



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116761615 A

(43) 申请公布日 2023. 09. 15

(21) 申请号 202280010804.2

(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

(22) 申请日 2022.01.20

专利代理师 陈桢

(30) 优先权数据

(51) Int.Cl.

2021-007531 2021.01.20 JP

A61K 31/7064 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.07.19

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2022/001997 2022.01.20

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/158528 JA 2022.07.28

(71) 申请人 国立大学法人北海道大学

地址 日本北海道札幌市北区北8条西5丁目

(72) 发明人 前仲胜实 松田彰 泽洋文

大场靖子 佐佐木道仁

上村健太郎

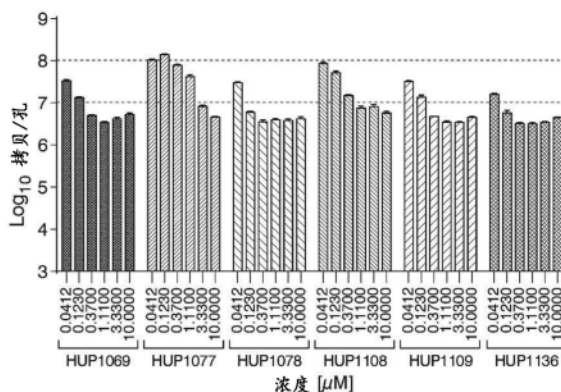
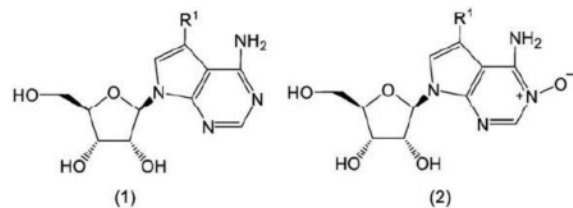
权利要求书5页 说明书20页 附图4页

(54) 发明名称

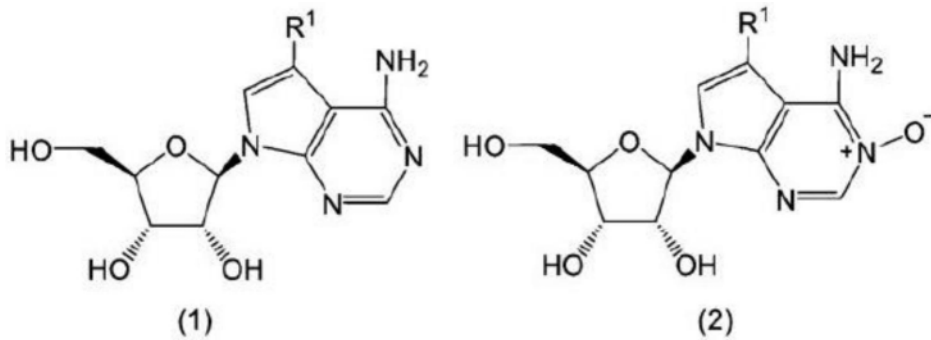
抗病毒剂

(57) 摘要

本发明提供了抗病毒剂等,其包含由通式(1)或(2)(其中R¹是-(CH₂)_n-Z¹-R¹¹或-CH(-Z¹-R¹¹)₂(n₁是0或1;Z¹是单键、-O-、-NH-、-S-、-SO-、-SO₂-、-CO-、-CO-O-或-CH=N-O-;R¹¹是氢原子、C1-6烷基、-NR¹²R¹³、-N₃、-NO₂、-CN、-CH₂-CO-O-R¹⁴、或含有氮原子的5元或6元杂环基团;R¹²和R¹³各自独立地是氢原子或C1-6烷基;并且R¹⁴是氢原子或C1-6烷基;条件是在所述杂环基团中,所述环基团中的氮原子与Z¹连接)表示的化合物或其衍生物、这些化合物的盐或其溶剂化物。



1. 一种抗病毒剂, 所述抗病毒剂包含: 由以下通式(1)或(2) - [化1]

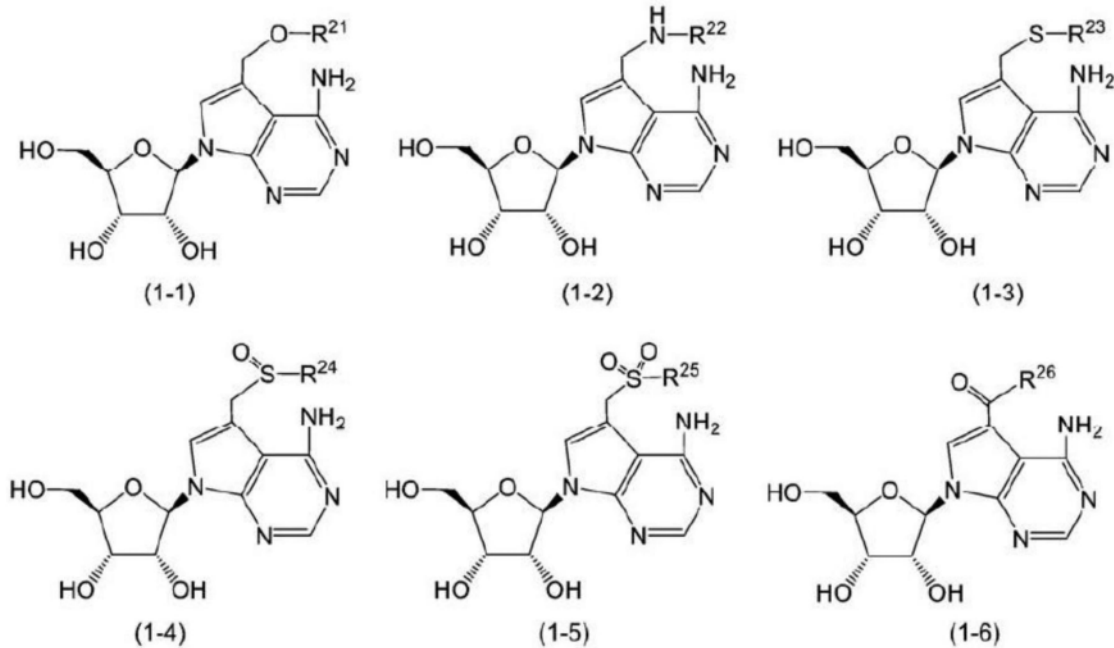


[在所述式中, R^1 是 $-(CH_2)_{n_1}-Z^1-R^{11}$ 或 $-CH(-Z^1-R^{11})_2$ (n_1 是 0 或 1; Z^1 是单键、氧原子、 $-NH-$ 、硫原子、 $-SO-$ 、 $-SO_2-$ 、 $-CO-$ 、 $-CO-O-$ 或 $-CH=N-O-$; R^{11} 是氢原子、具有 1 至 6 个碳的烷基、 $-NR^{12}R^{13}$ 、 $-N_3$ 、 $-NO_2$ 、 $-CN$ 、 $-CH_2-CO-O-R^{14}$ 、或包含氮原子的五元或六元杂环基团; R^{12} 和 R^{13} 各自独立地是氢原子或具有 1 至 6 个碳的烷基; 并且 R^{14} 是氢原子或具有 1 至 6 个碳的烷基, 条件是, 所述杂环基团中的氮原子与 Z^1 连接)]

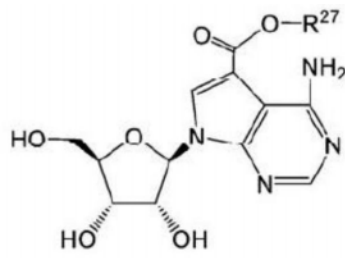
表示的化合物或其衍生物、盐、或其溶剂化物。

2. 根据权利要求 1 所述的抗病毒剂, 其中通式 (1) 是以下通式 (1-1) 至 (1-15) 中的任一个

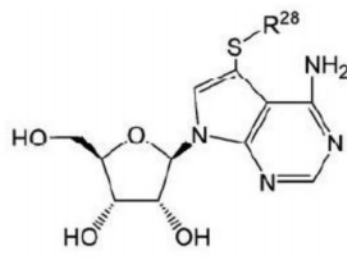
[化2]



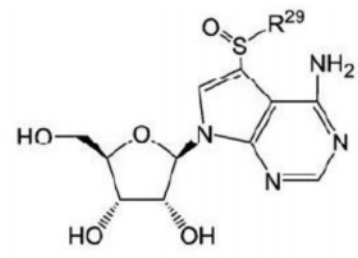
[化3]



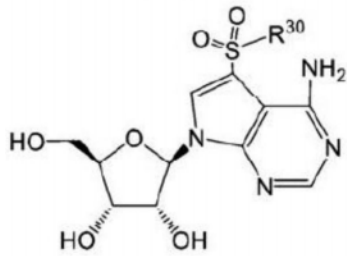
(1-7)



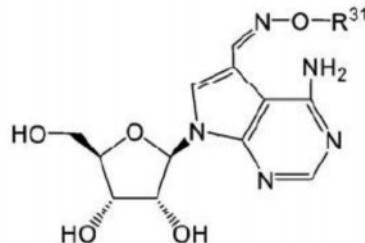
(1-8)



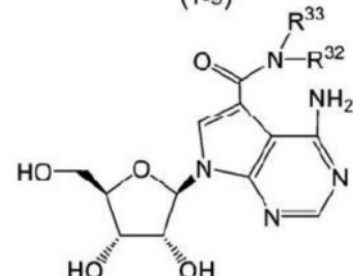
(1-9)



(1-10)

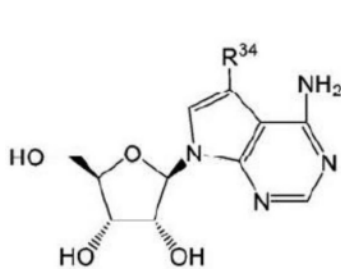


(1-11)

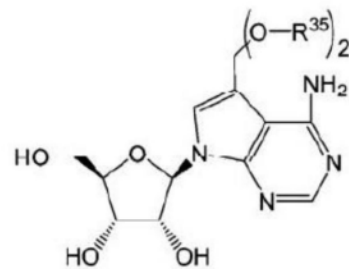


(1-12)

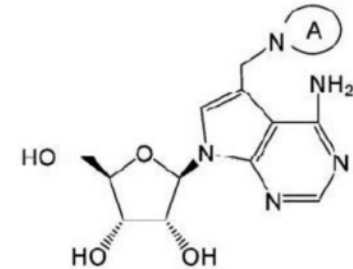
[化4]



(1-13)



(1-14)

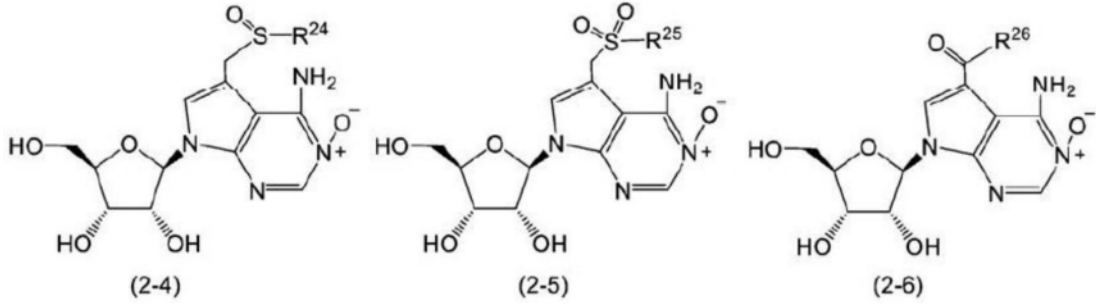
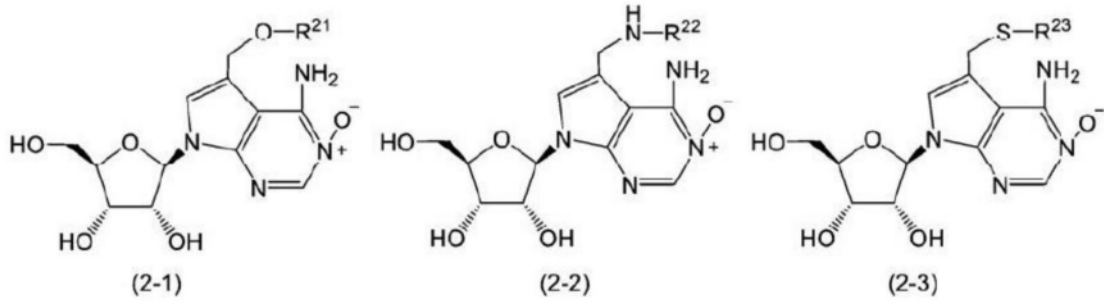


(1-15)

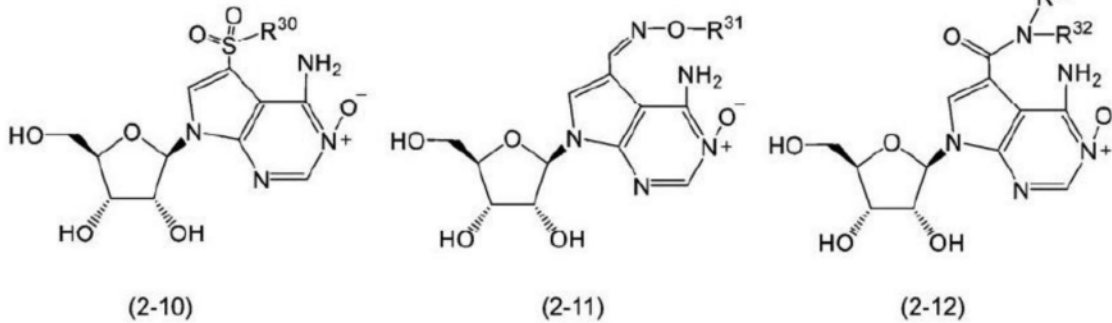
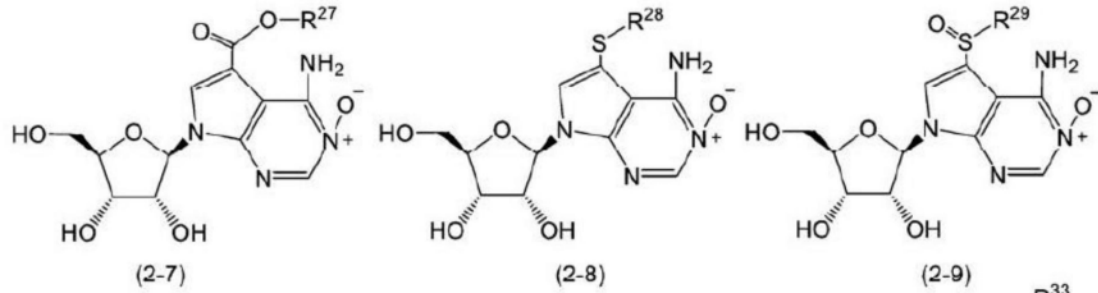
[在所述式中, R^{21} 是氢原子、具有1至6个碳的烷基、 $-CH_2-COOH$ 或氨基; R^{22} 是氢原子、具有1至6个碳的烷基、或氨基; R^{23} 、 R^{26} 、 R^{27} 、 R^{31} 、 R^{32} 和 R^{33} 是氢原子或具有1至6个碳的烷基; R^{24} 、 R^{25} 、 R^{29} 、 R^{30} 和 R^{35} 是具有1至6个碳的烷基; R^{28} 是氢原子、具有1至6个碳的烷基、或氰基; R^{34} 是氢原子、具有1至6个碳的烷基、 $-CH_2-N_3$ 、氰基、氨基、硝基或叠氮基; 并且A是包含氮原子的五元或六元杂环基团]

并且通式(2)是以下通式(2-1)至(2-15)中的任一个

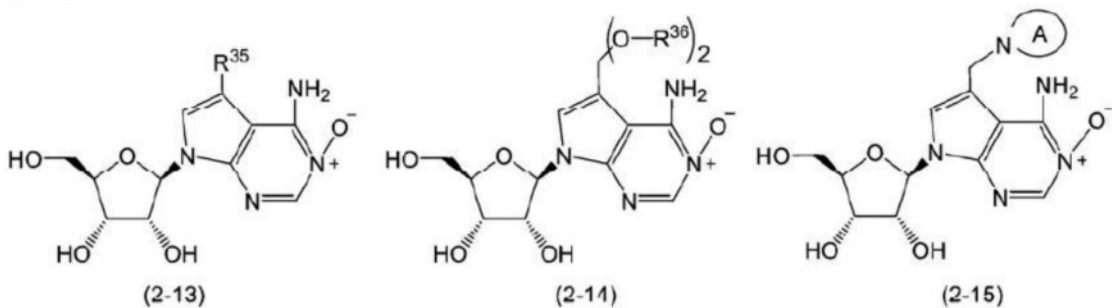
[化5]



[化6]

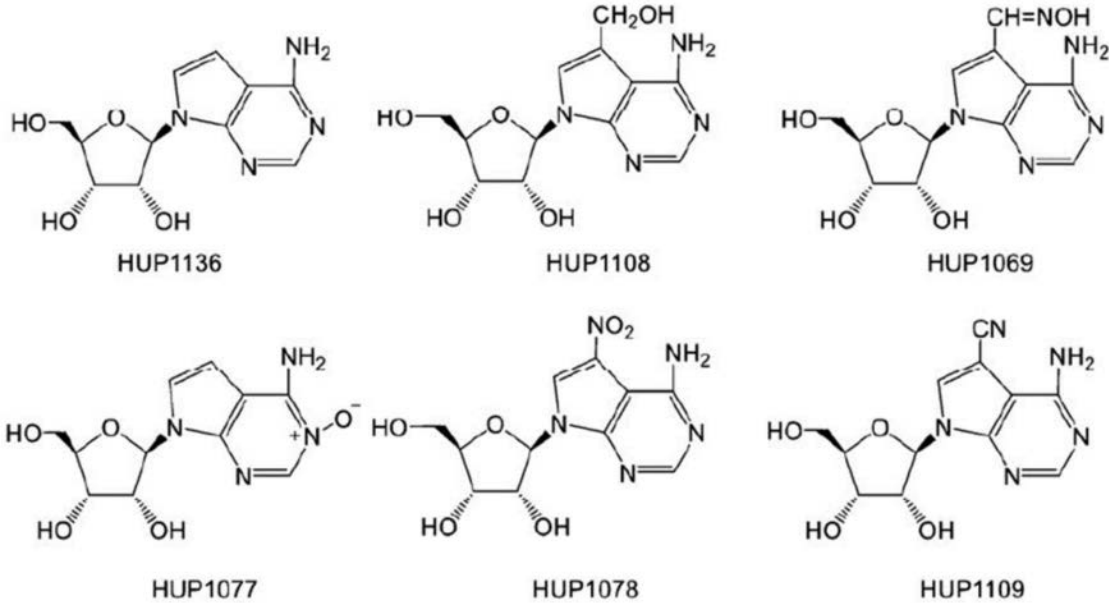


[化7]

[在所述式中, R^{21} 至 R^{35} 和 A 如上]。

3. 根据权利要求1或2所述的抗病毒剂, 其中所述抗病毒剂由选自HUP1136、HUP1108、HUP1069、HUP1077、HUP1078和HUP1109的一种或多种化合物组成。

[化8]



4. 一种药物组合物,所述药物组合物的活性成分是根据权利要求1至3中任一项所述的抗病毒剂。

5. 根据权利要求4所述的药物组合物,其中所述药物组合物用于治疗由冠状病毒或黄病毒引起的感染。

6. 根据权利要求5所述的药物组合物,其中所述药物组合物用于治疗COVID-19。

7. 根据权利要求4至6中任一项的药物组合物,其中所述药物组合物用于与3CL蛋白酶抑制剂的联合治疗。

8. 根据权利要求7的药物组合物,其中所述3CL蛋白酶抑制剂是PF-07304814和S-217622中的至少一种。

9. 一种治疗冠状病毒感染或黄病毒感染的方法,所述方法通过给予有效量的权利要求1至3中任一项的抗病毒剂。

10. 根据权利要求9的方法,其中给予有效量的由HUP1108组成的抗病毒剂。

11. 根据权利要求9或10的方法,其中所述有效量小于60毫克/千克。

12. 根据权利要求11的方法,其中所述有效量为20毫克/千克。

13. 根据权利要求9至12中任一项的方法,其中冠状病毒为SARS-CoV-2。

14. 根据权利要求13的方法,其中SARS-CoV-2为WK-521株、 α 株、 β 株、 γ 株、 δ 株和 θ 株中的至少一种。

15. 根据权利要求9至12中任一项的方法,其中黄病毒为登革病毒(DENV)、寨卡病毒(ZIKV)、黄热病病毒(YFV)、西尼罗河病毒(WNV)和日本脑炎病毒(JEV)中的至少一种。

16. 根据权利要求9至15中任一项的方法,其中与3CL蛋白酶抑制剂联合给予。

17. 根据权利要求16的方法,其中3CL蛋白酶抑制剂为PF-07304814和S-217622中的至少一种。

18. 根据权利要求1至权利要求3中任一项的抗病毒剂与3CL蛋白酶抑制剂的治疗性组合。

19. 根据权利要求18的组合,其中所述3CL蛋白酶抑制剂是PF-07304814和S-217622中

的至少一种。

20. 根据权利要求1至3中任一项的抗病毒剂,其中所述抗病毒剂用于治疗冠状病毒感染或黄病毒感染。

21. 根据权利要求20的抗病毒剂,其中所述冠状病毒为SARS-CoV-2WK-521株、 α 株、 β 株、 γ 株、 δ 株和 θ 株中的至少一种,所述黄病毒为登革病毒(DENV)、寨卡病毒(ZIKV)、黄热病病毒(YFV)、西尼罗河病毒(WNV)和日本脑炎病毒(JEV)中的至少一种。

抗病毒剂

[技术领域]

[0001] 本发明涉及一种抗病毒剂,所述抗病毒剂有效用作病毒诸如冠状病毒或黄病毒的治疗剂。

[背景技术]

[0002] 冠状病毒是具有正链单链RNA作为基因的包膜病毒。除了引起普通感冒的病毒之外,还有引起急性呼吸综合症的感染人类的冠状病毒。例如,存在作为在2003年广泛传播的严重急性呼吸综合症(SARS)的原因的SARS-CoV,SARS-CoV;作为在2013年广泛传播的中东呼吸综合症(MERS)的原因的MERS-CoV;和导致从2019年开始广泛传播的新型冠状病毒疾病COVID-19的SARS-CoV-2。特别是对于COVID-19,药品仍然很少,并且正在寻求开发更有效的药品。

[0003] 瑞德西韦是用于COVID-19的药品。瑞德西韦(GS-5734)是GS-441524的单磷酸酰胺前药并且是一种由核酸化合物制成的抗病毒药物,被开发为用于埃博拉出血热和马尔堡病毒病的药品。其对单链RNA病毒具有抗病毒活性。GS-441524也预期具有针对COVID-19的治疗作用(非专利文献1)。GS-441524是腺苷类似物,也是瑞德西韦的母核苷。

[0004] 非专利文献5报告称,GS-441524对黄病毒和冠状病毒具有抗病毒活性。

[0005] 非专利文献6报告称,GS-621763和MPV(莫纳匹韦)对SARS-CoV-2感染具有治疗效果。GS-621763是GS-441524的前药,而MPV是NHC(N-羟基胞苷)的前药。

[0006] [现有技术文献]

[0007] [非专利文献]

[0008] [非专利文献1]Yan and Muller,ACS Medicinal Chemistry Letters,2020,vol.11,p.1361-1366.

[0009] [非专利文献2]Watanabe and Ueda,Nucleosides&Nucleotides,1983,vol.2(2),p.113-125.

[0010] [非专利文献3]Bergstrom et al.,Journal of Organic Chemistry,1981,vol.46(7),p.1423-1431.

[0011] [非专利文献4]Uematsu and Suhadolnik,Journal of Medicinal Chemistry,1973,vol.16(12),p.1405-1407.

[0012] [非专利文献5]Cho et al.,Bioorganic&Medicinal Chemistry Letters,22(2012),2705-2707.

[0013] [非专利文献6]Schafer et al.,bioRxiv preprint doi:<https://doi.org/10.1101/2021.09.13.460111>,Version 9.4,2021.9.13.

[0014] [非专利文献7]Rasmussen et al.,Viruses 2021,13(7),1369.

[发明内容]

[0015] [本发明要解决的问题]

[0016] 本发明的一个目的是提供一种抗病毒剂,所述抗病毒剂有效地用作COVID-19和其他病毒性感染的药品。

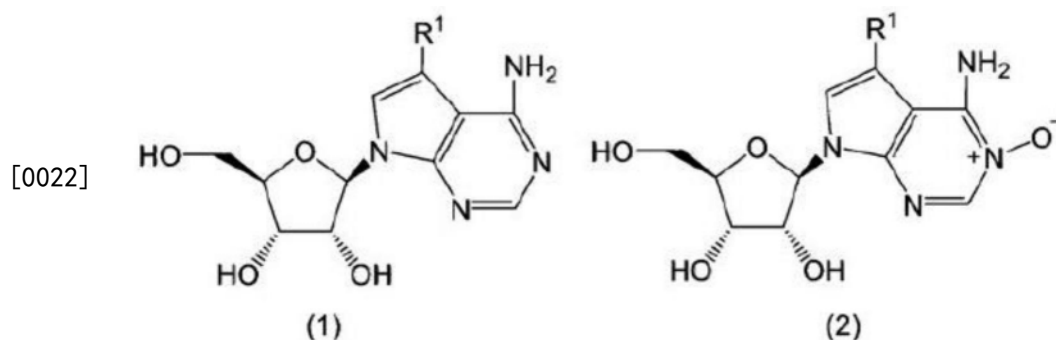
[0017] [解决问题的方式]

[0018] 本发明诸位发明人使用北海道大学药物科学学院药物发现研究和教育中心(the Center for Research and Education on Drug Discovery in the Faculty of Pharmaceutical Sciences at Hokkaido University)拥有的具有作为骨架的核酸化合物的化合物的文库筛选对新型冠状病毒SARS-CoV-2和两种类型的人冠状病毒(毒株229E和OC43)具有抗病毒活性的化合物并且选择具有高抗病毒活性的化合物,从而完成本发明。

[0019] 也就是说,本发明提供了以下抗病毒剂等。

[0020] [1]一种抗病毒剂,所述抗病毒剂由以下制成:由以下通式(1)或(2) -

[0021] [化1]



[0023] [在所述式中, R^1 是 $-(CH_2)_{n_1}-Z^1-R^{11}$ 或 $-CH-(-Z^1-R^{11})_2$ (n_1 是0或1; Z^1 是单键、氧原子、 $-NH-$ 、硫原子、 $-SO-$ 、 $-SO_2-$ 、 $-CO-$ 、 $-CO-O-$ 或 $-CH=N-O-$; R^{11} 是氢原子、具有1至6个碳的烷基、 $-NR^{12}R^{13}$ 、 $-N_3$ 、 $-NO_2$ 、 $-CN$ 、 $-CH_2-CO-O-R^{14}$ 、或包含氮原子的五元或六元杂环基团; R^{12} 和 R^{13} 各自独立地是氢原子或具有1至6个碳的烷基;并且 R^{14} 是氢原子或具有1至6个碳的烷基-然而,所述杂环基团中的氮原子与 Z^1 连接)] -

[0024] 表示的化合物或其衍生物、盐、或其溶剂化物。

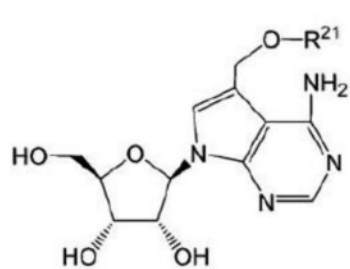
[0025] [2]根据[1]所述的抗病毒剂,其中通式(1)是以下通式(1-1)至(1-15)中的任一个

[0026] [在所述式中, R^{21} 是氢原子、具有1至6个碳的烷基、 $-CH_2-COOH$ 或氨基; R^{22} 是氢原子、具有1至6个碳的烷基、或氨基; R^{23} 、 R^{26} 、 R^{27} 、 R^{31} 、 R^{32} 和 R^{33} 是氢原子或具有1至6个碳的烷基; R^{24} 、 R^{25} 、 R^{29} 、 R^{30} 和 R^{35} 是具有1至6个碳的烷基; R^{28} 是氢原子、具有1至6个碳的烷基、或氰基; R^{34} 是氢原子、具有1至6个碳的烷基、 $-CH_2-N_3$ 、氰基、氨基、硝基或叠氮基;并且A是包含氮原子的五元或六元杂环基团]

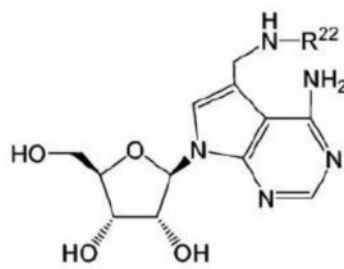
[0027] 并且通式(2)是以下通式(2-1)至(2-15)中的任一个

[0028] [在所述式中, R^{21} 至 R^{35} 和A如上]。

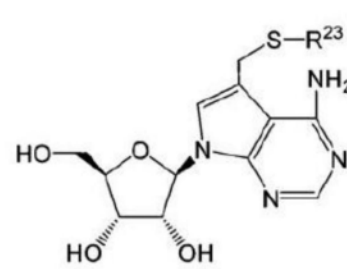
[0029] [化2]



(1-1)

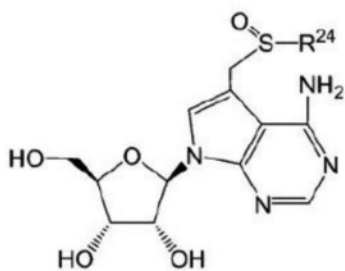


(1-2)

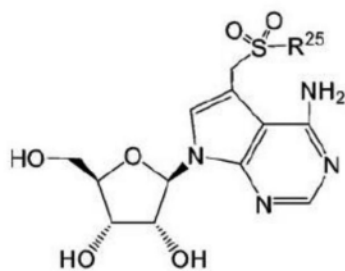


(1-3)

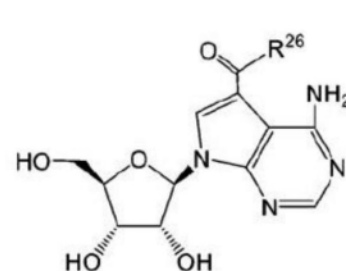
[0030]



(1-4)

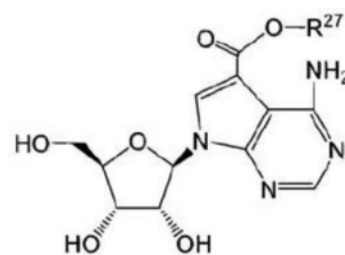


(1-5)

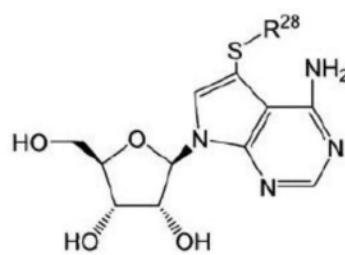


(1-6)

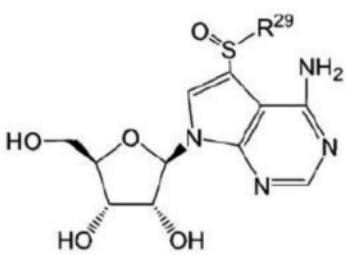
[0031] [化3]



(1-7)

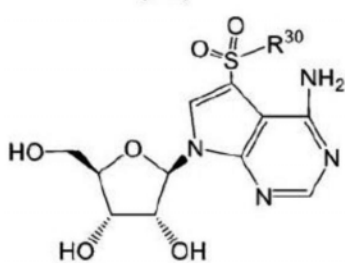


(1-8)

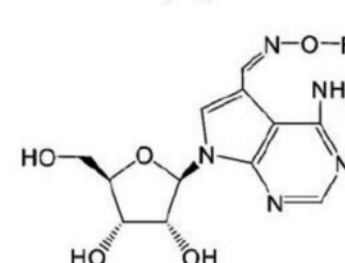


(1-9)

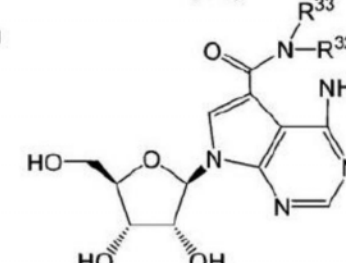
[0032]



(1-10)

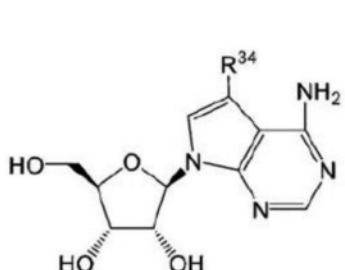


(1-11)

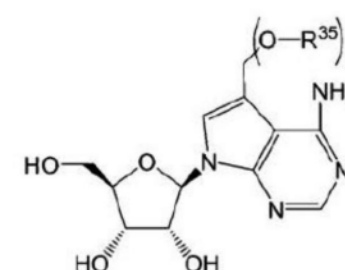


(1-12)

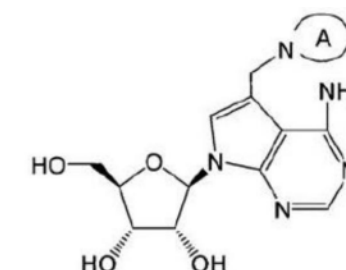
[0033] [化4]



(1-13)

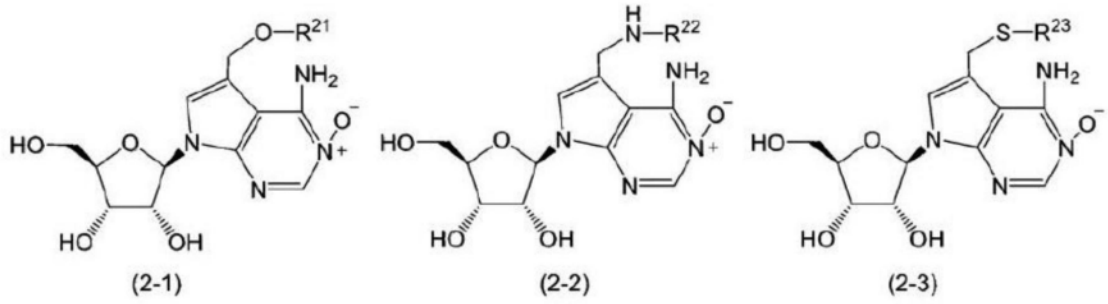


(1-14)

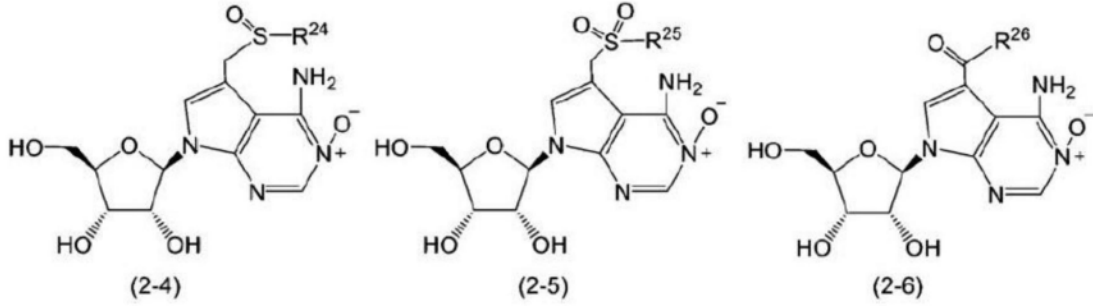


(1-15)

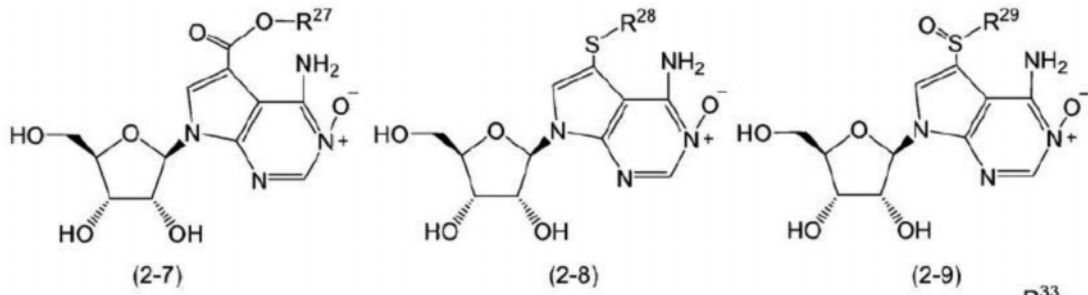
[0035] [化5]



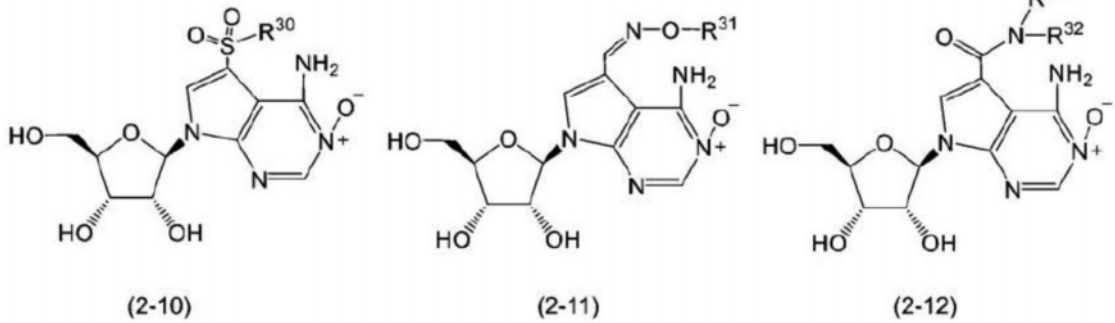
[0036]



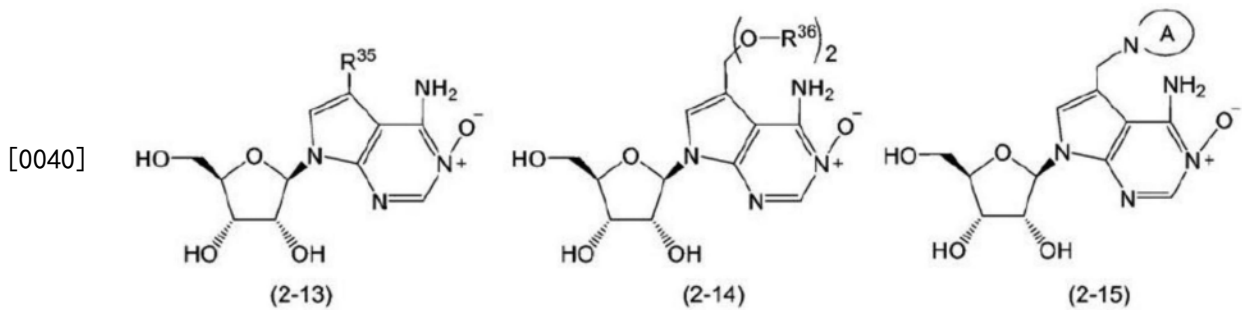
[0037] [化6]



[0038]

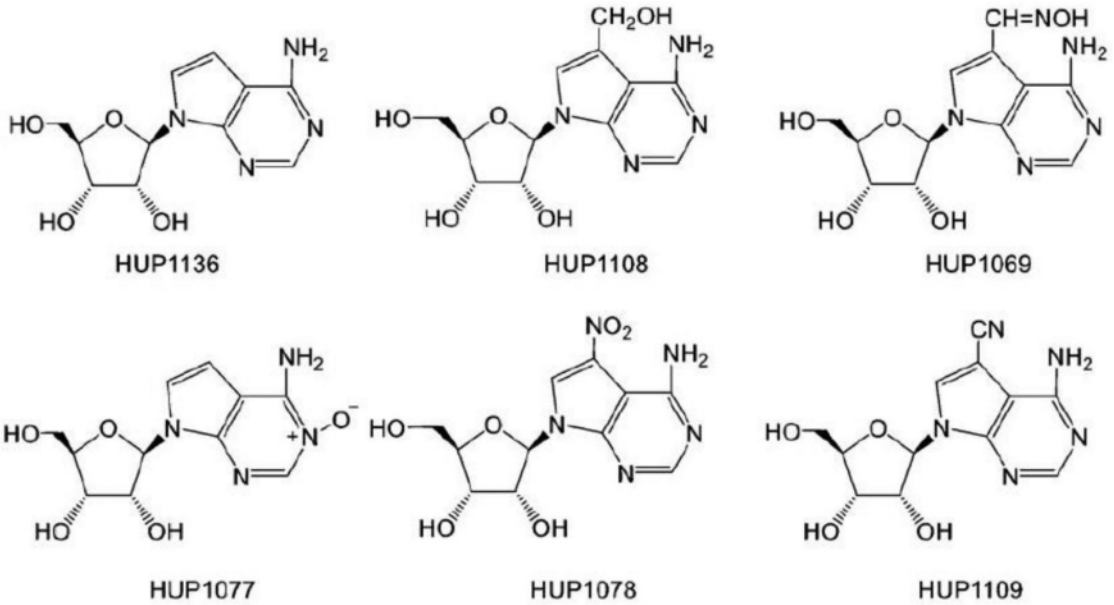


[0039] [化7]



[0041] [3]根据[1]或[2]所述的抗病毒剂,其中所述抗病毒剂由选自HUP1136、HUP1108、HUP1069、HUP1077、HUP1078和HUP1109的一种或多种化合物制成。

[0042] [化8]



[0044] [4] 一种药物组合物,所述药物组合物的活性成分是根据[1]至[3]中任一项所述的抗病毒剂。

[0045] [5] 根据[4]所述的药物组合物,其中所述药物组合物用于治疗由冠状病毒或黄病毒引起的感染。

[0046] [6] 根据[5]所述的药物组合物,其中所述药物组合物用于治疗COVID-19。

[0047] [7] 根据[4]至[6]中任一项的药物组合物,其中所述药物组合物用于与3CL蛋白酶抑制剂的联合治疗。

[0048] [8] 根据[7]的药物组合物,其中所述3CL蛋白酶抑制剂是PF-07304814和S-217622中的至少一种。

[0049] [9] 一种治疗冠状病毒感染或黄病毒感染的方法,所述方法通过给予有效量的[1]至[3]中任一项的抗病毒剂。

[0050] [10] 根据[9]的方法,其中给予有效量的由HUP1108组成的抗病毒剂。

[0051] [11] 根据[9]或[10]的方法,其中所述有效量小于60毫克/千克。

[0052] [12] 根据[11]的方法,其中所述有效量为20毫克/千克。

[0053] [13] 根据[9]至[12]中任一项的方法,其中冠状病毒为SARS-CoV-2。

[0054] [14] 根据[13]的方法,其中SARS-CoV-2为WK-521株、 α 株、 β 株、 γ 株、 δ 株和 θ 株中的至少一种。

[0055] [15] 根据[9]至[12]中任一项的方法,其中黄病毒为登革病毒(DENV)、寨卡病毒(ZIKV)、黄热病病毒(YFV)、西尼罗河病毒(WNV)和日本脑炎病毒(JEV)中的至少一种。

[0056] [16] 根据[9]至[15]中任一项的方法,其中与3CL蛋白酶抑制剂的联合给予。

[0057] [17] 根据[16]的方法,其中3CL蛋白酶抑制剂为PF-07304814和S-217622中的至少一种。

[0058] [18] 根据[1]至[3]中的抗病毒剂与3CL蛋白酶抑制剂的联合治疗性组合(therapeutic combination)。

[0059] [19] 根据[18]的组合,其中3CL蛋白酶抑制剂是PF-07304814和S-217622中的至少一种。

[0060] [20]根据[1]至[3]中任一项的抗病毒剂,其中所述抗病毒剂用于治疗冠状病毒感染或黄病毒感染。

[0061] [21]根据[20]的抗病毒剂,其中冠状病毒为SARS-CoV-2WK-521株、 α 株、 β 株、 γ 株、 δ 株和 θ 株中的至少一种,而黄病毒为登革病毒(DENV)、寨卡病毒(ZIKV)、黄热病病毒(YFV)、西尼罗河病毒(WNV)和日本脑炎病毒(JEV)中的至少一种。

[0062] [发明效果]

[0063] 本发明的抗病毒剂具有作为活性成分的核酸化合物,所述核酸化合物对具有正链单链RNA作为基因的包膜病毒诸如冠状病毒或黄病毒具有高抗病毒活性。因此,其活性成分为该抗病毒剂的药物组合物适合作为体内或离体抗病毒剂并且非常可作用用于治疗或预防由冠状病毒或黄病毒引起的感染性疾病的药物组合物的活性成分。

[附图说明]

[0064] [图1]展示了在实施例2中通过化合物HUP1136、HUP1108、HUP1069、HUP1077、HUP1078和HUP1109中的任一个处理使用SARS-CoV-2感染的Caco-2细胞的情况下,病毒RNA量(\log_{10} [病毒RNA拷贝数])的测量结果的图。

[0065] [图2]展示了在实施例2中通过HUP1136、HUP1108、HUP1069、HUP1077、HUP1078和HUP1109中的任一种处理使用SARS-CoV-2感染的Caco-2细胞的情况下,病毒RNA复制抑制率($[\text{来自经测试样品处理的细胞的病毒RNA拷贝数}]/[\text{来自其中未添加测试样品的组的细胞的病毒RNA拷贝数}] \times 100\%$)的测量结果的图。

[0066] [图3]展示了在实施例3中在三个时间(完整、进入和进入后)通过HUP1108处理使用SARS-CoV-2感染的Caco-2细胞的情况下相对病毒RNA量的测量结果的图。

[0067] [图4]展示了在实施例3中在三个时间(完整、进入和进入后)通过HUP1108处理使用SARS-CoV-2感染的Caco-2细胞的情况下病毒滴度(TCID_{50} 的对数值)的测量结果的图。

[0068] [图5]展示了实施例5中使用由化合物HUP1108处理的SARS-CoV-2(WK-521株)或各种变体感染Caco-2细胞的情况下的病毒RNA量(\log_{10} [病毒RNA拷贝数])的测量结果。

[0069] [图6]展示了实施例6中感染SARS-CoV-2并施用HUP1108的小鼠和感染SARS-CoV-2但未施用HUP1108的小鼠的肺内病毒滴度的测量结果。

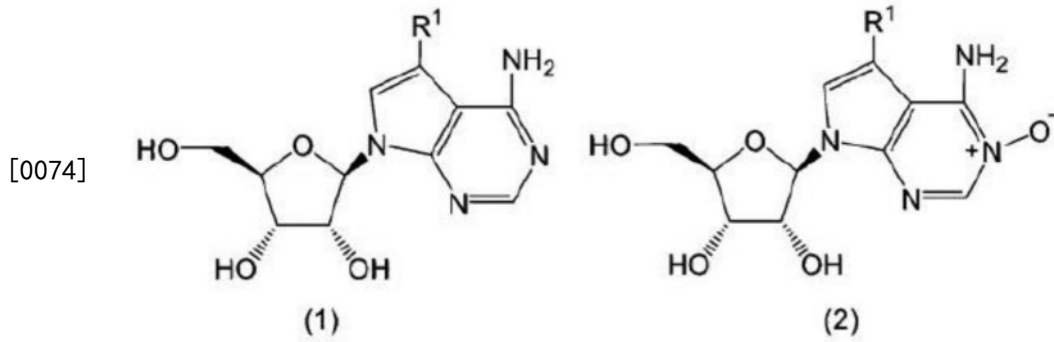
[0070] [图7]展示了实施例7中感染SARS-CoV-2并施用HUP1108的小鼠和感染SARS-CoV-2但未施用HUP1108的小鼠的存活率的测量结果。

[具体实施方式]

[0071] 在本发明和本申请的说明书中,“ C_{y-z} (y 和 z 是满足 $y < z$ 的正整数)”表示碳数不小于 y 且不大于 z 。

[0072] 本发明的抗病毒剂由以下通式(1)表示的化合物(下文也称为“化合物(1)”)或以下通式(2)表示的化合物(下文也称为“化合物(2)”)制成。

[0073] [化9]



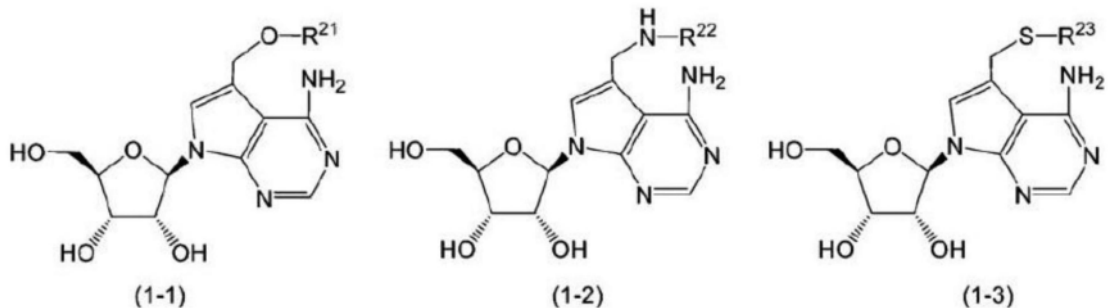
[0075] 在通式(1)和通式(2)中, R^1 是由 $-(CH_2)_{n_1}-Z^1-R^{11}$ 或 $-CH-(Z^1-R^{11})_2$ 表示的基团。在此, n_1 是0或1, 并且 Z^1 是单键、氧原子、 $-NH-$ 、硫原子、 $-SO-$ 、 $-SO_2-$ 、 $-CO-$ 、 $-CO-O-$ 或 $-CH=N-O-$ 。当 n_1 是0时, $-(CH_2)_0-$ 是单键并且表示 Z^1 与嘌呤环的碳原子直接键合。

[0076] R^{11} 是氢原子、具有1至6个碳的烷基、 $-NR^{12}R^{13}$ 、 $-N_3$ 、 $-NO_2$ 、 $-CN$ 、 $-CH_2-CO-O-R^{14}$ 、或包含氮原子的五元或六元杂环基团。 R^{12} 和 R^{13} 各自独立地是氢原子或具有1至6个碳的烷基, 并且 R^{14} 是氢原子或具有1至6个碳的烷基。然而, 杂环基团中的氮原子与 Z^1 连接。

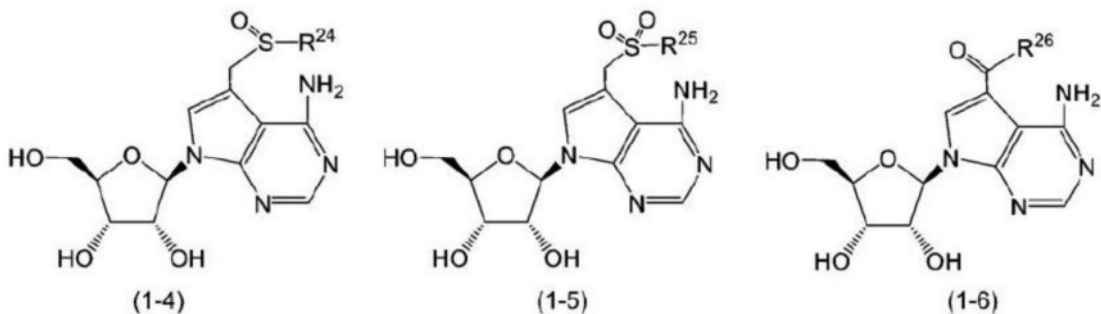
[0077] 当 R^{11} 、 R^{12} 、 R^{13} 和 R^{14} 是具有1至6个碳的烷基时, 该烷基可以是直链或支链的。更具体地, 优选具有1至6个碳的烷基, 诸如甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、仲丁基、异丁基、叔丁基、正戊基、仲戊基、异戊基、正己基、仲己基或异己基; 更优选具有1至4个碳的烷基; 进一步优选具有1至3个碳的烷基; 并且甚至更优选甲基或乙基。

[0078] 更具体地, 作为化合物(1), 可以提及由通式(1-1)至(1-15)表示的化合物, 并且作为化合物(2), 可以提及由通式(2-1)至(2-15)表示的化合物。

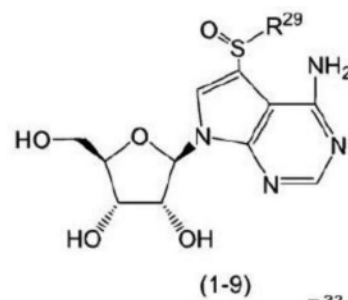
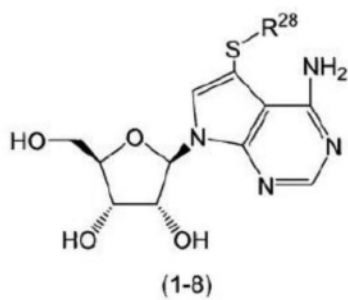
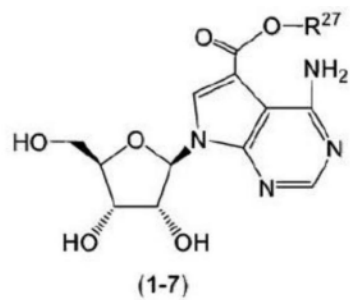
[0079] [化10]



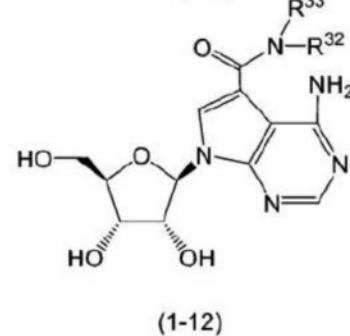
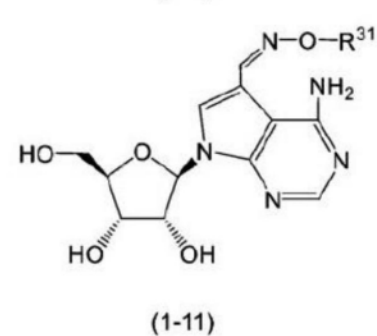
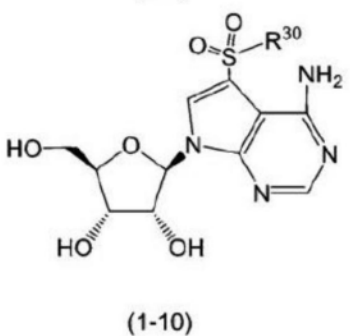
[0080]



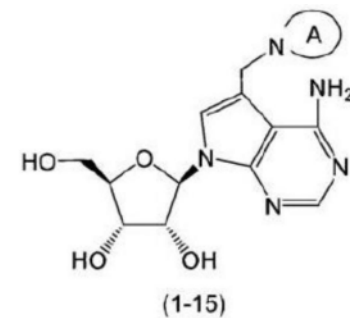
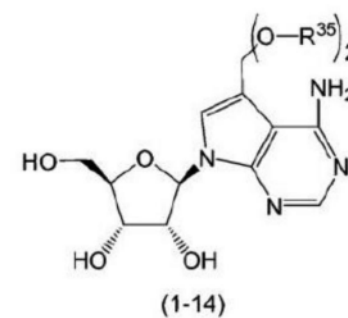
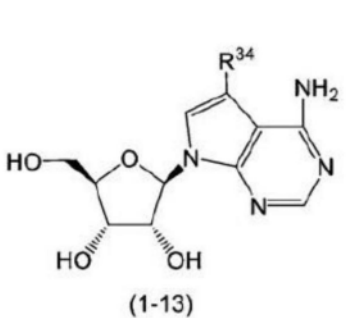
[0081] [化11]



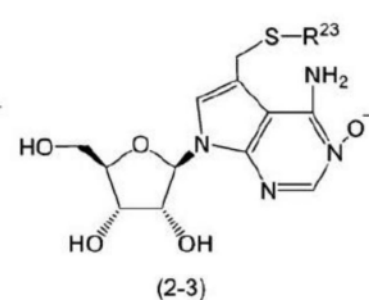
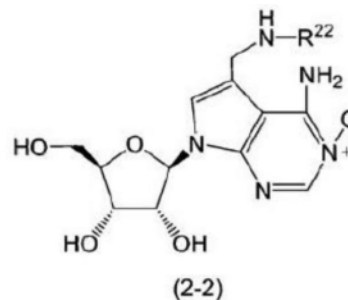
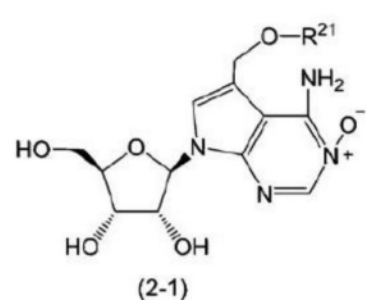
[0082]



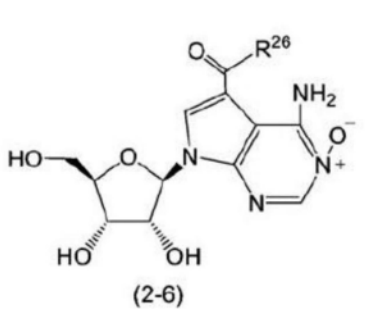
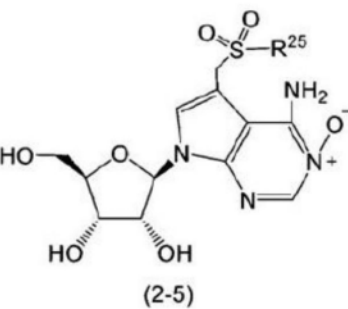
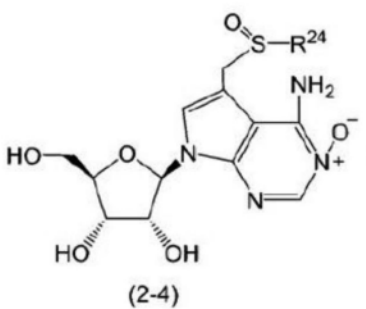
[0083] [化12]



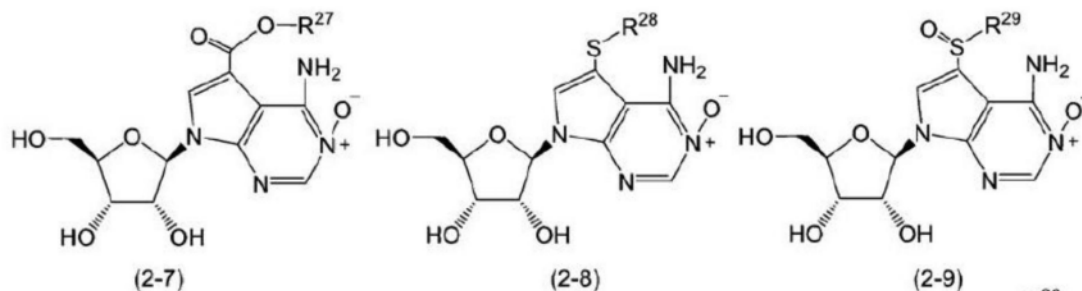
[0085] [化13]



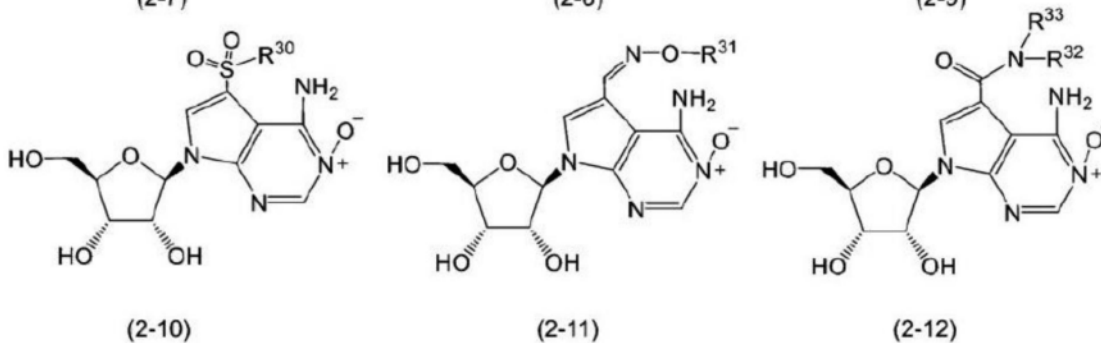
[0086]



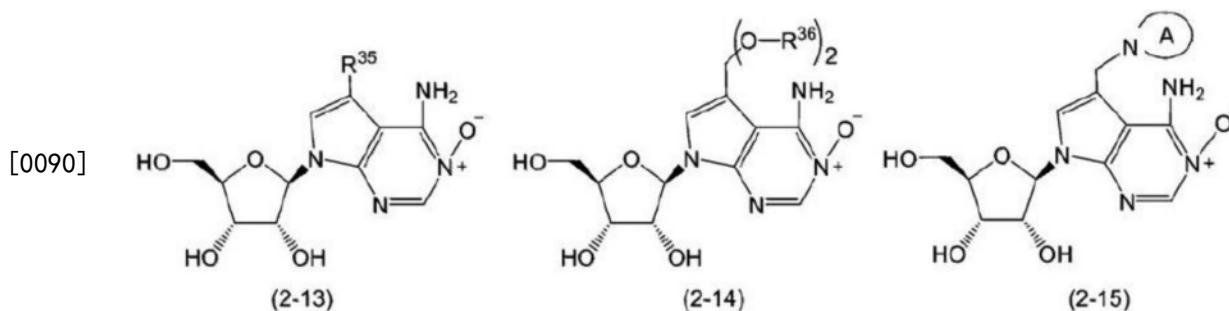
[0087] [化14]



[0088]



[0089] [化15]



[0091] 在通式(1-1)和通式(2-1)中, R^{21} 是氢原子、具有1至6个碳的烷基、 $-\text{CH}_2-\text{COOH}$ 、或氨基($-\text{NH}_2$)。作为具有1至6个碳的烷基,可以使用与针对 R^{11} 所列的基团类似的基团。

[0092] 在通式(1-2)和通式(2-2)中, R^{22} 是氢原子、具有1至6个碳的烷基、或氨基。作为具有1至6个碳的烷基,可以使用与针对 R^{11} 所列的基团类似的基团。

[0093] 在通式(1-3)和通式(2-3)中, R^{23} 是氢原子或具有1至6个碳的烷基。作为具有1至6个碳的烷基,可以使用与针对 R^{11} 所列的基团类似的基团。

[0094] 在通式(1-4)和通式(2-4)中, R^{24} 是具有1至6个碳的烷基。作为具有1至6个碳的烷基,可以使用与针对 R^{11} 所列的基团类似的基团。

[0095] 在通式(1-5)和通式(2-5)中, R^{25} 是具有1至6个碳的烷基。作为具有1至6个碳的烷基,可以使用与针对 R^{11} 所列的基团类似的基团。

[0096] 在通式(1-6)和通式(2-6)中, R^{26} 是氢原子或具有1至6个碳的烷基。作为具有1至6个碳的烷基,可以使用与针对 R^{11} 所列的基团类似的基团。

[0097] 在通式(1-7)和通式(2-7)中, R^{27} 是氢原子或具有1至6个碳的烷基。作为具有1至6个碳的烷基,可以使用与针对 R^{11} 所列的基团类似的基团。

[0098] 在通式(1-8)和通式(2-8)中, R^{28} 是氢原子、具有1至6个碳的烷基、或氰基($-\text{CN}$)。作为具有1至6个碳的烷基,可以使用与针对 R^{11} 所列的基团类似的基团。

[0099] 在通式(1-9)和通式(2-9)中, R^{29} 是具有1至6个碳的烷基。作为具有1至6个碳的烷基,可以使用与针对 R^{11} 所列的基团类似的基团。

[0100] 在通式(1-10)和通式(2-10)中, R^{30} 是具有1至6个碳的烷基。作为具有1至6个碳的烷基,可以使用与针对 R^{11} 所列的基团类似的基团。

[0101] 在通式(1-11)和通式(2-11)中, R^{31} 是氢原子或具有1至6个碳的烷基。作为具有1至6个碳的烷基,可以使用与针对 R^{11} 所列的基团类似的基团。

[0102] 在通式(1-12)和通式(2-12)中, R^{32} 和 R^{33} 各自独立地是氢原子或具有1至6个碳的烷基。作为具有1至6个碳的烷基,可以使用与针对 R^{11} 所列的基团类似的基团。优选地, R^{32} 和 R^{33} 各自独立地是氢原子、甲基或乙基,并且更优选地, R^{32} 和 R^{33} 都是氢原子、甲基或乙基。此外,还优选地, R^{32} 是氢原子并且 R^{33} 是甲基或乙基。

[0103] 在通式(1-13)和通式(2-13)中, R^{34} 是氢原子、具有1至6个碳的烷基、 $-\text{CH}_2-\text{N}_3$ 、氰基、氨基、硝基($-\text{NO}_2$)、或叠氮基($-\text{N}_3$)。作为具有1至6个碳的烷基,可以使用与针对 R^{11} 所列的基团类似的基团。

[0104] 在通式(1-14)和通式(2-14)中, R^{35} 是具有1至6个碳的烷基。作为具有1至6个碳的烷基,可以使用与针对 R^{11} 所列的基团类似的基团。在一个分子中出现两次的 R^{35} 可以是彼此相同的基团或不同的基团。作为 R^{35} ,优选氢原子、甲基或乙基;更优选甲基或乙基;并且进一步优选甲基。

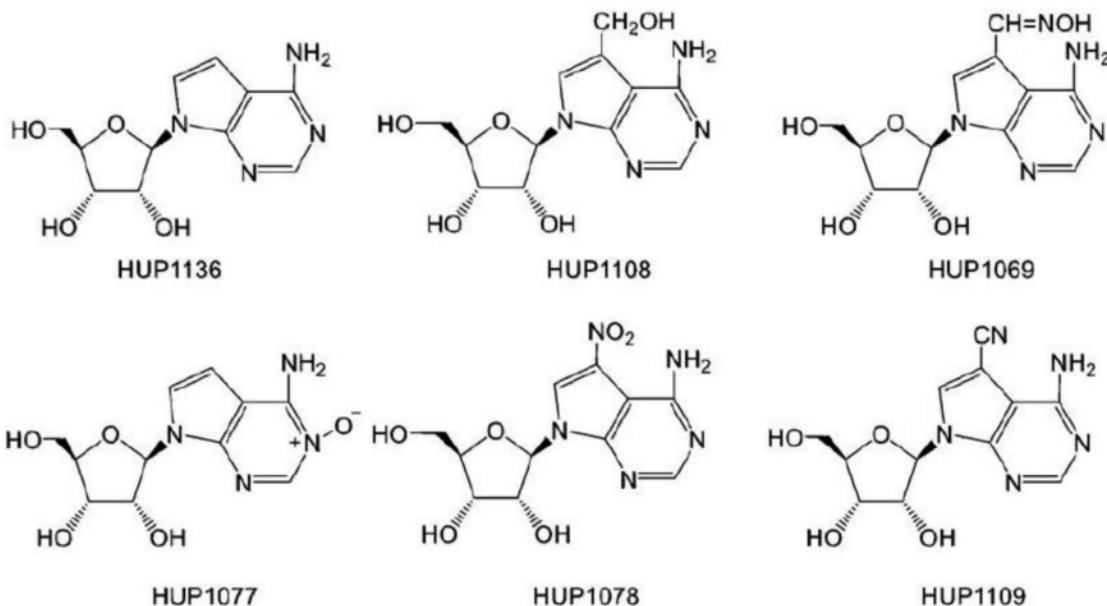
[0105] 在通式(1-15)和通式(2-15)中, A是包含氮原子的五元或六元杂环基团。该杂环基团中的氮原子通过亚甲基与嘌呤环的碳原子连接。作为这种杂环基团,可以提及一价基团,其中与氮原子键合的氢原子从吡咯烷、哌啶、吗啉或硫代吗啉中去除。

[0106] 作为化合物(1),优选由通式(1-13)表示的化合物、由通式(1-1)表示的化合物或由通式(1-11)表示的化合物,并且更优选其中通式(1-13)中的 R^{34} 是氢原子、具有1-3个碳的烷基、氰基或硝基的化合物;其中通式(1-1)中的 R^{21} 是氢原子或具有1至3个碳的烷基的化合物;或其中通式(1-11)中的 R^{31} 是氢原子或具有1至3个碳的烷基的化合物。

[0107] 作为化合物(2),优选由通式(2-13)表示的化合物、由通式(2-1)表示的化合物或由通式(2-11)表示的化合物,并且更优选其中通式(2-13)中的 R^{34} 是氢原子、具有1-3个碳的烷基、氰基或硝基的化合物;其中通式(2-1)中的 R^{21} 是氢原子或具有1至3个碳的烷基的化合物;或其中通式(2-11)中的 R^{31} 是氢原子或具有1至3个碳的烷基的化合物。

[0108] 特别优选地,本发明的抗病毒剂是选自HUP1136(杀结核菌素)(CAS号:69-33-0)、HUP1108(5-羟甲基杀结核菌素)、HUP1069(5-甲酰杀结核菌素脞)、HUP1077(杀结核菌素N-氧化物)、HUP1078(5-硝基杀结核菌素)和HUP1109(5-氰基杀结核菌素,丰加霉素)的一种或多种化合物。

[0109] [化16]



[0111] 可以通过使用非专利文献2中传授的方法从HUP1136合成HUP1108、HUP1069、HUP1077、HUP1078和HUP1109。HUP1108也可以通过使用非专利文献3中传授的方法从HUP1136合成以及通过使用非专利文献4中传授的方法从天然产物桑霉素合成。

[0112] 在本发明的抗病毒剂中,化合物(1)和化合物(2)可以形成盐,并且作为形成该盐的酸或碱,可以提及矿物酸,诸如盐酸或硫酸;有机酸,诸如乙酸、琥珀酸或柠檬酸;碱金属,诸如钠或钾;碱土金属,诸如钙或镁;等。此外,化合物(1)和化合物(2)也可以呈溶剂化物诸如水合物的形式。

[0113] 本发明的抗病毒剂可以是化合物(1)的衍生物或化合物(2)的衍生物。作为化合物(1)的衍生物或化合物(2)的衍生物,优选通过进行体内酶处理等产生化合物(1)或化合物(2)的衍生物。在本发明中,作为可用作抗病毒剂的化合物(1)的衍生物或化合物(2)的衍生物,例如,通过将其活性成分为核酸化合物的药物制备成前药而获得的衍生物是更优选的。具体地,可以提及磷酸酯衍生物,其中在通式(1)或通式(2)中,通过亚甲基与咪唑环连接的羟基被磷酸酯基团(PO_4^-)取代;单磷酰亚胺衍生物,其中该羟基被单磷酰亚胺基团取代;单硫代磷酸酯衍生物,其中该羟基被单硫代磷酸酯基团取代;等。此外,化合物(1)的衍生物和化合物(2)的衍生物可以形成盐并且呈溶剂化物诸如水合物的形式。上面列出的那些可以用作盐。

[0114] 化合物(1)、化合物(1)的衍生物、化合物(2)、化合物(2)的衍生物、这些化合物的盐、或其溶剂化物(在下文中也统称为“本发明的核酸化合物”)具有针对病毒-特别是针对冠状病毒和黄病毒(黄病毒)-的抗病毒活性并且因此可用于治疗或预防病毒感染的药物组合物的活性成分。

[0115] 冠状病毒的例子包括SARS-CoV、MERS-CoV和SARS-CoV-2。SARS-CoV-2有多种突变株;例如有 α 应变(α 应变)(B.1.1.7行)、 β 应变(β 应变)(B.1.351行)、 γ 应变(γ 应变)(P.1行)、 δ 应变(δ 菌株)(B.1.617.2系)、 \omicron 菌株(omicron菌株)(B.1.1.529)、E484K菌株(R.1系)、 ϵ 菌株(epsilon菌株)(B.1.427/B.1.429系)、 θ 应变(theta应变)(P.3系)、 κ 应变(kappa应变)(B.1.617.1系)以及其他突变株。

[0116] 像冠状病毒一样,黄病毒是具有正链单链RNA作为基因的包膜病毒。作为黄病毒,

可以提及引起登革热(登革出血热)的登革病毒(DENV);引起寨卡热(寨卡病毒病)的寨卡病毒(ZIKV);引起黄热病的黄热病病毒(YFV);引起西尼罗河热(西尼罗河脑炎)的西尼罗河病毒(WNV);以及引起日本脑炎的日本脑炎病毒(JEV)。DENV有四种类型:1型至4型(DENV1、DENV2、DENV3、DENV4)。

[0117] 类似于瑞德西韦,本发明的核酸化合物抑制RNA依赖性RNA聚合酶(RdRp)。因此,它对RdRp复制的病毒具有抗病毒活性。此类病毒的实例包括引起病毒性肝炎的病毒,例如冠状病毒、黄病毒和丙型肝炎病毒。本发明的核酸化合物可用于治疗由RdRp复制的病毒引起的感染。

[0118] 本发明的核酸化合物非常可用作治疗或预防特别是COVID-19和其他冠状病毒感染的药物组合物的活性成分。由于SARS-CoV-2的所有各种变体都需要RdRp进行复制,因此本发明的核酸化合物对所有变体都具有抗病毒活性。

[0119] 此外,本发明的核酸化合物也非常可用作治疗或预防登革热、寨卡热、黄热病、西尼罗热、日本脑炎和其他黄病毒感染的药物组合物的活性成分。本发明的核酸化合物是低分子量化合物并且因此在免疫原性等方面没有问题。此外,因为它们也可以口服施用并且在施用途径方面没有非常大的限制,所以它们特别可用于作用于包括人类在内的哺乳动物的药物的活性成分。

[0120] 非专利文献7研究了GS-441524向细胞内的掺入。该作者的推测是,GS-441524掺入细胞减少是因为GS-441524掺入细胞完全依赖于细胞表面存在的腺苷转运蛋白,而这些转运蛋白在缺氧的肺上皮细胞和某些细胞菌株中减少。

[0121] GS-441524和结核菌素衍生物(例如HUP1108)之间的一个主要区别是氰基(-CN)键合到GS-441524的第一个位置,但不连接到HUP1108。因此,这种差异可能是本发明化合物与GS-441524相比表现出更大功效的原因之一。

[0122] 因此,相信本发明的化合物通过多种机制掺入细胞中。这被认为改善了腺苷转运蛋白减少的缺氧肺上皮细胞掺入减少的问题,并提供了优异的抗病毒活性。

[0123] 当本发明的核酸化合物中的一种类型或者两种或更多种类型包含在药物组合物中时,根据需要,这些可以与药学上可接受的载体组合,并且可以根据预防或治疗目的采用各种施用形式。作为这些形式,可以提及例如口服剂、注射剂、栓剂、软膏剂和贴剂,但口服剂是优选的。这些施用形式可以分别通过本领域技术人员熟知的配制方法来产生。

[0124] 作为药学上可接受的载体,使用固体制剂中的赋形剂、粘合剂、崩解剂、润滑剂或着色剂;液体制剂中的溶剂、增溶剂、助悬剂、张力剂、缓冲剂或止痛剂;等。此外,根据需要,还可以使用制剂添加剂,诸如防腐剂、抗氧化剂、着色剂、甜味剂或稳定剂。

[0125] 当制备口服固体制剂时,将赋形剂以及(根据需要)粘合剂、崩解剂、润滑剂、着色剂、风味/气味矫正剂等添加到本发明的核酸化合物中。之后,可以通过常规方法生产片剂、包衣片剂、颗粒剂、散剂、胶囊等。

[0126] 当制备口服液体制剂时,向本发明的核酸化合物中添加风味矫正剂、缓冲剂、稳定剂、气味矫正剂等,并且可以通过常规方法生产内部液体制剂、糖浆剂、酏剂等。

[0127] 当制备注射剂时,将pH调节剂、缓冲液、稳定剂、张力剂、局部麻醉剂等添加到本发明的核酸化合物中,并且可以通过常规方法生产皮下、肌内和静脉内注射剂。

[0128] 当制备栓剂时,向本发明的核酸化合物中添加本领域熟知的制剂载体,例如聚乙

二醇、羊毛脂、可可脂或脂肪酸甘油三酯。之后,可以通过常规方法生产栓剂。

[0129] 当制备软膏剂时,将通常使用的基质、稳定剂、湿润剂、防腐剂等根据需要组合到本发明的核酸化合物中,并且通过常规方法混合和配制这些。

[0130] 当制备贴剂时,通过使用常规方法将上述软膏剂、乳膏剂、凝胶、糊剂等涂覆到正常的支持体上是足够的。

[0131] 上述每种制剂中本发明核酸化合物的含量取决于患者症状、制剂的剂型等并且不是恒定的。然而,一般来说,其在口服制剂中为大约0.001至1,000mg,在注射制剂中为大约0.001至500mg,并且在栓剂中为大约0.01至1,000mg。

[0132] 此外,这些制剂每天的施用量根据患者的症状、体重、年龄、性别等而不同,并且不能对此进行全面的确定。然而,对于正常的成年人(体重60kg),其为大约0.005至5,000mg/天。0.01至1,000mg是优选的,并且其施用优选每天一次或一天分约两至三次。

[0133] 此外,对本发明的核酸化合物的剂量没有特别限制,但优选小于60mg/kg,更优选10mg/kg以上且小于60mg/kg,甚至更优选15至40毫克/公斤。

[0134] 例如,本发明的核酸化合物的剂量可以是15至30mg/kg,也可以是20mg/kg。此外,例如,可以施用小于60mg/kg的HUP1108(5-羟甲基块茎苷(5-hydroxymethyltubersidin)),并且优选施用20mg/kg的HUP1108。

[0135] 被施用活性成分是本发明核酸化合物的抗病毒剂和药物组合物的动物没有特别限制并且可以是人或除人以外的动物。作为非人动物,可以提及哺乳动物诸如奶牛、猪、马、绵羊、山羊、猴、狗、猫、兔、小鼠、大鼠、仓鼠或豚鼠;鸟,诸如鸡、鹌鹑或鸭;等。

[0136] [实施例]

[0137] 接下来,通过给出实施例来更详细地描述本发明。然而,本发明不限于以下实施例。

[0138] <冠状病毒>

[0139] 在以下测试中使用的冠状病毒中,作为SARS-CoV-2,使用由国立传染病研究(National Institute of Infectious Diseases)所分发的毒株JPN/TY/WK-521。此外,作为SARS-CoV-2的变异株,使用国立传染病研究所分发的QK002(α 株)、TY8-612(β 株)、TY5-501(γ 株)和TY11-927(δ 株)。

[0140] 从ATCC获得的HCoV-229E(ATCC:VR-740)和HCoV-OC43(ATCC:VR-1558)用作经常感染人类的冠状病毒(人类冠状病毒:HCoV)。

[0141] <黄病毒>

[0142] 在以下测试中使用的黄病毒中,毒株D1/hu/PHL/10-07、D2/hu/INDIA/09-74、D3/hu/Thailand/00-40和D4/hu/Solomon/08-11分别用作DENV1-4。毒株MR766用作ZIKV。毒株17D-204用作YFV。毒株NY99用作WNV。毒株Beijing-1用作JEV。

[0143] <培养细胞>

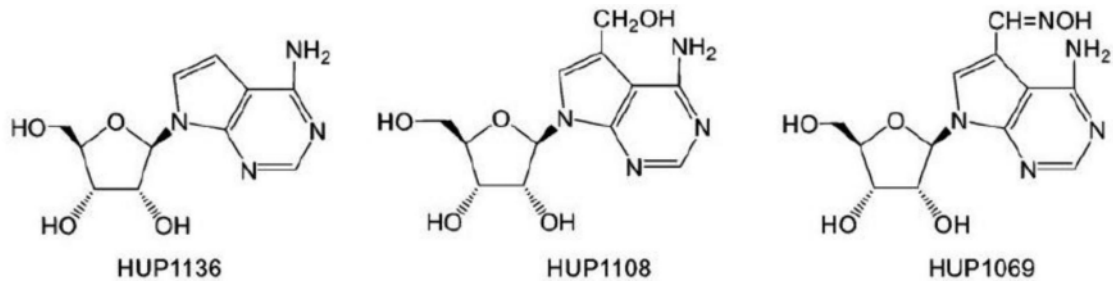
[0144] 在以下测试中,使用病毒感染来自人胎儿肺的培养细胞株MRC5细胞或来自人结肠癌的培养细胞株Caco-2细胞。对于两种细胞类型,使用2% FBS/MEM作为培养基。通过将2% FBS(胎牛血清;由Gibco制造)和L-谷氨酰胺(由Wako制造)添加到MEM(最低必需培养基;由Nissui制造)中来制备2% FBS/MEM。

[0145] [实施例1]

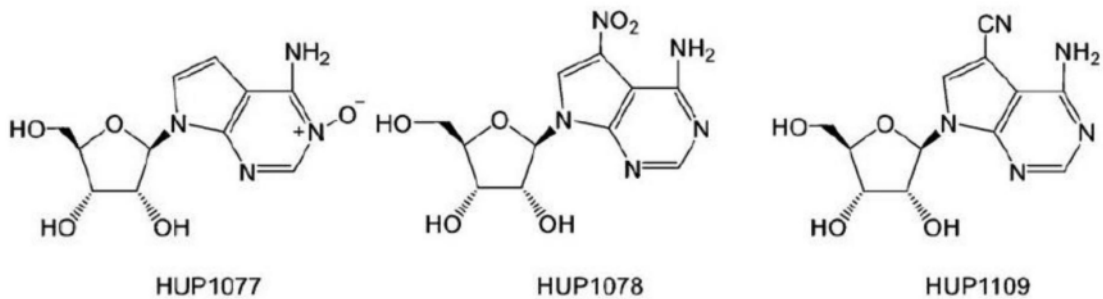
[0146] 使用来自北海道大学药物科学学院药物发现研究和教育中心拥有的具有作为骨架的核酸化合物的化合物的文库作为测试样品,对展现出抑制被人类冠状病毒感染的细胞的细胞死亡的作用的化合物进行筛选。HCoV-229E和HCoV-OC43用作人类冠状病毒。

[0147] 其结果是发现在所使用的化合物文库中包括的化合物中,以下六种化合物-HUP1136、HUP1108、HUP1069、HUP1077、HUP1078和HUP1109-具有抗病毒活性。

[0148] [化17]



[0149]



[0150] <细胞死亡抑制作用的确认>

[0151] 对评价为具有抗病毒活性的六种化合物检查抑制由冠状病毒感染引起的细胞死亡的作用。作为阳性对照,以相同的方式检查GS-5734(瑞德西韦)和GS-441524。

[0152] 首先,在96孔板的每个孔中,使用病毒感染用通过每种化合物处理的细胞,并且将其在CO₂培养箱(37°C,5% CO₂)中培养三天。

[0153] 在宏观上和微观上观察培养三天的96孔板,并且确认细胞形式、晶体的存在或不存在等。之后,将20μL刃天青溶液(刃天青钠盐(由Sigma制造)溶解在PBS中使得达到0.24mg/mL的溶液)分配到每个孔中。将其在CO₂培养箱中培养2小时后,将20μL反应终止溶液(其中病毒灭活溶液-十二烷基硫酸钠(SDS)-溶解在蒸馏水中使得达到7.5%的溶液)分配到每个孔中,并且使用板混合器将其共混。

[0154] 之后,使用多板读取器(设备名称:EnVision;由PerkinElmer制造)测量该96孔板在531nm(发射)/590nm(激发)下的荧光强度。

[0155] 使用统计分析软件(产品名称:GraphPad Prism 8;由GraphPad Software制造),基于诸如以下的计算公式计算病毒感染细胞的50%细胞死亡抑制浓度(EC₅₀)。此外,从EC₅₀和CC₅₀的值计算SI(CC₅₀/EC₅₀)。计算结果在表1中给出。

[0156] [激动剂]与反应-可变斜率(四个参数)

[0157] $Y = \text{底部} + (X^{\wedge} \text{希尔斜率}) * (\text{顶部} - \text{底部}) / (X^{\wedge} \text{希尔斜率} + \text{EC}50^{\wedge} \text{希尔斜率})$

[0158] X: 测试样品的浓度

[0159] Y: 感染细胞死亡抑制率(细胞存活率)

[0160] 希尔斜率(HillSlope): 曲线系列的斜率

- [0161] 底部(基础反应) = 0(感染细胞死亡抑制率:0%)
 [0162] 顶部(最大反应) = 100(感染细胞死亡抑制率:100%)
 [0163] [表1]

	HCoV-OC43		HCoV-229E		CC ₅₀ (μM)
	EC ₅₀ (μM)	SI	EC ₅₀ (μM)	SI	
[0164] HUP1136	0.11	5.9	< 0.078	> 8.5	0.66
HUP1108	0.35	> 141	0.43	> 117	> 50
HUP1069	0.055	13	< 0.078	> 9.5	0.74
HUP1077	4.3	5.6	4.0	6.1	24
HUP1078	> 10		2.0	0.17	0.33
HUP1109	> 10		2.3	0.26	0.59
GS-441524	3.7	> 13.7	3.1	> 16.1	> 50
GS-5734	0.23	> 221.1	0.072	> 694.1	> 50

[0165] [实施例2]

[0166] 针对实施例1中确认具有抗病毒活性的六种化合物,检查针对SARS-CoV-2的病毒RNA复制抑制作用。使用Caco-2细胞作为被病毒感染的培养细胞。

[0167] <病毒RNA复制抑制作用的确认>

[0168] (1) 培养细胞的病毒感染

[0169] 使用由2% FBS/MEM制成的培养基稀释测试样品(确认具有抗病毒活性的六种化合物)、病毒和细胞。

[0170] 首先,将制备到适当细胞计数的Caco-2细胞溶液以100μL/孔分配到96孔板中,并且将其通过CO₂培养箱(37°C, 5% CO₂)培养过夜。接下来,在其中放置Caco-2细胞的该96孔板的每个孔中,添加使用培养基预先稀释到适当浓度的测试样品,以产生三级稀释系列(50 μL/孔),并且使用板混合器混合这些。在该含有测试样品的96孔板中,以50μL/孔分配使用培养基预先稀释至适当浓度的病毒溶液。之后,将该96孔板使用板混合器共混并且在CO₂培养箱(37°C, 5% CO₂)中培养48小时。

[0171] (2) RNA提取与纯化

[0172] 培养48小时后,从96孔板的每个孔中收集150μL每种培养物上清液。此外,通过向每个孔中添加RNA提取试剂盒(产品名称:PureLink Pro 96Viral RNA/DNA试剂盒;由Thermo Fischer Scientific制造)中包含的裂解缓冲液来灭活病毒。之后,根据该试剂盒中包含的方案纯化病毒RNA。

[0173] (3) 病毒RNA的测量

[0174] 使用纯化的病毒RNA和在SARS-CoV-2核衣壳蛋白区设计的探针/引物组实施qRT-PCR(实时定量逆转录PCR)。使用可商购试剂盒(产品名称:THUNDERBIRD Probe One-Step qRT-PCR试剂盒;由TOYOBO制造)和实时PCR系统(产品名称:QuantStudio 7Flex实时PCR系统;由Thermo Fisher Scientific制造)进行qRT-PCR。

[0175] 使用校准曲线方法计算每个样品中的病毒RNA拷贝数。通过使用掺入了包含上述核衣壳蛋白区的碱基序列的质粒作为模板(10⁹至10³个拷贝)通过以相同的方式进行qRT-

PCR来制作校准曲线。

[0176] (4) 病毒RNA复制抑制率的计算

[0177] 基于其中没有添加测试样品的组中的病毒RNA拷贝数,计算每种浓度下测试样品的病毒RNA复制抑制率(%)。图1展示了来自经每个测试样品处理的细胞的病毒RNA量的测量结果(\log_{10} [病毒RNA拷贝数]),并且图2展示了病毒RNA复制抑制率的测量结果([来自经测试样品处理的细胞的病毒RNA拷贝数]/[来自其中未添加测试样品的组的细胞的病毒RNA拷贝数] $\times 100\%$)。

[0178] 之后,基于诸如以下的计算公式,使用统计分析软件(产品名称:GraphPad Prism 8;由GraphPad software制造)计算90%病毒RNA复制抑制浓度(EC_{90})。计算结果在表2中给出。

[0179] [激动剂]与反应-找到EC任意

[0180] $EC50 = ECF / (F / (100 - F))^{(1 / \text{希尔斜率})}$

[0181] $Y = \text{底部} + (\text{顶部} - \text{底部}) / (1 - (EC50 / X)^{\text{希尔斜率}})$

[0182] ECF: 反应值为F%的测试样品的浓度,在底部与顶部之间

[0183] F: 靶标抑制率值(对于 EC_{90} , $F = 90$)

[0184] X: 测试样品的浓度

[0185] Y: 病毒RNA复制抑制率

[0186] 希尔斜率: 曲线系列的斜率

[0187] 底部(基础反应) = 0(病毒RNA复制抑制率: 0%)

[0188] 顶部(最大反应) = 100(病毒RNA复制抑制率: 100%)

[0189] [表2]

	SARS-CoV-2
	EC_{90} (μM)
HUP1136	0.087
HUP1108	0.57
HUP1069	0.20
HUP1077	3.5
HUP1078	0.10
HUP1109	0.20

[0191] 如图1和图2所展示,对于由实施例1中确认具有抗病毒活性的六种化合物处理的细胞,尽管根据化合物而变化,但观察到一种趋势,其中以依赖于处理化合物的量的方式,从感染细胞释放的病毒量减少,并且病毒RNA复制抑制率增加。这证实了这些化合物对SARS-CoV-2具有抗病毒活性。

[0192] 作为测试实施过程中显微镜观察的结果,对经HUP1109处理的细胞观察到强细胞毒性,达到细胞灭绝的程度。此外,对于HUP1078(0.123 μM ~)、HUP1136(1.11 μM ~)和HUP1108(10 μM)观察到轻度细胞毒性,但没有达到细胞灭绝的程度。在通过HUP1078和HUP1109处理的细胞中,表明了由于这些化合物的细胞毒性作用而展现出抗病毒活性的可

能性。同时,对于HUP1136和HUP1108,确认抗病毒活性的浓度具有低于细胞毒性的浓度范围。特别是对于HUP1108,在高于3.33 μ M的浓度范围内,由于细胞毒性作用,存在病毒增殖被抑制的可能性,但是即使在低于3.33 μ M的浓度范围内,病毒增殖也受到抑制,并且即使在不展现出细胞毒性的低浓度区域内,也证实了抗病毒活性。在这六种化合物中,对细胞毒性的关注度低,特别是对于HUP1077和HUP1108。这些化合物展现出浓度依赖性病毒RNA复制抑制活性,并且被认为非常可用作抗病毒剂。

[0193] [实施例3]

[0194] 进行添加时间测试以检查HUP1108的抗SARS-CoV-2活性的作用点。使用Caco-2细胞作为被病毒感染的培养细胞。

[0195] <添加时间测试>

[0196] (1) 培养细胞的病毒感染

[0197] 使用由2% FBS/MEM制成的培养基稀释测试样品(HUP1108)、病毒和细胞。

[0198] 首先,将300 μ L/孔的制备到适当细胞计数的Caco-2细胞溶液分配到48孔板中,并且将其通过CO₂培养箱(37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂)培养过夜。接下来,从该48孔板中含有Caco-2细胞的每个孔中去除培养物上清液,并且之后,添加使用培养基预先稀释至适当浓度的病毒溶液(150 μ L/孔)。此外,在以下三个时间(完整、进入和进入后)添加使用培养基预先稀释的测试样品(150 μ L/孔;最终浓度:1 μ M)。使用板混合器将其共混后,将其通过CO₂培养箱(37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂)中培养总共24小时。

[0199] • 完整:病毒感染的所有步骤中都存在的测试样品

[0200] 在与添加病毒溶液相同的时间添加测试样品,并且使用板混合器将其共混。之后,将其通过CO₂培养箱(37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂)培养1小时。之后,去除培养物上清液。使用培养基洗涤后,添加含有测试样品的新培养基,并且将其通过CO₂培养箱(37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂)培养24小时。

[0201] • 进入:仅在病毒进入时存在的测试样品

[0202] 在与添加病毒溶液相同的时间添加测试样品,并且使用板混合器将其共混。之后,将其通过CO₂培养箱(37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂)培养1小时。之后,去除培养物上清液。使用培养基洗涤后,添加含有测试样品的新培养基,并且将其通过CO₂培养箱(37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂)培养2小时。之后,再次去除培养物上清液。使用培养基洗涤后,添加培养基-不含测试样品-并且将其通过CO₂培养箱(37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂)培养22小时。

[0203] • 进入后:仅在病毒进入后存在的测试样品

[0204] 添加病毒时不添加测试样品,并且将其通过CO₂培养箱(37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂)中培养1小时。之后,去除培养物上清液。使用培养基洗涤后,添加新培养基(不含测试样品的培养基),并且将其通过CO₂培养箱(37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂)培养2小时。之后,再次去除培养物上清液。使用培养基洗涤后,添加培养基-含有测试样品-并且将其通过CO₂培养箱(37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂)培养22小时。

[0205] (2) RNA提取与纯化

[0206] 培养24小时后,从48孔板的每个孔中收集培养物上清液并且用于病毒滴定。使用PBS(磷酸盐缓冲盐水)(300 μ L \times 两次)洗涤孔中的细胞。此外,将RNA提取试剂盒(产品名称:PureLink RNA Mini试剂盒;由Thermo Fisher Scientific制造)中包含的裂解缓冲液添加到每个孔中以溶解细胞。之后,根据该试剂盒中包含的方案纯化总RNA。

[0207] (3) 病毒RNA的测量

[0208] 使用纯化的总RNA和在SARS-CoV-2核衣壳蛋白区设计的探针/引物组实施qRT-PCR。除了使用ACTB作为内源性对照之外,以与实施例2相同的方式进行qRT-PCR。

[0209] (4) 病毒RNA复制抑制率的计算

[0210] 基于通过qRT-PCR获得的每个样品的Ct值,在其中未添加测试样品的组的病毒RNA量被定义为1的情况下使用 $\Delta \Delta Ct$ 方法计算相对病毒RNA量,并且计算病毒RNA复制抑制率。图3中给出了每个样品的相对病毒RNA量的计算结果。图3中展示的图是使用统计分析软件(产品名称:GraphPad Prism 8;由GraphPad Software制造)制成的。

[0211] (5) 病毒滴度

[0212] 将在上述(2)中收集的培养物上清液使用培养基稀释至适当浓度的溶液(100 μ L/孔)添加到分配到96孔板中的VeroE6/TMPRSS2细胞中(100 μ L/孔),并且使用板混合器将其共混。之后,将其通过CO₂培养箱(37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂)培养72小时。之后,观察到由病毒感染引起的细胞病变效应(CPE),并且计算中值组织培养感染剂量(TCID₅₀)。计算TCID₅₀的对数值在图4中给出。图4中展示的图是使用统计分析软件(产品名称:GraphPad Prism 8;由GraphPad Software制造)制成的。

[0213] 如图3和图4所展示,当HUP1108处理时间是完整和进入后时,观察到降低的相对病毒RNA量和病毒滴度。这些结果表明,HUP1108的抗SARS-CoV-2活性的作用点是在病毒进入后的复制过程中。

[0214] [实施例4]

[0215] 对在实施例1中评价为具有抗病毒活性的六种化合物检查抑制由黄病毒感染引起的细胞死亡的作用。

[0216] <细胞死亡抑制效果的评价>

[0217] (1) 培养细胞

[0218] 在以下测试中,使用病毒感染来自叙利亚仓鼠肾的培养细胞株BHK-21细胞。使用2%FBS/MEM或2% FBS/RPMI-1640作为培养基。通过将2% FBS(胎牛血清;由Gibco制造)和L-谷氨酰胺(由Wako制造)添加到MEM(最低必需培养基;由Nissui制造)或RPMI-1640(由Gibco制造)中来制备每种培养基。

[0219] (2) 病毒感染与MTT测定

[0220] 首先,在96孔板的每个孔中,通过每种类型的病毒感染经每种化合物处理的细胞。将DENV2培养四天;将DENV1、3和4培养五天;将ZIKV、YFV、WNV和JEV在CO₂培养箱(37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂)中培养三天。

[0221] 在宏观上和微观上观察培养的96孔板,并且确认细胞形式、晶体的存在或不存在等。接下来,将30 μ L MTT溶液(其中3-(4,5-二甲基-2-噻唑)-2,5-噻唑-2H-四唑鎓溴化物(由Nacalai Tesque制造)溶解在PBS中使得达到5 μ g/mL的溶液)添加到每个孔中,并且将其在CO₂培养箱中培养2小时。之后,将上清液从该板中一次性去除150 μ L以不抽吸到细胞,将细胞溶液(病毒灭活溶液:通过将50mL Triton X-100和4mL盐酸(12N)添加到500mL异丙醇中制备的溶液)一次性150 μ L添加到每个孔中,并且使用板混合器将其共混。之后,使用吸收光谱仪测量该96孔板的两个波长-570nm和630nm-的吸光度。

[0222] (3) EC₅₀的计算

[0223] 基于以下计算公式,使用Microsoft Excel或具有同等计算处理性能的程序计算病毒感染细胞的50%细胞死亡抑制浓度(EC_{50})。结果在表3中给出。

[0224] $[EC_{50}] = 10^Z$

[0225] $Z = ([50\% OD] - [低OD]) / ([高OD] - [低OD]) \times \{\log(高浓度) - \log(低浓度)\} + \log(低浓度)$

[0226] $[50\% OD] = \{OD(细胞对照) - OD(病毒对照)\} \times 0.5 + OD(病毒对照)$

[0227] OD:吸光度

[0228] 浓度:药物浓度

[0229] OD(细胞对照):对照孔吸光度的平均值

[0230] OD(病毒对照):病毒对照孔吸光度的平均值

[0231] EC_{50} 由吸光度和在药物浓度曲线上插入50% OD值的两个点计算:A-高(高OD,高浓度)和B-低(低OD,低浓度)。

[0232] 结果在表3中给出。如表3所展示,发现在这六种化合物中,四种化合物HUP1136、HUP1108、HUP1069和HUP1077均对DENV1、DENV2、DENV3、DENV4、ZIKV、YFV、WNV和JEV具有高抗病毒活性。

[0233] 此外,非专利文献5报道GS-441524针对DENV2的抗病毒活性(EC_{50})为9.46 μ M。该值显著高于本发明的化合物HUP1136、HUP1108、HUP1069和HUP1077中的任何一种化合物。特别是比HUP1108高了近十倍,比HUP1136高了近40倍。

[0234] 此外,非专利文献5报道GS-441524针对YFV的抗病毒活性(EC_{50})为11 μ M。该值明显高于HUP1136和HUP1108。特别是比HUP1108高不少于约40倍并且比HUP1136高不少于约73倍。

[0235] 因此,显然本发明化合物的抗病毒活性显著高于GS-441524。

[0236] [表3]

[0237]

	EC_{50} (μ M)							
	DENV1	DENV2	DENV3	DENV4	JEV	ZIKV	YFV	WNV
HUP1136	>16	<0.125	<0.125	>16	<0.13		0.15	0.2
HUP1108	0.35	0.24	0.42	0.52	0.5	1.3	0.27	0.95
HUP1069	>16	<0.125	>16	>16	<0.13			<0.13
HUP1077	3.2	0.95	2.3	2.5	6.9	6.3		10.7
HUP1078		>20						
HUP1109		>20						

[0238] [实施例5]

[0239] 通过与实施例2类似的方法检查HUP1108对SARS-CoV-2(毒株WK-521)及其各种变体(毒株 α 、毒株 β 、毒株 γ 、毒株 δ)的病毒-RNA复制抑制效果。当使用病毒感染培养细胞时,将预先使用培养基稀释至适当浓度的测试样品(50 μ L/孔)添加到96孔板的每个孔中——每个孔中含有Caco-2细胞——从而产生双阶稀释系列而不是三阶稀释系列。使用盘式混合器将其混合。

[0240] 如图5所示,观察到从受感染细胞释放的病毒量倾向于以依赖于HUP1108化合物的量的方式减少,证实HUP1108对SARS-CoV-2的各种变种株具有抗病毒活性。

[0241] [实施例6]

[0242] (1)体内小鼠模型(肺内病毒量测定模型)

[0243] BALB/c小鼠经鼻接种SARS-CoV-2(WK-521株),接下来的小鼠使用感染后三天的肺匀浆上清液接种。将该继代培养重复十次。从第3代(P3)开始,持续获得高病毒滴度,从P9开始,一些个体开始死亡。通过新一代测序(NGS)对P10病毒进行了遗传分析。结果,在决定病毒感染性的刺突蛋白区域观察到Q498H突变。

[0244] 使用已适应小鼠的该病毒(MA-P10株),通过增殖评估模型检查HUP1108抑制小鼠肺内病毒增殖的效果。使用MA-P10株(2×10^2 TCID₅₀/小鼠)经鼻接种五周大的BALB/c小鼠。感染后第二天,收集每个个体的肺部,并测量肺内病毒滴度(每组五只小鼠)。结果,感染前2小时肌内施用HUP1108(单剂量,20mg/kg)的组中的肺内病毒量比仅施用培养基的组中的肺内病毒量低约1.31log包括不含药物(媒介物)(图6)。

[0245] (2)体内小鼠模型(致死模型)

[0246] 接下来,使用MA-P10株感染的小鼠模型检查HUP1108的死亡抑制效果。

[0247] 使用SARS-CoV-2(MA-P10株; 2×10^2 TCID₅₀/小鼠)经鼻接种30至50周龄的BALB/c小鼠。HUP1108在感染前2小时肌内注射1次(20mg/kg),从感染后次日起至感染后4天每天1次,共5天,计算存活率(每组5只小鼠)。结果,施用HUP1108的小鼠组的存活率为100%,而仅施用不含药物的介质(赋形剂)五天的小鼠组的存活率为40%(图7)。即,连续施用HUP1108提供了抑制SARS-CoV-2的致命效应的结果。

[0248] 非专利文献6报道,对SARS-CoV-2-MA10模型口服每天不少于60mg/kg的GS-621763或每天不少于120mg/kg的MPV(molnupiravir)可改善急性呼吸道疾病窘迫综合征(急性呼吸窘迫综合征)。

[0249] 相反,向同一小鼠模型以每天20mg/kg肌内施用本发明化合物HUP1108,显着减少肺内病毒量,且存活率为100%。这证实,即使在体内,HUP1108也是一种在低剂量使用时对SARS-CoV-2表现出非常高的抗病毒活性的化合物。

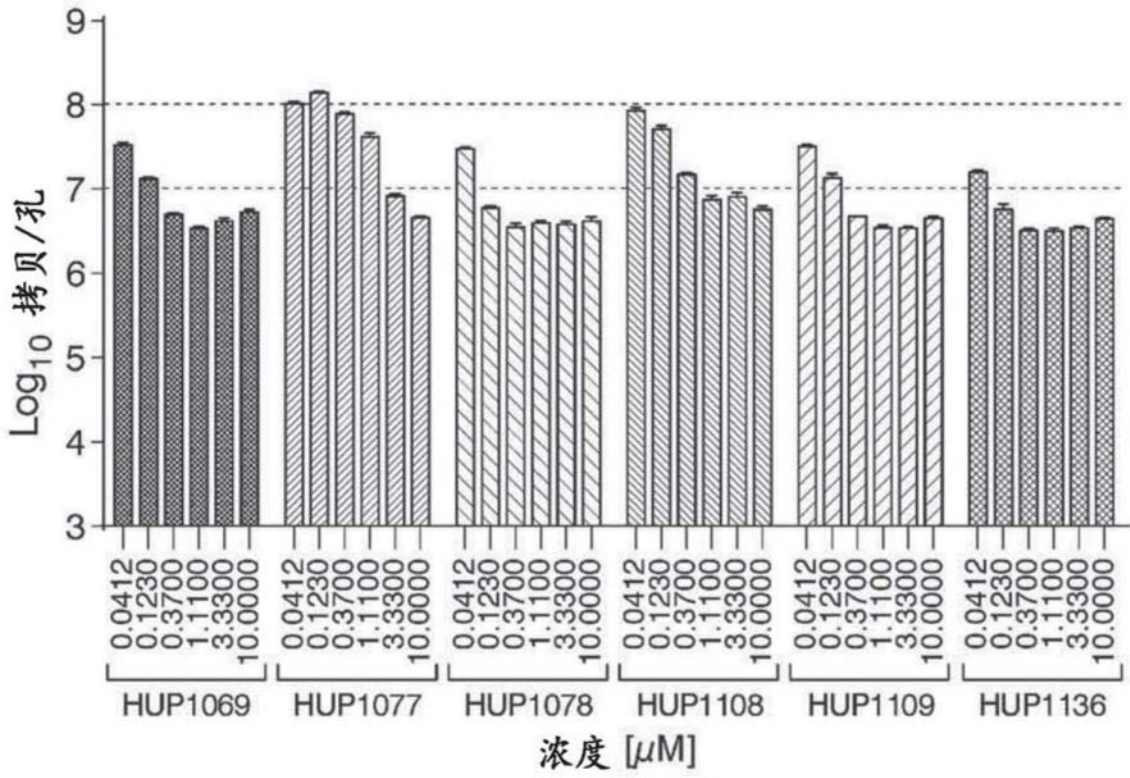


图1

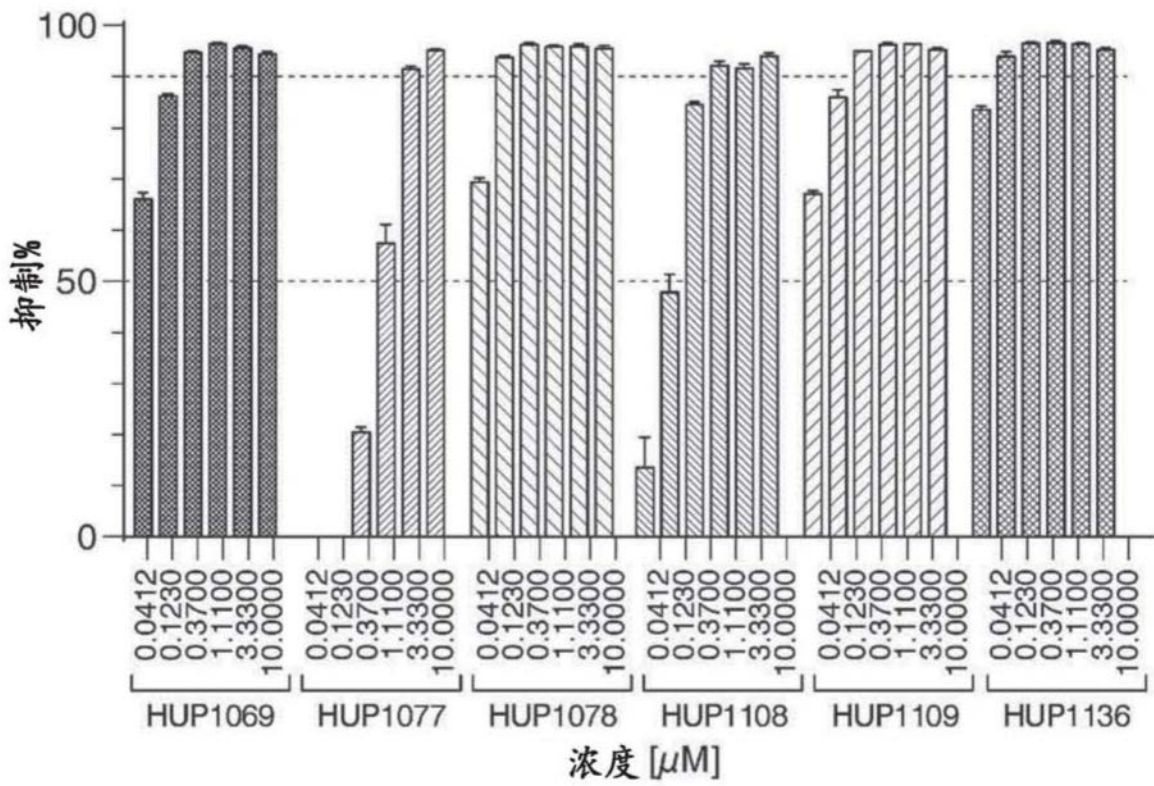


图2

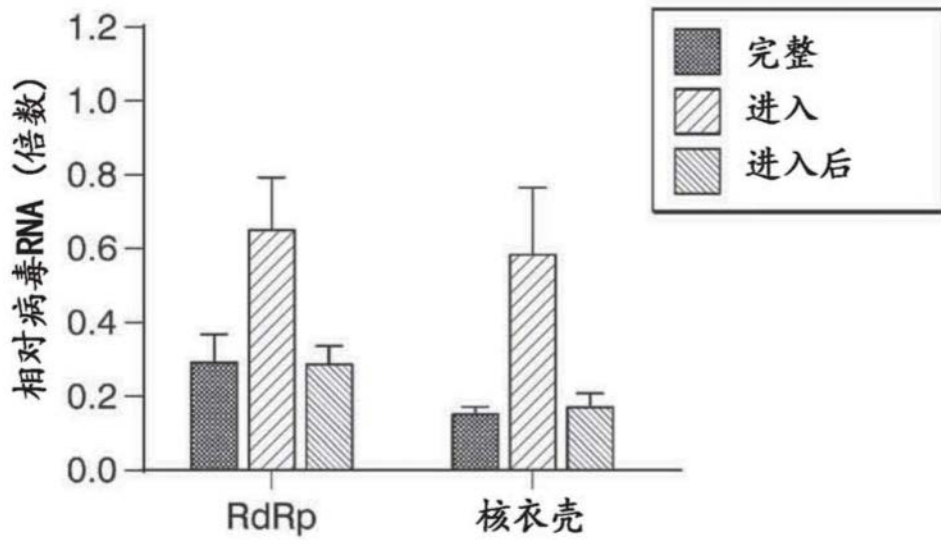


图3

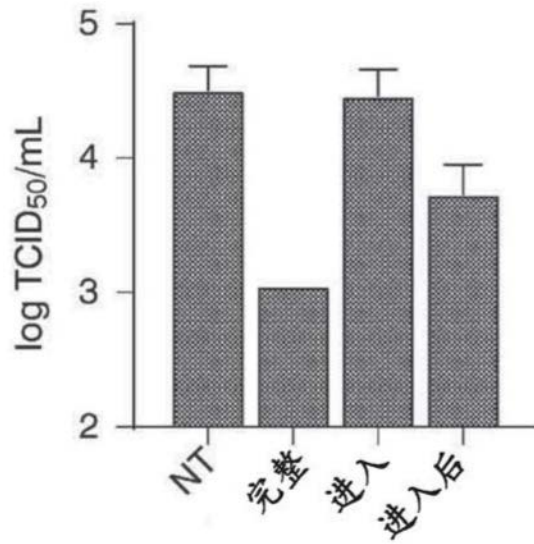


图4

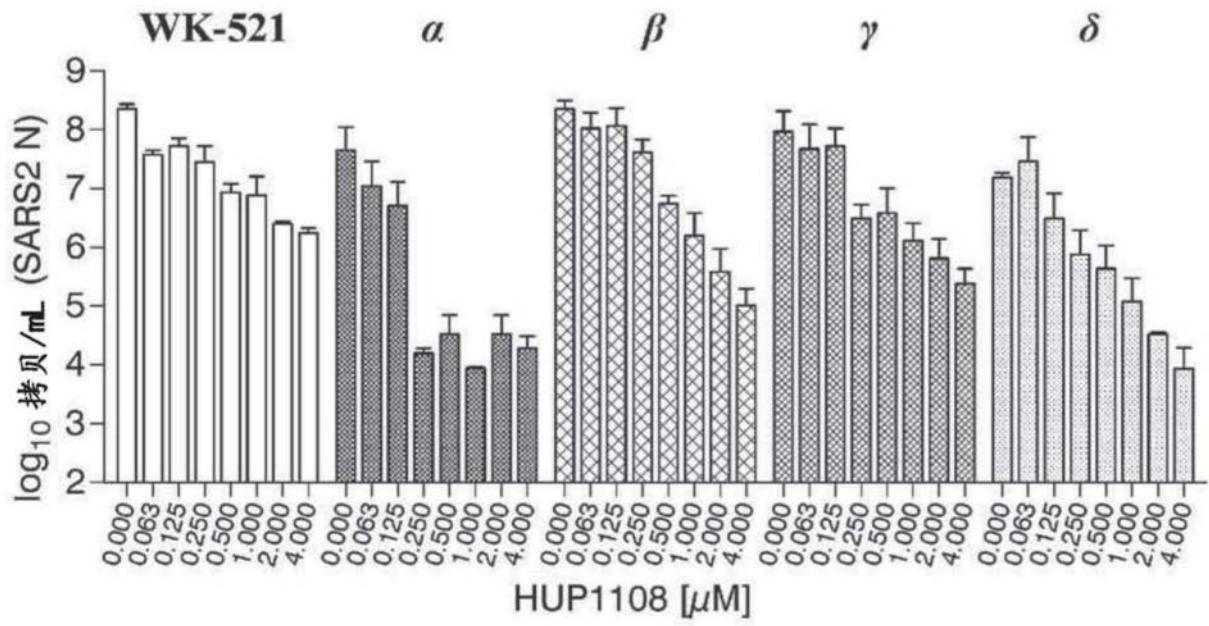


图5

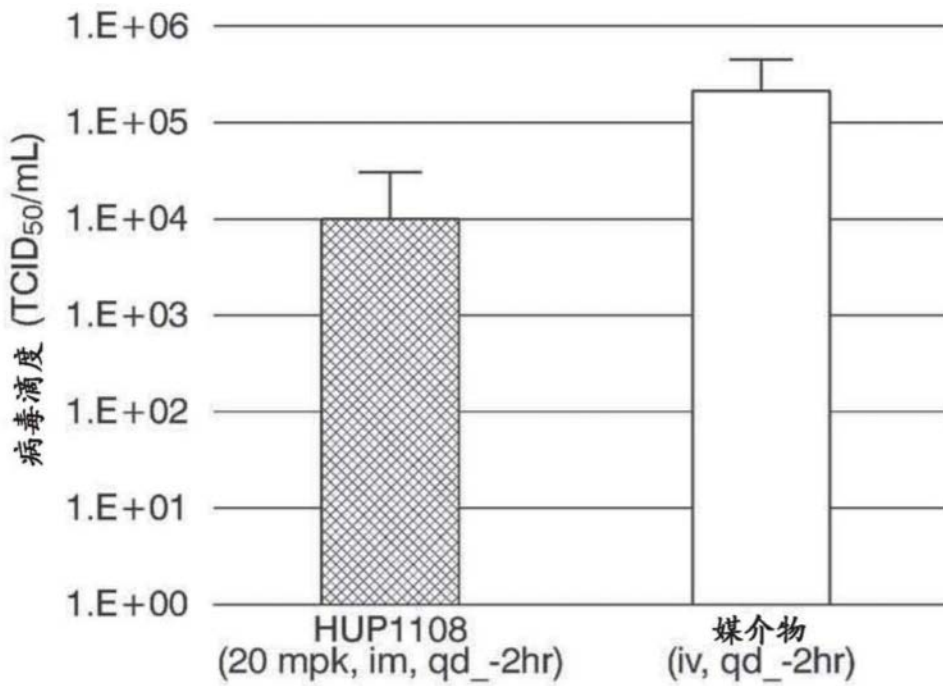


图6

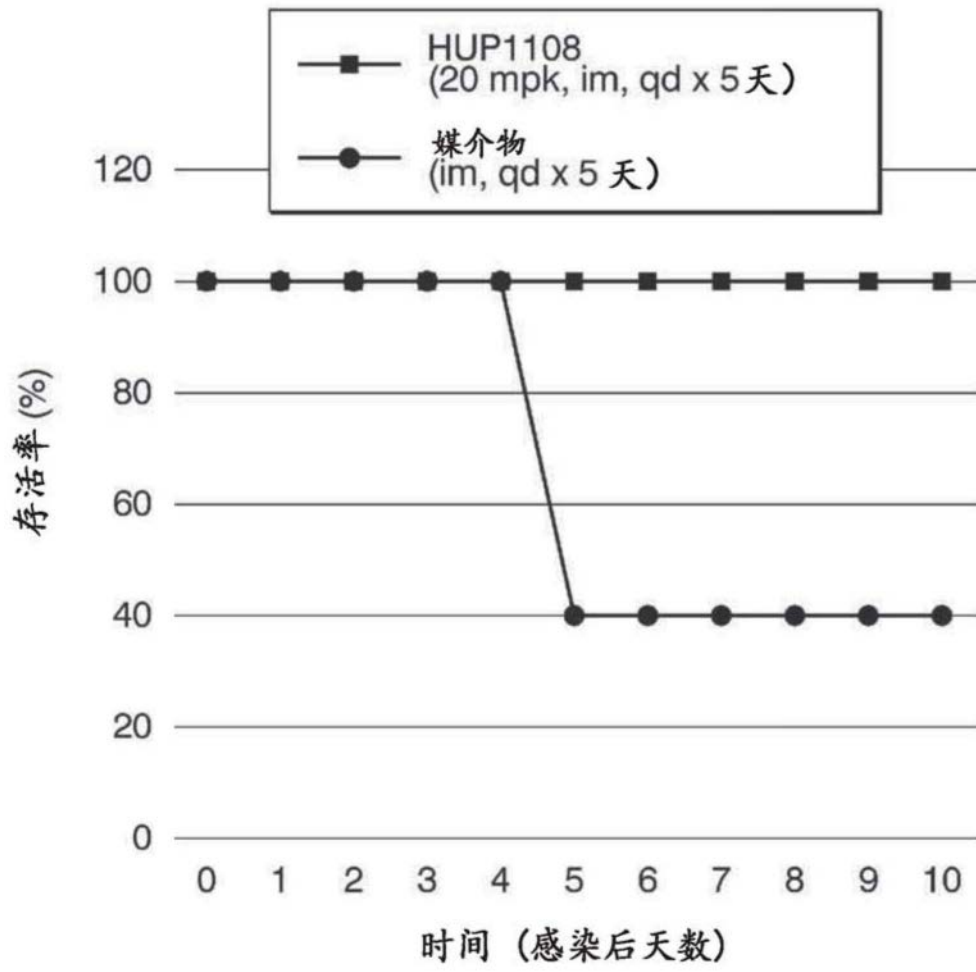


图7