



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 118574614 A

(43) 申请公布日 2024.08.30

(21) 申请号 202280089709.6

(22) 申请日 2022.11.24

(30) 优先权数据

2021903789 2021.11.24 AU

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.07.22

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/AU2022/051405 2022.11.24

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/092180 EN 2023.06.01

(71) 申请人 生物环境有限公司

地址 澳大利亚新南威尔士州

(72) 发明人 M·米勒 G·D·埃瓦尔特

(74) 专利代理机构 上海弼兴律师事务所 31283

专利代理师 高晓莉 徐婕超

(51) Int.Cl.

A61K 31/415 (2006.01)

A61P 31/14 (2006.01)

权利要求书1页 说明书19页 附图12页

(54) 发明名称

治疗SARS-CoV-2感染的方法

(57) 摘要

本发明涉及SARS-CoV-2感染或COVID-19的治疗或预防。特别是,本发明提供了一种N-甲脒基-5-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)-2-萘甲酰胺或其药学上可接受的盐在治疗或预防SARS-CoV-2感染或COVID-19中的用途。

1. 一种治疗或预防受试者感染SARS-CoV-2的方法,所述方法包括向受试者施用有效量的N-甲脒基-5-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)-2-萘甲酰胺,或其药学上可接受的盐。
2. 根据权利要求1所述的方法,其中,SARS-CoV-2的复制受到抑制。
3. 根据权利要求1或2所述的方法,其中,与SARS-CoV-2感染相关的并发症或症状的严重程度、强度或持续时间降低。
4. 根据权利要求1至3任一项所述的方法,其中,病毒载量降低。
5. 根据权利要求1至4中任一项所述的方法,其中,促炎细胞因子或趋化因子的产生减少。
6. 一种治疗或预防受试者感染COVID-19的方法,所述方法包括向受试者施用有效量的N-甲脒基-5-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)-2-萘甲酰胺,或其药学上可接受的盐。
7. 根据权利要求6所述的方法,其中,与COVID-19感染相关的并发症或症状的严重程度、强度或持续时间降低。
8. 根据权利要求1-7中任一项所述的方法,其中,N-甲脒基-5-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)-2-萘甲酰胺,或其药学上可接受的盐,通过选自口服、鼻内、静脉内、腹膜内、吸入和局部的途径施用。
9. 根据权利要求1-8中任一项所述的方法,其中,N-甲脒基-5-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)-2-萘甲酰胺,或其药学上可接受的盐,通过口服施用。
10. 根据权利要求1-9中任一项所述的方法,其中,N-甲脒基-5-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)-2-萘甲酰胺,或其药学上可接受的盐,以约100mg至约600mg的剂量施用。
11. 根据权利要求1-10中任一项所述的方法,其中,N-甲脒基-5-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)-2-萘甲酰胺,或其药学上可接受的盐,通过口服施用,并以约100mg至约200mg的剂量每日一次施用。
12. 根据权利要求1-10中任一项所述的方法,其中,N-甲脒基-5-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)-2-萘甲酰胺,或其药学上可接受的盐,通过口服施用,并以约100mg至约200mg的剂量每日两次施用。
13. 一种N-甲脒基-5-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)-2-萘甲酰胺或其药学上可接受的盐在制备用于治疗或预防SARS-CoV-2感染的药物中的用途。
14. 根据权利要求13所述的用途,其中,SARS-CoV-2的复制受到抑制。
15. 根据权利要求13或权利要求14所述的用途,其中,与SARS-CoV-2感染相关的并发症或症状的严重程度、强度或持续时间降低。
16. 根据权利要求13至15任一项所述的用途,其中,病毒载量降低。
17. 根据权利要求13至16中任一项所述的用途,其中,促炎细胞因子或趋化因子的产生减少。
18. 一种N-甲脒基-5-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)-2-萘甲酰胺或其药学上可接受的盐在制备用于治疗或预防COVID-19感染的药物中的用途。
19. 根据权利要求18所述的用途,其中,与COVID-19感染相关的并发症或症状的严重程度、强度或持续时间降低。

治疗SARS-CoV-2感染的方法

技术领域

[0001] 本申请要求澳大利亚临时专利申请2021903789(2021年11月24日提交)的优先权,其内容全部并入本申请。

[0002] 本发明涉及SARS-CoV-2感染的治疗或预防。具体地,本发明涉及抗病毒化合物及其在治疗或预防SARS-CoV-2感染中的用途。

背景技术

[0003] 本说明书中对现有技术的任何讨论都不应被视为是承认该现有技术是众所周知的或构成本领域公知常识的一部分。

[0004] 冠状病毒是一个庞大的病毒家族,可导致从普通感冒到更严重疾病的疾病,如中东呼吸综合征(MERS)和严重急性呼吸综合征(SARS)。严重急性呼吸综合征冠状病毒2(SARS-CoV-2)是一种新的冠状病毒毒株,它通过空气传播,具有高度传染性,并引起被称为COVID-19的疾病。世界卫生组织于2020年3月11日宣布COVID-19为大流行病。

[0005] COVID-19的临床范围从轻度自限性呼吸道疾病到重度进行性肺炎。此外,许多人没有从最初的呼吸系统疾病中完全康复,并继续患有被称为长期COVID的COVID-19后综合征。长期COVID最常见的症状是疲劳、呼吸急促、胸闷、心跳加速、注意力不集中和脑雾、嗅觉和味觉丧失、食欲不振、脱发、睡眠困难、焦虑和抑郁(Huang et al.2021,Lancet 397,220-232)。许多患有长期COVID的人最初症状轻微,没有住院治疗。长期COVID的影响目前与慢性异常免疫反应有关(Paull et al.2021,Viruses,13:1656)。

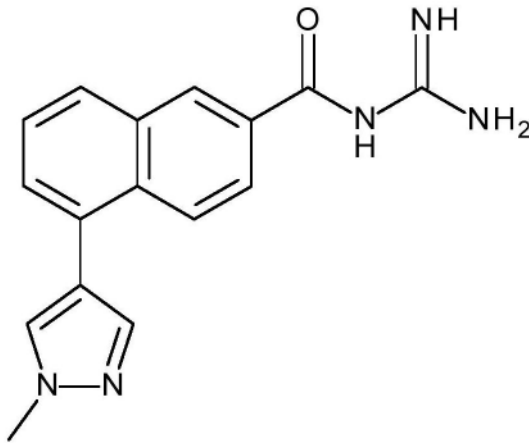
[0006] 迫切需要制定预防SARS-CoV-2感染的策略,以消除感染可能导致的潜在不良事件。

[0007] 本发明的目的在于克服或改善现有技术的至少一个缺点,或提供一种有用的替代方案。

发明内容

[0008] 本申请令人惊讶地显示,N-甲脒基-5-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)-2-萘甲酰胺(N-carbamimidoyl-5-(1-methyl-1H-pyrazol-4-yl)-2-naphthamide,BIT225)抑制SARS-CoV-2复制,降低感染性病毒载量并减少促炎细胞因子和趋化因子的产生。

[0009] BIT225的化学结构如下所示:



[0010] BIT225也被称为N-甲脒基-5-(1-甲基吡唑-4-基)萘-2-甲酰胺或5-(1-甲基吡唑-4-基)-2-萘甲酰基胍。

[0011] 本发明总体上涉及BIT225或其药学上可接受的盐的用途,用于治疗或预防SARS-CoV-2感染,用于抑制SARS-CoV-2的复制,用于降低与SARS-CoV-2感染相关的并发症或症状的严重程度、强度或持续时间,用于降低感染SARS-CoV-2的受试者的感染性病毒载量,或用于减少感染SARS-CoV-2的受试者中促炎细胞因子和趋化因子的产生。

[0012] 根据一个方面,本发明提供了一种治疗或预防受试者感染SARS-CoV-2的方法,所述方法包括向受试者施用有效量的N-甲脒基-5-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)-2-萘甲酰胺,或其药学上可接受的盐。

[0013] 根据另一方面,本发明提供了一种抑制SARS-CoV-2在受试者体内复制的方法,所述方法包括向受试者施用有效量的N-甲脒基-5-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)-2-萘甲酰胺,或其药学上可接受的盐。

[0014] 根据另一方面,本发明提供了一种降低受试者中与SARS-CoV-2感染相关的并发症或症状的严重程度、强度或持续时间的方法,所述方法包括向受试者施用有效量的N-甲脒基-5-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)-2-萘甲酰胺,或其药学上可接受的盐。

[0015] 根据另一方面,本发明提供了一种降低感染SARS-CoV-2的受试者的病毒载量的方法,所述方法包括向受试者施用有效量的N-甲脒基-5-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)-2-萘甲酰胺,或其药学上可接受的盐。

[0016] 根据另一方面,本发明提供了一种减少感染SARS-CoV-2的受试者中促炎细胞因子或趋化因子产生的方法,所述方法包括向受试者施用有效量的N-甲脒基-5-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)-2-萘甲酰胺,或其药学上可接受的盐。

[0017] 根据另一方面,本发明提供了一种降低感染SARS-CoV-2的受试者中促炎细胞因子或趋化因子浓度的方法,所述方法包括向受试者施用有效量的N-甲脒基-5-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)-2-萘甲酰胺,或其药学上可接受的盐。

[0018] 根据另一方面,本发明提供了一种降低感染SARS-CoV-2的受试者的肺或血清中促炎细胞因子或趋化因子浓度的方法,所述方法包括向受试者施用有效量的N-甲脒基-5-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)-2-萘甲酰胺,或其药学上可接受的盐。

[0019] 根据一个方面,本发明提供了一种用于在受试者中治疗或预防COVID-19的方法,所述方法包括向受试者施用有效量的N-甲脒基-5-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)-2-萘甲酰胺,

或其药学上可接受的盐。

[0020] 根据另一方面,本发明提供了一种降低受试者中与COVID-19感染相关的并发症或症状的严重程度、强度或持续时间的方法,所述方法包括向受试者施用有效量的N-甲脒基-5-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)-2-萘甲酰胺,或其药学上可接受的盐。

[0021] 根据另一方面,本发明提供了一种N-甲脒基-5-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)-2-萘甲酰胺或其药学上可接受的盐在制备用于治疗或预防SARS-CoV-2感染的药物中的用途。

[0022] 根据另一方面,本发明提供了一种N-甲脒基-5-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)-2-萘甲酰胺或其药学上可接受的盐在制备用于抑制SARS-CoV-2复制的药物中的用途。

[0023] 根据另一方面,本发明提供了一种N-甲脒基-5-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)-2-萘甲酰胺或其药学上可接受的盐在制备用于降低与SARS-CoV-2感染相关的并发症或症状的严重程度、强度或持续时间的药物中的用途。

[0024] 根据另一方面,本发明提供了一种N-甲脒基-5-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)-2-萘甲酰胺或其药学上可接受的盐在制备用于降低感染SARS-CoV-2的受试者的病毒载量的药物中的用途。

[0025] 根据另一方面,本发明提供了一种N-甲脒基-5-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)-2-萘甲酰胺或其药学上可接受的盐在制备用于减少感染SARS-CoV-2的受试者中促炎细胞因子或趋化因子产生的药物中的用途。

[0026] 根据另一方面,本发明提供了一种N-甲脒基-5-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)-2-萘甲酰胺或其药学上可接受的盐在制备降低感染SARS-CoV-2的受试者中促炎细胞因子或趋化因子浓度的药物中的用途。

[0027] 根据另一方面,本发明提供了一种N-甲脒基-5-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)-2-萘甲酰胺或其药学上可接受的盐在制备用于降低感染SARS-CoV-2的受试者的肺或血清中促炎细胞因子或趋化因子浓度的药物中的用途。

[0028] 根据另一方面,本发明提供了一种N-甲脒基-5-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)-2-萘甲酰胺或其药学上可接受的盐在制备用于治疗或预防COVID-19的药物中的用途。

[0029] 根据另一方面,本发明提供了一种N-甲脒基-5-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)-2-萘甲酰胺或其药学上可接受的盐在制备用于降低与COVID-19相关的并发症或症状的严重程度、强度或持续时间的药物中的用途。

[0030] 根据另一方面,本发明提供了一种用于治疗或预防SARS-CoV-2感染的方法中的包含N-甲脒基-5-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)-2-萘甲酰胺或其药学上可接受的盐的组合物。

[0031] 根据另一方面,本发明提供了一种用于抑制SARS-CoV-2复制的方法中的包含N-甲脒基-5-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)-2-萘甲酰胺或其药学上可接受的盐的组合物。

[0032] 根据另一方面,本发明提供了一种用于降低与SARS-CoV-2感染相关的并发症或症状的严重程度、强度或持续时间的方法中的包含N-甲脒基-5-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)-2-萘甲酰胺或其药学上可接受的盐的组合物。

[0033] 根据另一方面,本发明提供了一种用于降低感染SARS-CoV-2的受试者的病毒载量的方法中的包含N-甲脒基-5-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)-2-萘甲酰胺或其药学上可接受的盐的组合物。

[0034] 根据另一方面,本发明提供了一种用于减少感染SARS-CoV-2的受试者中促炎细胞

因子或趋化因子产生的方法中的包含N-甲脒基-5-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)-2-萘甲酰胺或其药学上可接受的盐的组合物。

[0035] 根据另一方面,本发明提供了一种用于治疗或预防COVID-19感染的方法中的包含N-甲脒基-5-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)-2-萘甲酰胺或其药学上可接受的盐的组合物。

[0036] 根据另一方面,本发明提供了一种用于降低与COVID-19感染相关的并发症或症状的严重程度、强度或持续时间的方法中的包含N-甲脒基-5-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)-2-萘甲酰胺或其药学上可接受的盐的组合物。

[0037] 根据另一方面,本发明提供了一种用于降低感染SARS-CoV-2的受试者中促炎细胞因子或趋化因子产生的包含N-甲脒基-5-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)-2-萘甲酰胺或其药学上可接受的盐的组合物。

[0038] 根据另一方面,本发明提供了一种用于降低感染SARS-CoV-2的受试者中促炎细胞因子或趋化因子的浓度的包含N-甲脒基-5-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)-2-萘甲酰胺或其药学上可接受的盐的组合物。

[0039] 根据另一方面,本发明提供了用于降低感染SARS-CoV-2的受试者的肺或血清中促炎细胞因子或趋化因子浓度的包含N-甲脒基-5-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)-2-萘甲酰胺或其药学上可接受的盐的组合物。

[0040] 根据另一方面,本发明提供了一种用于治疗或预防SARS-CoV-2感染的包含N-甲脒基-5-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)-2-萘甲酰胺或其药学上可接受的盐的药物组合物。

[0041] 根据另一方面,本发明提供了一种用于抑制SARS-CoV-2复制的包含N-甲脒基-5-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)-2-萘甲酰胺或其药学上可接受的盐的药物组合物。

[0042] 根据另一方面,本发明提供了一种用于降低与SARS-CoV-2感染相关的并发症或症状的严重程度、强度或持续时间的包含N-甲脒基-5-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)-2-萘甲酰胺或其药学上可接受的盐的药物组合物。

[0043] 根据另一方面,本发明提供了一种用于降低感染SARS-CoV-2的受试者的病毒载量的包含N-甲脒基-5-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)-2-萘甲酰胺或其药学上可接受的盐的药物组合物。

[0044] 根据另一方面,本发明提供了一种用于降低感染SARS-CoV-2的受试者中促炎细胞因子或趋化因子产生的包含N-甲脒基-5-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)-2-萘甲酰胺或其药学上可接受的盐的药物组合物。

[0045] 根据另一方面,本发明提供了一种用于治疗或预防COVID-19感染的包含N-甲脒基-5-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)-2-萘甲酰胺或其药学上可接受的盐的药物组合物。

[0046] 根据另一方面,本发明提供了一种用于降低与COVID-19感染相关的并发症或症状的严重程度、强度或持续时间的包含N-甲脒基-5-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)-2-萘甲酰胺或其药学上可接受的盐的药物组合物。

[0047] 根据另一方面,本发明提供了一种用于减少感染SARS-CoV-2的受试者中促炎细胞因子或趋化因子产生的包含N-甲脒基-5-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)-2-萘甲酰胺或其药学上可接受的盐的组合物。

[0048] 根据另一方面,本发明提供了一种用于降低感染SARS-CoV-2的受试者中促炎细胞因子或趋化因子的浓度的包含N-甲脒基-5-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)-2-萘甲酰胺或其药学

上可接受的盐的药物组合物。

[0049] 根据另一方面,本发明提供了一种用于降低感染SARS-CoV-2的受试者的肺或血清中促炎细胞因子或趋化因子浓度的包含N-甲脒基-5-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)-2-萘甲酰胺或其药学上可接受的盐的药物组合物。

[0050] 在某些实施方案中,SARS-CoV-2是选自由US-WA1/2020 (NR-52281)、US-PHC658/2021 (德尔塔(delta)变体;NR-55611)、South Africa/KRISP-K005325/2020 (贝塔(beta)变体;NR-54009)、England/204820464/2020 (阿尔法(alpha)变体;NR-54000)、Japan/TY7-503/2021-Brazil_P.1 (NR-54982) 和USA/MD-HP20874/2021 (奥密克戎(omicron)变体;NR-56461) 组成的组的毒株。

[0051] 在某些实施方案中,促炎细胞因子或趋化因子选自由白细胞介素6(IL-6)、白细胞介素1- α (IL-1 α)、肿瘤坏死因子 α (TNF α)、转化生长因子 β (TGF β)、单核细胞趋化蛋白-1 (MCP 1) 和白细胞介素1 β (IL-1 β) 组成的组。

[0052] 在某些实施方案中,N-甲脒基-5-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)-2-萘甲酰胺,或其药学上可接受的盐,通过选自口服、鼻内、静脉内、腹膜内、吸入和局部的途径施用。

[0053] 在某些实施方案中,N-甲脒基-5-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)-2-萘甲酰胺,或其药学上可接受的盐,通过口服施用。

[0054] 在某些实施方案中,N-甲脒基-5-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)-2-萘甲酰胺,或其药学上可接受的盐,每日施用。

[0055] 在某些实施方案中,N-甲脒基-5-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)-2-萘甲酰胺,或其药学上可接受的盐,每日两次施用。

[0056] 在某些实施方案中,N-甲脒基-5-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)-2-萘甲酰胺,或其药学上可接受的盐,以约100mg至约600mg的剂量施用。

[0057] 在某些实施方案中,N-甲脒基-5-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)-2-萘甲酰胺,或其药学上可接受的盐,通过口服施用,并以约600mg的剂量施用。

[0058] 在某些实施方案中,N-甲脒基-5-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)-2-萘甲酰胺,或其药学上可接受的盐,通过口服施用,并以约200mg的剂量施用。

[0059] 在某些实施方案中,N-甲脒基-5-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)-2-萘甲酰胺,或其药学上可接受的盐,通过口服施用,并以约100mg的剂量施用。

[0060] 在某些实施方案中,N-甲脒基-5-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)-2-萘甲酰胺,或其药学上可接受的盐,通过口服施用,每日施用。

[0061] 在某些实施方案中,N-甲脒基-5-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)-2-萘甲酰胺,或其药学上可接受的盐,通过口服施用,每日两次施用。

[0062] 在某些实施方案中,N-甲脒基-5-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)-2-萘甲酰胺,或其药学上可接受的盐,通过口服施用,并以约200mg的剂量每日一次施用。

[0063] 在某些实施方案中,N-甲脒基-5-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)-2-萘甲酰胺,或其药学上可接受的盐,通过口服施用,并以约200mg的剂量每日两次施用。

[0064] 在某些实施方案中,N-甲脒基-5-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)-2-萘甲酰胺,或其药学上可接受的盐,通过口服施用,并以约100mg的剂量每日一次施用。

[0065] 在某些实施方案中,N-甲脒基-5-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)-2-萘甲酰胺,或其药学

上可接受的盐,通过口服施用,并以约100mg的剂量每日两次施用。

[0066] 在某些实施方案中,N-甲脒基-5-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)-2-萘甲酰胺,或其药学上可接受的盐,与一种或多种另外的抗病毒药物联合施用。

附图说明

[0067] 图1:用qPCR方法评估VeroE6细胞或Calu-3细胞单层中病毒载量的BIT225剂量反应曲线,细胞在三个复孔中预先暴露于6种BIT225浓度中的一种的1小时,然后感染(m.o.i=0.1)6种SARS-CoV-2毒株中的一种:“BR”(三角形-Japan/TY7-503/2021-Brazil_P.1),“Delta”(“+”符号-US-PHC658/2021),“omicron”(“x”符号-USA/MD-HP20874/2021),“SA”(菱形-SouthAfrica/KRISP-K005325/2020),“UK”(倒三角形-England/204820464/2020),和US(实心圆圈-US-WA1/2020)。

[0068] 图2:通过qPCR评估的来自两种细胞类型的病毒载量的EC50值汇总(误差线为EC50估计值的95%渐近置信区间)。

[0069] 图3:用噬斑检测评估Vero E6细胞或Calu-3细胞单层中感染性病毒滴度的BIT225剂量反应曲线,细胞在三个复孔中预先暴露于6种BIT225浓度中的一种的1小时,然后感染(m.o.i=0.1)6种SARS-CoV-2毒株中的一种:“BR”(三角形-Japan/TY7-503/2021-Brazil_P.1),“Delta”(“+”符号-US-PHC658/2021),“omicron”(“x”符号-USA/MD-HP20874/2021),“SA”(菱形-SouthAfrica/KRISP-K005325/2020),“UK”(倒三角形-England/204820464/2020),和US(实心圆圈-US-WA1/2020)。

[0070] 图4:通过噬斑检测评估两种细胞类型的感染性病毒滴度的EC50值汇总(误差线为EC₅₀估计值的95%渐近置信区间)。

[0071] 图5:BIT225对SARS-2感染的K18-hACE2小鼠体重和死亡率的影响。实验1(A)和实验2(B和C)显示了体重变化的时间过程—以感染前基线体重的百分比表示。在鼻内感染10⁴PFU SARS-CoV-2(毒株WA1)前12时开始施用BIT225(BID)。在A中,显示了使用载体对照(三角形)、BIT225(100mg/kg-菱形和虚线)、或BIT225(300mg/kg-正方形和实线)给药(BID)的小鼠的组平均趋势线。误差线是平均值的95%置信区间(每组n=5)。B显示了每只小鼠与BIT225(300mg/kg)剂量(正方形)或载体(三角形)相关的体重变化。C:12天研究中,小鼠的Kaplan-Meier死亡率曲线:BIT225组(实线)与载体对照(虚线)。

[0072] 图6:在不同开始时间接受BIT225的小鼠对体重和死亡率的影响。在A和B中,四组(n=5)的K18-hACE2小鼠鼻内感染10⁴PFU的SARS-CoV-2(毒株WA1),并从感染前24小时(实心方块);感染后24小时(带有“+”的空心方块);感染后48小时(空心三角形)每日两次施用BIT225(300mg/kg),或对于载体对照组完全不施用(实心三角形)。C:每组相对于载体的Kaplan-Meier死亡率曲线(载体对照=虚线;感染前24小时=实线;感染后24小时=带圆圈的虚线;感染后48小时=加号)。所有用BIT225治疗的小鼠都存活到第12天—除了感染后48小时组中的一只小鼠在第11天死亡。

[0073] 图7:用BIT225治疗7天的小鼠的剂量反应性病毒载量降低。在第7天采集肺(A和B)和血清(C和D)样本,并通过qRT-PCR分析病毒载量(A和C);或通过噬斑检测分析感染性病毒滴度(B和D)。符号表示单个小鼠的数据:载体对照(三角形);BIT225(100mg/kg-菱形);BIT225(300mg/kg-正方形)。水平线和“+”分别表示组的中位数和平均值。Welch T检验

(Welch's T-tests) 用于比较组均值, P值表示为: **P<0.01; ***P<0.001。

[0074] 图8: 用BIT225治疗5或12天的小鼠的病毒载量降低。两组N=4小鼠被安排用BIT225或载体对照进行5天治疗, 两组N=7小鼠同样安排12天治疗。在感染后第5天或第12天从存活小鼠身上采集肺, 并通过qRT-PCR分析病毒载量(A); 或通过噬斑检测的感染性病毒滴度(B)。符号表示单个小鼠的数据: 载体对照(三角形); BIT225(300mg/kg-正方形)。水平线和“+”分别表示组的中位数和平均值。Welch T检验用于比较第5天对照组(N=3)和BIT225组(N=4), P值表示为: **P<0.01。请注意, 如图2所示, 对照组中没有小鼠存活到第12天, 而BIT225组的所有七只小鼠都存活。

[0075] 图9: 用BIT225治疗7天的小鼠的剂量反应性细胞因子水平: (A) 肺; (B) 血清。在感染后第7天从存活小鼠身上采集肺, 并通过夹心ELISA测定分析指定细胞因子或趋化因子的浓度。符号表示单个小鼠的数据: 载体对照(三角形); BIT225(100mg/kg-菱形); BIT225(300mg/kg-正方形)。水平线和“+”分别表示组中位数和平均值。Welch T检验用于比较组平均值(N=5只小鼠), P值表示为: ns-P>0.05; *P<0.05; **P<0.01; P<0.001。

定义

[0076] 在描述和要求保护本发明时, 根据下面给出的定义解释以下术语。还应该理解, 本文中使用的术语仅仅是为了描述本发明的特定实施例, 而不是旨在进行限制。除非另有定义, 否则本文中使用的所有技术和科学术语与本领域的普通技术人员通常理解的含义相同。

[0077] 在本发明的上下文中, 词语“包括”、“包含”等应理解为其包含性的含义, 而不是排他性的含义, 即“包括但不限于”的含义。

[0078] 术语“优选的”和“优选地”是指在某些情况下可以提供某些益处的本发明的实施例。然而, 在相同或其他情况下, 其他实施例也可能是优选的。此外, 一个或多个优选实施例的表述并不意味着其他实施例是无用的, 也并非旨在将其他实施例排除在本发明的范围之外。

[0079] 本文中使用的术语“症状”是指受试者患有特定病症或疾病的迹象或指征。例如, 本文中使用的与SARS-CoV-2感染相关的症状是指受试者感染了SARS-CoV-2的体迹象或指征。

[0080] 如本文所用, 术语“并发症”是指在疾病或病症期间发生的不是所述疾病或病症的基本组成部分的病理过程或事件, 其可能由所述疾病/病症或独立原因引起。

[0081] 如本文所用, 在对受试者施用治疗“有效量”的上下文中, 术语“有效量”是指具有预防和/或治疗效果的治疗量。在某些实施方案中, 在对受试者施用治疗“有效量”的上下文中, “有效量”是指足以实现以下一种、两种、三种、四种或多种效果的治疗量: (i) 减轻或改善SARS-CoV-2感染、与之相关的疾病或症状的严重程度; (ii) 缩短SARS-CoV-2感染、与之相关的疾病或症状的持续时间; (iii) 预防SARS-CoV-2感染、与之相关的疾病或症状的发展; (iv) 使SARS-CoV-2感染、与之相关的疾病或症状消退; (v) 防止SARS-CoV-2感染、与之相关的疾病或症状的发展或发作; (vi) 防止SARS-CoV-2感染、与之相关的疾病或症状的复发; (vii) 减少或防止SARS-CoV-2从一个细胞传播到另一个细胞、从一个组织传播到另一个组织或从一个器官传播到另一个器官; (ix) 防止或减少SARS-CoV-2从一个受试者传播至另一个受试者; (x) 减少与SARS-CoV-2感染相关的器官衰竭; (xi) 减少受试者的住院治疗; (xii)

缩短住院时间; (xiii) 增加患有SARS-CoV-2感染或与之相关的疾病的受试者的存活率; (xiv) 消除SARS-CoV-2感染或与之相关的疾病; (xv) 抑制或减少SARS-CoV-2复制; (xvi) 抑制或减少SARS-CoV-2进入宿主细胞; (xviii) 抑制或减少SARS-CoV-2基因组的复制; (xix) 抑制或减少SARS-CoV-2蛋白的合成; (xx) 抑制或减少SARS-CoV-2颗粒的聚集; (xxi) 抑制或减少SARS-CoV-2颗粒从宿主细胞中的释放; (xxii) 降低SARS-CoV-2滴度或病毒载量; 和/或 (xxiii) 增强或改善另一种疗法的预防或治疗效果。

[0082] 在某些实施方案中,有效量不会导致对SARS-CoV-2感染的完全保护,但与未经治疗的受试者相比,导致较低的滴度或病毒载量,减少SARS-CoV-2的数量或较低的病毒载量。在某些实施方案中,相对于未治疗的受试者,有效量导致SARS-CoV-2的滴度或病毒载量降低0.5倍、1倍、2倍、4倍、6倍、8倍、10倍、15倍、20倍、25倍、50倍、75倍、100倍、125倍、150倍、175倍、200倍、300倍、400倍、500倍、750倍或1,000倍或更大。在一些实施方案中,与未治疗的受试者相比,有效量导致SARS-CoV-2的滴度或病毒载量降低约1log或更多、约2log或更多、约3log或更多、约4log或更多、约5log或更多、约6log或更多、约7log或更多、约8log或更多、约9log或更多、约10log或更多、1到3log、1到5log、1到8log、1到9log、2到10log、2到5log、2到7log、2到8log、2到9log、2到10log、3到5log、3到7log、3到8log、3到9log、4到6log、4到8log、4到9log、5到6log、5到7log、5到8log、5到9log、6到7log、6到8log、6到9log、7到8log、7到9log、或8到9log。减少SARS-CoV-2感染的滴度、病毒载量、数量或总负担的好处包括但不限于减轻感染的严重症状、减少感染的症状以及缩短与感染相关的疾病持续时间。

[0083] 本文所用的“同时给药”、“同时施用”、“联合给药”、“联合施用”等包括以适合治疗SARS-CoV-2感染或适合治疗SARS-CoV-2感染相关症状/并发症的方式同时施用BIT225或其药学上可接受的盐和一种或多种其他病毒治疗剂。如本文所设想的,同时给药包括向受试者提供BIT225,或其药学上可接受的盐,和一种或多种作为单独化合物的其他病毒治疗剂,例如,连续、同时或在不同时间施用的单独药物组合物。优选地,如果BIT225或其药学上可接受的盐,和一种或多种其他病毒治疗剂分开施用,则它们的施用时间间隔不能太远,以至于BIT225或其药学上可接受的盐,和一种或多种其他病毒治疗剂不能相互作用。BIT225,或其药学上可接受的盐,和一种或多种其他病毒治疗剂可以按任何顺序施用。在一个实施方案中,BIT225或其药学上可接受的盐可以在向受试者施用一种或多种其他病毒治疗剂之前(例如,5分钟、15分钟、30分钟、45分钟、1小时、2小时、4小时、6小时、12小时、16小时、24小时、48小时、72小时、96小时、1周、2周、3周、4周、5周、6周、6周、1周、2周、3周、4周、5周、6周、8周,或之前12周前),同时或之后(例如,5分钟、15分钟、30分钟、45分钟、1小时、2小时、4小时、6小时、12小时、16小时、24小时、48小时、72小时、96小时、1周、2周、3周、4周、5周、6周、8周或12周后)施用。根据本发明,同时给药还包括提供一种或多种其他病毒治疗剂与BIT225或其药学上可接受的盐的混合物,例如在药物组合物中。

[0084] 本发明的其他病毒治疗剂包括疫苗接种或抗病毒药物,如神经氨酸酶或血凝素抑制剂或调节免疫系统或宿主细胞因子的药物。根据本发明使用的预期病毒治疗剂包括但不限于金刚烷胺(amantadine)、金刚乙胺(rimantadine)、利巴韦林(ribavirin)、碘尿苷(idoxuridine)、三氟尿苷(trifluridine)、阿糖腺苷(vidarabine)、阿昔洛韦(acyclovir)、更昔洛韦(ganciclovir)、膦甲酸钠(foscarnet)、齐多夫定(zidovudine)、去

羟肌苷 (didanosine)、帕拉米韦 (peramivir)、扎西他滨 (zalcitabine)、司他夫定 (stavudine)、泛昔洛韦 (famciclovir)、奥司他韦 (oseltamivir)、扎那米韦 (zanamivir) 和伐昔洛韦 (valaciclovir)。

[0085] 在相关实施方案中, BIT225或其药学上可接受的盐, 可以与可用于治疗SARS-CoV-2感染相关症状的其他治疗剂同时施用给被诊断患有SARS-CoV-2感染的受试者。例如, 镇咳剂、粘液溶解剂、祛痰剂、退热剂、镇痛剂或鼻减充血剂可以与BIT225或其药学上可接受的盐同时给药给被诊断患有SARS-CoV-2感染的受试者。

[0086] 如本文所用, 术语“感染”是指病毒在细胞或受试者中的入侵、增殖和/或存在。在一个实施方案中, 感染是“活动性”感染, 即病毒在细胞或受试者中复制的感染。这种感染的特征是病毒从最初被病毒感染的细胞、组织和/或器官传播到其他细胞、组织和/或器官。感染也可能是潜伏性感染, 即病毒处于休眠状态。

[0087] 如本文所用, 表述“治疗SARS-CoV-2感染”是指改善、减少或减轻受试者感染SARS-CoV-2的至少一种症状或生物学后果, 和/或降低或减少受试者在暴露于SARS-CoV-2后的SARS-CoV-2滴度、载量、复制或增殖。表述“治疗SARS-CoV-2感染”还包括缩短受试者表现出SARS-CoV-2感染的至少一种症状或生物学后果的时间。根据本发明, 用于治疗SARS-CoV-2感染的方法包括在受试者感染SARS-CoV-2和/或受试者表现出或被诊断出具有SARS-CoV-2感染的一种或多种症状或生物学后果之后, 向受试者施用本发明的药物组合物。

[0088] 如本文所用, 表述“预防SARS-CoV-2感染”是指在受试者中预防SARS-CoV-2感染的至少一种症状或生物学后果, 和/或抑制或减弱SARS-CoV-2能够进入、传播, 和/或在动物体细胞内/细胞间传播的程度。表述“预防SARS-CoV-2感染”还包括降低受试者表现出SARS-CoV-2感染的至少一种症状或生物学后果的易感性。根据本发明, 用于预防SARS-CoV-2感染(即预防)的方法包括在受试者感染SARS-CoV-2和/或受试者表现出具有SARS-CoV-2感染的一种或多种症状或生物学后果之前, 向受试者施用本发明的药物组合物。预防SARS-CoV-2感染的方法可包括在一年中的特定时间段或季节(例如, 在通常发现经历SARS-CoV-2感染的个体数量达到峰值之前的1-2个月期间)或在受试者前往或暴露于SARS-CoV-2感染频率高的环境之前, 和/或受试者暴露于其他感染SARS-CoV-2的受试者之前, 向受试者施用本发明的药物组合物。

[0089] 如本文所用, 在病毒的上下文中, 术语“复制”、“病毒的复制”和“病毒复制”是指导致病毒传播的病毒生命周期的一个或多个或所有阶段。病毒生命周期的步骤包括但不限于病毒附着在宿主细胞表面、穿透或进入宿主细胞(例如, 通过受体介导的内吞作用或膜融合)、脱壳(病毒衣壳被病毒酶或宿主酶去除和降解从而释放病毒基因组核酸的过程)、基因组复制、病毒信使RNA(mRNA)的合成、病毒蛋白合成和用于基因组复制的病毒核糖核蛋白复合物的组装、病毒颗粒的组装、病毒蛋白的翻译后修饰、以及通过裂解或出芽从宿主细胞释放并获取含有嵌入的病毒糖蛋白的磷脂包膜。在一些实施方案中, 术语“复制”、“病毒的复制”和“病毒复制”是指病毒基因组的复制。在其它实施方案中, 术语“复制”、“病毒的复制”和“病毒复制”是指病毒蛋白的合成。

[0090] 如本文所用, 病毒上下文中的术语“滴度”是指存在于给定体积的血液或其他生物体液或给定重量的组织或器官中的病毒颗粒的数量。也可以使用术语“病毒载量”和“病毒负荷”。

[0091] 如本文所用,术语“COVID-19”是指由SARS-CoV-2引起的疾病。

[0092] 如本文所用,术语“受试者”用于指动物(例如,鸟类、爬行动物和哺乳动物)。在一个具体实施方案中,受试者是鸟。在另一个实施方案中,受试者是哺乳动物,包括非灵长类动物(例如,骆驼、驴、斑马、牛、猪、马、山羊、绵羊、猫、狗、大鼠和小鼠)和灵长类动物(例如,猴子、黑猩猩和人类)。在某些实施方案中,受试者是非人类动物。在一些实施方案中,受试者是农场动物或宠物。在另一个实施方案中,受试者是人类。在另一个实施方案中,受试者是人类婴儿。在另一个实施方案中,受试者是人类儿童。在另一个实施方案中,受试者是成人。在另一个实施方案中,受试者是老年人。在另一个实施方案中,受试者是早产人类婴儿。

[0093] 本发明的药物组合物可以是脂质体或胶束的形式,其中除了其它药学上可接受的载体外,本发明的化合物还与两亲性试剂如脂质结合,在水溶液中以胶束、不溶性单层、液晶或层状层的聚集形式存在。适合用于脂质体制剂的脂质包括但不限于甘油单酯、甘油二酯、硫苷脂、溶血卵磷脂、磷脂、皂苷、胆汁酸等。这种脂质体制剂的制备在本领域技术人员的水平内,例如,在美国专利公开的第4,235,871;4,501,728;4,837,028;和4,737,323号,其全部通过引用并入本文。

[0094] 给药途径包括但不限于静脉内、腹膜内、皮下、颅内、皮内、肌内、眼内、鞘内、脑内、鼻内、经粘膜,或通过口服、直肠、静脉滴注、贴片和植入输注。口服途径是特别优选的。

[0095] 适合注射使用的组合物包括无菌水溶液(水溶性的)和用于临时制备无菌注射溶液的无菌粉末。所述载体可以是溶剂或分散介质,其包含例如水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)、其适当混合物和植物油。微生物的作用可以通过各种抗菌和抗真菌剂来预防,例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、山梨酸、硫柳汞等。在许多情况下,优选包括等渗剂,例如糖或氯化钠。可注射组合物的延长吸收可以通过在组合物中使用延迟吸收的试剂来实现,例如单硬脂酸铝和明胶。

[0096] 无菌注射溶液的制备是将所需量的活性化合物与上述各种其他成分掺入适当的溶剂中,然后根据需要进行例如过滤灭菌或通过其他适当方式灭菌。还考虑了分散体,这些分散体可以通过将各种灭菌的活性成分掺入无菌载体中来制备,所述载体包含基本分散介质和上述所列所需其他成分。在用于制备无菌注射溶液的无菌粉末的情况下,优选的制备方法包括真空干燥和冷冻干燥技术,其从先前无菌过滤的溶液中产生活性成分的粉末以及任何其他所需成分。

[0097] 当活性成分被适当保护时,它们可以口服施用,例如,用惰性稀释剂或可吸收的可食用载体一起施用,或者可以将其封装在硬壳或软壳明胶胶囊中,或者可以压缩成片剂。对于口服治疗性给药,活性化合物可以与赋形剂混合,并以可摄取片剂、含片、锭剂、胶囊、酞剂、混悬剂、糖浆剂、薄片剂等形式使用。这种组合物和制剂应含有至少0.01重量%,更优选0.1重量%,甚至更优选1重量%的活性化合物。当然,组合物和制剂的百分比可以是变化的,并且可以方便地在单位重量的约1至约99%,更优选约2至约90%,甚至更优选约5至约80%。这种治疗上有用的组合物中活性化合物的量应能获得合适的剂量。根据本发明的优选组合物或制剂的制备,使得口服剂型单位形式含有约0.1ng至2000mg的活性化合物。

[0098] 片剂、锭剂、丸剂、胶囊等也可以含有如下所列的组分:粘合剂:如树胶、阿拉伯胶、玉米淀粉或明胶;赋形剂:如磷酸二钙;崩解剂:如玉米淀粉、马铃薯淀粉、海藻酸等;润滑剂:如硬脂酸镁;可以加入甜味剂:如蔗糖、乳糖或糖精,或调味剂:如薄荷、冬青油或樱桃调

味剂。当剂量单位形式为胶囊时,除上述类型的材料外,还可以包含液体载体。各种其他材料可以作为包衣或以其他改变剂量单位的物理形式的方式存在。例如,片剂、丸剂或胶囊可以用虫胶、糖或两者都有包衣。糖浆或酞剂可以含有活性化合物、作为甜味剂的蔗糖、作为防腐剂的对羟基苯甲酸甲酯和对羟基苯甲酸丙酯、染料和如樱桃或橙子味的调味剂。用于制备任何剂量单位形式的任何材料应该是药学纯的,并且在所用量下基本上是无毒的。此外,活性化合物可以掺入缓释制剂和配方中。

[0099] 本发明还扩展到适合局部应用的形式,如乳膏、洗剂和凝胶。在这种形式中,可以添加或改性组分以帮助穿透表面屏障。

[0100] 用于制备剂量单位形式和局部制剂的方法对于本领域技术人员来说是容易获得的,例如《药学手册》,第19版(由Ainley Wade编辑),伦敦制药出版社;《CRC化学和物理手册》(由Robert C.Weast编辑),CRC出版社;Goodman和Gilman的《治疗学的药理学基础》,第9版,McGraw Hill;雷明顿:《药学科学与实践》,第19版(由Joseph P.Remington和Alfonso R.Gennaro编辑),麦克出版公司。

[0101] 本文所用术语“药学上可接受的盐”是指BIT225的任何药学上可接受的盐,并且不会显著降低或抑制BIT225的活性。合适的实例包括与有机或无机酸的酸加成盐,如乙酸盐、酒石酸盐、三氟乙酸盐、乳酸盐、马来酸盐、富马酸盐、柠檬酸盐、甲烷盐、磺酸盐、硫酸盐、磷酸盐、硝酸盐或盐酸盐。

[0102] 药学上可接受的载体和/或稀释剂包括任何和所有溶剂、分散介质、包衣、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等。将这类介质和试剂用于药学活性物质是本领域众所周知的。除非常规介质或试剂与活性成分不相容,否则考虑其在治疗组合物中的使用。补充活性成分也可以掺入组合物中。

[0103] 为了给药方便和剂量均匀,将肠胃外组合物配制成剂量单位形式是特别有利的。本文所用的剂量单位形式是指适合于作为待治疗受试者的单一剂量的物理离散单位;每个单元含有预定量的活性物质,所述活性物质经计算与所需的药物载体一起产生所需的治疗效果。本发明的新型剂量单位形式的规格取决于并直接依赖于(a)活性物质的独特特性和要达到的特定治疗效果,以及(b)配制领域固有的局限性。

[0104] 本发明预期的有效量将根据病情的严重程度以及接受者的健康和年龄而变化。一般而言,有效量可能从0.01ng/kg体重到约100mg/kg体重不等。有效量包括约100mg至约600mg,特别是约100mg、约150mg、约200mg、约250mg、约300mg、约350mg、约400mg、约450mg、约500mg、约550mg或约600mg。

[0105] 除了的操作实施例中,或在另有指示的情况下,本文使用的表达成分或反应条件的量的所有数字应理解为在所有情况下由术语“约”修饰。

[0106] 如本文所用,术语“约”可指在本领域每个实施方法的1个或多个标准偏差范围内。或者,“约”可以表示高达20%的范围。当在说明书和权利要求书中提供特定值时,应假定“约”的含义在该特定值的可接受误差范围内。

[0107] 使用端点的数值范围的表述包括包含在该范围内的所有数字(例如,1至5包括1、1.5、2、2.75、3、3.80、4、5等)。

本发明的优选实施方式

[0108] 尽管本发明已经参照本文详述的某些实施方式进行了描述,但其他实施方式可以

达到相同或相似的结果。本发明的变化和修改对于本领域的技术人员来说是显而易见的，并且本发明旨在涵盖所有此类修改和等同物。

[0109] 本申请基于令人惊讶的发现，即BIT225具有抗SARS-CoV-2的活性。

[0110] 本发明提供了用于治疗或预防SARS-CoV-2感染或由此产生的COVID-19的方法和组合物(例如药物组合物)。

[0111] 本发明提供了用于预防和/或治疗病毒感染的材料和方法。具体而言，本发明提供了用于预防SARS-CoV-2感染的材料和方法；治疗/改善与SARS-CoV-2感染相关的症状；和/或预防/延迟与SARS-CoV-2感染相关的并发症的发作。

[0112] 本发明提供了一种治疗或预防受试者感染SARS-CoV-2的方法，所述方法包括向受试者施用有效量的BIT225，或其药学上可接受的盐。

[0113] 本发明还提供了一种抑制SARS-CoV-2在受试者体内复制的方法，所述方法包括向受试者施用有效量的BIT225，或其药学上可接受的盐。

[0114] 本发明进一步提供了一种降低受试者中与SARS-CoV-2感染相关的并发症或症状的严重程度、强度或持续时间的方法，所述方法包括向受试者施用有效量的BIT225，或其药学上可接受的盐。

[0115] 本发明进一步提供了一种降低受试者体内SARS-CoV-2病毒载量的方法，所述方法包括向受试者施用有效量的BIT225，或其药学上可接受的盐。

[0116] 本发明进一步提供了一种减少感染SARS-CoV-2的受试者中促炎细胞因子或趋化因子产生的方法，所述方法包括向受试者施用有效量的BIT225，或其药学上可接受的盐。

[0117] 通过以下非限制性实施例进一步描述本发明。

具体实施方式

实施例1 BIT225的生产

[0118] 将5-溴-2-萘甲酸(2.12g, 8.44mmol)、1-甲基-4-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧硼杂环戊烷-2-基)-1H-吡唑(1.84g, 8.86mmol)和四(三苯基膦)钯(0)(502mg, 0.435mmol)的混合物在250mL圆底烧瓶中抽真空并用氮气吹扫(3个循环)。用注射器向混合物中加入乙腈(40mL)和2M碳酸钠水溶液(10mL)，在氮气下回流加热混合物22小时。让反应混合物冷却，加入1M盐酸水溶液(30mL)，然后用乙酸乙酯(3×50mL)萃取。将合并的有机层干燥(MgSO₄)，过滤，真空浓缩，得到粗品(空气干燥后2.98g)。将该粗品溶于热乙醇(150mL)中，趁热过滤以除去黄色杂质(120mg)。将滤液真空浓缩，残留物从二氯甲烷(30mL)重结晶，得到5-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)-2-萘甲酸为白色固体(724mg, 34%)。通过从二氯甲烷(2020mL)重结晶，从浓缩母液中获得第二批5-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)-2-萘酸(527mg, 25%)。

[0119] 在氮气下，将草酰氯(1.1mL, 13mmol)加入到5-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)-2-萘甲酸(1.19g, 4.71mmol)在含有二甲基甲酰胺(2滴)的无水二氯甲烷(200mL(反应过程中分批加入以达到溶解效果))的溶液中，将混合物在室温下搅拌4.25小时。将反应混合物在40°C下加热1小时，然后减压浓缩。将所得粗酰氯悬浮于无水四氢呋喃(50mL)中，将该混合物滴加到盐酸胍(2.09g, 21.9mmol)的2M氢氧化钠水溶液(15mL, 30mmol)中，然后将反应混合物搅拌30分钟。分离有机相，水相用氯仿(3×30mL)萃取，然后用乙酸乙酯(3×30mL)萃取。将合并的有机萃取物依次用1M氢氧化钠水溶液(60mL)和水(40mL)洗涤，然后干燥(Na₂SO₄)并真空

浓缩,得到玻璃状固体(高真空干燥后1.45g)。将该固体溶解在二氯甲烷中,然后缓慢蒸发,得到BIT225黄色固体(1.15g,83%)。

实施例2-体外测定

- 病毒:“US”US-WA1/2020(NR-52281),
“Delta”US-PHC658/2021(delta变体;NR-55611),
“SA”SouthAfrica/KRISP-K005325/2020(beta变体;NR-54009),
“UK”England/204820464/2020(alpha变体;NR-54000),
“BR”Japan/TY7-503/2021-Brazil_P.1(NR-54982)和“Omicron”USA/MD-HP20874/
2021(Omicron变体;NR-56461)
- 受感染的细胞:Vero(非洲绿猴肾脏)和Calu 3(人肺上皮癌)
- BIT225浓度:0、0.3、0.6、1.25、2.5、5和10 μ M(3个复孔中)
- BIT225在感染前1小时加入

[0120] 毒株来源于BEI Resources(Manassas,VA,USA)。在维持37 $^{\circ}$ C和5%CO₂的条件下,在补充有10%胎牛血清的Dulbecco氏改良Eagles培养基中,病毒在Vero E6细胞或Calu 3细胞中传代。

[0121] 使用Winkler et al.2020(Nat.Immunol.21:1327-1335)描述的方法,通过qRT-PCR(拷贝数/ml(log10))测量Vero和Calu 3细胞在感染后4天释放到培养基中的病毒基因组拷贝数。简而言之,在KingFisherTMFlex提取机器人(ThermoFisher Scientific,Waltham,MA,USA)上使用MagMaxTMmirVanaTM总RNA分离试剂盒(ThermoFisher Scientific,Waltham,MA,USA)从测试培养基中提取总病毒RNA。使用TaqMan[®]RNA-to cTTM一步法试剂盒(ThermoFisher Scientific,Waltham,MA,USA)对SARS-CoV-2核衣壳(N)基因进行逆转录和扩增。SARS-CoV-2N基因使用以下方法检测:

- 正向引物:ATGCTGCAATCGTGCTACAA;
- 反向引物:GACTGCCGCTCTGCTC;
- 探针:56FAM/TCAAGGAAC/ZEN/AACATTGCCAA/3IABkFQ。

[0122] 使用van den Worm et al.2012(PLoS One 7(3):e32857)描述的方法,通过噬斑检测(PFU/ml(log10))测量Vero和Calu 3细胞在感染后4天释放到培养基中的感染性病毒量。简而言之,将6孔簇中的Vero-E6细胞在37 $^{\circ}$ C下与在含有DEAE(0.005%w/v)和2%FCS的PBS中稀释的测试培养基一起孵育1小时。随后,用2ml的Avicel(RC-581;FMC Biopolymer)在DMEM中的1.2%悬浮液代替测试培养基,该悬浮液含有2%FBS、25mM HEPES、青霉素(100IU/ml)和链霉素(100IUg/ml)。将细胞在37 $^{\circ}$ C下孵育48-60小时并用甲醛固定,然后使用结晶紫染色观察噬斑。

[0123] 对于剂量-反应曲线,R软件包(drc)用于生成曲线图和估计EC50值。所有绘图和统计分析均使用R统计软件4.0.4版(R_Core_Team.2021.R:A language and environment for statistical computing.R Foundation for Statistical Computing,URL <https://www.R-project.org/>)。

[0124] 使用R软件包,drc(Ritz C,Baty F,Streibig JC,Gerhard D.2015.Dose-Response Analysis Using R.PLoS One 10:e0146021)对剂量响应曲线进行拟合和分析。通过函数DRM(\dots ,fct=LL.3)将三参数对数逻辑模型(方程1)拟合到浓度(x)对反应(f(x))

数据,并使用“delta”方法和t分布来估计EC50值(公式1中的参数e)和基于渐近的置信区间。

$$f(x, (b, d, e)) = \frac{d}{1 + \exp(b(\log(x) - \log(e)))} \quad - \text{公式.1}$$

(其中,x,f(x)和参数e如上所述;d和b分别是捕获最佳拟合响应曲线的最大值和斜率的参数)。

[0125] 实验以剂量-反应形式进行,并通过qRT-PCR(用于基因组拷贝)和噬斑测定(用于感染性病毒)对释放到培养基中的病毒进行定量。在以感染复数(m.o.i)为0.1感染SARS-CoV-2之前,单层暴露于测试浓度的BIT225中1小时。

[0126] 结果表明,BIT225抑制Vero-E6细胞和Calu-3细胞的受感染单层培养物中SARS-CoV-2的产生和释放。剂量反应曲线(图1和图3)显示,BIT225对所有六种测试的SARS-CoV-2毒株和两种细胞类型具有相似的抗病毒功效。表1列出了根据对数-logistic曲线拟合(分别为方程1中的参数e、d和b)得出的BIT225的参数估计值(EC₅₀;最大响应;和希尔斜率)。

[0127] 对于qRT-PCR检测(图1和图2),六种毒株的BIT225反应曲线相似,两种细胞类型的EC₅₀估计值在2.5μM和4.8μM之间(平均3.7μM)。对于噬斑检测(图3和图4),EC₅₀的范围在3.4μM和7.9μM之间(平均6.2μM),双向方差分析发现US毒株的EC₅₀(3.8μM)低于Delta,Omicron和Beta变体的估计值(P<0.05,Tukey调整)。最大响应和希尔斜率估计值的方差分析(表1)发现,虽然Calu-3细胞中这两个参数的平均值略低于Vero,但这些参数在病毒株之间没有显著差异。

表1-BIT225对病毒释放和感染性病毒产生的影响

检测	细胞	病毒	EC ₅₀		最大响应 (d)		斜率 (b)	
			(μ M)	[C.I.95%]	(log10)	[C.I.95%]	(nmol ⁻¹)	[C.I.95%]
PCR	Calu-3	WA1	2.55	[2.12, 2.99]	2.41	[2.28, 2.55]	1.38	[1.12, 1.64]
		Delta	4.81	[4.26, 5.35]	2.56	[2.48, 2.64]	1.08	[0.95, 1.21]
		Omicron	4.37	[3.86, 4.87]	2.57	[2.49, 2.65]	1.08	[0.95, 1.21]
		BR	4.64	[3.66, 5.61]	2.53	[2.38, 2.68]	1.12	[0.86, 1.38]
		SA	4.17	[3.65, 4.69]	2.67	[2.58, 2.76]	1.07	[0.93, 1.20]
		UK	2.86	[2.45, 3.26]	2.58	[2.47, 2.69]	1.21	[1.04, 1.37]
	Vero	WA1	2.53	[2.19, 2.88]	3.29	[3.13, 3.45]	1.79	[1.42, 2.16]
		Delta	3.59	[2.98, 4.21]	3.55	[3.39, 3.72]	1.15	[0.96, 1.35]
		Omicron	3.37	[2.87, 3.87]	3.51	[3.36, 3.66]	1.22	[1.04, 1.40]
		BR	4.03	[3.38, 4.68]	3.53	[3.37, 3.68]	1.13	[0.94, 1.32]
		SA	2.65	[2.27, 3.03]	3.52	[3.36, 3.67]	1.28	[1.10, 1.47]
		UK	4.56	[3.89, 5.24]	3.58	[3.44, 3.72]	1.07	[0.91, 1.23]
噬斑	Calu-3	WA1	3.43	[3.06, 3.81]	3.38	[3.27, 3.50]	1.31	[1.15, 1.48]
		Delta	7.9	[7.26, 8.55]	3.44	[3.38, 3.51]	1.00	[0.90, 1.09]
		Omicron	7.61	[6.04, 9.19]	3.42	[3.24, 3.60]	1.11	[0.81, 1.41]
		BR	5.79	[4.93, 6.65]	3.39	[3.25, 3.53]	1.36	[1.08, 1.64]
		SA	6.79	[6.06, 7.51]	3.52	[3.42, 3.62]	1.34	[1.14, 1.55]
		UK	5.72	[4.91, 6.52]	3.43	[3.30, 3.55]	1.15	[0.96, 1.33]
	Vero	WA1	4.09	[3.75, 4.44]	6.40	[6.23, 6.56]	1.45	[1.29, 1.62]
		Delta	6.65	[6.2, 7.11]	6.45	[6.33, 6.58]	1.48	[1.32, 1.64]
		Omicron	6.5	[6.05, 6.95]	6.31	[6.18, 6.43]	1.41	[1.26, 1.57]
		BR	6.36	[5.64, 7.07]	6.39	[6.17, 6.60]	1.67	[1.36, 1.98]
		SA	7.26	[6.54, 7.97]	6.40	[6.23, 6.57]	1.50	[1.26, 1.73]
		UK	6.7	[6.15, 7.26]	6.41	[6.26, 6.55]	1.38	[1.21, 1.55]

实施例3-小鼠研究

[0128] 在细胞角蛋白18启动子 (K18-hACE2小鼠) 的控制下表达人ACE2的6至8周龄转基因小鼠购自杰克逊实验室 (Bar Harbor, ME, USA; 库存号034860), 并在抵达时评估为健康状况不佳。这些动物经过1-2周的适应, 并被单独饲养, 以尽量减少交叉感染的风险。将动物保持在异氟醚麻醉下进行给药和病毒接种, 并返回其笼子中进行恢复。

[0129] 这些研究使用了SARS-CoV-2的2019n-CoV/US-WA1/2020毒株 (从BEI Resources (Manassas, VA, USA)、国家过敏和传染病研究所 (NIAID) 获得)。该病毒在Vero E6细胞 (CRL-1586™, ATCC, Washington, DC, USA) 中传代。将VeroE6细胞维持在补充有10%胎牛血清 (FBS) 的Dulbecco氏改良Eagle培养基 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, DMEM) 中。

[0130] 通过Vero E6细胞中的噬斑检测测定体外产生的病毒接种物的定量和研究结束时组织匀浆中病毒的数量。通过定量逆转录酶聚合酶链反应 (qRT-PCR) 检测血清和组织匀浆

中的病毒基因组。病毒株:2019n-CoV/USA-WA1/2020

[0131] 在第1天通过鼻内给药给小鼠接种 10^4 PFU的SARS-CoV-2 (2019n-CoV/USA-WA1/2020),并通过口服灌胃进行如下治疗:

- 实验1,第1组:在第1天,5只小鼠通过鼻内给药接种 10^4 PFU SARS-CoV-2 (2019n-CoV/USA-WA1/2020),并通过口服灌胃100mg/kgBIT225 (剂量体积为3ml/kg;在载体中浓度33.4mg/ml,每日两次,持续7天。

- 实验1,第2组:在第1天,5只小鼠通过鼻内给药接种 10^4 PFU SARS-CoV-2 (2019n-CoV/USA-WA1/2020),并通过口服灌胃300mg/kg BIT225 (剂量体积为3ml/kg;在载体中浓度100mg/ml)每日两次,持续7天。

- 实验1,第3组:在第1天,5只小鼠通过鼻内给药接种 10^4 PFU SARS-CoV-2 (2019n-CoV/USA-WA1/2020),并通过口服灌胃载体对照 (剂量体积为3ml/kg;载体),每日两次,持续7天。

- 实验2,第1组:在第1天,7只小鼠通过鼻内给药接种 10^4 PFU SARS-CoV-2 (2019n-CoV/USA-WA1/2020),并通过口服灌胃300mg/kgBIT225每日两次,持续12天。

- 实验2,第2组:在第1天,7只小鼠通过鼻内给药接种 10^4 PFU SARS-CoV-2 (2019n-CoV/USA-WA1/2020),并通过口服灌胃载体对照,每日两次,持续12天。

- 实验3,第1组:在第1天,4只小鼠通过鼻内给药接种 10^4 PFU SARS-CoV-2 (2019n-CoV/USA-WA1/2020),并通过口服灌胃300mg/kgBIT225每日两次,持续5天。

- 实验3,第2组:在第1天,4只小鼠通过鼻内给药接种 10^4 PFU SARS-CoV-2 (2019n-CoV/USA-WA1/2020),并通过口服灌胃载体对照,每日两次,持续5天。

- 实验4,第1组:在通过鼻内给药接种 10^4 PFU的SARS-CoV-2 (2019n-CoV/USA-WA1/2020)前24小时开始,5只小鼠用300mg/kgBIT225治疗,每日两次。

- 实验4,第2组:在通过鼻内给药接种 10^4 PFU的SARS-CoV-2 (2019n-CoV/USA-WA1/2020)后24小时开始,5只小鼠用300mg/kgBIT225治疗,每日两次。

- 实验4,第3组:在通过鼻内给药接种 10^4 PFU的SARS-CoV-2 (2019n-CoV/USA-WA1/2020)前48小时开始,5只小鼠用300mg/kgBIT225治疗,每日两次。

- 实验4,第4组:在通过鼻内给药接种 10^4 PFU的SARS-CoV-2 (2019n-CoV/USA-WA1/2020)前24小时开始,5只小鼠用载体对照治疗,每日两次。

[0132] 载体对照是:

- 0.5% (w/v) 羟丙基甲基纤维素,
- 0.5% (v/v) 苯甲醇和
- 0.4% (v/v) 聚山梨醇酯80的Milli-Q水溶液 (HPMC-SV)。

[0133] 每天早上第一次给药前记录体重。就死亡率而言,与接种前第1天的体重相比,体重减轻>30%被预先确定为立即安乐死的触发因素(出于伦理考虑)。对存活至计划终止时间(不同实验中的第5天、第7天或第12天)的小鼠实施安乐死,并采集肺和血液样品用于定量病毒基因组拷贝数、感染性病毒滴度和细胞因子浓度。

[0134] 计算每只小鼠在每个时间点从第1天(感染前)开始的体重百分比变化(公式2)。

$$\text{体重变化}_{\text{天数}i}(\%) = \frac{\text{体重}_{\text{天数}i} - \text{体重}_{\text{天数}1}}{\text{体重}_{\text{天数}1}} * 100\% \quad \text{— 公式2}$$

[0135] 通过双尾Welch T检验比较各时间点的组平均值。在体重变化的组间比较中,病毒基因组拷贝数、感染滴度和细胞因子水平也使用了双尾Welch T检验。

[0136] 对于死亡率比较,标准Kaplan-Meier分析(右删失)使用R软件包:生存(v3.2-13; Therneau, T.M. (2020). A Package for Survival Analysis in R. <https://CRAN.R-project.org/package=survival>)进行,并且生存曲线采用对数秩检验(log-rank检验)进行比较。

[0137] 使用Winkler et al. 2020 (Nat. Immunol. 21:1327-1335) 描述的方法通过qRT-PCR测定血液和肺组织匀浆中的病毒基因组拷贝数。简而言之,在KingFisher™ Flex提取机器人(ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA)上使用MagMax™ mirVana™总RNA分离试剂盒(ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA)从血清或组织中提取总病毒RNA。使用TaqMan® RNA-to cDNA一步法试剂盒(ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA)对SARS-CoV-2核衣壳(N)基因进行逆转录和扩增。SARS-CoV-2 N基因使用以下方法检测:

- 正向引物:ATGCTGCAATCGTGCTACAA;
- 反向引物:GACTGCCGCTCTGCTC;
- 探针:56FAM/TCAAGGAAC/ZEN/AACATTGCCAA/3IABkFQ。

[0138] 使用van den Wormet al. 2012 (PLoS One 7 (3) :e32857) 描述的方法通过噬斑检测法测定血液和肺组织匀浆中的感染性病毒的量。简而言之,将6孔簇中的Vero-E6细胞在37°C下与含有DEAE (0.005% w/v) 和2% FCS的PBS中的血液或肺匀浆一起孵育1小时。随后,将血液和肺组织匀浆替换为2ml 1.2%的Avicel (RC-581; FMC Biopolymer) 在含有2% FBS、25mM HEPES、青霉素(100IU/ml)和链霉素(100IUg/ml)的DMEM中的悬浮液。将细胞在37°C下孵育48-60小时并用甲醛固定,然后使用结晶紫染色观察噬斑。

[0139] 测量的疾病标志物是存活率;相对于感染前基线的体重变化百分比;病毒载量(qPCR测定);以及肺组织和血清样本中的感染性病毒滴度(噬斑检测)。此外,还测定了肺和血清样本中的六种促炎细胞因子/趋化因子(IL-6; IL-1 α ; IL-1 β ; TNF α ; TGF β ; MCP1)。

[0140] 进行了不同给药方案和持续时间的三个实验,以比较BIT225和载体对照组的疾病终点。实验1比较载体对照组和两种水平的BIT225 (100mg/kg和300mg/kg)组,每组5只小鼠给药7天(图5A)。实验2延长至12天给药,以包括死亡率分析,比较载体对照组和BIT225 (300mg/kg)组,每组7只小鼠给药12天(图5B和C)。实验3包括在感染后第5天处死BIT225给药组或载体对照组小鼠(每组n=4)。根据之前的结果,预计第5天之前载体对照组中不会有任何动物死亡,但是,载体对照组中的一只小鼠在第3天死亡。尽管如此,三只载体对照组小鼠存活到第5天,从而能够比较各组之间病毒载量(图8)和细胞因子/趋化因子(数据未显示)反应。

[0141] 在这三个实验中,所有16只仅服用载体对照的小鼠从感染后第3天开始体重减轻。相比之下,21只小鼠中有21只在接受12小时剂量的BIT225时体重继续增加。在实验1(图5A)中,两种BIT225给药水平(100mg/kg或300mg/kg)之间的体重变化没有显著差异,并且在第7天,所有10只BIT225给药小鼠的体重都大于感染前的体重。与任一BIT225组相比,载体对照组的体重显著减轻(P<0.001;单因素方差分析)。在第5天、第6天和第7天,与BIT225联合组相比,载体组的组平均体重变化差异在统计学上较低:分别为3.8% (P=0.01); 6.4% (P=0.001); 和8.1% (95% CI [5.6, 10.7], P=0.001) (P值来自Welch T检验,针对6个时间点的

检验进行了校正)。

[0142] 在实验2(图5B)中,载体对照组(n=7)中的所有小鼠从感染后第3天开始体重减轻。第8天早上发生2例死亡,对照组其余5只小鼠在第9天死亡(图5C)。相比之下,对于给药BIT225 12天(n=7)的组,所有小鼠都存活并继续增加体重,直到第12天安乐死以进行组织采集。从第3天开始,单日的方差分析和T检验为这两组之间的体重差异建立了很强的统计学意义(如图5B所示的调整后的P值)。实验3(给药5天;BIT225和载体对照组各n=4)给出了与实验1和实验2相同的体重变化趋势,至第5天,所有接受BIT225的小鼠都保持健康,并且体重增加(数据未显示)。在载体对照组中,一只小鼠在第3天死亡,另外三只小鼠在第5天体重减轻5%至15%。实验2的Kaplan-Meier死亡率曲线如图5C所示。对照曲线和BIT225曲线差异显著(经对数秩检验 $P < 0.001$)。BIT225给药具有明显的生存优势。

[0143] 实验4比较了在SARS-2感染前24小时、SARS-2感染后24小时或SARS-2感染后48小时开始给药BIT225的疗效(图6)。四组5只小鼠感染与早期实验相同的致死接种物(104pfu),从感染前24小时开始给药载体对照或BIT225(300mg/kg),每日两次。对于感染后组,在第2天(24h.p.i)或第3天(48h.p.i)的早上将给药从载体对照切换到BIT225。该实验的Kaplan-Meier生存曲线如图6B所示:与之前的研究一样,载体对照组的所有小鼠在第8天死亡。所有BIT225给药前小鼠(n=5)和给药后24小时小鼠(n=5)保持健康,并根据年龄预期继续增加体重,直到第12天。给药后48小时组的五只小鼠中有一只从第四天开始体重下降,并在第11天死亡,而该组中的其他四只小鼠保持健康,体重增加与其他BIT225组的小鼠相似。从组均趋势线(未显示)来看,随着BIT225给药的开始延迟,体重增加似乎有减少的趋势,但在第11天,给药前组和给药后48小时组之间的差异没有统计学意义($P = 0.3$, T检验)。重要的是,给药后48小时组明显优于未治疗组。

[0144] 在用100mg/kg或300mg/kg BIT225治疗7天的小鼠中,BIT225与肺匀浆和血清中病毒载量和感染性病毒的显著减少有关(图7)。此外,病毒减少是剂量反应性的。在肺中,100mg/kg剂量使病毒载量减少约 $2 \log_{10}$ ($P < 0.001$, T检验),而300mg/kg剂量使病毒载量减少约 $3.5 \log_{10}$ ($P < 0.001$, 剂量之间)。类似地,从肺组织中回收的感染性病毒在各自剂量下分别减少了约2000PFU/mL和4000PFU/mL($P < 0.001$)。这些变化也反映在血清样本中,尽管检测到的病毒绝对水平较低。

[0145] 还测量了存活到第5天(实验3)或第12天(实验2)的小鼠的肺部病毒载量(图8)。用BIT225(300mg/kg,每日两次)治疗的11只小鼠全部存活,并显示肺部病毒载量等于或低于qRT-PCR检测的检测限,且噬斑计数非常低($< 200/\text{mL}$),而存活至第5天的3只小鼠的病毒载量为 10^5 - 10^6 拷贝/mg,每mL匀浆产生约3000至4000个噬斑。

[0146] 根据各自制造商的说明,通过测定促炎细胞因子白细胞介素-6(IL-6)(RayBio® Mouse IL-6ELISA[ELM-IL6-1],RayBiotech Life,Peachtree Corners,GA,USA)、白细胞介素-1 α (IL-1 α)(RayBio®小鼠IL-1ELISA[ELM-IL1alpha-1])、白细胞介素-1 β (IL-1 β)(RayBio®小鼠IL-1ELISA[ELM-IL1 β -1]、RayBiotech Life,Peachtree Corners,GA,USA)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)(RayBio®小鼠TNF- α ELISA[ELM-TNF α -1])、RayBiotech Life,Peachtree Corners,GA,USA)、转化生长因子 β (TGF- β)(TGF- β -1小鼠ELISA试剂盒[BMS6084],ThermoFisher Scientific,Waltham,MA,USA)和促炎趋化因子单核细胞趋化蛋

白-1 (MCP-1) (RayBio® Mouse MCP-1 ELISA [ELM-MCP1-1], RayBiotech Life, Peachtree Corners, GA, USA) 的量测定炎症。ELISA方案采用固相夹心ELISA设计。细胞因子/趋化因子靶抗体已预先涂布到板上。将样品加入孔中以与捕获抗体结合。添加第二种抗体能够检测靶抗体夹心复合物,使用比色报告信号进行定量,该信号与原始标本中的浓度成正比。

[0147] 与疾病严重程度和病毒传播的降低一致,给药BIT225的小鼠在治疗结束时在肺和血清样本中测量的5种促炎细胞因子 (IL-6, IL-1 α , IL-1 β , TNF α 和TGF β) 和一种趋化因子 (MCP-1) 降低。除了100mg/kg剂量组中的IL-6之外,与载体对照组的所有比较都产生了BIT225组中具有统计学意义 ($P < 0.05$) 的较低水平。图9显示了感染后7天测量的所有15只小鼠的数据。一般来说,高剂量BIT225组的平均和中位细胞因子浓度低于载体对照组的一半,也低于低剂量组。在给药5天和12天的小鼠的血清和肺样本中测量到相似程度的细胞因子减少(未显示)。

[0148] 体内结果表明,BIT225可抑制SARS-CoV-2复制,降低感染性病毒载量,减少典型促炎细胞因子和趋化因子的产生,并降低与SARS-CoV-2感染相关的并发症的严重程度。

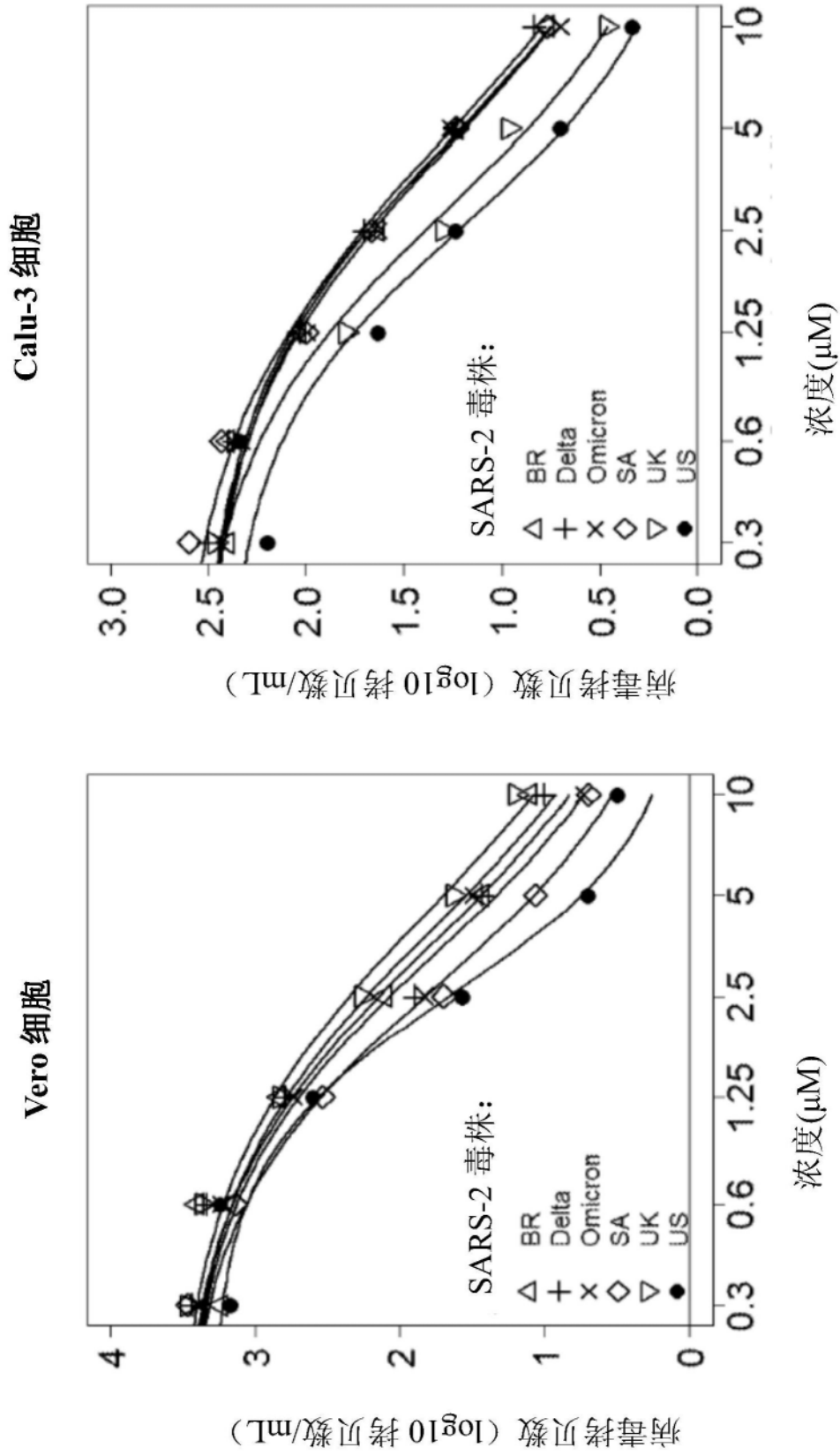


图1

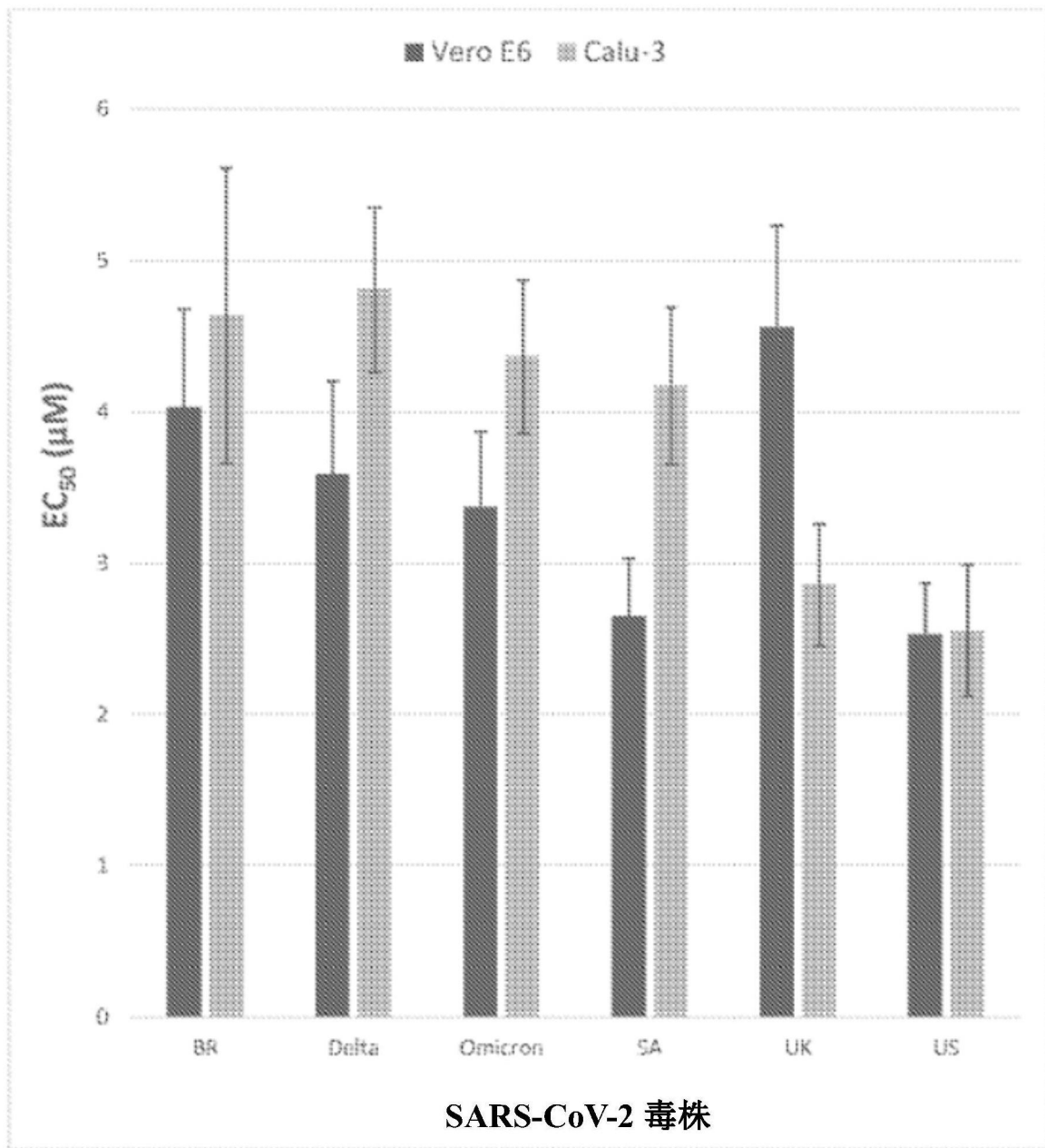


图2

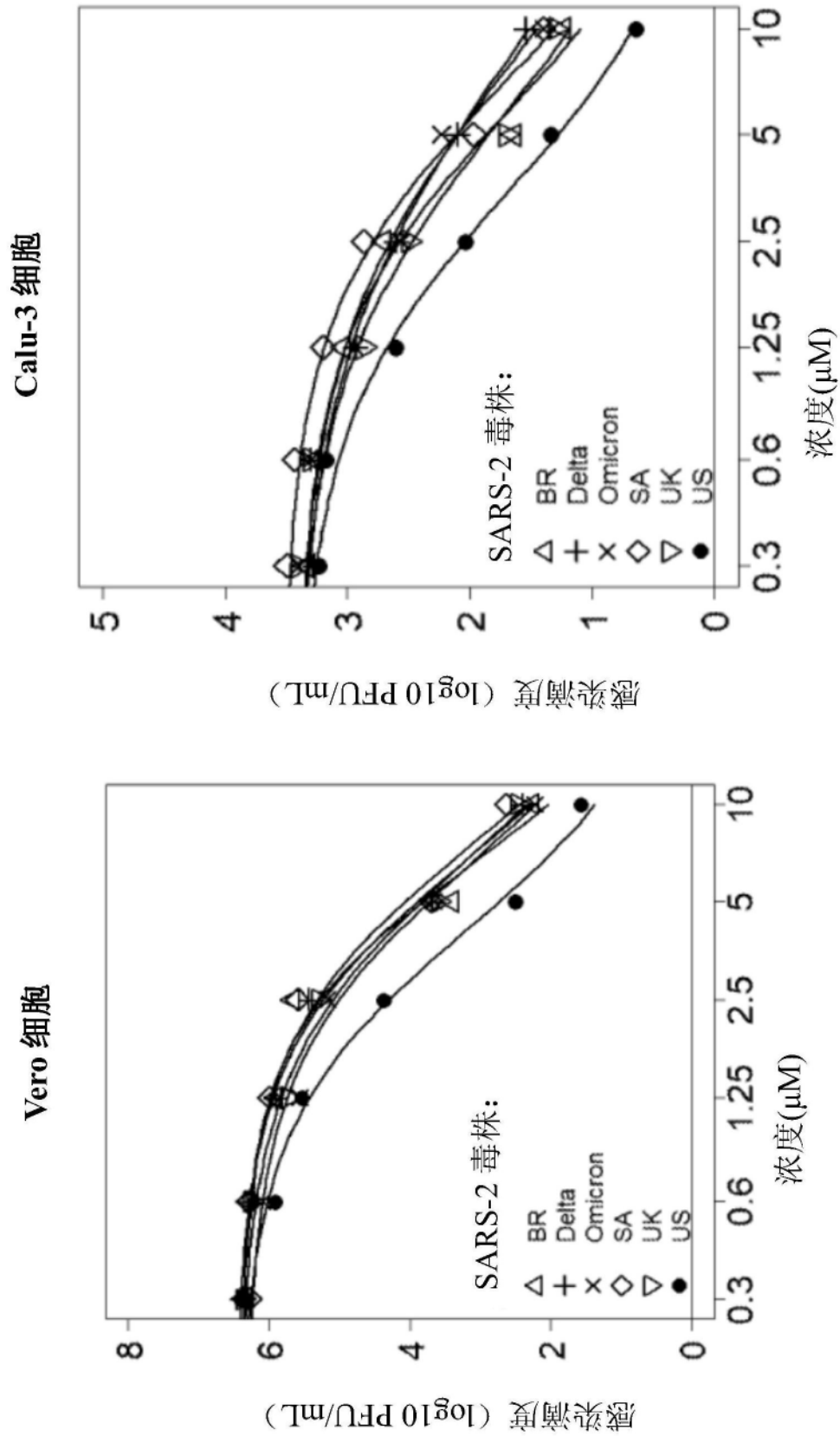


图3

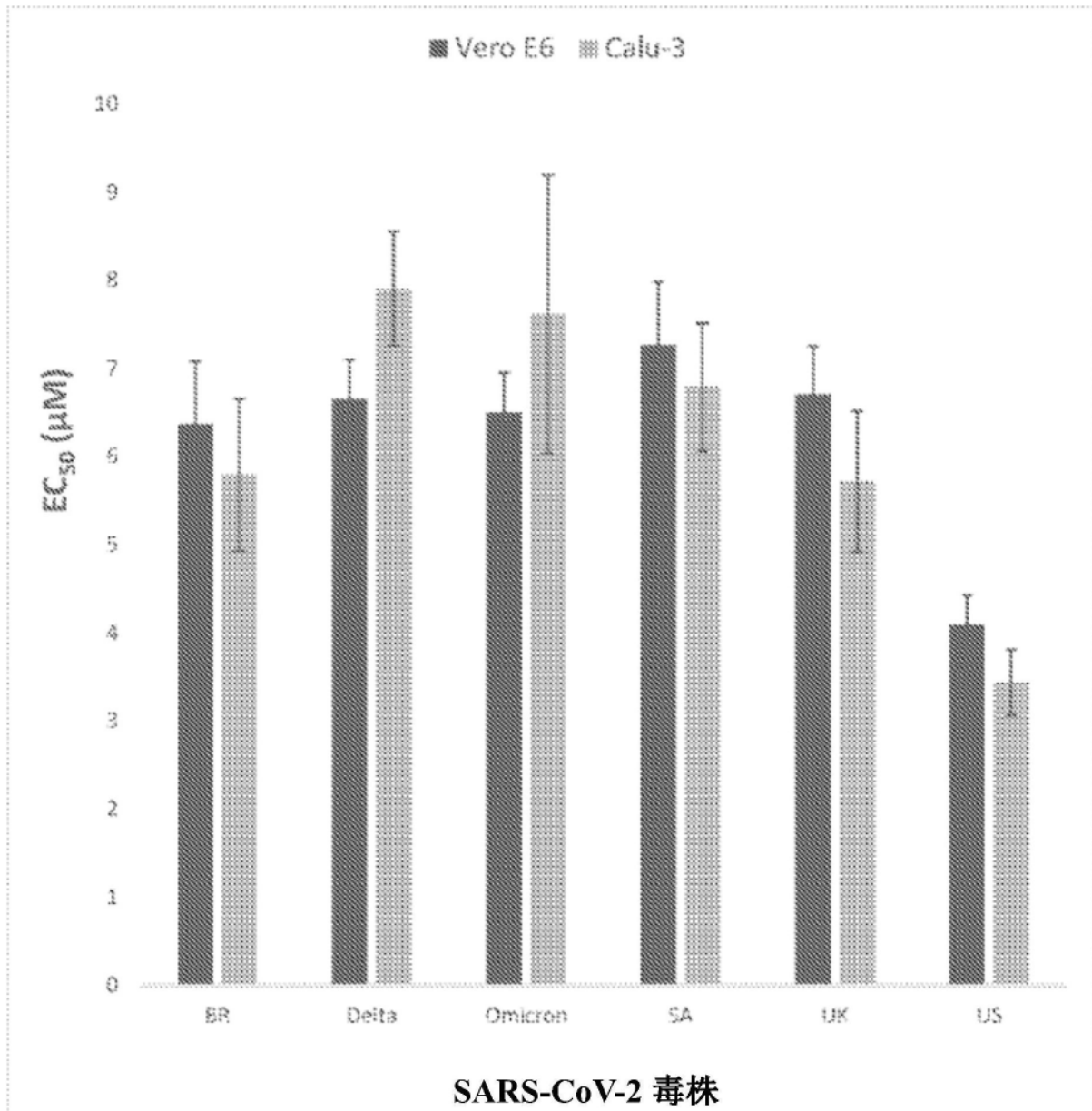


图4

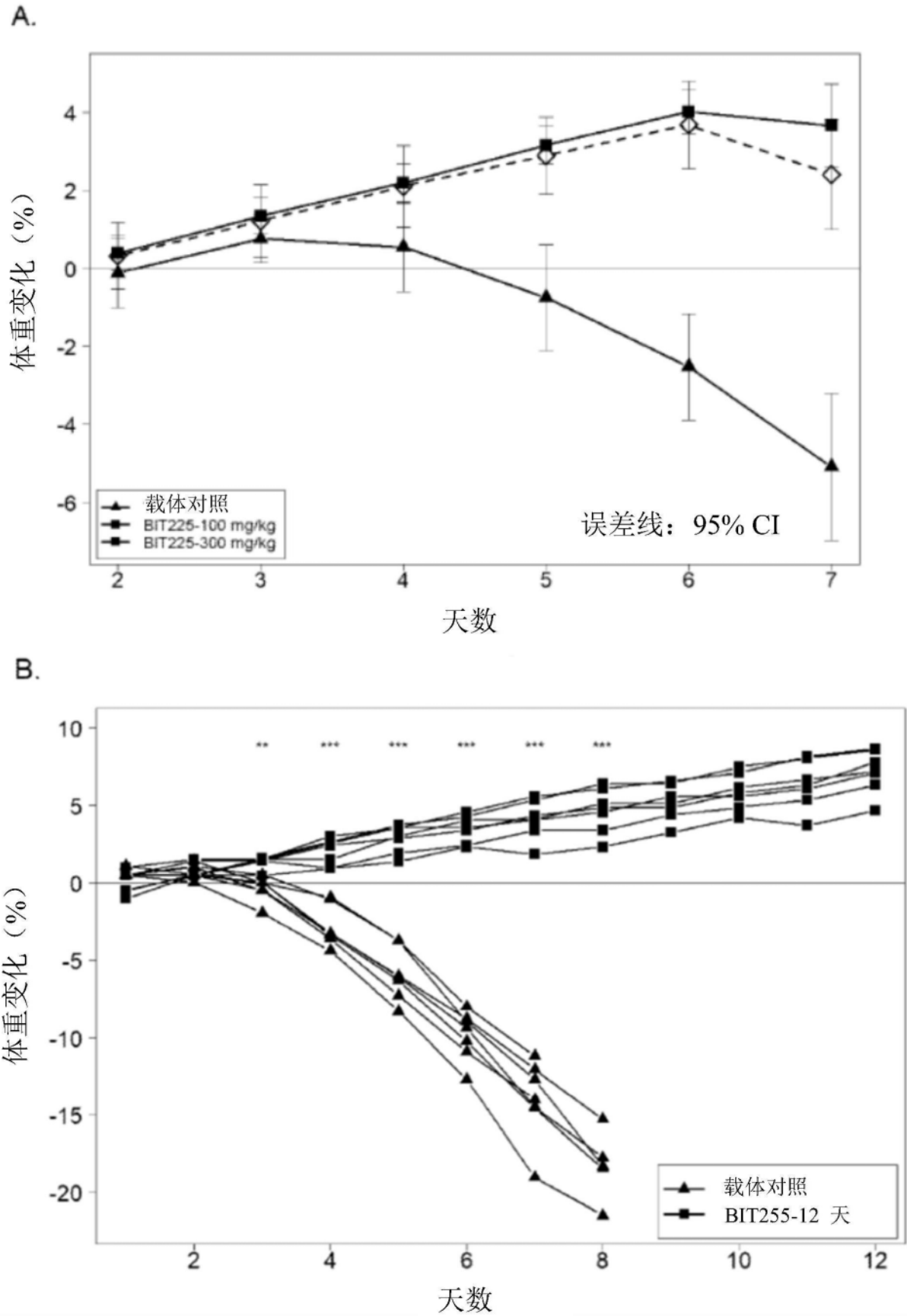


图5

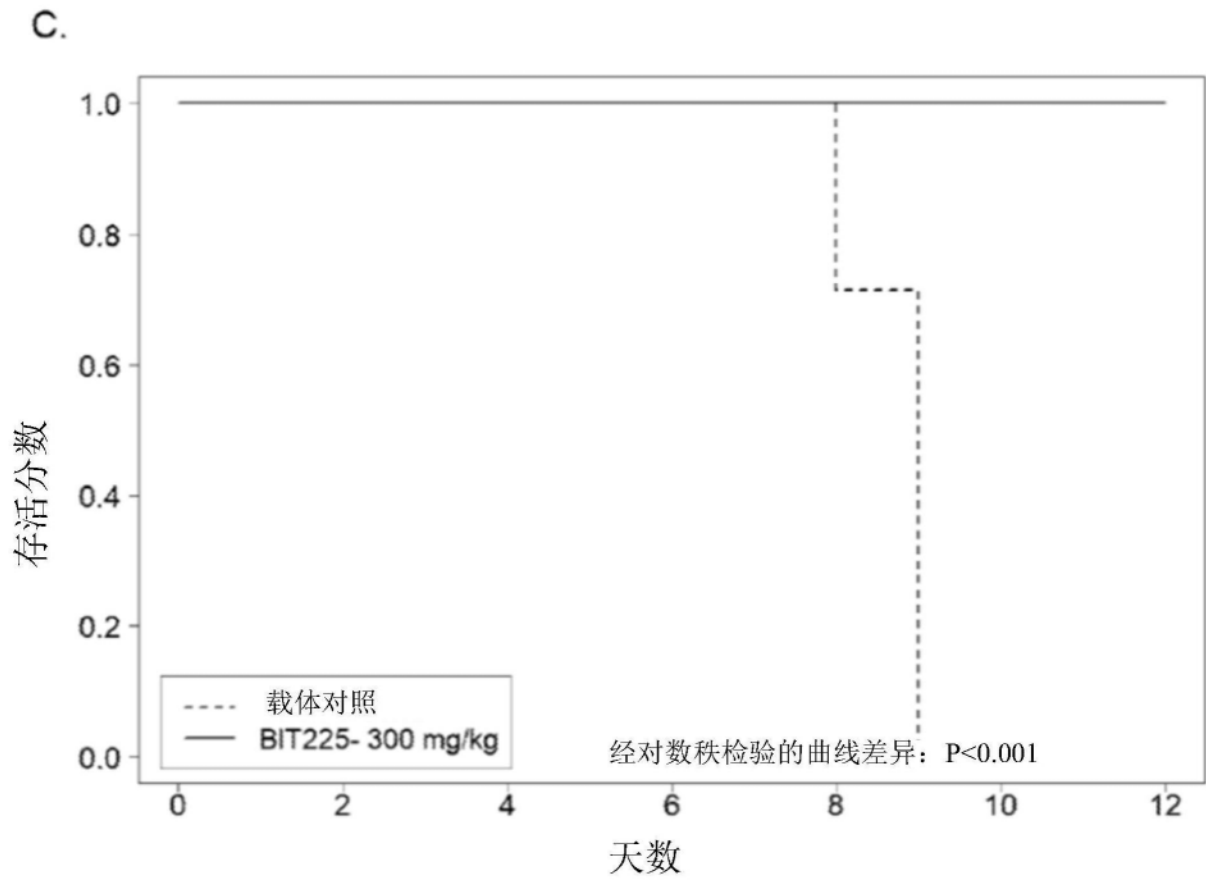


图5 (续)

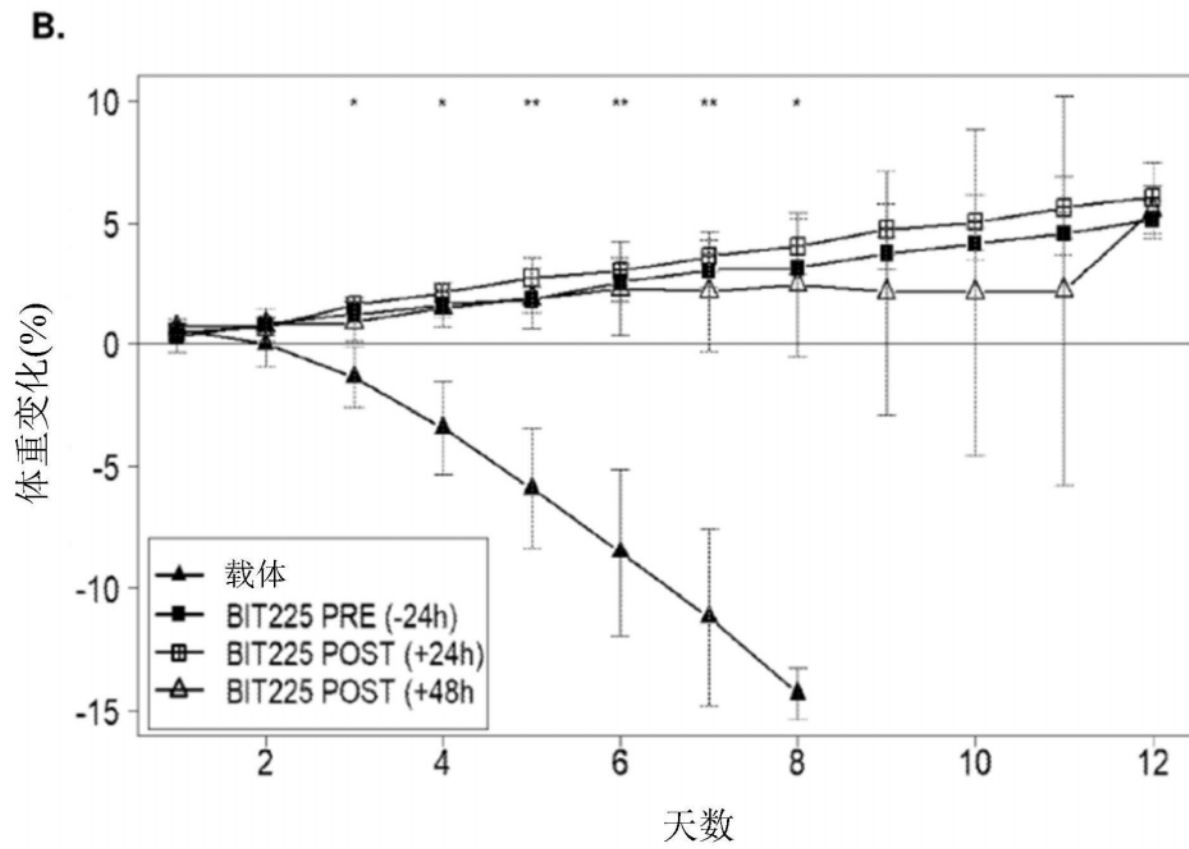
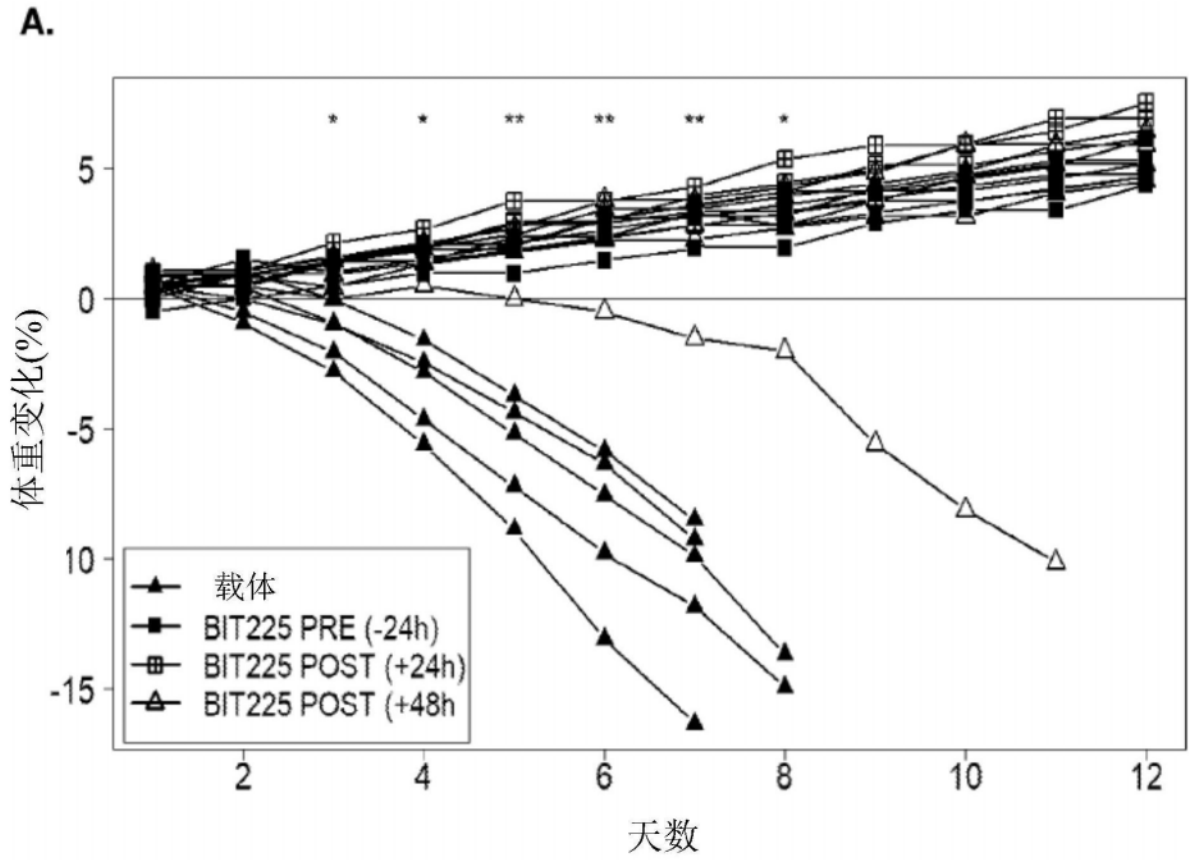


图6

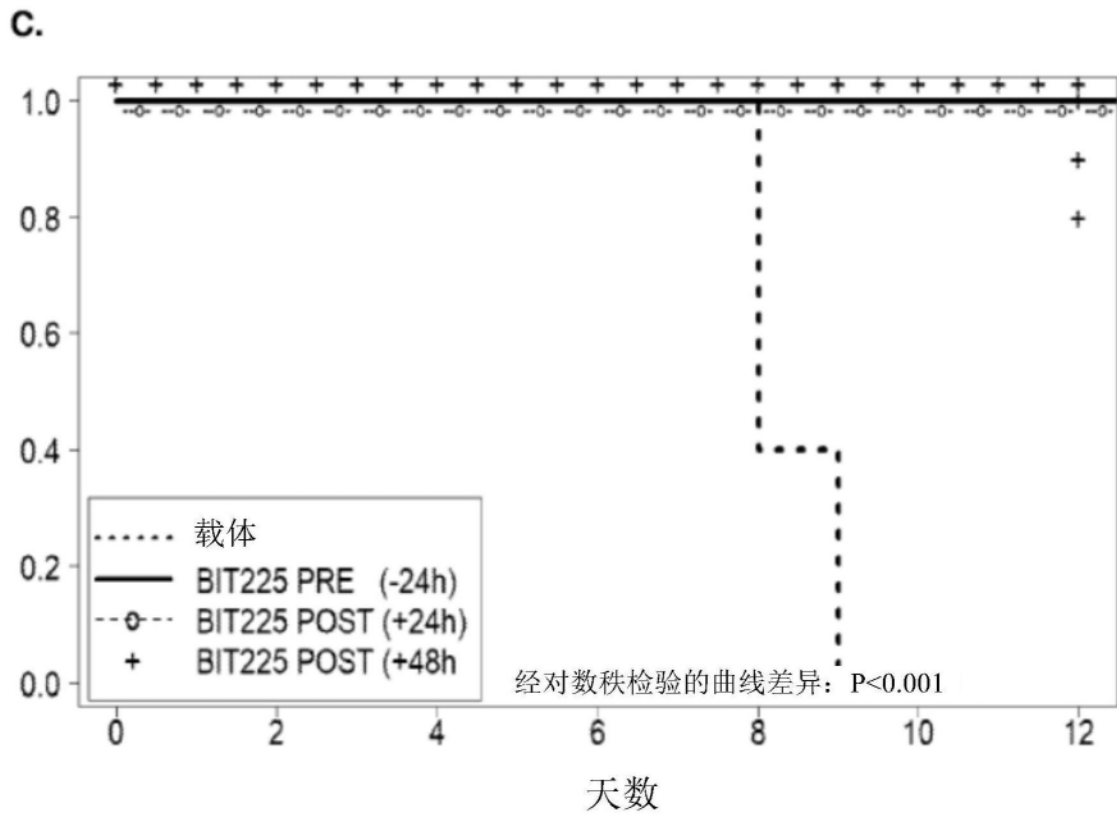


图6(续)

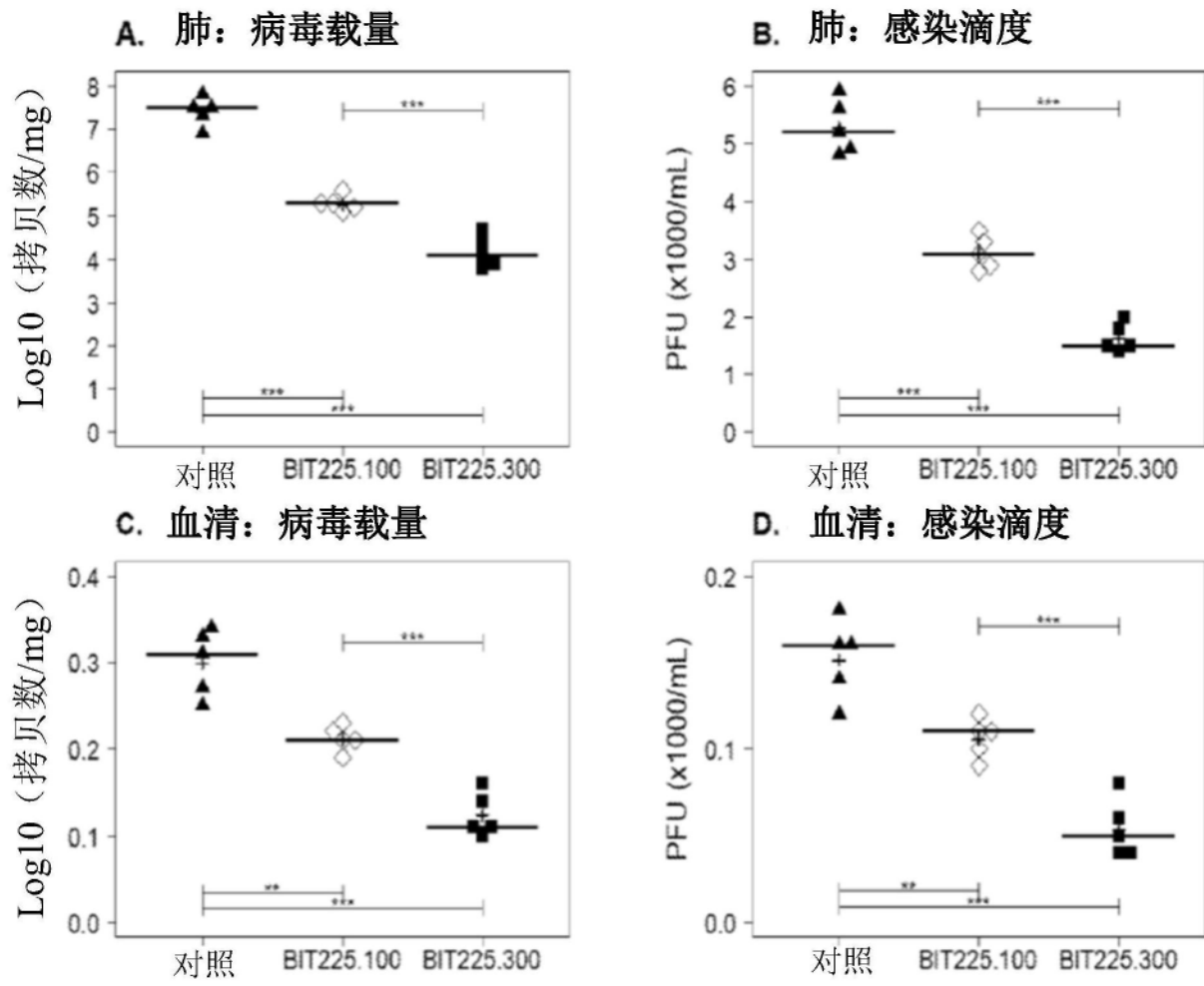


图7

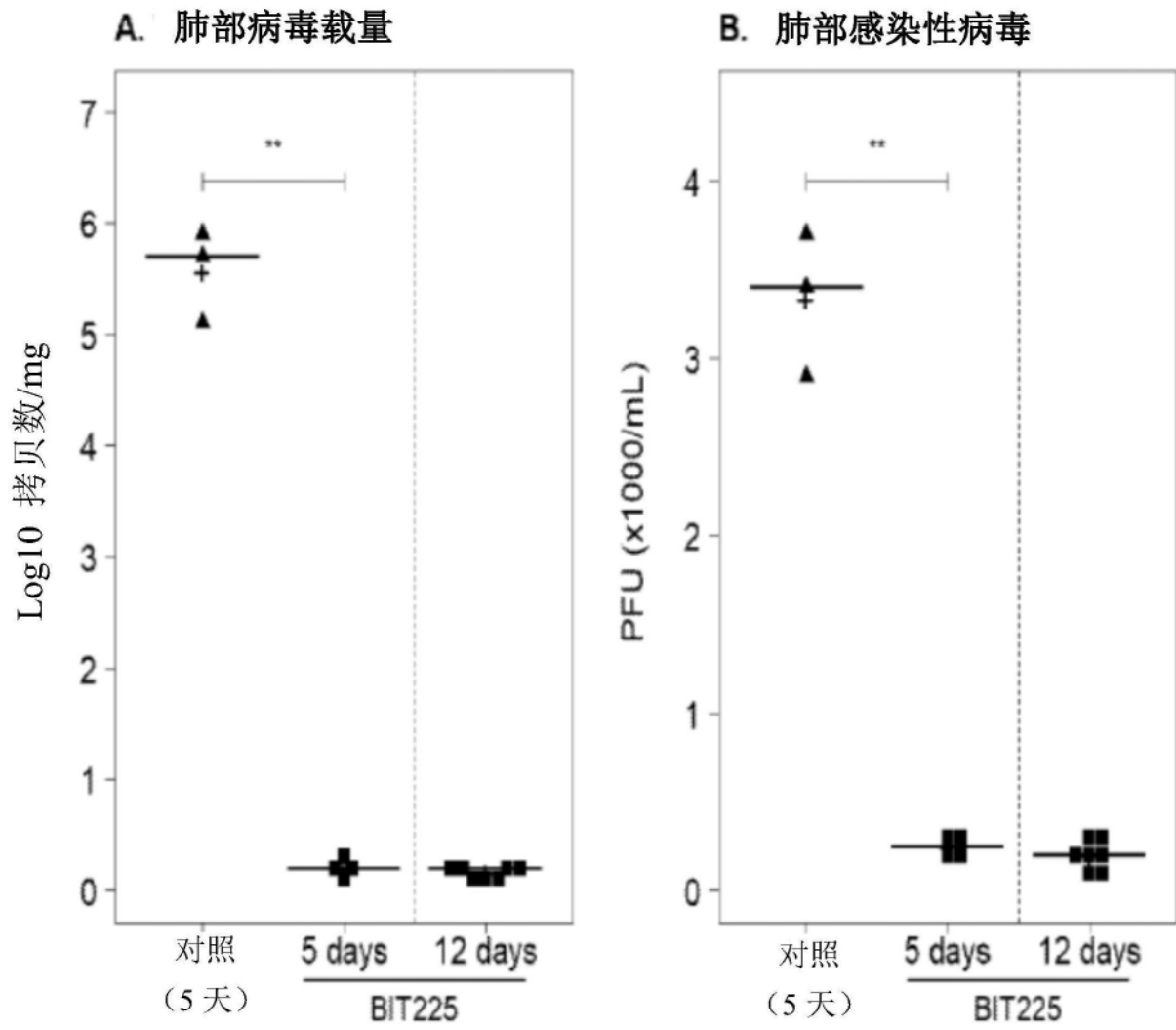


图8

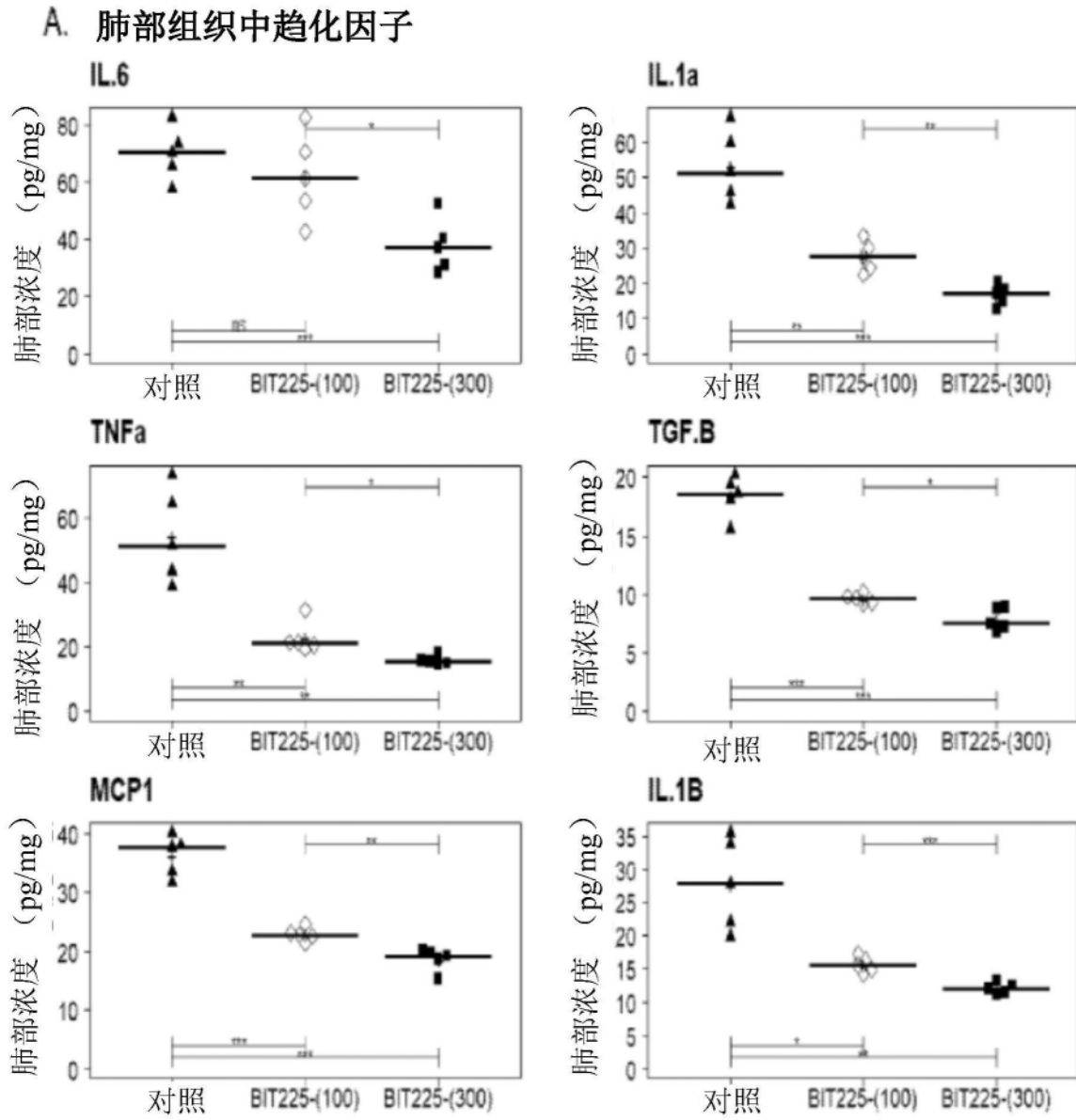


图9

B. 血清中趋化因子

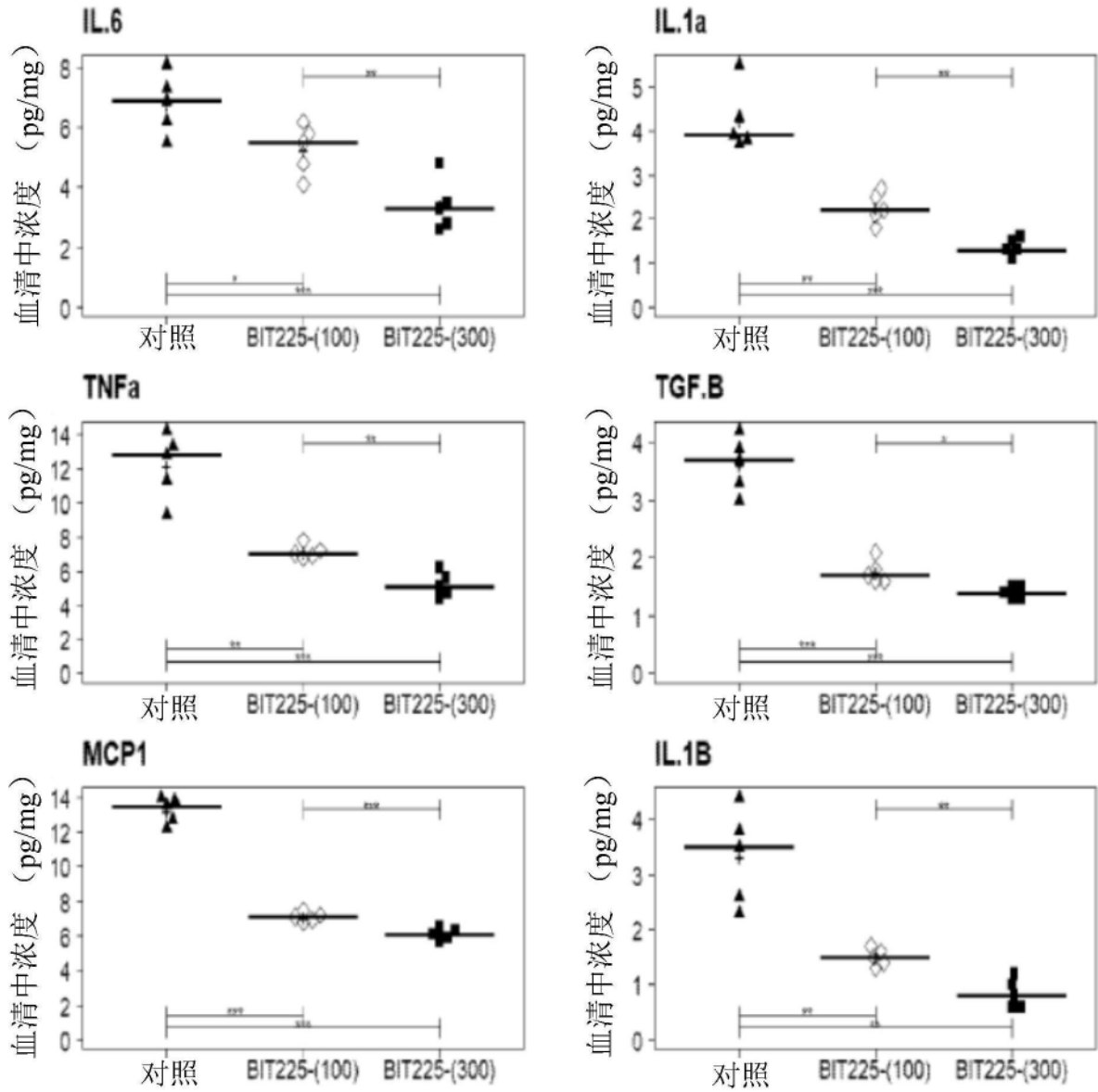


图9(续)