

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200380102693.5

[51] Int. Cl.

A61K 31/55 (2006.01)

A61P 31/12 (2006.01)

[45] 授权公告日 2008 年 11 月 5 日

[11] 授权公告号 CN 100430061C

[22] 申请日 2003. 10. 29

[21] 申请号 200380102693. 5

[30] 优先权

[32] 2002. 10. 31 [33] US [31] 60/422,683

[86] 国际申请 PCT/US2003/034431 2003. 10. 29

[87] 国际公布 WO2004/041176 英 2004. 5. 21

[85] 进入国家阶段日期 2005. 4. 30

[73] 专利权人 凯敏食品公司

地址 美国衣阿华

[72] 发明人 扬·范登凯尔克霍弗

贝内迪克特·萨斯 埃里克·派斯

约翰·范赫梅尔 约翰·内叶茨

[56] 参考文献

CN1035767C 1997. 9. 3

CN1105238A 1995. 7. 19

EP0456149A1 1991. 11. 13

Cis - acting RNA elements required for replication of bovine. Viral diarrhea virus - hepatitis C virus 5' non - translated regionchimeras. Frolov I., McBride S., Rice C. M. RNA, Vol. 4. 1998

RT - PCR 技术在流行性出血热病毒分型诊断中的应用. 张淑玲, 郑曲波, 曾令兰. 临床内科杂志, 第 17 卷第 4 期. 2000

边界病. 杨林, 张绍学, 牛钟相, 王新平. 山东农业大学学报, 第 30 卷第 1 期. 1999

审查员 黄海波

[74] 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

代理人 林晓红

权利要求书 1 页 说明书 9 页 附图 1 页

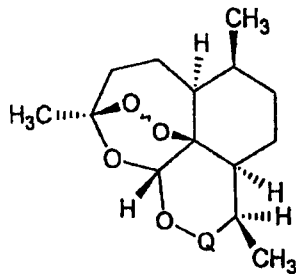
[54] 发明名称

内过氧化物在制备治疗由黄病毒科病毒 (包括丙型肝炎病毒、牛病毒性腹泻病毒和猪瘟病毒) 引起的感染的药物中的应用

[57] 摘要

倍半萜类, 特别是倍半萜内酯内过氧化物, 例如青蒿素及其类似物, 在治疗丙型肝炎病毒感染中的应用。对青蒿素、青蒿素的类似物和一些蒿的粗提取物进行了体外抗 DNA 病毒、逆转录病毒和黄病毒科病毒 (一种重要的人和动物 RNA 病原体科) 的测试。筛选了这些化合物的抗肿瘤活性。观察到青蒿素具有抗牛病毒性腹泻病毒的强活性。由于瘟病毒 (如 BVDV) 与丙型肝炎病毒 (HCV) 具有许多相似性, 我们能够得出结论, 在治疗丙型肝炎病毒感染方面, 内过氧化物具有一般的效果, 青蒿素具有更特异的效果。

1、倍半萜或其药学可接受的盐在制备一种用于治疗由黄病毒科病毒引起的感染的药物中的用途，所述倍半萜具有以下通式：



其中：

Q 选自 CO、CHOH、CHOCH₃、CHOC₂H₅、和 CHOCOCCH₂CH₂COOH。

2、权利要求 1 的用途，其中所述感染是丙型肝炎。

3、权利要求 1 的用途，其中所述感染是牛病毒性腹泻或猪瘟。

内过氧化物在制备治疗由黄病毒科病毒（包括丙型肝炎病毒、牛病毒性腹泻病毒和猪瘟病毒）引起的感染的药物中的应用

发明背景

本发明大体上涉及倍半萜内酯类 (sesquiterpene lactones) 在治疗由黄病毒科 (*Flaviviridae*) 引起的感染中的应用, 特别是倍半萜内酯内过氧化物在治疗丙型肝炎感染、黄热病、登革热、牛病毒性腹泻和猪瘟 (classical swine fever) 中的应用。

慢性丙型肝炎病毒感染是一个影响全世界 1.8 亿人 (总人口的 3%) 的一个重要的公共健康问题, 这里面包括美国的 4 百万人, 而且是导致肝慢性病的一个主要原因。有人预期美国的 HCV 感染将继续增加, 到 2010 年感染者将达到现在的 3 倍。丙型肝炎病毒的感染可能引起严重的, 在一些病例中可能是威胁生命的慢性肝病, 包括肝衰竭和肝癌。

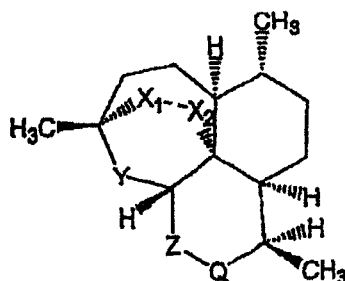
在美国, 慢性肝病是导致成人死亡的第十位原因, 并且导致 8 每年接近 25000 例或接近 1% 的死亡人数。人口基础上的研究表明: 40% 的慢性肝病是 HCV 相关的, 导致每年大约 8000-10000 的死亡。HCV 相关的急性和慢性肝病的医疗和工作损失估计每年要超过 6 亿美元。并且 HCV 相关的晚期肝病是成人肝移植最常见的原因。因为大多数的 HCV 感染者的年龄在 30-49 岁之间, 由与 HCV 相关的慢性肝病引起的死亡数可能在未来的 10-20 年间大幅增加, 这时候这组感染者将达到慢性肝病的并发症通常发生的年龄。

HCV 的传播主要是通过皮肤与血的大量或重复的直接接触。在美国, 与 HCV 传播有关的两种最常见的接触是输血和注射毒品。丙型肝炎的治疗是临床实践中变化快速的一个领域。干扰素和利巴韦林 (一种核酸类似物) 的联合治疗已被批准用于慢性丙型肝炎的首次治疗。对应用利巴韦林

和干扰素的联合治疗的患者的研究证实，与单独应用干扰素治疗的反应率 15-25%相比，其持久的反应率有显著增加，达到 40-50%。多数患者在治疗早期有干扰素一过性感冒样症状，但是这些症状在继续治疗中减轻。随后的副作用有疲劳、骨髓抑制和中枢精神作用（例如，淡漠、认知变化、暴躁和抑郁）。由于严重的副作用，10-40%的患者的干扰素的剂量必须减少，5-15%的患者必须间断使用。利巴韦林能引起溶血性贫血，并且对于患者原来存在的贫血、骨髓抑制或肾衰竭来说也是有问题的。在这些患者，应避免联合治疗，或应该试图纠正贫血。利巴韦林引起的溶血性贫血对有缺血性心脏疾病或脑血管疾病的患者也可能是威胁生命的。利巴韦林是引起畸形的，女性患者在治疗过程中要避免妊娠。其他治疗，包括皮质类固醇、脱氧熊胆酸 (ursodiol) 和胸腺素，是无效的。肝脏的高铁水平可降低干扰素的药效。去铁治疗（静脉切开放血术或螯合术）与干扰素的联合应用已经研究了，但是，还尚无结论 (www.cdc.gov)。所以，在医学领域迫切需要发现和发展可以用来治疗 HCV 感染、同时具有较少或者能够减少副作用的、并且与现有的治疗相比有更好疗效的新的生物活性分子。

发明内容

已经发现具有以下通式的倍半萜内酯：



具有对抗由黄病毒科，包括丙型肝炎病毒、牛病毒性腹泻病毒和猪瘟病毒引起的感染的活性。本申请描述了一些具有代表性的、目前优选

的倍半萜内酯类，不过，本领域人员显然能够理解，公知技术中其他倍半萜内酯化合物在由黄病毒科引起的感染的治疗中也是有效的。还包括此类化合物的药学上可接受的盐。

优先选用的倍半萜内酯是倍半萜内酯内过氧化物青蒿素 (artemisinin)、双氢青蒿素 (dihydroartemisinin)、青蒿琥酯 (artemether) 和蒿甲醚 (artemether)。

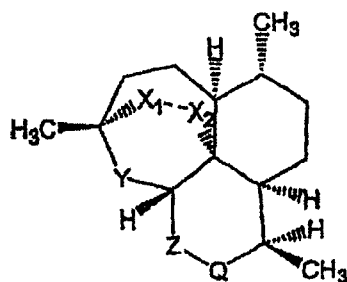
附图说明

图 1 是对青蒿素、双氢青蒿素、青蒿琥酯和蒿甲醚化学结构的图解说明。

具体实施方式

本申请中，我们将介绍倍半萜内酯类的抗病毒效应，特别是倍半萜内酯内过氧化物，例如青蒿素、双氢青蒿素、青蒿琥酯和蒿甲醚对特定的黄病毒科病毒例如丙型肝炎病毒的抗病毒作用。

本发明的优选的倍半萜化合物包含具有以下通式的化合物：



其中：X₁ 和 X₂ 选自 O、S、Se 和 NH；Y 选自 O、S、Se 和 NH；Z 选自 O、NH、S 和 Se，且 Q 选自 CO、CHOH、CHOCH₃、CHOC₂H₅、CHOC₃H₇ 和 CHOCOCCH₂CH₂COOH 及其药物可接受盐。

本发明特别优选的倍半萜化合物包括青蒿素，其 X₁ 和 X₂ 是 O、Y 是 O、Z 是 O、并且 Q 是 C=O；双氢青蒿素 (同青蒿素，但 Q 为 CHOH)；

蒿甲醚 (同青蒿素, 但 Q 为 CHOCH_3); 蒿乙醚 (arteether) (同青蒿素, 但 Q 为 COC_2H_5); 一种丙基产品 (同青蒿素, 但 Q 为 CHOC_3H_7); 及青蒿琥酯 (artesunate) (同青蒿素, 但 Q 为 $\text{CHOCOCH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$)。本发明的最优的倍半萜化合物是双氢青蒿素。

内过氧化物有一个二氧键 (peroxo linkage) ($-\text{O}-\text{O}-$), 这个结构被认为对这些产物具有抗疟疾活性是很重要的。用 $-\text{S}-\text{S}-$ (二硫键), 或 $-\text{Se}-\text{Se}-$ (二硒键), 或 $-\text{N}-\text{O}-$ 或 $-\text{NH}-\text{NH}-$ (胼), 以及上述键的不同组合, 会产生新的化合物, 也可能具有活性。

黄病毒科是人类和动物一个重要的 RNA 病毒病原体科 (Rice CM. 1996. *Flaviviridae: the viruses and their replication*. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, eds. *Fields virology*. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers. Pp 931-960)。目前已发现的黄病毒科的属在传播途径、宿主范围和发病机理方面表现不同。典型的黄病毒成员是黄热病毒、登革病毒和瘟病毒 (pestiviruses), 例如牛病毒性腹泻病毒 (BVDV) 和猪瘟病毒 (CSFV)。该家族最新的最具特征的成员是人的常见的且专有的病原体, 即丙型肝炎病毒 (HCV)。黄病毒是具有(+)有义 RNA 基因组极性的单链 RNA 病毒。其他具有(+)有义 RNA 的病毒科包括小核糖核酸病毒科 (*Picornaviridae*)、披膜病毒科 (*Togaviridae*)、杯状病毒科 (*Caliciviridae*) 和冠状病毒科 (*Coronaviridae*)。

本发明化合物可以应用它们的原形或它们的盐。在一些情况, 这些化合物由足够的碱性或酸性能够形成稳定的无毒的酸或碱的盐, 这些化合物以盐的形式施用是适合的。药学可接受的盐的例子是与形成的生理学可接受阴离子的有机酸形成的有机酸盐, 例如抗坏血酸醋酸盐, 安息香酸盐, 柠檬酸盐, etoglutarate, 甘油磷酸盐, 丙二酸盐, 甲磺酸盐, 琥珀酸盐和酒石酸盐。合适的无机酸盐也可以被合成, 包括重碳酸盐, 碳酸盐, 盐酸盐, 硝酸盐, 和硫酸盐。

本发明可以含有所述化合物以及合适的赋形剂的药物组合物而常规

给药, 该组合物对抗病毒感染是有用的。根据所治疗的是内或外病毒感染, 本发明的化合物和组合物可以经胃肠外, 局部, 阴道内, 口服或直肠给药。

对胃肠外给药, 活性成分或它的盐溶液可以用水制备, 任选地和无毒的表面活性剂混合。也可以在甘油, 液体聚乙二醇, 三乙酰甘油酯和上述试剂的混合物和在油剂里制备。

化合物可使用的剂量可以通过在体外比较其活性而决定。对人的有效量的外推方法是本领域已知的。

本化合物可以单位剂量的形式常规给药; 例如每单位剂量形式包含活性成分 0.1-2000mg, 优选为 100-1000mg, 最优选为 100-500mg。所需药量可以常规地一次性给药或以合适的间隔分次给药, 例如每天可分 2, 3, 4 或更多次给药。每次的亚剂量还可以进一步分开, 例如分成一些分散的松散分隔的施用形式; 例如多次从送药器吸入或多次点眼给药。

对体内感染, 组合物可以按游离药物计算的剂量水平通过口服或胃肠外给药, 大约为 1-30mg/kg (哺乳动物体重), 优选 1-10mg/kg (哺乳动物体重)。

在此揭示的化合物和组合物的给药的精确的方案将必须依赖于被治疗的个体的需要, 治疗的类型, 当然还有主治医师的判定。本发明的化合物可用于有该治疗需求的动物。大多情况下, 是用于人, 但是家畜和宠物也可以特别地预期属于本发明的应用范围。

材料和方法

青蒿素购于 Aldrich。洋艾 (*Artemisia absinthum*) KE-4、黄花蒿 (*Artemisia annua*) KE-5 和龙蒿 (*Artemisia dracunculus*) KE-6 的植物粗提取物从美国 Des Moines, Kemin 工业有限公司获得。为了制备 KE-4、-5 和-6 样品, 将 2g 干的磨碎的苦艾、甜苦艾或龙蒿在 200ml 己烷中室温搅拌 8 小时, 然后, 悬浮液经过 G3 玻璃滤器过滤和低压下蒸发。残留的黑

的滤渣用于生物筛选。蒿甲醚、双氢青蒿素和青蒿琥酯购于 Dafra Pharma。上述化合物都进行了抗不同致病病毒的筛选，例如人免疫缺陷病毒 (HIV)、单纯疱疹病毒 (HSV)、水痘病毒 (VV)、带状疱疹病毒 (VZV) 和人巨细胞病毒 (CMV)。对所有的病毒，除了 CMV 外，检测了 EC_{50} (对 HIV 在人 CEM 细胞培养物中诱导的致细胞病性、HSV 和 VV 在人胚胎成纤维细胞 E₆SM 细胞培养物中诱导的致细胞病性、和 VZV 在人胚胎肺 (HEL) 细胞培养物中诱导的噬斑形成达到 50% 的抑制所需的有效化合物的浓度)。为了检测抗病毒活性，抗 CMV 用 IC_{50} 表示，人胚胎肺成纤维 (HEL) 细胞用 96 孔板培养，每孔用 20PFU 病毒感染。

在 37°C 培养 2 小时后，感染的细胞中加入 0.1ml 含测试化合物的梯度稀释的培养液。第 7 天经细胞 Giemsa 染色后在显微镜下计数噬斑。最小抗病毒浓度以抑制病毒诱导的噬斑形成达到 50% 所需的剂量表示。

对这些化合物也进行了抗黄病毒的筛选。因为事实上没有足够的体外分析用于抗 HCV 筛选，所以决定筛选抗牛病毒性腹泻病毒 (BVDV)，因为它与丙型肝炎病毒有很多相似性 (Frolovl, McBride S and Rice CM. Cis-acting RNA elements required for replication of bovine. Viral diarrhea virus-hepatitis C virus 5' non-translated region chimeras. RNA 4, 1418-1435 (1998))。进一步对蒿甲醚抗 BVDV 的不同株的作用进行了筛选。

对这些化合物也进行了抗肿瘤活性的检测，通过对鼠白血病细胞 (L1210/0)、鼠乳腺癌细胞 (FM3A) 和人 T 淋巴细胞 (Molt4/C8, CEM/0) 的增殖(的检测)进行。观察到的对 CMV 和 VZV 的最好的抗病毒活性来自 KE-6。其次是青蒿素对 HSV-2 和 VV 的抗病毒活性。

结果和讨论

在第一批筛选中 (见表 1)，检测了青蒿素和一些蒿属粗提取物 (KE-4、KE-5 和 KE-6) 对 HIV-1、HIV-2、HSV-1、HSV-2、VV、CMV 和 VZV 的抗病毒活性。

表 1: 抗 HIV-1、HIV-2、HSV-1、HSV-2、VV、CMV 和 VZV 的筛选结果

化合物	^a EC50 (μg/ml)								
	HIV-1 (IIIB) (CEM)	HIV-2 (ROD) (CEM)	HSV-1 (KOS) (E ₆ SM)	HSV-2 (G) (E ₆ SM)	VV (E ₆ SM)	CMV Davis (HEL)	CMV AD-169 (HEL)	VZV (HEL)	VZV (HEL)
								OKA	YS
青蒿素	>20	>20	>400	240	240	>50	>50	>50	>50
KE-4	>20	>20	>80	>80	>80	>50	>50	>50	>50
KE-5	>100	>100	>240	>80	>80	>50	>50	>50	>50
KE-6	>20	>20	>80	>80	>80	10	33	17	30

^a50% 对 HIV 在人淋巴细胞 CEM 细胞培养物中诱导的致细胞病性、HSV 和 VV 在人胚胎成纤维细胞 E₆SM 细胞培养物中诱导的致细胞病性、和 CMV 和 VZV 在人胚胎肺 HEL 细胞培养物中诱导的噬斑形成达到 50%的抑制所需的有效的化合物浓度。

另外进行了第二个筛选 (表 2), 以便检测在牛肾 (MDBK) 细胞中抗牛病毒性腹泻病毒的活性。

表 2: 在 MDBK 细胞中抗 BVDV 的筛选结果

化合物	EC ₅₀ (μg/ml) BVDV	MTC (μg/ml) MDBK
青蒿琥酯	0.07	0.4
蒿甲醚	0.3	>100
青蒿素	0.4	>100
双氢青蒿素	0.05	0.4
KE4	>100	>100
KE5	>100	>100
KE6	>100	100

抗病毒活性用 BVDV 的 Pe515 株在 MDBK 细胞上来评估。抗病毒活性和细胞毒性的检测都应用 MTS 方法。

EC₅₀ 是降低病毒引起的细胞毒性效果 50% 时所需要的浓度。MTC (最小毒性浓度) 定义为引起细胞代谢降低 $\geq 20\%$ 的浓度。

当用蒿甲醚、青蒿素、KE4 和 KE5 处理 MDBK 细胞时, 在最高浓度 (100 $\mu\text{g/ml}$) 仍没有达到 MTC。本试验中观察到内过氧化物青蒿素、双氢青蒿素、蒿甲醚和青蒿琥酯具有很强的抗黄病毒 BVDV 的活性, 同时具有低细胞毒性。所以, 这些产品可以用于治疗由黄病毒引起的感染。

以蒿甲醚进行了抗不同 BVDV 株, 和抗 BDV (边界病病毒) 的筛选 (表 3)

表 3: 蒿甲醚抗 BVDV 和 BDV 的筛选结果

蒿甲醚	100 $\mu\text{g/ml}$	20 $\mu\text{g/ml}$	4 $\mu\text{g/ml}$	800 ng/ml	160 ng/ml	32 ng/ml	6.4 ng/ml	1.28 ng/ml	0.512 ng/ml	0.256 ng/ml
非感染	毒性									
BVDV II ncp	毒性	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
BVDV I cp	毒性	+	+	+	+	++	++	++	++	++
BVDV I ncp	毒性	+	+	+	++	+++	+++	+++	+++	+++
BDV	毒性	+	+	+	++	++	++	++	++	++

+++ 所有细胞都是阳性的

++ +/-50%细胞是阳性的

+ +/-10%细胞是阳性的

BVDV 牛病毒性腹泻病毒

BDV 边界病病毒

cp 致细胞病变株

ncp 非致细胞病变株

特别地抗 BVDVIcp (与 HCV 最相似的 BVDV 株), 可以清楚地看到蒿甲醚的效果。该产品的 EC₉₀=0.16 $\mu\text{g/ml}$ 。这些实验中发现的毒性浓度在 100 $\mu\text{g/ml}$ 附近。也可以观察到抗 BDV 的效果 (EC₉₀=0.8 $\mu\text{g/ml}$)。

青蒿素和蒿属粗提取物 (KE-4、KE-5 和 KE-6) 都进行了抗肿瘤细胞株 L12 10/0、FM3A/0、Molt4/C8 和 CEM/0 的筛选, 但没有发现有益结果。

结论

在最初的抗 DNA 病毒和逆转录病毒的筛选中我们没有发现任何明显的抗病毒活性。在第二次抗 BVDV (RNA 病毒) 的筛选中我们清楚地显示青蒿素、青蒿琥酯、蒿甲醚和双氢青蒿素的强抗病毒活性。这些产品都是内过氧化物, 与检测过的蒿属粗提取物相比较, 显示明显更好的抗 BVDV 活性。因为 BVDV 与 HCV 有许多相似性, 青蒿素、青蒿琥酯、蒿甲醚、双氢青蒿素及其他可能的过氧化物可能具有强的和选择性的抗 HCV 的抗病毒性质。

尽管本发明按期望已经描述了优选的具体实施方式, 但可以理解的是, 本发明并不仅仅局限于此, 因为对其作出的变化和修饰也属于所附权利要求书中所定义的本发明完整范围内。

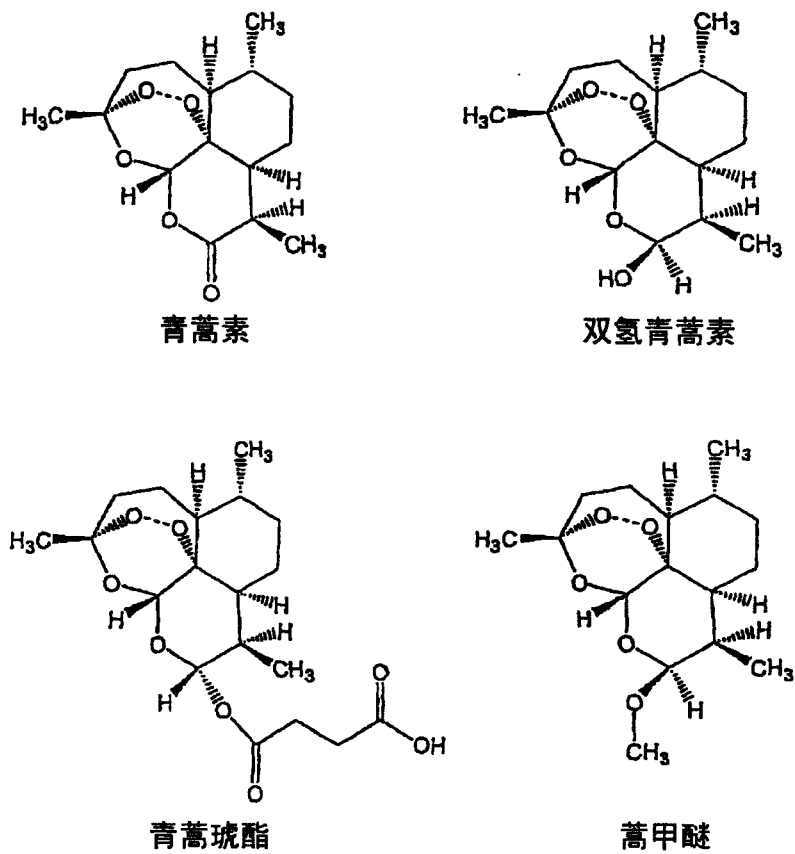


图1