如胆固醇)，具有一个以上C_4-C_8杂原子环结构的多环疏水基团，多氧C_1-C_4亚烷基如多氧亚丁基聚合物，或疏水聚合

取代基如聚(乳酸)基、聚(丙交酯-共-乙交酯)基或聚(羟乙酸)基。R_5基团可为直链、支链或环基团。

[0054] R_5基团的优选实例包括由式$CH_3(CH_2)_n$-CO-或$CH_3(CH_2)_n$-或链烯酸(alkeneoic acid)$CH_3(CH_2)_p$-CH=CH-$(CH_2)_q$-CO-代表的那些基团,其中n为4至30,更优选6至20,p和q可以相同或不同并且为4至16,更优选4至14。特别优选的R_5取代基的类型经由酰胺基连接至壳聚糖单体单元(包含式中的悬垂(pendant)NH),例如由式$CH_3(CH_2)_n$CO-所表示的,其中n为2至28。酰胺基的实例可通过将羧酸与壳聚糖的胺基偶联来产生。优选的实例为脂肪酸衍生物$CH_3(CH_2)_n$COOH,例如基于癸酸(n=8)、月桂酸(n=10)、豆蔻酸(n=12)、棕榈酸(n=14)、硬脂酸(n=16)或花生酸(n=18)的那些衍生物。

[0055] R_6、R_7和R_8独立地为任何直链、支链或环形式的任何烷基、烯基、炔基、芳基或酰基。优选地,R_6、R_7和R_8独立地选自取代的或未取代的烷基,如C_{1-10}烷基。R_6、R_7和/或R_8可为直链或支链的。优选地,R_6、R_7和R_8独立地选自甲基、乙基或丙基,并且优选甲基。方便地,R_6、R_7和R_8形成为亲水性的季铵基团。亲水性基团是指被水很好地水化并在分子水平上与水缔合的基团。

[0056] R_9基团在通式中可存在或不存在。R_9可存在或不存在,并且当存在时,其为取代的或未取代的烷基、取代的或未取代的胺基或取代的或未取代的酰胺基。通常,R_9不为2-羟基丙基。当不存在时,它提供直接与壳聚糖骨架的单体单元连接的季铵官能团。当R_9基团存在时,它可为未取代的或取代的烷基(例如C_{1-10}烷基,但通常不为2-羟基丙基-CH_2-CH(OH)-CH_2-),例如用-(CH_2)n-表示,其中n优选为1至4。$R_9N^+R_6R_7R_8$取代基的一个优选实例是通过将甜菜碱(-OOC-CH_2-N^+-$(CH_3)_3$)与提供酰胺基的D单元的胺基取代基偶联来提供的,如在:-NH-CO-CH_2-$N^+R_6R_7R_8$中。

[0057] R_{11}为取代的或未取代的烷基、取代的或未取代的醚基或取代的或未取代的烯基或氢。优选地,R_{11}选自氢和取代的或未取代的烷基,例如C_{1-10}烷基。R_{11}可为直链或支链的。优选地,R_{11}选自甲基、乙基或丙基,并且优选甲基。或者,其为OH-取代的烷基,优选具有式CH_2CH_2OH。

[0058] R_{12}为取代的或未取代的烷基、取代的或未取代的醚基或取代的或未取代的烯基。优选地,R_{12}选自取代的或未取代的烷基,如C_{1-10}烷基。R_{12}可为直链或支链的。优选地,R_{12}选自甲基、乙基或丙基。或者,其为OH-取代的烷基,优选具有式CH_2CH_2OH。通常,R_{12}为C_{1-10}烷基。R_{12}可为直链或支链的。优选地,R_{12}选自甲基、乙基或丙基,并且优选甲基。

[0059] R_{13}为取代的或未取代的烷基、取代的或未取代的醚基或取代的或未取代的烯基或氢。优选地,R_{13}选自氢和取代的或未取代的烷基,例如C_{1-10}烷基。R_{13}可为直链或支链的。优选地,R_{13}选自甲基、乙基或丙基,最优选甲基。或者,其为OH-取代的烷基,优选具有式CH_2CH_2OH。最优选地,R_{13}为氢。

[0060] A+D+H+Q+T的单体单元的总数可为约5至100。A+D+H+Q+T的单体单元的总数可小于约200。

[0061] 在本发明的一个优选实施方案中,所述两亲性碳水化合物为N-棕榈酰、N-单甲基、N,N-二甲基、N,N,N-三甲基-6-O-乙二醇壳聚糖(GCPQ)的形式。众所周知,其为无定形化合物(Godfrey等人,"Nanoparticulate peptide delivery exclusively to the brain produces tolerance free analgesia",J.Control Release 2017,270,135-144)。

[0062] 如所示，本文所述的一些取代基可为未取代的或被一种或多种本领域技术人员公知的其他取代基取代。常见取代基的实例包括卤素、羟基、醚(例如C_{1-7}烷氧基)、甲酰基、酰基(例如C_{1-7}烷基酰基、C_{5-20}芳基酰基)、酰卤、羧基、酯、酰氧基、酰氨基、酰基酰氨基、硫代酰氨基、四唑基、氨基、硝基、亚硝基、叠氮基、氰基、异氰基、氰氧基、异氰氧基、氰硫基、异氰硫基、巯基、硫醚(例如C_{1-7}烷硫基)、磺酸、磺酸根、砜、磺酰氧基、亚磺酰氧基、磺氨基(sulfamino)、磺酰氨基(sulfonamino)、亚磺酰氨基(sulfinamino)、氨磺酰基(sulfamyl)、亚磺酰氨基(sulfonamido)、C_{1-7}烷基(包含例如未取代的C_{1-7}烷基、C_{1-7}卤代烷基、C_{1-7}羟基烷基、C_{1-7}羧基烷基、C_{1-7}氨基烷基、C_{5-20}芳基-C_{1-7}烷基)、C_{3-20}杂环基和C_{5-20}芳基(包含例如C_{5-20}羧基(carboaryl)、C_{5-20}杂芳基、C_{1-7}烷基-C_{5-20}芳基和C_{5-20}卤代芳基)。

[0063] 如本文所使用的，术语“环结构”指由3至10个共价连接的原子，还更优选3至8个共价连接的原子，还更优选5至6个共价连接的原子组成的闭合环。环可为脂环或芳环。如本文所使用的，术语“脂环”指不是芳环的环。

[0064] 如本文所使用的，术语“碳环”指其中所有环原子均为碳原子的环。

[0065] 如本文所使用的，术语“碳芳环”指其中所有环原子均为碳原子的芳环。

[0066] 如本文所使用的，术语“杂环”指其中至少一个环原子为多价环杂原子的环，所述杂原子例如氮、磷、硅、氧或硫，更通常为氮、氧或硫。优选地，所述杂环具有1至4个杂原子。

[0067] 以上环可为“多环基团”的一部分。

[0068] 优选地，所述两亲性碳水化合物为N-棕榈酰-N-单甲基-N,N-二甲基-N,N,N-三甲基-6-O-乙二醇壳聚糖，又称季铵棕榈酰基乙二醇壳聚糖(GCPQ)。在这种化合物中，R_6、R_7和R_8为甲基；R_1、R_2、R_3、R_4和R_{10}为$-CH_2CH_2OH$；R_9不存在；R_5为$-C(=O)-C_{15}H_{31}$并且R_{13}为氢。R_{11}和R_{12}为氢或甲基，以及两者均可不为氢。

[0069] 在这种情况下，棕榈酰化水平(对应于H组)优选为每个单体5-50％，例如，每个单体10-20％。优选地，季铵化水平(Q)为每个单体3-40％，优选每个单体10-30％。GCPQ的分子量通常为1-40kDa或1-30kDa，例如5-30kDa或10-30kDa。

[0070] 所述两亲性碳水化合物能够在不存在其他制剂，如三聚磷酸酯的水性介质中自组装成粒子。通常，所述两亲性碳水化合物会形成微粒(micelle)。

[0071] 所述两亲性碳水化合物可形成颗粒状的聚集体。前述可通过单个亲水分子的聚集形成，其平均粒径为10nm至20μm。平均粒径可以很容易地通过显微镜或使用光子相关光谱来确定，并且在过滤前的水性分散体中方便地确定。更优选地，聚合的微粒聚集体的最小平均粒径为至少10nm，更优选至少30nm，最大平均粒径优选为10μm或更小。

[0072] 在本发明中，所述两亲性碳水化合物可单独使用或与一种或多种药物一起配制。所述药物可为疏水性药物。所述两亲性碳水化合物能够在水性介质中自组装成纳米粒子。本发明的药物组合物可包含所述两亲性碳水化合物的纳米粒子的纳米分散体。

[0073] 本发明的两亲性碳水化合物对病毒感染本身是有用的。因此，它可以单独用于治疗或预防病毒感染。因此，所述两亲性碳水化合物本身即为一种活性剂。在本发明的药物组合物中，它可为唯一的活性剂/成分，即可不存在其他药物。例如，药物组合物可以基本上仅由所述两亲性碳水化合物和一种或多种药学上可接受的赋形剂组成。

[0074] 在本发明的一个实施方案中，所述两亲性碳水化合物形成可以装载药物的纳米粒子。药物通常被自组装的带正电荷的两亲性聚合物包封。可形成透明或半透明的碳水化合

物和药物的分散体。通常，所述两亲性化合物与药物混合，通过涡旋和探针超声处理混合物或通过高压均质处理混合物来制备分散体。通常，所述药物为疏水性药物。疏水性药物是指难溶于水性介质(如水)的药物。所谓难溶性药物意指一克药物需要超过10,000ml的溶剂(水)才能溶解。或者，这意指在水中的溶解度低于0.1mg·mL^{-1}的药物。

[0075] 所述疏水性药物通常被两亲性碳水化合物包封。所述疏水性药物可为镇痛药、抗生素、抗凝血药、抗抑郁药、抗癌药(anticarcinogen)、抗肿瘤药(anticarcinoma)、抗炎药、抗组胺药、止吐药(antiemetic)、抗焦虑药、抗惊厥药(anticonvulsive)、抗精神病药(antipsychotic)、退热药、抗病毒药、抗糖尿病药、镇静药(sedative)、抗高血压药或心血管药。

[0076] 所述疏水性药物可作为利尿剂或抗利尿剂、降压药(chronotrope)、肌力剂(inotrope)、减充血剂、支气管扩张药、抗胆碱药(anticholinergic)、抗血栓药(antithrombotic)、抗微生物剂或杀真菌剂。

[0077] 当有药物存在时，它可为一种抗病毒药物，它能进一步增强两亲性碳水化合物的作用。通常，所述药物对呼吸道病毒有效。

[0078] 本发明的两亲性碳水化合物作为抗病毒剂是有效的。所述病毒可例以选自冠状病毒、流感和埃博拉病毒、疱疹病毒、腺病毒和肠道病毒。例如，所述化合物可对人类疱疹病毒1或甲型流感有效。

[0079] 优选地，所述两亲性碳水化合物用于预防和/或治疗由α冠状病毒或β冠状病毒引起的感染。冠状病毒可为严重急性呼吸系统综合症冠状病毒2(SARS-CoV-2)，又称Covid-19。

[0080] 本发明的两亲性碳水化合物可通过抑制病毒进入细胞而有效。

[0081] 本发明的聚合物可用于治疗和预防以人类或动物的呼吸功能不足和受损为表现的呼吸道感染，例如治疗和预防上呼吸道感染、下呼吸道感染、儿童的格鲁布性喉头炎(croup)、胃肠道感染、神经系统感染和川崎(Kawasaki)病。

[0082] 在本发明的组合物中，如果药物与两亲性碳水化合物一起存在，优选以0.001-10w/v%的浓度存在。当浓度以w/v%表示时，这意指100mL或100g组合物中含有的固体量，以g为单位。通常，两亲性碳水化合物与药物(如果存在)的比例为1:1至50:1，更优选1:1至20:1。

[0083] 通常，两亲性碳水化合物与药物与药学上可接受的载体的比例可为约1-40mg:1mg:1g，例如1-5mg:1mg:1g。

[0084] 所述药物组合物可为以下任一种形式：片剂、栓剂、液体胶囊剂、粉末形式或适合肺部或鼻腔给药的形式。

[0085] 当片剂用于口服给药时，通常使用的载体包括蔗糖，乳糖，甘露醇，麦芽糖醇，葡聚糖，玉米淀粉，典型的润滑剂如硬脂酸镁，防腐剂如对羟基苯甲酸酯(paraben)、山梨糖(sorbin)，抗氧化剂如抗坏血酸、α-生育酚(α-tocopheral)、半胱氨酸，分解剂(disintegrator)或粘合剂。当作为胶囊剂口服给药时，有效的稀释剂包括乳糖和干玉米淀粉。用于口服用途的液体剂包括糖浆剂、悬浮液、溶液剂和乳剂，其可包含本领域使用的典型惰性稀释剂(如水)，此外，还可包含甜味剂或调味剂。栓剂可以通过将本发明的化合物与合适的无刺激性赋形剂混合来制备，如在常温下为固体但在肠内温度下变成液体并在直肠

中溶化以释放活性成分的那些赋形剂,如可可脂和聚乙二醇。

[0086] 配方中可包括的其他成分包括张力增强剂(tonicity enhancers)、防腐剂、增溶剂、无毒赋形剂、缓和剂、螯合剂、pH调节剂、共溶剂和增粘剂。

[0087] 如果需要,通常通过张力增强剂来调节张力。例如,此类制剂可例如为离子和/或非离子型的。离子型张力增强剂的实例为(但不限于)碱金属或土金属卤化物,例如,$CaCl_2$、KBr、KCl、LiCl、NaI、NaBr或NaCl、Na_2SO_4或硼酸。非离子型张力增强剂为例如尿素、甘油、山梨醇、甘露醇、丙二醇或葡萄糖。这些制剂在某些实施方案中也可作为活性剂。

[0088] 为了调节pH(优选调节至生理pH),缓冲剂可能特别有用。本发明溶液的pH应保持为5.5至8.5。挑战在于要发生离子络合,可能需要更多的酸性或碱性pH。可以添加合适的缓冲剂,例如但不限于硼酸、硼酸钠、柠檬酸钾、柠檬酸、碳酸氢钠、TRIS和各种混合的磷酸盐缓冲剂(包括Na_2HPO_4、NaH_2PO_4和KH_2PO_4的组合)及其混合物。通常,缓冲剂的使用量为约0.05至2.5重量%。

[0089] 所述药物组合物可配制为通过任何途径给药,例如口咽、口服、肠胃外、鼻腔、通过吸入、眼部局部或外用。所述药物优选是通过鼻内或口咽部给药的方式递送到人体或动物体内。所述制剂可为粉末或液体分散体。特别优选将药物组合物配制成鼻腔和口咽部喷雾剂,用于鼻内或口咽部给药。鼻腔和/或口咽部喷雾剂的给药可通过喷雾装置完成,如Naltos™鼻腔给药装置(Alchemy Pharmatech)。

[0090] 剂量可根据年龄、体重、给药时间、给药方法、药物结合、临床病况的严重性或患者接受治疗的实际病况和其他因素来确定。虽然每日剂量可根据患者的状况和体重、物种或活性成分以及给药途径而变化,但在口服使用的情况下,每日剂量可为约0.1 mg-2 g/人/天,或0.5-1000 mg/人/天或5-500 mg/人/天或10-250 mg/人/天或25-200 mg/人/天。

[0091] 本发明的目的在于抑制病毒感染和/或限制其严重性,并着重于使用聚合物作为病毒抑制剂及其用于治疗或预防病毒感染的用途。本发明的组合物可以减少病毒的复制,使治疗后测得的病毒滴度与治疗前相比至少减少2倍或3倍或4倍或5倍或10倍或100倍。本发明的组合物可以减少病毒复制,使治疗后测得的病毒滴度与治疗前相比为治疗前滴度的10-90%或10-75%或10-50%或10-25%。

[0092] 实施例

[0093] 实施例1

[0094] 材料

[0095] a.细胞系:Vero E6(ATCC:CRL-1586),ACE2过表达的A549(A549/ACE2+;在发明人实验室用ATCC CCL-185细胞系制备);

[0096] b.病毒:SARS-CoV2分离株026V-03883用于体外工作;Charité-**Universitätsmedizin** Berlin,Germany,欧洲病毒档案-全球(EuropeanVirus Archive-Global,EVAg);https://www.european-virus-archive.com;SARS-CoV-2分离株(Munchen-1.2 2020/984)用于体内工作;

[0097] c.培养基:DMEM-达尔伯克氏改良伊格尔氏培养基(Dulbecco's Modified Eagle Medium)(Thermo Fisher Scientific,Poland),所述培养基补充有2-3%的热灭活胎牛血清(FBS)(Thermo Fisher Scientific,Poland)、青霉素(100U/mL)(Thermo Fisher Scientific,Poland)和链霉素(100μg/mL)(Thermo Fisher Scientific,Poland)以及环丙

沙星(ciproflocaxin)(5μg/mL)；

[0098] d.培养物:MucilAir™人类气道上皮(HAE)培养物被用于体外分析(Epithelix Sarl,Switzerland)。所有的培养均在37℃和5％的CO_2条件下进行的;e.动物:在细胞角蛋白18启动子下表达人ACE2蛋白的转基因小鼠(Jackson laboratory,USA)；

[0099] f.XTT细胞存活率试剂盒(Biological Industries,Israel)；

[0100] g.病毒DNA/RNA分离试剂盒(A&ABiotechnology,Poland)；

[0101] h.高容量cDNA反转录试剂盒(Thermo Fisher Scientific,Poland)；

[0102] i.实时qPCR试剂盒(RT-HS-PCR混合探针,A&ABiotechnology,Poland)；

[0103] j.实时qPCR寡核苷酸列于表1中。

[0104] 所有病原体的实验都在ABSL3+设施中进行,所述设施被批准用于处理空气传播的BSL3病原体,包括SARS-CoV-2病毒。

[0105] 表1:实时qPCR寡核苷酸。

[0106]

寡核苷酸	序列(5'->3')
5'引物(正向)	CACATTGGCACCCGCAATC
3'引物(反向)	GAGGAACGAGAAGAGGCTTG
荧光探针	6-ACTTCCTCAAGGAACAACATTGCCA-BHQ-1

[0107] i.GCPQ化合物：

[0108] 实验中使用的GCPQ列于表2中。这些化合物被重新悬浮在1×PBS中,最终浓度为5mg/mL。所有的备用物均储存在4℃下。

[0109] 表2:GCPQ

[0110]

GCPQa	GCPQc
分子量 = 10 kDa 棕榈酰基摩尔% = 18 季铵基摩尔% = 18	分子量 = 15 kDa 棕榈酰基摩尔% = 18 季铵基摩尔% = 20
GCPQb	**GCPQd**
分子量 = 30 kDa 棕榈酰基摩尔% = 19 季铵基摩尔% = 19	分子量 = 60 kDa 棕榈酰基摩尔% = 18 季铵基摩尔% = 16

[0111] 方法

[0112] 组织培养

[0113] a)通过用一定浓度的GCPQ化合物培养Vero E6和A549/ACE2+细胞的融合单层,来评估化合物的细胞毒性。48小时后,根据制造商的方案,使用每孔200,000个细胞和补充有胎牛血清、青霉素和链霉素的DMEM,进行XTT测定(请参见上文材料项下)。

[0114] b)在存在测试化合物或PBS的情况下,通过用400TCID50/mL的SARS-CoV-2病毒感染融合的Vero E6和A549/ACE2+单层,来确定每种化合物抑制病毒复制的能力(TCID50＝中位组织培养感染剂量)。模拟对照(无病毒的细胞裂解液)和培养基(补充的DMEM-请参见上文)对照也包括在内。每种化合物在感染期间和感染后都存在。然后将细胞在37℃和5％的CO_2条件下培养2小时。之后,用PBS清洗细胞三次,并将每种化合物重新涂抹到细胞单层中。随后,在37℃和5％的CO_2条件下培养两天后,从每个指定的孔中收集100μL的细胞培养上清液。实验一式三份进行。

[0115] c)在存在GCPQa或PBS的情况下,通过用SARS-CoV-2分离株026V-03883(体外)病毒以5000TCID50/mL感染MucilAir™,来评估在HAE中的病毒复制抑制。在感染前,将稀释在PBS中的GCPQa加入到插入片段的顶端(200μg/ml或500μg/ml)并在37℃下培养30分钟。预培养完成后,去除化合物,加入带有病毒的新鲜化合物稀释液,在37℃下培养2小时。接下来,将HAE的顶端用PBS洗三次,然后重新给予每种化合物,并再次在37℃下培养30分钟。在最后一次与GCPQ培养后,收集样本(50μL),并将HAE培养物置于气液相间。每隔24小时将HAE顶端表面与GCPQ或PBS培养30分钟,并收集样本进行病毒产量评估。

[0116] d)从细胞培养上清液中分离出病毒RNA,并反转录为cDNA,随后作为实时qPCR反应的模板。

[0117] 从每个实验的每个样本中收集一个等分的细胞培养上清液(100μL),并通过加入裂解缓冲液(400μL,R9F缓冲液,病毒DNA/RNA试剂盒)直接灭活。根据制造商的说明,用高容量cDNA反转录试剂盒制备cDNA样本。简言之,将5μL分离的RNA与2×浓缩的RT-PCR混合液混合,并按以下方案培养:在25℃下保持10分钟,在37℃下保持2小时,在85℃下保持5分钟。将cDNA储存在-20℃下直至使用。使用实时PCR(7500Fast Real-Time PCR;Life Technologies,Poland)评估病毒RNA产量。在含有1×qPCR Master Mix(A&ABiotechnology,Poland)的反应混合物中,在探针(100nM)和引物(各450nM)的存在下,扩增cDNA,序列提供于表1中。

[0118] 反应按照以下方案进行:在50℃下保持2分钟,在92℃下保持10分钟,然后进行40个循环的在92℃下保持15秒并在60℃下保持1分钟。为了评估N基因的拷贝数,制备了DNA标准物,如上文所述(Milewska,A.等人Replication of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus2in Human Respiratory Epithelium.J Virol 94,doi:10.1128/JVI.00957-20(2020))。

[0119] 通过比较每孔获得的数值和含有已知数量cDNA拷贝/mL(标准)的样本的连续稀释液的数值来计算病毒RNA拷贝/mL的数量。病毒产量的差异也被分析为对数去除值(LRV),表明与对照组相比,细胞培养基中的病毒量相对减少。

[0120] 健康动物模型中的鼻内给药

[0121] GCPQ(分子量=10kDa,棕榈酰基摩尔%=16,季铵基摩尔%=13)采用两阶段策略进行放射性标记:首先,将酰化试剂(N-琥珀酰亚胺基-3[4-羟基苯基]丙酸酯-博尔顿(Bolton)和亨特(Hunter)试剂(BH))初始与GCPQ共价偶联,然后用^{125}I对GCPQ-BH复合物进行碘化。简言之,将GCPQ(90mg)溶于DMSO(3mL)中。向该溶液中加入200μL三乙胺和0.05摩尔当量(10mg)的BH试剂,并在搅拌下,在室温下使反应过夜进行。第二天,用丙酮:二乙醚混合物(1:2,v/v)沉淀GCPQ-BH偶联物,然后用同样的丙酮:二乙醚混合物洗涤沉淀物3次。将洗过的沉淀物溶于甲醇(2mL)中,并对水进行透析过夜。然后将透析的GCPQ-BH冷冻干燥并收集。使用**碘化珠®**(Thermo Scientific Pierce,UK)用^{125}I对GCPQ-BH进行标记。简言之,在搅拌下将GCPQ-BH(20mg)和100mg GCPQ溶于甲醇中,然后在真空下除去甲醇,将Tris-HCL缓冲液(25mM,pH 4.8,1.8mL)加入到干膜中,产生66.7mg/mL的最终浓度。然后将此溶液加入含有I^{125}(1mCi,17Ci/mg,0.392nmol,Perkin-Elmer,USA)和四个**碘化珠®**(Thermo Scientific Pierce,UK)的管中。反应在室温下培养1.5小时,之后通过将溶液和珠子分离

来终止反应。使用PD Spin Trap G-25柱(GE Healthcare Life Sciences,UK)以去除游离碘(通过每根柱加入50μL反应物并以2800rpm离心2分钟来去除游离碘),所述柱是通过涡旋并通过离心(2800rpm,1分钟)丢弃洗脱储存缓冲液而制备的。将洗脱液置于Amicon超速离心过滤器(3kDa,Millipore,USA)中,加入200μL H_2O,并进行反复洗涤(通过在10,000rpm下离心10分钟),直到洗出的水可忽略不计。

[0122] 所有的动物实验均是根据英国内政部(UK Home Office)许可证(PPL 70/8224)进行的,并得到了当地伦理委员会-UCL动物福利和伦理审查机构(Animal Welfare and Ethical Review Body)的批准。动物实验是按照许可证中的指南进行的,并遵循ARRIVE指南,但没有进行盲法或随机化。对体重为25-30g的Balb/C雄性小鼠(Charles River,UK)进行了探索性研究,允许其自由接触标准啮齿动物饲料和水。将放射性标记的GCPQ-BH进行鼻内给药(10mg/kg,1.2MBq),其方法为用吸管将5μL放射性标记的材料放入小鼠的鼻腔,让小鼠在剂量中嗅闻。在给予放射性标记的GCPQ后的不同时间点,用异氟醚(1-2v/v%在氧气中)对动物进行麻醉,保持在37℃下,并进行NanoSPECT/CT分析(Mediso,USA)。

[0123] 体内SPECT/CT成像和分析

[0124] 在鼻腔给药后30分钟、2小时30分钟和24小时使用NanoSPECT/CT扫描仪(Mediso,Hungary)获得小鼠头部的SPECT/CT扫描(图4)。SPECT图像是在30分钟内使用4头扫描仪获得的,所述扫描仪有9个1.4mm的针孔孔径,采用螺旋扫描模式,每个视图时间为60秒。随后使用45千伏峰值(kVp)的X射线源获得CT图像,在180个投影中500ms的曝光时间,间距为0.5,采集时间为4:30分钟。体温由暖风机保持,呼吸和核心体温被全程监测。CT图像使用Bioscan InVivoScope(Bioscan,USA)软件进行重建,体素大小为124×124×124μm,而SPECT图像则使用HiSPECT(ScivisGmbH,Bioscan)进行重建,矩阵为256×256。使用VivoQuant(Invicro,A Konica Minolta Company)软件对图像进行融合和分析。为每个时间点的鼻腔内的摄取量创建三维关注区域(ROI),并以给药剂量的百分比计算活性。代表性图像的比例是相同的(相同的最小和最大)。在最后一次扫描后,小鼠被处死,并使用曲率计(Capintech,Mirion Technologies,UK)分析小鼠的整个头部,以进行^{125}I浓度的体外验证。

[0125] 在表达ACE2受体的转基因小鼠中的体内病毒抑制作用

[0126] 在人细胞角蛋白18启动子下表达人ACE2蛋白的转基因小鼠进行了对SARS-CoV-2(Munchen-1.2 2020/984)的抗病毒活性实验。共有3个实验组,其由GCPQ给药组、对照组(无GCPQ)和Remdisivir组组成,除了对照组有14只动物以外,每个组有10只动物。小鼠被隔离了至少7天,然后进行实验。将GPCQa每天鼻内给药一次(20mg/kg/天)。治疗对照组接受remdesivir肌肉注射(25mg/kg/天)。实验时间线为7天,从感染前1天开始到感染后第6天,期间对小鼠进行GCPQ或Remdisivir的鼻内给药,每24小时检查并称重。在各实验的整个期间,小鼠都能自由且持续地获得水。在第0天,用426,000$TCID_{50}$/ml(相当于约3×10^5pfu)的SARS-CoV-2病毒(Munchen-1.2 2020/984;每个鼻孔5μL)对小鼠进行鼻内感染。然后,所述病毒在Vero细胞上进行繁殖和滴定。感染后第6天,在麻醉状态下处死动物,提取肺和脑组织。使用珠子匀浆器将这些组织进行均质处理,同时提取鼻拭子。使用mirVana™ miRNA分离试剂盒(ThermoFisher Scientific,Poland)分离病毒RNA,并使用RT-qPCR对病毒感染进行量化。图5示出了鼻腔给药GCPQ和Remdesivir后,脑和呼吸道拭子中的抗病毒活性。

[0127] 统计学分析

[0128] 统计学分析采用单因素方差分析(ANOVA)和Tukey的事后检验进行。统计学显著性被设定为$p<0.05$。

[0129] 结果

[0130] 细胞毒性

[0131] 测试了四种GCPQ聚合物(见表2)。首先,分析了聚合物对Vero E6和A549/ACE2+细胞的细胞毒性。分析结果显示在图1中。

[0132] 分析表明,不同的GCPQ具有不同的毒性。对于病毒测定,仅测试了无毒浓度:10μg/ml的GCPQa、25μg/ml的GCPQc以及200μg/ml的GCPQb和GCPQd。

[0133] 抗病毒活性

[0134] 在Vero E6和A549/ACE2+细胞上分析了GCPQ的抗病毒活性。每个分析都是一式三份。实验结果示于图2中。

[0135] 分析表明,在壳聚糖GCPQa和GCPQc以无毒浓度存在下明显阻碍了SARS-CoV-2在体外的复制。GCPQa和GCPQc在无毒浓度下显示出抗冠状病毒的活性。GCPQa显示出最高的毒性和抗SARS-CoV-2的潜力(在10μg/mL时病毒载量减少约3至4对数)。

[0136] 人类气道上皮(HAE)细胞的抗病毒活性

[0137] 为了验证我们对GCPQa抗SARS-CoV-2活性的观察,使用了完全分化的HAE体外模型,在体外重构了人类呼吸道上皮细胞。评估了两种不同浓度的GCPQa(200μg/ml和500μg/ml),并使用PBS作为对照。每个分析均一式三份,结果显示在图3中。在48和72小时的时间点,500μg/ml的GCPQa与PBS处理的样本有统计学上的显著差异($p<0.05$)。

[0138] 结果表明,壳聚糖GCPQa阻碍了SARS-CoV-2在HAE体外模型中的复制。感染72小时后,在用GCPQ处理的培养物中检测到的病毒产量低于用PBS处理的对照。

[0139] 鼻腔给药

[0140] 对雄性小鼠进行GCPQ的鼻内给药,结果是由于聚合物具有黏附性,在给药后至多24小时可在小鼠的鼻腔内检测到该聚合物。图4中SPECT图像上的GCPQ摄取量的三维ROI表明,给药后(30分钟),在鼻腔内发现28.22%的给药剂量,2小时30分钟后,这一比例略微下降到25.13%的给药剂量,在24小时时,发现13.13%的给药剂量留在鼻腔内。在24小时时对小鼠头部的体外曲率计分析也证实,给药24小时后在鼻腔内发现了13.5%的给药剂量,这比通过SPECT获得的剂量略高,但反映在了整个头部内的放射性,而不仅仅是鼻腔区域。

[0141] 体内病毒抑制

[0142] 这些实验中使用的初始病毒滴度明显高于人类传染性流感呼气样本中所含的病毒滴度(在本研究中是将3×10^5pfu与30分钟细气溶胶呼气样本中3.8×10^4的流感qPCR RNA拷贝数和30分钟粗气溶胶呼气样本中1.2×10^4的流感qPCR RNA拷贝数相比,根据Yan等人(Yan,J.等人Infectious virus in exhaled breath of symptomatic seasonal influenza cases from a college community.Proceed Natl Acad Sci 115,1081,doi:10.1073/pnas.1716561115(2018)))。

[0143] 然而,每天一次的GCPQ剂量对小鼠鼻腔和脑中的病毒复制有抑制作用(图5)。

[0144] 根据图5的测定显示,在存在无毒浓度的GCPQ的情况下,相对于对照组,呼吸道拭子和脑中的SARS-CoV2复制均受到了抑制。相对于Remdisivir,使用GCPQ在呼吸道拭子中的平均RNA拷贝数基本持平,但总体上的抑制作用略低。此外,在脑测定中,GCPQ的平均抑制率

高于Remdisivir,但由于有一个高SARS-CoV-2拷贝/ml的单一结果,所以误差条较大。

[0145] 这个模型中的高初始病毒滴度(相对高于人类传染性飞沫所含的滴度)意指更难防止病毒在组织中复制,因为GCPQ不会被吸收到这些区域。鼻腔和呼吸道中病毒滴度的降低趋势提供了证据,证明GCPQ可能限制病毒传播,并确实起到了预防作用。

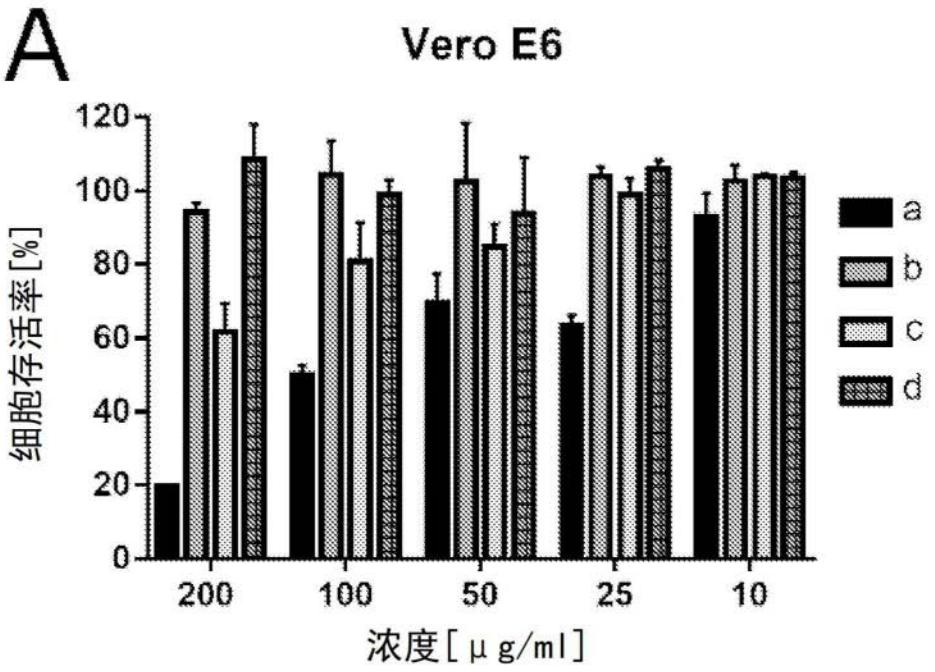
[0146] 结论

[0147] 一种具有6-O-乙二醇基(不存在于HTCC中)、疏水性酰基(不存在于HTCC和HM-HTCC中,后者用N-十二烷基衍生化)的衍生化壳聚糖化合物能够有效抑制病毒进入细胞,所述化合物分子量比HTCC低,直接用三甲基季铵基代替壳聚糖中的C2胺基,与HTCC不同(HTCC将羟丙基三甲基铵基团连接到C2氮上),季铵取代水平(<40摩尔%)低于HTCC。现有技术和本发明的化合物之间的巨大结构差异不会导致人们预期本发明的化合物会表现出抗病毒活性。

[0148] 低分子量明显促进了在哺乳动物细胞中抗SARS-COV-2的活性(表2和图2-3),这与这种聚合物与之结合可易于溶入水性介质有关。分子量为40-100kDa的未衍生化的乙二醇壳聚糖没有活性(数据未显示),表明季铵和可能的棕榈酰基团是活性的重要决定因素。此外,GCPQ拥有用于抑制病毒,特别是临床预防病毒感染的优势,因为GCPQ具有黏附性,在鼻腔内的停留时间长(图4),而且化学性质稳定至少18个月。GCPQ还能自组装成纳米粒子,这些纳米粒子可以聚集成微丸用于鼻腔给药。

[0149] 因此,GCPQ可作为分子面具鼻腔喷雾剂用于预防冠状病毒感染。脑中病毒水平的降低(图5)提供了令人鼓舞的证据,即有可能在使用抗病毒预防剂后,SARS-COV-2感染所经历的神经系统症状,如《柳叶刀神经病学(The Lancet Neurology)》("Long COVID: understanding the neurological effects",The Lancet Neurol.,20,247,2021)报道的那样,确实可能会减少。用MMS019治疗后,小鼠鼻腔内的病毒复制受到明显抑制,脑组织的病毒水平也有所下降,表明系统性感染有限。在实验期间未观察到任何不良反应。

[0150] 由于GCPQ的活性可能并不特别取决于对特定表位的识别,而似乎是基于GCPQ和病毒之间的静电相互作用,因此GCPQ可以应用于各种病毒感染。这些优点意味着,除了SARS-CoV-2之外,GCPQ聚合物可以作为鼻腔喷雾剂或通过其他方式用于预防和治疗其他特定的病毒感染。


A
Vero E6
细胞存活率[%]
120
100
80
60
40
20
0
200
100
50
25
10
浓度[μg/ml]
a
b
c
d

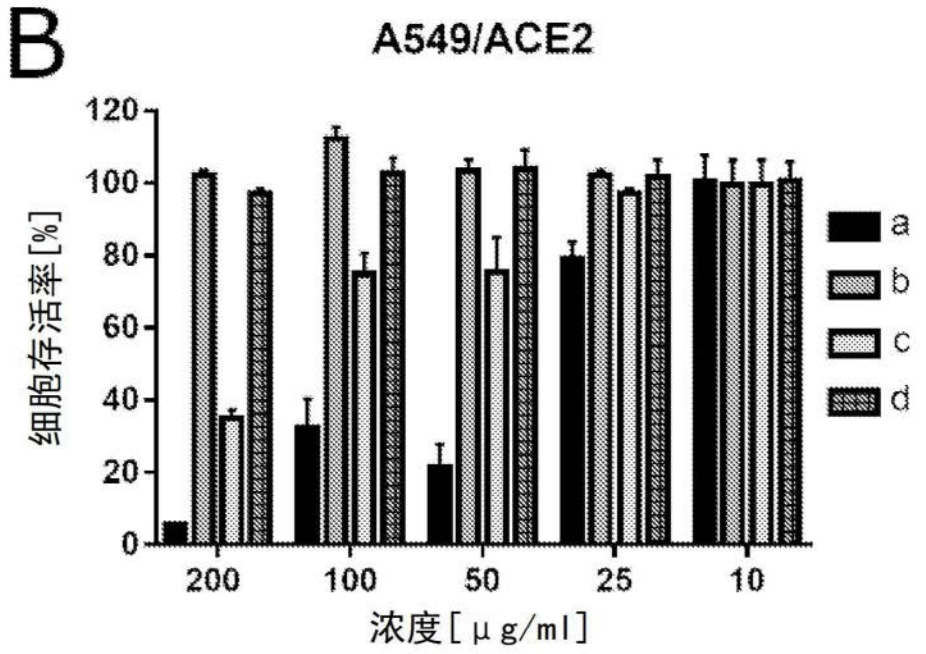

B
A549/ACE2
细胞存活率[%]
120
100
80
60
40
20
0
200
100
50
25
10
浓度[μg/ml]
a
b
c
d

图1

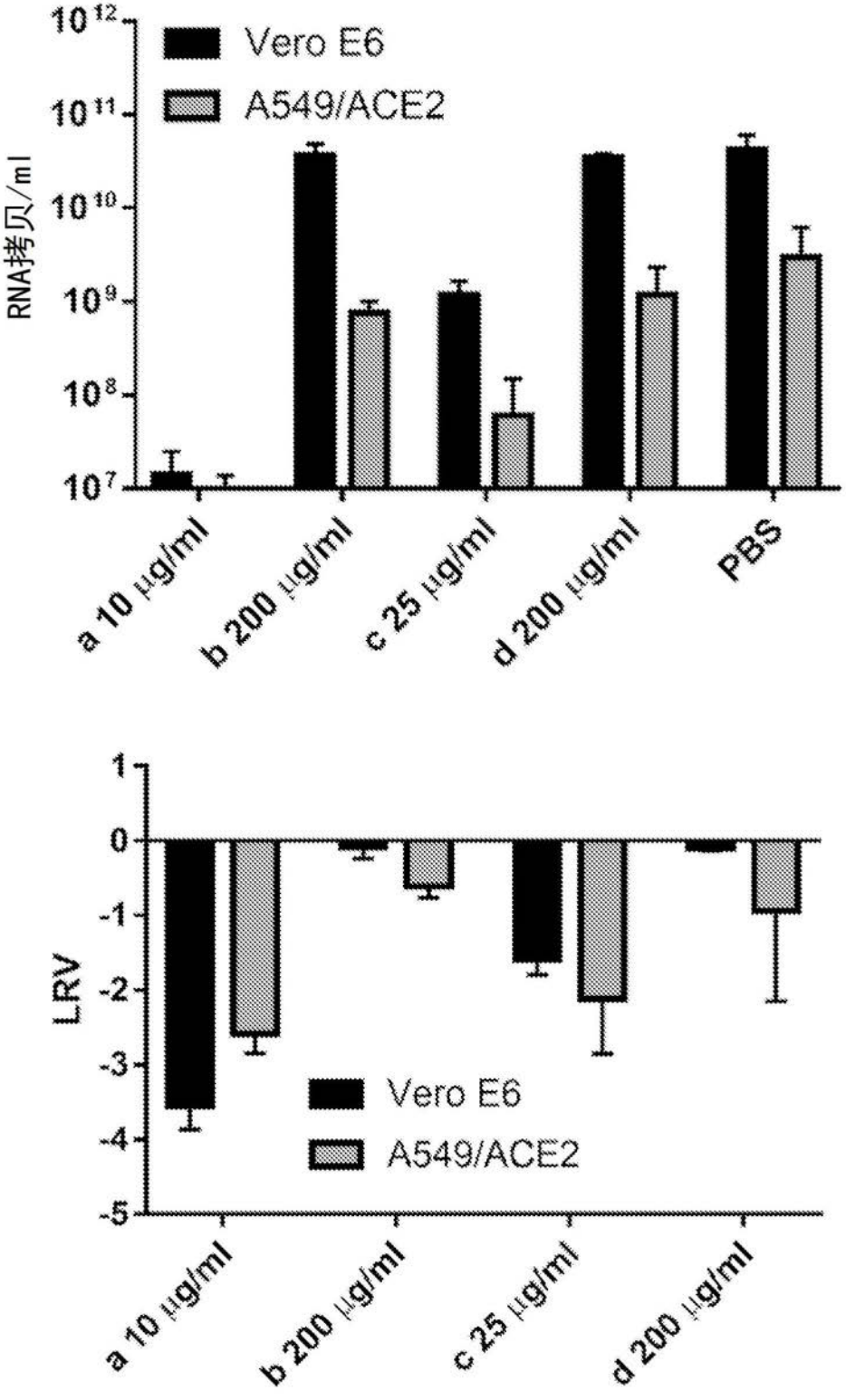

RNA拷贝/ml
Vero E6
A549/ACE2
a 10 μg/ml
b 200 μg/ml
c 25 μg/ml
d 200 μg/ml
PBS
LRV
Vero E6
A549/ACE2
a 10 μg/ml
b 200 μg/ml
c 25 μg/ml
d 200 μg/ml

图2

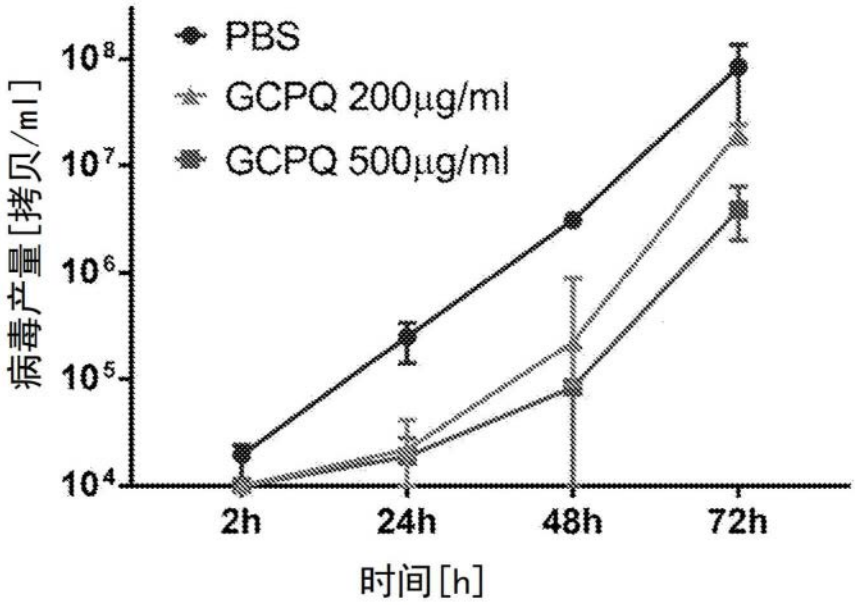

PBS
GCPQ 200μg/ml
GCPQ 500μg/ml
病毒产量[拷贝/ml]
10^8
10^7
10^6
10^5
10^4
2h
24h
48h
72h
时间[h]

图3

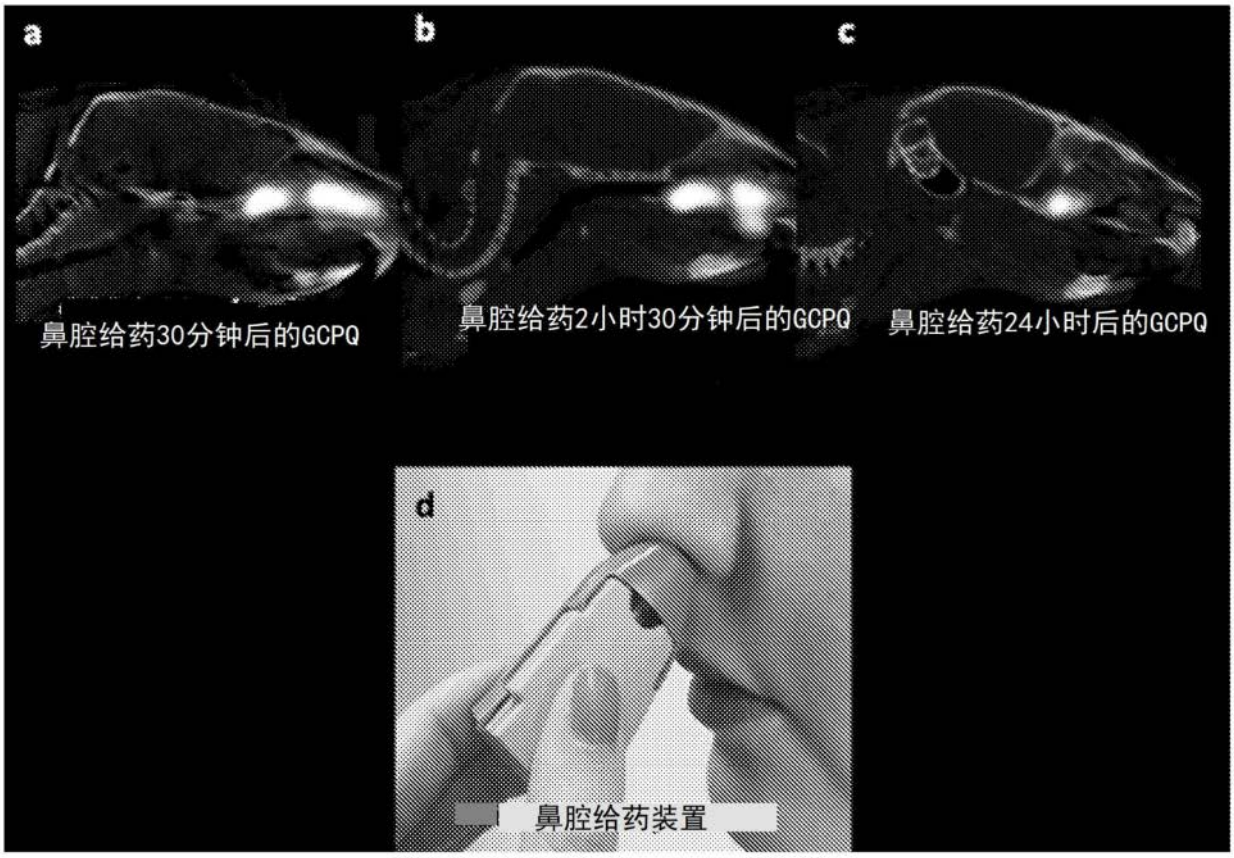

a
b
c
鼻腔给药30分钟后的GCPQ
鼻腔给药2小时30分钟后的GCPQ
鼻腔给药24小时后的GCPQ
d
鼻腔给药装置

图4

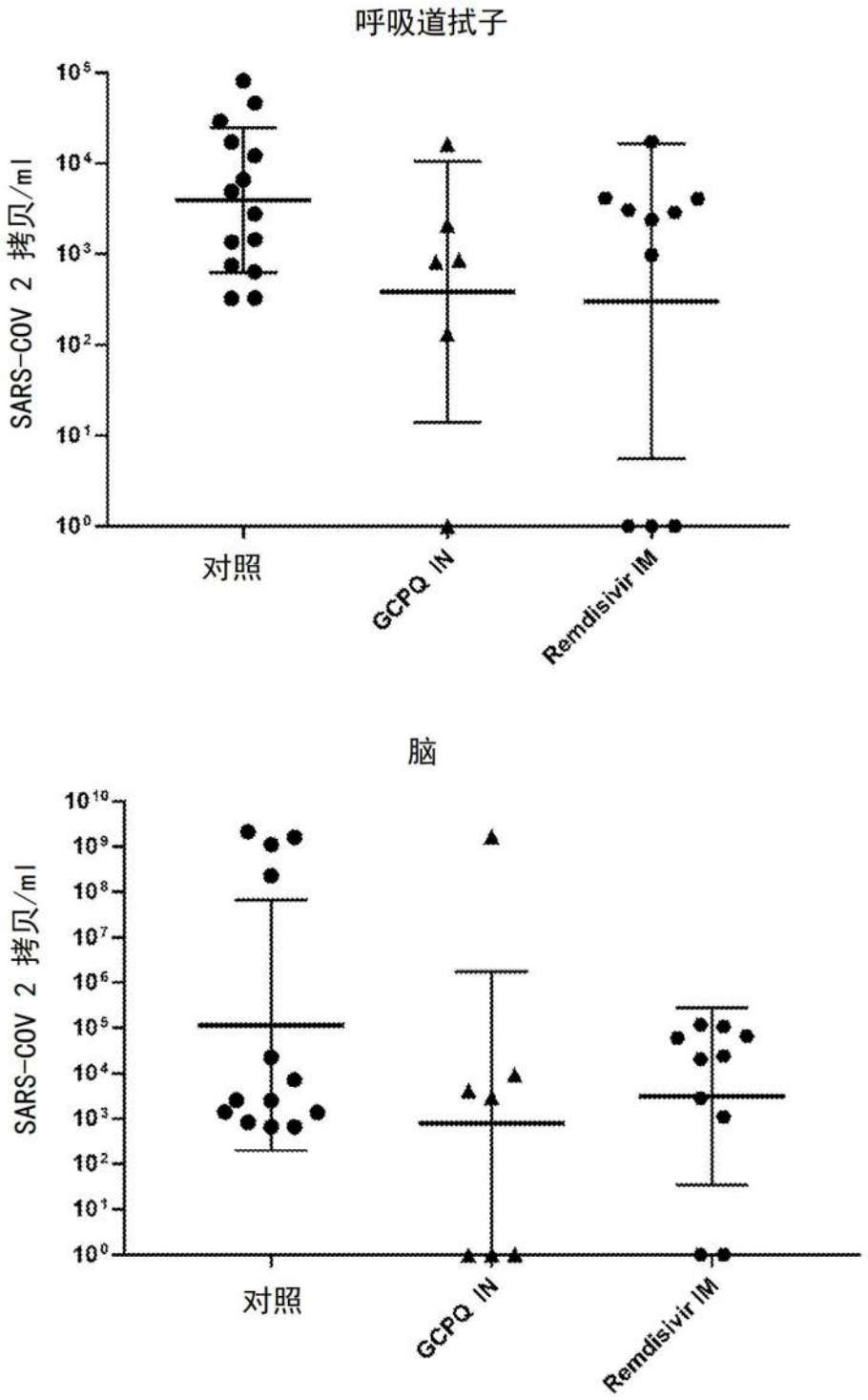

呼吸道拭子
SARS-COV 2 拷贝/ml
10^5
10^4
10^3
10^2
10^1
10^0
对照
GCPQ IN
Remdisivir IM
脑
SARS-COV 2 拷贝/ml
10^{10}
10^9
10^8
10^7
10^6
10^5
10^4
10^3
10^2
10^1
10^0
对照
GCPQ IN
Remdisivir IM

图5