

# (12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织  
国际局

(43) 国际公布日  
2022年1月20日 (20.01.2022)



(10) 国际公布号  
**WO 2022/012624 A1**

(51) 国际专利分类号:

A61K 31/4196 (2006.01) A61P 31/16 (2006.01)  
A61P 31/14 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2021/106486

(22) 国际申请日: 2021年7月15日 (15.07.2021)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:  
202010692337.9 2020年7月17日 (17.07.2020) CN

(71) 申请人: 中国人民解放军军事科学院军事医学研究院(ACADEMY OF MILITARY MEDICAL SCIENCES) [CN/CN]; 中国北京市海淀区太平路27号, Beijing 100850 (CN)。

(72) 发明人: 钟武(ZHONG, Wu); 中国北京市海淀区太平路27号, Beijing 100850 (CN)。 周辛波(ZHOU, Xinbo); 中国北京市海淀区太平路27号, Beijing 100850 (CN)。 曹瑞源(CAO, Ruiyuan); 中国北京市海淀区太平路27号, Beijing 100850 (CN)。 肖典(XIAO, Dian); 中国北京市海淀区太平路27号, Beijing 100850 (CN)。 王曼丽(WANG, Manli); 中国北京市海淀区太平路27号, Beijing 100850 (CN)。 樊士勇(FAN, Shiyong); 中国北京市海淀区太平路27号, Beijing 100850 (CN)。 胡志红(HU, Zhihong); 中国北京市海淀区太平路27号, Beijing 100850 (CN)。 李松(LI, Song); 中国北京市海淀区太平路27号, Beijing 100850 (CN)。

(74) 代理人: 中国贸促会专利商标事务所有限公司(CCPIT PATENT AND TRADEMARK LAW OFFICE); 中国北京市复兴门内大街158号远洋大厦F10层, Beijing 100031 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG,

BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

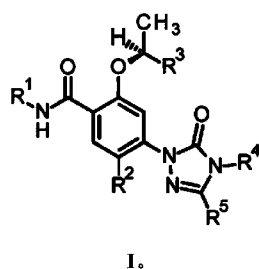
(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

— 包括国际检索报告(条约第21条(3))。

(54) Title: USE OF 2,4,5-TRISUBSTITUTED 1,2,4-TRIAZOLONE IN ANTIVIRAL

(54) 发明名称: 2,4,5-三取代的1,2,4-三唑酮在抗病毒中的应用



(57) Abstract: The present invention relates to the use of 2,4,5-trisubstituted 1,2,4-triazolone in an antiviral, and specifically to the use of the compound of formula I in the preparation of a drug, wherein the drug is used for preventing and/or treating diseases associated with viruses. In vitro experiments show that the compound can efficiently inhibit infections of multiple viruses, and same exhibits a lower cytotoxicity in some tests.

(57) 摘要: 涉及2,4,5-三取代的1,2,4-三唑酮在抗病毒中的应用, 具体涉及式I化合物在制备药物中的用途, 其中所述药物用于预防和/或治疗与病毒有关的疾病。体外实验显示所述化合物能高效抑制多种病毒的感染, 并且在一些试验中显示出较低的细胞毒性。



WO 2022/012624 A1

## 2, 4, 5-三取代的 1, 2, 4-三唑酮在抗病毒中的应用

本申请是以 CN 申请号为 202010692337.9，申请日为 2020 年 7 月 17 日的申请为基础，并主张其优先权，该 CN 申请的公开内容在此作为整体引入本申请中。

5

### 技术领域

本申请涉及化学药物领域，具体涉及 2,4,5-三取代的 1,2,4-三唑酮化合物在抗病毒中的应用。体外实验显示所述化合物能高效抑制各种病毒的感染，尤其地，化合物 BAY 2402234 对冠状病毒科病毒、流感病毒、肠道病毒、寨卡病毒、布尼亚病毒等具有高效抑制作用。

10

### 背景技术

病毒是只含一种核酸（DNA 或 RNA），须在活细胞内寄生并以复制方式增殖的非细胞型生物。其可通过多种途径侵入机体，并在易感的宿主细胞中进行增殖。

15

病毒感染人类可对人体产生轻重不一的损伤。例如，一些病毒引发的疾病几乎是致命的，如艾滋病毒、埃博拉病毒、狂犬病毒等等；另一些病毒如甲肝、乙肝等 5 种肝炎病毒引发的肝炎，柯萨奇病毒、流感病毒等引发的病毒性心肌炎等等会使人丧失劳动力甚至终生残疾。另外，其他病毒性疾病也给人类健康带来了严重的威胁，例如黄病毒科登革病毒和寨卡病毒、布尼亚病毒科的布尼亚病毒、小 RNA 病毒科的肠道病毒等。

20

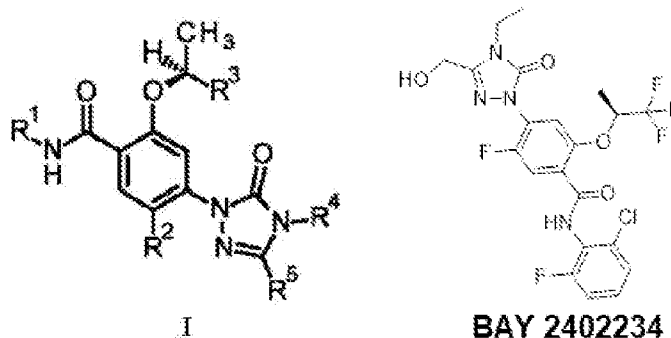
其中，冠状病毒（Coronavirus）是有包膜的不分节段的单股正链 RNA 病毒，具有广泛的动物宿主。来源于动物传染病的 SARS 冠状病毒和 MERS 冠状病毒可引起人类的死亡。

2020 年 2 月 11 日，国际病毒分类委员会（ICTV）命名了一种新型冠状病毒--严重急性呼吸综合征冠状病毒 2（severe acute respiratory syndrome coronavirus 2，SARS-CoV-2）。同日，世界卫生组织（WHO）宣布，由这一病毒导致的疾病的正式名称为 COVID-19。目前，针对新型冠状病毒感染，临床上以支持治疗为主，无特异抗病毒药物可用。研发能够有效抑制以上病毒尤其是能够抑制 SARS-CoV-2 的药品仍是十分紧迫和必要的。

25

30 2,4,5-三取代的 1,2,4-三唑酮化合物（下述式 I 化合物）为德国 Bayer 公司研发的

一种新型抗肿瘤药物，通过抑制肿瘤细胞增殖和诱导分化来发挥抗癌作用，对骨髓恶性肿瘤有较大的临床治疗潜力。其中，BAY 2402234 表现出较好的体内和体外抑制肿瘤的活性，目前正在进行适应症为骨髓性肿瘤的一期临床试验研究。

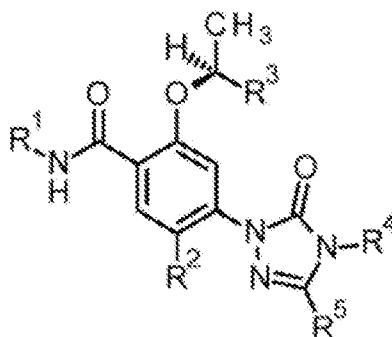


5

### 发明内容

发明人在研究中发现 BAY 2402234 能够有效抑制多种病毒，并且该化合物在一些试验中显示出较低的细胞毒性，为有效预防和/或治疗病毒引发的疾病或症状提供了新的途径和选择。

10 在第一个方面，本文提供式 I 化合物、或其 N-氧化物、互变异构体、几何异构体、溶剂合物、水合物、药学上可接受的盐、或所述互变异构体或 N-氧化物的盐在制备药物中的用途，其中所述药物用于预防和/或治疗与病毒有关的疾病，式 I 化合物结构如下所示：



15

I

其中：

R<sup>1</sup> 代表选自以下的基团：

3-戊基、2,2-二甲基丙基、4-庚基、4-氟苯基环丙基、环戊基、环己基、环庚基、环戊基甲基、环己基甲基、1-环己基乙基、1-羟基丙-2-基、2-羟基丙基、1-羟基丁-2-基、1-氰基丁-2-基、1-苯基丁-2-基、1-氨基-2-丙基、1-氨基-2-丁基、1-氨基-1-氧代丁-2-基、茚满-2-基、5-至 6-元杂环烷基，其选自四氢呋喃-3-基、四氢-2H-吡喃-4-基和哌啶-4-基，并且其

任选被甲基取代一次或两次，

苯基，其任选被取代一次、两次或三次，每个取代基独立地选自氟原子或氯原子或选自以下的基团：甲基、乙基、丙基、异丙基、二氟甲基、三氟甲基、甲氧基、-O-C(=O)-1,1-二甲基乙基、羟基、-C(=O)OCH<sub>3</sub>、-C(=O)NH-环丙基、氨基、甲基氨基、氨基甲基、-S-CH<sub>3</sub>、  
5 -S(=O)<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> 和-S(=O)(NH)CH<sub>3</sub>，和，

单环杂芳基，其选自噁唑-2-基、吡唑-3-基、吡唑-5-基、吡啶-2-基、吡啶-3-基、吡啶-4-基、嘧啶-2-基、嘧啶-4-基、喹啉-5-基、吲唑-5-基，并且其任选被取代一次或两次，每个取代基独立地选自甲基和甲氧基，

R<sup>2</sup> 代表氢原子或氟或氯原子，

10 R<sup>3</sup> 代表选自以下的基团：

丙基、2-甲基丙基、3-戊基、环丙基甲基、环丙基、环丙基甲基，环丁基、环戊基、环己基、二氟甲基、三氟甲基、1,1-二氟乙基、丙-2-烯-1-基、2-甲基-丙-1-烯-1-基，N,N-二甲基氨基乙基和苯基，

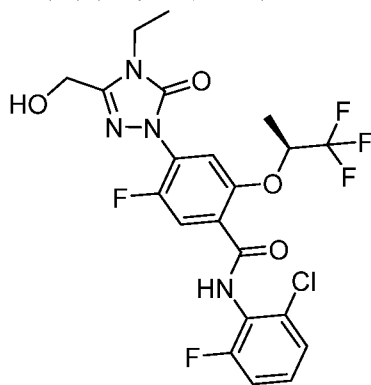
R<sup>4</sup> 代表选自以下的基团：

15 甲基、乙基、丙基、异丙基、2-丁基、丙-2-烯-1-基、环丙基甲基、苜基、环丙基、环丁基、环戊基和 2-羟基乙基，

R<sup>5</sup> 代表氯原子或选自以下的基团：

20 甲基、乙基、丙基、异丙基、2-丁基、异丁基、叔丁基、环丙基、环丁基、环戊基、三氟甲基、羟基甲基、1-羟基乙基、2-羟基丙-2-基、1-氯乙基、1-羟基-2,2,2-三氟乙基、1-甲氧基乙基、甲氧基、异丙氧基、甲基硫基、氨基甲基、(甲基氨基)甲基、(二甲基氨基)甲基、1-氨基乙基、2-氨基乙基、甲基氨基和乙基(甲基)氨基、-C(=O)OH、-C(=O)OCH<sub>3</sub>、-C(=O)NH<sub>2</sub>、-C(=O)NHCH<sub>3</sub>、-C(=O)NH 环丙基、-C(=O)N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 和-S(=O)(=NH)CH<sub>3</sub>

在一些实施方案中，所述化合物为式 II 化合物，



II。

在一些实施方案中，所述病毒为 RNA 病毒。

在一些实施方案中，所述病毒为冠状病毒科病毒、正粘病毒科病毒、黄病毒科病毒、布尼亚病毒科病毒、小 RNA 病毒科病毒、沙粒病毒、丝状病毒科病毒或西方马脑炎病毒。

5 在一些实施方案中，所述病毒为冠状病毒科病毒。

在一些实施方案中，所述冠状病毒科病毒选自 HCoV-229E、HCoV-OC43、HCoV-NL63、HCoV-HKU1、SARS-CoV、MERS-CoV 和 SARS-CoV-2。

在一些实施方案中，所述病毒为 SARS-CoV-2。

在一些实施方案中，所述病毒为正粘病毒科病毒。

10 在一些实施方案中，所述病毒为流感病毒。

在一些实施方案中，所述正粘病毒科病毒为流感病毒。

在一些实施方案中，所述流感病毒为甲型流感病毒（例如 H1N1、H5N1、H7N1、H7N2、H7N3、H7N7、H7N9、H9N2 或 H10N8 亚型）、乙型流感病毒或丙型流感病毒。

15 在一些实施方案中，所述病毒为黄病毒科病毒。

在一些实施方案中，所述黄病毒科病毒选自寨卡病毒、登革病毒、西尼罗病毒、黄热病病毒和 HCV 病毒。

在一些实施方案中，所述病毒为布尼亚病毒科病毒。

在一些实施方案中，所述布尼亚病毒科病毒为布尼亚病毒或白蛉病毒。

20 在一些实施方案中，所述病毒为小 RNA 病毒科病毒。

在一些实施方案中，所述小 RNA 病毒为肠道病毒或口蹄疫病毒。

在一些实施方案中，所述病毒为丝状病毒科病毒。

在一些实施方案中，所述丝状病毒科病毒选自埃博拉病毒、马尔堡病毒和库瓦病毒。

25 在一些实施方案中，所述药物用于预防和/或治疗由 SARS-CoV、MERS-CoV、SARS-CoV-2、流感病毒、寨卡病毒、登革病毒、布尼亚病毒或肠道病毒引起的疾病。在一些优选的实施方案中，所述药物用于预防和/或治疗由 SARS-CoV、MERS-CoV 或 SARS-CoV-2 引起的疾病，例如 SARS、MERS 或 COVID-19。

30 BAY 2402234 对冠状病毒特别是 SARS-CoV-2 有很高的抗病毒活性，可用于其感染引起相关疾病如单纯性感染如发热、咳嗽和咽痛等、肺炎、急性或严重急性呼吸道

感染、低氧性呼吸衰竭及急性呼吸窘迫综合征、脓毒症和脓毒性休克等的救治。发明人通过创造性的研究发现 BAY 2402234 具有抑制 SARS-CoV-2 复制方面的功能,在治疗 SARS-CoV-2 引起的疾病方面具有很好的治疗效果。因此,在一些特别优选的实施方案中,所述药物用于预防和/或治疗由 SARS-CoV-2 引起的疾病,例如 COVID-19。

5 在一些实施方案中,所述药物为人用。

在一些实施方案中,所述药物为兽用。

在一些实施方案中,所述药物中还包含药学上可接受的载体或辅料。

在一些实施方案中,所述化合物作为唯一的药物活性成分。

10 在一些实施方案中,所述化合物可与其它药物活性成分联用。在一些实施方案中,所述化合物与其它药物活性成分在同一制剂单元中。在一些实施方案中,所述化合物与其它药物活性成分在不同的制剂单元中。在一些实施方案中,所述化合物与其它药物活性成分同时、分别或依次给药。在一些实施方案中,所述其它药物活性成分为抗病毒药物,例如,金刚烷胺、金刚乙胺、恩夫韦地、马拉韦罗、阿昔洛韦、更昔洛韦、伐昔洛韦、泛昔洛韦、膦甲酸钠、拉米夫定、齐多夫定、恩曲他滨、替诺福韦、阿德福韦酯、依法韦仑、奈韦拉平、沙奎那韦、奥司他韦、扎那米韦、利巴韦林或干扰素等。

15 在一些实施方案中,所述药物为固体制剂或液体制剂。在一些实施方案中,所述药物为片剂、注射剂或喷剂。在一些实施方案中,所述药物为片剂或注射剂。

20 在第二个方面,本文还涉及如第一方面所定义的化合物、或其 N-氧化物、互变异构体、几何异构体、溶剂合物、水合物、药学上可接受的盐、或所述互变异构体或 N-氧化物的盐在制备药物中的用途,所述药物用于抑制病毒在细胞(例如哺乳动物细胞)中复制或繁殖。

在一些实施方案中,所述哺乳动物是人,狗或猪。

在一些实施方案中,所述药物为人用或兽用。

25 在一些实施方案中,所述药物中还包含药学上可接受的载体或辅料。

在一些实施方案中,所述化合物作为唯一的药物活性成分或与其它药物活性成分联用(例如,所述药物为复方制剂)。

30 在一些实施方案中,所述其它药物活性成分为抗病毒药物,例如金刚烷胺、金刚乙胺、恩夫韦地、马拉韦罗、阿昔洛韦、更昔洛韦、伐昔洛韦、泛昔洛韦、膦甲酸钠、拉米夫定、齐多夫定、恩曲他滨、替诺福韦、阿德福韦酯、依法韦仑、奈韦拉平、沙奎那韦、

奥司他韦、扎那米韦、利巴韦林和干扰素中的一种或多种。

在一些实施方案中，所述药物为固体制剂或液体制剂。

在一些实施方案中，所述药物为片剂、注射剂或喷剂；优选为片剂或注射剂。

5 在第三个方面，本文还涉及如第一方面所定义的化合物、或其 N-氧化物、互变异构体、几何异构体、溶剂合物、水合物、药学上可接受的盐、或所述互变异构体或 N-氧化物的盐在制备病毒抑制剂中的用途。

在一些实施方案中，所述抑制剂用于抑制病毒在细胞（例如哺乳动物细胞）中复制或繁殖。

10 在一些实施方案中，所述宿主为哺乳动物。

在一些实施方案中，所述哺乳动物是人，狗或猪。

在第四个方面，本文还涉及一种预防和/或治疗与病毒有关的疾病的方法，其包括向有此需要的受试者施用有效量的第一方面所定义的化合物、或其 N-氧化物、互变异  
15 构体、几何异构体、溶剂合物、水合物、药学上可接受的盐、或所述互变异构体或 N-氧化物的盐的步骤。

在一些实施方案中，所述受试者为哺乳动物，例如人。

在一些实施方案中，所述化合物、或其 N-氧化物、互变异构体、几何异构体、溶剂  
20 合物、水合物、药学上可接受的盐、或所述互变异构体或 N-氧化物的盐单独施用，或与其它药物活性成分联用，例如同时、分别或依次给药。

在一些实施方案中，所述其它药物活性成分为抗病毒药物，例如金刚烷胺、金刚乙  
胺、恩夫韦地、马拉韦罗、阿昔洛韦、更昔洛韦、伐昔洛韦、泛昔洛韦、膦甲酸钠、拉米  
夫定、齐多夫定、恩曲他滨、替诺福韦、阿德福韦酯、依法韦仑、奈韦拉平、沙奎那韦、  
奥司他韦、扎那米韦、利巴韦林和干扰素中的一种或多种。

25 在第五个方面，本文还涉及一种抑制病毒在细胞（例如哺乳动物细胞）中复制或繁殖的方法，其包括向受试者或细胞施用有效量的第一方面中所定义的化合物、或其 N-氧化物、互变异构体、几何异构体、溶剂合物、水合物、药学上可接受的盐、或所述互变异构体或 N-氧化物的盐的步骤。

30 在一些实施方案中，所述受试者为哺乳动物，例如人。

在一些实施方案中，所述哺乳动物细胞为来自人的细胞。

在一些实施方案中，所述化合物、或其 N-氧化物、互变异构体、几何异构体、溶剂合物、水合物、药学上可接受的盐、或所述互变异构体或 N-氧化物的盐单独施用，或与其它药物活性成分联用，例如同时、分别或依次给药。

5 在一些实施方案中，所述其它药物活性成分为抗病毒药物，例如金刚烷胺、金刚乙胺、恩夫韦地、马拉韦罗、阿昔洛韦、更昔洛韦、伐昔洛韦、泛昔洛韦、膦甲酸钠、拉米夫定、齐多夫定、恩曲他滨、替诺福韦、阿德福韦酯、依法韦仑、奈韦拉平、沙奎那韦、奥司他韦、扎那米韦、利巴韦林和干扰素中的一种或多种。

10 本文第二方面至第五任一方面所述病毒以及疾病如第一方面所定义。

在一些实施方案中，所述病毒为冠状病毒科病毒，例如 HCoV-229E、HCoV-OC43、HCoV-NL63、HCoV-HKU1、SARS-CoV、MERS-CoV 或 SARS-CoV-2，特别是 SARS-CoV-2。

15 在一些实施方案中，所述疾病为 SARS-CoV-2 引起的疾病，例如单纯性感染（如发热、咳嗽和/或咽痛）、肺炎、急性或严重急性呼吸道感染、低氧性呼吸衰竭、急性呼吸窘迫综合征、脓毒症或脓毒性休克，特别是 COVID-19。

在本申请中，除非另有说明，否则本文中使用的科学和技术名词具有本领域技术人员所通常理解的含义。并且，本文中所用的细胞培养、分子遗传学、核酸化学、免疫学实验室操作步骤均为相应领域内广泛使用的常规步骤。同时，为了更好地理解本公开，下面提供相关术语的定义和解释。

20 在本文中，所用术语“药学上可接受的盐”包括式 I 化合物的无机或有机酸盐，以及无机或有机碱盐，例如钠盐、钾盐、钙盐、锂盐、葡甲胺盐、盐酸盐，氢溴酸盐，氢碘酸盐，硝酸盐，硫酸盐，硫酸氢盐，磷酸盐，磷酸氢盐，乙酸盐，丙酸盐，丁酸盐，草酸盐，三甲基乙酸盐，己二酸盐，藻酸盐，乳酸盐，柠檬酸盐，酒石酸盐，琥珀酸盐，马来酸盐，富马酸盐，苦味酸盐，天冬氨酸盐，葡糖酸盐，苯甲酸盐，甲磺酸盐，乙磺酸盐，苯磺酸盐，对甲苯磺酸盐或双羟萘酸盐等。

30 在本文中，术语“几何异构体”是指在有双键或环状结构的分子中，由于分子中与双键或环相连接的原子或原子团的自由旋转受阻碍，存在不同的空间排列而产生的立体异构体，例如顺式/反式异构体。

本文中所述式 I 化合物可以溶剂合物（优选水合物）的形式存在，其包含作为所述化合物晶格的结构要素的极性溶剂，特别是水、甲醇或乙醇。极性溶剂特别是水的量可以化学计量比或非化学计量比存在。应理解的是，在治疗本申请所述的疾病或感染中使用的式 I 化合物的任何溶剂合物尽管可能提供不同的性质(包括药代动力学性质)，但是一旦吸收至受试者中，会得到式 I 化合物，使得式 I 化合物的使用分别涵盖式 I 化合物的任何溶剂合物的使用。

本领域技术人员应当理解，由于氮需要可用的孤对电子来氧化成氧化物，因此并非所有的含氮杂环都能够形成 N-氧化物；本领域技术人员会识别能够形成 N-氧化物的含氮杂环。本领域技术人员还会认识到叔胺能够形成 N-氧化物。用于制备杂环和叔胺的 N-氧化物的合成方法是本领域技术人员熟知的，包括用过氧酸如过氧乙酸和间氯过氧苯甲酸 (MCPBA)、过氧化氢、烷基过氧化氢如叔丁基过氧化氢、过硼酸钠和双环氧乙烷(dioxirane) 如二甲基双环氧乙烷来氧化杂环和叔胺。这些用于制备 N-氧化物的方法已在文献中得到广泛描述和综述，参见例如：T. L. Gilchrist, *Comprehensive Organic Synthesis*, vol. 7, pp 748-750; A. R. Katritzky 和 A. J. Boulton, Eds., Academic Press; 以及 G. W. H. Cheeseman 和 E. S. G. Werstiuk, *Advances in Heterocyclic Chemistry*, vol. 22, pp 390-392, A. R. Katritzky 和 A. J. Boulton, Eds., Academic Press。

所述式 I 化合物可以两种或更多种处于快速平衡的结构不同的形式的混合物(通常称作互变异构体)存在。互变异构体的代表性实例包括酮-烯醇互变异构体、苯酚-酮互变异构体、亚硝基-肟互变异构体、亚胺-烯胺互变异构体等。要理解，本申请的范围涵盖所有这样的以任意比例(例如 60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%)的异构体或其混合物。

在本文中，术语“治疗有效量”或“预防有效量”是指在合理的医学判断范围内，足以治疗或预防患者疾病但足够低地避免严重副作用（在合理的利益/风险比）的量。化合物的治疗有效量将根据所选择的具体化合物（例如考虑化合物的效力、有效性和半衰期）、所选择的给药途径、所治疗的疾病、所治疗的疾病的严重性、所治疗的患者的年龄、大小、体重和身体疾病、所治疗的患者的医疗史、治疗持续时间、并行疗法的性质、所需的治疗效果等因素发生变化，但仍可以由本领域技术人员常规确定。

另外需要指出，所述式 I 所示化合物、或其几何异构体、药学上可接受的盐、溶剂合物或水合物针对不同患者的特定使用剂量和使用方法决定于诸多因素，包括患者的年龄，体重，性别，自然健康状况，营养状况，药物的活性强度，服用时间，代谢速率，病症的

严重程度以及诊治医师的主观判断。这里优选使用剂量介于0.001-1000mg/kg体重/天。

### 附图说明

5 此处所说明的附图用来提供对本发明的进一步理解，构成本申请的一部分，本文示意性实施例及其说明用于解释本发明，并不构成对本发明的不当限定。在附图中：

图 1 显示 BAY 2402234 对 SARS-CoV-2 感染的 vero E6 细胞上病毒核酸载量的影响；其中 (a) 显示 BAY 2402234 在细胞感染 SARS-CoV-2 24h 后能够抑制细胞上的病毒 RNA 载量，且抑制活性呈剂量依赖性。左侧纵坐标为依据样品中病毒 RNA 的拷贝数计算出的百分比抑制率（对应图中的红色圆点及其拟合线），右侧纵坐标为依据细胞活力计算出的百分比毒性（对应图中的蓝色方块及其拟合线），横坐标为药物浓度；(b) 显示 BAY 2402234 在细胞感染 SARS-CoV-2 48h 后能够抑制细胞上的病毒 RNA 载量，且抑制活性呈剂量依赖性。左侧纵坐标为依据样品中病毒 RNA 的拷贝数计算出的百分比抑制率（对应图中的红色圆点及其拟合线），右侧纵坐标为依据细胞活力计算出的百分比毒性（对应图中的蓝色方块及其拟合线），横坐标为药物浓度。

15 图 2 显示 BAY 2402234 细胞毒性及体外抗流感病毒活性评价。

### 具体实施方式

下面将结合实施例中的附图，对本发明的技术方案进行清楚、完整地描述，显然，所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例，而不是全部的实施例。以下对至少一个示例性实施例的描述实际上仅仅是说明性的，绝不作为对本发明及其应用或使用的任何限制。基于本发明中的实施例，本领域普通技术人员在没有作出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例，都属于本发明保护的范围。

#### 实施例1 BAY 2402234降低SARS-CoV-2感染的细胞病毒核酸载量实验

##### 25 (1)药物处理感染病毒的细胞

将 Vero E6 细胞（购自 ATCC，货号 1586）接种至 24 孔板，培养 24h 后进行病毒感染。具体的，用 2%细胞维持液（配方为：将 FBS（购自 Gibco 公司，货号 16000044）按照 2%的体积比加入 MEM（购自 Gibco 公司，货号 10370021），即为 2%细胞维持液）将 SARS-CoV-2（2019-nCoV）病毒（nCoV-2019BetaCoV/Wuhan/WIV04/2019 株，由中国科学院武汉病毒研究所保存）稀释成相应浓度，然后加入 24 孔板中使每孔含有病毒量

为 100TCID<sub>50</sub>。接下来再用 2%细胞维持液将 BAY 2402234（购自 MCE 公司，货号 HY-112645）分别稀释成相应浓度，加入到对应的孔中，使药物最终浓度分别为 100μM、33 μM、11μM、3.7μM、1.23μM、0.41μM、0.14μM，然后放 37℃、5% CO<sub>2</sub> 孵箱继续培养 48h，细胞对照组只加不含有任何受试药物的 2%细胞维持液。

## 5 (2)RNA 提取

RNA 提取试剂盒购自 Qiagen 公司，货号 74106。下述 RNA 提取步骤中所涉及的耗材（离心柱、无 RNA 酶的 2ml 收集管等）及试剂（RLT、RW1、RPE、无 RNA 酶水等）均为试剂盒的组成部分。下述提取步骤均为试剂盒说明书所推荐的步骤。

1)取受试培养板的上清液 100μL，加入无核酸酶 EP 管中，然后每孔加入 350μL Buffer RLT，用移液枪吹吸混匀使其充分裂解后，离心取上清；

2)向 1) 中所得上清液加入等体积的 70%乙醇，混匀；

3)将上述 2) 中所得混合液转入无 RNA 酶的离心柱中，12000 rpm 离心 15s，弃废液；

4)加入 700μL Buffer RW1，12000 rpm 离心 15s 清洗离心柱，弃废液；

5)加入 500μL Buffer RPE，12000 rpm 离心 15s 清洗离心柱，弃废液；

15 6)加入 500μL Buffer RPE，12000 rpm 离心 2min 清洗离心柱，弃废液；

7)换新的无 RNA 酶的 2ml 收集管，12000 rpm 离心 1min，干燥离心柱，然后离心柱整体转移至步骤 8) 的 1.5ml 收集管中；

8)换上新的 1.5ml 收集管，放入步骤 7) 中干燥后的离心柱，并向离心柱中加入 30μl 不含 RNA 酶的水，12000 rpm 离心 2min，洗脱液即含有相应的 RNA，加入 RNA 酶抑制剂（购自 NEB 公司，货号 M0314L），用 Nano Drop（购自 Thermo scientific，型号 Nano Drop One）检测各 RNA 浓度。

## (3) RNA 反转录

实验采用 TaKaRa 公司生产的反转录试剂盒（PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser，货号 RR047Q）进行 RNA 反转录，步骤如下。

25 ①gDNA 去除：收集各实验组 RNA 样品，分别取 1 μg 进行反转录。首先，向各实验组 RNA 中加入 2μl 5× gDNA Eraser Buffer，用 RNase Free 水补足反应体系至 10μl，充分混匀，42℃水浴 2 min 去除样品中可能存在的 g DNA；

②逆转录：向①所得样品中加入适量的酶和引物 Mix 及反应缓冲液，用 RNase Free 水补足体积至 20 μl，37℃水浴反应 15 min，之后投入 85℃水中 5 秒，即可转录得到  
30 cDNA。

#### (4) Real-time PCR

采用荧光定量 PCR 检测原病毒液每毫升所含拷贝数。

采用 TB Green Premix (Takara, Cat#RR820A)混好反应体系, 在 StepOne Plus Real-time PCR 仪 (品牌: ABI)进行扩增反应和读数。计算原病毒液每毫升所含拷贝数。

5 步骤如下:

①首先建立标准品: 将质粒 pMT-RBD (质粒由中国科学院武汉病毒研究所保存) 稀释成  $5 \times 10^8$  copies/ $\mu\text{L}$ ,  $5 \times 10^7$  copies/ $\mu\text{L}$ ,  $5 \times 10^6$  copies/ $\mu\text{L}$ ,  $5 \times 10^5$  copies/ $\mu\text{L}$ ,  $5 \times 10^4$  copies/ $\mu\text{L}$ ,  $5 \times 10^3$  copies/ $\mu\text{L}$ ,  $5 \times 10^2$  copies/ $\mu\text{L}$ 。取 2  $\mu\text{L}$  标准品或 cDNA 模板用于 qPCR 反应。

②实验过程中所用引物序列如下 (均为 5'-3'方向表示):

10 **RBD-qF: CAATGGTTTAAACAGGCACAGG**

**RBD-qR: CTCAAGTGTCTGTGGATCACG**

③反应程序如下:

预变性: 95°C 5 分钟;

循环参数: 95°C 15 秒, 54°C 15 秒, 72°C 30 秒, 共 40 个循环。

15 抑制率 (%) = (药物处理组 RNA 拷贝数) / (细胞感染组 RNA 拷贝数)  $\times 100\%$

#### (5) 药物对细胞毒性测试

药物对细胞毒性的检测利用 CCK-8 试剂盒 (Beoytime) 测定。具体步骤如下:

①96 孔板中接种  $1 \times 10^4$  个 Vero E6 (ATCC) 细胞, 37°C 培养 8 小时。

②将药物用 DMSO 稀释到合适的母液浓度, 再用含 2%FBS (购自 Gibco 公司, 货号  
20 16000044) 的 MEM 培养基 (购自 Gibco 公司, 货号 10370021) 稀释到与药物处理同样的浓度, 弃 96 孔板中原培养基, 取 100  $\mu\text{L}$  含药物的 MEM 培养基加入到细胞中, 每个浓度做三个复孔。注意设置阴性对照 (细胞孔中加 DMSO 和培养基, 而不加药物) 和空白对照 (不含细胞, 加 DMSO 和培养基)。加药完毕, 细胞 37°C 培养 48 小时。

③向待测孔中加入 20  $\mu\text{L}$  CCK-8 溶液 (Beoytime), 轻轻混匀, 不要产生气泡, 37°C  
25 继续培养 2 小时。在酶标仪 (购自 Molecular Devices 公司, 型号 SpectraMax M5) 上读取 OD<sub>450</sub>, 计算细胞活性:

细胞活性 (%) =  $(A_{\text{(药物处理组)}} - A_{\text{(空白对照)}}) / (A_{\text{(阴性对照)}} - A_{\text{(空白对照)}}) \times 100\%$

其中 A 为酶标仪读数。

#### (6) 实验结果

30 病毒增殖抑制实验的结果显示, 受试化合物在 10 $\mu\text{M}$ , 3.3 $\mu\text{M}$ , 1.1 $\mu\text{M}$ , 0.3 $\mu\text{M}$ , 0.1 $\mu\text{M}$

以及 0.03 $\mu$ M 的浓度下，均能够有效抑制感染上清中 SARS-CoV-2 病毒基因组的复制（图 1）

细胞毒性结果显示，受试化合物 BAY 2402234 在 10 $\mu$ M 以下的浓度未改变细胞活力，即受试化合物在所有浓度下对细胞均无毒性作用（图 1）。

#### 5 (7) 结论

化合物 BAY 2402234 对 SARS-CoV-2 病毒分离株 nCoV-2019BetaCoV/Wuhan/WIV04/2019 具有显著的抑制作用，在病毒感染 24h、48h 后的 EC<sub>50</sub> 值分别为 0.0070  $\mu$ M，0.0027  $\mu$ M，CC<sub>50</sub> 值为 198.8 $\mu$ M，相应的治疗指数 SI 分别为 28400 和 73629.63。

10

### 实施例 2 BAY 2402234 体外抗流感病毒活性评价以及安全性评估

#### (1) 药物抗流感病毒活性评价

①将 MDCK 细胞（购自 ATCC，货号：CCL-34）按照 1.5 $\times$ 10<sup>4</sup> 细胞/孔的浓度接种 96 孔板，细胞培养基为含 10%FBS（购自 Gibco 公司，货号 16000044）的 DMEM 培养基（购自 Gibco 公司，货号 11995065），置入 CO<sub>2</sub> 孵箱，37 $^{\circ}$ C 培养 24 小时。

②实验前，用 PBS（购自 Gibco 公司，货号 10010049）将细胞洗涤 3 遍，加入 100 $\mu$ L 含 2 $\mu$ g/mL TPCK 胰酶（购自 Sigma 公司，货号 T1426）的 D/F-12 培养基（购自 Gibco 公司，货号 11330032）。然后将浓度为 50mM 的 BAY 2402234（购自 MCE 公司，货号 HY-112645）母液，用上述 D/F-12 培养基系列稀释至 0.444  $\mu$ M，0.148  $\mu$ M，0.049  $\mu$ M，0.016  $\mu$ M，0.005  $\mu$ M，1.829 nM，0.609 nM，0.203 nM，取 50  $\mu$ L 加入到细胞培养板中。最后，将流感病毒株 A/PR/8（军事医学研究院保存），A/California/07/2009（军事医学研究院保存），A/Hongkong/08/1968（购自 ATCC，货号：VR-1679），A/Zhenxing1109/2010（军事医学研究院保存），B/Lee/40（购自 ATCC，货号：VR-1535）用含 2 $\mu$ g/mL TPCK 胰酶的 D/F-12 培养基稀释成相应浓度，取 50 $\mu$ L 加入 96 孔板中使每孔含有病毒量为 100 TCID<sub>50</sub>。最终药物终浓度为预处理浓度的 0.25 倍，即以 0.111  $\mu$ M 为初始浓度，3 倍倍比稀释，药物终浓度为：0.111  $\mu$ M，0.037  $\mu$ M，0.012  $\mu$ M，0.004  $\mu$ M，0.0014  $\mu$ M，0.457 nM，0.152 nM，0.051 nM。设置阴性对照（细胞孔中加 DMSO 和培养基，而不加药物）和阳性对照（细胞孔中加 DMSO、培养基和病毒，而不加药物）。37 $^{\circ}$ C 培养 72 小时。

③将 CellTiter-Glo<sup>®</sup> 化学发光细胞活力检测试剂（购自 Promega 公司，货号 G7573）的 Buffer 和底物避光混合，配制为工作液。将工作液与 PBS 按 4:6 比例混合。细胞培养

板弃液后, 每孔加入 100 $\mu$ l 检测试剂, 利用轨道振荡器将 96 孔板震荡 7min, 以诱导细胞裂解。避光稳定信号 5min 后, 使用酶标仪(购自 Molecular Devices 公司, 型号 SpectraMax M5) 测定化学发光单位, 读板程序为 CellTiter-Glo 预设程序, 计算细胞活性:

$$\text{细胞活性 (\%)} = (A_{\text{(药物处理组)}} - A_{\text{(阳性对照)}}) / (A_{\text{(阴性对照)}} - A_{\text{(阳性对照)}}) \times 100\%$$

5 其中 A 为酶标仪读数。

### (2) 药物对细胞毒性测试

①将 MDCK 细胞(购自 ATCC, 货号: CCL-34) 按照  $1.5 \times 10^4$  细胞/孔的浓度接种 96 孔板, 细胞培养基为含 10%FBS(购自 Gibco 公司, 货号 16000044) 的 DMEM 培养基(购自 Gibco 公司, 货号 11995065), 置入 CO<sub>2</sub> 孵箱, 37 $^{\circ}$ C 培养 24 小时。

10 ②实验前, 用 PBS(购自 Gibco 公司, 货号 10010049) 将细胞洗涤 3 遍, 加入 150  $\mu$ L 含 2 $\mu$ g/mL TPCK 胰酶(购自 Sigma 公司, 货号 T1426) 的 D/F-12 培养基(购自 Gibco 公司, 货号 11330032)。然后将浓度为 50mM 的 BAY 2402234(购自 MCE 公司, 货号 HY-112645) 母液, 用上述 D/F-12 培养基系列稀释至 4  $\mu$ M, 1.333  $\mu$ M, 0.444  $\mu$ M, 0.148  $\mu$ M, 0.049  $\mu$ M, 0.016  $\mu$ M, 0.005  $\mu$ M, 1.829 nM, 0.609 nM, 0.203 nM, 取 50  $\mu$ L 加入  
15 到细胞培养板中。最终药物终浓度为预处理浓度的 0.25 倍, 即以 1 $\mu$ M 为初始浓度, 3 倍  
倍比稀释, 药物终浓度为: 1  $\mu$ M, 0.333  $\mu$ M, 0.111  $\mu$ M, 0.037  $\mu$ M, 0.012  $\mu$ M, 0.004  $\mu$ M,  
0.0014  $\mu$ M, 0.457 nM, 0.152 nM, 0.051 nM。注意设置阴性对照(细胞孔中加 DMSO 和  
培养基, 而不加药物)。37 $^{\circ}$ C 培养 72 小时。

③将 CellTiter-Glo<sup>®</sup>化学发光细胞活力检测试剂(购自 Promega 公司, 货号 G7573)  
20 的 Buffer 和底物避光混合, 配制为工作液。将工作液与 PBS 按 4:6 比例混合。细胞培养  
板弃液后, 每孔加入 100  $\mu$ l 检测试剂, 利用轨道振荡器将 96 孔板震荡 7min, 以诱导细胞  
裂解。避光稳定信号 5 min 后, 使用酶标仪(购自 Molecular Devices 公司, 型号 SpectraMax  
M5) 测定化学发光单位, 读板程序为 CellTiter-Glo 预设程序, 计算细胞毒性:

$$\text{细胞毒性 (\%)} = (A_{\text{(阴性对照)}} - A_{\text{(药物处理组)}}) / A_{\text{(阴性对照)}} \times 100\%$$

25 其中 A 为酶标仪读数。

### (3) 实验结果

体外抗病毒实验结果显示, 受试化合物 BAY 2402234 抑制流感病毒株 A/PR/8,  
A/California/07/2009, A/Hongkong/08/1968, A/Zhenxing1109/2010 和 B/Lee/40 的 EC<sub>50</sub> 分别  
为  $0.01 \pm 0.0003$   $\mu$ M,  $0.03 \pm 0.009$   $\mu$ M,  $0.007 \pm 0.003$   $\mu$ M,  $0.04 \pm 0.01$   $\mu$ M 和  $0.03 \pm 0.02$   $\mu$ M (如  
30 表1); 细胞毒性实验结果显示, 受试化合物在 MDCK 细胞上的 CC<sub>50</sub> 值为  $0.27 \pm 0.09$   $\mu$ M (如

表1)。相应的治疗指数分别为27, 9, 38.57, 6.75和9。

#### (4) 结论

化合物BAY 2402234对流感病毒具有较为广谱（H1N1, H1N1-奥司他韦耐药株, H3N2, B型）的抑制效果。

5 表 1 BAY 2402234 抗流感病毒的半数最大有效浓度（EC<sub>50</sub>）及安全性（CC<sub>50</sub>）

流感（ $\mu\text{M}$ ）					
PR8- MDCK	CA07- MDCK	HK68- MDCK	ZX1109- MDCK	Blee- MDCK	CC <sub>50</sub> - MDCK
0.01±0.0003	0.03±0.009	0.007±0.003	0.04±0.01	0.03±0.02	0.27±0.09

### 实施例 3 BAY 2402234 体外抗寨卡病毒活性评价以及安全性评估

#### (1) 药物对寨卡病毒的活性评价

①将 BHK 细胞（军事医学研究院保存）按照  $5 \times 10^3$  细胞/孔的浓度或 Vero 细胞（军事  
10 医学研究院保存）按照  $1 \times 10^4$  细胞/孔的浓度接种 96 孔板，细胞培养基为含 10%FBS（购  
自 Gibco 公司，货号 16000044）的 DMEM 培养基（购自 Gibco 公司，货号 11995065），  
置入 CO<sub>2</sub> 孵箱，37℃培养 24 小时。

②弃 96 孔板中原培养基，取 100  $\mu\text{L}$  含 2%FBS（购自 Gibco 公司，货号 16000044）  
的 DMEM 培养基（购自 Gibco 公司，货号 11995065）加入到细胞中。然后将浓度为 50mM  
15 的 BAY 2402234（购自 MCE 公司，货号 HY-112645）母液，用上述 DMEM 培养基系列  
稀释至 800 nM, 266.67 nM, 88.89 nM, 29.63 nM, 9.88 nM, 3.29 nM, 1.10 nM, 0.37 nM,  
取 50  $\mu\text{L}$  加入到细胞培养板中。最后细胞中加入 50 $\mu\text{L}$  用含 2%FBS 的 DMEM 培养基稀释  
好的寨卡病毒 SZ-SMGC-01 株（军事医学研究院保存），使每孔含有病毒量为 100TCID<sub>50</sub>。  
最终药物终浓度为预处理浓度的 0.25 倍，即以 200 nM 为初始浓度，3 倍倍比稀释，药物  
20 终浓度为：200 nM, 66.67 nM, 22.22 nM, 7.41 nM, 2.47 nM, 0.82 nM, 0.27nM, 0.09 nM。  
注意设置阴性对照（细胞孔中加 DMSO 和培养基，而不加药物）和阳性对照（细胞孔中  
加 DMSO、培养基和病毒，而不加药物）。37℃培养，BHK 细胞需培养 9 天，Vero 细胞  
需培养 7 天。

③将 CellTiter-Glo®化学发光细胞活力检测试剂（购自 Promega 公司，货号 G7573）  
25 的 Buffer 和底物避光混合，配制为工作液。将工作液与 PBS（购自 Gibco 公司，货号  
10010049）按 4:6 比例混合。细胞培养板弃液后，每孔加入 100 $\mu\text{L}$  检测试剂，利用轨道振

荡器将 96 孔板震荡 5min, 以诱导细胞裂解。避光稳定信号 2min 后, 使用酶标仪 (购自 Molecular Devices 公司, 型号 SpectraMax M5) 测定化学发光单位, 读板程序为 CellTiter-Glo 预设程序, 计算细胞活性:

$$\text{细胞活性 (\%)} = (A_{\text{(药物处理组)}} - A_{\text{(阳性对照)}}) / (A_{\text{(阴性对照)}} - A_{\text{(阳性对照)}}) \times 100\%$$

5 其中 A 为酶标仪读数。

### (2) 药物对细胞毒性测试

①将 BHK 细胞 (军事医学研究院保存) 按照  $5 \times 10^3$  细胞/孔的浓度或 Vero 细胞 (军事医学研究院保存) 按照  $1 \times 10^4$  细胞/孔的浓度接种 96 孔板, 细胞培养基为含 10%FBS (购自 Gibco 公司, 货号 16000044) 的 DMEM 培养基 (购自 Gibco 公司, 货号 11995065), 10 置入 CO<sub>2</sub> 孵箱, 37°C 培养 24 小时。

②弃 96 孔板中原培养基, 取 150  $\mu$ L 含 2%FBS (购自 Gibco 公司, 货号 16000044) 的 DMEM 培养基 (购自 Gibco 公司, 货号 11995065) 加入到细胞中。然后将浓度为 50mM 的 BAY 2402234 (购自 MCE 公司, 货号 HY-112645) 母液, 用上述 DMEM 培养基系列 15 稀释至 800 nM, 266.67 nM, 88.89 nM, 29.63 nM, 9.88 nM, 3.29 nM, 1.10 nM, 0.37 nM, 取 50  $\mu$ L 加入到细胞培养板中。最终药物终浓度为预处理浓度的 0.25 倍, 即以 200 nM 为初始浓度, 3 倍倍比稀释, 药物终浓度为: 200 nM, 66.67 nM, 22.22 nM, 7.41 nM, 2.47 nM, 0.82 nM, 0.27nM, 0.09 nM。注意设置阴性对照 (细胞孔中加 DMSO 和培养基, 而不加药物)。37°C 培养, BHK 细胞需培养 9 天, Vero 细胞需培养 7 天。

③将 CellTiter-Glo® 化学发光细胞活力检测试剂 (购自 Promega 公司, 货号 G7573) 20 的 Buffer 和底物避光混合, 配制为工作液。将工作液与 PBS (购自 Gibco 公司, 货号 10010049) 按 4:6 比例混合。细胞培养板弃液后, 每孔加入 100 $\mu$ l 检测试剂, 利用轨道振荡器将 96 孔板震荡 5min, 以诱导细胞裂解。避光稳定信号 2min 后, 使用酶标仪 (购自 Molecular Devices 公司, 型号 SpectraMax M5) 测定化学发光单位, 读板程序为 CellTiter-Glo 预设程序, 计算细胞毒性:

$$25 \quad \text{细胞毒性 (\%)} = (A_{\text{(阴性对照)}} - A_{\text{(药物处理组)}}) / A_{\text{(阴性对照)}} \times 100\%$$

其中 A 为酶标仪读数。

### (3) 实验结果

初步实验结果显示, 受试化合物 BAY 2402234 对寨卡病毒具有抑制作用。

30 实施例 4 BAY 2402234 体外抗布尼亚病毒活性评价以及安全性评估

### (1) 药物对布尼亚病毒的活性评价

①将 Huh7 细胞（军事医学研究院保存）按照  $5 \times 10^3$  细胞/孔的浓度接种 96 孔板，细胞培养基为含 10%FBS（购自 Gibco 公司，货号 16000044）的 DMEM 培养基（购自 Gibco 公司，货号 11995065），置入 CO<sub>2</sub> 孵箱，37℃培养 24 小时。

5       ②弃 96 孔板中原培养基，取 100 μL 含 2%FBS（购自 Gibco 公司，货号 16000044）的 DMEM 培养基（购自 Gibco 公司，货号 11995065）加入到细胞中。然后将浓度为 50mM 的 BAY 2402234（购自 MCE 公司，货号 HY-112645）母液，用上述 DMEM 培养基系列稀释至 800 nM, 266.67 nM, 88.89 nM, 29.63 nM, 9.88 nM, 3.29 nM, 1.10 nM, 0.37 nM, 取 50 μL 加入到细胞培养板中。最后细胞中加入 50μL 用含 2%FBS 的 DMEM 培养基稀释好的布尼亚病毒（本实验室分离：首都医科大学北京地坛医院患者血清），使每孔含有病毒量为 100TCID<sub>50</sub>。最终药物终浓度为预处理浓度的 0.25 倍，即以 200 nM 为初始浓度，3 倍倍比稀释，药物终浓度为：200 nM, 66.67 nM, 22.22 nM, 7.41 nM, 2.47 nM, 0.82 nM, 0.27nM, 0.09 nM。注意设置阴性对照（细胞孔中加 DMSO 和培养基，而不加药物）和阳性对照（细胞孔中加 DMSO、培养基和病毒，而不加药物）。37℃培养 6 天。

15       ③将 CellTiter-Glo®化学发光细胞活力检测试剂（购自 Promega 公司，货号 G7573）的 Buffer 和底物避光混合，配制为工作液。将工作液与 PBS（购自 Gibco 公司，货号 10010049）按 4:6 比例混合。细胞培养板弃液后，每孔加入 100μl 检测试剂，利用轨道振荡器将 96 孔板震荡 5min，以诱导细胞裂解。避光稳定信号 2min 后，使用酶标仪（购自 Molecular Devices 公司，型号 SpectraMax M5）测定化学发光单位，读板程序为  
20 CellTiter-Glo 预设程序，计算细胞活性：

$$\text{细胞活性 (\%)} = (A_{\text{(药物处理组)}} - A_{\text{(阳性对照)}}) / (A_{\text{(阴性对照)}} - A_{\text{(阳性对照)}}) \times 100\%$$

其中 A 为酶标仪读数。

### (2) 药物对细胞毒性测试

①将 Huh7 细胞（军事医学研究院保存）按照  $5 \times 10^3$  细胞/孔的浓度接种 96 孔板，细胞培养基为含 10%FBS（购自 Gibco 公司，货号 16000044）的 DMEM 培养基（购自 Gibco 公司，货号 11995065），置入 CO<sub>2</sub> 孵箱，37℃培养 24 小时。

②弃 96 孔板中原培养基，取 150 μL 含 2%FBS（购自 Gibco 公司，货号 16000044）的 DMEM 培养基（购自 Gibco 公司，货号 11995065）加入到细胞中。然后将浓度为 50mM 的 BAY 2402234（购自 MCE 公司，货号 HY-112645）母液，用上述 DMEM 培养基系列  
30 稀释至 800 nM, 266.67 nM, 88.89 nM, 29.63 nM, 9.88 nM, 3.29 nM, 1.10 nM, 0.37 nM,

取 50  $\mu\text{L}$  加入到细胞培养板中。最终药物终浓度为预处理浓度的 0.25 倍，即以 200 nM 为初始浓度，3 倍倍比稀释，药物终浓度为：200 nM，66.67 nM，22.22 nM，7.41 nM，2.47 nM，0.82 nM，0.27nM，0.09 nM。注意设置阴性对照（细胞孔中加 DMSO 和培养基，而不加药物）。37 $^{\circ}\text{C}$  培养 6 天。

- 5           ③将 CellTiter-Glo<sup>®</sup>化学发光细胞活力检测试剂（购自 Promega 公司，货号 G7573）的 Buffer 和底物避光混合，配制为工作液。将工作液与 PBS（购自 Gibco 公司，货号 10010049）按 4:6 比例混合。细胞培养板弃液后，每孔加入 100 $\mu\text{l}$  检测试剂，利用轨道振荡器将 96 孔板震荡 5min，以诱导细胞裂解。避光稳定信号 2min 后，使用酶标仪（购自 Molecular Devices 公司，型号 SpectraMax M5）测定化学发光单位，读板程序为
- 10 CellTiter-Glo 预设程序，计算细胞毒性：

$$\text{细胞毒性 (\%)} = (A_{(\text{阴性对照})} - A_{(\text{药物处理组})}) / A_{(\text{阴性对照})} \times 100\%$$

其中 A 为酶标仪读数。

### (3) 实验结果

初步实验结果显示，受试化合物 BAY 2402234 对布尼亚病毒具有抑制作用。

15

## 实施例 5 BAY 2402234 体外抗肠道病毒活性评价以及安全性评估

### (1) 药物抗肠道病毒活性评价

- ①将 Vero 细胞（购自 ATCC，货号：CCL-81）按照  $1 \times 10^4$  细胞/孔的浓度接种 96 孔板，细胞培养基为含 2%FBS（购自 Gibco 公司，货号 16000044）的 DMEM 培养基（购
- 20 自 Gibco 公司，货号 11995065），置入  $\text{CO}_2$  孵箱，37 $^{\circ}\text{C}$  培养 24 小时。

- ②实验前，用 PBS（购自 Gibco 公司，货号 10010049）将细胞洗涤 3 遍，加入 100 $\mu\text{L}$  含 2%FBS（购自 Gibco 公司，货号 16000044）的 DMEM 培养基（购自 Gibco 公司，货号 11995065）。然后将浓度为 50mM 的 BAY 2402234（购自 MCE 公司，货号 HY-112645）母液，用上述 DMEM 培养基系列稀释至 40  $\mu\text{M}$ ，13.33  $\mu\text{M}$ ，4.44  $\mu\text{M}$ ，1.48  $\mu\text{M}$ ，0.49  $\mu\text{M}$ ，
- 25 0.16  $\mu\text{M}$ ，0.05  $\mu\text{M}$ ，18.29 nM，6.09 nM，2.03 nM，取 50  $\mu\text{L}$  加入到细胞培养板中。最后细胞中加入 50 $\mu\text{L}$  用含 2%FBS 的 DMEM 培养基稀释好的肠道病毒 CB3（军事医学研究院保存），使每孔含有病毒量为 100TCID<sub>50</sub>。最终药物终浓度为预处理浓度的 0.25 倍，即以 10  $\mu\text{M}$  为初始浓度，3 倍倍比稀释，药物终浓度为：10  $\mu\text{M}$ ，3.33  $\mu\text{M}$ ，1.11  $\mu\text{M}$ ，0.37 $\mu\text{M}$ ，0.12 $\mu\text{M}$ ，0.04 $\mu\text{M}$ ，13.72nM，4.57nM，1.52nM，0.51nM。注意设置阴性对照（细胞孔中
- 30 加 DMSO 和培养基，而不加药物）和阳性对照（细胞孔中加 DMSO、培养基和病毒，而

不加药物)。37℃培养 5 天。

③将 CellTiter-Glo®化学发光细胞活力检测试剂（购自 Promega 公司，货号 G7573）的 Buffer 和底物避光混合，配制为工作液。将工作液与 PBS 按 4:6 比例混合。细胞培养板弃液后，每孔加入 100μl 检测试剂，利用轨道振荡器将 96 孔板震荡 5min，以诱导细胞裂解。避光稳定信号 3min 后，使用酶标仪（购自 Molecular Devices 公司，型号 SpectraMax M5）测定化学发光单位，读板程序为 CellTiter-Glo 预设程序，计算细胞活性：

$$\text{细胞活性 (\%)} = (A_{\text{(药物处理组)}} - A_{\text{(阳性对照)}}) / (A_{\text{(阴性对照)}} - A_{\text{(阳性对照)}}) \times 100\%$$

其中 A 为酶标仪读数。

### (2) 药物对细胞毒性测试

①将 Vero 细胞（购自 ATCC，货号：CCL-81）按照  $1 \times 10^4$  细胞/孔的浓度接种 96 孔板，细胞培养基为含 2%FBS（购自 Gibco 公司，货号 16000044）的 DMEM 培养基（购自 Gibco 公司，货号 11995065），置入 CO<sub>2</sub> 孵箱，37℃培养 24 小时。

②实验前，用 PBS（购自 Gibco 公司，货号 10010049）将细胞洗涤 3 遍，加入 150μL 含 2%FBS（购自 Gibco 公司，货号 16000044）的 DMEM 培养基（购自 Gibco 公司，货号 11995065）。然后将浓度为 50mM 的 BAY 2402234（购自 MCE 公司，货号 HY-112645）母液，用上述 DMEM 培养基系列稀释至 40 μM, 13.33 μM, 4.44 μM, 1.48 μM, 0.49 μM, 0.16 μM, 0.05 μM, 18.29 nM, 6.09 nM, 2.03 nM, 取 50 μL 加入到细胞培养板中。最终药物终浓度为预处理浓度的 0.25 倍，即以 10 μM 为初始浓度，3 倍倍比稀释，药物终浓度为：10 μM, 3.33 μM, 1.11 μM, 0.37μM, 0.12μM, 0.04μM, 13.72nM, 4.57nM, 1.52nM, 0.51nM。注意设置阴性对照（细胞孔中加 DMSO 和培养基，而不加药物）。37℃培养 5 天。

③将 CellTiter-Glo®化学发光细胞活力检测试剂（购自 Promega 公司，货号 G7573）的 Buffer 和底物避光混合，配制为工作液。将工作液与 PBS 按 4:6 比例混合。细胞培养板弃液后，每孔加入 100μl 检测试剂，利用轨道振荡器将 96 孔板震荡 5min，以诱导细胞裂解。避光稳定信号 3min 后，使用酶标仪（购自 Molecular Devices 公司，型号 SpectraMax M5）测定化学发光单位，读板程序为 CellTiter-Glo 预设程序，计算细胞毒性：

$$\text{细胞毒性 (\%)} = (A_{\text{(阴性对照)}} - A_{\text{(药物处理组)}}) / A_{\text{(阴性对照)}} \times 100\%$$

其中 A 为酶标仪读数。

### (3) 实验结果

初步实验结果显示，受试化合物BAY 2402234对对肠道病毒具有抑制作用。

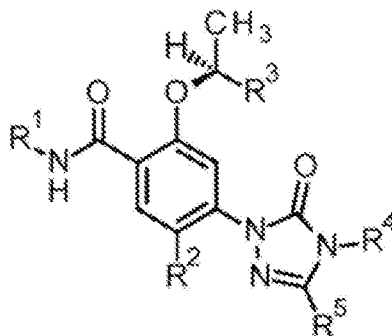
肠道病毒 ( $\mu\text{M}$ )					
EV71-RD	EVD68-RD	CA16-RD	CA6-RD	CB3-Vero	CC <sub>50</sub>
>100	>100	>100	>100	<0.05	>300

除本文中描述的那些外，根据前述描述，本发明的各种修改对本领域技术人员而言会是显而易见的。这样的修改也意图落入所附权利要求书的范围内。本申请中所引用的各参考文献(包括所有专利、专利申请、期刊文章、书籍及任何其它公开)均以其整体援引加入

5 本文。

# 权 利 要 求

1、式 I 化合物、或其 N-氧化物、互变异构体、几何异构体、溶剂合物、水合物、药学上可接受的盐、或所述互变异构体或 N-氧化物的盐在制备药物中的用途，其中所述药物用于预防和/或治疗与病毒有关的疾病，式 I 化合物结构如下所示：



I

其中：

**R<sup>1</sup>** 代表选自以下的基团：

3-戊基、2,2-二甲基丙基、4-庚基、4-氟苯基环丙基、环戊基、环己基、环庚基、环戊基甲基、环己基甲基、1-环己基乙基、1-羟基丙-2-基、2-羟基丙基、1-羟基丁-2-基、1-氰基丁-2-基、1-苯基丁-2-基、1-氨基-2-丙基、1-氨基-2-丁基、1-氨基-1-氧代丁-2-基、茚满-2-基、5-至 6-元杂环烷基，其选自四氢呋喃-3-基、四氢-2H-吡喃-4-基和哌啶-4-基，并且其任选被甲基取代一次或两次，

苯基，其任选被取代一次、两次或三次，每个取代基独立地选自氟原子或氯原子或选自以下的基团：甲基、乙基、丙基、异丙基、二氟甲基、三氟甲基、甲氧基、-O-C(=O)-1,1-二甲基乙基、羟基、-C(=O)OCH<sub>3</sub>、-C(=O)NH-环丙基、氨基、甲基氨基、氨基甲基、-S-CH<sub>3</sub>、-S(=O)<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> 和 -S(=O)(NH)CH<sub>3</sub>，和，

单环杂芳基，其选自噁唑-2-基、吡唑-3-基、吡唑-5-基、吡啶-2-基、吡啶-3-基、吡啶-4-基、嘧啶-2-基、嘧啶-4-基、喹啉-5-基、吲唑-5-基，并且其任选被取代一次或两次，每个取代基独立地选自甲基和甲氧基，

**R<sup>2</sup>** 代表氢原子或氟或氯原子，

**R<sup>3</sup>** 代表选自以下的基团：

丙基、2-甲基丙基、3-戊基、环丙基甲基、环丙基、环丙基甲基，环丁基、环戊基、环己基、二氟甲基、三氟甲基、1,1-二氟乙基、丙-2-烯-1-基、2-甲基-丙-1-烯-1-基，N,N-

二甲基氨基乙基和苯基，

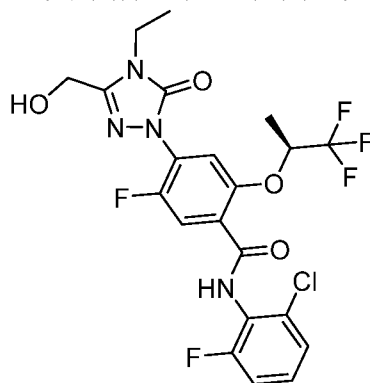
$R^4$  代表选自以下的基团：

甲基、乙基、丙基、异丙基、2-丁基、丙-2-烯-1-基、环丙基甲基、苄基、环丙基、环丁基、环戊基和 2-羟基乙基，

$R^5$  代表氯原子或选自以下的基团：

甲基、乙基、丙基、异丙基、2-丁基、异丁基、叔丁基、环丙基、环丁基、环戊基、三氟甲基、羟基甲基、1-羟基乙基、2-羟基丙-2-基、1-氯乙基、1-羟基-2,2,2-三氟乙基、1-甲氧基乙基、甲氧基、异丙氧基、甲基硫基、氨基甲基、(甲基氨基)甲基、(二甲基氨基)甲基、1-氨基乙基、2-氨基乙基、甲基氨基和乙基(甲基)氨基、 $-C(=O)OH$ 、 $-C(=O)OCH_3$ 、 $-C(=O)NH_2$ 、 $-C(=O)NHCH_3$ 、 $-C(=O)NH$  环丙基、 $-C(=O)N(CH_3)_2$  和  $-S(=O)(=NH)CH_3$ 。

2、权利要求 1 所述的用途，其中所述化合物为式 II 化合物，



II。

3、权利要求 1 或 2 中所定义的化合物、或其 N-氧化物、互变异构体、几何异构体、溶剂合物、水合物、药学上可接受的盐、或所述互变异构体或 N-氧化物的盐在制备药物中的用途，其中所述药物用于抑制病毒在细胞（例如哺乳动物细胞）中复制或繁殖。

4、权利 1-3 任一项所述的用途，其中所述病毒为 RNA 病毒。

5、权利要求 1-4 任一项所述的用途，其中所述病毒为冠状病毒科病毒、正粘病毒科病毒、黄病毒科病毒、布尼亚病毒科病毒、小 RNA 病毒科病毒、沙粒病毒、丝状病毒科病毒或西方马脑炎病毒；

优选地，所述冠状病毒科病毒选自 HCoV-229E、HCoV-OC43、HCoV-NL63、HCoV-HKU1、SARS-CoV、MERS-CoV 和 SARS-CoV-2；

优选地，所述正粘病毒科病毒为流感病毒，例如甲型流感病毒、乙型流感病毒或丙型流感病毒；

优选地，所述黄病毒科病毒选自寨卡病毒、登革病毒、西尼罗病毒、黄热病病毒

和 HCV 病毒；

优选地，所述布尼亚病毒科病毒为布尼亚病毒或白蛉病毒；

优选地，所述小 RNA 病毒为肠道病毒或口蹄疫病毒；

优选地，所述丝状病毒科病毒选自埃博拉病毒、马尔堡病毒和库瓦病毒。

6、权利 1-5 任一项所述的用途，其中所述药物用于预防和/或治疗由 SARS-CoV、MERS-CoV、SARS-CoV-2、流感病毒、寨卡病毒、登革病毒、布尼亚病毒或肠道病毒引起的疾病；

优选地，所述药物用于预防和/或治疗由 SARS-CoV、MERS-CoV 或 SARS-CoV-2 引起的疾病；

优选地，所述药物用于预防和/或治疗由 SARS-CoV-2 引起的疾病，例如单纯性感染（如发热、咳嗽和/或咽痛）、肺炎、急性或严重急性呼吸道感染、低氧性呼吸衰竭、急性呼吸窘迫综合征、脓毒症或脓毒性休克；

优选地，所述药物用于预防和/或治疗 COVID-19。

7、权利要求 1-6 任一项所述的用途，其中所述药物为人用或兽用。

8、权利要求 1-7 任一项所述的用途，其中所述药物中还包含药学上可接受的载体或辅料。

9、权利要求 1-8 任一项所述的用途，其中所述化合物作为唯一的药物活性成分或与其它药物活性成分联用（例如，所述药物为复方制剂）；

优选地，所述其它药物活性成分为抗病毒药物，例如金刚烷胺、金刚乙胺、恩夫韦地、马拉韦罗、阿昔洛韦、更昔洛韦、伐昔洛韦、泛昔洛韦、膦甲酸钠、拉米夫定、齐多夫定、恩曲他滨、替诺福韦、阿德福韦酯、依法韦仑、奈韦拉平、沙奎那韦、奥司他韦、扎那米韦、利巴韦林和干扰素中的一种或多种。

10、权利要求 1-9 任一项的用途，其中所述药物为固体制剂或液体制剂；

优选地，所述药物为片剂、注射剂或喷剂；优选为片剂或注射剂。

11、一种预防和/或治疗与病毒有关的疾病的方法，其包括向有此需要的受试者施用有效量的权利要求 1 或 2 中所定义的化合物、或其 N-氧化物、互变异构体、几何异构体、溶剂合物、水合物、药学上可接受的盐、或所述互变异构体或 N-氧化物的盐的步骤。

12、一种抑制病毒在细胞（例如哺乳动物细胞）中复制或繁殖的方法，其包括向受试者或细胞施用有效量的权利要求 1 或 2 中所定义的化合物、或其 N-氧化物、互变异构体、几何异构体、溶剂合物、水合物、药学上可接受的盐、或所述互变异构体或 N-氧化

物的盐的步骤。

13、权利要求 11 或 12 所述的方法，其中所述病毒为 RNA 病毒。

14、权利要求 11-13 任一项所述的方法，其中所述病毒为冠状病毒科病毒、正粘病毒科病毒、黄病毒科病毒、布尼亚病毒科病毒、小 RNA 病毒科病毒、沙粒病毒、丝状病毒科病毒或西方马脑炎病毒；

优选地，所述冠状病毒科病毒选自 HCoV-229E、HCoV-OC43、HCoV-NL63、HCoV-HKU1、SARS-CoV、MERS-CoV 和 SARS-CoV-2；

优选地，所述正粘病毒科病毒为流感病毒，例如甲型流感病毒、乙型流感病毒或丙型流感病毒；

优选地，所述黄病毒科病毒选自寨卡病毒、登革病毒、西尼罗病毒、黄热病病毒和 HCV 病毒；

优选地，所述布尼亚病毒科病毒为布尼亚病毒或白蛉病毒；

优选地，所述小 RNA 病毒为肠道病毒或口蹄疫病毒；

优选地，所述丝状病毒科病毒选自埃博拉病毒、马尔堡病毒和库瓦病毒。

15、权利要求 11-14 任一项所述的方法，其中所述化合物、或其 N-氧化物、互变异构体、几何异构体、溶剂合物、水合物、药学上可接受的盐、或所述互变异构体或 N-氧化物的盐用于预防和/或治疗由 SARS-CoV、MERS-CoV、SARS-CoV-2、流感病毒、寨卡病毒、登革病毒、布尼亚病毒或肠道病毒引起的疾病；

优选地，其中所述化合物、或其 N-氧化物、互变异构体、几何异构体、溶剂合物、水合物、药学上可接受的盐、或所述互变异构体或 N-氧化物的盐用于预防和/或治疗由 SARS-CoV、MERS-CoV 或 SARS-CoV-2 引起的疾病；

优选地，其中所述化合物、或其 N-氧化物、互变异构体、几何异构体、溶剂合物、水合物、药学上可接受的盐、或所述互变异构体或 N-氧化物的盐用于预防和/或治疗由 SARS-CoV-2 引起的疾病，例如单纯性感染（如发热、咳嗽和/或咽痛）、肺炎、急性或严重急性呼吸道感染、低氧性呼吸衰竭、急性呼吸窘迫综合征、脓毒症或脓毒性休克；

优选地，其中所述化合物、或其 N-氧化物、互变异构体、几何异构体、溶剂合物、水合物、药学上可接受的盐、或所述互变异构体或 N-氧化物的盐用于预防和/或治疗 COVID-19。

16、权利要求 11-15 任一项所述的方法，其中所述受试者为哺乳动物，例如人。

17、权利要求 12 所述的方法，其中所述哺乳动物细胞为来自人的细胞。

18、权利要求 11-17 任一项所述的方法，其中所述化合物、或其 N-氧化物、互变异构体、几何异构体、溶剂合物、水合物、药学上可接受的盐、或所述互变异构体或 N-氧化物的盐单独施用，或与其它药物活性成分联用，例如同时、分别或依次给药；

优选地，所述其它药物活性成分为抗病毒药物，例如金刚烷胺、金刚乙胺、恩夫韦地、马拉韦罗、阿昔洛韦、更昔洛韦、伐昔洛韦、泛昔洛韦、膦甲酸钠、拉米夫定、齐多夫定、恩曲他滨、替诺福韦、阿德福韦酯、依法韦仑、奈韦拉平、沙奎那韦、奥司他韦、扎那米韦、利巴韦林和干扰素中的一种或多种。

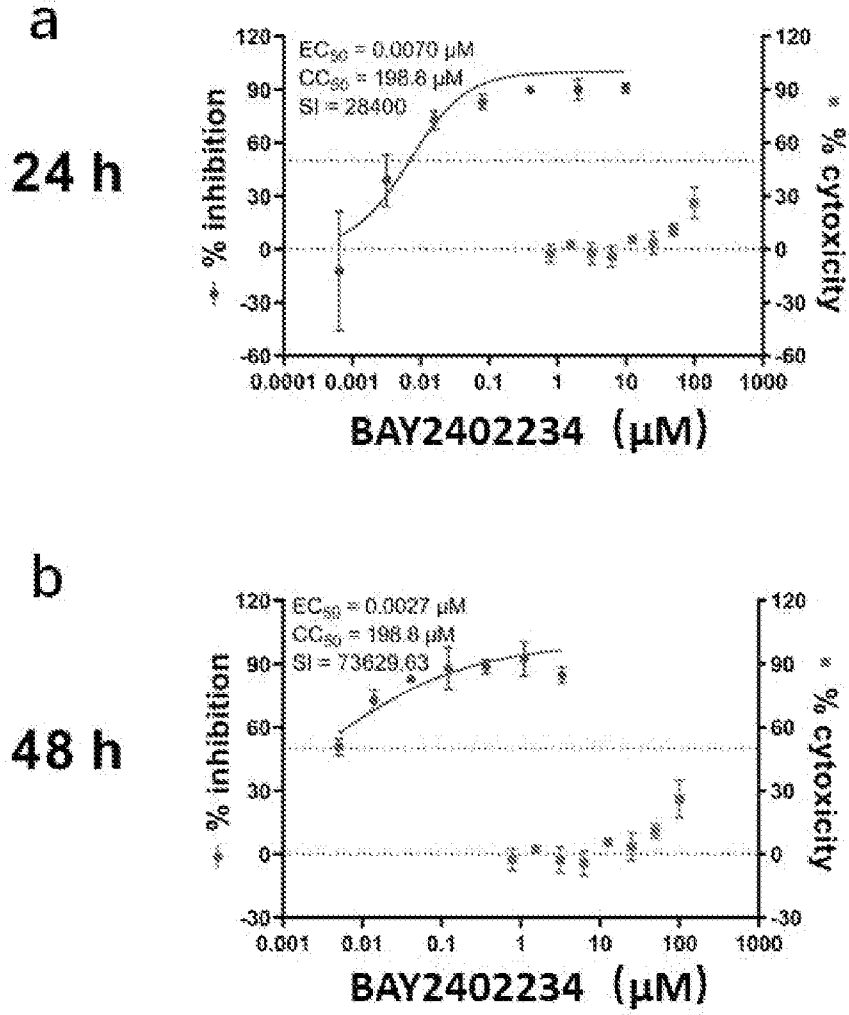


图 1

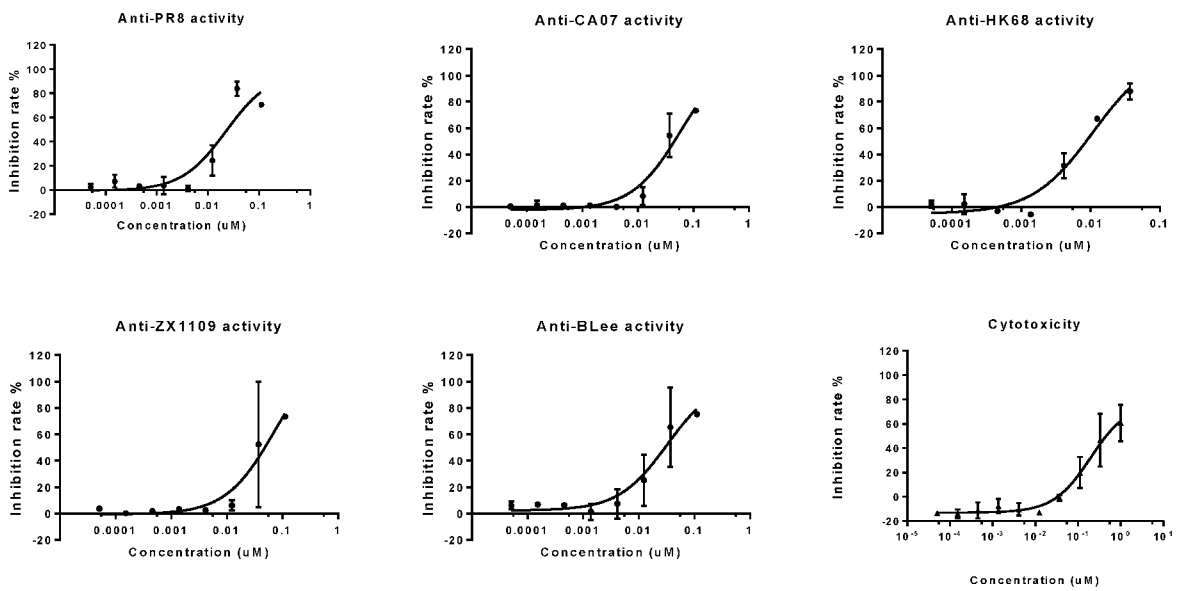


图 2

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2021/106486

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
A61K 31/4196(2006.01)i; A61P 31/14(2006.01)i; A61P 31/16(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
A61K; A61P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
CNABS; CNTXT; DWPI; SIPOABS; WOTXT; USTXT; EPTXT; CNKI; 万方; 读秀学术; Springer; ISI Web of Science; 中国人民解放军军事科学院军事医学研究院, 钟武, 周辛波, 曹瑞源, 肖典, 王曼丽, 樊士勇, 胡志红, 李松, 2, 4, 5-三取代的1, 2, 4-三唑酮, 二氢乳清酸脱氢酶, 抑制剂, RNA病毒, 寨卡病毒, 新型冠状病毒, BAY2402234, Academy of Military Medical Sciences, ZHONG Wu, ZHOU Xinbo, CAO Ruiyuan, XIAO Dian, WANG Manli, FAN Shiyong, HU Zhihong, LI Song, 2, 4, 5-trisubstituted-1, 2, 4-triazolone, dihydroorotate dehydrogenase, DHODH, inhibitor, RNA viruse, Zika Virus, COVID-19, SARS-CoV-2		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	Kim M. Stegmann et al. "N4-hydroxycytidine and Inhibitors of Dihydroorotate Dehydrogenase Synergistically Suppress SARS-CoV-2 Replication" <i>BioRxiv</i> , 28 June 2021 (2021-06-28), pages 1-30, in particular page 10, paragraph 2	1-10
PX	CN 111773214 A (ACAD OF MILITARY SCIENCES PLA CHINA ACAD OF MILITARY MEDICAL SCIENCES) 16 October 2020 (2020-10-16) claims 1-10	1-10
X	CN 110023302 A (BAYER AG et al.) 16 July 2019 (2019-07-16) description paragraphs [0015-0017], [0189], [1753], [1754], [3629], [3631], [3670], [3673], [3705]	1-3, 7-10
Y	CN 110023302 A (BAYER AG et al.) 16 July 2019 (2019-07-16) description paragraphs [0015-0017], [0189], [1753], [1754], [3629], [3631], [3670], [3673], [3705]	4-10
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
08 September 2021		27 September 2021
Name and mailing address of the ISA/CN		Authorized officer
China National Intellectual Property Administration (ISA/CN) No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088 China		
Facsimile No. (86-10)62019451		Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2021/106486

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	XIONG, Rui et al. "Novel and Potent Inhibitors Targeting DHODH, a Rate-limiting Enzyme in de Novo Pyrimidine Biosynthesis, Are Broad-spectrum Antiviral Against RNA Viruses Including Newly Emerged Coronavirus SARS-CoV-2" <i>BioRxiv</i> , 12 March 2020 (2020-03-12), pages 1-31, in particular abstract, page 12, last paragraph, page 13, paragraph 1	4-10
A	None. "华理与武大团队联合发现强效抗新冠病毒候选药物和老药品种 (Non-official translation: East China University of Science and Technology and Wuhan University Have Jointly Discovered An Effective Anti-COVID-19 Drug Candidate and A Drug Currently Used)" <i>上海化工 (Shanghai Chemical Industry)</i> , Vol. 45, No. 2, 30 April 2020 (2020-04-30), p. 76	1-10

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.: **11-18**  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  - [1] The subject matter of claim 11 relates to a method for preventing and/or treating diseases associated with virus, and the subject matter of claim 12 relates to a method for inhibiting virus replication and propagation in cells. However, the ultimate purpose of the claimed methods is to treat diseases in the living animal body, which falls within the scope of methods for diagnosing and treating diseases under PCT Rule 39.1(4).
  - [2] Based on the same reason, dependent claims 13-18 also pertain to methods for diagnosing and treating diseases under PCT Rule 39.1(4).
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on patent family members**

International application No.

**PCT/CN2021/106486**

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	111773214	A	16 October 2020	CN	111773214	B	20 April 2021
CN	110023302	A	16 July 2019	US	2020123129	A1	23 April 2020
				US	10815215	B2	27 October 2020
				JP	2019533694	A	21 November 2019
				KR	20190084954	A	17 July 2019
				US	2020377472	A1	03 December 2020
				WO	2018077923	A1	03 May 2018
				MX	2019005009	A	12 August 2019
				AU	2017351688	A1	11 April 2019
				CA	3041643	A1	03 May 2018
				BR	112019008458	A2	09 July 2019
				EP	3532468	A1	04 September 2019
				TW	201827414	A	01 August 2018
				US	20210188805	A9	24 June 2021
				SG	11201902392	A1	29 April 2019
				HK	40006139	A0	15 May 2020
				VN	64781	A	25 July 2019
				IN	201917015049	A	19 July 2019
				ID	201907156	A	27 September 2019
				PH	12019500932	A1	20 January 2020
				GE	202107248	B	26 April 2021

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2021/106486

<p><b>A. 主题的分类</b></p> <p>A61K 31/4196(2006.01)i; A61P 31/14(2006.01)i; A61P 31/16(2006.01)i</p> <p>按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类</p>																	
<p><b>B. 检索领域</b></p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>A61K; A61P</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))</p> <p>CNABS;CNTXT;DWPI;SIPOABS;WOTXT;USTXT;EPTXT;CNKI;万方;读秀学术;Springer;ISI Web of Science; 中国人民解放军军事科学院军事医学研究院, 钟武, 周辛波, 曹瑞源, 肖典, 王曼丽, 樊士勇, 胡志红, 李松, 2,4,5-三取代的1,2,4-三唑酮, 二氢乳清酸脱氢酶, 抑制剂, RNA病毒, 寨卡病毒, 新型冠状病毒, BAY2402234, Academy of Military Medical Sciences, ZHONG Wu, ZHOU Xinbo, CAO Ruiyuan, XIAO Dian, WANG Manli, FAN Shiyong, HU Zhihong, LI Song, 2,4,5-trisubstituted-1,2,4-triazolone, dihydroorotate dehydrogenase, DHODH, inhibitor, RNA virus, Zika Virus, COVID-19, SARS-CoV-2</p>																	
<p><b>C. 相关文件</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>PX</td> <td>Kim M. Stegmann 等. "N4-hydroxycytidine and Inhibitors of Dihydroorotate Dehydrogenase Synergistically Suppress SARS-CoV-2 Replication" bioRxiv, 2021年 6月 28日 (2021-06-28), 第1-30页, 尤其是第10页第2段</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>PX</td> <td>CN 111773214 A (中国人民解放军军事科学院军事医学研究院) 2020年 10月 16日 (2020-10-16) 权利要求1-10</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>CN 110023302 A (拜耳股份有限公司 等) 2019年 7月 16日 (2019-07-16) 说明书第[0015-0017]、[0189]、[1753]、[1754]、[3629]、[3631]、[3670]、[3673]、[3705]段</td> <td>1-3、7-10</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CN 110023302 A (拜耳股份有限公司 等) 2019年 7月 16日 (2019-07-16) 说明书第[0015-0017]、[0189]、[1753]、[1754]、[3629]、[3631]、[3670]、[3673]、[3705]段</td> <td>4-10</td> </tr> </tbody> </table>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	PX	Kim M. Stegmann 等. "N4-hydroxycytidine and Inhibitors of Dihydroorotate Dehydrogenase Synergistically Suppress SARS-CoV-2 Replication" bioRxiv, 2021年 6月 28日 (2021-06-28), 第1-30页, 尤其是第10页第2段	1-10	PX	CN 111773214 A (中国人民解放军军事科学院军事医学研究院) 2020年 10月 16日 (2020-10-16) 权利要求1-10	1-10	X	CN 110023302 A (拜耳股份有限公司 等) 2019年 7月 16日 (2019-07-16) 说明书第[0015-0017]、[0189]、[1753]、[1754]、[3629]、[3631]、[3670]、[3673]、[3705]段	1-3、7-10	Y	CN 110023302 A (拜耳股份有限公司 等) 2019年 7月 16日 (2019-07-16) 说明书第[0015-0017]、[0189]、[1753]、[1754]、[3629]、[3631]、[3670]、[3673]、[3705]段	4-10
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求															
PX	Kim M. Stegmann 等. "N4-hydroxycytidine and Inhibitors of Dihydroorotate Dehydrogenase Synergistically Suppress SARS-CoV-2 Replication" bioRxiv, 2021年 6月 28日 (2021-06-28), 第1-30页, 尤其是第10页第2段	1-10															
PX	CN 111773214 A (中国人民解放军军事科学院军事医学研究院) 2020年 10月 16日 (2020-10-16) 权利要求1-10	1-10															
X	CN 110023302 A (拜耳股份有限公司 等) 2019年 7月 16日 (2019-07-16) 说明书第[0015-0017]、[0189]、[1753]、[1754]、[3629]、[3631]、[3670]、[3673]、[3705]段	1-3、7-10															
Y	CN 110023302 A (拜耳股份有限公司 等) 2019年 7月 16日 (2019-07-16) 说明书第[0015-0017]、[0189]、[1753]、[1754]、[3629]、[3631]、[3670]、[3673]、[3705]段	4-10															
<p><input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p> <p>* 引用文件的具体类型:                  "A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件                  "E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利                  "L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)                  "O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件                  "P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件                  "T" 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件                  "X" 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性                  "Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性                  "&amp;" 同族专利的文件</p>																	
<p>国际检索实际完成的日期</p> <p>2021年 9月 8日</p>		<p>国际检索报告邮寄日期</p> <p>2021年 9月 27日</p>															
<p>ISA/CN的名称和邮寄地址</p> <p>中国国家知识产权局(ISA/CN)                  中国 北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088</p> <p>传真号 (86-10)62019451</p>		<p>授权官员</p> <p>杨凤娇</p> <p>电话号码 (86-512)88995733</p>															

C. 相关文件		
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
Y	XIONG, Rui 等. "Novel and Potent Inhibitors Targeting DHODH, a Rate-limiting Enzyme in de Novo Pyrimidine Biosynthesis, Are Broad-spectrum Antiviral Against RNA Viruses Including Newly Emerged Coronavirus SARS-CoV-2" bioRxiv, 2020年 3月 12日 (2020 - 03 - 12), 第1-31页, 尤其是摘要、第12页最后一段、第13页第1段	4-10
A	无. "华理与武大团队联合发现强效抗新冠病毒候选药物和老药品种" 上海化工, 第45卷, 第2期, 2020年 4月 30日 (2020 - 04 - 30), 第76页	1-10

## 第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1.  权利要求： 11-18  
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：  
[1] 权利要求11主题涉及一种预防和/或治疗与病毒有关的疾病的方法，权利要求12主题涉及一种抑制病毒在细胞中复制和繁殖的方法，但上述方法是以治疗有生命的动物体的疾病为最终目的，属于PCT细则39.1(4)条规定的疾病诊断和治疗方法范畴。  
[2] 同理，从属权利要求13-18也属于PCT细则39.1(4)条规定的疾病诊断和治疗方法范畴。
2.  权利要求：  
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索，具体地说：
3.  权利要求：  
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

国际检索报告  
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2021/106486

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	111773214	A	2020年 10月 16日	CN	111773214	B	2021年 4月 20日
CN	110023302	A	2019年 7月 16日	US	2020123129	A1	2020年 4月 23日
				US	10815215	B2	2020年 10月 27日
				JP	2019533694	A	2019年 11月 21日
				KR	20190084954	A	2019年 7月 17日
				US	2020377472	A1	2020年 12月 3日
				WO	2018077923	A1	2018年 5月 3日
				MX	2019005009	A	2019年 8月 12日
				AU	2017351688	A1	2019年 4月 11日
				CA	3041643	A1	2018年 5月 3日
				BR	112019008458	A2	2019年 7月 9日
				EP	3532468	A1	2019年 9月 4日
				TW	201827414	A	2018年 8月 1日
				US	20210188805	A9	2021年 6月 24日
				SG	11201902392	A1	2019年 4月 29日
				HK	40006139	A0	2020年 5月 15日
				VN	64781	A	2019年 7月 25日
				IN	201917015049	A	2019年 7月 19日
				ID	201907156	A	2019年 9月 27日
				PH	12019500932	A1	2020年 1月 20日
				GE	202107248	B	2021年 4月 26日