



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111315374 A

(43)申请公布日 2020.06.19

(21)申请号 201880070088.0

(22)申请日 2018.08.09

(30)优先权数据

62/550656 2017.08.27 US

62/664555 2018.04.30 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2020.04.27

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2018/046023 2018.08.09

(87)PCT国际申请的公布数据

W02019/045989 EN 2019.03.07

(71)申请人 抗病毒科技有限责任公司

地址 美国德克萨斯州

(72)发明人 F.默多克 R.默多克

W.P.斯图尔特

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

代理人 张宇腾 黄登高

(51)Int.Cl.

A61K 31/195(2006.01)

A61K 39/40(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

权利要求书2页 说明书35页

(54)发明名称

合成的赖氨酸类似物和模拟物的用于抗病毒用途的方法和组合物

(57)摘要

一种用于治疗、预防或减少一次性或复发性病毒爆发、用于抑制慢性病毒感染的发展或生长、或用于预防或治疗病毒感染的方法,所述方法包括施用合成的赖氨酸类似物或模拟物,其中所述合成的赖氨酸类似物或模拟物与病毒复制或传播所需的氨基酸或其它生物试剂拮抗或竞争。另外,一种用于治疗、预防或减少一次性或复发性病毒爆发、抑制慢性病毒感染的发展或生长、或预防或治疗病毒感染的组合物,所述组合物包含合成的赖氨酸类似物或模拟物,其中所述合成的赖氨酸类似物或模拟物与病毒复制或传播所需的氨基酸或其它生物试剂拮抗或竞争。

1. 一种用于治疗、预防或减少一次性或复发性病毒爆发、用于抑制慢性病毒感染的发展或生长、或用于预防或治疗病毒感染的方法,所述方法包括施用合成的赖氨酸类似物或模拟物,其中所述合成的赖氨酸类似物或模拟物与病毒复制或传播所需的氨基酸或其它生物试剂拮抗或竞争。

2. 权利要求1的方法,其中所述合成的赖氨酸类似物或模拟物是氨甲环酸、 ϵ -氨基己酸(EACA)或AZD 6564。

3. 权利要求1的方法,其中所述一次性或复发性病毒爆发由单纯疱疹病毒1型、单纯疱疹病毒2型或水痘带状疱疹病毒(带状疱疹)造成。

4. 权利要求1的方法,其中所述慢性病毒感染由人免疫缺陷病毒造成。

5. 权利要求1的方法,其中所述病毒感染由感冒病毒、流感病毒或其它短暂病毒造成。

6. 权利要求1的方法,其中所述合成的赖氨酸类似物或模拟物是在溶液中。

7. 权利要求6的方法,其中所述溶液具有约0.5至约30重量%的合成的赖氨酸类似物或模拟物的浓度。

8. 权利要求6的方法,其中将所述溶液配制为喷雾剂、薄雾剂、气雾剂或漱口水。

9. 权利要求6的方法,其中所述合成的赖氨酸类似物或模拟物作为适合人皮肤的媒介物的部分来施用。

10. 权利要求6的方法,其中静脉内地施用所述含有合成的赖氨酸类似物或模拟物的溶液。

11. 权利要求6的方法,其中经由媒介物施用所述溶液,所述媒介物允许合成的赖氨酸类似物或模拟物以定时释放的方式递送。

12. 权利要求1的方法,其中口服地递送所述合成的赖氨酸类似物或模拟物。

13. 权利要求12的方法,其中以定时释放的方式递送所述合成的赖氨酸类似物或模拟物。

14. 权利要求1的方法,其中所述合成的赖氨酸类似物或模拟物的施用至少每天发生1次。

15. 权利要求1的方法,其中所述合成的赖氨酸类似物或模拟物的施用每周或每半月地发生。

16. 权利要求1的方法,其中所述合成的赖氨酸类似物或模拟物的施用每月或每半月发生。

17. 权利要求1的方法,其中通过机械装置、通过永久的或可吸收的材料或通过媒介物施用所述合成的赖氨酸类似物或模拟物,通过所述媒介物以定时释放的方式递送所述合成的赖氨酸类似物或模拟物。

18. 权利要求1的方法,其中所述合成的赖氨酸类似物或模拟物阻止或抑制阿尔茨海默氏病的发展。

19. 权利要求1的方法,其中所述合成的赖氨酸类似物或模拟物进一步包含至少一种氨基酸。

20. 权利要求1的方法,其中所述合成的赖氨酸类似物或模拟物进一步包含至少一种其它的天然的或合成的氨基酸类似物或模拟物。

21. 一种用于治疗、预防或减少一次性或复发性病毒爆发、抑制慢性病毒感染的发展或

生长、或预防或治疗病毒感染的组合物,所述组合物包含合成的赖氨酸类似物或模拟物,其中所述合成的赖氨酸类似物或模拟物与病毒复制或传播所需的氨基酸或其它生物试剂拮抗或竞争。

22. 权利要求21的组合物,其中所述一次性或复发性病毒爆发由单纯疱疹病毒1型、单纯疱疹病毒2型或水痘带状疱疹病毒(带状疱疹)造成。

23. 权利要求21的组合物,其中所述慢性病毒感染由人免疫缺陷病毒造成。

24. 权利要求21的组合物,其中所述要预防的病毒感染由感冒病毒、流感病毒或其它短暂病毒造成。

25. 权利要求21的组合物,其中口服地递送所述合成的赖氨酸类似物或模拟物。

26. 权利要求21的组合物,其中局部地施用所述合成的赖氨酸类似物或模拟物。

27. 权利要求26的组合物,其中所述组合物包含为改善的局部施用、改善的皮肤穿透或延长的释放提供粘度的成分。

28. 权利要求21的组合物,其中静脉内地施用所述合成的赖氨酸类似物或模拟物。

29. 权利要求21的组合物,其中通过拭子、鼻腔薄雾剂、吸入或漱口液施用所述合成的赖氨酸类似物或模拟物。

30. 权利要求21的组合物,其中通过机械装置、通过永久的或可吸收的材料或通过媒介物施用所述合成的赖氨酸类似物或模拟物,通过所述媒介物以定时释放的方式递送所述合成的赖氨酸类似物或模拟物。

31. 权利要求21的组合物,其中经由透皮贴剂施用所述合成的赖氨酸类似物或模拟物。

32. 权利要求21的组合物,其中经由注射的或植入的脂质体递送储库来施用所述合成的赖氨酸类似物或模拟物。

33. 权利要求21的组合物,其中所述合成的赖氨酸类似物或模拟物是氨甲环酸、 ϵ -氨基己酸(EACA)或AZD 6564。

34. 权利要求21的组合物,其中所述组合物包含提供快速全身穿透或延长释放的成分。

35. 权利要求21的组合物,其中所述合成的赖氨酸类似物或模拟物阻止或抑制阿尔茨海默氏病的发展。

36. 权利要求21的组合物,其中所述组合物包含至少一种氨基酸。

37. 权利要求21的组合物,其中所述组合物包含至少一种其它的天然的或合成的氨基酸类似物或模拟物。

合成的赖氨酸类似物和模拟物的用于抗病毒用途的方法和组合物

[0001] 背景

相关申请的交叉引用

本专利申请要求2017年8月27日提交的美国临时专利申请号62/550,656和2018年4月30日提交的美国临时专利申请号62/664,555的优先权,并将其整个公开内容通过引用并入。

技术领域

[0002] 本公开内容总体上涉及赖氨酸类似物和模拟物,并且更具体地但非限制性地涉及合成的赖氨酸类似物和模拟物的用于抗病毒用途的方法和组合物。

[0003] 相关领域的历史

单纯疱疹病毒1型(HSV-1)和单纯疱疹病毒2型(HSV-2)是在人群中非常常见的病毒,据各种估计表明,全世界人口的至多80%是HSV-1的携带者。类似地,美国疾病控制与预防中心估计,在美国出生的40岁和更大龄的人中的大约99.5%已经被野生型水痘带状疱疹病毒(VZV)感染。除了HSV-1、HSV-2和VZV外,据估测目前还有大约3670万人感染了人免疫缺陷病毒(HIV)。尽管全世界许多人患有HSV-1、HSV-2、VZV和HIV,但感冒病毒和流感病毒甚至更加突出,并且可能对各个年龄组或易受病毒感染的人具有严重或威胁生命的影响。一种治疗方案是使用抗病毒药物,尽管几种抗病毒药物在治疗、预防和抑制HSV-1、HSV-2、VZV、HIV或感冒病毒和流感病毒方面表现出有限至无效力。

[0004] 发明概述

一种用于治疗、预防或减少一次性或复发性病毒爆发、用于抑制慢性病毒感染的发生或发展、或用于预防或治疗病毒感染的方法,所述方法包括施用合成的赖氨酸类似物或模拟物,其中所述合成的赖氨酸类似物或模拟物与病毒复制或传播所需的氨基酸或其它生物试剂拮抗或竞争。

[0005] 一种用于治疗、预防或减少一次性或复发性病毒爆发、抑制慢性病毒感染的发生或发展、或预防或治疗病毒感染的组合物,所述组合物包含合成的赖氨酸类似物或模拟物,其中所述合成的赖氨酸类似物或模拟物与病毒复制或传播所需的氨基酸或其它生物试剂拮抗或竞争。

[0006] 详细描述

长期保留在人体中并表现出复发性爆发的病毒的例子是单纯疱疹病毒1型(HSV-1)和单纯疱疹病毒2型(HSV-2),它们是在人群中非常常见的病毒。HSV-1通常与感冒疮或复发性唇疱疹(RHL)相关,但也可能涉及HSV-2。HSV-2通常与生殖器疱疹有关,但同样也可能涉及HSV-1。HSV-1更为常见,据各种估计表明,由于其高度传染性,全球人口的至多80%携带HSV-1病毒,且全球人口的多达40%具有定期复发的RHL爆发。在爆发发生之前通常没有人携带疱疹病毒的迹象,就RHL而言,这通常会影响到嘴唇或嘴附近的区域。可见的爆发可以呈疮的形式,其会发炎并且可能没有吸引力和有疼痛。病毒的爆发过程及其相关的可见病变

通常在大约2至4周的过程中通过人体的自然愈合过程完全消退,而无需药物治疗。

[0007] 旨在减轻这些爆发的严重程度并缩短其持续时间的当前治疗方法主要由抗病毒药物,诸如口服治疗药物VALTREX®和软膏剂ABREVA®组成。这些治疗方法已被证明是稍微有效的,但通常疮仍然是可见的且有症状至多2周,即使在爆发的最初迹象时按照指导使用也是如此。关于复发,相对于严重程度或愈合时间,2016年的Cochrane Review发现了口服抗病毒药物的有限临床益处,并且对于局部抗病毒药物或任何其它治疗方法而言无效力或未经证实效力。

[0008] 研究表明,组氨酸和精氨酸以该次序是HSV-1病毒复制所必需的11种氨基酸中最重要两种,这基于一项试验,其中在从培养基排除各种氨基酸中的每一种时测量了病毒的生长。此外,赖氨酸不是病毒复制所必需的,并且实际上表现出对病毒生长的抑制作用。在其它研究中已经证实,增加赖氨酸与精氨酸相比在体内的优势会抑制病毒的复制。因此,通过改变饮食以减少富含精氨酸的食物并增加富含赖氨酸的食物,例如,通过服用赖氨酸补充剂或通过施用含有赖氨酸的乳膏剂或软膏剂,可能减轻感冒疮爆发的严重程度和持续时间。此外,饮食的长期改变或补充疗法可能会降低HSV-1爆发的发生率。因此,市场上有多种赖氨酸营养补品。但是,从1975年到1987年,对口服赖氨酸补充疗法进行了五项研究,主要是双盲的、安慰剂对照的平行或交叉研究。其中三项研究发现,赖氨酸的长期每天补充疗法减少了爆发的严重程度和复发,而一项研究则发现,它仅能减少复发,而一项研究发现对严重程度或复发均无益处。当前,医师推荐的主要治疗是口服和局部抗病毒药物,通常在爆发迹象时。

[0009] 此外,存在多种含有赖氨酸的局部乳膏剂和软膏剂,诸如SUPERLYSINE+™ Cold Sore Treatment,其通过提供疼痛缓解、帮助停止灼热和瘙痒以及滋润受感染区域来促进将愈合时间缩短一半。但是,在该产品中,活性成分是薄荷醇,且氨基酸L-赖氨酸与各种基于植物的提取物、维生素和氧化锌一起被列为无活性成分。另外,即使愈合时间缩短了一半,对象可能仍然经历1-2周的爆发。支持该产品的临床研究表明,在30名对象中的几乎一半直到第四天都没有治愈,并且需要11天才能治愈所有30人。

[0010] 由于HSV-1的普遍性,已经进行了进一步的研究以鉴定并更好地理解HSV-1在体内的相互作用,以促进治疗和抑制复发。体外试验表明,HSV-1具有氨基酸营养要求,具体地,赖氨酸、组氨酸和精氨酸在疱疹病毒复制中起着至关重要的作用,如上文简要讨论的。但是,组氨酸缺乏导致明显的致细胞病变效应,所以没有进一步研究它,且随后的研究聚焦于拮抗性精氨酸以实现没有细胞毒性的病毒抑制。

[0011] 已经证实,向HSV-1的培养物中添加精氨酸会维持最佳的HSV-1病毒生长水平,并且已经进一步证实,HSV-1依赖于精氨酸进行繁殖。研究报告说,HSV-1在培养基中没有精氨酸不会生长。在缺乏精氨酸的培养基中,HSV-1表现出受抑制的病毒粒子合成、减少的蛋白合成量和受抑制的病毒肽从细胞质向细胞核的转运。这显示出依靠精氨酸依赖性繁殖来增强治疗和预防复发的有前途的结果。

[0012] 研究已经证实,在缺乏精氨酸的培养基中,HSV-1的包膜多肽(II)从细胞质非常缓慢地转运到细胞核。多肽(VII)是一种富含精氨酸的蛋白,其合成是精氨酸依赖性的。在没有精氨酸的情况下,大多数病毒结构蛋白、特别是病毒衣壳多肽II会留在细胞质中。另外,在细胞核中的HSV-1-DNA未包被且不能复制。在细胞质中的剩余病毒蛋白被迅速地降解。

[0013] 已经进行了多种研究以验证精氨酸支持HSV-1生长并且赖氨酸在体外拮抗精氨酸的这种作用。赖氨酸的作用似乎是多因素的。一种机制似乎涉及在宿主真核细胞的DNA周围的组蛋白层。已经鉴定出五种不同类型的组蛋白,并且仅在DNA复制期间才合成,其中富含赖氨酸的组蛋白在分裂中期和分裂间期将染色质的DNA纤丝交联,从而使染色质更加紧凑并从而维持人染色体的结构完整性。HSV-1的DNA核苷组合物包含更高的精氨酸/赖氨酸比例,并且受感染的细胞合成具有更高精氨酸/赖氨酸比例的蛋白。HSV-1经常使用含有鸟嘌呤(G)的密码子,而人宿主细胞则很少使用胞嘧啶(C)-鸟嘌呤。存在六个精氨酸密码子和仅两个赖氨酸密码子。一个核苷酸的简单移位会产生精氨酸。这可以非常迅速地发生在受感染的宿主细胞的翻译装置中。富含赖氨酸的宿主细胞蛋白会被病毒DNA改变,并生成新的精氨酰基、tRNA合成的富含精氨酸的蛋白。

[0014] 研究表明,赖氨酸还似乎如下拮抗精氨酸:看起来是精氨酸的抗代谢物和类似物,竞争在肾小管处的重吸收,导致增加的精氨酸排泄,竞争跨越肠壁运输,充当精氨酸酶诱导物,导致精氨酸的降解,和通过进入转运系统而降低精氨酸在组织细胞中的细胞内含量。

[0015] 除了体外试验外,还已经进行了几项临床研究,它们表明,当以适当的剂量并在正确的条件(例如,控制消耗的含精氨酸食物的量)下施用,长期口服施用的赖氨酸成功地减少了感冒疮爆发的复发。但是,该系列研究结束了,可能因为担心天然赖氨酸的连续消耗可能具有不希望的副作用。因此,就疱疹病毒而言,使用合成的(人造的)赖氨酸类似物或模拟物来模仿赖氨酸的抗病毒作用或增强天然赖氨酸的作用可能是有益的,包括局部递送的赖氨酸类似物或模拟物,使得它们直接影响相关组织,具有减少的全身影响。

[0016] 如上详述的,口服和局部赖氨酸治疗已经被证实具有有限的益处,并且主要的、医师指导的口服和局部抗病毒药物的治疗在降低HSV-1爆发的严重程度、持续时间和复发方面也已经显示出有限的效力。但是,考虑到上述调查和研究,证明更显著地降低HSV-1爆发的严重程度和持续时间的抗病毒剂的治疗性处理将是有益的。此外,借助于在上文详细描述的各项研究中获得的信息,进一步证明抗病毒剂的长期或预防性使用以避免HSV-1爆发的复发将是有益的。

[0017] 除了治疗和抑制HSV-1爆发的复发外,可以证实赖氨酸及其类似物或衍生物对于预防其它病毒感染(例如,人免疫缺陷病毒(HIV)、流感病毒和感冒病毒,以及其它)也是有益的。HIV是这样的病毒的例子:所述病毒长期存在于人体中且不会表现出爆发,但是随着时间的流逝而产生严重的不利后果。HIV病毒的持续复制最终会破坏免疫系统,使人体容易感染其它威胁生命的疾病。研究表明,与疱疹病毒不同,HIV需要赖氨酸才能复制,且当将赖氨酸添加到感染HIV的患者的血浆中时,病毒的复制会迅速增加。另一方面,当添加精氨酸时,没有作用。预见到,合成的赖氨酸类似物或模拟物可以用于通过与天然赖氨酸的活性竞争(阻断)而抑制HIV的复制,并且下述体外试验似乎证实了该作用。

[0018] 此外,抗病毒剂的延长或预防性使用以避免感染将是有益的,并且可以包括例如流感病毒和感冒病毒或其它短暂病毒,并且对于处于感染的升高暴露风险中的对象(例如老师或旅行者)以及对于处于因感染而遭受严重后果的更大风险的个人(例如老人或婴儿)是特别有利的。在天然药物产业中的文献指示,补充性赖氨酸在治疗和避免流感病毒和感冒病毒方面是有益的。这样,抗病毒剂用于治疗感染的用途也将被证明是有益的,并且可以包括例如流感病毒和感冒病毒或其它短暂病毒的治疗。

[0019] 考虑到前述内容,合成的赖氨酸类似物或模拟物将有益于治疗病毒如疱疹病毒,抑制病毒如疱疹病毒的爆发的复发,抑制病毒如HIV的发展,以及避免或治疗由病毒如流感病毒和感冒病毒或其它短暂病毒引起的感染,其中所述赖氨酸类似物或模拟物模仿并增强赖氨酸在拮抗病毒复制所需的其它氨基酸中的作用,或在病毒复制需要时与天然赖氨酸竞争并阻断它。此外,因为抗病毒的合成的赖氨酸类似物或模拟物在氨基酸(所有蛋白和某些其它代谢活性的基础结构单元)的基本水平起作用,所以它与作用于特定蛋白或其作用的常见抗病毒药物相比易受病毒抗性(例如,围绕药剂的活性的突变)影响的可能性低得多。

[0020] 本文公开内容寻求利用合成的赖氨酸类似物或模拟物的拮抗某些病毒的复制所需的氨基酸或当在病毒复制需要时与天然赖氨酸竞争的药理学。本公开内容包括使用合成的赖氨酸类似物或模拟物来使疱疹病毒爆发的严重程度和持续时间最小化并治疗某些经常传播的病毒(诸如感冒病毒和流感病毒或其它短暂病毒)的感染的方法和组合物。此外,本公开内容包括关于合成的赖氨酸类似物或模拟物的预防性应用的方法和组合物,其用于预防或减少长期存在于人体中的病毒(诸如HSV-1和HSV-2,它们参与感冒疮和生殖器疱疹爆发)的爆发的发生,抑制长期存在于人体中并随着时间的推移继续复制和发展并带来越来越严重的负面影响的病毒(诸如HIV)的发展和生长,并预防某些经常传播的病毒(诸如感冒病毒和流感病毒或其它短暂病毒)的感染。

[0021] 基于表明氨基酸赖氨酸对于某些病毒的复制很重要,且补充性赖氨酸可能拮抗或阻断某些病毒复制所需的其它氨基酸的活性的研究和调查,以及合成的赖氨酸类似物或模拟物在某些情况下如何可以模仿天然赖氨酸、而在其它情况下与天然赖氨酸竞争的知识,本公开内容包括这样的方法和组合物,其用于长期地或预防性地使用合成的赖氨酸类似物或模拟物来抑制病毒复制并由此减少某些病毒(如HSV-1和HSV-2)的复发性爆发的发生,抑制其它慢性病毒(如HIV)的发展,和避免被某些病毒(诸如流感病毒和感冒病毒或其它短暂病毒)感染。

[0022] 在一些实施方案中,所述合成的赖氨酸类似物可以是氨甲环酸。在不同的实施方案中,所述合成的赖氨酸类似物可以是 ϵ -氨基己酸(EACA)。在其它实施方案中,可以利用作为赖氨酸模拟物的不同试剂,例如,AZD 6564,或如下模拟或模仿赖氨酸功能的任何其它化合物:治疗、预防或减少病毒的爆发,抑制慢性病毒感染的发展或生长,或以与合成的赖氨酸类似物(诸如氨甲环酸)相同的方式预防或治疗病毒感染。

[0023] 下文更详细描述实验室试验表明,至少一种合成的赖氨酸类似物氨甲环酸有效地抑制HSV-1和HSV-2的复制。另外,如下面进一步详细描述的,实验室试验表明,将氨甲环酸加给被HIV感染的细胞会抑制所述病毒的复制。因此,在这种病毒的情况下,氨甲环酸显然与天然赖氨酸竞争,也就是说,它通过病毒复制机制阻断了赖氨酸的正常使用,这类类似于氨甲环酸的抗纤维蛋白溶解作用,在其中它如下与天然赖氨酸竞争:占据在纤溶酶原上的通常结合位置并从而阻止纤溶酶原转化为纤溶酶。

[0024] 此外,实验室试验表明氨甲环酸有效地抑制甲型流感病毒(H3N2)的复制,从而证明氨甲环酸的独特抗病毒性能。此外,进一步的实验室试验表明,过量的三种碱性氨基酸(赖氨酸、精氨酸、组氨酸或其类似物或模拟物)之一会干扰其它两种氨基酸的活性,且过量的其中两种的组合对第三种具有相同的作用,并进一步允许更大剂量的组合而不会产生细胞毒性。如将在下面更详细地讨论的,在刚好低于细胞毒性的水平添加精氨酸和氨甲环酸

在疱疹病毒中提供最高水平的病毒抑制,而添加相同量的单独氨甲环酸产生了小得多的抑制,且添加相同量的单独精氨酸增加了病毒复制。

[0025] 尽管研究已经表明赖氨酸拮抗精氨酸,但是先前的研究已经表明组氨酸是参与疱疹复制的重要氨基酸。基于该研究和观察到的实验室结果,预见到,三种碱性氨基酸中的一种碱性(非酸性)氨基酸或其类似物或模拟物的过量可能拮抗其它两种碱性氨基酸。此外,进一步预见到,两种碱性氨基酸或其类似物或模拟物的过量会拮抗第三种碱性氨基酸。下文讨论的实验室结果表明,氨甲环酸拮抗精氨酸和组氨酸,而氨甲环酸与精氨酸一起拮抗组氨酸,且氨甲环酸与组氨酸一起拮抗精氨酸(以足够量提供)。

[0026] 基于在下面详细讨论的实验室试验以及上面给出的研究和调查,本公开内容的一个目的是,提供使疱疹病毒爆发的严重程度和持续时间最小化的方法和组合物。根据本公开内容,一旦发现爆发的最初迹象就使受感染的区域可获得治疗上安全且有效的量的合成的赖氨酸类似物或模拟物并持续直到爆发已经适当地消退,例如,1-14天。

[0027] 本公开内容的另一个目的是,提供用于预防病毒爆发例如RHL(感冒疮)的發生的方法和组合物。根据本公开内容,可以使治疗上安全且有效的量的合成的赖氨酸类似物或模拟物可用于预防性使用,在复发的基础上施用。

[0028] 预见到,通过全身性施用药剂(例如口服)可以实践治疗和预防用途,但是也可以以有效浓度和方案以局部形式应用。在本公开内容的一个特定变体中,合成的赖氨酸类似物包括氨甲环酸,其已经被具体证实拮抗精氨酸和组氨酸并抑制HSV-1和HSV-2病毒的复制。在本公开内容的另一个变体中,合成的赖氨酸类似物包括氨甲环酸和精氨酸,其已经被具体证实拮抗组氨酸并抑制HSV-1和HSV-2病毒的复制。在一些实施方案中,所述组合物及其使用方法可以包括与一种或多种氨基酸一起的合成的赖氨酸类似物或模拟物,其用于治疗、预防或减少复发性病毒爆发(诸如疱疹病毒),用于抑制慢性病毒感染(诸如HIV)的发展或生长,或用于预防或治疗病毒感染(诸如流感病毒和感冒病毒或其它短暂病毒)。

[0029] 进一步预见到,可以使用合成的赖氨酸类似物和模拟物来抑制病毒的复制,所述病毒在体内长期保留并随着时间的推移继续发展,诸如HIV。因此,本公开内容的另一个目的是,提供治疗上安全且有效的量的合成的赖氨酸类似物或模拟物,其可用于预防用途,在复发的基础上施用,抑制HIV病毒的复制和发展。尽管与抑制HSV-1和HSV-2的机理不同,但预见到,氨甲环酸不是拮抗HSV-1和HSV-2的复制所必需的精氨酸和组氨酸,而是与HIV复制所需的天然赖氨酸竞争并将其替换,这类似于氨甲环酸如何阻止纤溶酶原活化为纤溶酶(例如,通过占据纤溶酶原上的赖氨酸结合位点)。

[0030] 进一步预见到,通过向个体(例如,具有增加的对感染的暴露或处于增加的由感染引起的严重后果的风险中的个体)施用所述试剂,可以利用合成的赖氨酸类似物或模拟物来避免或降低某些病毒(诸如流感病毒和感冒病毒或其它短暂病毒)的感染的严重程度。另外,预见到,合成的赖氨酸类似物或模拟物可以用于治疗某些病毒(诸如流感病毒和感冒病毒或其它短暂病毒)的感染。应当理解,合成的赖氨酸类似物或模拟物的所有这些应用都可以在适当时与其它抗病毒药物联合使用。

[0031] 此外,由于合成的赖氨酸类似物或模拟物对病毒(如疱疹病毒)的抑制性质,进一步预见到,合成的赖氨酸类似物或模拟物可用于促进阿尔茨海默氏病的预防、阿尔茨海默氏病的进展的减轻和阿尔茨海默氏病的可能治疗(或与其它疗法结合使用)。最近的研究提

示,两种极其常见的疱疹病毒会影响在阿尔茨海默氏病中涉及的基因的行为。有证据表明,大脑会主动防御病毒或其它病菌,且实验表明,粘性 β -淀粉样蛋白通过吞噬入侵病菌来捕获它们,这是斑块开始形成的原因。阿尔茨海默氏病的标志之一是淀粉样蛋白斑块在脑中的神经元之间的积累。淀粉样蛋白是身体正常产生的蛋白片段的一般术语。 β 淀粉样蛋白是从淀粉样蛋白前体蛋白剪下来的蛋白片段。在健康的脑中,这些蛋白片段会被分解并消除,但是,在阿尔茨海默氏病中,所述片段积聚以形成坚硬的不溶性斑块。在特定的实验中,证实了在没有疱疹(在该情况下,人疱疹病毒6A (HHV6a) 和人疱疹病毒7 (HHV7)) 消耗的分子存在下,淀粉样蛋白斑块更容易形成。这指示与阿尔茨海默氏病存在病毒联系。此外,据信HHV6和引起感冒疮的疱疹病毒可以触发或播种淀粉样蛋白斑块形成。这样,本文提出的用于治疗 and 抑制复发性疱疹爆发的方法和组合物可被证明作为潜在的预防或治疗或减慢阿尔茨海默氏病的进展是有益的。应当理解,合成的赖氨酸类似物或模拟物的这些应用在适当的情况下可以与阿尔茨海默氏病的其它方案和治疗结合使用。

[0032] 在培养物中未感染的细胞通常需要的氨基酸对病毒的抑制并不罕见。例如,赖氨酸也已经被证实会抑制GD VII小鼠脑脊髓炎病毒。已经发现甘氨酸抑制猴肾细胞中的脊髓灰质炎病毒复制,其中甘氨酸是必需的氨基酸。类似地,谷氨酰胺是疱疹病毒的持续病毒复制所必需的,但是在某些条件下,谷氨酰胺实际上会降低病毒产量。其它研究发现,以足够的量且在某些条件下添加精氨酸会抑制HSV-1。精氨酸还抑制甲型流感病毒(H3N2)和1型脊髓灰质炎病毒。因此,据信将精氨酸、谷氨酰胺或其它氨基酸加入含有氨甲环酸或其它合成的赖氨酸类似物或模拟物试剂的组合物中会辅助一次性或复发性病毒爆发(诸如疱疹病毒)的治疗、预防或减轻,慢性病毒感染(诸如HIV)的发展或生长的抑制,或病毒感染(诸如流感病毒和感冒病毒或其它短暂病毒)的预防或治疗。

[0033] 现在将参考本公开内容的更具体实施方案以及为这样的实施方案提供支持的数据。但是,应当指出,以下公开内容仅用于说明性目的,且无意以任何方式限制要求保护的的主题的范围。

[0034] 本公开内容的一个实施方案涉及合成的赖氨酸类似物或模拟物的应用,通过利用所述试剂/组合物的药理学活性及其对可见爆发的影响来提供快速愈合和恢复至正常美容外观。合成的赖氨酸类似物或模拟物可以呈简单水溶液、具有惰性赋形剂的溶液的形式,或与可以任选地含有其它治疗成分的媒介物诸如凝胶、乳膏剂或护肤液组合。本领域普通技术人员预见到并且将知道改善处理或治疗递送的另外实施方案,诸如通过粘稠溶液或被设计成延迟或缓慢地/可预测地递送合成的赖氨酸类似物或模拟物的溶液。所述溶液/组合物可以直接施用至正在表现出爆发迹象的皮肤区域,并且可以容易地施用并且容易适应受影响的区域。在某些实施方案中,所述组合物在病毒爆发的最初迹象时利用所述药剂/组合物的活性以降低爆发的严重程度和持续时间并促进快速的愈合过程。

[0035] 在某些实施方案中,合成的赖氨酸类似物或模拟物试剂治疗可以通过所述药剂的全身施用来实现,例如,每天最多4克共7天,但是另外可以以局部形式以有效浓度和方案施用,例如,为了提供快速活性和益处,每天在0.25-5 mL的体积中施用3-5% (w/v) 浓度的所述试剂2-3次。在某些实施方案中,所述试剂的浓度可以是例如最高30% (w/v) 浓度。在不同的实施方案中,所述赖氨酸类似物或模拟物可以拮抗精氨酸和组氨酸并抑制HSV-1病毒的复制,维持该区域中天然赖氨酸的量,因为它不能与纤溶酶原结合以产生纤溶酶(它否则与组

织创伤关联地发生),并阻断纤溶酶和其它丝氨酸蛋白酶的形成,从而提供抗炎效应并避免胶原和胶原基质的降解。

[0036] 此外,本公开内容的一个实施方案涉及合成的赖氨酸类似物或模拟物试剂的应用,通过利用所述试剂/组合物的药理学活性来提供病毒爆发的预防。所述试剂可以是简单的水溶液,具有惰性赋形剂的溶液,或者与可以任选地含有其它治疗成分的媒介物如凝胶、乳膏剂或护肤液组合。本领域普通技术人员也预见到并且将知道改善处理和/或预防性递送的另外实施方案,诸如通过粘稠溶液或被设计成延迟或可预测地递送合成的赖氨酸类似物或模拟物试剂的溶液。所述溶液和/或组合物可以直接施用至已知发生爆发的皮肤区域,并且可以容易地施用并且容易适应期望的施用区域。在某些实施方案中,所述溶液和/或组合物可以是3-10% (w/v) 浓度的合成的赖氨酸类似物或模拟物,或最高30% (w/v) 的合成的赖氨酸类似物或模拟物。

[0037] 在某些实施方案中,所述组合物可以用于预防或治疗由其它病毒引起的感染和疾病,所述其它病毒包括、但不限于普通感冒病毒和流感病毒或其它短暂病毒,例如在具有增加的暴露风险的人,或已经暴露于此类病毒的感染但尚未表现出感染症状的人,或被此类病毒感染可能会表现危及生命的事件的人中。由于这些病毒中的几种附着在喉咙的后部和鼻道,因此在某些实施方案中,可以将所述组合物配制成喷雾剂、薄雾剂、气雾剂和漱口液、或用于擦拭的溶液,它们可以施用于口、鼻和/或喉咙区域,包括鼻道。在某些实施方案中,所述溶液和/或组合物可以是3-10% (w/v) 浓度的合成的赖氨酸类似物或模拟物,或最高30% (w/v) 的合成的赖氨酸类似物或模拟物。

[0038] 在其它实施方案中,本文提出的组合物可以用于预防病毒爆发或抑制病毒感染的发展,并且可以通过肠内和肠胃外方法施用,例如,丸剂、片剂、胶囊剂或注射剂。在其它实施方案中,对于长期施用,可以通过注射的或植入的脂质体递送储库来施用所述组合物。在某些实施方案中,所述组合物可以呈通过皮肤接触来施用药物的透皮贴剂的形式。

[0039] 另外,本公开内容的一些实施方案涉及合成的赖氨酸类似物或模拟物试剂与精氨酸组合的组合物及其使用方法,其通过利用过量的赖氨酸类似物或模拟物和精氨酸的组合的药理学活性,辅助治疗和预防病毒爆发(诸如疱疹病毒),抑制其它慢性病毒(诸如HIV)的发展,并避免或治疗某些病毒(例如,流感病毒和感冒病毒,或其它短暂病毒)的感染。在某些实施方案中,构建病毒复制所需的蛋白所需的其它氨基酸可以与合成的赖氨酸类似物或模拟物如氨甲环酸结合使用,以改善合成的赖氨酸类似物或模拟物的抗病毒性能。

[0040] 此外,本公开内容的各个实施方案涉及合成的赖氨酸类似物或模拟物试剂与一种或多种氨基酸组合,例如,合成的赖氨酸类似物诸如氨甲环酸与赖氨酸、精氨酸或组氨酸的组合物及其使用方法,其用于治疗 and 预防病毒爆发(诸如疱疹病毒),抑制其它慢性病毒(诸如HIV)的发展,并避免或治疗某些病毒(例如,流感病毒和感冒病毒或其它短暂病毒)的感染。在不同的实施方案中,所述合成的赖氨酸类似物或模拟物可以与一种或多种合成的氨基酸、其类似物或模拟物结合使用,用于治疗 and 预防病毒爆发,抑制其它慢性病毒(诸如HIV)的发展,并避免或治疗某些病毒(例如,流感病毒和感冒病毒或其它短暂病毒)的感染。

[0041] 在某些实施方案中,所述合成的赖氨酸类似物或模拟物可以与任何氨基酸(例如脂族、芳族、酸性、碱性、中性或独特氨基酸)或其组合中的一种或多种组合,用于治疗 and 预防病毒爆发(诸如疱疹病毒),抑制其它慢性病毒(诸如HIV)的发展,并避免或治疗某些病毒

(例如,流感病毒和感冒病毒或其它短暂病毒)的感染。

[0042] 在不同的实施方案中,本公开内容涉及合成的赖氨酸类似物或模拟物试剂与谷氨酰胺组合的组合物及其使用方法,其用于治疗、预防或减少复发性病毒爆发(诸如疱疹病毒),用于抑制慢性病毒感染(诸如HIV)的发展或生长,或用于预防或治疗病毒感染(诸如流感病毒和感冒病毒或其它短暂病毒)。在一个具体的实施方案中,该组合物可以包含氨甲环酸和谷氨酰胺。在其它实施方案中,所述组合物可以包含氨甲环酸、谷氨酰胺和一种或多种氨基酸,例如赖氨酸、精氨酸或组氨酸。

[0043] 氨甲环酸的抗病毒活性

对HSV-1、HSV-2、HIV和甲型流感病毒(H3N2)进行了氨甲环酸的抗病毒活性(即病毒复制减少)的评价。每个评价由高和低病毒接种物组成,其中输入病毒对照(无氨甲环酸)用于确定Log₁₀减小和相应复制减小百分比的输入病毒滴度。

[0044] 另外,对HSV-1和HSV-2进行了2% (w/v) 氨甲环酸、L-精氨酸(具有不同浓度)以及2% (w/v) 氨甲环酸和L-精氨酸(具有不同浓度)的混合物的抗病毒活性的评价,以证实氨甲环酸和L-精氨酸的组合对病毒减小百分比的影响,并鉴别氨甲环酸如何抑制HSV-1和HSV-2复制。每个评价由输入病毒对照(无外来氨甲环酸或L-精氨酸)组成,其用于确定复制减小百分比的输入病毒滴度。

[0045] 如下面将更详细地讨论的,在HSV-1和HSV-2复制减少的评价中使用0.5% (w/v)、1.0% (w/v) 和2.0% (w/v) 的氨甲环酸,而在HIV复制减少的评价中使用2.0% (w/v)、3.0% (w/v) 和4.0% (w/v) 的氨甲环酸,这基于两种不同类型的病毒的细胞培养基的细胞毒性限制。在H3N2复制减少的评价中使用6% (w/v)、8% (w/v) 和10% (w/v) 的氨甲环酸。

[0046] 如下面将更详细地说明的,使用HSV-1和HSV-2评价了5,000μM、10,000μM和25,000μM的L-精氨酸,并与使用HSV-1和HSV-2的2% (w/v) 氨甲环酸+ 5,000μM L-精氨酸、2% (w/v) 氨甲环酸+10,000μM L-精氨酸和2% (w/v) 氨甲环酸+25,000μM L-精氨酸的评价进行了对比,以证实氨甲环酸在抑制HSV-1和HSV-2复制中的根本作用机理,并表明使用氨甲环酸和L-精氨酸的组合混合物的增加的病毒减小百分比效应。

[0047] 下面进一步详细说明,用HSV-1评价了不同浓度的L-精氨酸、不同浓度的L-组氨酸、2% (w/v) 氨甲环酸+不同浓度的L-精氨酸、2% (w/v) 氨甲环酸+不同浓度的L-组氨酸和2% (w/v) 氨甲环酸+不同浓度的L-精氨酸和L-组氨酸,以确认在足够量时,氨甲环酸拮抗精氨酸和组氨酸,而氨甲环酸与精氨酸的混合物拮抗组氨酸,且氨甲环酸与组氨酸的混合物拮抗精氨酸。大体而言,如下所示,在氨甲环酸中添加一种或多种氨基酸可以显著提高抗病毒活性的有效性。由过量的拮抗其它氨基酸的氨基酸(例如,作为赖氨酸起作用的氨甲环酸与精氨酸组合地拮抗组氨酸)来实现该提高的有效性。

[0048] 氨甲环酸对单纯疱疹病毒1型(HSV-1)的抗病毒活性

每个经试验并在下面显示的样品各具有3次重复,并由在0% (w/v) 氨甲环酸的输入病毒对照、对于低和高病毒接种物而言在0.5% (w/v)、1.0% (w/v) 和2.0% (w/v) 的氨甲环酸组成。每个样品的接触时间为48±8小时,并使用输入病毒滴度(Log₁₀TCID₅₀)和输出病毒滴度(Log₁₀TCID₅₀)生成减小因子,从而产生具有相关减小百分比的Log₁₀减小因子。

[0049] 如下制备用于评价氨甲环酸对HSV-1(对于低病毒接种物)的抗病毒活性的制剂:对于每剂氨甲环酸或输入病毒对照,将0.25 mL病毒接种物(含有10^{6.26} TCID₅₀单位)加入3

个孔中。将接种物在 $5 \pm 3\% \text{CO}_2$ 中在 $36 \pm 2^\circ \text{C}$ 温育90分钟。除去接种物,并用PBS洗涤孔3次。将1.0 mL的每剂氨甲环酸(或DM,对于输入病毒对照)加入每个孔中。将该板在 $36 \pm 2^\circ \text{C}$ 和 $5 \pm 3\% \text{CO}_2$ 下温育 48 ± 8 小时。然后将该板在 -60 至 -90°C 冷冻过夜,解冻,并且将每个孔的内容物在2,000 RPM离心10分钟。收集来自每个孔的上清液并测定感染性病毒。

[0050] 滴度结果如下表1所示,低病毒接种物的输入病毒对照滴度($\text{Log}_{10}\text{TCID}_{50}/\text{mL}$)是在 5.95 ± 0.10 至 6.55 ± 0.10 的范围内,平均为 6.26 ± 0.10 ,病毒储备物滴度对照具有 2.30 ± 0.19 的滴度。在试验中使用了0.5% (w/v)、1.0% (w/v) 和2.0% (w/v) 的氨甲环酸的样品量,其具有如下所示的滴度值($\text{Log}_{10}\text{TCID}_{50}/\text{mL}$)。

表 1

样品	病毒接种物	重复数目	接触时间	滴度 ($\text{Log}_{10}\text{TCID}_{50}/\text{mL}$)
细胞生存力/ 培养基无菌对照	NA	NA	NA	没有检测到病毒, 细胞是活的; 培养基是无菌的
病毒储备物滴度对照	低			2.30 ± 0.19
输入病毒对照 (0%氨甲环酸)	低	1	48±8 小时	6.55 ± 0.10
		2		6.01 ± 0.11
		3		5.95 ± 0.10
	输入病毒对照(低) - 平均			6.26 ± 0.10
氨甲环酸- 0.5%	低	1	48±8 小时	5.83 ± 0.00
		2		5.24 ± 0.10
		3		5.54 ± 0.09
氨甲环酸- 1.0%	低	1		5.65 ± 0.09
		2		4.58 ± 0.12
		3		4.34 ± 0.10
氨甲环酸- 2.0%	低	1		4.76 ± 0.08
		2		3.69 ± 0.10
		3		4.04 ± 0.08

[0051] 如下制备用于评价氨甲环酸对HSV-1(对于高病毒接种物)的抗病毒活性的制剂:对于每剂氨甲环酸或输入病毒对照,将0.25 mL病毒接种物(含有 $10^{6.46}$ TCID_{50} 单位)加入3个孔中。将接种物在 $5 \pm 3\% \text{CO}_2$ 中在 $36 \pm 2^\circ \text{C}$ 温育90分钟。除去接种物,并用PBS洗涤孔3次。将1.0 mL的每剂氨甲环酸(或DM,对于输入病毒对照)加入每个孔中。将该板在 $36 \pm 2^\circ \text{C}$ 和 $5 \pm 3\% \text{CO}_2$ 下温育 48 ± 8 小时。然后将该板在 -60 至 -90°C 冷冻过夜,解冻,并且将每个孔的内容物在2,000 RPM离心10分钟。收集来自每个孔的上清液并测定感染性病毒。

[0052] 滴度结果如下表2所示,高病毒接种物的输入病毒对照滴度($\text{Log}_{10}\text{TCID}_{50}/\text{mL}$)是在 6.37 ± 0.13 至 6.55 ± 0.14 的范围内,平均为 6.46 ± 0.13 ,病毒储备物滴度对照具有 2.30 ± 0.19 的滴度。在试验中使用了0.5% (w/v)、1.0% (w/v) 和2.0% (w/v) 的氨甲环酸的样品量,其具有如下所示的滴度值($\text{Log}_{10}\text{TCID}_{50}/\text{mL}$)。

表 2

样品	病毒接种物	重复数目	接触时间	滴度 (Log ₁₀ TCID ₅₀ /mL)
细胞生存力/ 培养基无菌对照	NA	NA	NA	没有检测到病毒, 细胞是活的; 培养基是无菌的
病毒储备物滴度对照	高			2.30±0.19
输入病毒对照 (0%氨甲环酸)	高	1	48±8 小时	6.37±0.13
		2		6.43±0.12
		3		6.55±0.14
	输入病毒对照(高) - 平均			6.46±0.13
氨甲环酸- 0.5%	高	1	48±8 小时	6.19±0.08
		2		6.43±0.13
		3		6.37±0.11
氨甲环酸- 1.0%	高	1		6.43±0.12
		2		6.61±0.11
		3		6.43±0.13
氨甲环酸- 2.0%	高	1		5.71±0.12
		2		5.42±0.06
		3		5.42±0.06

[0053] 所得的减小因子如下表3所示,其中将输入病毒对照平均值用作输入病毒滴度。如在表3中所见,在低病毒接种物中,减小百分比达到的峰值如下:对于0.5% (w/v) 的氨甲环酸为90.5%,对于1.0% (w/v) 的氨甲环酸为98.8%,和对于2.0% (w/v) 的氨甲环酸为99.7%。数据显示了在低病毒接种物上如预期的随着氨甲环酸百分比增加更高的减小百分比,并且在高病毒接种物上在0.5% (w/v) 和2.0% (w/v) 的氨甲环酸百分比之间观察到减小百分比的增加。在高病毒接种物中,减小百分比达到的峰值如下:对于0.5% (w/v) 的氨甲环酸为45.9%,对于1.0% (w/v) 的氨甲环酸为5.9%,和对于2.0% (w/v) 的氨甲环酸为90.8%。应特别注意2.0% (w/v) 的氨甲环酸的减小百分比,尤其是如在低病毒接种物中指示的,其证实了大于99%减小。在爆发之前,病毒感染的水平是相对较低的,因此氨甲环酸在该水平的有效性与爆发的抑制更相关。

表 3

试验物	病毒接种物	重复数目	接触时间	输入病毒滴度 (Log ₁₀ TCID ₅₀)	输出病毒滴度 (Log ₁₀ TCID ₅₀)	Log ₁₀ 减小	减小(%)
氨甲环酸-0.5%	低	1	48±8 小时	6.26	5.83	0.43	62.9
		2		6.26	5.24	1.02	90.5
		3		6.26	5.54	0.72	81.0
氨甲环酸-1.0%		1		6.26	5.65	0.61	75.5
		2		6.26	4.58	1.68	97.9
		3		6.26	4.34	1.92	98.8
氨甲环酸-2.0%		1		6.26	4.76	1.50	96.8
		2		6.26	3.69	2.57	99.7
		3		6.26	4.04	2.22	99.4
氨甲环酸-0.5%	高	1	48±8 小时	6.46	6.19	0.27	45.9
		2		6.46	6.43	0.03	5.9
		3		6.46	6.37	0.09	18.1
氨甲环酸-1.0%		1		6.46	6.43	0.03	5.9
		2		6.46	6.61	-0.15	无减小
		3		6.46	6.43	0.03	5.9
氨甲环酸-2.0%		1		6.46	5.71	0.75	82.1
		2		6.46	5.42	1.04	90.8
		3		6.46	5.42	1.04	90.8

[0054] 氨甲环酸对单纯疱疹病毒2型 (HSV-2) 的抗病毒活性

每个经试验并在下面显示的样品各具有3次重复,并由在0% (w/v) 氨甲环酸的输入病毒对照、对于低和高病毒接种物而言在0.5% (w/v)、1.0% (w/v) 和2.0% (w/v) 的氨甲环酸组成。每个样品的接触时间为48±8小时,并使用输入病毒滴度 (Log₁₀TCID₅₀) 和输出病毒滴度 (Log₁₀TCID₅₀) 生成减小因子,从而产生具有相关减小百分比的Log₁₀减小因子。

[0055] 如下制备用于评价氨甲环酸对HSV-2 (对于低病毒接种物) 的抗病毒活性的制剂: 对于每剂氨甲环酸或输入病毒对照,将0.25 mL病毒接种物 (含有10^{2.1} TCID₅₀单位) 加入3个孔中。将接种物在5±3%CO₂中在36±2℃温育90分钟。除去接种物,并用PBS洗涤孔3次。将1.0 mL的每剂氨甲环酸 (或DM,对于输入病毒对照) 加入每个孔中。将该板在36±2℃和5±3%CO₂下温育48±8小时。然后将该板在-60至-90℃冷冻6天,解冻,并且将每个孔的内容物在2,000 RPM离心10分钟。收集来自每个孔的上清液并测定感染性病毒。

[0056] 滴度结果如下表4所示,低病毒接种物的输入病毒对照滴度 (Log₁₀TCID₅₀/mL) 是在6.13±0.09至6.31±0.08的范围内,平均为6.22±0.08,病毒储备物滴度对照具有2.68±0.20的滴度。在试验中使用了0.5% (w/v)、1.0% (w/v) 和2.0%的氨甲环酸的样品量,其具有如下所示的滴度值 (Log₁₀TCID₅₀/mL)。

表 4

样品	病毒接种物	重复数目	接触时间	滴度 (Log ₁₀ TCID ₅₀ /mL)
细胞生存力/ 培养基无菌对照	NA	NA	NA	没有检测到病毒, 细胞是活的: 培养基是无菌的
病毒储备物滴度对照	低			2.68±0.20
输入病毒对照 (0%氨甲环酸)	低	1	48±8 小时	6.31±0.08
		2		6.19±0.08
		3		6.13±0.09
	输入病毒对照(低) - 平均			6.22±0.08
氨甲环酸- 0.5%	低	1	48±8 小时	5.54±0.09
		2		5.77±0.10
		3		5.71±0.08
氨甲环酸- 1.0%	低	1		5.89±0.10
		2		5.60±0.09
		3		5.83±0.08
氨甲环酸- 2.0%	低	1		4.76±0.10
		2		4.34±0.12
		3		4.40±0.11

[0057] 如下制备用于评价氨甲环酸对HSV-2(对于高病毒接种物)的抗病毒活性的制剂: 对于每剂氨甲环酸或输入病毒对照,将0.25 mL病毒接种物(含有 $10^{3.8}$ TCID₅₀单位)加入3个孔中。将接种物在 $5 \pm 3\%$ CO₂中在 $36 \pm 2^\circ\text{C}$ 温育90分钟。除去接种物,并用PBS洗涤孔3次。将1.0 mL的每剂氨甲环酸(或DM,对于输入病毒对照)加入每个孔中。将该板在 $36 \pm 2^\circ\text{C}$ 和 $5 \pm 3\%$ CO₂下温育 48 ± 8 小时。然后将该板在 -60 至 -90°C 冷冻6天,解冻,并且将每个孔的内容物在2,000 RPM离心10分钟。收集来自每个孔的上清液并测定感染性病毒。

[0058] 滴度结果如下表5所示,高病毒接种物的输入病毒对照滴度(Log₁₀TCID₅₀/mL)是在 7.74 ± 0.11 至 7.92 ± 0.09 的范围内,平均为 7.83 ± 0.09 ,病毒储备物滴度对照具有 4.43 ± 0.18 的滴度。在试验中使用了0.5% (w/v)、1.0% (w/v)和2.0% (w/v)的氨甲环酸的样品量,其具有如下所示的滴度值(Log₁₀TCID₅₀/mL)。

表 5

样品	病毒接种物	重复数目	接触时间	滴度 (Log ₁₀ TCID ₅₀ /mL)
细胞生存力/ 培养基无菌对照	NA	NA	NA	没有检测到病毒, 细胞是活的; 培养基是无菌的
病毒储备物滴度对照	高			4.43±0.18
输入病毒对照 (0%氨甲环酸)	高	1	48±8 小时	7.80±0.06
		2		7.92±0.09
		3		7.74±0.11
	输入病毒对照(高) - 平均			7.83±0.09
氨甲环酸- 0.5%	高	1	48±8 小时	7.50±0.09
		2		7.86±0.10
		3		7.56±0.09
氨甲环酸- 1.0%	高	1		7.62±0.08
		2		7.44±0.11
		3		7.38±0.10
氨甲环酸- 2.0%	高	1		4.04±0.08
		2		4.10±0.09
		3		5.00±0.10

[0059] 所得的减小因子如下表6所示, 其中将输入病毒对照平均值用作输入病毒滴度。如在表6中所见, 在低病毒接种物中, 减小百分比达到的峰值如下: 对于0.5% (w/v) 的氨甲环酸为78.94%, 对于1.0% (w/v) 的氨甲环酸为75.82%, 和对于2.0% (w/v) 的氨甲环酸为98.67%。数据显示了在低病毒接种物上2.0% (w/v) 的氨甲环酸的更高减小百分比和在高病毒接种物上随着氨甲环酸百分比增加减小百分比的普遍增加。在高病毒接种物中, 减小百分比达到的峰值如下: 对于0.5% (w/v) 的氨甲环酸为52.85%, 对于1.0% (w/v) 的氨甲环酸为64.24%, 和对于2.0% (w/v) 的氨甲环酸为99.98%。应特别注意2.0% (w/v) 的氨甲环酸的减小百分比, 尤其是如在低和高病毒接种物中指示的, 其中证实了大于98%的减小。

表 6

试验物	病毒接种物	重复数目	接触时间	输入病毒滴度 (Log ₁₀ TCID ₅₀)	输出病毒滴度 (Log ₁₀ TCID ₅₀)	Log ₁₀ 减小	减小 (%)
氨甲环酸-0.5%	低	1	48±8小时	6.22	5.54	0.68	78.94
		2		6.22	5.77	0.45	64.24
		3		6.22	5.71	0.51	68.85
氨甲环酸-1.0%		1		6.22	5.89	0.33	52.85
		2		6.22	5.60	0.62	75.82
		3		6.22	5.83	0.39	58.94
氨甲环酸-2.0%		1		6.22	4.76	1.46	96.51
		2		6.22	4.34	1.88	98.67
		3		6.22	4.40	1.82	98.47
氨甲环酸-0.5%	高	1	48±8小时	7.83	7.50	0.33	52.85
		2		7.83	7.86	无减小	无减小
		3		7.83	7.56	0.27	45.87
氨甲环酸-1.0%		1		7.83	7.62	0.21	37.85
		2		7.83	7.44	0.39	58.94
		3		7.83	7.38	0.45	64.24
氨甲环酸-2.0%		1		7.83	4.04	3.79	99.98
		2		7.83	4.10	3.73	99.98
		3		7.83	5.00	2.83	99.85

[0060] 氨甲环酸对人免疫缺陷病毒1型 (HIV-1) 的抗病毒活性

每个经试验并在下面显示的样品各具有3次重复,并由在0% (w/v) 氨甲环酸的输入病毒对照、对于低和高病毒接种物而言在2.0% (w/v)、3.0% (w/v) 和4.0% (w/v) 的氨甲环酸组成。每个样品的接触时间为48±8小时,并使用输入病毒滴度 (Log₁₀TCID₅₀) 和输出病毒滴度 (Log₁₀TCID₅₀) 生成减小因子,从而产生具有相关减小百分比的Log₁₀减小因子。

[0061] 如下制备用于评价氨甲环酸对HIV-1 (对于低病毒接种物) 的抗病毒活性的制剂:对于每剂氨甲环酸或输入病毒对照,将0.5 mL病毒接种物 (含有10^{2.0} TCID₅₀单位) 加入3个孔中。将1.0 mL的每剂氨甲环酸 (或DM,对于输入病毒对照) 加入每个孔中。将该板在36±2 °C和5±3%CO₂下温育48±8小时。然后将该板在-60至-90°C冷冻1天,解冻,并且将每个孔的内容物在2,000 RPM离心10分钟。收集来自每个孔的上清液并测定感染性病毒。

[0062] 滴度结果如下表7所示,低病毒接种物的输入病毒对照滴度 (Log₁₀TCID₅₀/mL) 是在4.34±0.10至4.46±0.10的范围内,平均为4.40±0.08,病毒储备物滴度对照具有2.30±0.19的滴度。在试验中使用了2.0% (w/v)、3.0% (w/v) 和4.0% (w/v) 的氨甲环酸的样品量,其具有如下所示的滴度值 (Log₁₀TCID₅₀/mL)。

表 7

样品	病毒接种物	重复数目	接触时间	滴度 (Log ₁₀ TCID ₅₀ /mL)
细胞生存力/ 培养基无菌对照	NA	NA	NA	没有检测到病毒, 细胞是活的; 培养基是无菌的
病毒储备物滴度对照	低			2.30±0.19
输入病毒对照 (0%氨甲环酸)	低	1	48±8 小时	4.34±0.10
		2		4.40±0.00
		3		4.46±0.10
	输入病毒对照(低) - 平均			4.40±0.08
氨甲环酸- 2.0%	低	1	48±8 小时	4.22±0.09
		2		4.16±0.09
		3		4.04±0.08
氨甲环酸- 3.0%	低	1		3.93±0.00
		2		4.04±0.10
		3		4.34±0.10
氨甲环酸- 4.0%	低	1		2.79±0.09
		2		2.85±0.08
		3		2.55±0.06

[0063] 如下制备用于评价氨甲环酸对HIV-1(对于高病毒接种物)的抗病毒活性的制剂: 对于每剂氨甲环酸或输入病毒对照,将0.5 mL病毒接种物(含有 $10^{3.88}$ TCID₅₀单位)加入3个孔中。将1.0 mL的每剂氨甲环酸(或DM,对于输入病毒对照)加入每个孔中。将该板在 36 ± 2 °C和 $5 \pm 3\%$ CO₂下温育 48 ± 8 小时。然后将该板在 -60 至 -90 °C冷冻1天,解冻,并且将每个孔的内容物在2,000 RPM离心10分钟。收集来自每个孔的上清液并测定感染性病毒。

[0064] 滴度结果如下表8所示,高病毒接种物的输入病毒对照滴度(Log₁₀TCID₅₀/mL)是在 5.71 ± 0.10 至 6.31 ± 0.08 的范围内,平均为 6.06 ± 0.09 ,病毒储备物滴度对照具有 4.18 ± 0.18 的滴度。在试验中使用了2.0% (w/v)、3.0% (w/v)和4.0% (w/v)的氨甲环酸的样品量,其具有如下所示的滴度值(Log₁₀TCID₅₀/mL)。

表 8

样品	病毒接种物	重复数目	接触时间	滴度 (Log ₁₀ TCID ₅₀ /mL)
细胞生存力/ 培养基无菌对照	NA	NA	NA	没有检测到病毒, 细胞是活的; 培养基是无菌的
病毒储备物滴度对照	高			4.18±0.18
输入病毒对照 (0%氨甲环酸)	高	1	48±8 小时	5.71±0.10
		2		5.95±0.08
		3		6.31±0.08
	输入病毒对照(高) - 平均			6.06±0.09
氨甲环酸- 2.0%	高	1	48±8 小时	5.83±0.00
		2		6.01±0.09
		3		6.01±0.11
氨甲环酸- 3.0%	高	1		5.83±0.00
		2		5.71±0.10
		3		6.01±0.09
氨甲环酸- 4.0%	高	1		4.82±0.10
		2		4.70±0.09
		3		4.52±0.08

[0065] 所得的减小因子如下表9所示, 其中将输入病毒对照平均值用作输入病毒滴度。如在表9中所见, 在低病毒接种物中, 减小百分比达到的峰值如下: 对于2.0% (w/v) 的氨甲环酸为56.6%, 对于3.0% (w/v) 的氨甲环酸为66.3%, 和对于4.0% (w/v) 的氨甲环酸为98.6%。数据显示了在低病毒接种物上如预期的随着氨甲环酸百分比增加更高的减小百分比, 和在高病毒接种物上减小百分比随着氨甲环酸百分比增加而增加。在高病毒接种物中, 减小百分比达到的峰值如下: 对于2.0% (w/v) 的氨甲环酸为41.1%, 对于3.0% (w/v) 的氨甲环酸为55.3%, 和对于4.0% (w/v) 的氨甲环酸为97.1%。应特别注意4.0% (w/v) 的氨甲环酸的减小百分比, 尤其是如在低和高病毒接种物中指示的, 其中证实了大于95%的减小。

表 9

试验物	病毒接种物	重复数目	接触时间	输入病毒滴度 (Log ₁₀ TCID ₅₀)	输出病毒滴度 (Log ₁₀ TCID ₅₀)	Log ₁₀ 减小	减小 (%)
氨甲环酸-2.0%	低	1	48±8 小时	4.40	4.22	0.18	34.3
		2		4.40	4.16	0.24	42.8
		3		4.40	4.04	0.36	56.6
氨甲环酸-3.0%		1		4.40	3.93	0.47	66.3
		2		4.40	4.04	0.36	56.6
		3		4.40	4.34	0.06	13.5
氨甲环酸-4.0%		1		4.40	2.79	1.61	97.6
		2		4.40	2.85	1.55	97.2
		3		4.40	2.55	1.85	98.6
氨甲环酸-2.0%	高	1	48±8 小时	6.06	5.83	0.23	41.1
		2		6.06	6.01	0.05	10.9
		3		6.06	6.01	0.05	10.9
氨甲环酸-3.0%		1		6.06	5.83	0.23	41.1
		2		6.06	5.71	0.35	55.3
		3		6.06	6.01	0.05	10.9
氨甲环酸-4.0%		1		6.06	4.82	1.24	94.2
		2		6.06	4.70	1.36	95.6
		3		6.06	4.52	1.54	97.1

[0066] 使用小鸡含胚卵作为感染系统的氨甲环酸对甲型流感病毒 (H3N2) 的抗病毒活性

每个经试验并在下面显示的样品各具有4个重复,并由在0% (w/v) 氨甲环酸的输入病毒对照、对于低和高病毒接种物而言在6% (w/v)、8% (w/v) 和10% (w/v) 的氨甲环酸组成。每个样品的接触时间是72±8小时,并使用输入病毒滴度 (Log₁₀TCID₅₀) 和输出病毒滴度 (Log₁₀TCID₅₀) 生成减小因子,从而产生具有相关减小百分比的Log₁₀减小因子。

[0067] 如下制备用于评价氨甲环酸对H3N2 (对于低病毒接种物) 的抗病毒活性的制剂:对于每剂氨甲环酸或输入病毒对照,将0.2 mL氨甲环酸-病毒混合物 (含有10^{3.0} TCID₅₀/mL) 加给4个含胚鸡卵。将所述卵在36±2℃温育72±8小时。然后将所述卵保持在1-10℃过夜。然后收获尿囊液,并保持在-60至-90℃直到测定,此后将样品解冻和在2,000 RPM离心15分钟。收集来自每个样品的上清液并测定感染性病毒。

[0068] 滴度结果如下表10所示,低病毒接种物的输入病毒对照滴度 (Log₁₀TCID₅₀/mL) 是在7.00±0.28至8.00±0.28的范围内,平均为7.64±0.27,病毒储备物滴度对照具有3.50±0.00的滴度。在试验中使用了6% (w/v)、8% (w/v) 和10% (w/v) 的氨甲环酸的样品量,其具有如下所示的滴度值 (Log₁₀TCID₅₀/mL)。

表 10

样品	病毒接种物	重复数目	接触时间	滴度 (Log ₁₀ TCID ₅₀ /mL)
细胞生存力/ 培养基无菌对照	NA	NA	NA	没有检测到病毒, 细胞是活的; 培养基是无菌的
病毒储备物滴度对照	低			3.50±0.00
输入病毒对照 (0%氨甲环酸)	低	1	72±8 小时	7.00±0.28
		2		7.00±0.28
		3		7.75±0.25
		4		8.00±0.28
	输入病毒对照(低) - 平均			7.64±0.27
6%氨甲环酸	低	1	72±8 小时	7.00±0.28
		2		6.50±0.00
		3		6.75±0.25
		4		6.25±0.25
8%氨甲环酸	低	1		4.75±0.25
		2		4.00±0.28
		3		4.25±0.25
		4		5.25±0.25
10%氨甲环酸	低	1		4.25±0.25
		2		3.75±0.25
		3		4.25±0.37
		4		4.25±0.25

[0069] 如下制备用于评价氨甲环酸对H3N2 (对于高病毒接种物) 的抗病毒活性的制剂: 对于每剂氨甲环酸或输入病毒对照, 将0.2 mL氨甲环酸-病毒混合物 (含有 $10^{5.0}$ TCID₅₀/mL) 加给4个含胚鸡卵。将所述卵在 $36 \pm 2^\circ\text{C}$ 温育 72 ± 8 小时。然后将所述卵保持在 $1-10^\circ\text{C}$ 过夜。然后收获尿囊液, 并保持在 -60 至 -90°C 直到测定, 此后将样品解冻和在2,000 RPM离心15分钟。收集来自每个样品的上清液并测定感染性病毒。

[0070] 滴度结果如下表11所示, 高病毒接种物的输入病毒对照滴度 (Log₁₀TCID₅₀/mL) 是在 6.00 ± 0.28 至 7.00 ± 0.28 的范围内, 平均为 6.74 ± 0.28 , 病毒储备物滴度对照具有 5.50 ± 0.00 的滴度。在试验中使用了6% (w/v)、8% (w/v) 和10% (w/v) 的氨甲环酸的样品量, 其具有如下所示的滴度值 (Log₁₀TCID₅₀/mL)。

表 11

样品	病毒接种物	重复数目	接触时间	滴度 (Log ₁₀ TCID ₅₀ /mL)
细胞生存力/ 培养基无菌对照	NA	NA	NA	没有检测到病毒, 细胞是活的; 培养基是无菌的
病毒储备物滴度对照	高			5.50±0.00
输入病毒对照 (0%氨甲环酸)	高	1	72±8 小时	6.00±0.28
		2		6.00±0.28
		3		7.00±0.28
		4		7.00±0.28
	输入病毒对照(高) - 平均			6.74±0.28
6%氨甲环酸	高	1	72±8 小时	6.75±0.25
		2		6.75±0.25
		3		7.00±0.28
		4		6.50±0.35
8%氨甲环酸	高	1		6.00±0.28
		2		6.25±0.25
		3		6.50±0.00
		4		6.00±0.28
10%氨甲环酸	高	1		4.00±0.28
		2		4.25±0.37
		3		5.50±0.00
		4		4.50±0.00

[0071] 所得的减小因子如下表12所示, 其中将输入病毒对照平均值用作输入病毒滴度, 低病毒接种物是 $10^{3.0}$ TCID₅₀/mL, 且高病毒接种物是 $10^{5.0}$ TCID₅₀/mL。如在表12中所见, 在低病毒接种物中, 减小百分比达到的峰值如下: 对于6% (w/v) 的氨甲环酸为95.96%, 对于8% (w/v) 的氨甲环酸为99.98%, 和对于10% (w/v) 的氨甲环酸为99.99%。数据显示了在低病毒接种物上如预期的随着氨甲环酸百分比增加更高的减小百分比和在高病毒接种物上减小百分比随着氨甲环酸百分比增加而增加, 尽管四个重复试验中的三个未显示6% (w/v) 的氨甲环酸的病毒减少。在高病毒接种物中, 减小百分比达到的峰值如下: 对于6% (w/v) 的氨甲环酸为42.50%, 对于8% (w/v) 的氨甲环酸为81.82%, 和对于10% (w/v) 的氨甲环酸为99.82%。应特别注意10% (w/v) 的氨甲环酸的减小百分比, 尤其是如在低和高病毒接种物中指示的, 其中证实了大于99%的减小。

表 12

试验物	病毒接种物	重复数目	接触时间	输入病毒滴度 (Log ₁₀ TCID ₅₀)	输出病毒滴度 (Log ₁₀ TCID ₅₀)	Log ₁₀ 减小	减小 (%)		
6%氨甲环酸	低	1	48±8 小时	7.64	7.00	0.64	77.30		
		2		7.64	6.50	1.14	92.82		
		3		7.64	6.75	0.89	87.24		
		4		7.64	6.25	1.39	95.96		
8%氨甲环酸		1		7.64	4.75	2.89	99.87		
		2		7.64	4.00	3.64	99.98		
		3		7.64	4.25	3.39	99.96		
		4		7.64	5.25	2.39	99.60		
10%氨甲环酸		1		7.64	4.25	3.39	99.96		
		2		7.64	3.75	3.89	99.99		
		3		7.64	4.25	3.39	99.96		
		4		7.64	4.25	3.39	99.96		
6%氨甲环酸		高		1	48±8 小时	6.74	6.75	-0.01	无减小
				2		6.74	6.75	-0.01	无减小
				3		6.74	7.00	-0.26	无减小
				4		6.74	6.50	0.24	42.50
8%氨甲环酸	1		6.74	6.00		0.74	81.82		
	2		6.74	6.25		0.49	67.67		
	3		6.74	6.50		0.24	42.50		
	4		6.74	6.00		0.74	81.82		
10%氨甲环酸	1		6.74	4.00		2.74	99.82		
	2		6.74	4.25		2.49	99.68		
	3		6.74	5.50		1.24	94.25		
	4		6.74	4.50		2.24	99.43		

[0072] 氨甲环酸/L-精氨酸对单纯疱疹病毒1型 (HSV-1) 的抗病毒活性

每个经试验并在下面显示的样品各具有3次重复,并由输入病毒对照(无外来氨甲环酸或L-精氨酸)、2% (w/v) 的氨甲环酸、5,000 μ M L-精氨酸、10,000 μ M L-精氨酸、25,000 μ M L-精氨酸、以及2% (w/v) 氨甲环酸与各5,000 μ M L-精氨酸、10,000 μ M L-精氨酸和25,000 μ M L-精氨酸的混合物组成。用每种组分的双倍浓度值制备氨甲环酸与L-精氨酸的混合物,并用等量的每种组分稀释以获得如上所述的最终浓度。每个样品的接触时间为48±8小时,并使用输入病毒滴度(Log₁₀TCID₅₀)和输出病毒滴度(Log₁₀TCID₅₀)生成减小因子,从而产生相关的减小百分比或促进百分比,并显示相应的Log₁₀滴度差异。

[0073] 如下制备用于评价氨甲环酸/L-精氨酸对HSV-1的抗病毒活性的制剂:对于每剂氨甲环酸、L-精氨酸、氨甲环酸与L-精氨酸、或输入病毒对照,将0.25 mL病毒接种物(含有10^{3.0} TCID₅₀单位)加入3个孔中。将1.0 mL的每剂氨甲环酸、L-精氨酸、氨甲环酸与L-精氨酸、或DM(对于输入病毒对照)加入每个孔。将该板在36±2℃和5±3%CO₂下温育48±8小时。然后将该板在-60至-90℃冷冻1天,解冻,并且将每个孔的内容物在2,000 RPM离心10分钟。收集来自每个孔的上清液并测定感染性病毒。

[0074] 滴度结果如下表13所示,病毒接种物的输入病毒对照滴度(Log₁₀TCID₅₀/mL)是在

6.25±0.11至6.55±0.12的范围内,平均为6.39±0.10,病毒储备物滴度对照具有3.68±0.20的滴度。在试验中使用了2%(w/v)的氨甲环酸、5,000μM L-精氨酸、10,000μM L-精氨酸、25,000μM L-精氨酸、和2%(w/v)氨甲环酸与5,000μM L-精氨酸、10,000μM L-精氨酸和25,000μM L-精氨酸的混合物的样品量,其具有如下所示的滴度值(Log₁₀TCID₅₀/mL)。

表 13

样品	重复数目	接触时间	滴度 (Log ₁₀ TCID ₅₀ /mL)
细胞生存力/培养基无菌对照	NA	NA	没有检测到病毒,细胞是活的;培养基是无菌的
病毒储备物滴度对照			3.68±0.20
输入病毒对照 (无外来氨甲环酸或 L-精氨酸)	1	48±8 小时	6.31±0.08
	2		6.55±0.12
	3		6.25±0.11
	输入病毒对照- 平均		6.39±0.10
2%氨甲环酸(TA)	1	48±8 小时	5.24±0.08
	2		5.30±0.10
	3		5.12±0.10
5,000μM L-精氨酸	1	48±8 小时	6.73±0.06
	2		6.73±0.06
	3		6.43±0.12
10,000μM L-精氨酸	1		7.21±0.06
	2		7.09±0.09
	3		7.15±0.08
25,000μM L-精氨酸	1		7.21±0.06
	2		6.97±0.09
	3		6.85±0.06
2%TA + 5,000μM L-精氨酸	1	48±8 小时	5.71±0.13
	2		5.48±0.08
	3		5.71±0.10
2%TA + 10,000μM L-精氨酸	1		4.52±0.12
	2		4.94±0.10
	3		4.58±0.09
2%TA + 25,000μM L-精氨酸	1		2.61±0.10
	2		2.43±0.11
	3		3.21±0.09

[0075] 所得的减小因子显示在下表14中,其中将输入病毒对照平均值用作输入病毒滴度。如在表14中所见,减小百分比达到的峰值如下:2%(w/v)的氨甲环酸为95%,而含有L-精氨酸(在5,000μM、10,000μM、和25,000μM)的样品没有表现出病毒减少,但是相反,表现出病毒促进。病毒促进达到的峰值如下:5,000μM L-精氨酸为54%,10,000μM L-精氨酸为85%,和25,000μM L-精氨酸为85%。与仅含L-精氨酸的样品相比,含有2%(w/v)氨甲环酸与L-精氨酸的样品在病毒减少方面表现出明显不同的结果。病毒减少达到的峰值如下:2%(w/v)氨甲环

酸与5,000 μ M L-精氨酸为88%,2% (w/v) 氨甲环酸与10,000 μ M L-精氨酸为99%,和2% (w/v) 氨甲环酸与25,000 μ M L-精氨酸为99.99%。如以下呈现的数据所示,2% (w/v) 氨甲环酸与25,000 μ M L-精氨酸表现出大于99%病毒减少。

表 14

试验物	重复数目	接触时间	输入病毒滴度 (Log ₁₀ TCID ₅₀)	输出病毒滴度 (Log ₁₀ TCID ₅₀)	Log ₁₀ 滴度差异	病毒减少 (%)	病毒促进 (%)	
2%氨甲环酸(TA)	1	48 \pm 8 小时	6.39	5.24	-1.15	93	NA	
	2		6.39	5.30	-1.09	92		
	3		6.39	5.12	-1.27	95		
5,000 μ M L-精氨酸	1		6.39	6.73	0.34	NA	54	
	2		6.39	6.73	0.34		54	
	3		6.39	6.43	0.04		9	
10,000 μ M L-精氨酸	1		6.39	7.21	0.82		85	
	2		6.39	7.09	0.70		80	
	3		6.39	7.15	0.76		83	
25,000 μ M L-精氨酸	1		6.39	7.21	0.82		85	
	2		6.39	6.97	0.58		74	
	3		6.39	6.85	0.46		65	
2%TA + 5,000 μ M L-精氨酸	1	48 \pm 8 小时	6.39	5.71	-0.68		79	NA
	2		6.39	5.48	-0.91		88	
	3		6.39	5.71	-0.68		79	
2%TA + 10,000 μ M L-精氨酸	1		6.39	4.52	-1.87	99		
	2		6.39	4.94	-1.45	96		
	3		6.39	4.58	-1.81	98		
2%TA + 25,000 μ M L-精氨酸	1		6.39	2.61	-3.78	99.98		
	2		6.39	2.43	-3.96	99.99		
	3		6.39	3.21	-3.18	99.9		

[0076] 氨甲环酸/L-精氨酸对单纯疱疹病毒2型 (HSV-2) 的抗病毒活性

每个经试验并在下面显示的样品各具有3次重复,并由输入病毒对照(无外来氨甲环酸或L-精氨酸)、2% (w/v) 的氨甲环酸、5,000 μ M L-精氨酸、10,000 μ M L-精氨酸、25,000 μ M L-精氨酸、和2% (w/v) 氨甲环酸与各5,000 μ M L-精氨酸、10,000 μ M L-精氨酸和25,000 μ M L-精氨酸的混合物组成。用每种组分的双倍浓度值制备氨甲环酸与L-精氨酸的混合物,并用等量的每种组分稀释以获得如上所述的最终浓度。每个样品的接触时间为48 \pm 8小时,并使用输入病毒滴度 (Log₁₀TCID₅₀) 和输出病毒滴度 (Log₁₀TCID₅₀) 生成减小因子,从而产生相关的减小百分比或促进百分比,并显示相应的Log₁₀滴度差异。

[0077] 如下制备用于评价氨甲环酸/L-精氨酸对HSV-2的抗病毒活性的制剂:对于每剂氨甲环酸、L-精氨酸、氨甲环酸与L-精氨酸、或输入病毒对照,将0.25 mL病毒接种物(含有10^{3.0} TCID₅₀单位)加入3个孔中。将1.0 mL每剂氨甲环酸、L-精氨酸、氨甲环酸与L-精氨酸、或DM (对于输入病毒对照)加入每个孔。将该板在36 \pm 2 $^{\circ}$ C和5 \pm 3%CO₂下温育48 \pm 8小时。然后将该板在-60至-90 $^{\circ}$ C冷冻1天,解冻,并且将每个孔的内容物在2,000 RPM离心10分钟。收集来自每个孔的上清液并测定感染性病毒。

[0078] 滴度结果如下表15所示,病毒接种物的输入病毒对照滴度 (Log₁₀TCID₅₀/mL) 是在4.82 \pm 0.11至5.00 \pm 0.13的范围内,平均为4.93 \pm 0.10,病毒储备物滴度对照具有3.18 \pm

0.18的滴度。在试验中使用了2% (w/v) 的氨甲环酸、5,000 μ M L-精氨酸、10,000 μ M L-精氨酸、25,000 μ M L-精氨酸、和2% (w/v) 氨甲环酸与5,000 μ M L-精氨酸、10,000 μ M L-精氨酸和25,000 μ M L-精氨酸的混合物的样品量,其具有如下所示的滴度值 ($\text{Log}_{10}\text{TCID}_{50}/\text{mL}$)。

表 15

样品	重复数目	接触时间	滴度 ($\text{Log}_{10}\text{TCID}_{50}/\text{mL}$)
细胞生存力/培养基无菌对照	NA	NA	没有检测到病毒, 细胞是活的; 培养基是无菌的
病毒储备物滴度对照			3.18 \pm 0.18
输入病毒对照 (无外来氨甲环酸或 L-精氨酸)	1	48 \pm 8 小时	5.00 \pm 0.13
	2		4.82 \pm 0.11
	3		4.94 \pm 0.06
	输入病毒对照- 平均		4.93 \pm 0.10
2%氨甲环酸(TA)	1	48 \pm 8 小时	2.55 \pm 0.10
	2		2.43 \pm 0.10
	3		2.79 \pm 0.12
5,000 μ M L-精氨酸	1	48 \pm 8 小时	5.54 \pm 0.11
	2		5.18 \pm 0.09
	3		4.76 \pm 0.08
10,000 μ M L-精氨酸	1		5.36 \pm 0.11
	2		4.94 \pm 0.06
	3		5.54 \pm 0.09
25,000 μ M L-精氨酸	1		4.94 \pm 0.10
	2		4.46 \pm 0.06
	3		4.94 \pm 0.06
2%TA + 5,000 μ M L-精氨酸	1	48 \pm 8 小时	2.37 \pm 0.10
	2		2.20 \pm 0.09
	3		2.49 \pm 0.13
2%TA + 10,000 μ M L-精氨酸	1		2.08 \pm 0.06
	2		2.14 \pm 0.08
	3		2.20 \pm 0.09
2%TA + 25,000 μ M L-精氨酸	1		1.54 \pm 0.00
	2		1.60 \pm 0.06
	3		1.54 \pm 0.00

[0079] 所得的减小因子显示在下表16中,其中将输入病毒对照平均值用作输入病毒滴度。如在表16中所见,减小百分比达到的峰值如下:2% (w/v) 的氨甲环酸为99.7%,而含有L-精氨酸(在5,000 μ M、10,000 μ M和25,000 μ M)的样品主要表现出病毒促进,除了如在5,000 μ M L-精氨酸样品的重复3和25,000 μ M L-精氨酸样品的重复2中所指出的,它们分别表现出32%和66%的病毒减少。病毒促进达到的峰值如下:5,000 μ M L-精氨酸为76%,10,000 μ M L-精氨酸为76%,和25,000 μ M L-精氨酸为3%。与仅含L-精氨酸的样品相比,含有2% (w/v) 氨甲环酸

与L-精氨酸的样品在病毒减少方面表现出明显不同的结果。病毒减少达到的峰值如下：2% (w/v) 氨甲环酸与5,000 μ M L-精氨酸为99.8%，2% (w/v) 氨甲环酸与10,000 μ M L-精氨酸为99.9%，和2% (w/v) 氨甲环酸与25,000 μ M L-精氨酸为99.96%。如以下呈现的数据所示，2% (w/v) 氨甲环酸与L-精氨酸 (在5,000 μ M、10,000 μ M、和25,000 μ M) 表现出大于99%病毒减少。

表 16

试验物	重复数目	接触时间	输入病毒滴度 (Log ₁₀ TCID ₅₀)	输出病毒滴度 (Log ₁₀ TCID ₅₀)	Log ₁₀ 滴度差异	病毒减少 (%)	病毒促进 (%)	
2%氨甲环酸(TA)	1	48±8 小时	4.93	2.55	-2.38	99.6	NA	
	2		4.93	2.43	-2.50	99.7		
	3		4.93	2.79	-2.14	99.3		
5,000 μ M L-精氨酸	1		4.93	5.54	0.61	NA	76	
	2		4.93	5.18	0.25	NA	44	
	3		4.93	4.76	-0.17	32	NA	
10,000 μ M L-精氨酸	1		4.93	5.36	0.43	NA	63	
	2		4.93	4.94	0.01	NA	3	
	3		4.93	5.54	0.61	NA	76	
25,000 μ M L-精氨酸	1		4.93	4.94	0.01	NA	3	
	2		4.93	4.46	-0.47	66	NA	
	3		4.93	4.94	0.01	NA	3	
2%TA + 5,000 μ M L-精氨酸	1		48±8 小时	4.93	2.37	-2.56	99.7	NA
	2			4.93	2.20	-2.73	99.8	
	3			4.93	2.49	-2.44	99.6	
2%TA + 10,000 μ M L-精氨酸	1			4.93	2.08	-2.85	99.9	
	2			4.93	2.14	-2.79	99.8	
	3			4.93	2.20	-2.73	99.8	
2%TA + 25,000 μ M L-精氨酸	1	4.93		1.54	-3.39	99.96		
	2	4.93		1.60	-3.33	99.95		
	3	4.93		1.54	-3.39	99.96		

[0080] 使用精氨酸和组氨酸时氨甲环酸对单纯疱疹病毒1型 (HSV-1) 的抗病毒活性

每个经试验并在下面显示的样品各具有3次重复,并由输入病毒对照(无外来化合物)、2% (w/v) 的氨甲环酸、0.5 mM L-精氨酸、2 mM L-精氨酸、5 mM L-精氨酸、以及2% (w/v) 氨甲环酸与各0.5 mM L-精氨酸、2 mM L-精氨酸和5 mM L-精氨酸的混合物组成。用每种组分的双倍浓度值制备氨甲环酸与L-精氨酸的混合物,并用等量的每种组分稀释以获得如上所述的最终浓度。每个样品的接触时间是48±2小时,并使用输入病毒滴度 (Log₁₀TCID₅₀) 和输出病毒滴度 (Log₁₀TCID₅₀) 生成Log₁₀滴度减小。

[0081] 如下制备用于评价氨甲环酸/L-精氨酸对HSV-1的抗病毒活性的制剂:对于每剂氨甲环酸、L-精氨酸、氨甲环酸与L-精氨酸、或输入病毒对照,将0.25 mL病毒接种物(含有10^{3.0} TCID₅₀单位)加入3个孔中。将1.0 mL每剂氨甲环酸、L-精氨酸、氨甲环酸与L-精氨酸、或DM (对于输入病毒对照)加入每个孔。将该板在36±2°C和5±3%CO₂下温育48±2小时。然后将该板在-60至-90°C冷冻,解冻,并且将每个孔的内容物在2,000 RPM离心10分钟。收集来自每个孔的上清液并测定感染性病毒。

[0082] 滴度结果如下表17所示,病毒接种物的输入病毒对照滴度 (Log₁₀TCID₅₀/mL) 是在8.34±0.10至8.64±0.06的范围内,平均为8.50±0.09,病毒储备物滴度对照具有3.68±

0.20的滴度。在试验中使用了2% (w/v) 的氨甲环酸、0.5 mM L-精氨酸、2 mM L-精氨酸、5 mM L-精氨酸以及2% (w/v) 氨甲环酸与0.5 mM L-精氨酸、2 mM L-精氨酸和5 mM L-精氨酸的混合物的样品量,其具有如下所示的滴度值 ($\text{Log}_{10}\text{TCID}_{50}/\text{mL}$)。

表 17

样品	重复数目	接触时间	滴度($\text{Log}_{10}\text{TCID}_{50}/\text{mL}$)
细胞生存力/培养基无菌对照	NA	NA	没有检测到病毒,细胞是活的;培养基是无菌的
病毒储备物滴度对照			3.68±0.20
输入病毒对照 (无外来化合物)	1	48±2 小时	8.34±0.10
	2		8.46±0.09
	3		8.64±0.06
	输入病毒对照- 平均		8.50±0.09
2%氨甲环酸(TA)	1	48±2 小时	7.15±0.08
	2		7.21±0.06
	3		7.27±0.00
0.5 mM L-精氨酸	1		8.52±0.09
	2		8.22±0.11
	3		8.34±0.11
2 mM L-精氨酸	1		8.46±0.09
	2		8.46±0.10
	3		8.64±0.10
5 mM L-精氨酸	1		8.64±0.06
	2		8.52±0.10
	3		8.70±0.00
2%TA + 0.5 mM L-精氨酸	1		7.74±0.08
	2		7.62±0.08
	3		7.68±0.11
2%TA + 2 mM L-精氨酸	1		7.80±0.06
	2		7.86±0.08
	3		7.62±0.08
2%TA + 5 mM L-精氨酸	1		7.09±0.09
	2		7.09±0.09
	3	7.03±0.09	

[0083] 每个经试验并在下面显示的样品各具有3次重复,并由0.5 mM L-组氨酸、1 mM L-组氨酸、5 mM L-组氨酸、10 mM L-组氨酸、25 mM L-组氨酸、以及2% (w/v) 氨甲环酸与各0.01 mM L-组氨酸、0.05 mM L-组氨酸、0.1 mM L-组氨酸、0.25 mM L-组氨酸和0.5 mM L-组氨酸的混合物组成。用每种组分的双倍浓度值制备氨甲环酸与L-组氨酸的混合物,并用等量的每种组分稀释以获得如上所述的最终浓度。每个样品的接触时间是48±2小时,并使用输入病毒滴度 ($\text{Log}_{10}\text{TCID}_{50}$) 和输出病毒滴度 ($\text{Log}_{10}\text{TCID}_{50}$) 产生 Log_{10} 滴度减小。

[0084] 如下制备用于评价氨甲环酸/L-组氨酸对HSV-1的抗病毒活性的制剂:对于每剂L-

组氨酸或氨甲环酸与L-组氨酸,将0.25 mL病毒接种物(含有 $10^{3.0}$ TCID₅₀单位)加入3个孔中。将1.0 mL每剂L-组氨酸或氨甲环酸与L-组氨酸加入每个孔。将该板在 $36 \pm 2^\circ\text{C}$ 和 $5 \pm 3\%$ CO₂下温育 48 ± 2 小时。然后将该板在 -60 至 -90°C 冷冻,解冻,并且将每个孔的内容物在2,000 RPM离心10分钟。收集来自每个孔的上清液并测定感染性病毒。

[0085] 滴度结果如下表18所示,在试验中使用了0.5 mM L-组氨酸、1 mM L-组氨酸、5 mM L-组氨酸、10 mM L-组氨酸、25 mM L-组氨酸以及2% (w/v) 氨甲环酸与0.01 mM L-组氨酸、0.05 mM L-组氨酸、0.1 mM L-组氨酸、0.25 mM L-组氨酸和0.5 mM L-组氨酸的混合物的样品量,其具有如下所示的滴度值 ($\text{Log}_{10}\text{TCID}_{50}/\text{mL}$)。

表 18

样品	重复数目	接触时间	滴度($\text{Log}_{10}\text{TCID}_{50}/\text{mL}$)
0.5 mM L-组氨酸	1	48±2 小时	8.46±0.09
	2		8.76±0.06
	3		8.76±0.10
1 mM L-组氨酸	1		8.40±0.11
	2		8.76±0.10
	3		8.70±0.11
5 mM L-组氨酸	1		8.52±0.10
	2		8.82±0.08
	3		8.64±0.06
10 mM L-组氨酸	1		8.70±0.00
	2		8.64±0.06
	3		8.64±0.06
25 mM L-组氨酸	1		8.64±0.10
	2		8.52±0.12
	3		8.70±0.00
2%TA + 0.01 mM L-组氨酸	1		6.91±0.08
	2		6.73±0.06
	3		6.97±0.09
2%TA + 0.05 mM L-组氨酸	1		6.97±0.09
	2		6.97±0.09
	3		7.15±0.08
2%TA + 0.1 mM L-组氨酸	1		7.03±0.09
	2		7.15±0.08
	3		6.97±0.09
2%TA + 0.25 mM L-组氨酸	1	7.15±0.08	
	2	6.97±0.09	
	3	6.91±0.08	
2%TA + 0.5 mM L-组氨酸	1	7.15±0.08	
	2	6.61±0.09	
	3	6.97±0.09	

[0086] 每个经试验并在下面显示的样品各具有3次重复,并由2% (w/v) 氨甲环酸与各0.5

mM L-精氨酸和0.5 mM L-组氨酸、0.5 mM L-精氨酸和5 mM L-组氨酸、0.5 mM L-精氨酸和10 mM L-组氨酸、2 mM L-精氨酸和0.05 mM L-组氨酸、2 mM L-精氨酸和0.5 mM L-组氨酸、2 mM L-精氨酸和5 mM L-组氨酸、5 mM L-精氨酸和0.05 mM L-组氨酸、5 mM L-精氨酸和0.5 mM L-组氨酸、以及5 mM L-精氨酸和5 mM L-组氨酸的混合物组成。用每种组分的三倍浓度值制备氨甲环酸与L-精氨酸和L-组氨酸的混合物,并用等量的每种组分稀释以获得如上所述的最终浓度。每个样品的接触时间是 48 ± 2 小时,并使用输入病毒滴度($\text{Log}_{10}\text{TCID}_{50}$)和输出病毒滴度($\text{Log}_{10}\text{TCID}_{50}$)产生 Log_{10} 滴度减小。

[0087] 如下制备用于评价氨甲环酸与L-精氨酸和L-组氨酸对HSV-1的抗病毒活性的制剂:对于每剂氨甲环酸与L-精氨酸和L-组氨酸,将0.25 mL病毒接种物(含有 $10^{3.0}$ TCID_{50} 单位)加入3个孔中。将1.0 mL每剂氨甲环酸与L-精氨酸和L-组氨酸加入每个孔。将该板在 $36 \pm 2^\circ\text{C}$ 和 $5 \pm 3\% \text{CO}_2$ 下温育 48 ± 2 小时。然后将该板在 -60 至 -90°C 冷冻,解冻,并且将每个孔的内容物在2,000 RPM离心10分钟。收集来自每个孔的上清液并测定感染性病毒。

[0088] 滴度结果如下表19所示。在试验中使用了2% (w/v) 氨甲环酸与0.5 mM L-精氨酸和0.5 mM L-组氨酸、0.5 mM L-精氨酸和5 mM L-组氨酸、0.5 mM L-精氨酸和10 mM L-组氨酸、2 mM L-精氨酸和0.05 mM L-组氨酸、2 mM L-精氨酸和0.5 mM L-组氨酸、2 mM L-精氨酸和5 mM L-组氨酸、5 mM L-精氨酸和0.05 mM L-组氨酸、5 mM L-精氨酸和0.5 mM L-组氨酸、以及5 mM L-精氨酸和5 mM L-组氨酸的样品量,其具有如下所示的滴度值($\text{Log}_{10}\text{TCID}_{50}/\text{mL}$)。

表 19

样品	重复数目	接触时间	滴度(Log ₁₀ TCID ₅₀ /mL)
2%TA + 0.5 mM L-精氨酸+ 0.5 mM L-组氨酸	1	48±2 小时	8.34±0.08
	2		8.28±0.06
	3		8.10±0.08
2%TA + 0.5 mM L-精氨酸+ 5 mM L-组氨酸	1		7.92±0.11
	2		7.50±0.09
	3		7.68±0.10
2%TA + 0.5 mM L-精氨酸+ 10 mM L-组氨酸	1		5.95±0.10
	2		5.77±0.10
	3		6.13±0.09
2%TA + 2 mM L-精氨酸+ 0.05 mM L-组氨酸	1		7.56±0.09
	2		7.86±0.08
	3		8.10±0.08
2%TA + 2 mM L-精氨酸+ 0.5 mM L-组氨酸	1		8.04±0.09
	2		7.50±0.09
	3		7.74±0.00
2%TA + 2 mM L-精氨酸+ 5 mM L-组氨酸	1		6.67±0.10
	2		7.38±0.10
	3		7.56±0.09
2%TA + 5 mM L-精氨酸+ 0.05 mM L-组氨酸	1	7.62±0.08	
	2	7.98±0.09	
	3	8.04±0.09	
2%TA + 5 mM L-精氨酸+ 0.5 mM L-组氨酸	1	7.92±0.09	
	2	7.98±0.09	
	3	7.74±0.08	
2%TA + 5 mM L-精氨酸+ 5 mM L-组氨酸	1	6.91±0.08	
	2	7.03±0.09	
	3	6.91±0.08	

[0089] 得到的Log₁₀滴度减小显示在下表20中,其中对于2% (w/v) 氨甲环酸、0.5 mM L-精氨酸、2 mM L-精氨酸、5 mM L-精氨酸以及2% (w/v) 氨甲环酸与0.5 mM L-精氨酸、2 mM L-精氨酸和5 mM L-精氨酸的混合物,将输入病毒对照平均值用作输入病毒滴度。如下所示, Log₁₀滴度减小达到的峰值如下:2% (w/v) 氨甲环酸为1.29,0.5 mM L-精氨酸为0.28,2 mM L-精氨酸为0.04,而5 mM L-精氨酸没有表现出Log₁₀滴度减小。进一步,Log₁₀滴度减小达到的峰值如下:2% (w/v) 氨甲环酸与0.5 mM L-精氨酸为0.88,2% (w/v) 氨甲环酸与2 mM L-精氨酸为0.88,和2% (w/v) 氨甲环酸与5 mM L-精氨酸为1.47。

表 20

样品	重复数目	接触时间	输入病毒滴度 (Log ₁₀ TCID ₅₀)	输出病毒滴度 (Log ₁₀ TCID ₅₀)	Log ₁₀ 滴度减小
2%氨甲环酸(TA)	1	48±2 小时	8.50	7.15	1.35
	2		8.50	7.21	1.29
	3		8.50	7.27	1.23
0.5 mM L-精氨酸	1		8.50	8.52	无减小
	2		8.50	8.22	0.28
	3		8.50	8.34	0.16
2 mM L-精氨酸	1		8.50	8.46	0.04
	2		8.50	8.46	0.04
	3		8.50	8.64	无减小
5 mM L-精氨酸	1		8.50	8.64	无减小
	2		8.50	8.52	无减小
	3		8.50	8.70	无减小
2%TA + 0.5 mM L-精氨酸	1		8.50	7.74	0.76
	2		8.50	7.62	0.88
	3		8.50	7.68	0.82
2%TA + 2 mM L-精氨酸	1		8.50	7.80	0.70
	2		8.50	7.86	0.64
	3		8.50	7.62	0.88
2%TA + 5 mM L-精氨酸	1	8.50	7.09	1.41	
	2	8.50	7.09	1.41	
	3	8.50	7.03	1.47	

[0090] 得到的Log₁₀滴度减小显示在下面表21中,其中对于0.5 mM L-组氨酸、1 mM L-组氨酸、5 mM L-组氨酸和10 mM L-组氨酸,将输入病毒对照平均值用作输入病毒滴度。如下所示,L-组氨酸的Log₁₀滴度减小达到的峰值如下:0.5 mM L-组氨酸为0.04,和1 mM L-组氨酸为0.10,而剩余的样品没有表现出Log₁₀滴度减小。

表 21

样品	重复数目	接触时间	输入病毒滴度 (Log ₁₀ TCID ₅₀)	输出病毒滴度 (Log ₁₀ TCID ₅₀)	Log ₁₀ 滴度减小
0.5 mM L-组氨酸	1	48±2 小时	8.50	8.46	0.04
	2		8.50	8.76	无减小
	3		8.50	8.76	无减小
1 mM L-组氨酸	1		8.50	8.40	0.10
	2		8.50	8.76	无减小
	3		8.50	8.70	无减小
5 mM L-组氨酸	1		8.50	8.52	无减小
	2		8.50	8.82	无减小
	3		8.50	8.64	无减小
10 mM L-组氨酸	1		8.50	8.70	无减小
	2		8.50	8.64	无减小
	3		8.50	8.64	无减小

[0091] 得到的Log₁₀滴度减小显示在下面表22中,其中对于2% (w/v) 氨甲环酸与0.01 mM L-组氨酸、0.05 mM L-组氨酸、0.1 mM L-组氨酸、0.25 mM L-组氨酸和0.5 mM L-组氨酸,将输入病毒对照平均值用作输入病毒滴度。如下所示,Log₁₀滴度减小达到的峰值如下:2% (w/v) 氨甲环酸与0.01 mM L-组氨酸为1.77,2% (w/v) 氨甲环酸与0.05 mM L-组氨酸为1.53,2% (w/v) 氨甲环酸与0.1 mM L-组氨酸为1.53,2% (w/v) 氨甲环酸与0.25 mM L-组氨酸为1.59,和2% (w/v) 氨甲环酸与0.5 mM L-组氨酸为1.89。

表 22

样品	重复数目	接触时间	输入病毒滴度 (Log ₁₀ TCID ₅₀)	输出病毒滴度 (Log ₁₀ TCID ₅₀)	Log ₁₀ 滴度减小
2%TA + 0.01 mM L-组氨酸	1	48±2 小时	8.50	6.91	1.59
	2		8.50	6.73	1.77
	3		8.50	6.97	1.53
2%TA + 0.05 mM L-组氨酸	1		8.50	6.97	1.53
	2		8.50	6.97	1.53
	3		8.50	7.15	1.35
2%TA + 0.1 mM L-组氨酸	1		8.50	7.03	1.47
	2		8.50	7.15	1.35
	3		8.50	6.97	1.53
2%TA + 0.25 mM L-组氨酸	1		8.50	7.15	1.35
	2		8.50	6.97	1.53
	3		8.50	6.91	1.59
2%TA + 0.5 mM L-组氨酸	1		8.50	7.15	1.35
	2		8.50	6.61	1.89
	3		8.50	6.97	1.53

[0092] 得到的Log₁₀滴度减小显示在下面表23中,其中对于2% (w/v) 氨甲环酸与0.5 mM L-精氨酸和0.5 mM L-组氨酸、0.5 mM L-精氨酸和5 mM L-组氨酸、0.5 mM L-精氨酸和10 mM L-组氨酸、2 mM L-精氨酸和0.05 mM L-组氨酸、2 mM L-精氨酸和0.5 mM L-组氨酸、2 mM L-精氨酸和5 mM L-组氨酸、5 mM L-精氨酸和0.05 mM L-组氨酸、5 mM L-精氨酸和0.5 mM L-组氨酸、以及5 mM L-精氨酸和5 mM L-组氨酸,将输入病毒对照平均值用作输入病毒滴度。如下所示,Log₁₀滴度减小达到的峰值如下:2% (w/v) 氨甲环酸与0.5 mM L-精氨酸和0.5 mM L-组氨酸为0.40,2% (w/v) 氨甲环酸与0.5 mM L-精氨酸和5 mM L-组氨酸为1.00,2% (w/v) 氨甲环酸与0.5 mM L-精氨酸和10 mM L-组氨酸为2.73,2% (w/v) 氨甲环酸与2 mM L-精氨酸和0.05 mM L-组氨酸为0.94,2% (w/v) 氨甲环酸与2 mM L-精氨酸和0.5 mM L-组氨酸为1.00,2% (w/v) 氨甲环酸与2 mM L-精氨酸和5 mM L-组氨酸为1.83,2% (w/v) 氨甲环酸与5 mM L-精氨酸和0.05 mM L-组氨酸为0.88,2% (w/v) 氨甲环酸与5 mM L-精氨酸和0.5 mM L-组氨酸为0.76,以及2% (w/v) 氨甲环酸与5 mM L-精氨酸和5 mM L-组氨酸为1.59。

表 23

样品	重复数目	接触时间	输入病毒滴度 (Log ₁₀ TCID ₅₀)	输出病毒滴度 (Log ₁₀ TCID ₅₀)	Log ₁₀ 滴度减小
2%TA + 0.5 mM L-精氨酸 + 0.5 mM L-组氨酸	1	48±2 小时	8.50	8.34	0.16
	2		8.50	8.28	0.22
	3		8.50	8.10	0.40
2%TA + 0.5 mM L-精氨酸 + 5 mM L-组氨酸	1		8.50	7.92	0.58
	2		8.50	7.50	1.00
	3		8.50	7.68	0.82
2%TA + 0.5 mM L-精氨酸 + 10 mM L-组氨酸	1		8.50	5.95	2.55
	2		8.50	5.77	2.73
	3		8.50	6.13	2.37
2%TA + 2 mM L-精氨酸+ 0.05 mM L-组氨酸	1		8.50	7.56	0.94
	2		8.50	7.86	0.64
	3		8.50	8.10	0.40
2%TA + 2 mM L-精氨酸+ 0.5 mM L-组氨酸	1		8.50	8.04	0.46
	2		8.50	7.50	1.00
	3		8.50	7.74	0.76
2%TA + 2 mM L-精氨酸+ 5 mM L-组氨酸	1		8.50	6.67	1.83
	2		8.50	7.38	1.12
	3		8.50	7.56	0.94
2%TA + 5 mM L-精氨酸+ 0.05 mM L-组氨酸	1		8.50	7.62	0.88
	2		8.50	7.98	0.52
	3		8.50	8.04	0.46
2%TA + 5 mM L-精氨酸+ 0.5 mM L-组氨酸	1		8.50	7.92	0.58
	2		8.50	7.98	0.52
	3		8.50	7.74	0.76
2%TA + 5 mM L-精氨酸+ 5 mM L-组氨酸	1	8.50	6.91	1.59	
	2	8.50	7.03	1.47	
	3	8.50	6.91	1.59	

[0093] 结果概述

如上文在前面的讨论中所示,已经使用不同百分比的氨甲环酸证实了HSV-1、HSV-2、HIV和H3N2的病毒复制减少。通常,相对于HSV-1和HSV-2,在低和高病毒接种物中,2.0% (w/v) 的氨甲环酸都显示出最佳结果,尽管即使在低氨甲环酸百分比,HSV-1仍显示出高减少百分比。关于HIV,较高百分比(例如4.0% (w/v))的氨甲环酸在低和高病毒接种物均显示出非常好的结果。关于H3N2,证实了氨甲环酸抗病毒性能是剂量依赖性的并且与病毒载量有关。例如,8% (w/v) 和10% (w/v) 的氨甲环酸显示出在低病毒载量 ($10^{3.0}$ TCID₅₀/mL) 的高减少百分比,而10% (w/v) 的氨甲环酸显示出在高病毒载量 ($10^{5.0}$ TCID₅₀/mL) 的高减少百分比。

[0094] 此外,如在上述讨论中证实的,精氨酸的加入显著改善了氨甲环酸在HSV-1和HSV-2中的抗病毒性能。关于HSV-1,数据指示,2% (w/v) 氨甲环酸与10,000μM L-精氨酸使病毒减少百分比增加至99%,与此相比,单独的2% (w/v) 氨甲环酸的峰值为95%减少。此外,数据表

明,2% (w/v) 氨甲环酸与25,000 μ M L-精氨酸使病毒减少百分比增加至99.99%。关于HSV-2, 数据指示,2% (w/v) 氨甲环酸与5,000 μ M、10,000 μ M和25,000 μ M的L-精氨酸表现出大于99%的病毒减少。

[0095] 氨甲环酸与精氨酸的实验室试验旨在证明氨甲环酸通过拮抗精氨酸来抑制HSV-1和HSV-2复制的作用机理。将不同量的精氨酸加给氨甲环酸处理过的细胞,以观察这是否会拯救病毒复制。出人意料的是,结果表明,与精氨酸(至少在较高水平)组合的氨甲环酸比单独的氨甲环酸更多地抑制病毒。这些结果促使进一步审查。

[0096] 先前的研究已经指示,组氨酸是参与疱疹复制的一种重要氨基酸,其次是精氨酸,尽管后来的研究聚焦于赖氨酸拮抗精氨酸而不是组氨酸。赖氨酸、精氨酸和组氨酸是三种碱性(非酸性)氨基酸,并且它们的结构非常相似,有些人认为它们是彼此的类似物,尤其是赖氨酸和精氨酸。

[0097] 基于上面显示的实验室数据,预见到,三种碱性氨基酸中的一种碱性氨基酸的过量可能会拮抗其它两种碱性氨基酸。此外,预见到,两种碱性氨基酸的过量将拮抗第三种碱性氨基酸。同样,用类似物或模拟物也适用,诸如代替赖氨酸的氨甲环酸。基于上述实验室试验和研究,预见到,在足够量,氨甲环酸拮抗精氨酸和组氨酸,而氨甲环酸与精氨酸的混合物拮抗组氨酸,且氨甲环酸与组氨酸的混合物拮抗精氨酸。大体而言,在氨甲环酸中添加一种或多种氨基酸可以显著提高抗病毒活性的有效性。由过量的拮抗其它氨基酸的氨基酸(例如,作为赖氨酸起作用的氨甲环酸与精氨酸组合地拮抗组氨酸)来实现该提高的有效性。

[0098] 在细胞内的精氨酸和组氨酸的正常生理浓度是约0.1-1 mM,或平均为大约0.5 mM。疱疹病毒需要大约0.5 mM精氨酸和0.5 mM组氨酸才能有效复制,且各在0.5 mM,精氨酸和组氨酸不会互相拮抗。但是,上述研究表明,2% (w/v) 的氨甲环酸拮抗精氨酸和组氨酸,从而使精氨酸和组氨酸的有效可用浓度大大降低至分别低于0.5 mM。不受理论的约束,据信精氨酸可能是主要的或最直接的靶标,而组氨酸可能是次要的或间接的靶标。

[0099] 上面说明的研究证实,加回0.5 mM精氨酸会帮助解除精氨酸的“阻断效应”,但是,组氨酸仍未恢复,因此仅存在部分拯救。加回0.5 mM组氨酸无助于挽救,因为直接靶标精氨酸仍然被“阻断”。但是,加回0.5 mM精氨酸和0.5 mM组氨酸会解除氨甲环酸的作用,且几乎完全挽救疱疹病毒复制。

[0100] 基于上述研究,提供的指示是,10 mM或更高(例如,与生理水平相比过量)的精氨酸和组氨酸开始彼此拮抗。这样,预见到,与单独的2% (w/v) 氨甲环酸相比,2% (w/v) 氨甲环酸与10或25 mM精氨酸将显示出更高的病毒抑制水平。这是由于2% (w/v) 氨甲环酸与0.5 mM精氨酸和10 mM组氨酸样品表现出比单独的2% (w/v) 氨甲环酸更高的病毒抑制水平。应当指出,在进行的研究中,由于细胞毒性,不能评价2% (w/v) 氨甲环酸与10 mM组氨酸。此外,2-5 mM的精氨酸或组氨酸的浓度可能接近临界水平,因为它们可能显示出对2% (w/v) 氨甲环酸的一些拯救作用。

[0101] 预见到,与一种或多种氨基酸组合的氨甲环酸可以增加氨甲环酸的抗病毒效力。组合可以包括、但不限于氨甲环酸与脂族氨基酸、芳族氨基酸、酸性氨基酸、碱性氨基酸、中性氨基酸、独特氨基酸、氨基酸类似物或模拟物或它们的任意组合。此外,据信氨甲环酸(或其它合成的赖氨酸或模拟物)与氨基酸的各种组合允许所述组合物的更高剂量且无毒性。

[0102] 应当指出,在这些实验室试验中使用的氨甲环酸的百分比受限于所用的特定细胞培养基。例如,2% (w/v) 氨甲环酸是可用于HSV-1和HSV-2且无细胞毒性的氨甲环酸的最大浓度,且4% (w/v) 氨甲环酸是可用于HIV-1的最大浓度。但是,在表现出不同生物学行为(例如活性代谢)的人体中,可以使用高得多的浓度的合成赖氨酸类似物。典型的局部使用浓度范围为3-10% (w/v),且研究已经指示,可以安全地施用最高30% (w/v) 的浓度。因而,上述的实验室试验提供了氨甲环酸在抑制这些病毒中的有效性的强烈证据,并且预见在临床应用中甚至更高浓度的合成赖氨酸试剂。此外,以上已经证实,氨甲环酸与精氨酸可以通过拮抗组氨酸而干扰组氨酸的活性。这可以允许更大剂量的氨甲环酸与精氨酸,而无细胞毒性。

[0103] 在人对象中的治疗和预防用法

除上述实验室试验外,还针对人对象进行了各种治疗和预防性使用研究并进行了记录。例如,通过一名54岁女性对象说明了治疗活动,该对象具有在唇部上或唇部附近的感冒疮的复发性爆发的历史。在该情况下,对象注意到爆发的最初迹象,在该情况下,是一个红色的斑点,在它周围有小白点,伴有相关的麻刺感、疼痛和敏感,并立即通过简单拭子向该区域应用了少量,大约0.25 mL的5% (w/v) 氨甲环酸水溶液。在36个小时的过程中,将该实践重复5次,且令人惊讶的是,在36小时时段内,感冒疮已经愈合到只有一个小红点可见的程度,它在此后不久就完全消退。该活性在对象的爆发的典型持续时间(通常持续约14天,甚至当使用局部抗病毒治疗诸如ABREVA[®]时)中是显著的改善。尽管已证明5% (w/v) 浓度的氨甲环酸是有效的,但递送的一系列浓度和总剂量(例如在1-14天的过程中以0.25-5 mL的增量递送的0.5-30% (w/v)) 例如也可以证明是有益的。

[0104] 除上述治疗研究外,还已经进行了进一步研究,其中三名患有复发性感冒疮经历(通常持续约2周)的人对象在检测到爆发开始后每天局部施用3% (w/v) 氨甲环酸几次,并且爆发的症状在48小时内消退。第四位具有复发性感冒疮经历的对象(其通常施用ABREVA[®]几天,仅为避免更大的爆发)在感觉到爆发发作后局部施用10% (w/v) 氨甲环酸一次,并注意到一个非常小的水泡,并且在第二天早晨,水泡消失,且爆发也已经停止。此外,所述对象之一每天在脸上施用3或10% (w/v) 氨甲环酸约一年,并且在这一年中仅经历了一次感冒疮爆发,而不是他们通常的3至5次爆发的经历。

[0105] 此外,在三例中,当个体感觉到感冒或流感感染的症状时,每6至8小时对他们的鼻道和咽喉应用3% (w/v) 氨甲环酸溶液,且症状在36-48小时内消退,而不是约2周的通常持续时间。

[0106] 尽管已经在附表中说明了本公开内容的各种实施方案并且在前面的详细描述中进行了描述,但是应该理解,本公开内容不限于本文公开的实施方案,而是能够在不脱离本文阐述的本公开内容的精神的前提下进行众多重排、修改和替换。

[0107] 如本领域普通技术人员所理解的,术语“基本上”被定义为在很大程度上但不一定完全是所指定的。在任何公开的实施方案中,术语“基本上”、“大约”、“通常”和“约”可以被指定的事项的“……的[百分比]内”代替,其中百分比包括0.1%、1%、5%和10%。

[0108] 前述内容概述了几个实施方案的特征,使得本领域技术人员可以更好地理解本公开内容的方面。本领域技术人员应当理解,他们可以容易地将本公开内容用作设计或修改其它方法和组合物的基础,所述其它方法和组合物用于实现本文所介绍的实施方案的相同目的和/或达到相同优点。本领域技术人员还应该认识到,这样的等效构造不脱离本公开内

容的精神和范围,并且在不脱离本公开内容的精神和范围的前提下,它们可以在本文中做出不同的变化、替换和改变。本发明的范围应当仅由后续权利要求的语言确定。在权利要求内的术语“包含”意图指“至少包括”,使得在权利要求中所列举的要素列表是一个开放的组。除非明确排除,否则术语“一个”、“一种”和其它单数术语意图包括其复数形式。

专利名称(译)	合成的赖氨酸类似物和模拟物的用于抗病毒用途的方法和组合物		
公开(公告)号	CN111315374A	公开(公告)日	2020-06-19
申请号	CN201880070088.0	申请日	2018-08-09
发明人	F.默多克 R.默多克 W.P.斯图尔特		
IPC分类号	A61K31/195 A61K39/40 G01N33/53		
CPC分类号	A61K31/195 A61K31/454		
代理人(译)	黄登高		
优先权	62/550656 2017-08-27 US 62/664555 2018-04-30 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种用于治疗、预防或减少一次性或复发性病毒爆发、用于抑制慢性病毒感染的发展或生长、或用于预防或治疗病毒感染的方法，所述方法包括施用合成的赖氨酸类似物或模拟物，其中所述合成的赖氨酸类似物或模拟物与病毒复制或传播所需的氨基酸或其它生物试剂拮抗或竞争。另外，一种用于治疗、预防或减少一次性或复发性病毒爆发、抑制慢性病毒感染的发展或生长、或预防或治疗病毒感染的组合物，所述组合物包含合成的赖氨酸类似物或模拟物，其中所述合成的赖氨酸类似物或模拟物与病毒复制或传播所需的氨基酸或其它生物试剂拮抗或竞争。