



## (12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105232562 B

(45)授权公告日 2019.06.28

(21)申请号 201410321248.8

C12R 1/93(2006.01)

(22)申请日 2014.07.07

(56)对比文件

(65)同一申请的已公布的文献号

CN 101029313 A, 2007.09.05, 说明书实施例1.

申请公布号 CN 105232562 A

CN 101631463 A, 2010.01.20, 说明书第1-18页.

(43)申请公布日 2016.01.13

CN 101631463 A, 2010.01.20, 说明书第1-18页.

(73)专利权人 中国科学院上海巴斯德研究所

地址 200025 上海市黄浦区合肥路411号

(72)发明人 R·艾德铭 B·本杰明 邹罡

杨素勤等. 环巴胺衍生物的研究进展.《广州化工》.2013,第41卷(第9期),第23-26页.

(74)专利代理机构 上海一平知识产权代理有限公司

公司 31266

代理人 马莉华 崔佳佳

顾文龙等. 环巴胺及其类似物的抗肿瘤作用.《药学进展》.2009,第33卷(第2期),第68-69页.

(51)Int.Cl.

A61K 31/58(2006.01)

A61P 31/14(2006.01)

C07K 14/135(2006.01)

C12N 7/00(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/569(2006.01)

顾文龙等. 环巴胺及其类似物的抗肿瘤作用.《药学进展》.2009,第33卷(第2期),第68-69页.

审查员 童欣

权利要求书1页 说明书13页

序列表2页 附图4页

### (54)发明名称

一种人呼吸道合胞病毒的抑制剂和抗病毒药物设计靶点

### (57)摘要

本发明提供了一种环巴胺或环巴胺类似物在制备试剂中的用途,用于抑制呼吸道合胞病毒。本发明还提供了一种呼吸道合胞病毒的抑制剂,所述抑制剂以M2-1蛋白为靶点抑制所述呼吸道合胞病毒的生长或繁殖。本发明还提供了一种呼吸道合胞病毒耐药毒株,所述毒株的M2-1蛋白发生了突变,并且所述突变导致所述呼吸道合胞病毒产生了耐药性。实验结果表明,该抑制剂在体内和体外均可有效的抑制人呼吸道合胞病毒的生长和繁殖。进一步地实验证明该抑制剂以参与病毒RNA复制的M2-1蛋白为靶点。

1. 环巴胺在制备试剂中的用途,其特征在于,所述试剂用于抑制呼吸道合胞病毒的复制。
2. 环巴胺在制备试剂中的用途,其特征在于,所述试剂用于抑制呼吸道合胞病毒M2-1蛋白的合成。
3. 如权利要求1所述的用途,其特征在于,所述试剂与呼吸道合胞病毒M2-1蛋白的151位氨基酸结合。
4. 如权利要求1所述的用途,其中,所述试剂包括药物。
5. 一种体外非治疗性地抑制呼吸道合胞病毒生长或者杀灭呼吸道合胞病毒的方法,其特征在于,包括步骤:在需要处理的场所使用环巴胺或其药学上可接受的盐。

## 一种人呼吸道合胞病毒的抑制剂和抗病毒药物设计靶点

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物医药领域,具体地说,本发明涉及一种人呼吸道合胞病毒的抑制剂和抗病毒药物设计靶点。

### 背景技术

[0002] 呼吸道合胞病毒是一种RNA病毒,属副粘液病毒科。该病经空气飞沫和密切接触传播。多见于新生儿和6个月以内的婴儿。潜伏期3~7日。婴幼儿症状较重,感染后出现高热、鼻炎、咽炎及喉炎,以后表现为细支气管炎及肺炎。少数病儿可并发中耳炎、胸膜炎及心肌炎等。成人和年长儿童感染后,主要表现为上呼吸道感染。

[0003] 到目前为止,尚无治疗人呼吸道合胞病毒(human respiratory syncytial virus, hRSV)感染的小分子化合物被FDA批准,唯一适用于预防高危儿童感染hRSV的措施是注射针对病毒F蛋白的人源化单克隆抗体帕利珠单抗(palivizumab, Synagis)。因此本领域技术人员一直致力于开发一种能够治疗呼吸道合胞病毒感染的小分子化合物。

[0004] 环巴胺(Cyclopamine, CPM)又称环杷明、去氧芥芬胺,是从藜芦属植物内分离得到的一种异甾体类生物碱,主要存在百合科植物中北美山藜芦(*Veratrum californicum*)、印第安鹿食草(*Cornlily*)及毛叶藜芦(*Veratrum grandiflorum*)、伊贝(*Fritillaria pallidiflora* Schrenk)四种植物中,能与Hedgehog信号通路中的Smoothed(Smo)蛋白结合,从而抑制该蛋白活性。因其致畸作用而于20世纪60年代被发现,但九十年代以后的研究表明,环巴胺是一种hedgehog信号通路抑制剂,已经在果蝇体中得到证实,由于hedgehog信号通路的突变与多种肿瘤的发病有关联,最近研究发现,环巴胺在成人中具有抗肿瘤作用,且在胰腺癌、胆管癌、卵巢癌、肝癌等的体内或体外实验中均得到证实。目前环巴胺作为一种潜在的抗肿瘤新药在世界范围内掀起了研究热潮。

### 发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供一种环巴胺及其类似物的新用途。

[0006] 本发明的另一目的在于提供抑制呼吸道合胞病毒的新的靶点。

[0007] 本发明的第一方面,提供了环巴胺或环巴胺类似物在制备试剂中的用途,所述试剂用于:

[0008] (i) 抑制呼吸道合胞病毒的复制;

[0009] (ii) 抑制呼吸道合胞病毒M2-1蛋白的合成,和/或

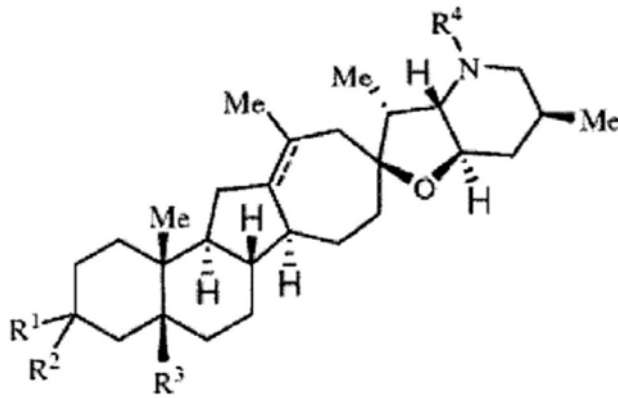
[0010] (iii) 与呼吸道合胞病毒M2-1蛋白的151位氨基酸结合。

[0011] 在另一优选例中,所述环巴胺类似物包括公开号为CN101631463A的中国专利文献中所披露的环巴胺类似物。

[0012] 在另一优选例中,所述试剂包括药物。

[0013] 在另一优选例中,所述环巴胺类似物结构如式I所示,

[0014]



(I)

[0015] 式中,  $R^1$  是 H、烷基、氨基、亚磺酰氨基、磺酰氨基、 $-OC(O)R^5$ 、 $-N(R^5)C(O)R^5$  或糖;

[0016]  $R^2$  是 H、烷基、烯基、炔基、芳基、环烷基、腈或杂环烷基; 或者  $R^1$  和  $R^2$  一起形成  $=O$ 、 $=S$ 、 $=N(R)$ 、 $=N(NR_2)$  或  $=C(R)_2$ ;

[0017]  $R^3$  是 H、烷基、烯基或炔基;

[0018]  $R^4$  是 H、烷基、烯基、炔基、芳基、环烷基、杂环烷基、芳烷基、杂芳基、杂芳烷基、卤代烷基、 $-OR^5$ 、 $-C(O)R^5$ 、 $-CO_2R^5$ 、 $-SO_2R^5$ 、 $-C(O)N(R^5)(R^5)$ 、 $-[C(R)_2]_qR^5$ 、 $-[(W)-N(R)C(O)]_qR^5$ 、 $-[(W)-C(O)]_qR^5$ 、 $-[(W)-C(O)O]_qR^5$ 、 $-[(W)-OC(O)]_qR^5$ 、 $-[(W)-SO_2]_qR^5$ 、 $-[(W)-N(R^5)SO_2]_qR^5$ 、 $-[(W)-C(O)N(R^5)]_qR^5$ 、 $-[(W)-O]_qR^5$ 、 $-[(W)-N(R)]_qR^5$ 、 $-W-NR_3^+X^-$  或  $-[(W)-S]_qR^5$ ;

[0019] 其中, W 各自独立地是二价烷基;

[0020] R 各自独立地是 H 或烷基;

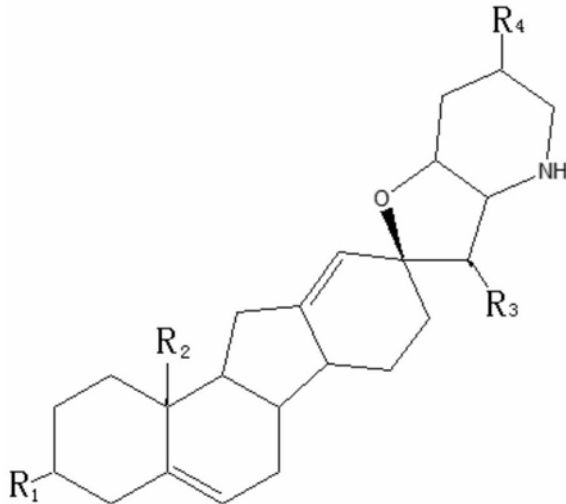
[0021] q 各自独立地是 1、2、3、4、5 或 6;

[0022]  $X^-$  是卤素;

[0023]  $R^5$  各自独立地是 H、烷基、烯基、炔基、芳基、环烷基、杂环烷基、芳烷基、杂芳基、杂芳烷基或  $-[C(R)_2]_pR^6$ ; 其中 p 为 0-6; 或者同一取代基上的任何两个  $R^5$  可一起形成含有 0-3 个杂原子的 4-8 元任选取代的环, 所述杂原子选自 N、O、S 或 P;  $R^6$  各自独立地是羟基、 $-N(R)COR$ 、 $-N(R)C(O)OR$ 、 $-N(R)SO_2(R)$ 、 $-C(O)N(R)_2$ 、 $-OC(O)N(R)(R)$ 、 $-SO_2N(R)(R)$ 、 $-N(R)(R)$ 、 $-COOR$ 、 $-C(O)N(OH)(R)$ 、 $-OS(O)_2OR$ 、 $-S(O)_2OR$ 、 $-OP(O)(OR)(OR)$ 、 $-NP(O)(OR)(OR)$  或  $-P(O)(OR)(OR)$ ; 限制条件是, 当  $R^2$ 、 $R^3$  和  $R^4$  是 H 时;  $R^1$  不是羟基或糖; 限制条件还有, 当  $R^4$  是羟基时,  $R^1$  不是糖或羟基; 限制条件还有, 当  $R^4$  是羟基时,  $R^1$  和  $R^2$  一起不是  $C=O$ 。

[0024] 在另一优选例中, 所述环巴胺及其类似物包括结构如式 II 所示的化合物,

[0025]



(II)

[0026] 式中,  $R_1$  是 H、OH、烷基、氨基、亚磺酰氨基、磺酰氨基、 $-OC(O)R_5$ 、 $-N(R_5)C(O)R_5$  或糖;

[0027]  $R_2$  是 H、烷基、烯基、炔基、芳基、环烷基、腈或杂环烷基;

[0028]  $R_3$  是 H、烷基、烯基或炔基;

[0029]  $R_4$  是 H、烷基、烯基、炔基、芳基、环烷基、杂环烷基、芳烷基、杂芳基、杂芳烷基、卤代烷基、 $-OR_5$ 、 $-C(O)R_5$ 、 $-CO_2R_5$ 、 $-SO_2R_5$ 、 $-C(O)N(R_5)(R_5)$ 、 $-[C(R)_2]_q-R_5$ 、 $-[(W)-N(R)C(O)]_qR_5$ 、 $-[(W)-C(O)]_qR_5$ 、 $-[(W)-C(O)O]_qR_5$ 、 $-[(W)-OC(O)]_qR_5$ 、 $-[(W)-SO_2]_qR_5$ 、 $-[(W)-N(R^5)SO_2]_qR_5$ 、 $-[(W)-C(O)N(R_5)]_qR_5$ 、 $-[(W)-O]_qR_5$ 、 $-[(W)-N(R)]_qR_5$ 、 $-W-NR_5^+X^-$  或  $-[(W)-S]_qR_5$ ;

[0030] 其中, W 各自独立地是二价烷基;

[0031] R 各自独立地是 H 或烷基;

[0032] q 各自独立地是 1、2、3、4、5 或 6;

[0033]  $X^-$  是卤素;

[0034]  $R^5$  各自独立地是 H、烷基、烯基、炔基、芳基、环烷基、杂环烷基、芳烷基、杂芳基、杂芳烷基或  $-[C(R)_2]_p-R_6$ ; 其中 p 为 0-6; 或者同一取代基上的任何两个  $R_5$  可一起形成含有 0-3 个杂原子的 4-8 元任选取代的环, 所述杂原子选自 N、O、S 或 P;  $R_6$  各自独立地是羟基、 $-N(R)COR$ 、 $-N(R)C(O)OR$ 、 $-N(R)SO_2(R)$ 、 $-C(O)N(R)_2$ 、 $-OC(O)N(R)(R)$ 、 $-SO_2N(R)(R)$ 、 $-N(R)(R)$ 、 $-COOR$ 、 $-C(O)N(OH)(R)$ 、 $-OS(O)_2OR$ 、 $-S(O)_2OR$ 、 $-OP(O)(OR)(OR)$ 、 $-NP(O)(OR)(OR)$  或  $-P(O)(OR)(OR)$ 。

[0035] 在另一优选例中, 所述式 II 中,  $R_1$  选自 OH、H、取代或未取代的 C1-C3 烷基;

[0036]  $R_2$  选自取代或未取代的 C1-C3 烷基、烯基、炔基;

[0037]  $R_3$  选自取代或未取代的 C1-C3 烷基、烯基、炔基;

[0038]  $R_4$  选自取代或未取代的 C1-C3 烷基、烯基、炔基;

[0039] 其中所述取代是指, 指烃基上的一个或多个氢原子被选自下组的取代基取代: C1~C10 烷基、C3~C10 环烷基、C1~C10 烷氧基、羟基、羧基、C1~C10 羰基、C1~C10 酰胺基、C2~C10 酯基、C6~C30 芳基、卤素原子、氰基和硫醚基。

[0040] 在另一优选例中, 所述  $R_1$  为 OH, 所述  $R_2$  为甲基, 所述  $R_3$  为甲基, 所述  $R_4$  为甲基。

[0041] 本发明的第二方面, 提供了一种呼吸道合胞病毒的抑制剂, 所述抑制剂以 M2-1 蛋白为靶点, 抑制所述呼吸道合胞病毒的生长或繁殖。

- [0042] 在另一优选例中,所述抑制剂选自:
- [0043] (1) 环巴胺;和
- [0044] (2) 环巴胺类似物。
- [0045] 在另一优选例中,所述呼吸道合胞病毒为人呼吸道合胞病毒。
- [0046] 在另一优选例中,所述抑制剂对呼吸道合胞病毒的抑制作用不依赖于刺猬 信号通路。
- [0047] 在另一优选例中,所述环巴胺类似物结构如上所述。
- [0048] 本发明的第三方面,提供了一种复合物,所述复合物如式III所示
- [0049] A-B III
- [0050] 其中,A为环巴胺或其类似物;B为呼吸道合胞病毒的M2-1蛋白。
- [0051] 在另一优选例中,所述复合物中,A和B的结合位点包括R151氨基酸。
- [0052] 本发明的第四方面,提供了一种药物组合物,所述的药物组合物含有本发 明第二方面所述的抑制剂或其药学上可接受的盐以及药学上可接受的载体。
- [0053] 本发明的第五方面,提供了一种呼吸道合胞病毒耐药毒株,所述毒株的 M2-1蛋白发生了突变,并且所述突变导致所述呼吸道合胞病毒产生了耐药性。
- [0054] 在另一优选例中,所述突变发生在M2-1蛋白的第151位。
- [0055] 在另一优选例中,所述M2-1蛋白的第151位氨基酸由精氨酸突变为赖氨 酸。
- [0056] 本发明的第六方面,提供了本发明第五方面所述的耐药毒株的用途,用于 筛选抑制或杀灭呼吸道合胞病毒的药剂或试剂。
- [0057] 本发明的第七方面,提供了一种本发明第五方面所述的呼吸道合胞病毒耐 药毒株的抑制剂,所述抑制剂能抑制或杀灭本发明第五方面所述的的耐药毒 株。
- [0058] 本发明的第八方面,提供了一种筛选药物的方法,所述方法包括:将待筛 选药物与呼吸道合胞病毒或者呼吸道合胞病毒的M2-1蛋白接触,并检测是否 形成本发明第三方面所述的所述的复合物。
- [0059] 在另一优选例中,所述待筛选药物包括环巴胺及其类似物。
- [0060] 本发明的第九方面,提供了一种体外非治疗性地抑制呼吸道合胞病毒生长 或者杀灭呼吸道合胞病毒的方法,包括步骤:在需要处理的场所使用本发明的本 发明第二方面所述的所述的抑制剂或其药学上可接受的盐。
- [0061] 应理解,在本发明范围内中,本发明的上述各技术特征和在下文(如实施 例)中具体描述的各技术特征之间都可以互相组合,从而构成新的或优选的技 术方案。限于篇幅,在此不再一一累述。

## 附图说明

- [0062] 图1显示环巴胺能够在hRSV病毒吸附细胞后抑制病毒感染。图1A显示了 环巴胺在病毒吸附前和吸附后对hRSV抑制作用的剂量依赖实验。图1B显示了 环巴胺以及番茄碱对hRSV抑制作用的剂量依赖实验,图1C显示了细胞毒性测 定结果。
- [0063] 图2显示药物GDC-0449和LY2940680并不抑制hRSV感染。图2A为药物 GDC-0449和LY2940680对hRSV抑制作用的剂量依赖实验结果。图2B为环巴 胺与1 $\mu$ M GDC-0449或1 $\mu$ M LY2940680联合使用对hRSV抑制作用的剂量依 赖实验结果。

[0064] 图3显示了hRSV对环巴胺的耐药株均含有M2-1 R151K突变。图3A显示了M2-1部分蛋白与其中一株耐药株的序列比对,在151位氨基酸上本发明人发现了从精氨酸到赖氨酸的突变。图3B左图显示了环巴胺对hRSV野生型和耐药株抑制作用的剂量依赖实验;右图显示了耐药株和野生型病毒在突变位点附近的测序图谱,其中耐药株1和2在151位还有一些双峰,说明病毒尚未完全转变成耐药株,这也解释了为什么耐药株3的耐药性最强。

[0065] 图4显示了环巴胺抑制病毒的转录。

[0066] 图5显示了M2-1蛋白含有2个与环巴胺结合的潜在位点。

[0067] 图6显示了环巴胺在BALB/c小鼠模型上的抗病毒活性。

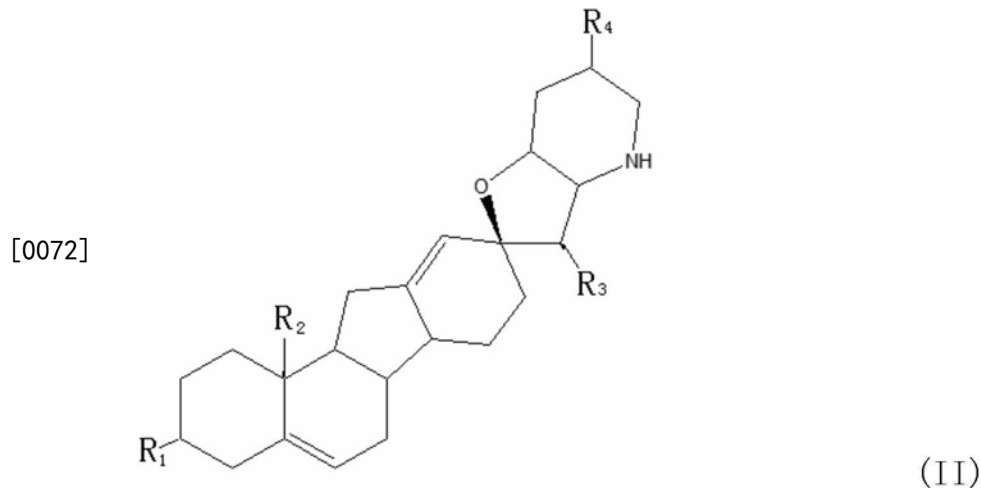
### 具体实施方式

[0068] 本发明人通过广泛而深入的研究,意外的发现,环巴胺或环巴胺类似物能够有效地抑制呼吸道合胞病毒。实验结果表明,该类抑制剂在体内和体外均可有效的抑制人呼吸道合胞病毒的生长和繁殖。进一步地实验证明该抑制剂以参与病毒RNA复制的M2-1蛋白为靶点。

[0069] 环巴胺及其类似物

[0070] 环巴胺及其类似物是刺猬信号通路(Sonic hedgehog pathway, ShhP)的特异性抑制剂,它特异性作用于通路中的smoothened蛋白,抑制刺猬信号通路可能致畸。在中国专利申请申请号CN200780051114.7(公开号CN101631463A),公开了一系列的环巴胺及其类似物的结构。这样的结构类似物也在美国专利申请US20080293754A1中有所记载。

[0071] 在一个优选地的实施方式中,本发明所述的环巴胺及其类似物包括结构如式II所示的化合物,



[0073] 式中,  $R_1$  是H、OH、烷基、氨基、亚磺酰氨基、磺酰氨基、 $-OC(O)R_5$ 、 $-N(R_5)C(O)R_5$ 或糖;

[0074]  $R_2$  是H、烷基、烯基、炔基、芳基、环烷基、腈或杂环烷基;

[0075]  $R^3$  是H、烷基、烯基或炔基;

[0076]  $R^4$  是H、烷基、烯基、炔基、芳基、环烷基、杂环烷基、芳烷基、杂芳基、杂芳烷基、卤代烷基、 $-OR_5$ 、 $-C(O)R_5$ 、 $-CO_2R_5$ 、 $-SO_2R_5$ 、 $-C(O)N(R_5)(R_5)$ 、 $-[C(R)_2]_qR_5$ 、 $-[(W)-N(R)C(O)]_qR_5$ 、 $-[(W)-C(O)]_qR_5$ 、 $-[(W)-C(O)O]_qR_5$ 、 $-[(W)-OC(O)]_qR_5$ 、 $-[(W)-SO_2]_qR_5$ 、 $-[(W)-N(R^5)SO_2]_qR_5$ 、 $-[(W)-C(O)N(R_5)]_qR_5$ 、 $-[(W)-O]_qR_5$ 、 $-[(W)-N(R)]_qR_5$ 、 $-W-NR_5^+X^-$ 或 $-[(W)-S]_qR_5$ ;

[0077] 其中,W各自独立地是二价烷基;

[0078] R各自独立地是H或烷基;

[0079] q各自独立地是1、2、3、4、5或6;

[0080] X<sup>-</sup>是卤素;

[0081] R<sup>5</sup>各自独立地是H、烷基、烯基、炔基、芳基、环烷基、杂环烷基、芳烷基、杂芳基、杂芳烷基或-[C(R)<sub>2</sub>]<sub>p</sub>-R<sub>6</sub>;其中p为0-6;或者同一取代基上的任何两个R<sub>5</sub>可一起形成含有0-3个杂原子的4-8元任选取代的环,所述杂原子选自N、O、S或P;R<sub>6</sub>各自独立地是羟基、-N(R)COR、-N(R)C(O)OR、-N(R)SO<sub>2</sub>(R)、-C(O)N(R)<sub>2</sub>、-OC(O)N(R)(R)、-SO<sub>2</sub>N(R)(R)、-N(R)(R)、-COOR、-C(O)N(OH)(R)、-OS(O)<sub>2</sub>OR、-S(O)<sub>2</sub>OR、-OP(O)(OR)(OR)、-NP(O)(OR)(OR)或-P(O)(OR)(OR)。

[0082] 在另一优选例中,所述式II中,R<sub>1</sub>选自OH、H、取代或未取代的C1-C3烷基;

[0083] R<sub>2</sub>选自取代或未取代的C1-C3烷基、烯基、炔基;

[0084] R<sub>3</sub>选自取代或未取代的C1-C3烷基、烯基、炔基;

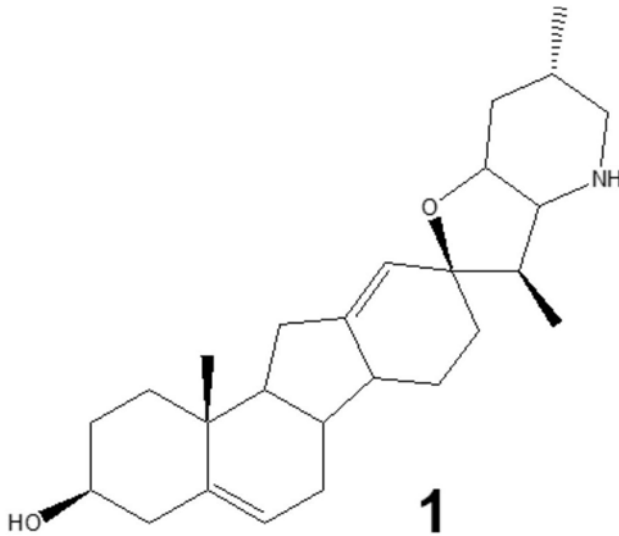
[0085] R<sub>4</sub>选自取代或未取代的C1-C3烷基、烯基、炔基;

[0086] 其中所述取代是指,指烃基上的一个或多个氢原子被选自下组的取代基取代:C1~C10烷基、C3~C10环烷基、C1~C10烷氧基、羟基、羧基、C1~C10羰基、C1~C10酰胺基、C2~C10酯基、C6~C30芳基、卤素原子、氰基和硫醚基。

[0087] 在另一优选例中,所述R<sub>1</sub>为OH,所述R<sub>2</sub>为甲基,所述R<sub>3</sub>为甲基,所述R<sub>4</sub>为甲基。

[0088] 一个典型的环巴胺结构如式1所示。

[0089]



[0090] M2-1蛋白

[0091] M2-1蛋白是病毒基因组复制的加工因子。当M2-1功能受影响时80%的转录可以被抑制<sup>[1,2]</sup>,本发明通过分子模拟对接显示了2个潜在的环巴胺与M2-1结合位点。M2-1蛋白与磷酸化蛋白复制复合体、核衣壳蛋白以及聚合酶是新的抗hRSV药物靶点,环巴胺和其结构类似物可以通过抑制M2-1的功能从而抑制病毒。环巴胺及其特异的结构类似物而非smoothened蛋白结合分子有望成为新的RSV治疗药物,这种药物针对M2-1蛋白而不影响刺猬信号通路。

[0092] M2-1蛋白的氨基酸序列如下所示:

[0093] MSRRNPCKFE IRGHCLNGKR CHFShNYFEW PPHALLVRQN FMLNRILKSM DKSIDTLSEI SGAAELDRTE EYALGVVGVLE SYIGSINNI TKQSACVAMS KLLTELNSDD IKKLRDNEEL NSPKIRVYNT VISYIESNRK NNKQTIHLK RLPADVLKKT IKNTLDIHK ITINPKELT VSDTNDHAKN NDTT (SEQ ID NO.: 1, gb|AAX23995.1|)

[0094] 活性成分

[0095] 如本文所用,术语“环巴胺及其类似物”包括环巴胺及其类似物的各种晶型形式、药学上可接受的盐、水合物或溶剂合物。

[0096] 如本文所用,术语“药学上可接受的盐”指本发明化合物与酸或碱所形成的适合用作药物的盐。药学上可接受的盐包括无机盐和有机盐。一类优选的盐是本发明化合物与酸形成的盐。适合形成盐的酸包括但不限于:盐酸、氢溴酸、氢氟酸、硫酸、硝酸、磷酸等无机酸,甲酸、乙酸、丙酸、草酸、丙二酸、琥珀酸、富马酸、马来酸、乳酸、苹果酸、酒石酸、柠檬酸、苦味酸、甲磺酸、苯甲磺酸,苯磺酸等有机酸;以及天冬氨酸、谷氨酸等酸性氨基酸。

[0097] 药物组合物和施用方法

[0098] 由于本发明人发现本发明所涉及的化合物“环巴胺及其类似物”具有优异的抗RSV的作用,因此本发明化合物及其各种晶型,药学上可接受的无机或有机盐,水合物或溶剂合物,以及含有本发明化合物为主要活性成分的药物组合物可用于治疗、预防以及缓解由RSV感染所导致的疾病。

[0099] 本发明的药物组合物包含安全有效量范围内的本发明化合物或其药理上可接受的盐及药理上可以接受的赋形剂或载体。其中“安全有效量”指的是:化合物的量足以明显改善病情,而不至于产生严重的副作用。通常,药物组合物含有1-2000mg本发明化合物/剂,更佳地,含有10-200mg本发明化合物/剂。更佳地,所述的“一剂”为一个胶囊或药片。

[0100] “药学上可以接受的载体”指的是:一种或多种相容性固体或液体填料或凝胶物质,它们适合于人使用,而且必须有足够的纯度和足够低的毒性。“相容性”在此指的是组合物中各组份能和本发明的化合物以及它们之间相互掺和,而不明显降低化合物的药效。药学上可以接受的载体部分例子有纤维素及其衍生物(如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素钠、纤维素乙酸酯等)、明胶、滑石、固体润滑剂(如硬脂酸、硬脂酸镁)、硫酸钙、植物油(如豆油、芝麻油、花生油、橄榄油等)、多元醇(如丙二醇、甘油、甘露醇、山梨醇等)、乳化剂(如吐温®)、润湿剂(如十二烷基硫酸钠)、着色剂、调味剂、稳定剂、抗氧化剂、防腐剂、无热原水等。

[0101] 本发明化合物或药物组合物的施用方式没有特别限制,代表性的施用方式包括(但不限于):口服、肠胃外(静脉内、肌肉内或皮下)、和局部给药。

[0102] 用于口服给药的固体剂型包括胶囊剂、片剂、丸剂、散剂和颗粒剂。在这些固体剂型中,活性化合物与至少一种常规惰性赋形剂(或载体)混合,如柠檬酸钠或磷酸二钙,或与下述成分混合:(a) 填料或增容剂,例如,淀粉、乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露醇和硅酸;(b) 粘合剂,例如,羟甲基纤维素、藻酸盐、明胶、聚乙烯基吡咯烷酮、蔗糖和阿拉伯胶;(c) 保湿剂,例如,甘油;(d) 崩解剂,例如,琼脂、碳酸钙、马铃薯淀粉或木薯淀粉、藻酸、某些复合硅酸盐、和碳酸钠;(e) 缓溶剂,例如石蜡;(f) 吸收加速剂,例如,季胺化合物;(g) 润湿剂,例如鲸蜡醇和单硬脂酸甘油酯;(h) 吸附剂,例如,高岭土;和(i) 润滑剂,例如,滑石、硬脂酸钙、硬脂酸镁、固体聚乙二醇、十二烷基硫酸钠,或其混合物。胶囊剂、片剂和丸剂中,剂型

也可包含缓冲剂。

[0103] 固体剂型如片剂、糖丸、胶囊剂、丸剂和颗粒剂可采用包衣和壳材制备,如肠衣和其它本领域公知的材料。它们可包含不透明剂,并且,这种组合中活性化合物或化合物的释放可以延迟的方式在消化道内的某一部分中释放。可采用的包埋组分的实例是聚合物物质和蜡类物质。必要时,活性化合物也可与上述赋形剂中的一种或多种形成微胶囊形式。

[0104] 用于口服给药的液体剂型包括药学上可接受的乳液、溶液、悬浮液、糖浆或酏剂。除了活性化合物外,液体剂型可包含本领域中常规采用的惰性稀释剂,如水或其它溶剂,增溶剂和乳化剂,例如,乙醇、异丙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、丙二醇、1,3-丁二醇、二甲基甲酰胺以及油,特别是棉籽油、花生油、玉米胚油、橄榄油、蓖麻油和芝麻油或这些物质的混合物等。

[0105] 除了这些惰性稀释剂外,组合物也可包含助剂,如润湿剂、乳化剂和悬浮剂、甜味剂、矫味剂和香料。

[0106] 除了活性化合物外,悬浮液可包含悬浮剂,例如,乙氧基化异十八烷醇、聚氧乙烯山梨醇和脱水山梨醇酯、微晶纤维素、甲醇铝和琼脂或这些物质的混合物等。

[0107] 用于肠胃外注射的组合物可包含生理上可接受的无菌含水或无水溶液、分散液、悬浮液或乳液,和用于重新溶解成无菌的可注射溶液或分散液的无菌粉末。适宜的含水和非水载体、稀释剂、溶剂或赋形剂包括水、乙醇、多元醇及其适宜的混合物。

[0108] 用于局部给药的本发明化合物的剂型包括软膏剂、散剂、贴剂、喷射剂和吸入剂。活性成分在无菌条件下与生理上可接受的载体及任何防腐剂、缓冲剂,或必要时可能需要的推进剂一起混合。

[0109] 本发明化合物可以单独给药,或者与其他药学上可接受的化合物联合给药。

[0110] 使用药物组合物时,是将安全有效量的本发明化合物适用于需要治疗的哺乳动物(如人),其中施用剂量为药学上认为的有效给药剂量,对于60kg体重的人而言,日给药剂量通常为1~2000mg,优选20~500mg。当然,具体剂量还应考虑给药途径、病人健康状况等因素,这些都是熟练医师技能范围内的。

[0111] 本发明公开了人呼吸道合胞病毒(human respiratory syncytial virus, hRSV) RNA复制加工因子M2-1蛋白可以用作抗病毒药物设计靶点。同时描述了一种针对M2-1蛋白的小分子化合物抑制剂——环巴胺。环巴胺的结构类似物和其它理性设计合成的针对病毒M2-1蛋白的化合物可以用于抑制hRSV的体外感染。

[0112] 本发明人研究发现环巴胺可以通过另一种机制抑制hRSV感染。实验证明hRSV复制可以被环巴胺抑制并证实参与病毒RNA复制的M2-1蛋白是环巴胺的作用靶点,并且除了环巴胺以外的smoothened蛋白抑制剂并不抑制hRSV复制,证实M2-1蛋白特异性抑制剂可以抑制hRSV,而且这种抑制作用不依赖于与smoothened蛋白的相互作用。

[0113] 环巴胺对hRSV的抑制效果具有特异性,它并不抑制人副流感3型病毒,该病毒并不编码M2-1类似的蛋白。环巴胺的抑制效果在病毒吸附细胞后会更明显( $IC_{50}=112nM$ ),在无细胞毒的浓度下,它能有效的抑制病毒复制。为了判断环巴胺抑制hRSV感染是否通过抑制刺猬信号通路,本发明人测试了环巴胺的一个结构类似物番茄碱(tomatidine)和其它smoothened蛋白的抑制剂和激活剂,本发明人发现番茄碱,GDC-0449,和LY2940680对hRSV

都没有抑制作用。

[0114] 本发明人通过在病毒盲传过程中逐步增加药物浓度的方式筛选到了3株耐药株，全基因组测序揭示一个共同的突变位于M2-1基因，导致M2-1蛋白151位氨基酸由精氨酸突变成了赖氨酸。

[0115] 本发明的主要优点在于：

[0116] (1) 首次揭示了环巴胺及其结构类似物对hRSV抑制作用；

[0117] (2) 首次揭示了hRSV的M2-1蛋白可以作为hRSV抑制剂的作用靶点。

[0118] (3) 首次发现将M2-1蛋白151位氨基酸由精氨酸突变为赖氨酸形成的突变株具有耐受环巴胺的能力。

[0119] 下面结合具体实施例，进一步阐述本发明。应理解，这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件如Sambrook等人，分子克隆：实验室手册(New York:Cold Spring Harbor Laboratory Press,1989)中所述的条件，或按照制造厂商所建议的条件。除非另外说明，否则百分比和份数按重量计算。

[0120] 材料和方法：

[0121] 细胞、病毒和化合物

[0122] 人呼吸道合胞病毒Long株(ATCC编号VR-26)以及HEp-2细胞(ATCC编号 CCL-23)可以购自美国ATCC。细胞在含有青霉素/链霉素的双抗和10%胎牛血清的DMEM培养基中培养，培养条件为37℃，5%的CO<sub>2</sub>。病毒在相同培养条件下的HEp-2细胞中传代培养，但是培养基中胎牛血清的浓度为2%。通过用0.1的病毒感染复数(Multiplicity of infection, MOI)的病毒感染长满单层的HEp-2细胞，感染后二至三天，当病变的细胞达到约30%的时候停止培养并收集病毒。病毒的收集是将细胞连同感染的培养基上清经过-80℃冻融一次以充分释放结合的病毒，然后在4℃，2000g条件下离心10分钟。将上清液轻轻混匀，分装，储存在-80℃备用。化合物环巴胺是从Logan Natural Products(Plano, USA)购得，GDC-0449从Selleck Chemicals购得，LY2940680从Biochempartner 购得，tomatidine从Yingxuan Pharmaceutical购得。

[0123] 病毒效价的测定

[0124] 病毒效价通过空斑实验测定，在长满单层HEp-2细胞的24孔板中加入梯度稀释的病毒在37℃孵育1.5小时，使病毒吸附在细胞表面。用PBS溶液洗两次，加入含0.75%的羧甲基纤维素(Carboxymethyl Cellulose,CMC)、青霉素/链霉素的双抗和2%FBS的DMEM培养基。37℃培养72小时后吸除感染的培养基，用PBS洗三次，每次5分钟，然后室温下用含4%PFA的PBS固定30分钟，用PBS洗三次，每次5分钟后加入1:1000稀释的hRSV F一抗(mouse-Fitzgerald,Acton,MA)室温孵育1小时。再次用含0.02%Tween20的PBS清洗后，加入1:6000稀释的HRP标记的羊抗鼠二抗(Bethyl, Montgomery, TX)室温孵育1小时，最后用PBS-0.02%Tween20洗一遍，然后加入True Blue过氧化物酶底物(KPL, Gaithersburg, MD)，直到蓝点出现。细胞用流水轻轻冲洗，晾干，用常规扫描仪扫描，统计蓝斑的数量和大小。

[0125] 空斑减少实验和细胞毒性的测定

[0126] 为了测试化合物的抗hRSV病毒活性，本发明人在24孔板或96孔板中进行空斑减

少实验。病毒感染和免疫染色如上述,每个孔中加入含有50-100个空斑的病毒。分别在4℃吸附1小时或37℃感染1.5小时,又或37℃吸附后加入化合物培养72小时,然后测量他们的抗病毒活性。化合物对细胞的毒性是利用CellTiter-Glo®发光法细胞活力检测试剂盒(Promega, Madison, WI)测定,操作方法严格按照试剂盒说明书。

[0127] hRSV病毒的耐药突变株的筛选

[0128] 耐药株是通过在病毒盲传过程中逐步增加药物浓度来筛选获得的。在12孔板中接种HEp-2细胞,  $3 \times 10^5$ 个/孔, 37℃培养过夜,第二天用0.1感染复数的hRSV病毒感染细胞,同时在培养基中加入终浓度为100nM的环巴胺,培养3天,再将上清中的病毒在此浓度下盲传1代,然后分别在200, 400, 600, 和800nM的浓度下各传2代,最终在1μM的浓度下盲传2代,总共12代,盲传采用在传代培养过程中每天观察细胞病变情况的方式,决定病毒培养的最佳时间。同时以野生型病毒在不加环巴胺的培养基中平行传代作为对照。在1μM的浓度下,不加环巴胺传代的病毒将不会导致细胞病变,而盲传后的病毒仍然可以导致细胞病变,这说明产生了耐药突变。本发明人平行筛选了三株耐药毒株,扩增后保存在-80℃备用。

[0129] 病毒基因组的抽提、扩增和测序

[0130] 根据生产商的说明,用TIANamp Virus RNA exctraction Kit(北京天根生化科技公司)提取病毒感染细胞后上清中的病毒RNA,通过SuperScript III One-Step RT-PCR试剂盒(Invitrogen)扩增,扩增产物用TIANgel Midi Purification Kit(北京天根生化科技公司)进行胶回收后送往上海生工测序,测序结果通过Lasergene SeqMan Pro v.7.1(DNASTAR, Madison, WI)软件进行分析。

[0131] 细胞内病毒RNA水平定量分析

[0132] 先用PBS清洗药物处理过及没有用药物处理的细胞然后用RNAprep Pure Cell/Bacteria Kit(北京天根生化科技公司)提取病毒RNA。RNA的含量用hRSV聚合酶基因的特异性引物<sup>[4]</sup>和Quant One Step qRT-PCR Kit(北京天根生化科技公司)进行实时荧光定量反转录PCR测定,病毒RNA的含量用细胞内GAPDH含量的倍数计算<sup>[5]</sup>。

[0133] 分子对接模拟

[0134] 环巴胺的结构从Zinc数据库获得<sup>[6][7]</sup>, M2-1蛋白结构从PDB获取(登陆号为4C3B),结构模拟是在M2-1单体结构上进行的,模拟前水分子被移除,所有这些模拟都是用Autodock Vina软件进行。起始模拟是在M2-1全部核心结构域范围内搜索,全面性参数被设为32。预测结果分为2类,然后更为精细的模拟在它们附近更小的区域进行,共产生了20个模型。这些模型被可视化,分析,高分辨率的图片采用PyMOL v.1.3软件(Schrödinger, LLC)生成。

[0135] 实施例1环巴胺对hRSV的抑制效果

[0136] 1. 实验结果表明环巴胺对hRSV的抑制效果在病毒吸附细胞后再加入化合物更为显著,环巴胺在病毒吸附细胞后和吸附前的IC<sub>50</sub>值分别为115nM和535 nM, IC<sub>95</sub>值则分别为404nM和5.4μM。环巴胺的结构类似物番茄碱对hRSV则无抑制作用。这两个化合物在所测试的最高浓度下均不显示细胞毒性。

[0137] 实验结果如图1所示。图1A显示了环巴胺在病毒吸附前和吸附后对hRSV抑制作用的剂量依赖实验。图1B和图1C显示了环巴胺以及番茄碱对hRSV抑制作用的剂量依赖实验

以及它们在细胞上的毒性测定。hRSV的相对感染力是病毒感染细胞72小时后,收集病毒,利用免疫染色法测定病毒效价。化合物的毒性是在细胞上加入化合物72小时后利用CellTiter-Glo发光法细胞活力检测试剂盒检测。IC<sub>50</sub>和IC<sub>95</sub>值采用GraphPad Prism v.5软件(GraphPad Software,La Jolla California,USA)分析计算所得。

[0138] 2. 实验显示,药物GDC-0449和LY2940680并不抑制hRSV感染(图2A)。药物GDC-0449和LY2940680都是刺猬信号通路中smoothed蛋白的特异性抑制剂,其中GDC-0449对刺猬信号通路的IC<sub>50</sub>=13nM,但是它们都不能抑制hRSV感染。环巴胺与1μM GDC-0449或1μM LY2940680联合使用并没显示出更好的抗病毒活性,如图2B所示。进一步说明环巴胺对hRSV抑制作用的特异性,并且该抑制作用不依赖于刺猬信号通路。

[0139] 图2中A为药物GDC-0449和LY2940680对hRSV抑制作用的剂量依赖实验。图2中B为环巴胺与1μM GDC-0449或1μM LY2940680联合使用对hRSV抑制作用的剂量依赖实验。化合物的活性是通过病毒空斑减少实验测得,病毒空斑的数目和大小是采用Fiji软件<sup>[3]</sup>分析获得。

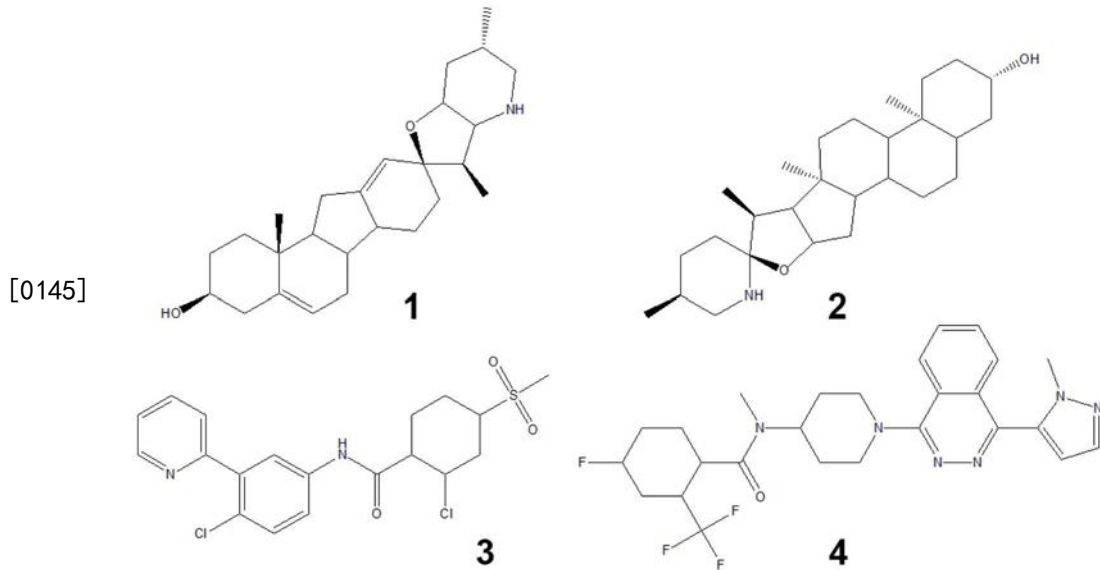
[0140] 3. hRSV对环巴胺的耐药株均含有相同的一个突变:M2-1蛋白151位氨基酸从精氨酸到赖氨酸的突变。耐药株是通过在病毒盲传过程中逐步增加药物浓度来筛选获得的。病毒分别在终浓度为100,200,400,600,800nM和1μM的环巴胺中传2代,总共12代,盲传采用在传代培养过程中每天观察细胞病变情况的方式,决定病毒培养的最佳时间。同时以野生型病毒在不加环巴胺的培养基中平行传代作为对照。在1μM的浓度下,不加环巴胺传代的病毒将不会导致细胞病变,而盲传后的病毒仍然可以导致细胞病变,这说明产生了耐药突变。本发明人平行筛选了三株耐药毒株,经测定环巴胺对耐药株的抑制效果至少下降了10倍,IC<sub>50</sub>迁移了10倍以上。全基因组测序显示3株耐药株含有共同的突变,即M2-1蛋白151位氨基酸从精氨酸到赖氨酸的突变。

[0141] 图3显示了hRSV对环巴胺的耐药株均含有M2-1R151K突变。(A).M2-1部分蛋白与其中一株耐药株的序列比对,在151位氨基酸上本发明人发现了从精氨酸到赖氨酸的突变。(B).左:环巴胺对hRSV野生型和耐药株抑制作用的剂量依赖实验。右:耐药株和野生型病毒在突变位点附近的测序图谱,其中耐药株1和2在151位还有一些双峰,说明病毒尚未完全转变成耐药株,这也解释了为什么耐药株3的耐药性最强。

[0142] 4. 环巴胺抑制病毒的转录。环巴胺处理的病毒感染细胞中病毒RNA含量可以下降达到20倍以上,实验结果如图4所示。

[0143] 图4显示了环巴胺抑制病毒的转录。在hRSV感染细胞后加入环巴胺,番茄碱处理48小时后利用针对病毒L基因的引物通过qRT-PCR定量胞内病毒RNA水平,以胞内GAPDH为内参作换算。

[0144] 5. 本发明所涉及的化合物的结构式,1为环巴胺,2为番茄碱,3为GDC-0449,4为LY2940680。



[0146] 6.环巴胺与M2-1蛋白的潜在结合位点有2个,本发明人通过分子模拟对接分析了M2-1蛋白核心区域后发现其中一个结合位点靠近R151氨基酸,这两个模型分别如图5所示,青色(图右上侧)和品红色(图右下侧),它们都具有最低的能量,结合亲和力分别为7.7kcal/mol and 7.9kcal/mol。

[0147] 图5.M2-1蛋白含有2个与环巴胺结合的潜在位点。分子对接模拟分析采用的M2-1晶体结构来自PDB:4C3B。M2-1蛋白表面电势从低到高按蓝色-红色梯度变化,蓝色和红色分别代表 $-10\text{kTe}^{-1}$  and  $10\text{kTe}^{-1}$ 电势。环巴胺与M2-1结合采用Autodock Vina软件模拟。环巴胺用青色和品红色的棒状表示,图中所示2种模型具有最低的自由能。

[0148] 实施例2体内评估了环巴胺对hRSV的抑制效果

[0149] 本发明人在体内评估了环巴胺对hRSV的抑制效果,将每组6只7-10周雌性BALB/c小鼠(体重介于15-20g之间)用不含环巴胺的对照、30mg/kg以及100mg/kg的环巴胺处理,1小时后将小鼠麻醉然后滴鼻灌输100微升hRSV病毒悬液(含有 $8 \times 10^5 \text{TCID}_{50}$ 的病毒)。小鼠用对照或者上述剂量的环巴胺连续处理4天,4天后对小鼠实施安乐死后收集它们的肺组织,匀浆后离心取上清在HEp2细胞上测定其中hRSV的效价。结果如图6所示,环巴胺在小鼠体内有显著的抗hRSV活性,在100mg/kg剂量下可以降低1.5个log的病毒载量。

[0150] 图6.环巴胺在BALB/c小鼠模型上的抗病毒活性。图中每个点表示来自于每个小鼠的hRSV效价,每组中的水平线代表该组6只小鼠hRSV的平均效价,底部虚线代表实验检测的极限,\*\*\*表示与对照组相比 $p < 0.001$ 。

[0151] 在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考,就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解,在阅读了本发明的上述讲授内容之后,本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改,这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

[0152] 参考文谢:

[0153] [1] M.-L.Blondot,V.Dubosclard,J.Fix,S.Lassoued,M. Aumont-Nicaise, F.Bontems,J.-F.Eléouët,and C.Sizun,“Structure and Functional Analysis of the RNA-and Viral Phosphoprotein-Binding Domain of Respiratory Syncytial Virus

M2-1Protein,” PLoS Pathog, vol. 8, no. 5, p. e1002734, May 2012.

[0154] [2] S.J.Tanner, A.Ariza, C.-A.Richard, H.F.Kyle, R.L.Dods, M.-L.Blondot, W.Wu, J. Trincão, C.H.Trinh, J.A.Hiscox, M.W.Carroll, N.J.Silman, J.-F.Eléouët, T.A.Edwards, and J.N.Barr, “Crystal structure of the essential transcription antiterminator M2-1protein of human respiratory syncytial virus and implications of its phosphorylation,” Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A., Jan.2014.

[0155] [3] J.Schindelin, I.Arganda-Carreras, E.Frise, V.Kaynig, M. Longair, T.Pietzsch, S.Preibisch, C.Rueden, S.Saalfeld, B.Schmid, J.-Y.Tinevez, D.J.White, V.Hartenstein, K.Eliceiri, P.Tomancak, and A.Cardona, “Fiji: an open-source platform for biological-image analysis,” Nat.Methods, vol.9, no.7, pp.676-682, Jul.2012.

[0156] [4] K.E.Templeton, S.A.Scheltinga, M.F.C.Beersma, A.C.M. Kroes, and E.C.J.Claas, “Rapid and sensitive method using multiplex real-time PCR for diagnosis of infections by influenza A and influenza B viruses, respiratory syncytial virus, and parainfluenza viruses 1, 2, 3, and 4,” J.Clin.Microbiol., vol.42, no.4, pp.1564-1569, Apr. 2004.

[0157] [5] M.S.Ikram, G.W.Neill, G.Regl, T.Eichberger, A.-M. Frischauf, F.Aberger, A.Quinn, and M.Philpott, “GLI2 Is Expressed in Normal Human Epidermis and BCC and Induces GLI1 Expression by Binding to its Promoter,” J.Invest.Dermatol., vol.122, no.6, pp.1503-1509, Jun.2004.

[0158] [6] J.J.Irwin and B.K.Shoichet, “ZINC—a free database of commercially available compounds for virtual screening,” J.Chem.Inf. Model., vol.45, no.1, pp.177-182, Feb.2005.

[0159] [7] J.J.Irwin, T.Sterling, M.M.Mysinger, E.S.Bolstad, and R.G.Coleman, “ZINC: A Free Tool to Discover Chemistry for Biology,” J.Chem.Inf.Model., vol.52, no.7, pp.1757-1768, Jul.2012.



---

	145		150		155		160									
	Ile	Lys	Asn	Thr	Leu	Asp	Ile	His	Lys	Ser	Ile	Thr	Ile	Asn	Asn	Pro
					165				170						175	
[0002]	Lys	Glu	Leu	Thr	Val	Ser	Asp	Thr	Asn	Asp	His	Ala	Lys	Asn	Asn	Asp
					180				185						190	
	Thr	Thr														

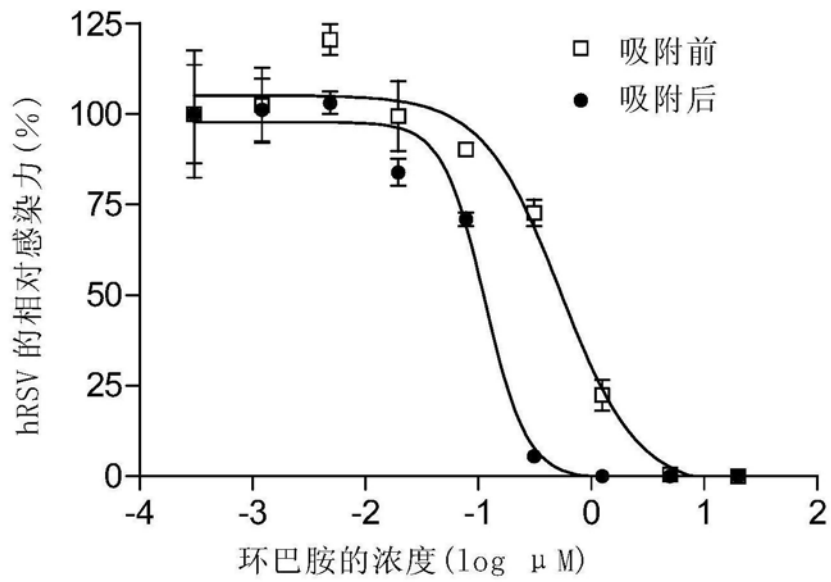


图1A

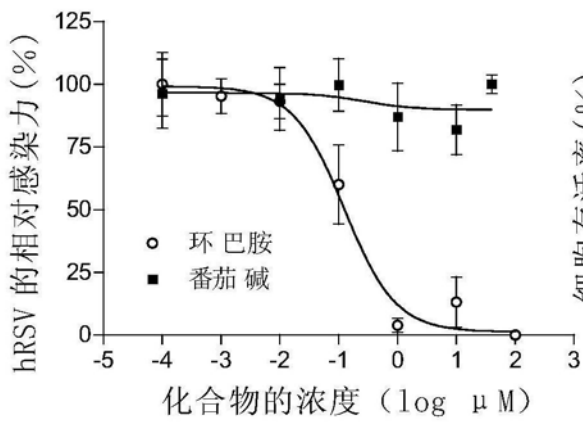


图 1B

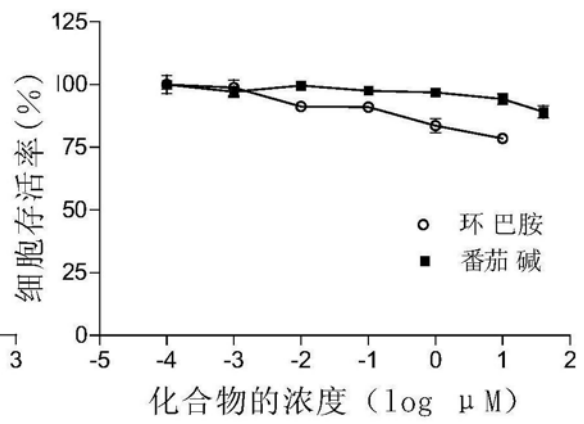


图 1C

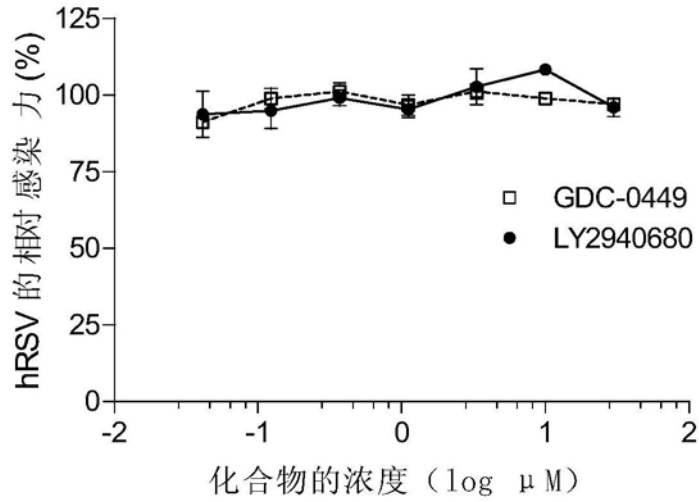


图2A

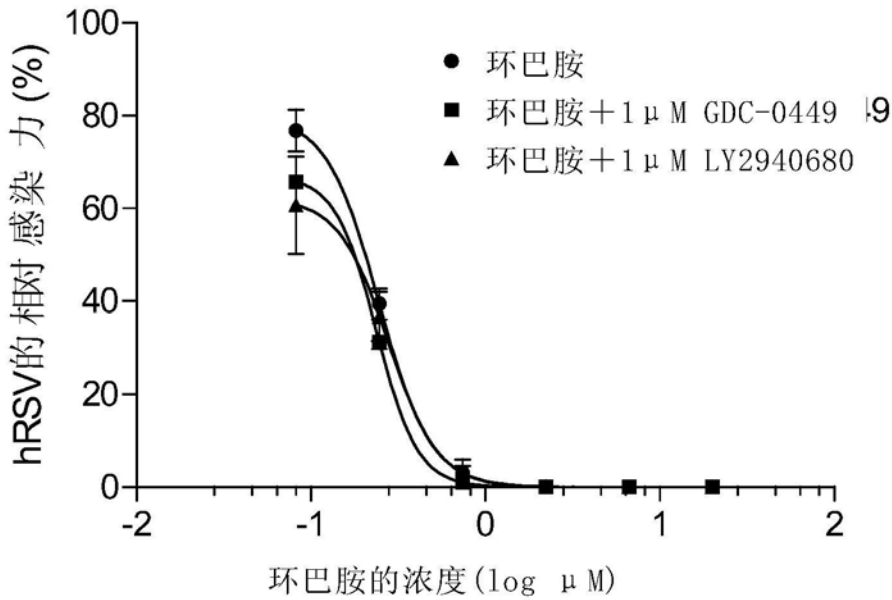


图2B

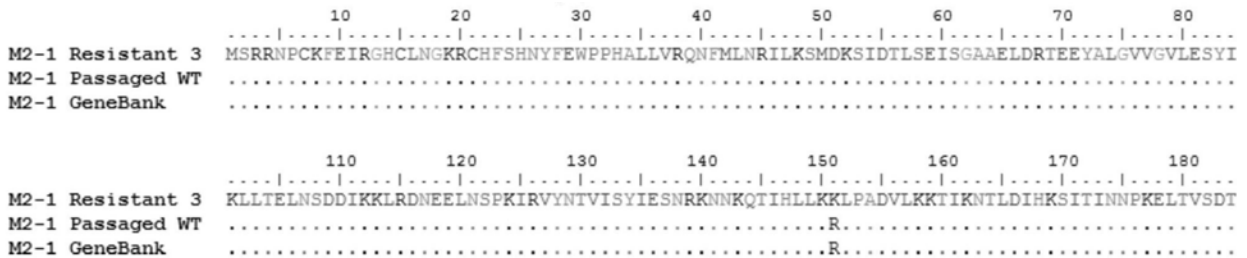


图3A

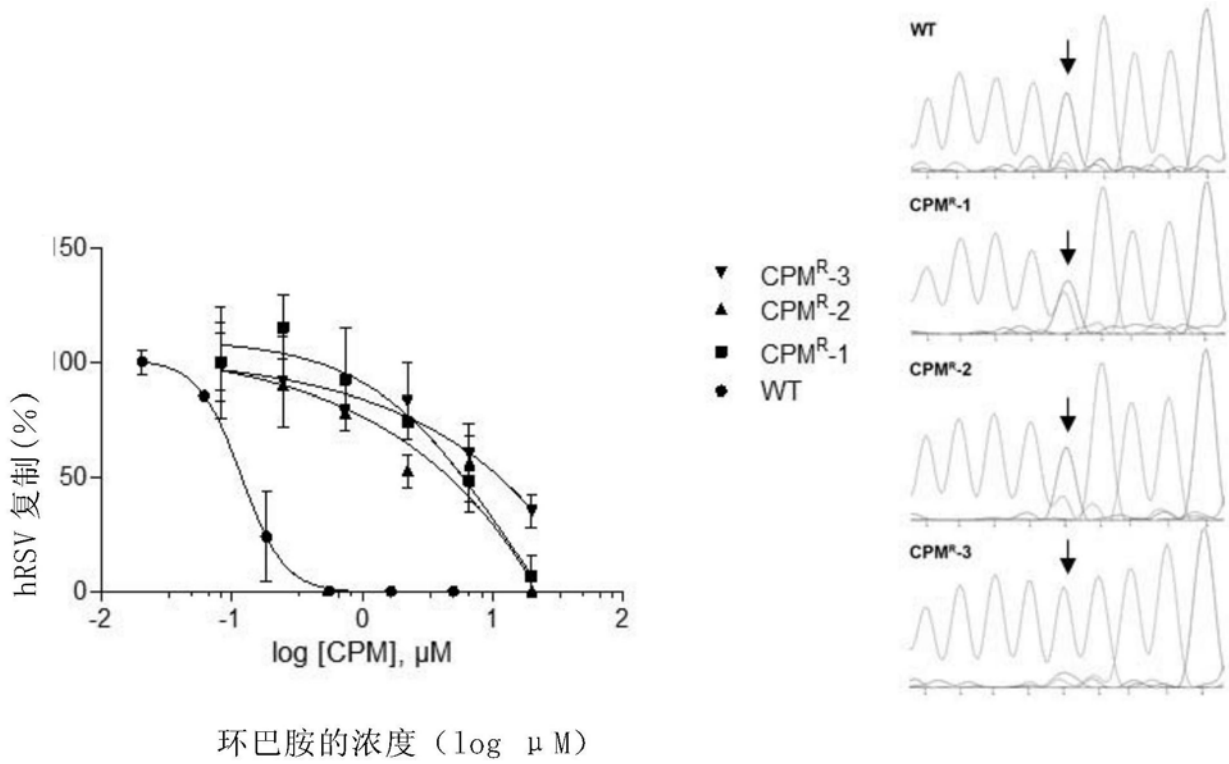


图3B

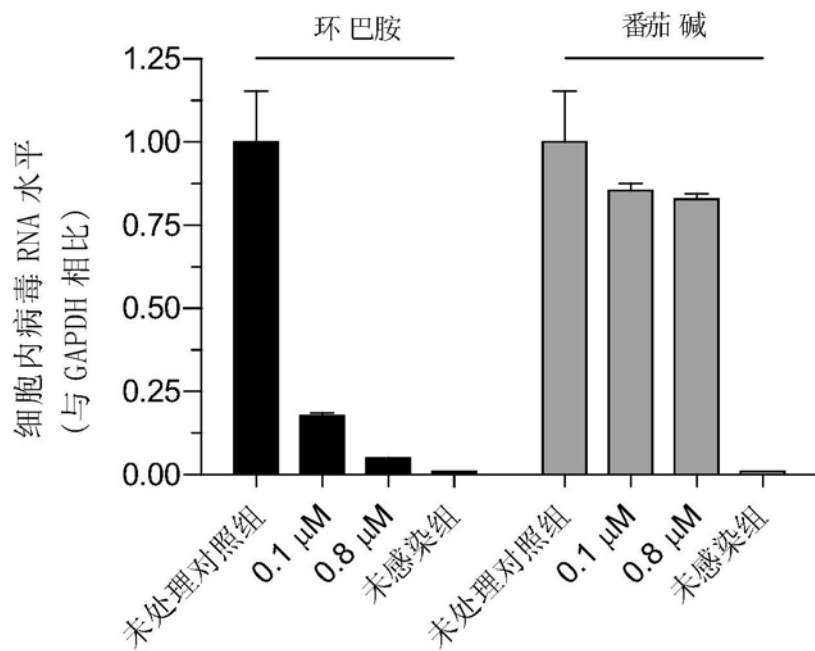


图4

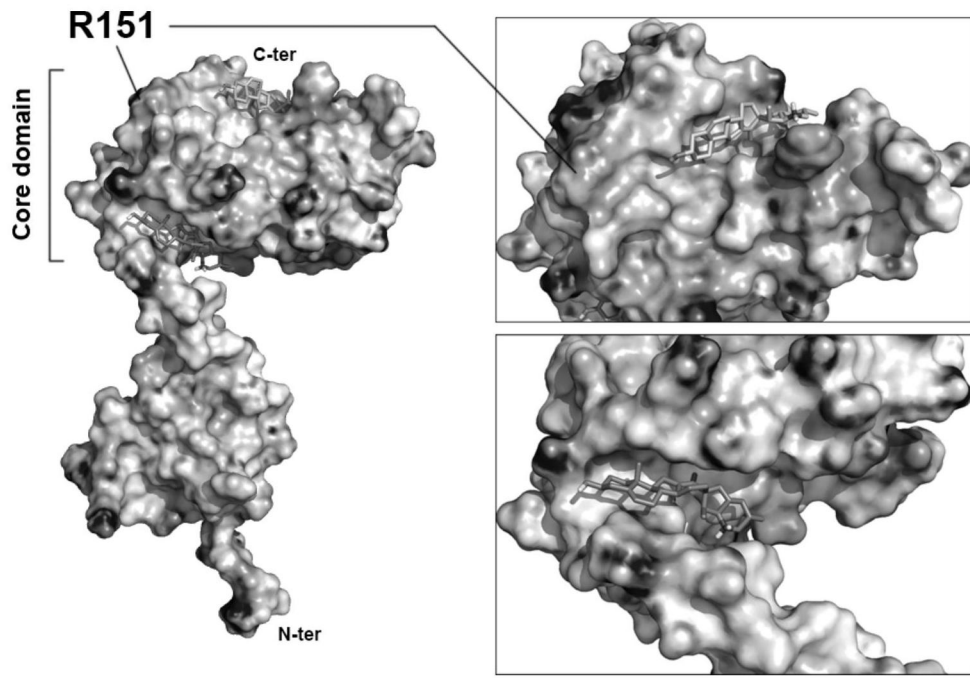


图5

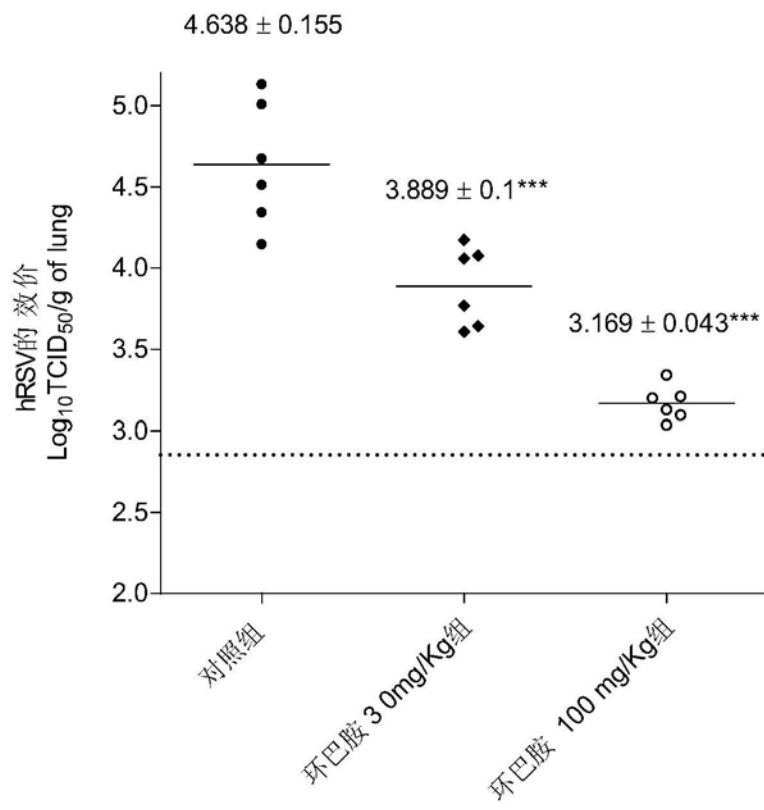


图6