



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 119072326 A

(43) 申请公布日 2024.12.03

(21) 申请号 202380017328.1

(22) 申请日 2023.01.19

(30) 优先权数据

22305072.5 2022.01.24 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.07.15

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2023/051296 2023.01.19

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/139182 EN 2023.07.27

(71) 申请人 INSERM (法国国家健康医学研究院)

地址 法国

申请人 巴黎西岱大学

(72) 发明人 M·拉福吉 P·格雷森斯

(74) 专利代理机构 北京英创嘉友知识产权代理  
事务所(普通合伙) 11447

专利代理师 桑传标

(51) Int.Cl.

A61K 38/05 (2006.01)

A61K 38/55 (2006.01)

A61P 31/14 (2006.01)

权利要求书1页 说明书16页  
序列表(电子公布) 附图10页

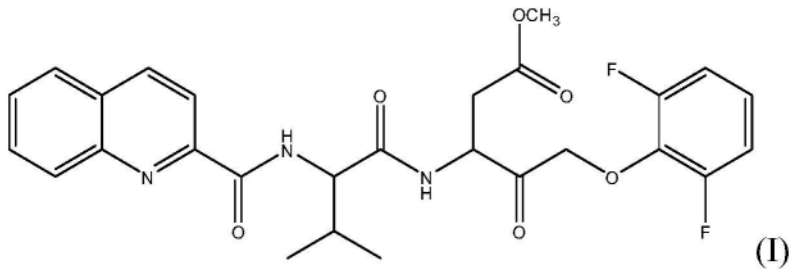
(54) 发明名称

用于预防和/或治疗由SARS-CoV-2引起的感  
染的化合物

(57) 摘要

本发明涉及治疗和/或预防由SARS-CoV-2引  
起的病毒感染的领域。本发明人发现N-(2(喹啉  
基)-缬氨酰基-0-甲基天冬氨酰基-(2,6-二氟苯  
氧基)甲基酮在体外和体内均能够抑制SARS-  
CoV-2复制,并且与利用该化合物的非0-甲基化  
形式(喹啉基-缬氨酰基-天冬氨酰基-[-2,6-二  
氟苯氧基]-甲基酮)获得的抑制相比,这种抑制  
更重要。因此,本发明涉及N-(2(喹啉基)-缬氨酰  
基-0-甲基天冬氨酰基-(2,6-二氟苯氧基)甲基  
酮或其药学上可接受的盐或溶剂化物,用于在预  
防和/或治疗由SARS-CoV-2引起的病毒感染中使  
用。本发明还涉及包含这样的化合物用于相同用  
途的药物组合物和套装试剂盒。

1. 一种用于在有需要的患者中预防和/或治疗由SARS-CoV-2引起的病毒感染的方法, 其中所述方法包括以下步骤: 向所述有需要的患者施用具有式(I)的化合物:



或其药学上可接受的盐或溶剂化物。

2. 一种用于在有需要的患者中预防和/或治疗由SARS-CoV-2引起的病毒感染的方法, 其中所述方法包括向所述有需要的患者施用药物组合物的步骤, 所述药物组合物包含作为活性成分的如权利要求1中所限定的具有式(I)的化合物或其药学上可接受的盐或溶剂化物。

3. 根据权利要求2所述的方法, 其中所述药物组合物进一步包含至少一种药学上可接受的媒介物。

4. 根据权利要求2或3所述的方法, 其中所述药物组合物进一步包含至少一种另外的治疗剂。

5. 一种用于在有需要的患者中预防和/或治疗由SARS-CoV-2引起的病毒感染的方法, 其中所述方法包括向所述有需要的患者施用套装试剂盒的步骤, 所述套装试剂盒包含以下或由以下组成:

a) 如权利要求1中所限定的具有式(I)的化合物或其盐或溶剂化物或者如权利要求2至4中任一项所限定的药物组合物, 以及

b) 至少一种另外的治疗剂或者包含至少一种另外的治疗剂的药物组合物。

6. 根据权利要求4或5所述的方法, 其中所述至少一种另外的治疗剂选自自由以下组成的组: 抗病毒剂、抗炎剂、镇痛剂、肌肉松弛剂、麻醉剂、利尿剂和抗生素剂。

7. 根据权利要求5或6所述的方法, 其中所述至少一种另外的治疗剂是N-(2(喹啉基)-缬氨酰基-谷氨酰基-(2,6-二氟苯氧基)甲基酮或其药学上可接受的或溶剂化物。

8. 根据权利要求6所述的方法, 其中所述抗病毒剂是病毒RNA依赖性RNA聚合酶调节剂或融合抑制剂。

9. 根据权利要求6所述的方法, 其中所述抗炎剂是单克隆抗体。

10. 根据权利要求1至9中任一项所述的方法, 其中实施所述方法以预防、抑制和/或减少感染SARS-CoV-2的受试者中的病毒复制和/或病毒蛋白合成。

11. 根据权利要求1至9中任一项所述的方法, 其中实施所述方法以预防COVID-19的并发症, 如COVID-19肺炎、急性呼吸窘迫综合征(ARDS)、急性呼吸衰竭以及肝脏或心脏损伤。

## 用于预防和/或治疗由SARS-CoV-2引起的感染的化合物

### 技术领域

[0001] 本发明属于治疗和/或预防病毒感染、更特别地由SARS-CoV-2引起的病毒感染的领域。

[0002] 实际上,本发明涉及用于在治疗和/或预防由SARS-CoV-2引起的感染中使用的一种特定的化合物以及包含这样的化合物的药物组合物和试剂盒,该化合物是N-(2(喹啉基)-缬氨酰基-0-甲基天冬氨酰基-(2,6-二氟苯氧基)甲基酮或其药学上可接受的盐或溶剂化物。

### 背景技术

[0003] 冠状病毒是属于冠状病毒科的单链有包膜RNA病毒。

[0004] 自21世纪初期以来,出现了几种由冠状病毒引起并影响人类的严重感染。实际上,2002年11月首次鉴定出严重急性呼吸综合征冠状病毒(SARS-CoV),而2012年6月在沙特阿拉伯检测出另一种引起人类严重并且有时甚至致命的呼吸道感染的冠状病毒,被命名为中东呼吸综合征冠状病毒(MERS-CoV)。

[0005] 2019年12月,由新型冠状病毒引起的肺炎病例爆发,并在全球范围内迅速传播。世界卫生组织(WHO)将相对应的冠状病毒首先命名为2019-nCoV,然后又命名为SARS-CoV-2,并且将相关的疾病命名为冠状病毒病2019(COVID-19)。由于该疾病在全球范围内迅速传播,WHO于2020年3月11日宣布其为大流行。

[0006] 在其基因组序列水平上,首次鉴定出的SARS-CoV-2表现出与SARS-CoV具有约80%的核苷酸同一性,与MERS-CoV具有50%的核苷酸同一性。另外,SARS-CoV-2很快被认为比SARS-CoV和MERS-CoV严重程度更低,但传染性更强。

[0007] 大多数感染SARS-CoV-2的人表现出轻度至中度呼吸道病症,有以下症状中的至少一种:发热、头痛、肌肉疼痛、疲劳、干咳、呼吸困难、味觉丧失和嗅觉丧失,但无需特殊治疗即可恢复。不过,老年人以及那些COVID-19伴有另一种医学疾病或疾患(如,例如肥胖症、心血管疾病、糖尿病、慢性呼吸系统疾病和癌症)的人可能会发展成严重疾病。在这些病例中,病症可能进展为肺炎,也称为COVID-19相关性肺炎或COVID-19肺炎和/或多器官衰竭。COVID-19的并发症可能包括急性呼吸窘迫综合征(ARDS)、急性呼吸衰竭以及肝脏或心脏损伤。

[0008] 鉴于上述情况,众多公司和公共研究组织都在努力发现能够预防和/或治疗由SARS-CoV-2引起的感染的抗病毒化合物。

[0009] 在国际申请W0 2021/228846中,本发明人已经提出了作为潜在的抗SARS-CoV-2化合物的N-(2(喹啉基)-缬氨酰基-谷氨酰基(2,6-二氟苯氧基)甲基酮。后者也称为“QVE-0Ph”、“喹啉基-Val-Glu-0Ph”或“QVD-0Ph阴性对照”。实际上,QVD-0Ph即N-(2(喹啉基)-缬氨酰基-天冬氨酰基-(2,6-二氟苯氧基)甲基酮在化学上非常接近QVE-0Ph,因为两种化合物的不同之处在于一个氨基酸的侧链,该侧链对于QVD-0Ph而言是天冬氨酸(Asp或D),对于QVE-0Ph而言是谷氨酸(Glu或E)。就活性而言,QVD-0Ph是广泛的半胱天冬酶抑制剂,而QVE-

OPh不表现出半胱天冬酶抑制活性并因此用作QVD-OPh的阴性对照。

[0010] QVD-OPh也可以以甲基化形式、更特别地以O-甲基化形式进行实施。在本披露中指定为QVDM-OPh的这种形式中,天冬氨酸侧链中羧基基团的氢原子通过酯化反应被甲基取代。国际申请WO 2009/092897中已经提出将QVD-OPh作为抗病毒化合物。更特别地,该申请中提供的实验数据表明了,QVD-OPh由于其半胱天冬酶抑制活性而抑制了受HIV感染的细胞的凋亡表型,并且还抑制了病毒复制。Laforge等人(2018)(J.Clin.Invest.[临床研究杂志],第128卷,第1627-1640页)已经证实了QVD-OPh的潜在抗HIV活性,其中由于QVD-OPh处理而在受SIV感染的恒河猴中预防了AIDS疾病进展,这使得长期控制病毒复制成为可能。不过,在国际申请WO 2009/092897或Laforge等人(2018)中没有给出关于其他类型病毒的数据。

[0011] 即使QVE-OPh未表现出任何半胱天冬酶抑制活性,本发明人已在国际申请WO 2021/228846中证明了该化合物能够抑制病毒复制,更特别地是抑制HIV病毒复制和SARS-CoV-2病毒复制。实际上,该化合物通过没有任何毒性的情况下抑制SARS-CoV-2在细胞内的复制并通过防止病毒产生和新的感染而在控制由SARS-CoV-2引起的体外感染方面非常有效。QVE-OPh的抗SRAS-CoV-2活性的实验数据仅为体外数据。另外,应当注意的是,该申请仅针对涉及HIV的实验对QVE-OPh与QVD-OPh和QVDM-OPh进行了比较。

[0012] 本发明人旨在鉴定另外的具有改进特性的抗SARS-CoV-2化合物。

## 发明内容

[0013] 本发明能够达到发明人设定的目的。

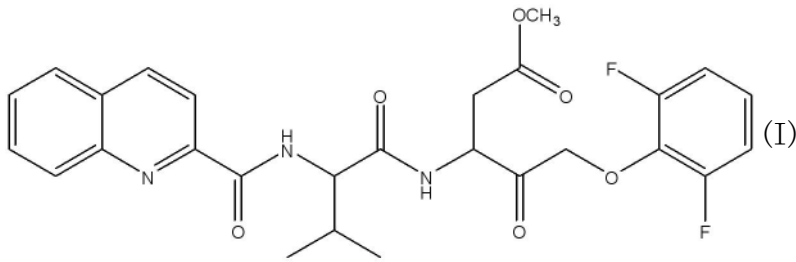
[0014] 事实上,发明人已经在体内和体外均表明了QVDM-OPh表现出对SARS-CoV-2的抑制活性。更特别地,该化合物通过没有任何毒性的情况下抑制细胞内的病毒复制并通过预防体外病毒产生和新的感染而在体外控制SARS-CoV-2感染方面有效。另外,QVDM-OPh的抗SRAS-CoV-2活性已在患有COVID-19的仓鼠体内得到证实,QVDM-OPh处理显著减少了其肺部的病毒复制。在递交本申请时,根本不清楚QVDM-OPh具有这样的活性。尽管国际申请WO 2021/228846中将QVE-OPh描述为抗HIV和抗SARS-CoV-2化合物,但这并不意味着因其抗HIV活性而众所周知的QVDM-OPh毫无疑问地具有抗SARS-CoV-2活性。实际上,一方面,HIV和SARS-CoV-2属于两种截然不同类型的病毒,即逆转录病毒和冠状病毒,另一方面,QVD-OPh和QVDM-OPh被定义为具有限定谱的抗病毒剂(国际申请WO 2021/228846第6页的第8-10行)。

[0015] 甚至更出乎意料的是,没有迹象表明QVDM-OPh会表现出比QVD-OPh更强的抗SARS-CoV-2活性,如下文实施例1中针对预防病毒产生和新的感染所说明的(图5和图9)。关于QVD-OPh与QVDM-OPh之间的差异,国际申请WO 2009/092897中指出,没有O-甲基化的化合物疏水性更低,这有利于它们在水性介质中使用(第[0057]段),并且QVD-OPh不如QVDM-OPh稳定(第[0068]段)。然而,在现有技术中没有提及或暗示它们在抗病毒活性方面的差异。特别地,国际申请WO 2021/228846(第30页第24-32行)中,观察到QVE-OPh、QVD-OPh和QVDM-OPh对HIV的病毒复制具有相同抗病毒作用。

[0016] 另外,本发明人已经表明,QVDM-OPh在患有COVID-19的仓鼠体内表现出比QVE-OPh更强的抗SRAS-CoV-2活性,如通过所比较的其肺部病毒载量和病毒复制的水平得到证实的

(图10)。

[0017] 因此,本发明涉及具有式 (I) 的化合物:



或其药学上可接受的盐或溶剂化物,用于在预防和/或治疗由SARS-CoV-2引起的病毒感染中使用。

[0018] 具有式 (I) 的化合物的化学名称是N-(2(喹啉基)-缬氨酰基-0-甲基天冬氨酰基-(2,6-二氟苯氧基)甲基酮,即QVDM-OPh(QVD-OPh的O-甲基化形式)。具有式 (I) 的化合物是泛半胱天冬酶抑制剂,可商购自Avantor™ 旗下的VWR™ 公司,参考号BIOV2787-1和BIOV2787-5。

[0019] 表述具有式 (I) 的化合物的“药学上可接受的盐”意指药学上可接受并且与具有式 (I) 的化合物的生物活性相比,即与具有式 (I) 的化合物的抗SARS-CoV-2活性相比,具有基本上相似的生物活性的盐。显然,具有式 (I) 的化合物的药学上可接受的盐是无毒的。典型地,本发明中实施的药学上可接受的盐是从具有式 (I) 的化合物获得的任何酸加成盐。该酸加成盐可以是无机酸加成盐或有机酸加成盐。作为这样的酸加成盐的说明性和非限制性实例,可以列举盐酸盐、氯化物、氢溴酸盐、溴化物、磷酸盐、磷酸氢盐、磷酸二氢盐、硫酸盐、硫酸氢盐、硼酸盐、乙酸盐、酒石酸氢盐、碳酸盐、柠檬酸盐、甲酸盐、乳酸盐、硝酸盐、草酸盐、硬脂酸盐和琥珀酸盐。更特别地,本发明中实施的具有式 (I) 的化合物的药学上可接受的盐是盐酸盐。该盐可以通过使用氯化氢获得,后者能够与具有式 (I) 的化合物的至少一个氮原子络合。

[0020] 表述具有式 (I) 的化合物的“药学上可接受的溶剂化物”意指包含具有式 (I) 的化合物以及化学计量或亚化学计量的一种或多种药学上可接受的溶剂分子(例如乙醇或水)的分子络合物。术语“水合物”是指所述溶剂是水的情况。

[0021] 具有式 (I) 的化合物的药学上可接受的盐或溶剂化物可以通过本领域熟知的技术制备,如,例如涉及沉淀步骤、过滤步骤、结晶步骤、蒸发步骤、冻干步骤和/或离子交换树脂的技术。

[0022] 本发明中实施的化合物或其任何药学上可接受的盐或溶剂化物用于预防和/或治疗由SARS-CoV-2引起的病毒感染。

[0023] 如本文所用,术语“治疗(treat/treating/treatment)”意指包括减轻、减弱或消除病况或疾病,特别是由SARS-CoV-2引起的病毒感染和/或与其相关的体征、症状和/或并发症。与病况或疾病相关的体征或症状可以是生化的、细胞的、组织学的、功能的或物理的、主观的或客观的。与病况或疾病、特别是由SARS-CoV-2引起的病毒感染相关的并发症可以是COVID-19肺炎、急性呼吸窘迫综合征(ARDS)、急性呼吸衰竭以及肝脏或心脏损伤。

[0024] 如本文所用,术语“预防(prevent/preventing/prevention)”意味着不仅包括延迟或防止病况或疾病(特别是由SARS-CoV-2引起的病毒感染和/或与其相关的体征、症状

和/或并发症)的发作,而且还包括阻止患者获得病况或疾病(特别是由SARS-CoV-2引起的病毒感染),或者减少患者获得病况或疾病(特别是由SARS-CoV-2引起的病毒感染)的风险。

[0025] 如本文所用,术语“SARS-CoV-2”不仅应理解为首次鉴定的SARS-CoV-2,还应理解为其任何变体或突变体。首次鉴定的SARS-CoV-2是最初发现的病毒株,后者也被称为2019-nCoV、HCoV-19、SARS2、COVID-19病毒、冠状病毒、肺炎病毒和人类冠状病毒2019。该冠状病毒的完整基因组(29903 bp ss-RNA)可从NCBI(“美国国家生物技术信息中心”)网站<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>以参考序列NC\_045512.2获得。

[0026] 首次鉴定的SARS-CoV-2的“突变体或变体”可以是在至少一些国家已经鉴定的任何突变体或变体,如变体阿尔法(也称为变体B.1.1.7)、变体贝塔(也称为变体B.1.351)、变体伽马(也称为变体P.1)、变体德尔塔(也称为变体B.1.617.2)以及变体奥密克戎(也称为变体B.1.1.529)及其亚谱系(也称为变体BA.1、BA.2、BA.3、BA.4和BA.5)。首次鉴定的SARS-CoV-2的“突变体或变体”还涵盖其完整基因组表现出与参考序列NC\_045512.2具有至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或者甚至至少99%同一性的任何突变体或变体。

[0027] 如本文所用,表述“两个核苷酸序列之间的同一性百分比”意味着所比较的两个序列之间相同核苷酸残基的百分比,该百分比是在两个序列之间实施最佳比对(最优比对)之后获得的。本领域技术人员知晓能够获得这样的同一性百分比的不同技术,这些技术涉及同源性算法或计算机程序,如程序BLAST。

[0028] 同一性百分比是统计学的,并且两个序列之间的差异沿着这些序列随机分布。两个序列之间的差异可以由序列的不同修饰类型组成:核苷酸残基的缺失、取代或添加。

[0029] 本发明中实施的化合物或本发明中实施的其任何药学上可接受的盐或溶剂化物可以配制成药物组合物。因此,本发明还涉及用于一种药物组合物,其包含作为活性成分的如先前定义的具有式(I)的化合物或其药学上可接受的盐或溶剂化物,用于在预防和/或治疗由SARS-CoV-2引起的病毒感染中使用。

[0030] 典型地,本发明中实施的药物组合物进一步包含至少一种药学上可接受的媒介物。

[0031] 如本文所用,表述“药学上可接受的媒介物”意味着添加到本发明中实施的活性成分中以促进其转运、避免其在所述组合物中的显著降解和/或增加其半衰期的任何物质。有利的是,这样的药学上可接受的媒介物是无菌且无热原的,并且是指当恰当地施用于动物(特别是哺乳动物,尤其是人)时,不会产生不利的、过敏性的或其他不良反应的分子实体和组合物。根据本发明的药物组合物的应用类型,特别是作为其施用模式的功能对药学上可接受的载剂进行选择。有利的是,药学上可接受的媒介物是指无毒、固态、半固态或液态的载剂、填充剂、稀释剂、添加剂、赋形剂、缓冲剂、包封材料或任何类型的配制助剂。

[0032] 本发明中实施的药物组合物可以通过以下进行施用:全身途径;肠胃外途径,例如静脉内、动脉内、腹膜内、鞘内、心室内、胸骨内、颅内、肌肉内或皮下途径;局部途径;眼部途径;口服途径;以及粘膜途径,如颊、鼻、鼻内、直肠和阴道途径。

[0033] 作为本发明中实施的用于口服施用的固态药物组合物,可以使用片剂、丸剂、粉剂、颗粒剂或胶囊剂,其中活性成分与一种或多种常规使用的惰性稀释剂如,例如淀粉、碳酸钙、蔗糖、乳糖或明胶以及可能的其他物质如,例如润滑剂(可以是硬脂酸镁或滑石)、着

色剂或包衣混合。

[0034] 作为本发明中实施的用于口服或眼部施用的液态药物组合物,可以使用药学上可接受的含有常规使用的惰性稀释剂的混悬剂、溶液、乳剂、糖浆,以及可能的其他物质如,例如润湿产品、保湿剂、甜味剂、调味剂、防腐剂或增稠剂。

[0035] 本发明中实施的用于肠胃外施用的无菌药物组合物可以是无菌的、水性或非水性溶液、混悬剂或乳剂。作为溶剂或媒介物,可以使用水、丙二醇、聚乙二醇、植物油、注射用酯(像油酸乙酯)或其他合适的有机溶剂。该组合物还可以含有佐剂,如润湿剂、等渗剂(isotonising agent)或乳化剂。

[0036] 在本发明中实施的用于局部施用的药物组合物可以是例如乳膏、洗剂、口腔喷雾剂、鼻部或眼部滴剂或者气雾剂。

[0037] 在特定的实施方式中,本发明中实施的药物组合物进一步包含至少一种另外的治疗剂。

[0038] 因此,本发明中实施的药物组合物包含以下或由以下组成:(i) 如前文所定义的具有式(I)的化合物或其药学上可接受的盐或溶剂化物,(ii) 至少一种药学上可接受的媒介物以及任选地(iii) 至少一种另外的治疗剂。特别地,本发明中实施的药物组合物包含以下或由以下组成:(i) 如前文所定义的具有式(I)的化合物或其药学上可接受的盐或溶剂化物,(ii) 至少一种药学上可接受的媒介物以及(iii) 至少一种另外的治疗剂。

[0039] 典型地,存在于本发明中实施的药物组合物中的另外的治疗剂可以是已经在预防和/或治疗由SARS-CoV-2引起的病毒感染中使用的治疗剂和已经在预防和/或治疗由SARS-CoV-2引起的病毒感染中遇到的症状或并发症中使用的治疗剂。有利的是,存在于本发明中实施的药物组合物中的另外的治疗剂选自自由以下组成的组:抗病毒剂、抗炎剂、镇痛剂、肌肉松弛剂、麻醉剂、利尿剂和抗生素剂。

[0040] 当本发明中实施的药物组合物包含至少一种另外的治疗剂,该另外的治疗剂是至少一种抗病毒剂时,显然该至少一种另外的抗病毒剂不同于具有式(I)的化合物或其药学上可接受的盐或溶剂化物。

[0041] 可在本发明中使用的抗病毒剂的第一个实例是QVE-0Ph或其药学上可接受的盐或溶剂化物,特别是如国际申请W0 2021/228846中所披露的。针对QVDM-0Ph的药学上可接受的盐或溶剂化物已经披露的内容加以必要的修改适用于QVE-0Ph的药学上可接受的盐或溶剂化物。换句话说,本发明中实施的药物组合物的至少一种另外的治疗剂可以是N-(2(喹啉基)-缬氨酰基-谷氨酰基-(2,6-二氟苯氧基)甲基酮或其药学上可接受的盐或溶剂化物。

[0042] 作为可在本发明中使用的其他抗病毒剂,可以列举病毒RNA依赖性RNA聚合酶调节剂,如核苷酸类似物和融合抑制剂。后者防止SARS-CoV-2包膜与细胞膜之间的融合,然后防止SARS-CoV-2进入细胞。有利的是,融合抑制剂是丝氨酸/蛋白酶抑制剂、血管紧张素转换酶2(ACE2)抑制剂或抗疟/杀寄生虫药物。因此,可在本发明中使用的融合抑制剂选自自由以下组成的组:瑞德西韦、甲磺酸卡莫司他、甲磺酸萘莫司他、磷酸氯喹、羟氯喹、千金藤素、塞拉菌素以及甲氟喹及其盐如盐酸甲氟喹。

[0043] 作为可在本发明中使用的抗炎剂,可以列举单克隆抗体。后者优选针对炎性白细胞介素及其受体如IL-6及其受体。因此,可在本发明中使用的单克隆抗体选自自由以下组成的组:托珠单抗、萨瑞鲁单抗(sarilumab)和司妥昔单抗(siltuximab)。

[0044] 可选地或另外地,存在于本发明中实施的药物组合物中的另外的治疗剂选自由以下组成的组:顺苯磺酸阿曲库铵、地塞米松磷酸钠、盐酸右美托咪定、柠檬酸芬太尼、吠塞米、盐酸氢吗啡酮、盐酸氯胺酮、劳拉西泮、盐酸咪达唑仑、硫酸吗啡、重酒石酸去甲肾上腺素、罗库溴铵、盐酸万古霉素(vancomycin hydrochloride)和维库溴铵。

[0045] 在特定的实施方式中,本发明中实施的药物组合物包含选自前文所定义的列表中的相同列表或不同列表中的至少两种或至少三种另外的治疗剂。

[0046] 在更特定的实施方式中,本发明中实施的药物组合物包含以下或由以下组成:(i) 如前文所定义的具有式(I)的化合物或其药学上可接受的盐或溶剂化物,(ii) 至少一种药学上可接受的媒介物,(iii)<sub>1</sub> 前文所定义的至少一种另外的抗病毒剂以及 (iii)<sub>2</sub> 前文所定义的至少一种抗炎剂。

[0047] 本发明中实施的药物组合物的剂量必须是药学有效量。“药学有效量”意指足以以可适用于医学治疗的合理益处/风险比预防或治疗疾病的量,并且有效剂量的水平可以由本领域技术人员根据如,例如配制方法、患者的病况(包括体重、性别和年龄)、疾病程度、药物形式、施用途径、施用周期(如果该施用实施单次或分次剂量)、排泄速率和反应敏感性等因素而进行不同选择。如本领域技术人员所知,有效量可以根据处理途径、赋形剂的使用以及与其他治疗剂一起使用的可能性而变化。

[0048] 本发明还涉及一种套装试剂盒,其包含以下或由以下组成:

a) 前文所定义的具有式(I)的化合物或其药学上可接受的盐或溶剂化物或者包含其的药物组合物,以及

b) 至少一种另外的治疗剂,特别是如前文所定义的,或者包含至少一种另外的治疗剂的药物组合物,

用于在预防和/或治疗由SARS-CoV-2引起的病毒感染中使用。

[0049] 针对包含具有式(I)的化合物或其药学上可接受的盐或溶剂化物的药物组合物已经披露的内容加以必要的修改适用于包含至少一种另外的治疗剂的药物组合物。

[0050] 套装试剂盒也可以定义为上文所定义的要素a)和b)的组合。

[0051] 当不能将具有式(I)的化合物或其药学上可接受的盐或溶剂化物和至少一种另外的治疗剂配制在相同药物组合物中和/或当要将具有式(I)的化合物或其药学上可接受的盐或溶剂化物或者包含其的药物组合物和至少一种另外的治疗剂或包含其的药物组合物分开或顺序施用时,这样的套装试剂盒在本发明中是特别受关注的。

[0052] 因此,可以将本发明中实施的套装试剂盒同时、分开或顺序使用,特别是用于预防和/或治疗由SARS-CoV-2引起的病毒感染。

[0053] 如本文所用,同时使用意指将上文所定义的要素a)与上文所定义的要素b)同时施用于患者。患者水平下的施用区域以及进而施用途径可以相同或不同。

[0054] 如本文所用,分开或顺序使用意指将上文所定义的要素a)和b)分开或顺序施用,前提是要素a)对患者发挥其药理学作用的时间段和要素b)对患者发挥其药理学作用的时间段至少部分交叉。

[0055] 如本文所用,“患者”、“有需要的患者”、“受试者”和“有需要的受试者”意指处于发展为由SARS-CoV-2引起的病毒感染的风险中的受试者或已经被SARS-CoV-2感染的受试者。受试者可以是非人类动物或人类。可以通过检测来源于受试者的样品如唾液、血液或鼻咽

样品中的SARS-CoV-2蛋白或SARS-CoV-2特异性抗体来证实感染。被SARS-CoV-2感染的受试者可以是有症状的、缺乏典型症状或无症状的。有需要的受试者也可以是在从最初的病症恢复后遭受中长期影响的受试者。这些中长期影响被称为“COVID-19后病况”或“长期COVID”，尤其是“神经系统长期COVID”。

[0056] 另外,将如前文所定义用于使用的具有式 (I) 的化合物或其药学上可接受的盐或溶剂化物、如前文所定义用于使用的药物组合物和/或如前文所定义用于使用的套装试剂盒实施用于预防、抑制和/或减少感染SARS-CoV-2的受试者中的病毒复制和/或病毒蛋白合成。在该实施方式中,受试者也可以是非人类动物或人类。对病毒复制和/或病毒蛋白合成的预防或抑制可以是部分的或全部的。

[0057] 如本文所用,表述“病毒复制”包括病毒复制周期的全部步骤。特别地,该表述包括SARS-CoV-2复制的主要步骤,包括病毒进入细胞、病毒复制和转录复合物的形成、病毒基因组RNA复制、通过负模板的转录和翻译形成结构蛋白以及病毒颗粒的组装。

[0058] 可以例如在体外对前文所定义的具有式 (I) 的化合物或其药学上可接受的盐或溶剂化物、药物组合或套装试剂盒预防、抑制和/或减少病毒复制和/或病毒蛋白质合成的能力进行评估。下文的实施例1提出了用于进行这种评估的技术,包括蛋白质印迹分析和qRT-PCR分析。

[0059] 此外,将如前文所定义用于使用的具有式 (I) 的化合物或其药学上可接受的盐或溶剂化物、如前文所定义用于使用的药物组合物和/或如前文所定义用于使用的套装试剂盒实施用于在预防COVID-19的并发症如COVID-19肺炎、急性呼吸窘迫综合征 (ARDS)、急性呼吸衰竭以及肝脏或心脏损伤中使用。

[0060] 本发明涉及一种用于在有需要的患者中预防和/或治疗由SARS-CoV-2引起的病毒感染的方法,其中所述方法包括向有需要的患者施用如前文所定义的具有式 (I) 的化合物或其药学上可接受的盐或溶剂化物、如前文所定义的药物组合物或者如前文所定义的套装试剂盒的步骤。

[0061] 如针对药物组合物已经披露的,具有式 (I) 的化合物或其药学上可接受的盐或溶剂化物以及套装试剂盒的要素a) 和b) 可以通过以下进行施用:全身途径;肠胃外途径,例如静脉内、动脉内、腹膜内、鞘内、心室内、胸骨内、颅内、肌肉内或皮下途径;局部途径;眼部途径;口服途径以及粘膜途径,如颊、鼻、鼻内、直肠和阴道途径。

[0062] 另外,如针对药物组合物已经披露的,要将具有式 (I) 的化合物或其药学上可接受的盐或溶剂化物以及套装试剂盒的要素a) 和b) 以药学有效量进行施用。前文针对药物组合物给出的定义加以必要的修改适用于具有式 (I) 的化合物或其药学上可接受的盐或溶剂化物以及套装试剂盒的要素a) 和b)。

[0063] 在特定的实施方式中,可以实施这种预防和/或治疗方法,以便在感染SARS-CoV-2的受试者中预防、抑制和/或减少病毒复制和/或病毒蛋白合成。

[0064] 在另一个特定的实施方式中,可以实施这种预防和/或治疗方法,以便预防COVID-19的并发症如COVID-19肺炎、急性呼吸窘迫综合征 (ARDS)、急性呼吸衰竭以及肝脏或心脏损伤,更特别地是在有需要的患者中,更特别是在感染SARS-CoV-2的受试者中。

[0065] 阅读下面的实施例后,本发明的其它特征和优点对于本领域技术人员来说将更加显而易见,给出这些实施例仅作为说明而非限制,并参考附图。

## 附图说明

[0066] 图1:QVDM-OPh肽对Vero E6/TMPRSS2细胞的毒性测试

使未感染或用MOI为0.05的SARS-CoV-2感染的Vero-E6/TMPRSS2细胞,每天与在25  $\mu$ M、50  $\mu$ M、100  $\mu$ M浓度下的不同浓度QVDM-OPh一起孵育,72小时后收集。将细胞用PBS洗涤两次,之后在4°C下进行活性固定染料染色30分钟,然后洗涤并用2%多聚甲醛(PFA)固定,并在Fortessa Flux细胞仪上进行分析。每种条件记录30 000次事件,一式三份。使用FlowJo软件进行分析,并根据分析报告计算活力百分比。结果代表4个独立实验的平均值 $\pm$ SD,每种条件分别有3个独立点。

[0067] 图2:完全处理条件下QVDM-OPh肽对SARS-CoV-2诱导的感染和死亡率的作用。用于对未处理或用不同化合物处理的受感染细胞中的SARS-CoV-2刺突(S)蛋白表达进行细胞内检测的流式细胞术分析。

[0068] A) 在感染之前,将未感染或用MOI为0.05的SARS-CoV-2感染的Vero-E6/TMPRSS2细胞与不同浓度的QVDM-OPh(10  $\mu$ M, 25  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, 100  $\mu$ M)、Vx765(25  $\mu$ M)或瑞德西韦(10  $\mu$ M)一起孵育1小时。之后,在不从培养物中除去病毒的情况下,将细胞用含药物的培养基进行培养直至实验结束(完全处理)。感染后72小时,收集细胞并染色进行死亡率和感染率分析。感染百分比(%)呈现在每个分析图中。

[0069] B) 结果表示与受感染的未处理组相比,在不同的受感染并经处理的细胞中通过刺突蛋白染色检测到的感染百分比(%)。结果代表4个独立实验的平均值 $\pm$ SD,每种条件分别有3个独立点。使用GraphPad Prism软件(GraphPad软件公司,美国),应用单因素方差分析检验,然后是Dunnett事后检验来评估统计学显著性。(\*\*\*\* $P < 0.0001$ )。

[0070] 图3:完全处理条件下QVDM-OPh肽在体外对病毒复制和病毒蛋白表达的作用。用于对未处理或用不同化合物处理的受感染细胞中的SARS-CoV-2刺突(S)蛋白和核衣壳(N)蛋白进行细胞内检测的蛋白质印迹分析。

[0071] A-B) 在用MOI = 0.05的病毒进行感染之前,用指定浓度的QVDM-OPh肽或瑞德西韦将Vero E6/TMPRSS2细胞预处理1小时。之后,将细胞用含药物的培养基进行培养直至实验结束(完全处理)。将有未受感染的细胞的孔作为感染的阴性对照。在感染后72小时,通过RIPA缓冲液裂解细胞,并进行蛋白质印迹分析以检测刺突蛋白(S)(全长和S1结构域)以及核衣壳蛋白(N)的表达。将GAPDH用作加样对照。结果代表来自4个独立实验的平均值  $\pm$  SD,每个条件3个独立点。

[0072] 图4:完全处理条件下QVDM-OPh肽在体外对病毒复制的作用。对未处理或用QVDM-OPH处理的受感染细胞中的SARS-CoV-2刺突(S)、核衣壳(N)和NSP6基因进行的细胞内qRT-PCR分析。

[0073] A-B-C) 在用MOI = 0.05的病毒进行感染之前,用指定浓度的QVDM-OPH肽将Vero E6/TMPRSS2细胞预处理1小时。之后,将细胞用含药物的培养基进行培养直至实验结束(完全处理)。将有未受感染的细胞的孔作为感染的阴性对照。在感染后72小时,将细胞在LBP缓冲液中裂解用于RNA纯化,并进行RT-qPCR分析以检测刺突蛋白(S)、核衣壳蛋白(N)和NSP6的基因表达。将每种基因的相对mRNA量相对于GAPDH mRNA表达归一化。使用 $\Delta\Delta$ Ct方法计算倍数变化。结果代表来自4个独立实验的平均值  $\pm$  SD,每个条件3个独立点。

[0074] 图5:完全处理条件下QVDM-OPh肽在体外对SARS-CoV-2的抗病毒活性。通过qRT-

PCR对受感染细胞上清液中的病毒产量进行定量。

[0075] A-B) 在用MOI = 0.05的病毒进行感染之前,用指定浓度的QVD-OPh (QVD)、QVDM-OPh (QVDM) 或瑞德西韦将Vero E6/TMPRSS2细胞预处理1小时。将有未受感染的细胞的孔作为感染的阴性对照。之后,将细胞用含药物的培养基进行培养直至实验结束(完全处理)。在感染后72小时,收集上清液,并提取病毒RNA。使用针对SARS-CoV-2 N基因或NSP6基因的探针对上清液进行实时PCR分析。结果表示平均值+SEM(n = 3)。使用单因素方差分析检验,然后是Dunnett事后检验探究平均值之间差异的比较。与未处理组相比,\*\*\* $p < 0.001$ 。

[0076] 图6:进入后处理条件下QVDM-OPh肽对SARS-CoV-2诱导的感染和死亡率的作用。用于对未处理或用不同化合物处理的受感染细胞中的SARS-CoV-2刺突(S)蛋白表达进行检测的流式细胞术分析。

[0077] A) 将Vero E6/TMPRSS2用MOI为0.05的病毒感染2小时,然后从培养基中除去病毒。然后,将细胞与不同浓度的QVDM-OPh (10  $\mu$ M, 25  $\mu$ M, 50  $\mu$ M和100  $\mu$ M)、Vx765 (25  $\mu$ M) 或瑞德西韦 (10  $\mu$ M) 一起孵育72小时(进入后)。每天将药物以不同浓度培养基进行添加,直至实验结束。感染后72小时,收集细胞并染色进行死亡率和感染率分析。感染百分比(%)呈现在每个分析图中。

[0078] B) 结果表示与未处理的对照组(n = 3)相比而染色的刺突蛋白表达的抑制百分比(%)的平均值+SEM。

[0079] 图7:进入后(post-entry)处理条件下QVDM-OPh肽在体外对病毒复制和病毒蛋白表达的作用。用于对未处理或用不同化合物处理的受感染细胞中的SARS-CoV-2刺突(S)蛋白和核衣壳(N)蛋白进行细胞内检测的蛋白质印迹分析。

[0080] A-B) 将Vero E6/TMPRSS2细胞感染,然后在与图6中所述相同的条件下用指定浓度的QVDM-OPh或瑞德西韦进行处理。将有未受感染的细胞的孔作为感染的阴性对照。在感染后72小时,通过RIPA缓冲液裂解细胞,并进行蛋白质印迹分析以检测刺突蛋白(S)(全长和S1结构域)以及核衣壳蛋白(N)的表达。将GAPDH用作加样对照。结果代表来自4个独立实验的平均值  $\pm$  SD,每个条件3个独立点。

[0081] 图8:进入后处理条件下QVDM-OPh肽在体外对病毒复制的作用。对未处理或用QVDM-OPh处理的受感染细胞中的SARS-CoV-2刺突(S)、核衣壳(N)和NSP6基因进行的细胞内qRT-PCR分析。

[0082] A-B-C) 将Vero E6/TMPRSS2细胞用MOI为0.05的病毒感染2小时,然后从培养基中除去病毒。然后,将细胞与不同浓度的QVDM-OPh一起孵育72小时(进入后)。每天将药物以不同浓度培养基进行添加,直至实验结束。将有未受感染的细胞的孔作为感染的阴性对照。在感染后72小时,将细胞在LBP缓冲液中裂解用于RNA纯化,并进行RT-qPCR分析以检测刺突蛋白(S)、核衣壳蛋白(N)和NSP6的基因表达。将每种基因的相对mRNA量相对于GAPDH mRNA表达归一化。使用 $\Delta\Delta$ Ct方法计算倍数变化。结果代表来自4个独立实验的平均值  $\pm$  SD,每个条件3个独立点。

[0083] 图9:进入后处理条件下QVDM-OPh肽在体外对SARS-CoV-2的抗病毒活性。通过qRT-PCR对受感染细胞上清液中的病毒产量进行定量。

[0084] A-B) 将Vero E6/TMPRSS2细胞用MOI为0.05的病毒感染2小时,然后从培养基中除去病毒。然后,将细胞与不同浓度的QVD-OPh (QVD)、QVDM-OPh (QVDM) 或指定浓度的瑞德西韦

一起孵育(进入后)。每天将药物以不同浓度培养基进行添加,直至实验结束。将有未受感染的细胞的孔作为感染的阴性对照。在感染后72小时,收集上清液,并提取病毒RNA。使用针对SARS-CoV-2 N基因或NSP6基因的探针对上清液进行实时PCR分析。结果表示平均值+SEM( $n = 3$ )。使用单因素方差分析检验,然后是Dunnett事后检验探究平均值之间差异的比较。与未处理组相比,\*\*\* $p < 0.001$ 。

[0085] 图10:在COVID-19金黄叙利亚仓鼠模型中QVDM-OPh和QVE-OPh对SARS-CoV-2的作用

将金黄叙利亚仓鼠在D-3随机分组,按每只动物 $10^5$  pfu TCID<sub>50</sub>接种SARS-CoV-2。所有组在第0天(D0)通过鼻内(IN)途径接受SARS-CoV-2。在D0,将QVDM-OPh和QVE-OPh肽或媒介物通过腹膜内(IP)途径以10 mL/kg的总体积且每个接种时间点进行施用。在D0(t+1h)和第1天(D1)接种了试验物。第2天(D2)是研究的最后一天。

[0086] A) 在感染后D0、D1和D2,经媒介物、QVE-OPH和QVDM-OPH处理的动物组之间的平均体重变化曲线(与D0相比)。

[0087] B) 在2 dpi,接种SARS-CoV-2的金黄叙利亚仓鼠肺部的病毒RNA表达水平(平均值+SD),每个点 $n = 5$ 。结果表示为 $2^{-\Delta CT}$ 。曼-惠特尼(Mann-Whitney)检验比较受感染的动物与模拟物(A)。\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ 。

[0088] C) 与媒介物相比,从在2 dpi接种SARS-CoV-2并用QVE-OPH或QVDM-OPH处理的金黄叙利亚仓鼠获得的肺部中的病毒复制下降的百分比。

[0089] 实施例1

材料和方法

细胞、病毒和药物

非洲绿猴肾Vero E6/TMPRSS2细胞系是从波尔多大学(University of Bordeaux) Andreola Marie-Aline博士处善意获得的,并在37°C、5% CO<sub>2</sub>的湿润气氛中维持在伊格尔培养基(Eagle's medium)(杜尔贝科改良伊格尔培养基(Dulbecco's modified Eagle's medium);英杰公司(Invitrogen)的Gibco,补充有10%热灭活FBS、1% PS(青霉素10,000 U/ml;链霉素10,000 μg/ml))中。毒株BetaCoV/法国/IDF0372/2020由巴斯德研究所(Institut Pasteur)(法国巴黎)主办并由Sylvie van der Werf教授领导的国家呼吸道病毒参考中心(National Reference Centre for Respiratory Viruses)提供。从中分离出毒株BetaCoV/法国/IDF0372/2020的人类样品是由法国巴黎Bichat医院的X.Lescure博士和Y.Yazdanpanah教授提供的。此外,毒株BetaCoV/法国/IDF0372/2020是通过“欧洲病毒资源库:走向全球(European Virus Archive goes Global, Evag)”平台提供的,该平台是一项根据第653316号拨款协议获得了欧盟地平线2020研究和创新计划资助的项目。在以 $1 \times 10^{-4}$  PFU的感染复数感染的Vero-E6细胞上产生病毒储液。在感染后3天收获病毒,澄清,然后等分并储存在-80°C。使用半固体覆盖物(Avicel, RC581-NFDR080I, 杜邦公司(DuPont))通过经典空斑测定在Vero-E6细胞上对病毒储液进行滴定。所有感染实验均在CRC(Cordelier研究中心(Cordelier Research Center))的生物安全3级(BLS-3)实验室中进行。称为QVDM-OPH的泛半胱天冬酶抑制剂Q-VD(OME)-OPH(目录号BIOV2787-5)和QVE-OPH购自艾万拓公司旗下的VWR公司(Avantor-VWR)和哈罗生物公司>Hello Bio)。瑞德西韦购自COGER(目录号AG--CR1-3713-M005), Vx765(半胱天冬酶-1抑制剂)(目录号BIOV2781-5)购

自艾万拓公司旗下的VWR公司。

#### [0090] 对抗病毒活性、毒性和感染抑制的评估

为了评估QVDM-OPh对Vero E6细胞的毒性和抗病毒功效,通过流式细胞术测量死亡率百分比和受感染细胞的百分比。将细胞在24孔细胞培养皿中培养过夜,密度为 $75 \times 10^4$ 个细胞/孔。第二天,将细胞用不同剂量的指定QVDM-OPh、Vx765或瑞德西韦在不同浓度下预处理1小时或不进行预处理。然后,接着以MOI 0.05添加病毒以允许在250  $\mu$ l/孔中感染2小时。之后,将完全培养基添加到细胞培养物中至最终体积为500  $\mu$ l/孔。每天将相同浓度的药物添加到细胞培养物中。感染后72小时,收集细胞上清液并立即冷冻于 $-80^\circ\text{C}$ ,用于进行病毒提取和qRT-PCR扩增。收集细胞,并根据制造商的说明使用针对刺突蛋白(SARS-CoV-2刺突蛋白-Alexa 647,目录号51-6490-82,eBioscience公司)的细胞内染色和Cytotfix/cytoperm固定透化试剂盒(目录号554714,BD公司)将一部分细胞用于进行流式细胞术分析以测量感染率。根据制造商的说明,使用活性405/452固定染料(目录号130-109-814,来自德国美天旎生物技术公司(Miltenyi Biotec))对毒性进行分析。简而言之,将细胞用PBS洗涤两次,然后在 $4^\circ\text{C}$ 下用活性固定染料染色30分钟。然后,将细胞通过Cytotfix/cytoperm缓冲液透化20分钟,并在用permawash缓冲液洗涤两次后,将抗刺突-Alexa 647添加到细胞中, $4^\circ\text{C}$ 下持续30分钟。染色后,将细胞用2%多聚甲醛(FPA)固定,然后在Fortessa流式细胞仪上进行分析。每种条件记录30 000次事件,一式三份。使用FlowJo软件进行分析。将另一部分细胞在含有蛋白酶(罗氏公司(Roche))和磷酸酶抑制剂(英杰公司)的RIPA裂解缓冲液(英杰公司,目录号10230544)中裂解用于进一步定量和免疫印迹分析,或者在LBP缓冲液中裂解用于RNA纯化和RT-qPCR分析。每种条件在同一实验中一式三份( $n = 3$ )进行,并重复进行4个独立实验。

#### [0091] 时间添加(Time-of-addition)实验

使用QVDM-OPh(10  $\mu$ M,25  $\mu$ M,50  $\mu$ M和100  $\mu$ M)、Vx765(25  $\mu$ M)和瑞德西韦(5  $\mu$ M和10  $\mu$ M)进行时间添加实验。将Vero E6细胞( $75 \times 10^3$ 个细胞/孔)在病毒感染的不同阶段用QVDM-OPh、Vx765和瑞德西韦进行处理。对于“全时”处理,在病毒感染前将Vero E6细胞用药物预处理1小时,然后在药物存在下与病毒一起孵育2小时直至实验结束。对于“进入后”实验,将病毒添加到细胞中以允许感染2小时,然后用含药物的培养基替换含病毒的上清液,直至实验结束。

#### [0092] 在Vero E6/TMPRSS2细胞中进行的RNA提取和定量实时RT-PCR(qRT-PCR)

##### 从上清液提取病毒RNA

根据制造商的说明,使用MiniBEST病毒RNA/DNA提取试剂盒(宝生物公司(Takara),目录号9766)将两百微升细胞培养物上清液用于病毒RNA提取。将RNA在30  $\mu$ L不含RNA酶的水中洗脱。

#### [0093] 细胞内RNA纯化

用PBS洗涤后,将细胞用LBP裂解并储存在 $-80^\circ\text{C}$ 。根据制造商推荐的程序使用“Nucleospin RNA PLUS”试剂盒(马歇雷纳格尔公司(Machery Nagel),货号740984.250)进行ARN纯化。将RNA在30  $\mu$ L不含RNA酶的水中洗脱。

#### [0094] 定量实时RT-PCR(qRT-PCR)

按照制造商推荐的程序,使用含gDNA去除剂的PrimeScript RT试剂盒(宝生物公

司,目录号RR047A)将总RNA转化为cDNA。使用TB Green Premix Ex Taq II(宝生物公司,目录号RR820A)进行定量PCR。简而言之,每个反应由含有以下的25  $\mu$ L总体积组成:1  $\mu$ L的每种引物[0.4  $\mu$ M/ $\mu$ L]、2  $\mu$ l的cDNA(5ng/ $\mu$ L)、12.5  $\mu$ l的TB Green Premix Ex Taq II和8.5  $\mu$ L的不含RNA酶的水。

[0095] 使用伯乐公司(Bio Rad)CFX384实时系统PCR仪进行实时PCR。所使用的热循环条件如下:初始变性:95 $^{\circ}$ C 30秒,随后在96 $^{\circ}$ C 5秒和60 $^{\circ}$ C 30秒下扩增40个循环。由Abdel-Sater等人(2021) (“A Rapid and Low-Cost protocol for the detection of B.1.1.7 lineage of SARS-CoV-2 by using SYBR Green-Based RT-qPCR [使用基于SYBR绿色的RT-qPCR快速低成本检测SARS-CoV-2的B.1.1.7谱系的方案]”, medRxiv预印本 doi:<https://doi.org/10.1101/2021.01.27.21250048>)设计和描述的用于SARS-CoV-2核衣壳(N)、非结构蛋白6(NSP6)和刺突(S)基因的引物购自欧陆集团(Eurofins)。对于细胞外病毒mRNA的相对定量,使用SARS-CoV-2 cDNA(对于N和NSP6基因,Ct约20)作为阳性对照。使用 $\Delta$  Ct方法将计算的Ct值转换为经处理的样品与阳性对照相比的倍数减少(病毒RNA的倍数变化 =  $2^{-\Delta Ct}$ )。

[0096] 对于细胞内mRNA,使用仪器软件和自动Ct功能获得每个基因的阈值循环(Ct)值。将每种基因的相对mRNA量相对于GAPDH mRNA表达归一化。使用 $\Delta$   $\Delta$  Ct方法计算倍数变化。实验中使用的特异性SARS-CoV-2(N、NSP6和S)和人类(GAPDH)引物序列如下:

N-qF:CGTTTGGTGGACCCTCAGAT(序列列表中的SEQ ID NO:1);  
N-qR:CCCCACTGCGTTCTCCATT(序列列表中的SEQ ID NO:2);  
NSP6-qF:GGTTGATACTAGTTTGTCTGGTTTT(序列列表中的SEQ ID NO:3);  
NSP6-qR:AACGAGTGTCAAGACATTCATAAG(序列列表中的SEQ ID NO:4);  
S-qF:GGTCCATGCTATACATGTCTC(序列列表中的SEQ ID NO:5);  
S-qR:GGTCTTCGAATCTAAAGTAGTACCA(序列列表中的SEQ ID NO:6);  
GAPDH-qF:AAGGTCGGAGTCAACGGATTT(序列列表中的SEQ ID NO:7);  
GAPDH-qR:TGAAGGGGTCATTGATGGCA(序列列表中的SEQ ID NO:8)。

#### [0097] 蛋白质印迹分析

对于蛋白质印迹分析,将来自每个点的40  $\mu$ g蛋白质在4%-12% Bis-Tris-SDS-NUPAGE凝胶(英杰公司)上进行拆分,然后转移到硝酸纤维素膜(安玛西亚生物科学公司(Amersham Bioscience))上。在用含有0.05%吐温20的TBS缓冲液中的5% BSA封闭后,接着用小鼠抗刺突蛋白(S1-NTD)(E7M5X)(Ozyme公司,目录号42172S)、兔抗核衣壳(飞世尔科学公司(Fisher Scientific),目录号MA536086)对膜进行探测。通过用兔抗GAPDH(三鹰生物技术公司(Protein Tech),目录号60004-1-AP)对膜进行探测来评估相等的蛋白质加样。用辣根过氧化物酶连接的山羊抗小鼠或抗兔二抗(安玛西亚生物科学公司)对膜进行处理。使用CCD相机(GBOX,SYNGENE Pxi-4,Ozyme公司)通过增强化学发光(皮尔斯公司(Pierces),美国)对免疫反应性蛋白进行检测和定量。

#### [0098] 结果

用不同浓度的QVDM-OPh肽处理表明对Vero E6/TMPRSS2细胞没有毒性作用,无论这些细胞在感染后72小时是否用MOI为0.05的病毒进行感染(图1)。

[0099] 通过流式细胞术分析,使用针对SARS-CoV-2刺突蛋白的细胞内染色和活性染料来

测量死亡率,评价了不同浓度的QVDM-OPh的抗病毒和死亡率作用。在研究期间,将瑞德西韦用作阳性对照,Vx765用作阴性对照。对于刺突蛋白和核衣壳蛋白,还通过对病毒蛋白表达的蛋白质印迹分析评估了QVDM-OPh对SARS-CoV-2复制的作用。通过流式细胞术和蛋白质印迹获得的结果表明,QVDM-OPh在10  $\mu$ M剂量(抑制约为50%)和25  $\mu$ M剂量(抑制约为70%)下对病毒复制有显著抑制。在50  $\mu$ M浓度时完全得到抑制(抑制约为99%)。在感染后72小时内,在病毒持续存在于培养物中的情况下(完全处理条件),每日剂量下均观察到了这种作用。这种减少与利用瑞德西韦获得的减少相当(图2和图3)。

[0100] 然后,发明人探索了SARS-CoV-2病毒基因的mRNA表达,并且更特别地是探索了经QVDM-OPh处理或未经处理的受感染细胞内刺突(S)、核衣壳(N)和非结构蛋白6或辅助蛋白ORF6(NSP6)的基因表达。实际上,QVDM-OPh处理能够显著减少细胞内的结构蛋白、刺突、核衣壳和NSP6基因的相对表达(图4)。

[0101] 最后,发明人验证了QVDM-OPh是否抑制病毒从细胞到培养基的分泌/产生。为此,她在进行病毒提取和qRT-PCR后针对核衣壳(N)和NSP6基因表达对在完全处理条件下经不同抑制剂处理或未经处理的受感染细胞的上清液进行了分析。SARS-CoV-2在Vero E6/TMPRSS2受感染并经QVDM-OPh处理的细胞的上清液中与经瑞德西韦处理的细胞的上清液中一样显著减少(图5)。

[0102] 在进入后处理条件下再现了所有这些结果,其中将细胞感染了2小时,然后将病毒从更换了新鲜培养基的培养基中完全去除。所有药物均在感染2小时后以不同浓度添加,并在72小时期间每天进行添加。在进入后条件下进行的实验显示出与在完全处理条件下的所有实验中描述的相同作用(图6、图7、图8和图9)。

[0103] 本发明人的发现证明,QVDM-OPh肽通过在甚至25  $\mu$ M和50  $\mu$ M的浓度时也没有任何毒性的情况下抑制细胞内的病毒复制并防止病毒产生和新的感染而在体外控制SARS-CoV-2感染方面非常有效。

[0104] 另外,当将在同等浓度下使用的QVDM-OPh和QVD-OPh之间进行比较时(图5和图9),QVDM-OPh能够比在相同浓度下实施的QVD-OPh更有效地抑制病毒从细胞到培养基的分泌/产生。

[0105] 实施例2

材料和方法

*COVID-19*金黄叙利亚仓鼠模型

1. 伦理声明

动物舍饲和实验程序是根据法国和欧洲法规以及国家研究委员会的实验动物护理和使用指南进行的。动物设施得到法国当局批准(协议N° B 91 962 106)。本研究中使用的所有动物程序(包括手术、麻醉和安乐死,如适用)均已提交给法国当局认可的Oncodesign的实验动物管理和使用委员会(Oncomet)(CNREEA协议N° 91)。

[0106] 动物BSL3设施得到法国当局批准(协议N° D92-032-02)。本研究中使用的所有动物程序(包括手术、麻醉和安乐死,如适用)均已提交给法国当局认可的CEA的实验动物管理和使用委员会(CETEA DSV - n° 44)。

[0107] 2. 舍饲条件

根据FELASA指南,使动物维持在处于无特定病原体的健康状态。对动物进行了单

独鉴定。将动物维持在受控环境条件下的舍饲室中,即温度: $21^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ,湿度: $55\% \pm 10\%$ ,光周期(12小时光照/12小时黑暗),H14过滤空气,每小时最少12次空气交换,没有再循环。

[0108] 每个笼子都标有专门的代码。动物围栏提供了无菌和充足的空间,有垫料、食物和水、环境和社交丰容(群体舍饲),如下所述:A3设施:IsoRat900N生物防护系统(泰尼百斯公司(Techniplast),法国)、杨木垫料(Select fine,安全级,法国)、A04 SP-10饲料(安全级,法国)、自来水以及带有洞穴通道和木棍的环境丰容。

[0109] 3. SARS-CoV-2

- SARS-CoV-2毒株“斯洛伐克/SK-BMC5/2020”,最初由欧洲病毒资源库全球(EVAg)提供(GISAID EPI\_ISL\_417879,<https://www.european-virus-archive.com/virus/sars-cov-2-strainslovakias-bmc52020>),由OncoDesign在Vero E6/TMPRSS2细胞上制备和滴定,用于仓鼠感染。该毒株属于GH进化枝。

[0110] - 在接种了 $50 \times 10^6$ 个Vero E6/TMPRSS2细胞的T175烧瓶中进行病毒产生,最终体积为40 mL。借助ViCell装置通过0.25%台盼蓝拒染测定评估细胞计数和活力。在48小时的感染时间范围(用MOI为0.001-0.005的SARS-CoV-2病毒)后,在显微镜观察下证实了致细胞病变作用。将培养物上清液收获、离心(5000 g下5分钟)并进行等分(1 mL等分试样)。

[0111] - 在Vero E6/TMPRSS2细胞上测定了病毒储液TCID<sub>50</sub>滴度。在试验前约2小时,在96孔板中将细胞以每孔 $2 \times 10^4$ 个细胞的密度铺板在体积为200  $\mu\text{L}$ 的完全生长培养基(DMEM 10% FCS)中。将细胞用病毒储液的系列稀释(8个重复;第一次稀释1 : 100;5倍系列稀释)在 $37^{\circ}\text{C}$ 下感染1小时。添加新鲜培养基,持续72小时,然后根据供应商方案(普洛麦格公司(Promega),货号G5430)进行MTS/PMS测定。使用ELISA酶标仪进行读板并记录数据。基于Spearman-Kärber公式将感染力表示为TCID<sub>50</sub>/mL/72 h。

[0112] 实验设计和处理

#### 1. 动物

从Janvier实验室获得12只健康的金黄叙利亚仓鼠(雌性),收到时为6至8周龄。

[0113] 2. 随机分组

将动物称重,然后分成2个均匀的组,每组5只动物。在尾巴上对动物进行标记。

[0114] 3. 处理

通过腹膜内(IP)途径以10 mL/kg的总体积并在每个接种时间点施用处理。在第0天(t + 1h)和第1天接种了试验物。用试验物质进行的处理按照以下指定计划进行:

· A组动物(媒介物)使用腹膜内(IP)途径(10 mL/kg体积)使用补充有2.5% DMSO的0.9%氯化钠进行接种;

· B组动物(Q-VDM-OPH)在第0天(t + 1h)和第1天通过IP途径接受两次试验化合物(10 mL/kg体积,10 mg/kg剂量);

· C组动物(Q-VE-OPH)在第0天(t + 1h)和第1天通过IP途径接受两次试验化合物(10 mL/kg体积,10 mg/kg剂量)。

[0115] 4. SARS-CoV-2激发

通过OncoDesign选择了SARS-CoV-2的施用途径。将病毒通过鼻内途径(IN)以70  $\mu\text{L}$ (每个鼻孔35  $\mu\text{L}$ )的总体积施用于异氟醚麻醉的动物。每只动物施用了 $10^5$  pfu TCID<sub>50</sub>的

鼻内剂量。所有组在第0天通过IN途径接受SARS-CoV-2。

[0116] 5. 在感染后第2天 (2dpi) 终止动物生命

在感染后第2天 (2dpi) 对动物 (n = 12) 进行生命终止。使用通过IP途径注射的舒泰 (30 mg/kg - 0.6 mL/kg) 和赛拉嗪 (10 mg/kg - 0.5 mL/kg) 的混合物对动物进行深度麻醉。采集肺之前, 轻柔颈椎脱位, 然后进行开胸手术。

[0117] 将右上叶置于RNAlater中在4°C过夜, 然后储存在-80°C, 直至提取RNA用于通过qRT-PCR对病毒载量进行定量。将中叶、后腔静脉和右下叶在液氮中速冻 (每管一份肺叶), 然后储存在-80°C, 直至进一步使用。

[0118] 离体分析

1- 通过基因组RT-qPCR测定肺部的病毒载量

使用病毒ORF1ab基因通过RT-qPCR对肺部病毒载量进行了定量。使用马歇雷-纳格尔公司 (Macherey Nagel) 病毒RNA试剂盒 (货号740452.4) 进行了病毒RNA的提取。将RNA冷冻在-80°C直至进行qRT-PCR。使用SuperScript™ III一步法qRT-PCR系统试剂盒 (商品化试剂盒#1732-020, 生命技术公司 (Life Technologies)) 用针对ORF1ab基因的引物和qRT-PCR条件运行完整的qRT-PCR。使用伯乐公司CFX384™ 和联接的软件进行扩增。实施用于进行这种定量的引物和探针是:

ORF1ab\_Fw: CCGCAAGGTTCTTCTTCGTAAG (序列表中的SEQ ID NO:9);

ORF1ab\_Rv: TGCTATGTTTAGTGTTCCAGTTTTTC (序列表中的SEQ ID NO:10);

ORF1ab\_探针: Hex-AAGGATCAGTGCCAAGCTCGTCGCC-BHQ-1 (序列表中的SEQ ID NO:11), 其中5'-末端位置处的Hex表示六氯荧光素, 3'-末端位置的BHQ-1表示黑洞猝灭剂-1。

[0119] 2- 动物监测

临床监测

在SARS-CoV-2感染后, 每天监测动物的活力、行为和体重。使用以下列出的参数, 在SARS-CoV-2感染后每天记录模型特异性临床随访:

- 体重减轻
- 立毛 (无-轻微-明显)
- 行为 (正常-移动性较差-松散或孤僻)
- 姿势 (正常-异常-驼背)
- 咳嗽 (存在或不存在)
- 打喷嚏 (存在或不存在)

人道终点

人道终点确定如下:

- 体重减轻百分之二十 (与处理第一天或最大体重相比), 最多持续连续的两天,
- 疼痛、痛苦或悲伤的迹象: 疼痛姿势、疼痛面容遮掩、异常行为或嘶叫,
- 身体状况不佳、消瘦、萎靡不振、脱水,
- 膀胱流出口梗阻或腹泻超过48 h时间段,
- 长期缺乏对外部刺激的自发性反应,
- 呼吸急促费力,
- 贫血、明显出血,

- 来自任何孔口的带血或粘液脓性分泌物,
- 神经系统体征:转圈、抽搐、后肢麻痹,
- 体温持续下降,
- 腹胀。

#### [0120] 麻醉和镇痛

将异氟醚气体麻醉用于进行试验品接种和颈静脉采血(如适用)。为所有疼痛的过程提供了非药理学护理。另外,可以在主治医师的建议下提供不干扰研究的药理学护理(局部处理)。

#### [0121] 安乐死

在使用通过IP途径注射的舒泰(30 mg/kg - 0.6 mL/kg)和赛拉嗪(10 mg/kg - 0.5 mL/kg)的混合物深度麻醉的情况下对动物进行安乐死。在组织采集之前,进行了轻柔的颈椎脱位,随后进行了开胸手术和最大限度的末梢血取样。如果安乐死的物理方法(颈椎脱位)是必要的,则由高度熟练和训练有素的技术人员进行。

#### [0122] 统计学分析

使用Prism软件(GraphPad公司,版本8,美国圣地亚哥)进行统计分析。对于体外实验,使用了单因素方差分析检验,然后是Dunnett事后检验。对于体内实验,使用曼-惠特尼检验对动物组之间的定量数据进行了比较。数据代表平均值  $\pm$  SEM。基于单因素方差分析检验计算了统计结果。 $*p<0.05$ ,  $**p<0.01$ ,  $***p<0.001$ 。

#### [0123] 结果

为了完成在体外所进行关于QVDM-OPh对SARS-CoV-2的抗病毒作用的研究,发明人在COVID19金黄叙利亚仓鼠模型中实现了体内测定,以表明QVDM-OPh肽抑制病毒在肺部复制的功效,并将其与QVE-OPh进行比较。

[0124] 与感染且未处理组相比,感染并经QVDM-OPh处理组以及感染并经QVE-OPh处理组的临床评分和体重变化与第0天相比显示出令人振奋的结果(图10A)。尽管在dpi2停止了测定,并且在该时间点已将动物进行了安乐死,但结果非常令人振奋,显示出与未处理组相比,感染并经处理的动物肺部的病毒载量和病毒复制显著减少(分别为图10B和图10C)。另外,与用QVE-QVE-OPh处理的动物(病毒下降52%)相比,用QVDM-OPh处理的动物(病毒复制下降70%)的病毒载量和病毒复制的减少更重要。

[0125] 所有这些体外和体内结果均证实了QVDM-OPh对SARS-CoV-2复制的抗病毒作用。

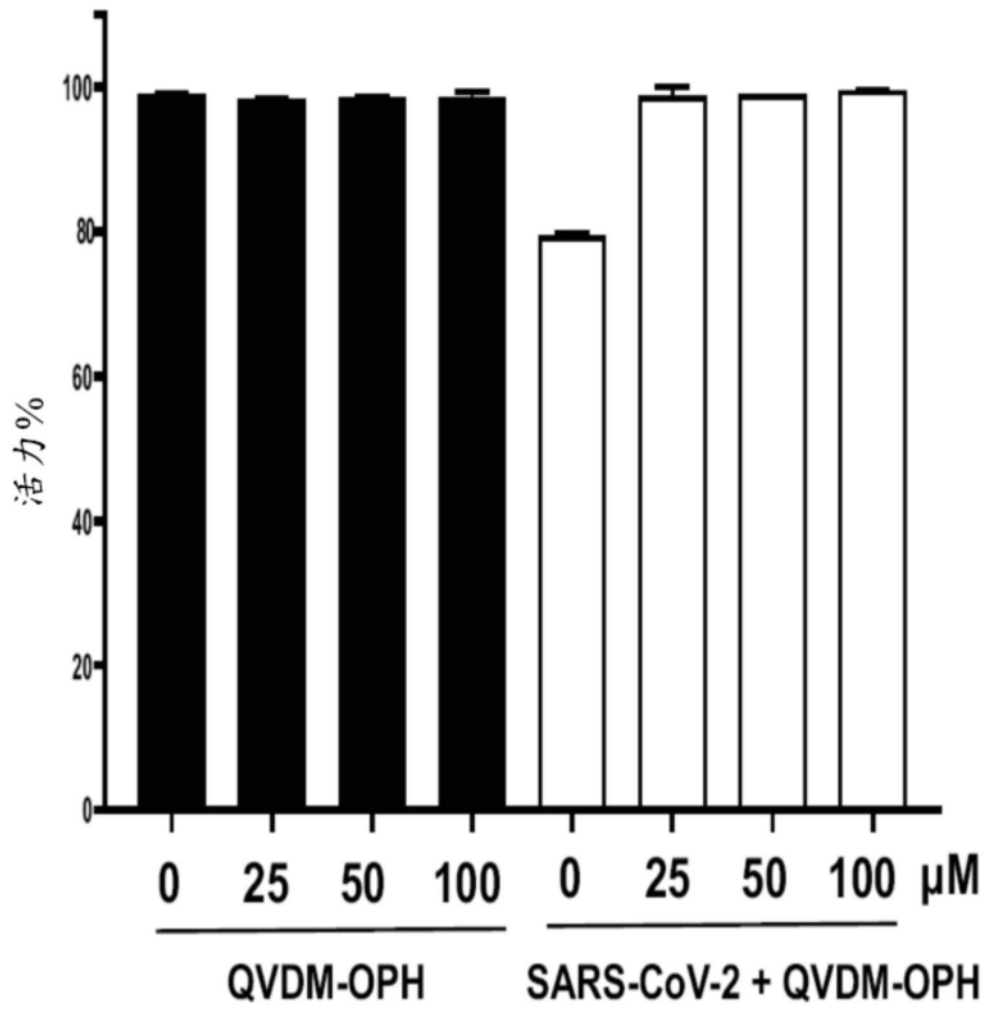


图1

完全处理/感染后72小时

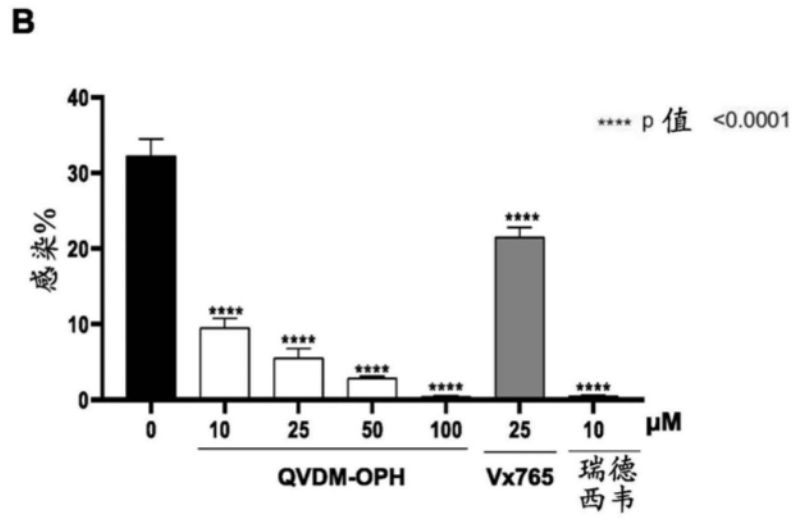
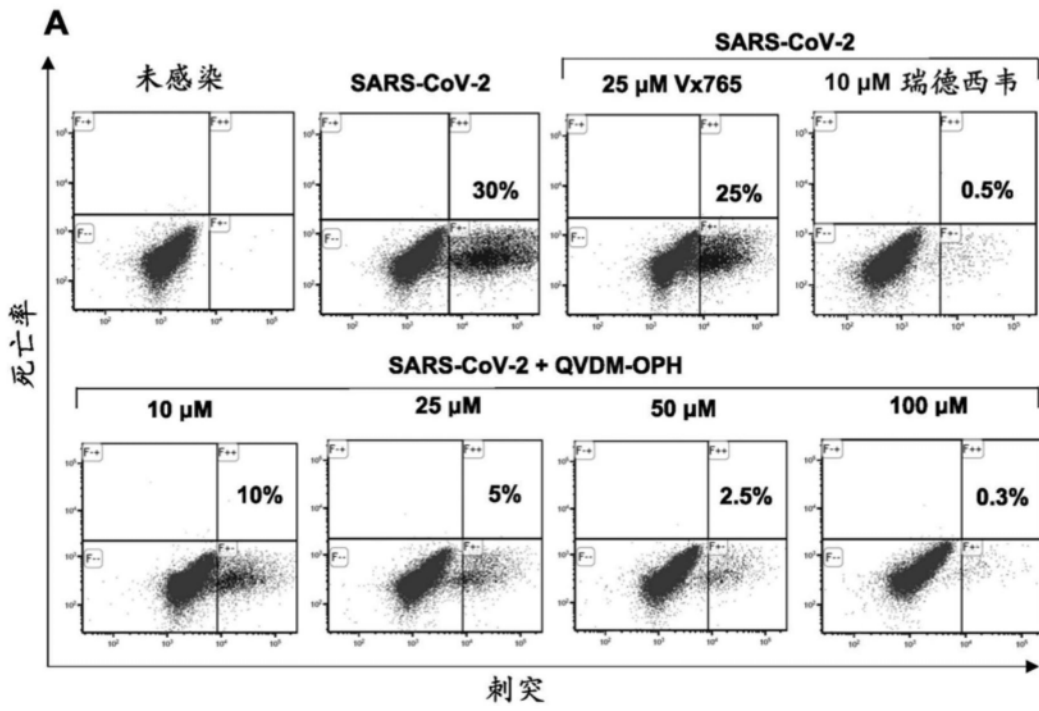


图2

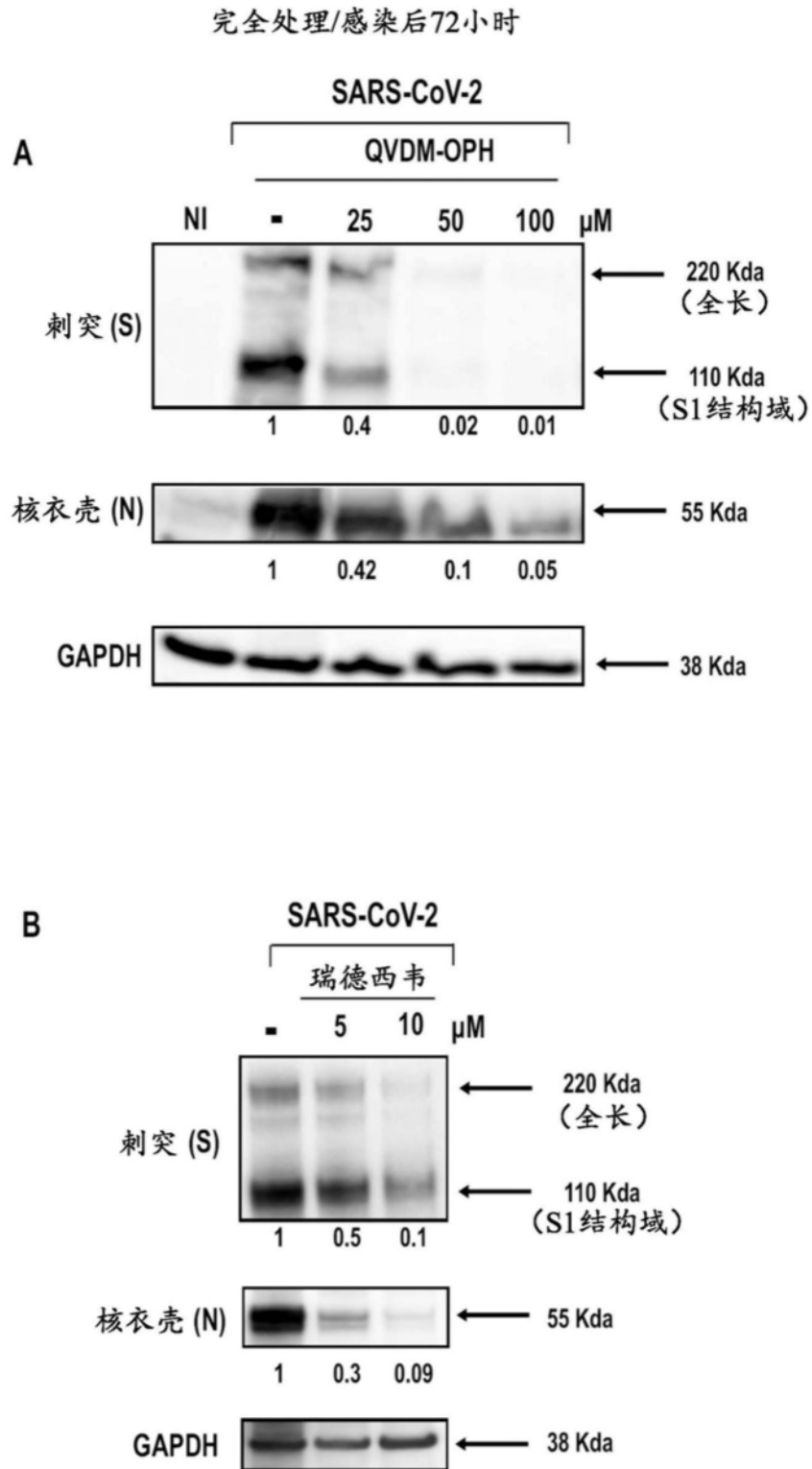


图3

完全处理/感染后72小时

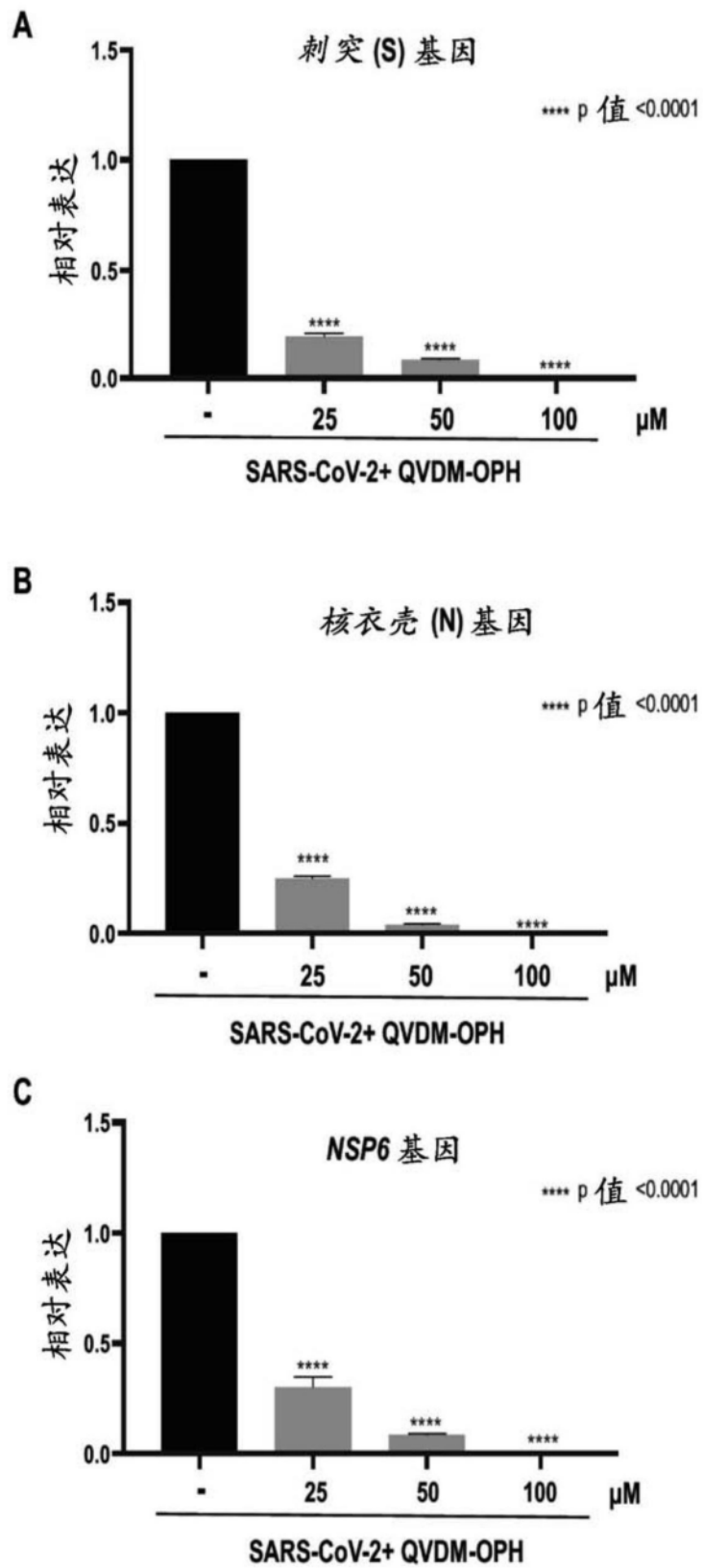


图4

完全处理/感染后72小时

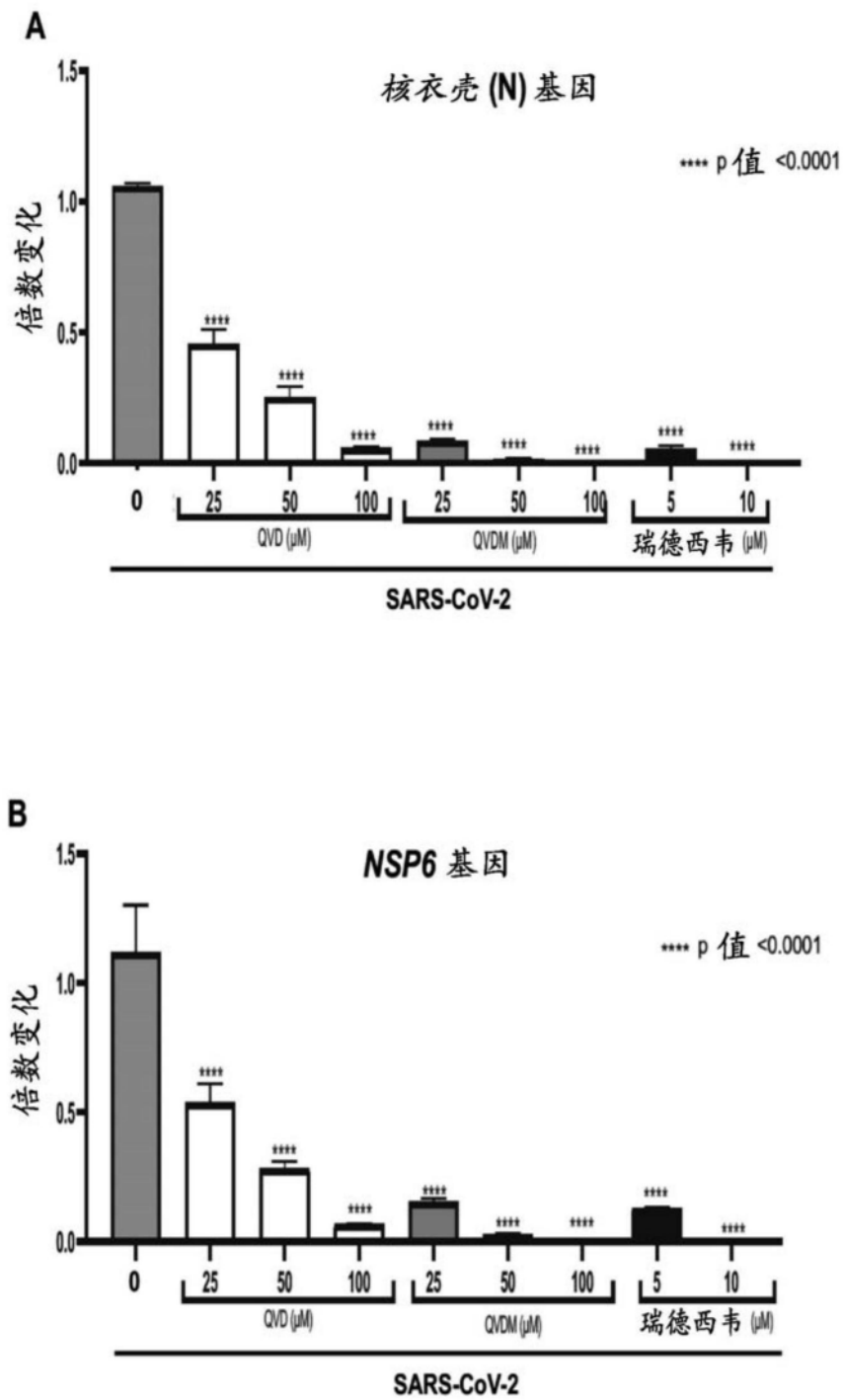


图5

进入后/感染后72小时

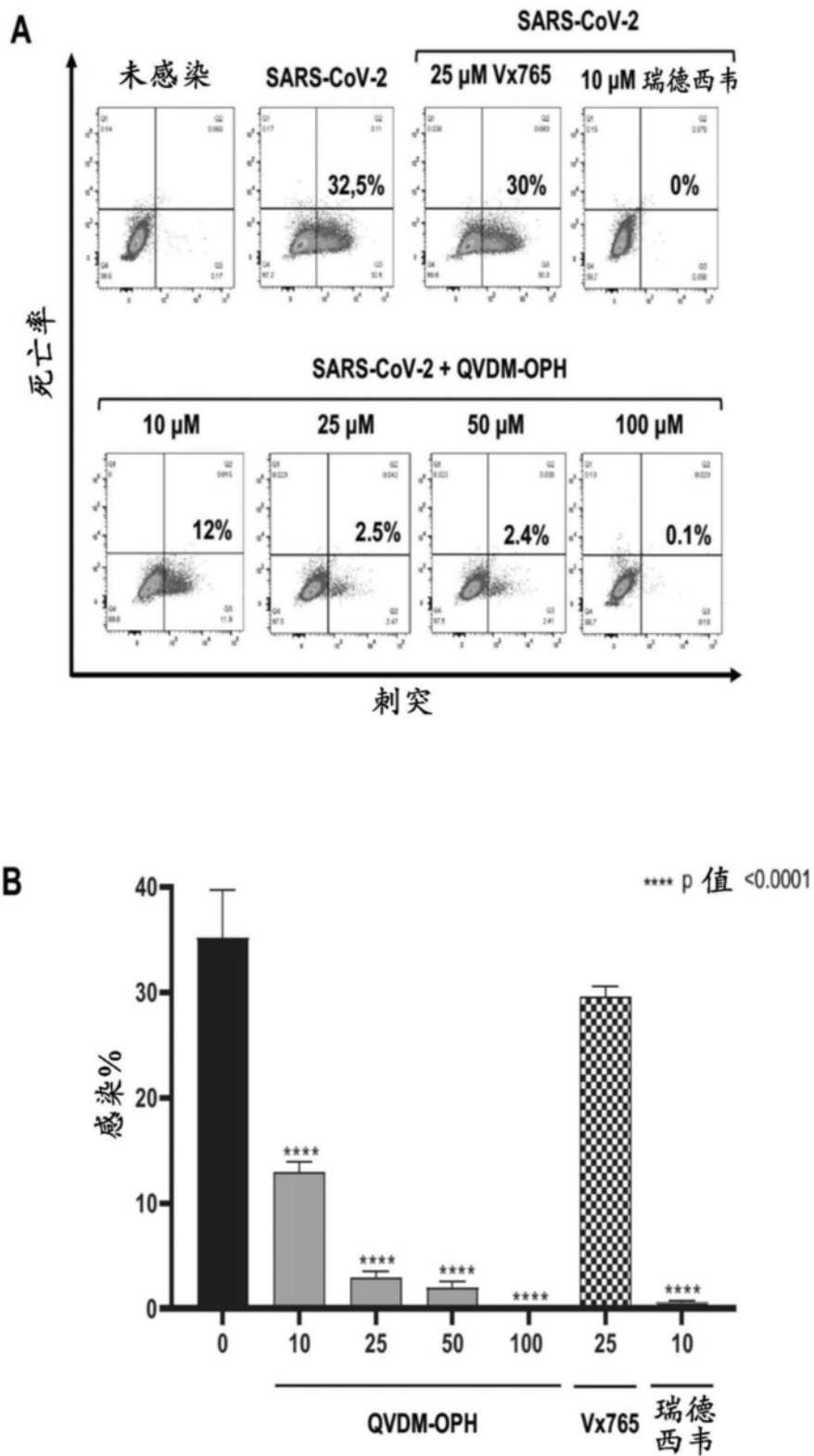


图6

进入后/感染后72小时

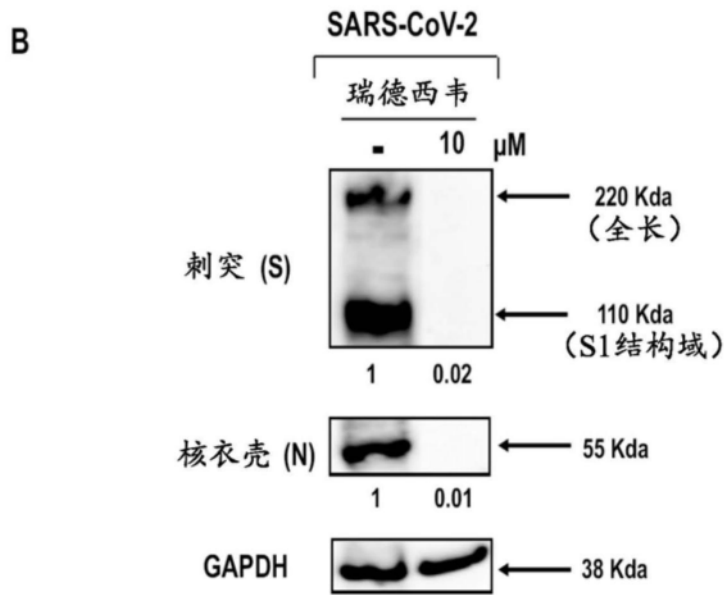
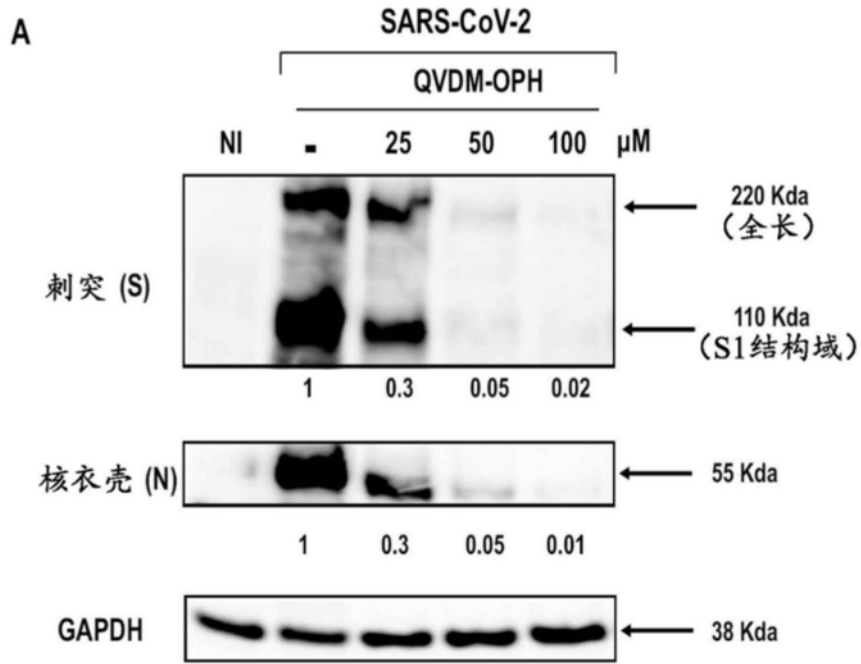


图7

进入后/感染后72小时

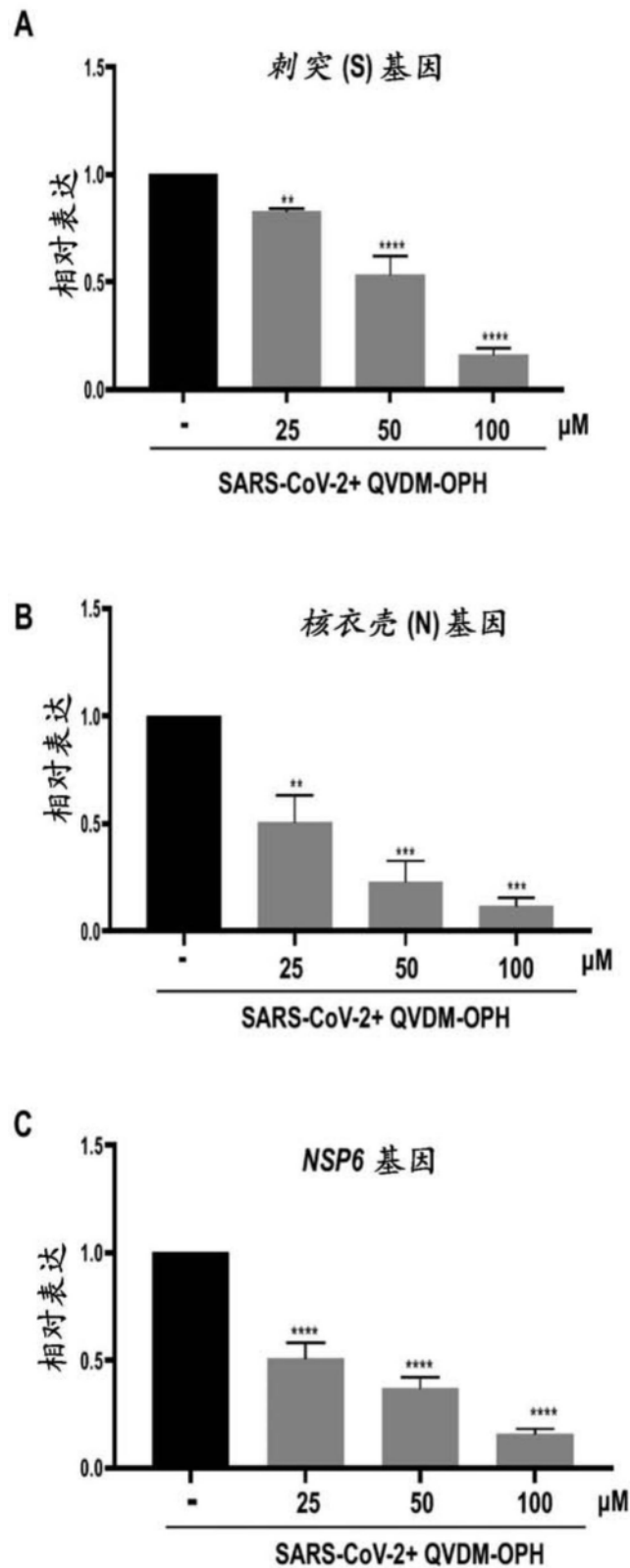


图8

进入后/感染后72小时

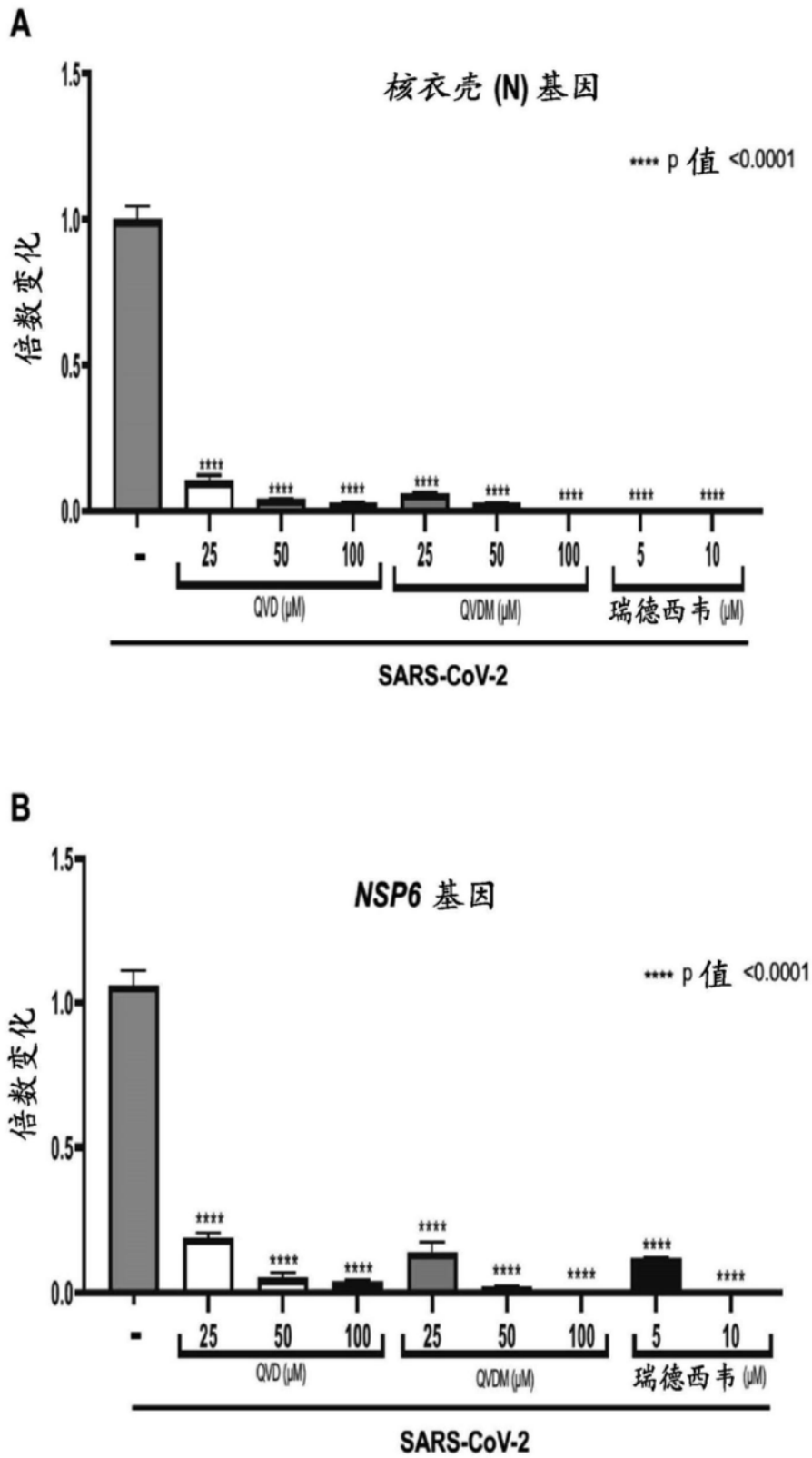


图9

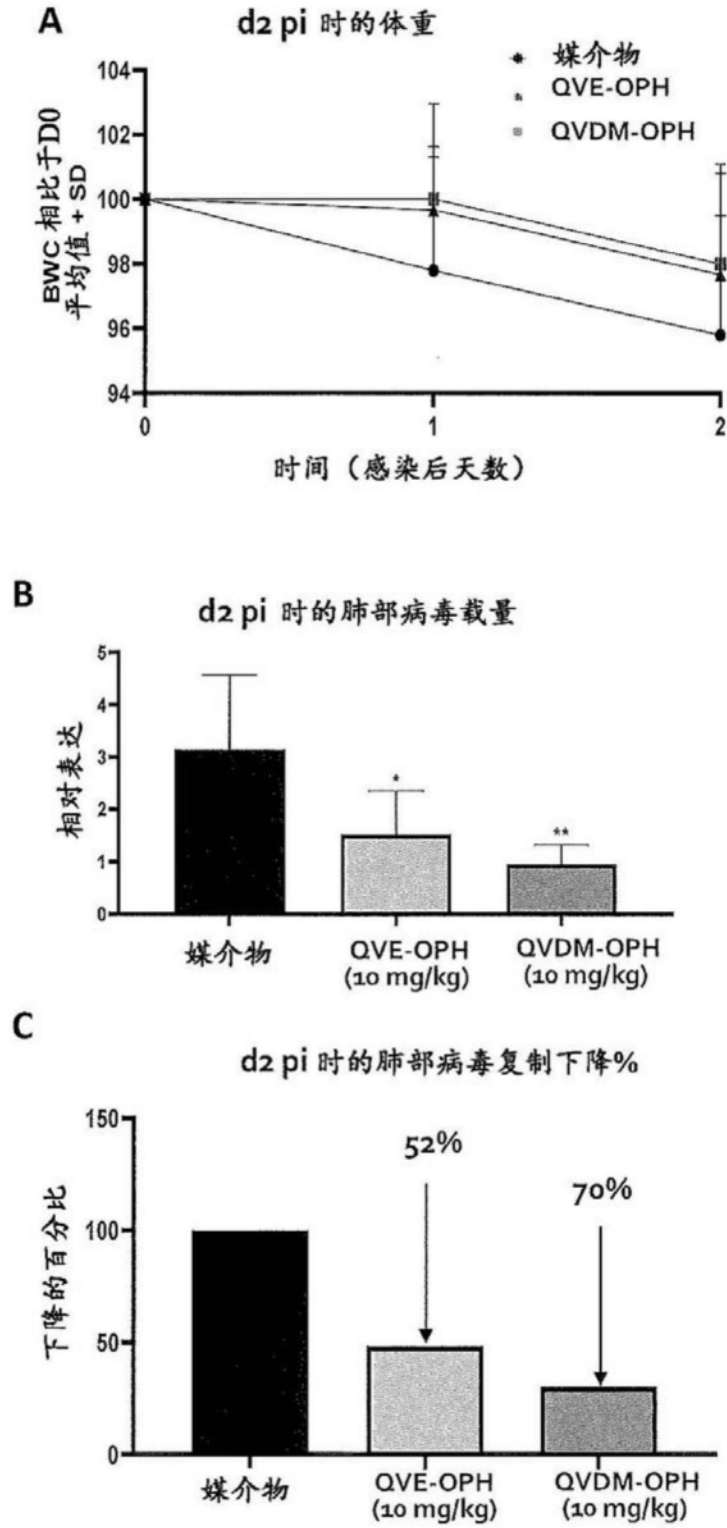


图10