(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 115461067 A
(43)申请公布日 2022.12.09

(21)申请号 202180018363.6

(22)申请日 2021.03.02

(30)优先权数据
20382152.5 2020.03.02 EP
20382192.1 2020.03.13 EP
20382266.3 2020.04.02 EP
20382339.8 2020.04.27 EP
20382815.7 2020.09.16 EP
20382816.5 2020.09.16 EP
21382059.0 2021.01.25 EP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2022.09.01

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2021/055187 2021.03.02

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2021/175857 EN 2021.09.10

(71)申请人 法马马有限公司
地址 西班牙马德里

(72)发明人 P·阿维莱斯·马林
A·洛萨达·冈萨雷斯
J·M·费南德斯·索萨-法罗
S·夫迪奥·穆尼奥斯

(74)专利代理机构 北京市中伦律师事务所 11410
专利代理师 钟锦舜 王奕勋

(51)Int.Cl.
A61K 38/12(2006.01)
A61K 31/56(2006.01)
A61P 31/12(2006.01)
A61K 38/15(2006.01)
A61P 37/06(2006.01)
A61P 29/00(2006.01)

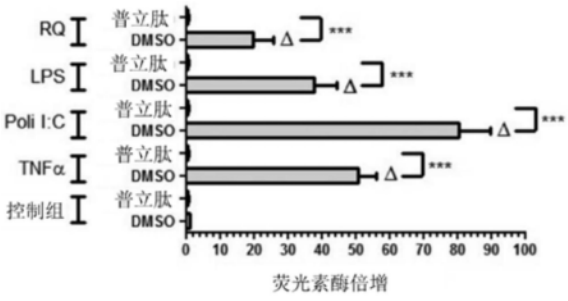
权利要求书15页 说明书77页 附图53页

(54)发明名称

用于炎症的化合物

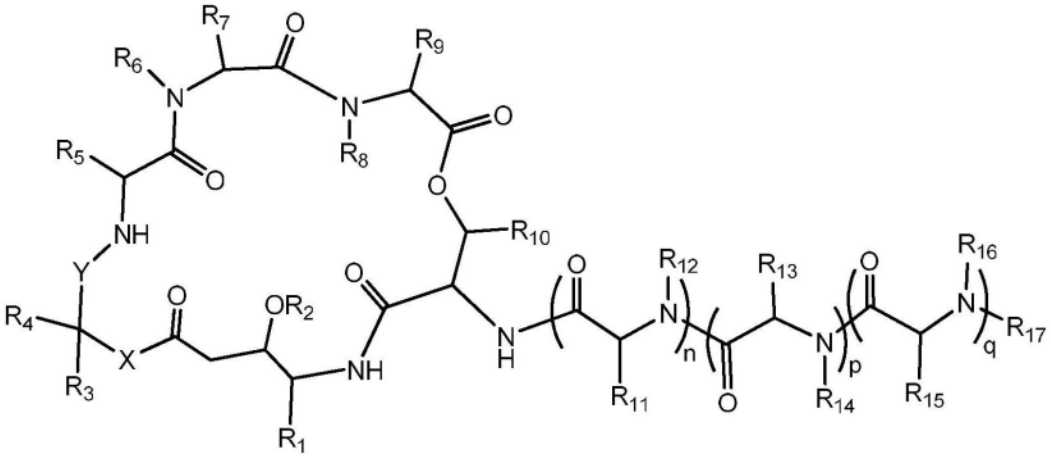
(57)摘要

本发明涉及化合物在治疗炎症,优选与Toll样受体激活相关的炎症中的用途。本发明还涉及化合物在治疗病原体诱导的炎症中的用途。



CN 115461067 A

1.用于治疗炎症的通式I的化合物



（I）

其中X选自O和NH；

Y选自CO和-COCH(CH$_3$)CO-；

n和p各自独立地选自0和1，q选自0、1和2；

R_1、R_3、R_5、R_9、R_{11}、以及R_{15}各自独立地选自氢、取代或未取代的C_1-C_6烷基、取代或未取代的C_2-C_6烯基和取代或未取代的C_2-C_6炔基；

R_2选自氢、COR_a、$COOR_a$、取代或未取代的C_1-C_6烷基、取代或未取代的C_2-C_6烯基和取代或未取代的C_2-C_6炔基；

R_4、R_8、R_{10}、R_{12}和R_{16}各自独立地选自氢和取代或未取代的C_1-C_6烷基；

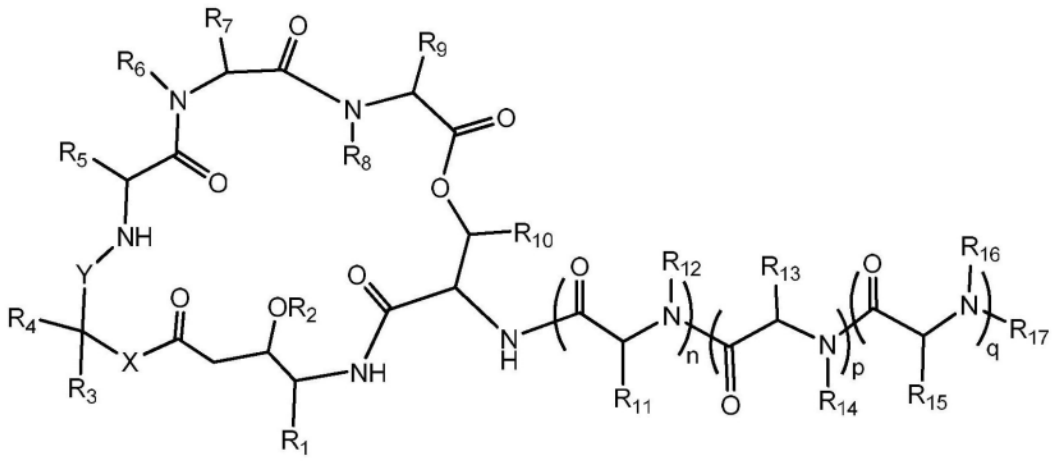
R_7和R_{13}各自独立地选自氢、取代的或未取代的C_1-C_6烷基、取代的或未取代的C_2-C_6烯基和取代的或未取代的C_2-C_6炔基；R_6和R_{14}各自独立地选自氢、和取代的或未取代的C_1-C_6烷基；或者R_6和R_7和/或R_{13}和R_{14}与它们所连接的相应的N原子和C原子一起可形成取代的或未取代的杂环基；

R_{17}选自氢、COR_a、$COOR_a$、$CONHR_b$、$COSR_c$、$(C=NR_b)OR_a$、$(C=NR_b)NHR_b$、$(C=NR_b)SR_c$、$(C=S)OR_a$、$(C=S)NHR_b$、$(C=S)SR_c$、SO_2R_c、SO_3R_c、取代或未取代的C_1-C_{12}烷基、取代或未取代的C_2-C_{12}烯基、取代或未取代的C_2-C_{12}炔基、取代或未取代的芳基、以及取代或未取代的杂环基，前提是当n、p、以及q为0时，R_{17}不是氢；且

R_a、R_b和R_c各自独立地选自氢、取代或未取代的C_1-C_{12}烷基、取代或未取代的C_2-C_{12}烯基、取代或未取代的C_2-C_{12}炔基、取代或未取代的芳基和取代或未取代的杂环基；

或其药学上可接受的盐或立体异构体。

2.用于治疗与Toll样受体激活相关的炎症的通式I的化合物



(I)

其中X选自O和NH；

Y选自CO和-COCH(CH$_3$)CO-；

n和p各自独立地选自0和1，q选自0、1和2；

R_1、R_3、R_5、R_9、R_{11}、以及R_{15}各自独立地选自氢、取代或未取代的C_1-C_6烷基、取代或未取代的C_2-C_6烯基和取代或未取代的C_2-C_6炔基；

R_2选自氢、COR_a、$COOR_a$、取代或未取代的C_1-C_6烷基、取代或未取代的C_2-C_6烯基和取代或未取代的C_2-C_6炔基；

R_4、R_8、R_{10}、R_{12}和R_{16}各自独立地选自氢和取代或未取代的C_1-C_6烷基；

R_7和R_{13}各自独立地选自氢、取代的或未取代的C_1-C_6烷基、取代的或未取代的C_2-C_6烯基和取代的或未取代的C_2-C_6炔基；R_6和R_{14}各自独立地选自氢、和取代的或未取代的C_1-C_6烷基；或者R_6和R_7和/或R_{13}和R_{14}与它们所连接的相应的N原子和C原子一起可形成取代的或未取代的杂环基；

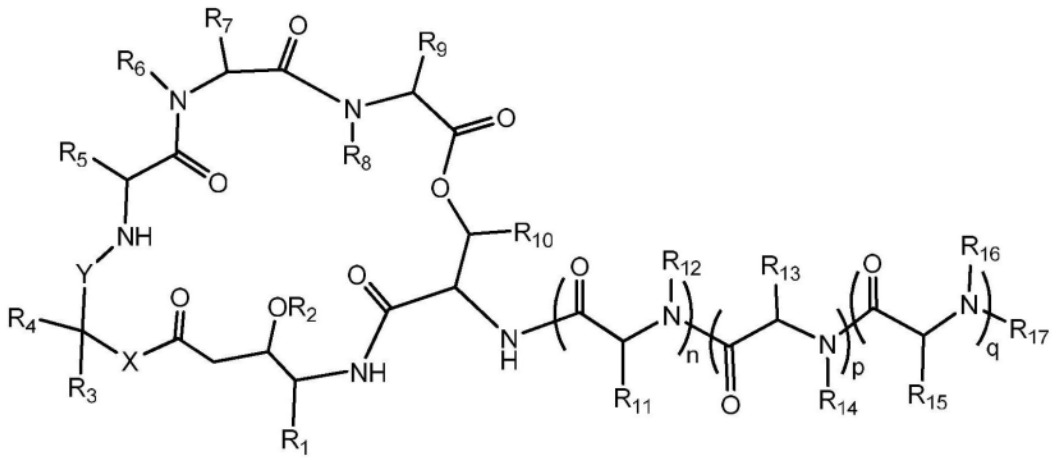
R_{17}选自氢、COR_a、$COOR_a$、$CONHR_b$、$COSR_c$、(C=NR_b)OR_a、(C=NR_b)NHR_b、(C=NR_b)SR_c、(C=S)OR_a、

(C=S)NHR_b、(C=S)SR_c、SO_2R_c、SO_3R_c、取代或未取代的C_1-C_{12}烷基、取代或未取代的C_2-C_{12}烯基、取代或未取代的C_2-C_{12}炔基、取代或未取代的芳基、以及取代或未取代的杂环基，前提是当n、p、以及q为0时，R_{17}不是氢；且

R_a、R_b和R_c各自独立地选自氢、取代或未取代的C_1-C_{12}烷基、取代或未取代的C_2-C_{12}烯基、取代或未取代的C_2-C_{12}炔基、取代或未取代的芳基和取代或未取代的杂环基；

或其药学上可接受的盐或立体异构体。

3.用于治疗选自肺炎、急性呼吸窘迫(ARDS)、免疫病理、优选高细胞因子血症(细胞因子风暴综合征)、败血症和移植物抗宿主病的疾病的通式I的化合物



(I)

其中X选自O和NH；

Y选自CO和-COCH(CH$_3$)CO-；

n和p各自独立地选自0和1，q选自0、1和2；

R_1、R_3、R_5、R_9、R_{11}、以及R_{15}各自独立地选自氢、取代或未取代的C_1-C_6烷基、取代或未取代的C_2-C_6烯基和取代或未取代的C_2-C_6炔基；

R_2选自氢、COR_a、$COOR_a$、取代或未取代的C_1-C_6烷基、取代或未取代的C_2-C_6烯基和取代或未取代的C_2-C_6炔基；

R_4、R_8、R_{10}、R_{12}和R_{16}各自独立地选自氢和取代或未取代的C_1-C_6烷基；

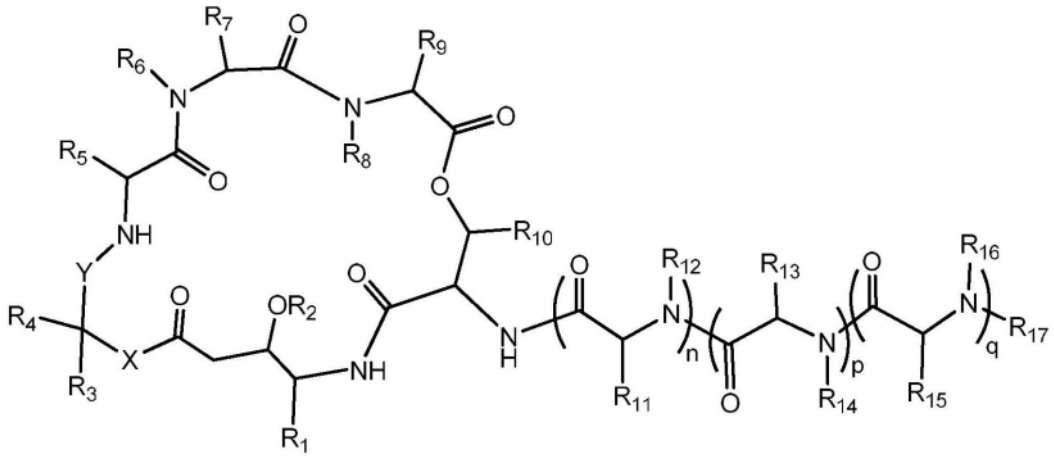
R_7和R_{13}各自独立地选自氢、取代的或未取代的C_1-C_6烷基、取代的或未取代的C_2-C_6烯基和取代的或未取代的C_2-C_6炔基；R_6和R_{14}各自独立地选自氢、和取代的或未取代的C_1-C_6烷基；或者R_6和R_7和/或R_{13}和R_{14}与它们所连接的相应的N原子和C原子一起可形成取代的或未取代的杂环基；

R_{17}选自氢、COR_a、$COOR_a$、$CONHR_b$、$COSR_c$、(C=NR_b)OR_a、(C=NR_b)NHR_b、(C=NR_b)SR_c、(C=S)OR_a、(C=S)NHR_b、(C=S)SR_c、SO_2R_c、SO_3R_c、取代或未取代的C_1-C_{12}烷基、取代或未取代的C_2-C_{12}烯基、取代或未取代的C_2-C_{12}炔基、取代或未取代的芳基、以及取代或未取代的杂环基，前提是当n、p、以及q为0时，R_{17}不是氢；且

R_a、R_b和R_c各自独立地选自氢、取代或未取代的C_1-C_{12}烷基、取代或未取代的C_2-C_{12}烯基、取代或未取代的C_2-C_{12}炔基、取代或未取代的芳基和取代或未取代的杂环基；

或其药学上可接受的盐或立体异构体。

4.用于治疗病原体诱导的炎症的通式I的化合物



（I）

其中X选自O和NH；

Y选自CO和-COCH(CH$_3$)CO-；

n和p各自独立地选自0和1，q选自0、1和2；

R$_1$、R$_3$、R$_5$、R$_9$、R$_{11}$、以及R$_{15}$各自独立地选自氢、取代或未取代的C$_1$-C$_6$烷基、取代或未取代的C$_2$-C$_6$烯基和取代或未取代的C$_2$-C$_6$炔基；

R$_2$选自氢、COR$_a$、COOR$_a$、取代或未取代的C$_1$-C$_6$烷基、取代或未取代的C$_2$-C$_6$烯基和取代或未取代的C$_2$-C$_6$炔基；

R$_4$、R$_8$、R$_{10}$、R$_{12}$和R$_{16}$各自独立地选自氢和取代或未取代的C$_1$-C$_6$烷基；

R$_7$和R$_{13}$各自独立地选自氢、取代的或未取代的C$_1$-C$_6$烷基、取代的或未取代的C$_2$-C$_6$烯基和取代的或未取代的C$_2$-C$_6$炔基；R$_6$和R$_{14}$各自独立地选自氢、和取代的或未取代的C$_1$-C$_6$烷基；或者R$_6$和R$_7$和/或R$_{13}$和R$_{14}$与它们所连接的相应的N原子和C原子一起可形成取代的或未取代的杂环基；

R$_{17}$选自氢、COR$_a$、COOR$_a$、CONHR$_b$、COSR$_c$、(C＝NR$_b$)OR$_a$、(C＝NR$_b$)NHR$_b$、(C＝NR$_b$)SR$_c$、(C＝S)OR$_a$、

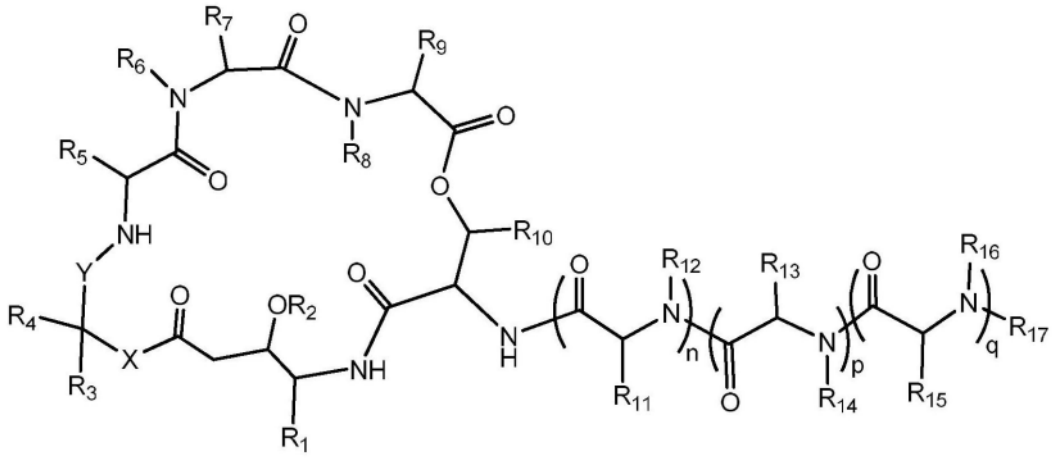
(C＝S)NHR$_b$、(C＝S)SR$_c$、SO$_2$R$_c$、SO$_3$R$_c$、取代或未取代的C$_1$-C$_{12}$烷基、取代或未取代的C$_2$-C$_{12}$烯基、取代或未取代的C$_2$-C$_{12}$炔基、取代或未取代的芳基、以及取代或未取代的杂环基，前提是当n、p、以及q为0时，R$_{17}$不是氢；且

R$_a$、R$_b$和R$_c$各自独立地选自氢、取代或未取代的C$_1$-C$_{12}$烷基、取代或未取代的C$_2$-C$_{12}$烯基、取代或未取代的C$_2$-C$_{12}$炔基、取代或未取代的芳基和取代或未取代的杂环基；

或其药学上可接受的盐或立体异构体。

5.根据权利要求4所述的化合物，其中所述病原体选自病毒和细菌。

6.用于联合治疗与Toll样受体激活相关的炎症或病原体诱导的炎症和治疗病毒感染的通式I的化合物



(I)

其中X选自O和NH；

Y选自CO和-COCH(CH$_3$)CO-；

n和p各自独立地选自0和1，q选自0、1和2；

R_1、R_3、R_5、R_9、R_{11}、以及R_{15}各自独立地选自氢、取代或未取代的C_1-C_6烷基、取代或未取代的C_2-C_6烯基和取代或未取代的C_2-C_6炔基；

R_2选自氢、COR_a、$COOR_a$、取代或未取代的C_1-C_6烷基、取代或未取代的C_2-C_6烯基和取代或未取代的C_2-C_6炔基；

R_4、R_8、R_{10}、R_{12}和R_{16}各自独立地选自氢和取代或未取代的C_1-C_6烷基；

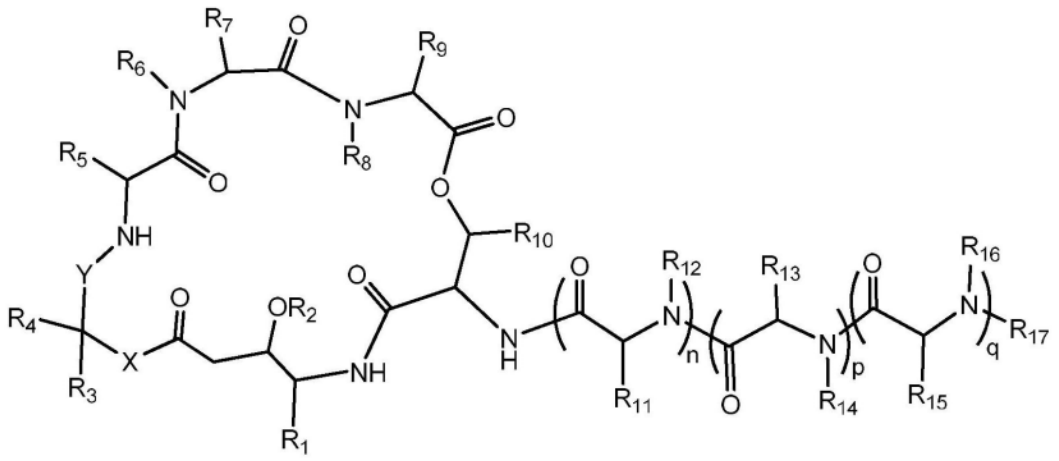
R_7和R_{13}各自独立地选自氢、取代的或未取代的C_1-C_6烷基、取代的或未取代的C_2-C_6烯基和取代的或未取代的C_2-C_6炔基；R_6和R_{14}各自独立地选自氢、和取代的或未取代的C_1-C_6烷基；或者R_6和R_7和/或R_{13}和R_{14}与它们所连接的相应的N原子和C原子一起可形成取代的或未取代的杂环基；

R_{17}选自氢、COR_a、$COOR_a$、$CONHR_b$、$COSR_c$、$(C=NR_b)OR_a$、$(C=NR_b)NHR_b$、$(C=NR_b)SR_c$、$(C=S)OR_a$、$(C=S)NHR_b$、$(C=S)SR_c$、SO_2R_c、SO_3R_c、取代或未取代的C_1-C_{12}烷基、取代或未取代的C_2-C_{12}烯基、取代或未取代的C_2-C_{12}炔基、取代或未取代的芳基、以及取代或未取代的杂环基，前提是当n、p、以及q为0时，R_{17}不是氢；且

R_a、R_b和R_c各自独立地选自氢、取代或未取代的C_1-C_{12}烷基、取代或未取代的C_2-C_{12}烯基、取代或未取代的C_2-C_{12}炔基、取代或未取代的芳基和取代或未取代的杂环基；

或其药学上可接受的盐或立体异构体。

7.用作抗炎药和抗病毒药的通式I的化合物



(I)

其中X选自O和NH；

Y选自CO和-COCH(CH_3)CO-；

n和p各自独立地选自0和1，q选自0、1和2；

R_1、R_3、R_5、R_9、R_{11}、以及R_{15}各自独立地选自氢、取代或未取代的C_1-C_6烷基、取代或未取代的C_2-C_6烯基和取代或未取代的C_2-C_6炔基；

R_2选自氢、COR_a、$COOR_a$、取代或未取代的C_1-C_6烷基、取代或未取代的C_2-C_6烯基和取代或未取代的C_2-C_6炔基；

R_4、R_8、R_{10}、R_{12}和R_{16}各自独立地选自氢和取代或未取代的C_1-C_6烷基；

R_7和R_{13}各自独立地选自氢、取代的或未取代的C_1-C_6烷基、取代的或未取代的C_2-C_6烯基和取代的或未取代的C_2-C_6炔基；R_6和R_{14}各自独立地选自氢、和取代的或未取代的C_1-C_6烷基；或者R_6和R_7和/或R_{13}和R_{14}与它们所连接的相应的N原子和C原子一起可形成取代的或未取代的杂环基；

R_{17}选自氢、COR_a、$COOR_a$、$CONHR_b$、$COSR_c$、(C=NR_b)OR_a、(C=NR_b)NHR_b、(C=NR_b)SR_c、(C=S)OR_a、(C=S)NHR_b、(C=S)SR_c、SO_2R_c、SO_3R_c、取代或未取代的C_1-C_{12}烷基、取代或未取代的C_2-C_{12}烯基、取代或未取代的C_2-C_{12}炔基、取代或未取代的芳基、以及取代或未取代的杂环基，前提是当n、p、以及q为0时，R_{17}不是氢；且

R_a、R_b和R_c各自独立地选自氢、取代或未取代的C_1-C_{12}烷基、取代或未取代的C_2-C_{12}烯基、取代或未取代的C_2-C_{12}炔基、取代或未取代的芳基和取代或未取代的杂环基；

或其药学上可接受的盐或立体异构体。

8.根据任一前述权利要求所述的化合物，其中R_3和R_4独立地选自氢和取代或未取代的C_1-C_6烷基；优选地，其中R_3是异丙基，R_4是氢。

9.根据任一前述权利要求所述的通式II的化合物，其中R_3和R_4是甲基。

10.根据任一前述权利要求所述的化合物，其中R_{11}选自氢和取代或未取代的C_1-C_6烷基；优选地，其中R_{11}是甲基或异丁基。

11.根据任一前述权利要求所述的通式III的化合物，其中R_{11}是甲基，并且n=1。

12.根据任一前述权利要求所述的化合物，其中R_1、R_5、R_9和R_{15}独立地选自氢和取代或未取代的C_1-C_6烷基；优选地，其中R_1选自仲丁基和异丙基，R_5是异丁基，R_9是对甲氧基苄基，并且R_{15}选自甲基和苄基。

13.根据任一前述权利要求所述的化合物，其中R_8、R_{10}、R_{12}和R_{16}独立地选自氢和取代或

未取代的C_1-C_6烷基;优选地,其中R_8、R_{10}和R_{12}是甲基,并且R_{16}是氢。

14.根据任一前述权利要求所述的化合物,其中R_6和R_{14}独立地选自氢和取代或未取代的C_1-C_6烷基;优选地,其中R_6选自氢和甲基,并且R_{14}是氢。

15.根据任一前述权利要求所述的化合物,其中R_7和R_{13}独立地选自氢和取代或未取代的C_1-C_6烷基;优选地,其中R_7是甲基,R_{13}选自氢、甲基、异丙基、异丁基和3-氨基-3-氧丙基。

16.根据权利要求1至13中任一项所述的化合物,其中R_6和R_7和/或R_{13}和R_{14}与它们所连接的相应的N原子和C原子一起形成取代或未取代的吡咯烷基团。

17.根据任一前述权利要求所述的化合物,其中R_2选自氢、取代或未取代的C_1-C_6烷基和COR_a,并且其中R_a是取代或未取代的C_1-C_6烷基;优选地,其中R_2是氢。

18.根据任一前述权利要求所述的化合物,其中R_{17}选自氢、COR_a、$COOR_a$、$CONHR_b$、(C=S)NHR_b、以及SO_2R_c,并且其中R_a、R_b和R_c各自独立地选自取代或未取代的C_1-C_6烷基、取代或未取代的C_2-C_6烯基、取代或未取代的C_2-C_6炔基、取代或未取代的芳基和取代或未取代的杂环基;优选地,其中R_{17}选自氢、COO苄基、CO苯并[b]噻吩-2-基、SO_2(对甲基苯基)、$COCOCH_3$和$COOC(CH_3)_3$。

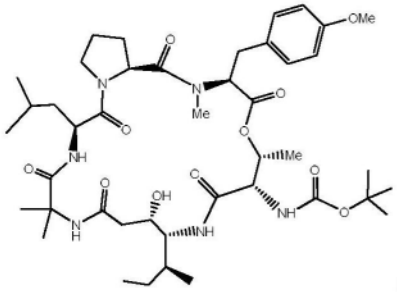
19.根据任一前述权利要求所述的化合物,其中X是NH。

20.根据权利要求1至18中任一项所述的化合物,其中X是O。

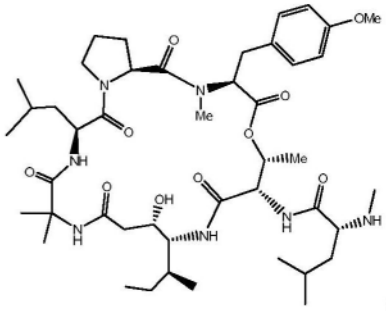
21.根据任一前述权利要求所述的化合物,其中Y是CO。

22.根据权利要求1至20中任一项所述的化合物,其中Y是-$COCH(CH_3)CO$-。

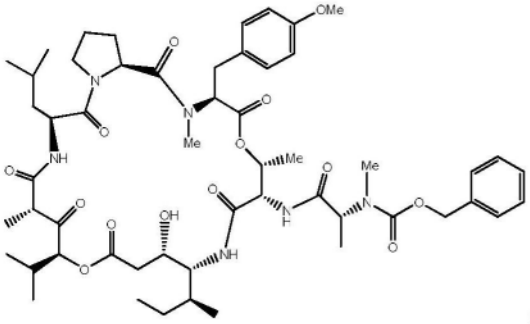
23.根据权利要求1至7中任一项所述的化合物,所述化合物具有以下结构:



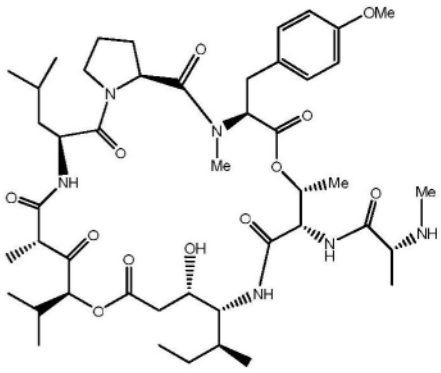
,



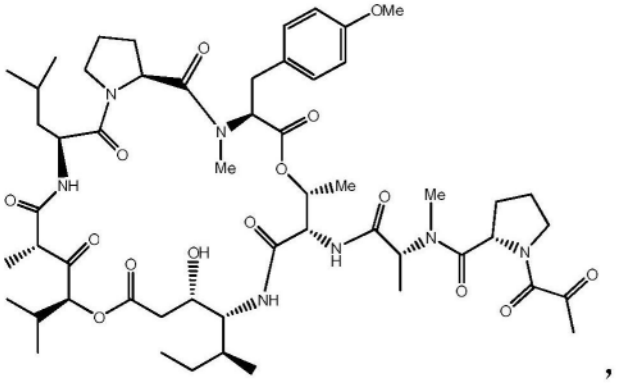
,



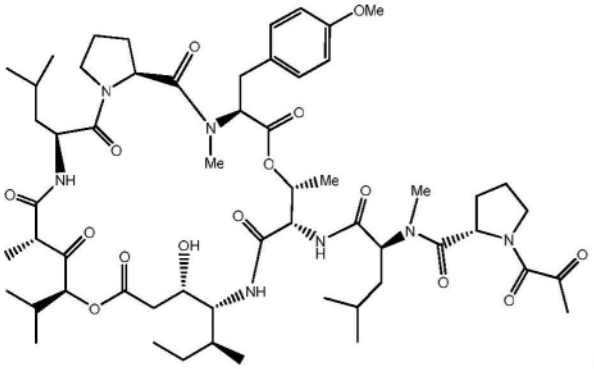
,



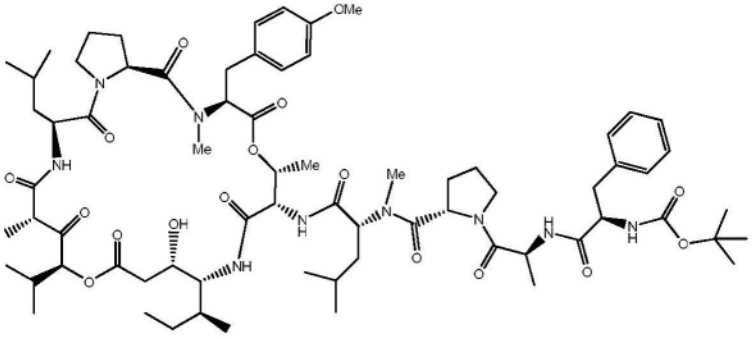
,



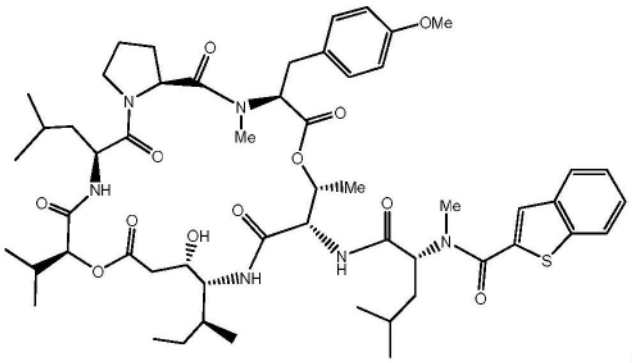
,



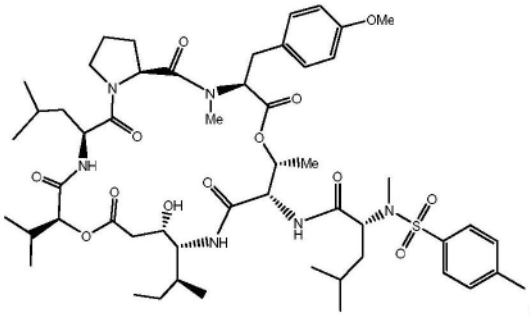
,



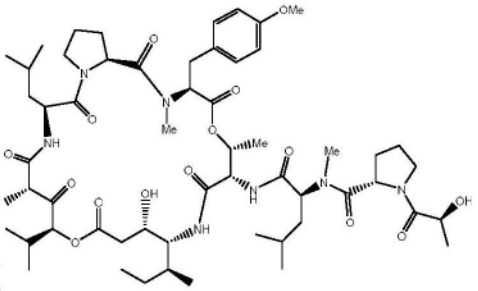
,



，



，或



或其药学上可接受的盐或立体异构体。

24.根据权利要求1至7中任一项所述的化合物，其中所述化合物是PLD或其药学上可接受的盐或立体异构体。

25.根据权利要求1至7中任一项所述的化合物，其中所述化合物是膜海鞘素B，或其药学上可接受的盐或立体异构体。

26.根据权利要求2所述的化合物，其中Toll样受体被单链RNA病毒激活，其中，优选地，所述病毒选自黄病毒科、小RNA病毒科、披膜病毒科、杯状病毒科、反转录病毒科、冠状病毒科、正粘病毒科、白蛉病毒属、沙状病毒科、或双链DNA病毒，优选疱疹病毒科。

27.根据权利要求4至6中任一项所述的化合物，其中所述病原体是病毒，优选单链RNA病毒，其中，优选地，所述病毒选自黄病毒科、小RNA病毒科、披膜病毒科、杯状病毒科、反转录病毒科、冠状病毒科、正粘病毒科、白蛉病毒属、沙状病毒科、或双链DNA病毒，优选疱疹病毒科。

28.根据权利要求5、6或7所述的化合物，其中所述病毒是单链RNA病毒，其中，优选地，所述病毒选自黄病毒科、小RNA病毒科、披膜病毒科、杯状病毒科、反转录病毒科、冠状病毒科、正粘病毒科、白蛉病毒属、沙状病毒科、或双链DNA病毒，优选疱疹病毒科。

29.根据权利要求26至28中任一项所述的化合物，其中所述病毒是黄病毒科病毒；并且可选地选自黄热病病毒(YFV)、丙型肝炎病毒、西尼罗病毒(WNV)、登革热病毒(DENV)、日本脑炎病毒(JEV)、蜱传脑炎病毒(TBEV)、猪瘟病毒和寨卡病毒(ZIKV)。

30.根据权利要求26至28中任一项所述的化合物，其中所述病毒是冠状病毒亚科；并且可选地为SARS-CoV-2。

31.根据权利要求26至28中任一项所述的化合物，其中所述病毒是小RNA病毒科，并且

可选地是口蹄疫病毒、肠道病毒A71、柯萨奇病毒、鼻病毒和甲型肝炎。

32.根据权利要求26至28中任一项所述的化合物，其中所述病毒是披膜病毒科；并且可选地是基孔肯雅病毒、辛德毕斯病毒、塞姆利基森林病毒、东部马脑炎病毒/西部马脑炎病毒/委内瑞拉马脑炎病毒和风疹病毒。

33.根据权利要求26至28中任一项所述的化合物，其中所述病毒是杯状病毒科；并且可选地是兔出血热病毒、诺如病毒、纽布病毒、Recovirus、扎幌病毒、Valovirus、水泡疹病毒，特别是诺瓦克病毒。

34.根据权利要求26至28中任一项所述的化合物，其中所述病毒是反转录病毒科；并且可选地是HIV。

35.根据权利要求26至28任一项所述的化合物，其中所述病毒是正粘病毒科，并且可选地是流感。

36.根据权利要求26至28中任一项所述的化合物，其中所述病毒是白蛉病毒属，并且可选地是白蛉热病毒或裂谷热病毒。

37.根据权利要求26至28中任一项所述的化合物，其中所述病毒是沙状病毒科，并且可选地是伯钦特病毒。

38.根据权利要求26至28中任一项所述的化合物，其中所述病毒是疱疹病毒科，优选单纯疱疹病毒1或2。

39.根据权利要求26至28中任一项所述的化合物，其中所述病毒是呼吸道病毒。

40.根据权利要求1至39中任一项所述的化合物，其中所述病毒为SARS-CoV-2，用于治疗COVID-19和/或用于治疗由COVID-19引起的肺炎或ARDS。

41.根据权利要求30所述的化合物，其中所述CoV感染是轻度感染；和/或其中所述CoV感染是中度感染；和/或其中所述CoV感染是重度感染。

42.根据权利要求30所述的化合物，其中所述CoV感染是急性CoV感染，优选地，其中所述CoV感染是急性COVID-19感染；和/或其中所述CoV感染是持续症状的CoV感染，优选地，其中所述CoV感染是持续症状的COVID-19感染；和/或其中所述CoV感染是后CoV综合征、持续性CoV或长CoV；优选地，其中所述CoV感染是后COVID-19综合征、持续性COVID或长COVID感染。

43.根据权利要求42所述的化合物，其中后CoV综合征、持续性CoV或长CoV包括由以下引起的一种或多种症状：心血管、呼吸、胃肠、神经、肌肉骨骼、代谢、肾脏、皮肤、耳鼻咽喉、血液学和自主神经系统；精神问题、全身疼痛、疲劳和/或持续发烧。

44.根据权利要求30所述的化合物，所述化合物用于治疗具有CoV感染，优选COVID-19症状和体征长达4周的患者；和/或用于治疗具有CoV感染，优选COVID-19症状和体征4周至12周的患者；和/或用于治疗具有CoV感染，优选COVID-19症状和体征超过12周的患者。

45.根据权利要求30所述的化合物，其中所述化合物用于预防、减少或治疗持续性COVID、长COVID或后COVID综合征；优选地，所述预防、减少或治疗将患者患有持续性COVID、长COVID或后COVID综合征症状的可能性降至最低；和/或降低此类症状的严重程度；进一步优选地，所述治疗将CoV感染的症状降至最低。

46.根据权利要求30所述的化合物，其中所述治疗降低CoV患者的传染性；包括其中所述患者是无症状的或症状不明显的患者但具有高病毒载量。

47.根据任一前述权利要求所述用途的化合物，其中所述化合物与皮质类固醇，优选地塞米松联合给药。

48.根据权利要求47所述用途的化合物，其中所述化合物和皮质类固醇同时、分别或依次给药。

49.根据任一前述权利要求所述用途的化合物，其中根据每日剂量的方案给药10天、9天、8天、7天、6天、5天、4天、3天、2天或1天；优选2-5天、3-5天或3、4或5天；最优选3天或5天；最优选3天。

50.根据任一前述权利要求所述用途的化合物，其中所述化合物以每天5mg或更少、每天4.5mg或更少、每天4mg或更少、每天3.5mg或更少、每天3mg或更少、每天2.5mg或更少、或每天2mg或更少；0.5mg/天、1mg/天、1.5mg/天、2mg/天、2.5mg/天、3mg/天、3.5mg/天、4mg/天、4.5mg/天、或5mg/天；优选1mg/天、1.5mg/天、2mg/天或2.5mg/天；更优选1.5-2.5mg/天；最优选1.5mg/天、2.0mg/天或2.5mg/天的剂量给药。

51.根据任一前述权利要求所述用途的化合物，其中所述化合物以1-50mg、1-40mg、1-30mg、1-20mg、1-15mg、3-15mg、3-12mg、4-12mg、4-10mg、4.5-10mg；4.0mg、4.5mg、5mg、5.5mg、6mg、6.5mg、7mg、7.5mg、8mg、8.5mg、9mg、9.5mg或10mg；优选4.5mg、5mg、6mg、7.5mg、8mg、9mg、或10mg；更优选4.5-7.5mg/天的总剂量给药。

52.根据任一前述权利要求所述用途的化合物，其中所述化合物通过注射给药。

53.根据权利要求52所述用途的化合物，其中所述注射是1小时注射、1.5小时注射、2小时注射或3小时注射，优选1.5小时注射。

54.根据权利要求1至53中任一项所述用途的化合物，其中1.5mg普立肽以1.5小时注射给药，每天1次，连续3天；或其中2mg普立肽以1.5小时注射给药，每天1次，连续3天；或其中2.5mg普立肽以1.5小时注射给药，每天1次，连续3天；或其中1mg普立肽以1.5小时注射给药，每天一次，连续5天；或其中2mg普立肽以1.5小时注射给药，每天一次，连续5天。

55.根据任一前述权利要求所述用途的化合物，其中所述化合物使用负荷剂量和维持剂量给药。

56.根据权利要求55所述用途的化合物，其中给药方案为：

第1天2.5mg的负荷剂量，随后几天2mg/天的维持剂量；

第1天2.5mg的负荷剂量，随后几天1.5mg/天的维持剂量；

第1天2.5mg的负荷剂量，随后几天1mg/天的维持剂量；

第1天2.5mg的负荷剂量，随后几天0.5mg/天的维持剂量；

第1天2mg的负荷剂量，随后几天1.5mg/天的维持剂量；

第1天2mg的负荷剂量，随后几天1mg/天的维持剂量；

第1天2mg的负荷剂量，随后几天0.5mg/天的维持剂量；

第1天1.5mg的负荷剂量，随后几天1mg/天的维持剂量；

第1天1.5mg的负荷剂量，随后几天0.5mg/天的维持剂量；或

第1天1mg的负荷剂量，随后几天0.5mg/天的维持剂量。

57.根据任一前述权利要求所述用途的化合物，其中所述化合物与皮质类固醇组合给药，并且其中所述皮质类固醇在与给药根据权利要求1至25中任一项所述的化合物相同的天数给药。

58.根据权利要求57所述用途的化合物，其中也可以在随后的一天或更多天给药所述皮质类固醇；优选地，在第1-3天与化合物一起给药所述皮质类固醇，在第4-10天中的一天或更多天进一步给药所述皮质类固醇。

59.根据权利要求58所述用途的化合物，其中所述皮质类固醇在给药所述化合物的天数通过静脉注射给药，但是在随后的天数通过口服或IV给药。

60.根据权利要求57至59中任一项所述用途的化合物，其中所述皮质类固醇是地塞米松；优选地，其中在给药根据本发明的化合物时以6.6mg/天的剂量IV给药地塞米松。

61.根据权利要求60所述用途的化合物，其中地塞米松在随后的天数，优选第4、5、6、7、8、9和10天中的一天或更多天，以6mg/天的剂量口服给药或IV给药。

62.根据任一前述权利要求所述用途的化合物，其中在第1至3天静脉注射(IV)给药PLD1.5mg/天，并与静脉注射地塞米松6.6mg/天组合，随后从第4天直至第10天口服(PO)/IV地塞米松6mg/天(取决于医生根据患者临床状况和进展的判断)；或

其中在第1天至第3天静脉注射(IV)给药PLD 2.0mg/天，并与静脉注射地塞米松6.6mg/天组合，随后从第4天直至第10天口服(PO)/IV地塞米松6mg/天(取决于医生根据患者临床状况和进展的判断)；或

其中在第1天至第3天静脉注射(IV)给药PLD 2.5mg/天，并与静脉注射地塞米松6.6mg/天组合，随后从第4天直至第10天口服(PO)/IV地塞米松6mg/天(取决于医生根据患者临床状况和进展的判断)。

63.根据权利要求57至62中任一项所述用途的化合物，其中在开始用根据权利要求1至25中任一项所述的化合物治疗之前20至30分钟给药所述皮质类固醇。

64.根据任一前述权利要求所述用途的化合物，其中在开始使用根据权利要求1至25中任一项所述的化合物进行治疗之前，优选20至30分钟，患者额外接受下列药物：

昂丹司琼8mg IV(或等同药物)；

盐酸苯海拉明25mg IV(或等同药物)；以及

雷尼替丁50mg IV(或等同药物)。

65.根据任一前述权利要求所述用途的化合物，其中在第4天和第5天，患者PO接受4mg的昂丹司琼(或等同药物)，每天两次。

66.根据权利要求1至53中任一项所述用途的化合物，其中所述化合物以单剂量给药(第1天)。

67.根据权利要求66所述用途的化合物，其中单剂量为1-10mg、4-10mg、4.5-10mg、4mg、4.5mg、5mg、5.5mg、6mg、6.5mg、7mg、7.5mg、8mg、8.5mg、9mg、9.5mg、或10mg，优选4.5mg、5mg、6mg、7.5mg、8mg、9mg或10mg，更优选5-9mg、6.5-8.5mg、7-8mg或最优选7.5mg。

68.根据权利要求66至67中任一项所述用途的化合物，其中所述化合物以1.5小时注射给药。

69.根据权利要求66至68中任一项所述用途的化合物，其中根据权利要求57至63中任一项所述的方案给药皮质类固醇。

70.根据权利要求66至69中任一项所述用途的化合物，其中在用本发明化合物给药之前20-30分钟给药以下预防性药物：

静脉注射昂丹司琼8mg(或等同药物)，特别是以15分钟缓慢注射；

静脉注射盐酸苯海拉明25mg(或等同药物)；

静脉注射雷尼替丁50mg(或等同药物)。

71.根据权利要求66至70中任一项所述用途的化合物,其中在给药本发明化合物后每12小时口服给药昂丹司琼4mg,持续3天。

72.根据任一前述权利要求所述用途的化合物,其中地塞米松是磷酸地塞米松,如果在给药本发明化合物的天数给药,则以8mg的剂量给药(相当于6.6mg碱的剂量),如果在给药本发明化合物的天数后给药,则以7.2mg的剂量给药(相当于6mg碱的剂量)。

73.用于治疗炎症的药物组合物,所述药物组合物包含任一前述权利要求所定义的化合物或其药学上可接受的盐或立体异构体,以及药学上可接受的载体。

74.用于治疗与Toll样受体激活相关的炎症的药物组合物,所述药物组合物包含根据权利要求1至72中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐或立体异构体,以及药学上可接受的载体。

75.用于治疗选自肺炎、急性呼吸窘迫(ARDS)、以及免疫病理学,特别是高细胞因子血症(细胞因子风暴综合征)、败血症和移植物抗宿主病的疾病的药物组合物,所述药物组合物包含根据权利要求1至72中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐或立体异构体,以及药学上可接受的载体。

76.用于治疗病原体诱导的炎症的药物组合物,所述药物组合物包含根据权利要求1至72中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐或立体异构体、以及药学上可接受的载体。

77.用于联合治疗与Toll样受体激活相关的炎症或病原体诱导的炎症或治疗病毒感染的药物组合物,所述药物组合物包含根据权利要求1至72中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐或立体异构体、以及药学上可接受的载体。

78.用作抗炎药和抗病毒药的药物组合物,所述药物组合物包含根据权利要求1至72中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐或立体异构体、以及药学上可接受的载体。

79.根据权利要求1至72中任一项所定义的化合物或其药学上可接受的盐或立体异构体在制备用于治疗炎症的药物中的用途。

80.根据权利要求1至72中任一项所定义的化合物或其药学上可接受的盐或立体异构体在制备用于治疗与Toll样受体激活相关的炎症的药物中的用途。

81.根据权利要求1至72中任一项所定义的化合物或其药学上可接受的盐或立体异构体在制备用于治疗选自肺炎、急性呼吸窘迫(ARDS)、和免疫病理,特别是高细胞因子血症(细胞因子风暴综合征)、败血症和移植物抗宿主病的疾病的药物中的用途。

82.根据权利要求1至72中任一项所定义的化合物或其药学上可接受的盐或立体异构体在制备用于治疗病原体诱导的炎症的药物中的用途。

83.根据权利要求1至72中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐或立体异构体在制备用于联合治疗与Toll样受体激活相关的炎症或病原体诱导的炎症和治疗病毒感染的药物中的用途。

84.根据权利要求1至72中任一项所述的化合物或药学上可接受的盐或其立体异构体在制备用作抗炎药和抗病毒药的药物中的用途。

85.一种治疗炎症的方法,其中所述方法包括向有需要的个体给药治疗有效量的根据

权利要求1至72中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐或立体异构体。

86.一种治疗与Toll样受体激活相关的炎症的方法,其中所述方法包括向有需要的个体给药治疗有效量的根据权利要求1至72中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐或立体异构体。

87.一种治疗选自肺炎、急性呼吸窘迫(ARDS)、以及免疫病理,特别是高细胞因子血症(细胞因子风暴综合征)、败血症和移植物抗宿主病的疾病的方法,其中所述方法包括向有需要的个体给药治疗有效量的根据权利要求1至72中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐或立体异构体。

88.一种治疗病原体诱导的炎症的方法,其中所述方法包括向有需要的个体给药治疗有效量的根据权利要求1至72中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐或立体异构体。

89.一种联合治疗与Toll样受体激活相关的炎症或病原体诱导的炎症和治疗病毒感染的方法,其中所述方法包括向有需要的个体给药治疗有效量的根据权利要求1至72中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐或立体异构体。

90.一种抗炎和抗病毒治疗的方法,其中所述方法包括向有需要的个体给药治疗有效量的根据权利要求1至72中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐或立体异构体。

91.用于治疗与Toll样受体激活相关的炎症;用于治疗选自肺炎、急性呼吸窘迫(ARDS)和免疫病理,特别是高细胞因子血症(细胞因子风暴综合征)、败血症和移植物抗宿主病的疾病;用于治疗病原体诱导的炎症;用于联合治疗与Toll样受体激活相关的炎症或病原体诱导的炎症和治疗病毒感染;或用作抗炎药和抗病毒药的试剂盒,所述试剂盒包含根据权利要求1至72中任一项所定义的化合物以及用于治疗炎症的说明书。

92.一种降低受试者或得自受试者的样品或细胞培养物中的一种或多种促炎细胞因子的表达和/或分泌的方法,所述方法包括给药权利要求1至72中任一项所述的化合物。

93.一种增加受试者或得自受试者的样品或细胞培养物中的巨噬细胞激活和/或募集的方法,所述方法包括给药根据权利要求1至72中任一项所述的化合物。

94.一种预防、减少或治疗持续性CoV、长CoV或后CoV综合征的炎症方面的方法,其中所述方法包括向有需要的个体给药治疗有效量的根据权利要求1至72中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐或立体异构体;优选地,其中CoV是SARS-CoV-2;可选地,其中所述治疗使患者遭受持续性COVID、长COVID或后COVID综合征症状的可能性最小化;和/或降低此类症状的严重程度。

95.一种减少CoV患者的传染性和炎症的方法,其中所述方法包括向有需要的个体给药治疗有效量的根据权利要求1至72中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐或立体异构体;优选地,其中所述CoV是SARS-CoV-2;可选地,其中所述患者无症状或症状不明显但具有高病毒载量。

96.一种最小化CoV感染的炎症症状的方法,其中所述方法包括向有需要的个体给药治疗有效量的根据权利要求1至72中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐或立体异构体;优选地,其中所述CoV是SARS-CoV-2。

97.用于治疗炎症的皮质类固醇,其中所述皮质类固醇与根据权利要求1至72中任一项所述的化合物组合给药。

98.用于治疗炎症的根据权利要求1至25中任一项所述的化合物和皮质类固醇;其中所述用途根据权利要求1至72中任一项所述。

99.一种治疗炎症的方法,所述方法包括将根据权利要求1至25中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐和皮质类固醇的组合疗法施用于有需要的患者,从而治疗炎症;其中所述方法根据权利要求1至72中任一项所述。

100.根据权利要求1至72中任一项所定义的化合物或其药学上可接受的盐或立体异构体在制备用于治疗炎症的药物中的用途;其中所述治疗包括给药皮质类固醇。

101.皮质类固醇在制备用于治疗炎症的药物中的用途;其中所述治疗包括给药根据权利要求1至72中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐或立体异构体。

102.根据权利要求1至72中任一项所定义的化合物或其药学上可接受的盐或立体异构体和皮质类固醇在制备用于治疗炎症的药物中的用途。

103.包含根据权利要求1至25中任一项所定义的化合物和皮质类固醇的药物包装,可选地,所述药物包装进一步包含根据权利要求1至72中任一项的说明书。

用于炎症的化合物

技术领域

[0001] 本发明涉及炎症的治疗,特别是与Toll样受体激活相关或作为Toll样受体激活结果的炎症的治疗。本发明还涉及病原体诱导的炎症的治疗。

背景技术

[0002] 炎症是免疫系统对组织损伤和感染的主要反应之一,涉及主要的免疫细胞和细胞外介质和调节剂,如细胞因子。

[0003] 在感染的情况下,当固有免疫系统被激活时,炎症被触发。固有免疫细胞,如巨噬细胞、树突状细胞和中性粒细胞都是固有免疫和感染的重要角色。这些细胞表达检测微生物成分的PRR(模式识别受体),即所谓的病原体相关分子模式(PAMPS)。一类PRR是Toll样受体(TLR,其中有10个子类型TLR1-10),其可以检测来自病毒、细菌、原生动物和真菌的各种病原体。例如,TLR可以检测细菌脂多糖、脂蛋白、鞭毛蛋白、细菌CpG-DNA和病毒的单链和双链RNA。在识别PAMPS后,PRR被激活并触发胞内信号传递级联,最终导致促炎性细胞因子分子的表达。一个信号级联导致典型的NF-κB通路的激活,这是炎症的关键调节剂和促炎基因诱导的中央介质。NF-κB转导的活化与不同类型免疫细胞中的促炎性细胞因子、趋化因子和其他炎症介质的转录诱导有关。这些炎症介质既可直接参与炎症的诱导,又可通过促进炎性T细胞的分化间接起作用。

[0004] 然而,尽管产生强大的免疫反应是宿主对病原体感染反应的关键部分,但过度或不适当的炎症--例如高炎症可能是有害的。事实上,过度炎症在许多传染病的发病机制中起着重要作用。在一个例子中,病原体感染后过度炎症导致高细胞因子血症(通常称为细胞因子风暴)。细胞因子风暴是由促炎细胞因子的不受控制和过度释放引起的。细胞因子的这种突然和过度释放对宿主特别有害,并可导致多系统器官衰竭和死亡。特别地,急性肺损伤(ALI)是肺泡环境和全身循环中细胞因子风暴的常见后果。病原体引起的肺损伤可以发展成ALI或更严重的形式(称为急性呼吸窘迫综合征(ARDS),这种综合征在SAR-CoV-2感染中可见)。高细胞因子血症也可由许多感染源以及非感染性宿主引起。

[0005] 此外,病原体感染还导致巨噬细胞的激活。激活的巨噬细胞的大小是静息的巨噬细胞的两倍,更具“攻击性”,具有更高的溶酶体蛋白水平和更强的吞噬作用。经典激活的巨噬细胞也释放蛋白酶、中性粒细胞趋化因子、活性氧和促炎细胞因子(如IL-1β/IL-1F2、IL-6和TNF-α/TNFSF1A),导致炎症和组织破坏。因此,巨噬细胞效应子功能显著影响炎症反应的质量、持续时间和程度,当不受控制、激活的巨噬细胞会引起显著的组织损伤时,该反应对宿主防御很重要。因此,巨噬细胞的过度激活是导致以过度炎症为特征的疾病的关键因素。最值得注意地,2020年Wang等人给出结论:激活的肺泡巨噬细胞是SARS-CoV-2感染引起的细胞因子风暴的核心。仅由于这个原因,降低巨噬细胞激活和/或募集水平的方法也是预防和治疗由病原体感染引起的炎症,特别是高细胞因子血症的关键。

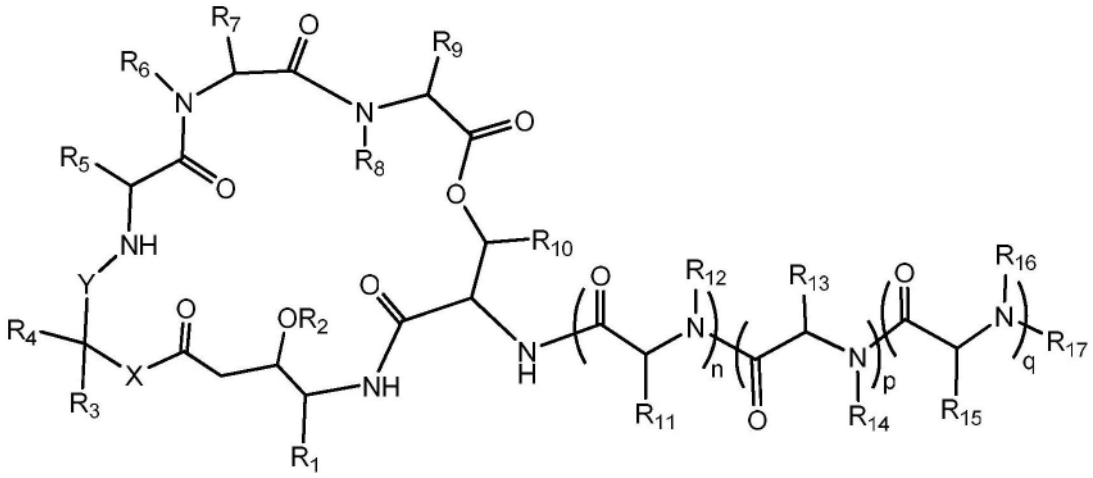
[0006] 因此,炎症和细胞因子风暴是许多病毒感染引起的严重和致命感染的常见临床特征。这些病毒包括呼吸道病毒,如正粘病毒科(Orthomyxoviridae)。它们还包括单链(+)RNA

病毒感染，单链(+)RNA病毒包括黄病毒科(Flaviviridae)、小RNA病毒科(Picornaviridae)、披膜病毒科(Togaviridae)、杯状病毒科(Caliciviridae)、杆状套病毒科(Roniviridae)、反转录病毒科(Retroviridae)和冠状病毒科(Coronaviridae)的成员。在大多数致命感染中，造成致命的因子不是病毒的细胞溶解活性，而是宿主的免疫病理反应。在引起具有经济重要性的人和动物的严重疾病的ss(+)RNA病毒中，黄病毒科、小RNA病毒科、披膜病毒科、杯状病毒科、反转录病毒科、冠状病毒科、正粘病毒科(Orthomyxoviridae)、白蛉病毒属(Phlebovirus)、沙状病毒科(Arenaviridae)、疱疹病毒科(Herpesviridae)特别与炎症和细胞因子风暴有关。

[0007] 因此，需要提供新的用于炎症，特别是过度炎症(excessive inflammation)或高炎症(hyperinflammation)，例如由于病原体感染而产生的过度炎症或高炎症的治疗方法。本发明解决了这种需要。

发明内容

[0008] 一方面，本发明涉及通式I的化合物，或其药学上可接受的盐或立体异构体，

[0009] 

(I)

[0010] 其中X选自O和NH；

[0011] Y选自CO和-COCH(CH_3)CO-；

[0012] n和p各自独立地选自0和1，q选自0、1和2；

[0013] R_1、R_3、R_5、R_9、R_{11}、以及R_{15}各自独立地选自氢、取代或未取代的C_1-C_6烷基、取代或未取代的C_2-C_6烯基和取代或未取代的C_2-C_6炔基；

[0014] R_2选自氢、COR_a、$COOR_a$、取代或未取代的C_1-C_6烷基、取代或未取代的C_2-C_6烯基和取代或未取代的C_2-C_6炔基；

[0015] R_4、R_8、R_{10}、R_{12}和R_{16}各自独立地选自氢和取代或未取代的C_1-C_6烷基；

[0016] R_7和R_{13}各自独立地选自氢、取代的或未取代的C_1-C_6烷基、取代的或未取代的C_2-C_6烯基和取代的或未取代的C_2-C_6炔基；R_6和R_{14}各自独立地选自氢、和取代的或未取代的C_1-C_6烷基；或者R_6和R_7和/或R_{13}和R_{14}与它们所连接的相应的N原子和C原子一起可形成取代的或未取代的杂环基；

[0017] R_{17}选自氢、COR_a、$COOR_a$、$CONHR_b$、$COSR_c$、$(C=NR_b)OR_a$、$(C=NR_b)NHR_b$、$(C=NR_b)SR_c$、(C

＝S)OR_a、(C＝S)NHR_b、(C＝S)SR_c、SO_2R_c、SO_3R_c、取代或未取代的C_1-C_{12}烷基、取代或未取代的C_2-C_{12}烯基、取代或未取代的C_2-C_{12}炔基、取代或未取代的芳基、以及取代或未取代的杂环基，前提是当n、p、以及q为0时，R_{17}不是氢；且

[0018] R_a、R_b和R_c各自独立地选自氢、取代或未取代的C_1-C_{12}烷基、取代或未取代的C_2-C_{12}烯基、取代或未取代的C_2-C_{12}炔基、取代或未取代的芳基和取代或未取代的杂环基；

[0019] 用于治疗炎症。

[0020] 在一方面，本发明涉及如上(和本文)定义的化合物，其用于治疗与Toll样受体激活相关的炎症。

[0021] 在另一方面，本发明涉及如上(和本文)定义的化合物，其用于治疗选自急性呼吸综合征(ARDS)、肺炎和免疫病理，特别是高细胞因子血症(细胞因子风暴综合征)、败血症和移植物抗宿主病的疾病。

[0022] 在一方面，本发明涉及如上(和本文)定义的化合物，其用于治疗病原体诱导的炎症。在一实施例中，病原体是细菌或病毒。

[0023] 一方面，本发明涉及如上(和本文)定义的化合物，其用于联合治疗与Toll样受体激活相关的炎症或与病原体诱导的炎症相关的炎症和治疗病毒感染。

[0024] 在一方面，本发明涉及如上(和本文)定义的化合物，其用作抗炎药和抗病毒药。

[0025] 在一具体方面，通式I的化合物是PLD或其药学上可接受的盐或立体异构体。

[0026] 在一具体方面，通式I的化合物是膜海鞘素B或其药学上可接受的盐或立体异构体。

[0027] 另一方面，本发明还涉及用于本发明用途的药物组合物，所述药物组合物包含本文所定义的化合物和药学上可接受的载体。

[0028] 另一方面，本发明涉及本文所定义的化合物在制备用于治疗炎症的药物中的用途。

[0029] 另一方面，本发明涉及本文所定义的化合物在制备用于治疗与Toll样受体激活相关的炎症的药物中的用途。

[0030] 在另一方面，本发明涉及如本文所定义的化合物在制备药物中的用途，所述药物用于治疗选自肺炎、急性呼吸综合征(ARDS)、高细胞因子血症(细胞因子风暴综合征)、败血症和移植物抗宿主病的疾病。

[0031] 另一方面，本发明涉及本文所定义的化合物在制备用于治疗病原体诱导的炎症的药物中的用途。

[0032] 在另一方面，本发明涉及本文所定义的化合物在制备药物中的用途，所述药物用于联合治疗与Toll样受体激活相关的炎症或与病原体诱导的炎症相关的炎症以及治疗病毒感染。

[0033] 另一方面，本发明涉及本文所定义的化合物在制备用作抗炎药和抗病毒药的药物中的用途。

[0034] 在另一方面，本发明涉及用于治疗任意哺乳动物(优选人)的炎症的方法，其中所述方法包括向有需要的个体给药治疗有效量的本文所定义的化合物。

[0035] 在另一方面，本发明涉及治疗任意哺乳动物(优选人)的与Toll样受体激活相关的炎症的方法，其中所述方法包括向有需要的个体给药治疗有效量的本文所定义的化合物。

[0036] 在另一方面，本发明涉及治疗任意哺乳动物(优选人)的选自肺炎、急性呼吸综合征(ARDS)、高细胞因子血症(细胞因子风暴综合征)、败血症和移植物抗宿主病的方法，其中所述方法包括向有需要的个体给药治疗有效量的本文所定义的化合物。

[0037] 在另一方面，本发明涉及治疗任意哺乳动物(优选人)的病原体诱导的炎症的方法，其中所述方法包括向有需要的个体给药治疗有效量的本文所定义的化合物。

[0038] 在另一方面，本发明涉及对任意哺乳动物(优选人)进行联合治疗与Toll样受体激活相关的炎症或与病原体诱导的炎症相关的炎症和病毒感染的方法，其中所述方法包括向有需要的个体给药治疗有效量的本文所定义的化合物。

[0039] 在另一方面，本发明涉及抗炎和抗病毒治疗的方法，其中所述方法包括向有需要的个体给药治疗有效量的本文所定义的化合物。

[0040] 在本发明的另一方面，提供了试剂盒，所述试剂盒包括本文定义的化合物，以及用于治疗炎症的说明书；所述试剂盒用于治疗与Toll样受体激活相关的炎症；用于治疗选自肺炎、高细胞因子血症(细胞因子风暴综合征)、败血症和移植物抗宿主病的疾病；用于治疗病原体诱导的炎症；用于联合治疗与Toll样受体激活相关的炎症或与病原体诱导的炎症相关的炎症和用于治疗病毒感染；或用作抗炎药和抗病毒药。在另一实施例中，试剂盒还可包含用于治疗病毒感染，优选SARS-CoV或SARS-CoV-2感染的说明书。

[0041] 以下实施例适用于本发明的所有方面。

[0042] 病原体可以是病毒。Toll样受体可被病毒激活。优选地，所述病毒是RNA病毒。更优选地，所述病毒选自黄病毒科、小RNA病毒科、披膜病毒科、杯状病毒科、反转录病毒科、冠状病毒科、正粘病毒科、白蛉病毒属、以及沙状病毒科。或者，所述病毒为双链DNA病毒，优选疱疹病毒科。

[0043] 替换地或附加地，病毒是呼吸道病毒。

[0044] R_3和R_4独立地选自氢和取代或未取代的C_1-C_6烷基。R_3可以是异丙基，R_4可以是氢。R_3和R_4可以是甲基(该化合物也称为通式II的化合物)。

[0045] R_{11}可以选自氢和取代或未取代的C_1-C_6烷基。R_{11}可以是甲基或异丁基。R_{11}可以是甲基并且n＝1(该化合物也称为通式III的化合物)。

[0046] R_1、R_5、R_9和R_{15}可以独立地选自氢和取代或未取代的C_1-C_6烷基。R_1可以选自仲丁基和异丙基，R_5可以是异丁基，R_9可以是对甲氧基苄基，R_{15}可以选自甲基和苄基。

[0047] R_8、R_{10}、R_{12}和R_{16}可以独立地选自氢和取代或未取代的C_1-C_6烷基。R_8、R_{10}和R_{12}可以是甲基，R_{16}可以是氢。

[0048] R_6和R_{14}可以独立地选自氢和取代或未取代的C_1-C_6烷基。R_6可以选自氢和甲基，并且R_{14}可以是氢。

[0049] R_7和R_{13}可以独立地选自氢和取代或未取代的C_1-C_6烷基。R_7可以是甲基，R_{13}可以选自氢、甲基、异丙基、异丁基和3-氨基-3-氧丙基。

[0050] R_6和R_7和/或R_{13}和R_{14}与它们所连接的相应的N原子和C原子一起可以形成取代或未取代的吡咯烷基团。

[0051] R_2可以选自氢、取代或未取代的C_1-C_6烷基和COR_a，其中R_a可以是取代或未取代的C_1-C_6烷基。R_2可以是氢。

[0052] R_{17}可以选自氢、COR_a、$COOR_a$、$CONHR_b$、(C＝S)NHR_b、以及SO_2R_c，并且其中R_a、R_b和R_c可

以独立地选自取代或未取代的C_1-C_6烷基、取代或未取代的C_2-C_6烯基、取代或未取代的C_2-C_6炔基、取代或未取代的芳基和取代或未取代的杂环基。R_{17}可选自氢、COO苄基、CO苯并[b]噻吩-2-基、SO_2(对甲基苯基)、$COCOCH_3$和$COOC-(CH_3)_3$。

[0053] X可以是NH。X可以是O。Y可以是CO。Y可以是-$COCH(CH_3)CO$-。

[0054] 所述化合物可以是PLD或其药学上可接受的盐或立体异构体。所述化合物可以是PLD。

[0055] 所述化合物可以是膜海鞘素B(didemninB)、或其药学上可接受的盐或立体异构体。所述化合物可以是膜海鞘素B。

[0056] 所述炎症可以是由于COVID-19。

[0057] CoV感染可以是轻度感染、和/或中度感染、和/或重度感染。

[0058] 所述CoV感染可以是急性CoV感染,优选地,其中所述CoV感染是急性COVID-19感染;和/或可以是持续有症状的CoV感染,优选地,其中所述CoV感染是持续有症状的COVID-19感染;和/或可以是后CoV综合征、持续性CoV或长CoV;优选地其中所述CoV感染是后COVID-19综合征、持续性COVID或长COVID。CoV后综合征,持续性CoV或长CoV可包括心血管、呼吸、胃肠、神经、肌肉骨骼、代谢、肾脏、皮肤、耳鼻咽喉、血液学和自主神经系统;精神问题、全身疼痛、疲劳和/或持续发烧引起的一种或多种症状。

[0059] 所述用途可包括用于治疗具有CoV感染(优选COVID-19)症状和体征长达4周;和/或4周至12周;和/或超过12周的患者。

[0060] 所述用途可包括预防、减少或治疗持续性COVID、长COVID或后COVID综合征;优选地,预防、减少或治疗将患者遭受持续性COVID、长COVID或后COVID综合征症状的可能性降至最低;和/或降低此类症状的严重程度;进一步优选地,治疗将CoV感染的症状降至最低。

[0061] 所述用途可降低CoV患者的传染性,包括无症状或症状不明显但具有高病毒载量的患者。所述用途可以减少超级传染源的发生(无症状或症状不明显的高病毒载量患者(例如Tc<25))。

[0062] 所述用途可减少与病原体感染相关的并发症,包括住院、ICU和死亡。优选地,病原体是CoV感染。

[0063] 所述用途可以是预防、减少或治疗持续性COVID(也称为长COVID或后COVID综合征)。

[0064] 该化合物可与皮质类固醇,优选地塞米松联合给药。所述化合物和皮质类固醇可以同时、分别或顺序给药。

[0065] 该化合物可以根据每日一次,给药10天、9天、8天、7天、6天、5天、4天、3天、2天或1天的方案给药;优选2-5天、3-5天、或3、4或5天;最优选3天或5天;最优选3天。

[0066] 该化合物的给药剂量为:每天5mg或更少、每天4.5mg或更少、每天4mg或更少、每天3.5mg或更少、每天3mg或更少、每天2.5mg或更少、或每天2mg或更少;0.5mg/天、1mg/天、1.5mg/天、2mg/天、2.5mg/天、3mg/天、3.5mg/天、4mg/天、4.5mg/天、或5mg/天;优选1mg/天、1.5mg/天、2mg/天或2.5mg/天;优选1.5-2.5mg/天;进一步优选1.5mg/天、2mg/天或2.5mg/天。

[0067] 该化合物的总给药剂量为:1-50mg、1-40mg、1-30mg、1-20mg、1-15mg、3-15mg、3-12mg、4-12mg、4-10mg、4.5-10mg;4.0mg、4.5mg、5mg、5.5mg、6mg、6.5mg、7mg、7.5mg、8mg、

8.5mg、9mg、9.5mg或10mg;优选4.5mg、5mg、6mg、7.5mg、8mg、9mg、或10mg;更优选4.5-7.5mg/天。总剂量可以分成1、2、3、4、5、6、7、8、9或10天,优选3天或5天;最优选3天。

[0068] 该化合物可以以1.5-2.5mg/天的剂量每日一次给药,持续3天。剂量可以为1.5mg/天。剂量可以为2.5mg/天。

[0069] 所述化合物可以是以1.5小时注射给药的PLD,每天一次,连续3天。可以1.5小时注射给药1.5mg PLD,每天一次,连续3天。可以1.5小时注射给药2mg PLD,每天一次,连续3天。可以1.5小时注射给药2.5mg PLD,每天一次,连续3天。可以1.5小时注射给药1mg PLD,每天一次,连续5天。可以1.5小时注射给药2mg PLD,每天一次,连续5天。

[0070] 方案可以是单剂量(1天)。化合物可以1-10mg、4-10mg、4.5-10mg、4mg、4.5mg、5mg、5.5mg、6mg、6.5mg、7mg、7.5mg、8mg、8.5mg、9mg、9.5mg或10mg;优选4.5mg、5mg、6mg、7.5mg、8mg、9mg或10mg;更优选5-9mg、6.5-8.5mg、7-8mg或7.5mg的单剂量给药。该化合物可以是1.5小时注射、单剂量给药的PLD。

[0071] 单剂量方案可与本发明所述的所有疗法一起使用。在实施例中,与皮质类固醇的组合使用(包括随后的皮质类固醇给药)可以与单剂量方案一起使用。多日方案可以与本发明中提出的所有疗法一起使用。

[0072] 皮质类固醇可以在与给药根据本发明的化合物相同的天数每天给药。可在随后的一天或多天给药皮质类固醇。可以在随后的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10天或更多天给药皮质类固醇。当与本发明的化合物在同一天给药时,可以以较高剂量给药皮质类固醇,并且在随后的一天或多天以较低剂量给药。皮质类固醇可以是地塞米松。

[0073] 本发明的化合物可以在给药方案的第1-3天以本发明的剂量给药。皮质类固醇可以在给药方案的第1-3天静脉注射给药。此后,皮质类固醇可以从第4天至第10天通过口服给药或IV给药(取决于医生根据患者临床状况和进展的判断)。皮质类固醇可以是地塞米松。剂量可以是第1至3天6.6mg/天IV(例如8mg磷酸地塞米松),然后从第4天到第10天口服或IV地塞米松6mg/天(例如7.2mg磷酸地塞米松或6mg地塞米松碱)。

[0074] 在实施例中,地塞米松是磷酸地塞米松,并且例如在第1天至第3天以8mg/天的剂量IV给药,然后从第4天至第10天口服或IV地塞米松7.2mg/天。

[0075] 根据本发明的化合物可以注射给药,优选1小时注射、1.5小时注射、2小时注射、3小时注射或更长时间,特别优选1.5小时注射。

[0076] 方案可以是1.5小时注射给药1.5mg普立肽,每天一次,连续3天;或1.5小时注射给药2mg普立肽,每天一次,连续3天;或1.5小时注射给药2.5mg普立肽,每天一次,连续3天;或1.5小时注射给药1mg普立肽,每天一次,连续5天;或1.5小时注射给药2mg普立肽,每天一次,连续5天。

[0077] 方案可以是在第1天作为单剂量以1.5小时注射给药7.5mg普立肽。

[0078] 根据本发明的化合物可以使用负荷剂量和维持剂量给药。

[0079] 根据本发明的方案可以是:

[0080] 第1天2.5mg的负荷剂量,随后几天2mg/天的维持剂量;

[0081] 第1天2.5mg的负荷剂量,随后几天1.5mg/天的维持剂量;

[0082] 第1天2.5mg的负荷剂量,随后几天1mg/天的维持剂量;

[0083] 第1天2.5mg的负荷剂量,随后几天0.5mg/天的维持剂量;

[0084] 第1天2mg的负荷剂量,随后几天1.5mg/天的维持剂量;

[0085] 第1天2mg的负荷剂量,随后几天1mg/天的维持剂量;

[0086] 第1天2mg的负荷剂量,随后几天0.5mg/天的维持剂量;

[0087] 第1天1.5mg的负荷剂量,随后几天1mg/天的维持剂量;

[0088] 第1天1.5mg的负荷剂量,随后几天0.5mg/天的维持剂量;或

[0089] 第1天1mg的负荷剂量,随后几天0.5mg/天的维持剂量。

[0090] 根据本发明的化合物可以与皮质类固醇组合给药。皮质类固醇可以在与化合物给药相同的天数给药。

[0091] 皮质类固醇也可以在随后的一天或更多天给药;例如其中皮质类固醇在第1-3天与化合物一起给药,皮质类固醇在第4-10天中的一天或更多天进一步给药。

[0092] 皮质类固醇可以在给药化合物的天数里静脉注射给药,但在随后的天数里通过口服或IV给药。

[0093] 皮质类固醇可以是地塞米松。地塞米松可以在给药化合物的天数里以6.6mg/天的剂量IV给药。

[0094] 地塞米松可以在随后的天数,优选第4、5、6、7、8、9和10天中的一天或更多天,以6mg/天的剂量口服给药或IV给药。

[0095] 本文定义的地塞米松剂量是指碱重量(base weight)。因此,如果以盐形式使用,可以调节剂量。例如,地塞米松可以是磷酸地塞米松,使得8mg/天磷酸地塞米松相当于6.6mg地塞米松碱,7.2mg/天磷酸地塞米松相当于6mg地塞米松碱。

[0096] 根据本发明的化合物,特别是PLD,可以在第1天至第3天与IV地塞米松6.6mg/天组合静脉注射(IV)给药1.5mg/天,随后从第4天至第10天口服(PO)/IV地塞米松6mg/天(取决于医生根据患者临床状况和进展的判断)。

[0097] 根据本发明的化合物,特别是PLD,可以在第1天至第3天与IV地塞米松6.6mg/天组合静脉注射(IV)给药2.0mg/天,随后从第4天至第10天口服(PO)/IV地塞米松6mg/天(取决于医生根据患者临床状况和进展的判断)。

[0098] 根据本发明的化合物,特别是PLD,可以在第1天至第3天与IV地塞米松6.6mg/天组合静脉注射(IV)给予2.5mg/天,然后从第4天至第10天口服(PO)/IV地塞米松6mg/天(取决于医生根据患者临床状况和进展的判断)。

[0099] 皮质类固醇可在开始用本文定义的化合物治疗前20至30分钟给药。

[0100] 在根据本发明的方案中,患者可另外接受以下药物,优选在开始用根据本发明的化合物治疗前20至30分钟:

[0101] 昂丹司琼8mg IV(或等同药物);

[0102] 盐酸苯海拉明25mg IV(或等同药物);以及

[0103] 雷尼替丁50mg IV(或等同药物)。

[0104] 在根据本发明的方案中,在第4天和第5天,患者可PO接受每天两次4mg的昂丹司琼(或等同药物)。

[0105] 当以单剂量给药时,患者可在注射普立肽前20-30分钟接受以下预防性药物:

[0106] -盐酸苯海拉明25mg i.v;

[0107] -雷尼替丁50mg i.v;

[0108] -地塞米松6.6mg静脉注射;

[0109] -昂丹司琼8mg i.v,缓慢注射15分钟。

[0110] 可每12小时口服昂丹司琼4mg,持续3天,以减轻药物引起的恶心和呕吐。如果在早晨给予普立肽,患者可在下午接受第一剂量的昂丹司琼。

附图说明

[0111] 在以下非限制性附图中进一步描述本发明:

[0112] 图1显示PLD抑制了应答Toll样受体激活的NF-κB转录。用NF-kB-Luc质粒稳定转染人单核细胞(THP-1),并且(A)在存在和不存在PLD时测量NF-kB转录的水平。(B)通过MTT细胞增殖实验测试化合物诱导的细胞毒性。培养物暴露于100nM的PLD中6小时。RQ—雷西莫特(雷西莫特),10μg/mL。LPS-B5—来自大肠杆菌055:B5的脂多糖(LPS-B5),10μg/mL。Poly-C—聚胞苷酸(Polyinosinic-polycytidylic),500μg/mL。以TNF-α为阳性对照组。***p<0.001;**p<0.01

[0113] 图2显示普立肽负性调节TLR触发的细胞因子分泌。应答Toll样受体激活的NF-κB转录导致促炎细胞因子:IL-1(a)、IL-6(b)、IL-8(c)和TNF-α(d)的分泌增加。培养物暴露于100nM的PLD或DMSO 6小时。在处理后6小时,通过ELISA分析分泌的细胞因子。以TNF-α为阳性对照组。***p<0.001;**p<0.01

[0114] 图3显示PLD对细胞因子IL-6、IL-10和TNF-α的离体下调。

[0115] 图4显示LPS刺激的(LPS-challenged)小鼠中经典激活的巨噬细胞的减少。

[0116] 图5显示了普立肽对LPS处理的小鼠中肺泡巨噬细胞募集的影响。小鼠(a)、大鼠(b)和仓鼠(c)分别在单次静脉注射1.0、0.2和0.2mg/kg后血浆和肺中普立肽的浓度-时间曲线(平均值±SD)。

[0117] 图6-MT-2细胞(图6A)和预先激活的PBMC(图6B)中几种浓度(μM)的化合物3的抗病毒活性(-◆-RLU)和毒性(-●-活力(Viability))的图形表示,其中MT-2细胞和预先激活的PBMC都感染了重组病毒(NL4.3 Luc)。图形表示至少是MT-2细胞的两个独立实验和PBMC的四个独立实验的平均值。

[0118] 图7-MT-2细胞(图7A)和预先激活的PBMC(图7B)中几种浓度(μM)的化合物8的抗病毒活性(-◆-RLU)和毒性(-●-活力)的图形表示,其中MT-2细胞和预先激活的PBMC都感染了重组病毒(NL4.3 Luc)。图形表示至少是MT-2细胞的两个独立实验和PBMC的四个独立实验的平均值。

[0119] 图8-MT-2细胞(图8A)和预先激活的PBMC(图8B)中几种浓度(μM)的化合物9的抗病毒活性(-◆-RLU)和毒性(-●-活力)的图形表示,其中MT-2细胞和预先激活的PBMC都感染了重组病毒(NL4.3 Luc)。图形表示至少是MT-2细胞的两个独立实验和PBMC的四个独立实验的平均值。

[0120] 图9-MT-2细胞(图9A)和预先激活的PBMC(图9B)中几种浓度(μM)的化合物10的抗病毒活性(-◆-RLU)和毒性(-●-活力)图形表示,其中MT-2细胞和预先激活的PBMC都感染了重组病毒(NL4.3 Luc)。图形表示至少是MT-2细胞的两个独立实验和PBMC的四个独立实验的平均值。

[0121] 图10-MT-2细胞(图10A)和预先激活的PBMC(图10B)中几种浓度(μM)的化合物11的

抗病毒活性(-RLU)和毒性(-●-活力)的图形表示,其中MT-2细胞和预先激活的PBMC都感染了重组病毒(NL4.3 Luc)。图形表示至少是MT-2细胞的两个独立实验和PBMC的四个独立实验的平均值。

[0122] 图11-15示出荧光图像,其显示a)细胞生长和b)DMSO 24hpi对HCoV-229E感染的Huh-7细胞的抗病毒活性(表2的A1、A2、A3、A4、A5)。可以看出,细胞保持存活,但没有观察到抗病毒效果。

[0123] 图16-19示出荧光图像,其显示a)细胞生长和b)化合物240(膜海鞘素B)在50nM、5nM和0.5nM浓度下24hpi对HCoV-229E感染的Huh-7细胞的抗病毒活性(分别为表2中的B1、B2、B3、B4)。可以看出,细胞在包括高浓度在内的所有浓度下都保持存活;并且在所有浓度下,甚至在亚纳米摩尔浓度下,都可以看到显著的抗病毒特性。

[0124] 图20-23示出荧光图像,其显示a)细胞生长和b)PLD在50nM、5nM和0.5nM浓度下24hpi对HCoV-229E感染的Huh-7细胞的抗病毒活性(分别为表2中的C1、C2、C3、C4)。同样,可以看出,细胞在所有浓度下,包括高浓度下,都保持存活;并且在所有浓度下,甚至在亚纳米摩尔浓度下,都可以看到显著的抗病毒特性。

[0125] 图24-26示出荧光图像,其显示a)细胞生长和b)化合物9在50nM、5nM和0.5nM浓度下24hpi对HCoV-229E感染的Huh-7细胞的抗病毒活性(分别为表的D1、D2、D3)。同样,可以看出,细胞在所有浓度下,包括高浓度下,都保持存活;并且在所有浓度下,甚至在亚纳米摩尔浓度下,都可以看到显著的抗病毒特性。

[0126] 图27-29示出荧光图像,其显示a)细胞生长和b)化合物10在50nM、5nM和0.5nM浓度下24hpi对HCoV-229E感染的Huh-7细胞的抗病毒活性(分别为表2的E1、E2、E3)。同样,可以看出,细胞在所有浓度下,包括高浓度下,都保持存活;并且在所有浓度下,甚至在亚纳米摩尔浓度下,都可以看到显著的抗病毒特性。

[0127] 图30-33示出荧光图像,其显示a)细胞生长和b)PLD在50nM、5nM和0.5nM浓度下24hpi对HCoV-229E感染的Huh-7细胞的抗病毒活性(分别为表2中的F1、F2、F3、F4)。同样,可以看出,细胞在所有浓度下,包括高浓度下,都保持存活;并且在所有浓度下,甚至在亚纳米摩尔浓度下,都可以看到显著的抗病毒特性。

[0128] 图34和图35显示了根据本发明的剂量方案和给药预测的总血浆浓度曲线相对时间的关系。

[0129] 图36显示了根据本发明的进一步剂量方案和给药预测的总血浆浓度曲线相对时间的关系。

[0130] 图37显示了PLD对vero细胞中SARS-CoV-2的抗病毒作用的剂量反应曲线。

[0131] 图38显示了PLD对vero细胞中SARS-CoV-2的抗病毒作用的剂量反应曲线。

[0132] 图39示出x射线,其显示了PLD给药对双侧肺炎患者的影响。

[0133] 图40示出x射线,其显示了PLD给药对单侧肺炎患者的影响。

[0134] 图41显示了用PLD处理的患者的C反应蛋白测试。

[0135] 图42显示了患者4(图42a)、患者5(图42b)、患者6(图42c)和患者7(图42d)的病毒载量记录。患者连续3天(第1-3天)每天以90分钟IV注射给药PLD,在基线、第4天、第7天、第15天和第31天通过PCR评估病毒载量。

[0136] 图43显示了用(PR8)或不用(PC)PLD处理的感染流感病毒的小鼠BALF中的炎症图

形(inflammatory profile)。

[0137] 图44显示了用或不用PLD处理的小鼠肺中流感病毒的滴度。通过qPCR检测病毒NP(NP-PR8)的mRNA水平,定量PLD的抗病毒活性。

[0138] 图45显示了用(PR8)或不用(PC)PLD处理的感染流感的小鼠BALF中免疫细胞,特别是AM(肺泡巨噬细胞)的浸润水平的定量测量。

[0139] 图46显示了VeroE6细胞中的WNV-GFP感染效率。感染效率(GFP;绿线)和细胞生物量(DAPI;蓝线)的普立肽剂量-反应曲线。数据显示为用四个生物学重复(biological replicate)(n=8)进行的两个独立实验的平均值和SEM。

[0140] 图47显示Huh-7细胞中的WNV-GFP感染效率。感染效率(GFP;绿线)和细胞生物量(DAPI;蓝线)的普立肽剂量-反应曲线。数据显示为用四个生物学重复(n=8)进行的两个独立实验的平均值和SEM。

[0141] 图48显示了普立肽对WNV细胞外感染性滴度的影响。用MOI为0.01的WNV/NY99接种Vero-E6(a)或Huh-7细胞(b)。48小时后,收集细胞上清液,通过终点稀释和免疫荧光显微镜测定细胞外感染性滴度。数据以对数尺度的单位体积上清液的感染单位(病灶形成单位(FFU)/ml)表示,并显示为平均值和SEM(N=4)。使用单向ANOVA和Dunnet事后检验(Dunnet's post hoc test)检验统计显著性(*p<0.05)。

[0142] 图49显示了普立肽对细胞内WNV RNA水平的影响。用MOI为0.01的WNV/NY99接种Vero-E6(a)或Huh-7(b)细胞。48小时后,对总细胞RNA进行RT-qPCR。数据表示为对数尺度归一化的基因组拷贝数/60ng总RNA,使用28S RNA作为看家基因(house-keeping gene),并显示为平均值和SEM(N=4)。使用单向ANOVA和Dunnet事后检验检验统计显著性(*p<0.05)。N.D.,未检测到(<1000个拷贝/反应)。

[0143] 图50显示了1nM、10nM和50nM的普立肽(APL)预处理对促炎细胞因子IL6(a)、IL8(b)、IL1β(c)和TNF-α(d)分泌的影响。(e)显示1nM、10nM和50nM PLD处理对细胞活力的影响(相对对照组的百分比)。0时,用1nM、10nM或50nM APL或DMSO(0.2%)处理THP-1细胞,然后在8时用2.5或5μg/mL的雷西莫特刺激。在24时测量细胞因子或细胞活力。

[0144] 图51显示了普立肽处理对在从支气管肺泡灌洗液(BALF)分离的$CD45^+$细胞中,由LPS-B5介导的促炎细胞因子IL-6(c)、IL-10(d)和TNF-α(e)的产生的影响。(a)显示对照组、LPS-B5、以及LPS-B5和PLD处理的细胞中$CD45^+$活细胞的百分比。(b)显示在LPS-B5、以及LPS-B5和PLD处理的细胞中相对对照组的细胞存活的百分比。

[0145] 图52显示了普立肽治疗对由雷西莫特介导的促炎细胞因子TNF-α产生的影响。

[0146] 图53显示了单剂量普立肽7.5mg和1.5、2.0和2.5mg(使用1.5小时注射)在第1天至第3天的总对血浆浓度曲线。

具体实施方式

[0147] 以下实施例适用于本发明的所有方面。

[0148] 现在将进一步描述本发明。在下面的段落中,更详细地限定本发明的不同方面。如此限定的每个方面可与任何其它一个或多个方面或一个或多个实施例组合,除非明确指示不要这样组合。特别地,指示为优选或有利的任一特征可以与指示为优选或有利的任何其它一个或多个特征组合。

[0149] 在本申请中,使用了多个通用术语和短语,其应当被解释如下。

[0150] 病毒感染情况下的“治疗”(“treat”、“treating”、以及“treatment”)可指以下一项或多项:1)减少感染细胞的数量;2)减少血清中存在的病毒粒子数量,包括病毒滴度的降低(可通过qPCR测量);3)抑制(即在一定程度上减缓,优选停止)病毒复制速率;4)减少病毒RNA载量;5)减少病毒感染性滴度(能够入侵宿主细胞的病毒颗粒的数量);和6)在某种程度上缓解或减轻与病毒感染相关的一种或多种症状。这可能包括与病毒感染相关的炎症。

[0151] “患者”包括人类、非人类哺乳动物(如狗、猫、兔子、牛、马、绵羊、山羊、猪、鹿等)和非哺乳动物(如鸟类等)。患者需要住院治疗以治疗炎症和/或感染。

[0152] 普立肽(Plitidepsin)(PLD)是一种环酯肽(cyclic depsipeptide),最初从海洋海鞘白色念珠菌(marine tunicate Aplidium albicans)中分离得到。PLD也被称为Aplidin或Aplidine。这些术语在本文中可互换使用。PLD类似物是本文定义为式I、II或III化合物的那些类似物。在优选实施例中,本发明涉及PLD的用途。

[0153] 我们发现PLD

[0154] (i)抑制NF-κB的转录,尤其是当被Toll样受体激活诱导时;

[0155] (ii)体内和离体抑制促炎细胞因子的分泌,所述促炎细胞因子例如但不限于IL-1、IL-6、IL-8和TNF-α;且

[0156] (iii)抑制巨噬细胞的激活和/或募集。

[0157] 这些特性意味着PLD在治疗炎症方面具有特殊的功效。特别地,我们已经发现PLD在治疗由病原体感染引起的炎症方面具有特别的功效。如实施例中所示,我们发现PLD可以抑制许多关键的促炎细胞因子的分泌。特别地,我们发现PLD可通过Toll样受体(TLR)抑制NF-kB的转录,以及后续的促炎细胞因子的分泌。如本文所解释的,Toll样受体应答于许多感染性刺激而被激活。TLR配体(即刺激物(stimuli))与Toll样受体(TLR)的结合触发下游的信号传递级联,其最终导致核转录因子-κB(NF-kB)的激活,核转录因子-κB(NF-kB)控制促炎细胞因子和趋化因子的诱导。我们已经发现PLD显著地阻断这种级联反应,从而导致促炎细胞因子释放或分泌的减少。结果,在一实施例中,PLD可用于在Toll样受体激活后预防炎症。在另一实施例中,PLD可用于抑制NF-kB转录或NF-kB诱导的促炎细胞因子的表达或分泌。在另一实施例中,PLD可用于抑制促炎细胞因子的表达和/或分泌。

[0158] 我们还发现,PLD显著降低巨噬细胞激活和/或募集(特别是应答于病原体刺激)的水平。激活的巨噬细胞是炎症的关键介质,抑制激活是治疗炎症的核心。因此,在另一实施例中,PLD还可用于治疗病原体诱导的炎症,特别是通过减少巨噬细胞激活和/或募集。

[0159] 还显示PLD以高亲和力和低解离速率结合人翻译延伸因子eEF1A(真核翻译延伸因子1α1)。对肿瘤细胞的FLIM-phasor FRET实验表明,PLD定位在肿瘤细胞中足够接近eEF1A,从而提示在活细胞中形成药物-蛋白质复合物。PLD抗性细胞系(PLD-resistant cell lines)还显示降低的eEF1A蛋白水平和这些抗性细胞中eEF1A的异位表达恢复了对PLD的敏感性,表明eEF1A直接参与了PLD的作用机制。

[0160] 许多病毒,例如SARS-CoV和SARS-CoV-2的N蛋白,也与eEF1A结合,并且这种结合对于病毒复制是必需的。然而,给药PLD和后续的PLD与eEF1A的结合阻止或减少病毒N-蛋白与eEF1A的结合。这反过来又可以防止病毒复制。因此,PLD和EF1A之间的相互作用可降低从头合成病毒衣壳的效率,并因此导致病毒载量的降低。

[0161] 除此之外,PLD与eEF1A的结合阻止了eEF1A与其通常的结合配偶体相互作用。一种这样的结合配偶体是dsRNA激活的蛋白激酶(PKR或eIF2AK2)。PLD与eEF1A的结合从与eEF1A的复合物中释放PKR,导致PKR的活化。PKR是抗病毒免疫应答中的关键角色。具体而言,

[0162] (i)活化的PKR磷酸化起始因子eIF2的α亚基,导致形成无活性的eIF2复合物;

[0163] (ii)PKR的激活通过Fas聚集和NF-κB转位的机制诱导细胞凋亡,从而消除感染细胞。

[0164] 值得注意地,病毒(如CoV)的蛋白4a通过螯合(sequestration)dsRNA强烈抑制PKR的激活。PLD绕过这种病毒反应,通过从eEF1A复合物释放PKR而导致PKR激活,这可以从在没有病毒感染的情况下PKR的激活中看出。

[0165] 最后,除上述外,PLD与eEF1A的结合也激活了ER应激诱导的未折叠蛋白反应(UPR),这反过来又导致了许多抗病毒反应,包括eIF2α的磷酸化。

[0166] 通过这些机制的结合-(i)抑制或减少N蛋白/eEF1A相互作用;(ii)PKR的激活和(iii)UPR的激活;PLD阻止病毒复制并导致宿主反应的激活,从而消除病毒。两者都有助于有效的病毒疗法。靶向eEF1A的另一个优点是它是人类目标,因此不会像病毒蛋白那样突变以逃避PLD。

[0167] 因此,本发明的化合物(包括PLD)可用于治疗病毒感染和由病毒感染引起的任何炎症。换句话说,本发明的化合物(包括PLD)作为单一疗法可用于治疗由病毒感染引起的两种适应症-感染本身(病毒合成的抑制和病毒的消除)、以及任意(后续的)过度的宿主炎症反应-即高细胞因子血症。

[0168] 因此,本发明的化合物(包括PLD和膜海鞘素B(didemninB)),特别是PLD,可用于治疗炎症,特别是与Toll样受体激活和/或病原体感染引起的炎症相关的炎症。

[0169] 本发明可用于以下病毒:

[0170] 黄病毒科

[0171] 黄病毒科病毒(flaviviridae virus)是许多影响全球公共卫生的重要疾病的罪魁祸首。黄病毒科病毒包括黄热病毒(YFV)、寨卡病毒(ZIKV)、日本脑炎病毒(JEV)、西尼罗病毒(WNV)、丙型肝炎病毒(HCV)和登革热病毒(DENV)。黄病毒科病原体在感染细胞中夺取细胞途径,产生允许病毒复制的环境。通过与病毒RNA的3′(+)茎环和几种复制复合物蛋白的相互作用,eEF1A在负链RNA合成和病毒复制中具有重要作用。延伸因子eEF1A与包括蜱传黄病毒在内的几种不同(divergent)黄病毒的RNA的3′端茎环相互作用,并与登革热病毒复制复合物在感染细胞中共存。这些结果表明eEF1A在所有黄病毒的RNA复制中起相似的作用。所有黄病毒引起的疾病的另一个特征是,一小部分患者遭受病毒感染炎症反应的加剧(细胞因子风暴),这最终产生组织损伤并恶化由病毒引起的病理过程。

[0172] 1.登革热病毒

[0173] 登革热是由四种登革热病毒(DENV-1-4)中的任何一种引起的,属于黄病毒科。DENV是含有约10千碱基长度的单链(+)RNA的小包膜病毒,其编码被切割以产生10个病毒蛋白的单个多蛋白。登革热病毒感染是世界热带和亚热带地区的主要健康问题。最初的DENV感染可能是无症状的或产生登革热(DF),一种急性发热性疾病,伴有头痛、关节痛和皮疹,患者通常可以在没有并发症的情况下康复。异质性登革热病毒血清型的二次感染可产生登革出血热/登革休克综合征(DHF/DSS),其特征是血浆渗漏和异常出血,可导致休克和死亡。

严重登革热的标志是血管完整性的瞬间扰动(transient perturbation)和凝血。恢复通常是快速和完整的,这表明关键机制是血管系统的功能变化,而不是结构变化,这很可能是由于局部产生的细胞因子的作用。证明严重登革热中的过渡的免疫激活的研究强烈表明:免疫应答在登革热发病机制中起着关键作用。固有免疫和适应性免疫(及其相互作用)都参与了这一过程。登革热患者外周血细胞中的早期基因表达由I型IFN介导的应答基因主导,除I型IFN外,树突状细胞和单核细胞/巨噬细胞也产生可增加血管通透性的促炎细胞因子。这种细胞因子在短时间内的海啸(tsunami)诱导血管内皮细胞的破坏和凝血系统的失调,导致血浆渗漏、出血和休克。

[0174] 真核延伸因子1A(eEF1A)是SphK1的直接激活剂。DENV-2RNA与来自感染细胞的eEF1A共存并共沉淀。在DENV-2感染细胞后期的SphK1活性的降低可能是DENV-2与SphK1竞争eEF1A结合并劫持细胞eEF1A以进行自身复制的策略的结果。

[0175] 2.寨卡病毒

[0176] 寨卡病毒(Zika virus,ZIKV)是寨卡热的病原,属于黄病毒科。ZIKV是具有约11千碱基长度的基因组的小包膜ss(+)RNA病毒,其编码被切割以产生10个病毒蛋白的单个多蛋白。人类感染ZIKV在过去十年在太平洋和美洲出现之前是间断发生的。事实上,在2013年和2014年法属波利尼西亚大规模爆发之前(当时报告了严重的神经系统并发症),ZIKV感染仅与轻度疾病有关,并且在巴西与ZIKV感染相关的在怀孕期间严重先天性畸形(小头畸形)急剧增加。大多数病例(约80%)无症状。当出现症状时,它们通常是轻微的、自限性的,并且类似于其它虫媒病毒感染(例如,DENV和CHIKV)。常见的症状包括皮疹、发烧、关节痛和头痛。感染寨卡病毒的病人中很少有死亡病例。目前已知ZIKV可引起胎儿感染和先天性寨卡综合征,包括小头畸形、脑畸形、眼科和听力缺陷以及关节扭伤。

[0177] 在ZIKV期间炎症标志物轻度升高已经描述。与DENV感染的情况类似,在ZIKV感染中,干扰素系统是宿主防御和病毒反击目标的中央介质。在ZIKV感染的急性期期间观察到多功能免疫激活,与Th1(IL-2)、Th2(IL-4、IL-13)、Th17(IL-17)以及TH9(IL-9)应答(16)相关的细胞因子谱(cytokine profile)升高。在ZIKV感染患者中也观察到增加的IL-4、IL-6、IL-8、IL-10和IP-10水平。虽然在ZIKV患者中没有观察到“细胞因子风暴”,但在ZIKV感染的胎盘中观察到了大量炎症,这可能会阻碍妊娠的成功(16)。ZIKV干扰胎盘的促炎/抗炎平衡,导致组织损伤和炎性霍夫鲍尔细胞(Hofbauer cell)对绒毛核心(villous core)的大量浸润。

[0178] 3.黄热病病毒

[0179] 黄热病(YF)是一种由黄热病病毒(YFV)引起的致死性病毒性出血热(VHF),属于黄病毒科。YFV是具有大约11千碱基长度的基因组的小包膜ss(+)RNA病毒,其编码被切割以产生10个病毒蛋白的单个多蛋白。虽然大多数YFV感染无症状或症状非常轻,但大约12%的患者发生严重的YF,表现为黄疸、出血和多器官衰竭。YFV感染的特点是严重肝炎、肾功能衰竭、出血、以及休克和多器官衰竭的快速终末事件。

[0180] 黄热病(YF)的病程分为三个阶段:“感染”阶段,一种流感样疾病,特征是发烧、头痛、恶心和肌痛,在3到6天的潜伏期后开始。病毒血症的高峰出现在这个感染阶段。然后是“缓解”期,之后大多数患者都会康复。最后,在该缓解后,在疾病的严重形式中,患者发展到中毒阶段,其中,发生出血和肝脏疾病症状,以及多器官功能障碍。

[0181] 感染的早期症状可能是由于对感染的固有免疫应答，包括干扰素-α和TNF-α等急性期反应物的产生。在这种疾病的严重形式中，突然的全身炎症反应综合征(“细胞因子风暴”)导致了终末事件和死亡。在猴子身上，YF病毒主要在淋巴组织中复制，这种复制超出了中和抗体的出现范围。淋巴组织在YF感染中经历了深刻变化(profound change)，这些组织中细胞的激活有助于YF的全身性终末特征(systemic terminal feature)，其特征是释放促炎细胞因子。终末事件发生迅速，临床上以心血管休克和多器官衰竭为特征。这一阶段的特征强烈表明它们是由炎症级联介导的，尽管很少有患者被直接研究。在自然获得性疾病中，致命病例中类似于细菌性败血症的促炎和抗炎细胞因子(IL-6、IL-8、TNF-α、单核细胞趋化蛋白-1、IL-1受体拮抗剂、IL-10)显著升高。抗体和T细胞的免疫清除导致促炎细胞因子的释放、GPCR发信号、NFκB激活和氧自由基的产生，这有助于发病和细胞因子风暴。

[0182] 4.西尼罗病毒

[0183] 西尼罗病毒(WNV)是一种重要的新兴嗜神经病毒，为全球范围内人类和马暴发日益严重的脑炎的原因。WNV为黄病毒科的成员，由a～11kb正义单链RNA(ssRNA)基因组编码。基因组被翻译为单个多聚蛋白，随后通过病毒和宿主蛋白酶切割该多聚蛋白生成10种病毒蛋白。WNV的发病机制分为三个阶段：早期阶段初发感染和传播(早期阶段)、外周病毒扩增(内脏器官散布阶段)、以及神经侵袭(中枢神经系统(CNS)阶段)。包括I型干扰素(IFN)和先天细胞介导应答在内的固有免疫应答负责WNV的早期控制，而包括体液和适应性免疫细胞介导应答(CD4+、CD8+和调节性T细胞)在内的适应性免疫应答对于WNV清除和限制感染后期可能的免疫应答介导损伤必不可少。

[0184] 皮下感染后的早期阶段通过以下各项定义：WNV在角质形成细胞和皮肤驻留DC中复制，随后病毒在引流淋巴结内扩增，从而导致病毒血症并扩散到内脏器官。WNV感染的特异性靶细胞没有明确限定，但被认为是DC、巨噬细胞和可能的中性粒细胞的亚群。WNV侵入CNS组织(例如，脑和脊髓)构成感染的第三阶段。WNV可以通过促进病毒神经侵袭的机制的组合进入大脑，诸如有或无破坏血脑屏障(BBB)和/或沿着外周神经元运输病毒的直接感染。

[0185] 先天抗病毒防御对于控制WNV感染必不可少，这些先天抗病毒防御包括I型IFN和促炎细胞因子的产生、抗病毒基因的表达、以及适应性免疫应答的后续激活。在WNV感染中，固有免疫活性主要由RIG-1样受体(RLR)信令触发，而Toll样受体(TLR)也会有助于NF-κB激活以及I型干扰素和促炎细胞因子的产生。DC和巨噬细胞都是固有免疫岗哨细胞和WNV感染的靶细胞，它们在链接固有免疫应答和适应性免疫应答中起着关键作用。巨噬细胞和DC易被WNV激活，从而释放促炎细胞因子和趋化因子，诸如I IFN型、TNF型、IL-1β型、CCL2型、CCL3型、CCL5型、以及IL-8型。这些细胞因子在调节先天细胞介导应答(涉及NK细胞、中性粒细胞和γδT细胞)以及发展适应性免疫应答中很重要。WNV发病机制的一个主要标志为神经炎症，其由过度的先天性免疫应答和获得性免疫应答引起。炎性单核细胞积聚到脑中并分化为巨噬细胞和小胶质细胞也会加重神经炎症和CNS损伤，如在非致死性WNV感染的鼠模型中所演示的。TLR识别单核细胞/小胶质细胞中的WNV核酸可能导致TNF-α的产生，这会导致紧密连接的丧失，从而允许WNV和免疫细胞进入小鼠的脑的血管周围空间。因此，WNV对单核细胞/巨噬细胞系统的细胞的激活似乎会产生重要的神经病理学后果，并且过度的先天性应答可能导致炎症，从而更改血脑屏障通透性并允许病毒进入CNS。事实上，使用阻断TNF-α

的抗体和其他促炎介体治疗受感染的神经元细胞导致WNV介导神经元死亡的显著减少，表明这些介体在CNS中WNV感染的发病机制中起主要作用。

[0186] 5.丙型肝炎病毒

[0187] 丙型肝炎病毒(HCV)感染导致进行性肝病，其从慢性炎症恶化为纤维化、肝硬化甚至肝细胞癌。据估计，HCV所致肝炎的患病率为7100万人，每年造成约40万人死亡。丙型肝炎病毒(HCV)属于黄病毒科，是一种含有长度大约为10个千碱基的单链(+)RNA的小包膜病毒，其对单个多聚蛋白进行编码，该单个多聚蛋白通过细胞蛋白酶和病毒蛋白酶切割以生成10种病毒蛋白。HCV感染时，募集到肝脏的肝细胞和免疫细胞(巨噬细胞、肥大细胞、树突状细胞和自然杀伤细胞)启动先天性免疫应答，导致急性HCV感染的自发消除。然而，在70％至80％的病例中，在急性阶段期间，免疫应答不能清除病毒，导致慢性感染。肝细胞中持续的HCV复制导致炎症和趋化因子的产生不受控制。过量的细胞因子(如炎症介质)进一步导致肝脏炎症，最终加剧组织损伤和肝病进展。

[0188] 直接抗病毒治疗首选HCV治疗，但单独使用抗病毒药物不足以阻断HCV感染个体的严重炎症和肝损伤。HCV只是病理生理过程的触发因素，但持续的炎性细胞因子风暴和HCV诱导肝细胞损伤加剧了严重肝病的发展。HCV RNA诱发TLR介导NF-κB活化和炎性细胞因子释放，同时HCV蛋白激活NLRP3。所释放的炎症因子与它们对应的受体结合，然后诱导NF-κB激活，从而导致下游炎症应答。因此，长期持续且不受控制的炎症应答为这些疾病的标志，进一步导致肝损伤和更严重的疾病进展。在直接抗病毒治疗后获得持续抗病毒应答的一些患者仍处于发展为肝硬化和肝细胞癌的长期风险。因此，将直接抗病毒治疗与抗炎/肝保护剂结合是一种在治疗HCV患者方面很有前途的方案。

[0189] 6.蜱传脑炎病毒

[0190] 蜱传脑炎病毒(TBEV)引起严重疾病，这种严重病毒会导致永久性神经病症甚至死亡。TBE的严重程度取决于病毒亚型、欧洲(TBEV-Eu)、西伯利亚(TBEV-Sib)、以及远东(TBEV-FE)。TBEV-Eu是最温和的变体(死亡率小于2％)，而TBEV-FE是最严重的变体，其具有严重的神经后遗症率以及高达40％的死亡率。TBEV是一种小包膜病毒，其含有约11个千碱基的单链(+)RNA，对单个多聚蛋白进行编码，该单个多聚蛋白通过细胞蛋白酶和病毒蛋白酶切割以生成10种病毒蛋白。蜱传脑炎(TBE)是一种具有三期病程的综合征，开始为流感样疾病(特点为发烧、疲劳和身体疼痛)，之后65％至70％的感染个体清除了病毒。大约三分之一的患者随后是无症状疾病阶段，最后是神经侵袭阶段，该神经侵袭阶段具有严重程度不同的神经症状，范围从脑膜炎到伴有或没有脊髓炎的严重脑膜脑炎。

[0191] 已经提出了免疫机制和非免疫机制以有助于TBEV穿过血脑屏障(BBB)并侵入CNS。细胞因子可能促进这一过程。诸如TNF-α和IL-6之类的细胞因子会影响内皮细胞渗透性，该内皮细胞渗透性可能诱导BBB破坏，从而导致病毒与中枢神经系统交叉。诸如树突状细胞、中性粒细胞、单核细胞、巨噬细胞和T细胞之类的TBEV感染的免疫细胞也会迁移到实质隔室中，从而引起脑和脊髓中的神经元或其他细胞的感染。

[0192] TBEV感染通过细胞外环境或细胞质中病毒dsRNA的TLR3识别激活1型IFN的产生。IFN-α系统似乎在激活先天性免疫中起关键作用。它影响免疫活性细胞的激活和其他促炎细胞因子的诱导。在小鼠模型中，TBEV在感染的晚期诱导细胞因子风暴，这可以被认为是细胞因子风暴。

[0193] 有趣的是,在TBEV感染患者的急性感染阶段期间,血液和脑脊液中的S1P水平大幅升高。这种增加可能会促进促炎性应答。增加细胞外S1P的产生可以通过S1P途径的调节剂调节。事实上,延伸因子eEF1A结合并激活SPHK以使鞘氨醇磷酸化并产生S1P。普立肽(platidepsin)靶向eEF1A,从而抑制经处理细胞中产生S1P。

[0194] 7.猪瘟病毒

[0195] 猪瘟(CSF)是目前世界范围内最严重的猪跨境病毒性疾病之一。它对动物健康和生猪产业有巨大影响,因此须向世界动物卫生组织报告。猪瘟病毒(CSFV)是一种小型包膜病毒,属于黄病毒科。它具有大约12.3kb的单链(+)RNA基因组,该单链(+)RNA基因组被翻译为一个多聚蛋白。通过病毒蛋白酶和细胞蛋白酶对前体蛋白进行共翻译和翻译后加工产生13种成熟蛋白。猪细胞中病毒的推定受体为CD46。猪瘟可以分为以下几种形式的疾病:急性(短暂或致命)病程、慢性病程、以及持续性病程,通常需要在怀孕期间感染(34)。在感染后的头两周内,急性阶段的特点为非特异性(通常称为“非典型”)临床症状,如高烧、厌食、胃肠道症状、全身虚弱、以及结膜炎。感染后约两周到四周会出现神经症状,这些神经症状包括失调、轻瘫、瘫痪和抽搐。同时,皮肤出血或紫绀可能出现在身体的不同位置,诸如耳朵、四肢和腹侧腹部。这些晚期症状是教科书级病例,因此被称为“典型”CSF症状。在急性致死进展中,通常在CSFV感染后2周至4周死亡,且死亡率可以高达100%。当受感染的猪不能产生足够的免疫应答时,就会发生慢性病程。一般而言,在受感染的动物中只观察到非特异性临床症状,如长程发热、抑郁、消瘦、以及弥漫性皮炎。

[0196] 急性猪瘟的一个标志是感染后早期血清中干扰素(IFN)-α水平较高,随后出现炎性细胞因子风暴。激活的巨噬细胞好像在CSF的免疫发病机制中起关键作用。事实上,对于在CSFV感染过程中发生的许多病变,几乎可以排除病毒的直接损害。

[0197] 反转录病毒科

[0198] 反转录病毒科是正义单链RNA病毒族,其特征在于它们表达反转录酶,该反转录酶是一种RNA依赖性DNA聚合酶,该RNA依赖性DNA聚合酶从它们的RNA基因组生成DNA,然后该DNA随后整合到受感染的植物的宿主基因组中。反转录病毒科病毒包括引起AIDS的HIV-1和HIV-2以及HTLV(人类嗜T淋巴细胞病毒)。HIV感染尤其触发表现为急性反转录病毒综合征(ARS)且在一些个体或晚期感染病例中与细胞因子风暴综合征一致的炎症综合征的免疫应答。

[0199] 小RNA病毒科

[0200] 小RNA病毒是小的非包膜的单链(+)RNA病毒。它们的小基因组跨越8个千碱基,含有开放读框,该开放读框被翻译成单个多肽,该单个多肽随后通过病毒蛋白酶加工成11至12个单独病毒蛋白。该族包括肠道病毒(EV)、肝病毒、肺病毒、鼻病毒、口蹄疫病毒、以及心脏病毒。作为几种小RNA病毒感染(1型糖尿病、心肌炎或瘫痪)结果的严重致病疾病的主要特征之一是与自身免疫密切相关。最简单的解释可能是,使用细胞病变感染剂感染导致细胞死亡或损伤,从而释放在感染前以低浓度存在的隔离性自身抗原或细胞自身抗原,从而防止自身致敏。由于包括脊髓灰质炎病毒(PV)、柯萨奇病毒(CVB)和口蹄疫病毒在内的几种小RNA病毒可能诱导持续性病毒感染,MDA5的慢性激活和IFN-I的上调可能产生一些研究者认为是小RNA病毒感染促进诱导自身免疫的主要因素的佐剂效应。

[0201] 1.口蹄疫病毒

[0202] 口蹄疫病毒(FMDV)是一种在全世界范围内影响猪、牛和其他家畜和野生动物的急性水疱病的病原体。FMDV是一种来自小RNA病毒科(Picornaviridae)族的小型非包膜病毒，其具有长度约为8.5Kb的单链(+)RNA基因组，该单链(+)RNA基因组对单个多聚蛋白进行编码，该单个多聚蛋白通过病毒蛋白酶进行蛋白水解加工以生成14种病毒蛋白。

[0203] 病毒感染可以刺激多种途径以诱导具有抗病毒功能、抗增殖功能和免疫调节功能的I型IFN和III型IFN。IFN-I促进树突状细胞(DC)的成熟，从而影响所诱导的适应性免疫应答的效力。一些病毒蛋白酶可以通过切割参与这些途径的受体、衔接子和调节剂来抑制I型IFN的产生和NF-κB信令。然后，通过表达数百个IFN刺激基因，放大IFN应答并散播到周围未受感染的细胞。MDA5参与识别小RNA病毒。1型IFN诱导双链RNA依赖性蛋白激酶R(PKR)在抑制FMDV复制中的相关性已经在猪和牛细胞中得到充分证实。与未经处理的受感染的细胞相比较，使用PKR的抑制剂处理使病毒产量提高了几倍，并且通过RNA干扰进行PKR下调也会产生更高的病毒滴度，从而进一步证实了PKR在控制口蹄疫病毒复制时的直接作用。延伸因子EEF1A2与PKR结合并维持激酶保持不变。普立肽与EEF1A2结合，从而从具有延伸因子的复合物中释放PKR并激活激酶(48)。这样，普立肽可以增强对口蹄疫病毒的应答。

[0204] 2.肠道病毒A71

[0205] 手足口病(HFMD)是一种传染性病毒性疾病，主要影响婴幼儿。主要表现为发热，手部、足部和臀部上有水疱性皮疹、以及口腔粘膜有溃疡。通常，HFMD具有自限性，其中患者会出现发烧、手和脚底出现斑丘疹皮疹或丘疹水疱性皮疹、以及疼痛性口腔溃疡，它们通常在不到十天内消退。然而，一小部分儿童可能会出现严重的并发症，这些并发症包括脑膜炎、脑炎、急性弛缓性麻痹和神经呼吸综合征、甚至死亡。HFMD由两种病原体引起：肠道病毒71(EV-A71)和柯萨奇病毒A16(CV-A16)。EV-A71是一种来自小RNA病毒科的小的二十面体的非包膜单链(+)RNA病毒。EV71的大约7.4kb基因组对单个多聚蛋白进行编码，该单个多聚蛋白以蛋白水解方式切割为各种结构病毒蛋白和非结构病毒蛋白。

[0206] 致命EV-A71感染病程伴有广泛的神经元变性、严重的中枢神经系统炎症和坏死、以及肺充血和出血。全身炎症应当与CNS炎症和细胞因子风暴结合可能在EV71相关暴发性肺水肿的发展中起重要作用。脑源性促炎性细胞因子可能在脑炎后遗症血脑屏障破坏后进入体循环，以全身激活炎性级联，从而有助于脑炎后遗症全身炎症反应综合征(SIRS)的发展，进而导致心肺衰竭和肺水肿。

[0207] 3.柯萨奇病毒

[0208] 柯萨奇病毒(CV)是一种与若干种严重的人类疾病相关联的相对常见的肠道病毒，这些严重的人类疾病包括心肌炎和脑膜脑炎。柯萨奇病毒是来自小RNA病毒科的小的二十面体的无包膜单链(+)RNA病毒，其中7至8个千碱基的基因组共价链接到病毒蛋白VPg，该基因组充当RNA合成的引物。传播是通过粪-口途径。柯萨奇病毒可以分为两组：A和B。A组病毒优先感染皮肤和粘膜，从而引起诸如手足口病(HFMD)之类的疾病。柯萨奇病毒(CVB)组易感染内脏器官，从而引起胰腺炎、肝炎、心肌炎等。特别地，血清型B3病毒(CVB3)与人心肌炎的发展相关。

[0209] CV是一种相对常见的儿科病毒，其通常引起范围从亚临床症状到流感样症状以及轻度胃肠炎的轻度感染。CV已被证明会感染心脏、胰腺和CNS。在一些情况下，CV会导致严重的全身性炎性疾病，诸如脑膜脑炎、胰腺炎、以及心肌炎，所有这些疾病都是致命的或导致

持久性器官功能障碍，该持久性器官功能障碍包括扩张型心肌病和脑脊髓炎，其中死亡率高达10％。

[0210] 在通过宿主胃肠道吸收之后，CVB3感染并在派伊尔氏淋巴集结(Peyer's patches)和脾脏的淋巴细胞和巨噬细胞中复制。随后，感染性病毒粒子被释放到血液中，并且扩散到诸如心脏和胰腺之类的器官。病毒性心肌炎的发展一般分为三个不同的阶段。前3天至前4天是'急性'期，其特征在于病毒复制。病毒所产生的细胞裂解和TLR对PAMP的识别诱导包括IL-1b、IL-6、IL-18、TNF-α、以及I型和II型干扰素(IFN)在内的炎性细胞因子的表达。这些细胞因子由心脏驻留细胞产生，这些心脏驻留细胞包括肌细胞、成纤维细胞、内皮细胞、以及树突状细胞(DC)。这些细胞因子信号激活局部巨噬细胞，上调内皮粘附分子以及趋化因子和趋化因子受体以共同触发天生性免疫细胞的募集。从第4天或第5天至大约第14天的亚急性阶段开始为先天性免疫系统的细胞对心脏的浸润。单核细胞参与死细胞的吞噬作用并强烈增加促炎细胞因子的表达。在亚急性阶段期间，免疫应答不仅消除了受感染的细胞和死亡的细胞，还显著促进了不可逆心脏损害。病毒性心肌炎的第三阶段在病毒完全消除后开始，并且特征在于心脏修复和使用纤维化疤痕代替死亡组织，从而长期影响心脏功能。

[0211] 4.鼻病毒

[0212] 人类鼻病毒(HRV)为超过一半的感冒样疾病的原因，每年在医疗访问和缺勤天数上花费数十亿美元。HRV经由接触(直接或通过染菌杂物)或气溶胶(小颗粒或大颗粒)在人与人之间传播。HRV属于小RNA病毒科并且为具有约7,200bp的基因组的单链(+)RNA病毒，该基因组涵盖单个ORF，该单个ORF对通过经病毒编码的蛋白酶切割的多聚蛋白进行编码以产生11种病毒蛋白。存在三个遗传上不同的HRV组，它们被指定为群A、群B和群C。

[0213] 大多数HRV-A和HRV-B血清型(主受体群)经由ICAM-1(免疫球蛋白超族的成员)进入气道上皮细胞。HRV很少与上呼吸道的细胞病变有关。除了对呼吸上皮细胞的直接作用外，先天性宿主应答和适应性宿主应答也在HRV感染的发病机制中起作用。I型干扰素(IFN)应答由MDA-5和RIG-1介导。这些受体使I型IFN和II型IFN和促炎细胞因子(包括RANTES、IP-10、IL-6、IL-8和ENA-78)的诱导最大。HRV刺激IL-8产生部分由NF-κB依赖性转录激活途径介导。IL-8水平与症状严重程度(流涕和鼻塞)相关，并且在病毒接种后48小时至72小时达到峰值。

[0214] 5.甲型肝炎

[0215] 甲型肝炎病毒(HAV)每年造成约140万例肠道传播肝炎(WHO情况说明书N°328，甲型肝炎，2013年)，尽管存在成功疫苗，但仍然是死亡的一个来源。与其余小RNA病毒不同，HAV有一个包膜，该包膜使HAV非常稳定，不能关闭宿主蛋白质合成。细胞表面分子TIM-1充当HAV的受体。疾病严重程度取决于年龄，在幼儿中是轻微的或无症状的，并且表现为急性肝炎(黄疸、疲劳、全身不适等)，而在老年人中重型肝炎的发病率较高。重型肝炎影响50岁以上的人，其中死亡率高达5.4％。

[0216] HAV是一种属于小RNA病毒科的单链(+)RNA假包膜病毒。其基因组跨越7.5kb，含有单个开放读框，该单个开放读框对通过病毒蛋白酶切割为10种病毒蛋白的多聚蛋白进行编码。RNA基因组缺乏5'帽结构，但与VPg蛋白结合。

[0217] 感染HAV病程伴有初期症状，如发烧或黄疸，在约70％的病例中，约三分之一的患

者无症状。HAV感染没有慢性携带状态，不会导致慢性肝炎或肝硬化。诸如HAV之类的小RNA病毒的细胞质RNA由MDA5感测，但与HCV相比之下，HAV在受感染的肝脏中最低限度地刺激IFN应答。HAV 3C蛋白酶切割NF-κB必需调节剂(NEMO)，从而减弱MAVS和TLR3两者下游的核因子-κB(NF-κB)激活。肝损伤不是由甲肝病毒直接引起，而是由免疫介导机制引起。来自AHA患者的Treg细胞经历质变，从而产生TNF-α。而且，来自AHA患者的产生TNF-α的Treg细胞在其表型方面表现出Th17样特征，并且具有减弱的抑制功能。炎性Treg细胞与AHA中的免疫病理肝损伤相关联。

[0218] 披膜病毒科

[0219] 披膜病毒科仅含有1个属，即，甲病毒科(Alphaviridae)，计有31种。甲病毒是具有约11至12个千碱基的单链(+)RNA基因组的小包膜二十面体病毒。该封帽RNA基因组被分为对非结构蛋白进行编码的非结构域(基因组的5'-末端三分之二)和对病毒的三个结构蛋白进行编码的结构域(基因组的3'-末端三分之一)。非结构蛋白从基因组RNA本身翻译为一个或两个多聚蛋白。这些多聚蛋白被切割以产生nsp1、nsP2、NSP3、以及NSP4，以及具有不同于最终产物的重要功能的若干个切割中间体。结构域被翻译为来自封帽亚基因组mRNA(26S mRNA)的多聚蛋白。

[0220] 在许多地区，甲病毒严重或潜在威胁人类健康。在北美和南美，东部马脑炎病毒(EEEV)和西部马脑炎病毒(WEEV)经常在人类中造成致命脑炎，尽管病例数目很少。委内瑞拉马脑炎病毒(VEEV)也会造成人类疾病。基孔肯雅病毒(CHIKV)及其近亲O'Nyong-Nyong病毒(ONNV)已经造成数百万例严重但并非致命的疾病，其特点为发烧、皮疹、以及疼痛性关节痛。罗斯河病毒(RRV)、牛泡沫病毒(BFV)和辛德毕斯(Sindbis)病毒(SINV)在人类中造成流行性多关节炎，其中症状会持续多年。塞姆利基森林病毒(SFV)所造成的疾病的特点为特别严重的头痛、发烧、肌痛、以及关节痛。

[0221] 1.基孔肯雅病毒

[0222] 基孔肯雅病毒(CHIKV)是一种蚊虫传播的疾病(基孔肯雅热)的病原体，该基孔肯雅热是一种使人衰弱的关节炎疾病，这种疾病在包括新生儿在内的人类中造成不可估量的发病率和一些死亡率。CHIKV具有约12个千碱基的单链(+)RNA基因组。该基因组以两个开放读框组织：5'ORF，其由基因组RNA翻译并且对四种非结构蛋白进行编码；以及3'ORF，其由亚基因组26S RNA翻译并且对被切割成5种结构蛋白的多聚蛋白进行编码。

[0223] 基孔肯雅热(CF)的潜伏期不到10天。无症状患者少于30％，少于其他甲病毒疾病患者。有症状的患者会突然出现高烧、多关节痛、头痛和疲劳。多关节疼痛是最具特征性的症状，尤其是周围关节疼痛。肌痛也很常见。一半的患者会出现包括黄斑皮疹在内的皮肤表现。在基孔肯雅热的急性阶段期间，已经报道了多种其他临床症状，诸如结膜炎、神经视网膜炎、虹膜睫状体炎、心肌炎、心包炎、肺炎、干咳、淋巴结病、肾炎、肝炎和胰腺炎。据报道，死亡原因为心力衰竭、多器官衰竭综合征、中毒性肝炎、脑炎、大疱性皮肤病、呼吸衰竭、肾功能衰竭、肺炎、急性心肌梗死、脑血管病、甲状腺机能减退或败血症。

[0224] CHIKV RNA基因组可能触发宿主模式识别受体(PRR)，其包括内体Toll样受体(TLR3和TLR7)和细胞质RIG-I样受体(RIG-I和MDA5)，这些受体激活下游衔接子分子(TRIF、MyD88和MAVS)以诱导干扰素调节(IRF1、IRF3、IRF5和IRF7)和NF-κB转录因子的核转位，这些转录因子诱导I型IFN、IFN刺激基因(ISG)、促炎性细胞因子和趋化因子的表达。炎性细胞

因子和趋化因子被认为参与了CHIKV的发病机制，并且与严重的临床表现以及突发性和持续性关节痛的发展相关联。据报道，与非重症CF病例相比较，重症CF病例的IL-1β和IL-6水平显著增加。在意大利发生的一起致命病例中，对炎性细胞因子的分析显示：循环I型IFN以及IL-6促炎性细胞因子的显著和强烈增加，该IL-6促炎性细胞因子与I型IFN在CHIKV驱动的细胞因子风暴中的可能作用一致，该CHIKV驱动的细胞因子风暴继而可能带来组织损伤和死亡的增强。

[0225] 2.辛德毕斯病毒

[0226] 辛德毕斯病毒(SinV)是所有已知的节肢动物传播的病毒中分布最广泛的病毒。Pogosta、Ockelbo和Karellian发热病毒属于辛德毕斯组。以关节炎、皮疹、有时发热为特征的Ockelbo疾病在瑞典中部的Ockelbo村首次被发现。后来，同样的疾病在芬兰被描述为Pogosta疾病。在俄罗斯，这种疾病被称为Karelian发热。除了人类以外的其他脊椎动物中没有任何SinV诱导疾病的证据。一般而言，潜伏期从2天到10天不等，症状性疾病突然开始，疾病持续时间短，不到20天。然而，相当比例的SinV感染可能会随着慢性病而恶化。与其他甲病毒一样，儿童经常受到感染，但只发展为亚临床疾病。主要症状为发热、肌肉疼痛、头痛、喉咙痛、斑丘皮疹和关节痛。在人类巨噬细胞中，感染促进激活，导致巨噬细胞迁移抑制因子(MIF)从细胞内储池中释放出来并且诱导TNF-α、IL-1β和IL-6的分泌。在小鼠中，SinV复制导致血清中TNF-α、IFN-γ、IFN-α/β、IL-6和皮质酮的高水平诱导，这是全身炎症反应综合征(SIRS，细胞因子风暴)的两个原因(76)。因此，SIRS与强毒性辛德毕斯病毒所诱导的疾病有很强的间接关系。

[0227] 3.塞姆利基森林病毒

[0228] 塞姆利基森林病毒(SFV)是一种披膜病毒科的甲病毒属的单链(+)RNA病毒。SFV的基因组长度为13个千碱基，在两个开放读框(ORF)中仅对9个蛋白质进行编码。四种非结构蛋白在第一ORF中被编码为多聚蛋白，位于基因组的5'区，并且直接从基因组DNA翻译。其余5个结构蛋白在第二ORF中被编码为多聚蛋白，该多聚蛋白由称为26S的亚基因组RNA种翻译并位于基因组的3'区。然后，多聚蛋白通过病毒蛋白酶切为单独蛋白质。

[0229] SFV的原始L10分离株在近交系小鼠中显示完全毒力，其通过中枢神经系统(CNS)的感染引起致死性脑炎。强毒株与非致命毒株之间的关键区别可能是CNS中神经元损害的迅速诱导，从而在免疫系统能够干预之前导致受感染的小鼠死亡。通过非致死性SFV株的感染诱导小鼠脑炎性海绵状病变。这些病变在使用免疫抑制药物环磷酰胺治疗的小鼠中延迟(Berger ML，1980)。因此，直接病毒细胞溶解在病理学的产生中并非必不可少。尽管缺乏功能性T细胞但裸鼠患有相同的炎性海绵状病变的事实表明，免疫病理并不取决于它们。取而代之的是，病变似乎由于来自单核细胞-巨噬细胞谱系的单核细胞的存在，这些细胞可以被募集到受感染的组织中并产生海绵状坏死。

[0230] 4.东部马脑炎病毒/西部马脑炎病毒/委内瑞拉马脑炎病毒

[0231] 甲病毒属(披膜病毒科)中的三种病毒(东部马脑炎病毒/西部马脑炎病毒/委内瑞拉马脑炎病毒(分别为EEEV、WEEV和VEEV))可能造成马和人类脑炎的严重暴发。EEEV于1938年在影响马萨诸塞州的一次严重暴发期间首次在人类中被发现。大多数成人EEEV感染无症状或产生轻微疾病，其特点为发烧、发冷、头痛、恶心、呕吐和肌痛。有症状患者的死亡率接近80％，许多幸存者表现出严重的后遗症，如智力低下、抽搐和瘫痪。WEEV的致死率介于3％

与7％之间，其中15％至50％的脑炎幸存者(尤其是幼儿)遭受永久性神经损害。VEEV相关脑炎在哥伦比亚和委内瑞拉的暴发中造成严重的发病率和死亡率，其中75000多人员受到影响，3000多位患者患有神经系统疾病，300多人员死亡。

[0232] 作为其余甲病毒，EEEV、WEEV和VEEV为具有约11.7个千碱基的短的封帽基因组的单链(+)RNA病毒。基因组具有两个ORF，即，5'ORF，其对四种非结构蛋白进行编码，这四种非结构蛋白被翻译为来自基因组RNA的单个多肽；以及3'ORF，其被翻译为来自亚基因组26S RNA的单个多肽，该单个多肽含有三种结构蛋白。多肽通过病毒蛋白酶切为单独蛋白质。

[0233] 在实验感染的实验室小鼠中，EEEV产生类似于人类和马感染后的神经系统疾病。在感染后第1天(PI)，在脑中检测到病毒，在PI的第3天至第4天疾病具有明显症状。鼠类疾病的临床症状包括毛发卷曲、厌食、呕吐、嗜睡、后肢瘫痪、抽搐和昏迷。受感染的小鼠的病理改变包括神经元变性、细胞浸润和血管周围套，类似于自然感染的人类所出现的CNS病理改变。VEEV感染淋巴组织中的树突状细胞(DC)和巨噬细胞，从而促进血清病毒血症和促进神经侵袭。相比之下，EEEV在淋巴组织中复制较差。

[0234] 5.风疹病毒

[0235] 儿童和成人的风疹病毒(RV)感染通常是无症状的(高达50％的病例)，或以轻度发烧、喉咙痛、淋巴结病和斑丘疹(maculopapular rush)为特征。然而，当感染孕妇时，RV会导致出生缺陷和胎儿死亡。由于每年有超过10万例先天性风疹综合征(CRS)发生，RV是一个主要的公共卫生问题。风疹病毒(RV)是披膜病毒科(Togaviridae)中风疹病毒属的唯一成员，具有约10千碱基的单链(+)RNA基因组，编码5种蛋白质。基因组含有两个ORF，5′ORF编码两个直接从基因组RNA翻译的非结构蛋白，第二个3′ORF编码三个从亚基因组mRNA翻译的结构蛋白。

[0236] 在胎儿器官发育的关键阶段(在怀孕的早期妊娠阶段)，RV感染可导致CRS，一种以感觉器官(眼睛和耳朵)、中枢神经系统和心血管系统严重缺陷为特征的综合征。在CRS中，风疹病毒能够感染胎盘，传播到胎儿，并通过干扰器官形成和引起全身性炎症改变多个胎儿系统的功能。风疹病毒相关性葡萄膜炎(RVU)是由RV引起的炎症综合征之一。该炎症性过程的特征在于高眼内水平的炎性细胞因子，包括IL-6、IL-6Ra和MCP-1。

[0237] 杯状病毒科(Caliciviridae Family)

[0238] 杯状病毒科由11个属组成，其中感染哺乳类的有7个属，兔病毒属(Lagovirus)、诺如病毒属(Norovirus)、纽布病毒属(Nebovirus)、Recovirus、札幌病毒属(Sapovirus)、Valovirus和水泡疹病毒属(Vesivirus)，感染鸟类的有2个属(Bavovirus和Nacovirus)，感染鱼类的有2个属(Minovirus和Salovirus)。杯状病毒引起物种特异性感染，大多数诺如病毒、札幌病毒和纽布病毒仅限于胃肠道，而lagoviruses、saloviruses和vesiviruses可在其天然宿主中引起严重的全身性感染。该科包括具有约7-8千碱基的单链(+)RNA基因组的非包膜病毒，分组为两个、三个或四个ORF。杯状病毒在VPg蛋白存在时与小RNA病毒相似，VPg蛋白附着在其基因组的5'末端和几种依次的蛋白中。诺瓦克病毒

[0239] 1.诺沃克病毒(Norwalk virus)

[0240] 诺如病毒(Norovirus，NoV)是杯状病毒科属，其由单一种类——诺沃克病毒(Norwalk virus)组成。人类诺如病毒是全球流行和散发性急性胃肠炎的主要病因，可持续性感染免疫功能低下的患者。诺如感染会产生典型的胃肠炎症状，包括腹泻、呕吐和胃痛，

也可能引起发烧、头痛和身体疼痛。诺如病毒是具有约7.5千碱基的单链(+)RNA基因组的非包膜病毒。基因组被编组成三到四个ORF。5'ORF1编码一个大多聚蛋白,其被病毒蛋白酶剪切成6个非结构蛋白。ORF2编码单结构衣壳蛋白。ORF3编码一个次要结构蛋白。亚基因组RNA编码另外两个结构蛋白。最后,鼠诺如病毒中的ORF4(其与ORF2重叠)编码另外的蛋白质,致病因子1。NoV基因组和亚基因组RNA的5′端与病毒编码的小蛋白VPg以共价键连接,3′端被多聚腺苷酸化。

[0241] 近年来已积累了令人信服的证据,证明NOV的主要靶标是抗原呈递细胞(APC)。MuNoVs在体外在主树突状细胞和巨噬细胞以及大量类巨噬细胞系中有效复制。NoV感染肠道免疫细胞的能力无疑对NoV发病机制和宿主对NoV感染的免疫应答具有显著影响。与NoV症状持续时间短一致,固有免疫--尤其是I型IFN--对控制急性NoV感染至关重要。

[0242] 冠状病毒科

[0243] 冠状病毒是可以感染动物和人类宿主的病原体,主要引起轻度到严重的肠道或呼吸道疾病,在某些情况下可能危及生命,如MERS-CoV、SARS-CoV或新的SARS-CoV-2。SARS-CoV-2和与其密切相关的SARS-CoV均属于冠状病毒科四个属之一的β属冠状病毒(MERS-CoV也属于该属)内的Sarbecoviridae亚属。冠状病毒是包膜的单链(+)RNA病毒,其基因组大小约为26-32千碱基,是已知的最大的RNA病毒基因组。它们于1964年被June Almeida首次发现。它们的名字来自于它们的电子显微镜图像与日冕的相似性。它们的基因组编码14个开放阅读框,即复制酶ORF 1a和1b(编码15或16个成熟非结构蛋白,也称为复制酶蛋白)、四种常见的CoV结构蛋白基因(S、E、M和N)以及编码所谓辅助蛋白的ORF。复制酶蛋白似乎具有多种功能,对于病毒RNA的合成或产生是必不可少的,而且对于稳定病毒-宿主相互作用以促进病毒进入、基因表达、RNA合成或病毒释放也是必不可少的。CoV N蛋白是350至450个氨基酸的结构蛋白,在丝氨酸残基中广泛磷酸化,高碱性,其主要功能是与病毒RNA结合形成长螺旋核糖蛋白。N蛋白也参与病毒RNA转录、翻译和病毒释放。SARS-CoV的N蛋白与其SARS-CoV-2蛋白具有高度同源性。

[0244] MERS-CoV、SARS-CoV和SARS-CoV-2可引起急性呼吸窘迫综合征(ARDS),ARDS是该疾病最急性和最致命的阶段,其特征是对病毒感染的异常免疫应答导致肺部大面积炎症。

[0245] 1.SARS-CoV-1

[0246] 由SARS-CoV引起的严重急性呼吸综合征(SARS),于2002年出现于中国广东省,在全球范围内影响了8096人,造成774人死亡(10%死亡率)。SARS-CoV的基因组包含29.7千碱基,包含11个ORF,其编码23个蛋白质。

[0247] SARS最常见的症状是高烧、肌痛、干咳和淋巴细胞减少。大约30%的患者也发展为非典型肺炎,伴有由急性肺损伤引起的急性呼吸窘迫。高龄、男性、高峰乳酸脱氢酶水平、高峰肌酸激酶水平和高初始嗜中性粒细胞绝对计数是重症监护病房入住和死亡的重要预测因素。肺中过度的炎症反应表明了急性肺损伤的进展,此外,患者在病毒载量下降时仍表现出肺损伤。

[0248] 急性病毒感染可通过直接细胞病变或间接免疫病理损伤对宿主细胞产生损伤。在早期阶段,细胞病变伴随着病毒扩增,此时用抗病毒药物治疗可能特别有效。在后期,当适应性免疫应答增强时,病毒清除可伴随严重的炎性损伤。IFN-γ相关的细胞因子风暴可能发生在SARS冠状病毒感染的后期,这种细胞因子风暴可能参与了SARS患者的免疫病理损

害。

[0249] 2.MERS-CoV

[0250] 中东呼吸综合征(MERS)是由MERS-CoV引起的,于2012年出现于沙特阿拉伯,影响2506人,在全球造成862人死亡,死亡率为35%。MERS-CoV的基因组长度为30.1千碱基,包括10个ORF,其编码16个非结构蛋白和5个结构蛋白。

[0251] MERS最常见的症状是发烧、咳嗽、发冷、喉咙痛、肌痛和关节痛,随后出现呼吸困难并在第一周内迅速发展为肺炎,通常需要通气和其他器官支持。感染MERS-CoV后,年轻人经历轻度-中度临床疾病,而老年人或患有糖尿病、肥胖症、心力衰竭和肾衰竭等共病的人经历严重疾病。在其最严重的形式,MERS导致急性高度致命的肺炎。与轻度至中度疾病相比,重度MERS患者血清促炎细胞因子(IL-6和IFN-α)和趋化因子(IL-8、CXCL-10和CCL5)水平升高。MERS患者的高血清细胞因子和趋化因子水平与肺和外周血中嗜中性粒细胞和单核细胞数量增加相关,这些细胞是与致死MERS患者的致命急性呼吸窘迫综合征相关的细胞因子和趋化因子的主要来源。

[0252] 3.SARS-CoV-2

[0253] 由SARS-CoV-2引起的新型冠状病毒肺炎迅速在全球蔓延,并发展成为全球大流行病。虽然似乎比SARS和MERS疾病的死亡率要小,但其死亡率仍未确定。SARS-CoV-2基因组编码14个开放阅读框,包括复制酶ORF 1a和1b(其编码15或16个成熟非结构蛋白,也称为复制酶蛋白)、四种常见的CoV结构蛋白基因(S、E、M和N)以及编码所谓辅助蛋白的ORF。复制酶蛋白似乎具有多种功能,对于病毒RNA的合成或产生是必需的,但对于病毒生命周期的其他步骤也是必需的。N蛋白是广泛磷酸化的、高碱性的结构蛋白,其主要功能是与病毒RNA结合形成长螺旋核糖蛋白。N蛋白还参与病毒RNA转录、翻译和病毒释放。SARS-CoV与SARS-CoV-2的N蛋白具有高度的同源性。一些细胞蛋白与病毒蛋白协作以支持病毒增殖,其中eEF1A与N蛋白相互作用以支持病毒复制和传播。

[0254] 感染早期常见的轻微症状是发烧、干咳、肌痛和疲乏。少数头痛、咯血和腹泻。在疾病向严重阶段的转变过程中,出现呼吸困难和缺氧等症状。最后,该病的严重形式表现为急性呼吸窘迫综合征(ARDS),伴有严重的肺部炎症和损伤。疾病严重阶段的并发症与病毒诱导的过度炎症有关,类似于以前在SARS-CoV和MERS-CoV感染中看到的情况。

[0255] 在SARS-CoV-2中,巨噬细胞向Th17细胞呈递CoV抗原,导致促炎细胞因子,如IL-1、IL-6、IL-8、IL-21、TNF-b和MCP-1大量释放。这是免疫扩增的原因,也是呼吸肺泡、细支气管和肺间质壁组织损伤的部分原因。此外,炎症介质表达的增加对NK细胞和CD8细胞具有下调的调节作用,这对于清除病毒也是重要的(Kaul)。D(2020年))。因此,在SARS-CoV-2感染中,高细胞因子血症已成为导致更严重临床结果的主要因素。

[0256] 关于SARS-CoV-2,本发明可以治疗SARS-CoV-2感染。治疗可以是治疗COVID-19感染。治疗可以是治疗COVID-19。治疗可以是治疗由CoV感染引起的疾病。治疗可以是治疗由SARS-CoV-2感染引起的疾病。治疗可以是治疗由CoV感染引起的肺炎。治疗可以是治疗由SARS-CoV-2感染引起的肺炎。治疗可以是治疗由COVID-19感染引起的肺炎。治疗可以是治疗由COVID-19引起的肺炎。类似地,治疗可以是治疗由SARS-CoV-2或COVID-19感染引起的急性呼吸窘迫综合征(ARDS)。

[0257] 感染可以是中度感染。感染可以是严重感染。感染可以是轻微的感染。

[0258] 治疗可以减少与CoV感染相关的并发症,包括住院、ICU和死亡。

[0259] 本发明可用于治疗急性COVID-19感染(高达4周的COVID-19的体征和症状),治疗(或最小化)正在出现症状的COVID-19(从4周到12周的COVID-19的体征和症状),或治疗或最小化后COVID-19综合征(post-COVID-19syndrome)(在感染期间或之后出现的与COVID-19一致的症状和体征,持续超过12周,并且不能通过其他诊断来解释。它通常表现为一系列症状,通常重叠,这些症状会随着时间的推移而波动和变化,并可能影响身体的任何系统。后COVID-19综合征可在12周前考虑,同时也在评估其他潜在疾病的可能性)。本发明的化合物可以治疗具有COVID-19症状和体征长达4周的患者。本发明的化合物可治疗具有COVID-19症状和体征4周至12周的患者。本发明的化合物可以治疗具有COVID-19症状和体征超过12周的患者。

[0260] 治疗可以是预防、减少或治疗持续性COVID(COVID persistent)(也称为长COVID或后COVID综合征)。根据本发明的化合物可使患者遭受持续性COVID症状的可能性最小化。或者,本发明的化合物可以降低这些症状的严重性,优选可以使CoV感染的症状最小化。

[0261] 后COVID综合征可被认为是在感染期间或之后出现的与COVID-19一致的持续12周以上的症状和体征,其不能通过其他诊断来解释。这种病症通常会出现一系列症状,通常是重叠的,这些症状可能会随着时间的推移而改变,并可能影响体内的任何系统。许多患有后COVID综合征的人也会经历全身疼痛、疲劳、持续的高温和精神问题。症状包括(但不限于)心血管、呼吸系统、胃肠道、神经系统、肌肉骨骼、代谢、肾脏、皮肤病、耳鼻喉科、血液学和自主神经系统出现的症状,此外还有精神疾病、全身疼痛、疲劳和持续发烧。

[0262] 治疗可以是降低CoV患者的传染性。本发明实现了病毒负荷(viral burden)的快速且显著的减少。减少病毒负荷可以降低患者的传染性。这对于无症状或症状不明显但具有高病毒载量的患者(例如,Tc<25)特别有益。这样的患者可能是超级感染者或超级传播者。在检测到感染时给药根据本发明的化合物可减少病毒负荷并因此减少患者的感染性。

[0263] 所述治疗可导致病毒载量的减少。这可以表现为在给药后第6天,复制周期阈值(Ct)大于30(Ct>30)。该治疗可从基线开始减少病毒载量。这可以表现为给药后需要住院治疗的患者百分比的降低。这可以表现为在给药后需要有创机械通气和/或进入ICU的患者百分比的降低。这可以表现为出现与持续性疾病有关的后遗症的患者减少。这可以表现为被选择为不良预后标准的分析参数(包括例如淋巴细胞减少、LDH、D-二聚体或PCR)正常化的患者百分比的增加。这可以表现为临床标准正常化(包括例如:头痛、发烧、咳嗽、疲劳、呼吸困难(气短)、关节肌痛或腹泻的症状消失)的患者百分比的增加。

[0264] 白蛉病毒

[0265] 白蛉病毒(Phlebovirus)是来自布尼亚病毒科(bunyavirus)的负链或双义(ambisense)单链包膜RNA病毒,其基因组范围约为11-12kb。白蛉病毒可大致分为两组,白蛉热病毒组(SFV)和类乌库尼米(Uukuniemi-like)病毒(ULV)组。SFV由双翅目昆虫传播,包括白蛉虫(phlebotomines)和蚊子,在地中海和其他地区流行。SFV感染的症状包括发烧、头痛、肌肉和关节疼痛、疲乏和腹痛。患者通常在7-14天内康复。在某些情况下,中枢神经系统感染可导致脑炎和脑膜炎。ULV组由蜱传播,但它们在人类中是非致病性的。

[0266] 研究最为充分的是裂谷热(RVF)病毒,它主要感染家养动物,但也可能导致人类中度至重度感染。人类由于受感染的动物或蚊子在撒哈拉以南非洲和阿拉伯爆发过裂谷热。

症状通常是轻微的，类似流感，可能包括双相发烧。一小部分病人会出现严重的并发症，如出血热、脑炎或视网膜炎。神经疾病是延迟发作的、通常致命的并发症，其可在初始疾病后5-30天发生。在2000年沙特爆发期间，中枢神经系统并发症患者的死亡率为50％。

[0267] 病毒蛋白与宿主免疫反应的相互作用可能在致病性中起作用，并可能解释为什么RVF的临床表现在个体之间有所不同。2010/2011年南非爆发期间，致命病例中趋化因子、促炎细胞因子和抗炎细胞因子显著增加(IL-8、CXCL9、MCP-1、IP-10、IL-10)或减少(RANTES)。在三名乌干达严重出血性感染患者中，IL-8、IL-10、IP-10、MCP-2、MCP-3、趋化因子(Fractalkine)和GRO-α水平升高，且MCP-2和IP-10水平与病毒载量相关。三名乌干达患者的高水平的促炎标志物随着患者康复而正常化。此外，包括IL-6在内的先天性免疫途径中的遗传多态性可能与RVFV症状的不同严重程度有关。宿主炎症反应可能影响人类RVFV感染的结果，而失控的炎症反应可能导致致命结果。

[0268] 沙粒病毒(Arenaviruses)

[0269] 沙粒病毒(AV)是包膜的、多形性的单链RNA病毒科，其基因组大小约为11kb，跨越小片段和大片段，每个片段以双义方式编码两种蛋白质。暴露于啮齿类动物会发生到人类的传染。一些沙粒病毒可导致人类轻度至重度疾病，包括出血性疾病。经过6-21天的长期潜伏期后，AV感染通常最初发烧、全身虚弱和不适，随后头痛、喉咙痛、恶心、呕吐、腹泻和腹痛。在更严重的情况下，症状可能包括出血、休克、癫痫、昏迷甚至死亡。

[0270] AVS可分为两个血清群，“旧世界”和“新世界”。“旧世界”病毒包括拉沙热和淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒。拉沙热是西非地区的地方病，每年造成大约5000人死亡。拉沙热引起全身性疾病，但大多数感染者是无症状的。由病毒性出血热引起的重症发生在20％的患者中。总死亡率约为1％。住院患者的死亡率为15％-25％。人类的致命病例的特征是肝、脾和肾上腺坏死。

[0271] “新世界”病毒包括皮钦德病毒(Pichinde virus)和阿根廷、玻利维亚和委内瑞拉出血热。皮钦德病毒对人类是非致病性的。南美出血热有6-14天的前驱期。8-12天后，约20-30％的患者进展到神经学和出血期。症状包括精神错乱、抽搐、昏迷和身体诸窍出血。流行地区的病死率可能为10-30％。

[0272] 沙粒病毒最初靶向人的巨噬细胞和树突状细胞，它们产生高水平的干扰素和细胞因子。这些抗原呈递细胞的感染可能是病毒传播、建立全身性感染并允许显著的病毒产生和释放的原因。拉沙病毒感染抑制I型干扰素反应，这对于控制感染是关键的，导致不受控制的病毒生产。相比之下，感染“新世界”沙拉病毒的严重和致命病例中与高水平的干扰素和细胞因子有关。事实上，感染胡宁病毒(Junin virus)(阿根廷出血热的病原体)的患者可进展成细胞因子风暴，并表现出TNF-α、IFN-α、IL-6和IL-10水平的升高。重症和死亡病例患者持续呈现高水平的TNF-α和IFN-α。

[0273] 疱疹病毒(Herpesviruses)

[0274] 疱疹病毒(HSV)是具有复杂基因组的大的、包膜的、双链DNA病毒。HSV基因组大小范围为125-240kbp，编码数十种病毒基因。HSV的传播是通过与受感染人之间的皮肤或口腔接触，主要途径是性传播。疱疹的症状包括感染部位疼痛的水疱或溃疡，但大多数感染者是无症状的。因此，HSV在人类和动物中非常流行，估计世界上90％的人口感染单纯疱疹病毒1型(HSV-1)和单纯疱疹病毒2型(HSV-2)中的一种或两种。HSV-1与口面部感染有关，而HSV-2

可引起生殖器感染。婴儿也可能在分娩期间感染HSV-2,导致严重的中枢神经系统疾病或播散性感染。

[0275] HSV感染是不可治愈的,因为它们能够在宿主细胞中建立潜伏感染。在原发感染部位侵入后,HSV可在神经元细胞中建立潜伏。例如,HSV-1可以在三叉神经节潜伏,而HSV-2可以在骶神经节潜伏。在潜伏期间,病毒基因组可能合并到宿主细胞DNA中,或者它可能保留在染色体外。潜伏相关的RNA转录物被表达,其控制宿主细胞基因组并抑制宿主细胞死亡机制,保存宿主细胞的病毒感染并允许随后非潜伏时期的复发。非潜伏期通常是有症状的,并允许病毒感染新的宿主。

[0276] 在某些情况下,HSV感染可导致脑炎。HSV脑炎从类似流感的症状开始,发展为神经系统退化,如果不治疗,可能致命。此外,在具有严重播散性感染的新生儿中,对病毒HSV感染的全身性炎症反应可导致器官损伤和功能障碍,其可导致死亡。

[0277] 正粘病毒科(Orthomyxoviridae)

[0278] 正粘病毒科(Orthomyxoviridae)是负义(negative-sense)RNA病毒科,包停含人和动物的重要病原体。该科共有7个属,包括A型流感病毒、B型流感病毒、C型流感病毒、托高土病毒属(Thogotovirus)、夸兰扎病毒属(Quaranjavirus)和传染性鲑鱼贫血病毒属(Isavirus)。

[0279] 1.流感病毒

[0280] 流感病毒分为四类:A、B、C和D,特别是A型和B型流感病毒引起冬季流感流行,每年造成约30万至65万人死亡。A型流感病毒具有特别的临床重要性,因为它们是许多流感大流行的原因,许多国家都受到大规模疫情的影响。A型流感病毒是有负义的单链分段RNA病毒,根据病毒表面的两种蛋白质分为亚型:血凝素(H)和神经氨酸酶(N)。有18种不同的血凝素亚型和11种不同的神经氨酸酶亚型(分别为H1到H18和N1到N11),因此在任何特定时间可能有许多亚型的流感病毒在人群中传播,从而导致被称为流感的疾病。

[0281] 流感的特征是症状包括高烧、流鼻涕、喉咙痛、肌肉和关节疼痛、头痛、咳嗽和疲乏的轻微到严重的疾病,不过感染病毒的儿童也会出现呕吐和腹泻。这些症状通常在接触后1至4天出现,通常是自限性的,但在某些情况下,特别是在免疫系统较弱的情况下,可能会发生肺炎和败血症等并发症。

[0282] 严重流感感染与肺组织中的显著病理变化相关,其与高水平的炎性细胞因子和趋化因子相关。这种强烈的免疫反应,被称为细胞因子风暴,与高水平的促炎细胞因子和大面积的组织损伤有关。事实上,“细胞因子风暴”一词是在描述流感相关脑病的免疫反应时首次创造的。人们认为,呼吸道上皮细胞的流感感染导致这些细胞产生炎性细胞因子的浪潮,驱动各种干扰素调节基因,这些基因通过激活天然免疫细胞,如巨噬细胞、中性粒细胞和树突状细胞,继续导致下游细胞因子的进一步产生,在严重情况下,这可导致组织损伤和慢性炎症。正是这种炎症的正反馈循环导致与流感感染相关的并发症,并最终导致受影响最严重的患者死亡。

[0283] 在本发明的化合物中,基团可根据以下指南进行选择:

[0284] 烷基可以是支化的或未支化的,并且优选具有1至约12个碳原子。一类更优选的烷基具有1至约6个碳原子。甚至更优选的是具有1、2、3或4个碳原子的烷基。甲基、乙基、正丙基、异丙基和丁基(包括正丁基、叔丁基、仲丁基和异丁基)是本发明化合物中特别优选的烷

基。除非另有说明，本文所用的术语烷基是指环状和非环状基团，尽管环状基团将包括至少三个碳环成员。

[0285] 本发明化合物中优选的烯基和炔基可以是支化的或未支化的，具有一个或多个不饱和键和2至约12个碳原子。更优选的一类烯基和炔基具有2至约6个碳原子。甚至更优选的是具有2、3或4个碳原子的烯基和炔基。除非另有说明，本文所用的术语烯基和炔基是指环状和非环状基团，尽管环状基团将包括至少三个碳环成员。

[0286] 本发明化合物中合适的芳基包括单环和多环化合物，包括含有分开的和/或稠合的芳基的多环化合物。典型的芳基含有1至3个分开的或稠合的环和6至约18个碳环原子。优选芳基含有6至约10个碳环原子。特别优选的芳基包括取代或未取代的苯基、取代或未取代的萘基、取代或未取代的联苯基、取代或未取代的菲基、以及取代或未取代的蒽基。

[0287] 合适的杂环基包括含有1至3个分开的和/或稠合的环和5至约18个环原子的杂芳族和杂脂环基团。优选杂芳族和杂脂环族基团含有5至约10个环原子，最优选5、6或7个环原子。本发明化合物中合适的杂芳族基团包含一个、两个或三个选自N、O或S原子的杂芳族原子，包括例如香豆素基(包括8-香豆素基)、喹啉基(包括8-喹啉基)、异喹啉基、吡啶基、吡嗪基、吡唑基(包括吡唑-3基、吡唑-4基和吡唑-5基)、嘧啶基、呋喃基(包括呋喃-2-基、呋喃-3-基、呋喃-4-基和呋喃-5-基)、吡咯基、噻吩基、噻唑基(包括噻唑-2-基、噻唑-4-基和噻唑-5-基)、异噻唑基、噻二唑基(包括噻二唑-4-基和噻二唑-5-基)、三唑基、四唑基、异恶唑基(包括异恶唑-3-基、异恶唑-4-基和异恶唑-5-基)、恶唑基、咪唑基、吲哚基、异吲哚基、吲唑基、吲哚嗪基、酞嗪基、蝶啶基、嘌呤基、恶二唑基、噻二唑基、呋咱基、哒嗪基、三嗪基、噌啉基、苯并咪唑基、苯并呋喃基、苯并呋咱基、苯并噻吩基(包括苯并[b]噻吩-2-基和苯并[b]噻吩-3-基)、苯并噻唑基、苯并恶唑基、咪唑并[1,2-a]吡啶基(包括咪唑并[1,2-a]吡啶-2-基和咪唑并[1,2-a]吡啶-3-基)、喹唑啉基、喹喔啉基、萘啶基和呋喃吡啶基。本发明化合物中合适的杂脂环族基团包含一个、两个或三个选自N、O或S原子的杂原子，包括例如吡咯烷基、四氢呋喃基、二氢呋喃基、四氢噻吩基、四氢噻喃基、哌啶基(包括哌啶-3-基、哌啶-4-基和哌啶基-5-基)、吗啉基、硫代吗啉基、噻噁烷基(thioxanyl)、哌嗪基、氮杂环丁烷基(azetidinyl)、氧杂环丁烷基(oxetanyl)、硫杂环丁烷基(thietanyl)、高哌啶基(homopiperidyl)、氧杂环庚烷基(oxepanyl)、硫杂环庚烷基(thiepanyl)、氧氮杂基(oxazepinyl)、二氮杂基(diazepinyl)、硫氮杂基(thiazepinyl)、1,2,3,6-四氢吡啶基、2-吡咯啉基、3-吡咯啉基、二氢吡咯基、吲哚啉基、2H-吡喃基、4H-吡喃基、二恶烷基、1,3-二氧戊环基、吡唑啉基、二噻吩基、二硫杂环戊基(dithiolanyl)、二氢吡喃基、二氢噻吩基、二氢呋喃基、吡唑烷基、咪唑啉基、咪唑烷基(imidazolidinyl)、3-氮杂双环[4.1.0]庚基、3H-吲哚基和喹啉嗪基。

[0288] 在上述基团中，一个或多个氢原子可以被一个或多个合适的基团取代，例如OR'，=O，SR'，SOR'，SO_2R'，NO_2，NHR'，NR'R'，=N-R'，NHCOR'，$N(COR')_2$，$NHSO_2R'$，NR'C(=NR')NR'R'，CN，卤素，COR'，COOR'，OCOR'，OCONHR'，OCONR'R'，CONHR'，CONR'R'，取代或未取代的C_1-C_{12}烷基，取代或未取代的C_1-C_{12}烯基，取代或未取代的C_1-C_{12}炔基，未取代或未取代的芳基，以及取代或未取代的杂环基，其中每个R'基团独立地选自氢、OH、NO_2、NH_2、SH、CN、卤素、COH、CO烷基、CO_2H、取代或未取代的C_1-C_{12}烷基、取代或未取代的C_1-C_{12}烯基、取代或未取代的C_1-C_{12}炔基、取代或未取代的芳基和取代或未取代的杂环基。当这些基团本身被取代时，

取代基可选自上述列表。当取代基以双键(例如=O和=N-R′)终止时,它取代相同碳原子中的2个氢原子。

[0289] 本发明化合物中合适的卤素取代基包括F、Cl、Br和I。

[0290] 术语"药学上可接受的盐"是指给予患者后能够(直接或间接)提供本文所述化合物的任何盐。应理解,非药学上可接受的盐也落入本发明的范围内,因为这些盐可用于制备药学上可接受的盐。盐的制备可以通过本领域已知的方法进行。例如,本文提供的化合物的药学上可接受的盐是由包含碱性或酸性部分的母体化合物通过常规化学方法合成的。通常,这样的盐例如通过使这些化合物的游离酸或碱形式与化学计量量的合适的碱或酸在水中或在有机溶剂中或在两者的混合物中反应来制备。通常,优选非水介质如醚、乙酸乙酯、乙醇、异丙醇或乙腈。酸加成盐的示例包括无机酸加成盐(如盐酸盐、氢溴酸盐、氢碘酸盐、硫酸盐、硝酸盐、磷酸盐)和有机酸加成盐(如乙酸盐、三氟乙酸盐、马来酸盐、富马酸盐、柠檬酸盐、草酸盐、琥珀酸盐、酒石酸盐、苹果酸盐、扁桃酸盐、甲磺酸盐和对甲苯磺酸盐)。碱加成盐的示例包括无机盐(如钠盐、钾盐、钙盐和铵盐),以及有机碱盐(如乙二胺、乙醇胺、N,N-二烷基乙醇胺(N,N-dialkylenethanolamine)、三乙醇胺和碱性氨基酸盐)。

[0291] 本发明的化合物可以是作为游离化合物或溶剂合物(例如水合物、醇化物,特别是甲醇合物)的结晶形式,这两种形式都在本发明的范围内。溶剂化方法通常是本领域已知的。本发明的化合物可以具有不同的多晶型形式,并且本发明意欲包括所有这些形式。

[0292] 本文所提及的任何化合物旨在代表这样的特定化合物以及某些变体或形式。特别地,本文提及的化合物可具有不对称中心,因此以不同的对映异构体或非对映异构体形式存在。因此,本文提及的任何给定的化合物旨在代表外消旋物、一种或多种对映异构体形式、一种或多种非对映异构体形式及其混合物中的任何一种。同样,关于双键的立体异构或几何异构也是可能的,因此在某些情况下,分子可以(E)-异构体或(Z)-异构体(反式和顺式异构体)存在。如果分子含有几个双键,每个双键都会有自己的立体异构体,这可能与分子中其他双键的立体异构体相同或不同。此外,本文提及的化合物可作为阻转异构体存在。本文所提及的化合物的所有立体异构体(包括对映体、非对映体、几何异构体和阻转异构体)及其混合物都被认为在本发明的范围内。

[0293] 在通式I和II的化合物中,特别优选的R_1、R_5、R_9、R_{11}和R_{15}独立地选自氢和取代或未取代的C_1-C_6烷基。更优选的R_1、R_5、R_9、R_{11}和R_{15}独立地选自氢、取代的或未取代的甲基、取代的或未取代的乙基、取代的或未取代的正丙基、取代的或未取代的异丙基和取代的或未取代的丁基(包括取代的或未取代的正丁基、取代的或未取代的叔丁基、取代的或未取代的异丁基、和取代的或未取代的仲丁基)。所述基团的优选取代基是OR'、=O、SR'、SOR'、SO_2R'、NO_2、NHR'、NR'R'、=N-R'、NHCOR'、$N(COR')_2$、$NHSO_2R'$、NR'C(=NR')NR'R'、CN、卤素、COR'、COOR'、OCOR'、OCONHR'、OCONR'R'、CONHR、CONR'R'、取代或未取代的C_1-C_{12}烷基、取代或未取代的C_2-C_{12}烯基、取代或未取代的C_2-C_{12}炔基、取代或未取代的芳基、以及取代或未取代的杂环基,其中每个R'基团独立地选自氢、OH、NO_2、NH_2、SH、CN、卤素、COH、CO烷基、CO_2H、取代或未取代的C_1-C_{12}烷基、取代或未取代的C_2-C_{12}烯基、取代或未取代的C_2-C_{12}炔基、取代或未取代的芳基以及取代或未取代的杂环基。当这些基团本身被取代时,取代基可以选自前述列表。氢、甲基、正丙基、异丙基、异丁基、仲丁基、4-氨基丁基、3-氨基-3-氧丙基、苄基、对甲氧基苄基、对羟基苄基和环己基甲基是最优选的R_1、R_5、R_9、R_{11}、以及R_{15}基团。具体地,特别优选的

R_1选自仲丁基和异丙基，最优选仲丁基。特别优选的R_5选自异丁基和4-氨基丁基，最优选异丁基。特别优选的R_{11}是甲基和异丁基。特别优选的R_9选自对甲氧基苄基、对羟基苄基和环己基甲基，最优选对甲氧基苄基。特别优选的R_{15}选自甲基、正丙基和苄基，最优选甲基和苄基。

[0294] 在通式III的化合物中，特别优选的R_1、R_5、R_9和R_{15}独立地选自氢和取代或未取代的C_1-C_6烷基。更优选的R_1、R_5、R_9和R_{15}独立地选自氢、取代或未取代的甲基、取代或未取代的乙基、取代或未取代的正丙基、取代或未取代的异丙基和取代或未取代的丁基(包括取代或未取代的正丁基、取代或未取代的叔丁基、取代或未取代的异丁基、以及取代或未取代的仲丁基)。所述基团的优选取代基是OR'、=O、SR'、SOR'、SO_2R'、NO_2、NHR'、NR'R'、=N-R'、NHCOR'、N(COR')$_2$、$NHSO_2$R'、NR'C(=NR')NR'R'、CN、卤素、COR'、COOR'、OCOR'、OCONHR'、OCONR'R'、CONHR'、CONR'R'、取代或未取代的C_1-C_{12}烷基、取代或未取代的C_2-C_{12}烯基、取代或未取代的C_2-C_{12}炔基、取代或未取代的芳基、以及取代或未取代的杂环基，其中每个R'基团独立地选自以下组：氢、OH、NO_2、NH_2、SH、CN、卤素、COH、CO烷基、CO_2H、取代或未取代的C_1-C_{12}烷基、取代或未取代的C_2-C_{12}烯基、取代或未取代的C_2-C_{12}炔基、取代或未取代的芳基、取代或未取代的杂环基。当这些基团本身被取代时，取代基可以选自前述列表。氢、甲基、正丙基、异丙基、异丁基、仲丁基、4-氨基丁基、3-氨基-3-氧丙基、苄基、对甲氧基苄基、对羟基苄基和环己基甲基是最优选的R_1、R_5、R_9和R_{15}基团。具体地，特别优选的R_1选自仲丁基和异丙基，最优选仲丁基。特别优选的R_5选自异丁基和4-氨基丁基，最优选异丁基。特别优选的R_9选自对甲氧基苄基，对羟基苄基和环己基甲基，最优选对甲氧基苄基。特别优选的R_{15}选自甲基，正丙基和苄基，最优选甲基和苄基。

[0295] 在通式I、II和III的化合物中，特别优选的R_8、R_{10}、R_{12}和R_{16}独立地选自氢和取代或未取代的C_1-C_6烷基。更优选R_8、R_{10}、R_{12}和R_{16}独立地选自氢、甲基、乙基、正丙基、异丙基和丁基(包括正丁基、叔丁基、异丁基和仲丁基)，甚至更优选它们独立地选自氢和甲基。具体地，特别优选的R_8、R_{10}以及R_{12}是甲基，特别优选的R_{16}是氢。

[0296] 在通式I和III的化合物中，特别优选的R_3和R_4独立地选自氢和取代或未取代的C_1-C_6烷基。更优选的R_3和R_4独立地选自氢、取代或未取代的甲基、取代或未取代的乙基、取代或未取代的正丙基、取代或未取代的异丙基和取代或未取代的丁基(包括取代或未取代的正丁基、取代或未取代的叔丁基、取代或未取代的异丁基和取代的仲丁基)。所述基团的优选取代基是OR'、=O、SR'、SOR'、SO_2R'、NO_2、NHR'、NR'R'、=N-R'、NHCOR'、N(COR')$_2$、$NHSO_2$R'、NR'C(=NR')NR'R'、CN、卤素、COR'、COOR'、OCOR'、OCONHR'、OCONR'R'、CONHR'、CONR'R'、取代或未取代的C_1-C_{12}烷基、取代或未取代的C_2-C_{12}烯基、取代或未取代的C_2-C_{12}炔基、取代或未取代的芳基、以及取代或未取代的杂环基，其中每个R'基团独立地选自：氢、OH、NO_2、NH_2、SH、CN、卤素、COH、CO烷基、CO_2H、取代或未取代的C_1-C_{12}烷基、取代或未取代的C_2-C_{12}烯基、取代或未取代的C_2-C_{12}炔基、取代或未取代的芳基、取代或未取代的杂环基。当这些基团本身被取代时，取代基可以选自前述列表。氢、甲基、异丙基和仲丁基是最优选的R_3和R_4基团。具体而言，特别优选的R_3选自甲基和异丙基，特别优选的R_4为甲基或氢。

[0297] 在通式I、II和III的化合物的一实施例中，特别优选的R_6和R_7独立地选自氢和取代或未取代的C_1-C_6烷基。更优选R_7选自氢、取代的或未取代的甲基、取代的或未取代的乙基、取代的或未取代的正丙基、取代的或未取代的异丙基和取代的或未取代的丁基(包括取代或未取代的正丁基、取代或未取代的叔丁基、取代或未取代的异丁基和取代的仲丁基)。所

述基团的优选取代基是OR'、=O、SR'、SOR'、SO_2R'、NO_2、NHR'、NR'R'、=N-R'、NHCOR'、$N(COR')_2$、$NHSO_2R'$、NR'C(=NR')NR'R'、CN、卤素、COR'、COOR'、OCOR'、OCONHR'、OCONR'R'、CONHR'、CONR'R'、取代或未取代的C_1-C_{12}烷基、取代或未取代的C_2-C_{12}烯基、取代或未取代的C_2-C_{12}炔基、取代或未取代的芳基、以及取代或未取代的杂环基,其中每个R'基团独立地选自氢、OH、NO_2、NH_2、SH、CN、卤素、COH、CO烷基、CO_2H、取代或未取代的C_1-C_{12}烷基、取代或未取代的C_2-C_{12}烯基、取代或未取代的C_2-C_{12}炔基、取代或未取代的芳基以及取代或未取代的杂环基。当这些基团本身被取代时,取代基可以选自前述列表。更优选的R_6选自氢、甲基、乙基、正丙基、异丙基和丁基(包括正丁基、叔丁基、异丁基和仲丁基)。最优选的R_6选自氢和甲基,最优选的R_7是甲基。

[0298] 在通式I、II和III的化合物的另一实施例中,特别优选R_6和R_7与它们所连接的相应的N原子和C原子一起形成取代的或未取代的杂环基。在这方面,优选的杂环基是含有一个、两个或三个选自N、O或S原子的杂原子,最优选一个N原子,并具有5至约10个环原子,最优选5、6或7个环原子的杂脂环基团(heteroalicyclic group)。吡咯烷基团是最优选的。

[0299] 在通式I、II和III的化合物的一实施例中,特别优选的R_{13}和R_{14}独立地选自氢和取代或未取代的C_1-C_6烷基。更优选R_{13}选自氢、取代的或未取代的甲基、取代的或未取代的乙基、取代的或未取代的正丙基、取代的或未取代的异丙基和取代的或未取代的丁基(包括正丁基、叔丁基、异丁基和仲丁基)。所述基团的优选取代基是OR'、=O、SR'、SOR'、SO_2R'、NO_2、NHR'、NR'R'、=N-R'、NHCOR'、$N(COR')_2$、$NHSO_2R'$、NR'C(=NR')NR'R'、CN、卤素、COR'、COOR'、OCOR'、OCONHR'、OCONR'R'、CONHR'、CONR'R'、取代或未取代的C_1-C_{12}烷基、取代或未取代的C_2-C_{12}烯基、取代或未取代的C_2-C_{12}炔基、取代或未取代的芳基、以及取代或未取代的杂环基,其中每个R'基团独立地选自以下组:氢、OH、NO_2、NH_2、SH、CN、卤素、COH、CO烷基、CO_2H、取代或未取代的C_1-C_{12}烷基、取代或未取代的C_2-C_{12}烯基、取代或未取代的C_2-C_{12}炔基、取代或未取代的芳基、取代或未取代的杂环基。当这些基团本身被取代时,取代基可以选自前述列表。更优选的R_{14}选自氢、甲基、乙基、正丙基、异丙基和丁基(包括正丁基、叔丁基、异丁基和仲丁基)。最优选的R_{13}选自氢、甲基、异丙基、异丁基和3-氨基-3-氧丙基,最优选的R_{14}为氢。

[0300] 在通式I、II和III的化合物的另一实施例中,特别优选R_{13}和R_{14}与它们所连接的相应的N原子和C原子一起形成取代的或未取代的杂环基。在这方面,优选的杂环基是含有一个、两个或三个选自N、O或S原子的杂原子,最优选一个N原子,并具有5至约10个环原子,最优选5、6或7个环原子的杂脂环基团。吡咯烷基团是最优选的。

[0301] 在通式I、II和III的化合物中,特别优选R_2选自氢、取代或未取代的C_1-C_6烷基和COR_a,其中R_a是取代或未取代的C_1-C_6烷基,甚至更优选R_a是甲基、乙基、正丙基、异丙基和丁基(包括正丁基、叔丁基、仲丁基和异丁基)。更优选地,R_2是氢。

[0302] 在通式I、II和III的化合物中,特别优选R_{17}选自氢、COR_a、$COOR_a$、$CONHR_b$、$(C=S)NHR_b$和SO_2R_c,其中每个R_a、R_b和R_c优选且独立地选自取代或未取代的C_1-C_6烷基、取代或未取代的C_2-C_6烯基、取代或未取代的C_2-C_6炔基、取代或未取代的芳基、和取代或未取代的杂环基。所述基团的优选取代基是OR'、=O、SR'、SOR'、SO_2R'、NO_2、NHR'、NR'R'、=N-R'、NHCOR'、$N(COR')_2$、$NHSO_2R'$、NR'C(=NR')NR'R'、CN、卤素、COR'、COOR'、OCOR'、OCONHR'、OCONR'R'、CONHR'、CONR'R'、取代或未取代的C_1-C_{12}烷基、取代或未取代的C_2-C_{12}烯基、取代或未取代的C_2-C_{12}炔基、取代或未取代的芳基、以及取代或未取代的杂环基,其中每个R'基团独立地选

自氢、OH、NO_2、NH_2、SH、CN、卤素、COH、CO烷基、CO_2H、取代或未取代的C_1-C_{12}烷基、取代或未取代的C_2-C_{12}烯基、取代或未取代的C_2-C_{12}炔基、取代或未取代的芳基、以及取代或未取代的杂环基。当这些基团本身被取代时，取代基可以选自前述列表。氢、COR_a、$COOR_a$和SO_2R_c是最优选的R_{17}基团，并且甚至最优选氢、COO苄基、CO苯并[b]噻吩-2-基、SO_2(对甲基苯基)、$COCOCH_3$和$COOC-(CH_3)_3$。

[0303] 在通式I、II和III的化合物的另一实施例中，特别优选Y是CO。在另一实施例中，特别优选Y是-$COCH(CH_3)CO$-。

[0304] 在通式I、II和III的化合物的另一实施例中，特别优选X是O。在另一实施例中，特别优选X是NH。

[0305] 在通式I和II的化合物的另一实施例中，特别优选n、p和q为0。在另一实施例中，特别优选n为1，p和q为0。在另一实施例中，特别优选n和p为1，q为0。在另一实施例中，特别优选n、p和q为1。在另一实施例中，特别优选n和p为1，q为2。

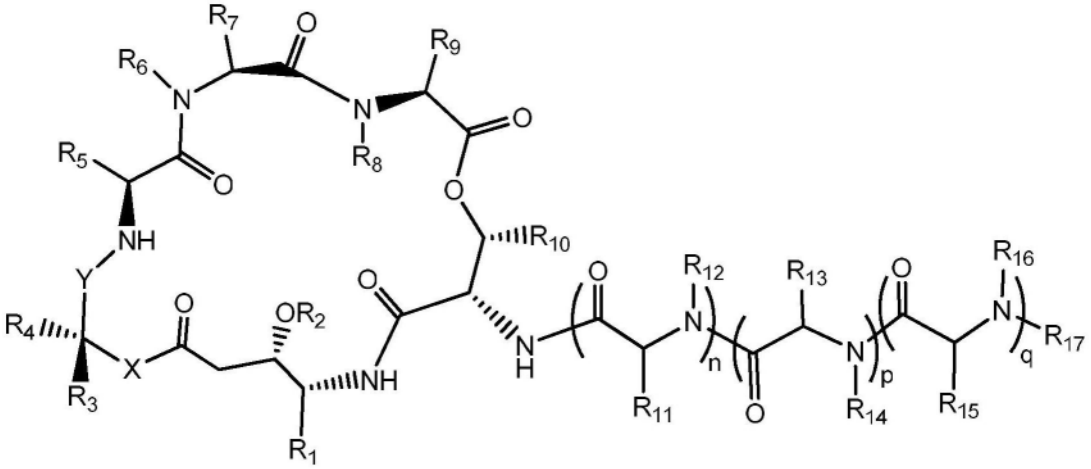
[0306] 在通式III化合物的另一实施例中，特别优选p和q为0。在另一实施例中，特别优选p为1和q为0。在另一实施例中，特别优选p和q为1。在另一实施例中，特别优选p是1和q是2。

[0307] 在另外的优选实施例中，组合了上述对于不同取代基的优选项。本发明还涉及上述式I、II和III的优选取代基的这种组合。

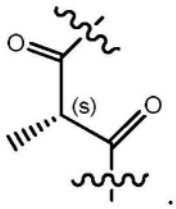
[0308] 在本发明的描述和定义中，当在本发明的化合物中存在几个基团R_a、R_b和R_c时，除非明确指出，应理解它们在给定的定义内可以各自独立地不同，即，R_a在本发明的给定的化合物中不一定同时代表相同的基团。

[0309] 在通式I、II和III的化合物中，当q的值为2时，化合物中有两个基团R_{15}和两个基团R_{16}。由此阐明，给定的化合物中的每个R_{15}和每个R_{16}基团可以独立地选自上文针对这些基团描述的不同可能性。

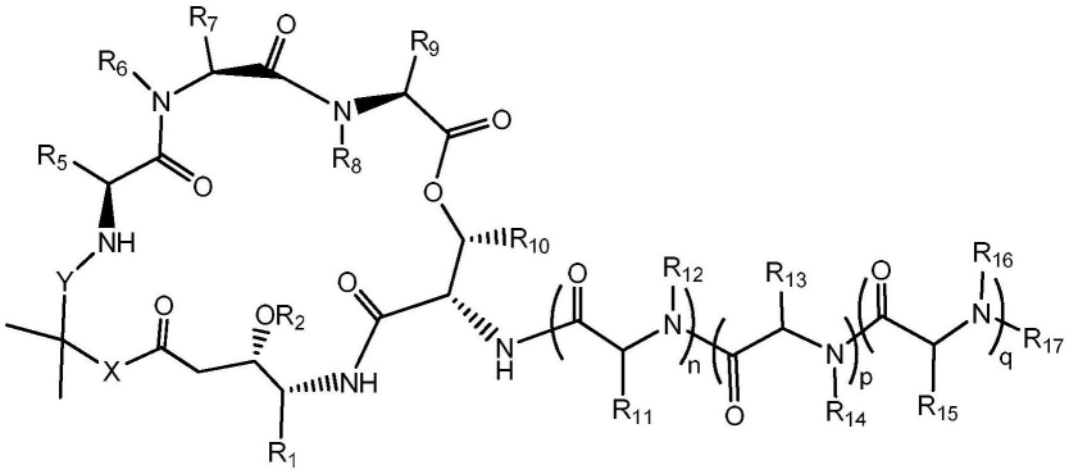
[0310] 通式I的化合物的特别优选的立体化学是

[0311] 

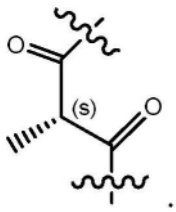
[0312] 其中X、Y、n、p、q和R_1-R_{17}如上所定义，并且当Y是-$COCH(CH_3)CO$-时，其具有以下立体化学：

[0313] 

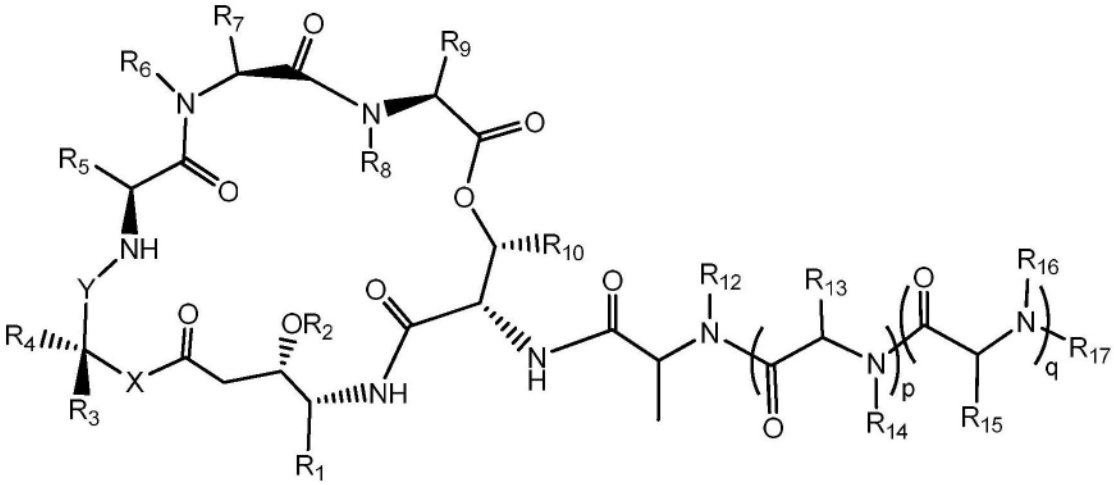
[0314] 通式II的化合物的特别优选的立体化学是

[0315] 

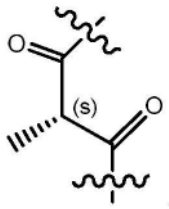
[0316] 其中X、Y、n、p、q、R_1、R_2和R_5-R_{17}如上所定义，并且当Y是-COCH(CH_3)CO-时，其具有以下立体化学：

[0317] 

[0318] 通式III的化合物的特别优选的立体化学是

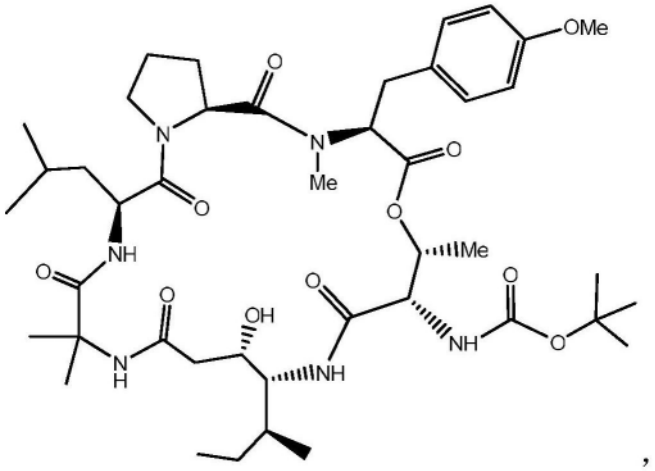
[0319] 

[0320] 其中X、Y、p、q、R_1-R_{10}和R_{12}-R_{17}如上所定义，并且当Y是-COCH(CH_3)CO-时，其具有以下立体化学：

[0321] 

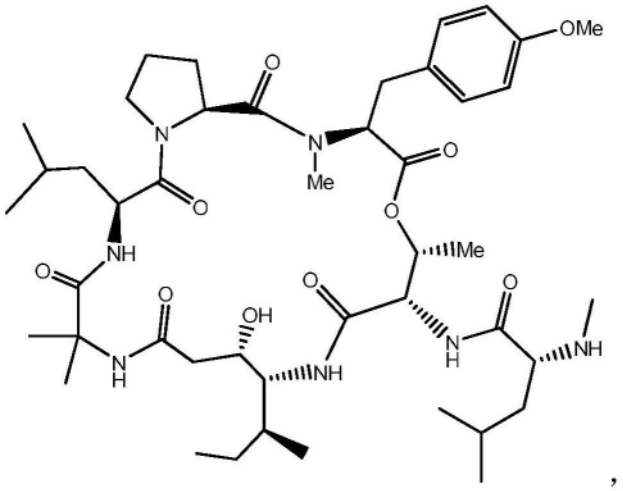
..

[0322] 本发明特别优选的化合物如下：

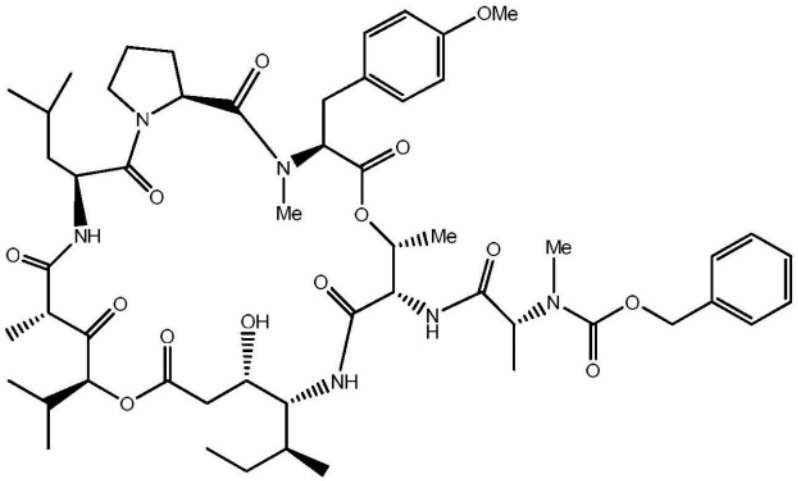


,

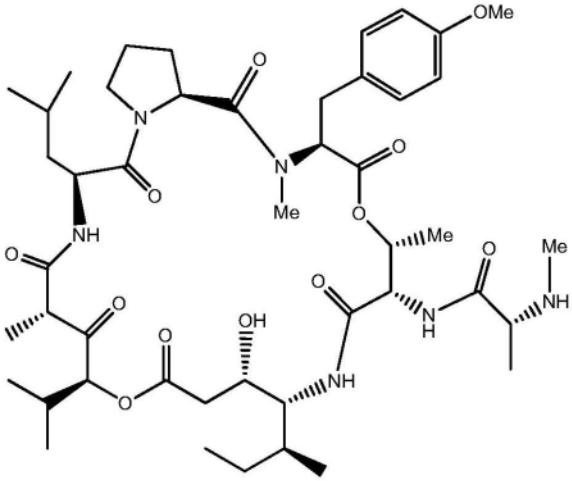
[0323]

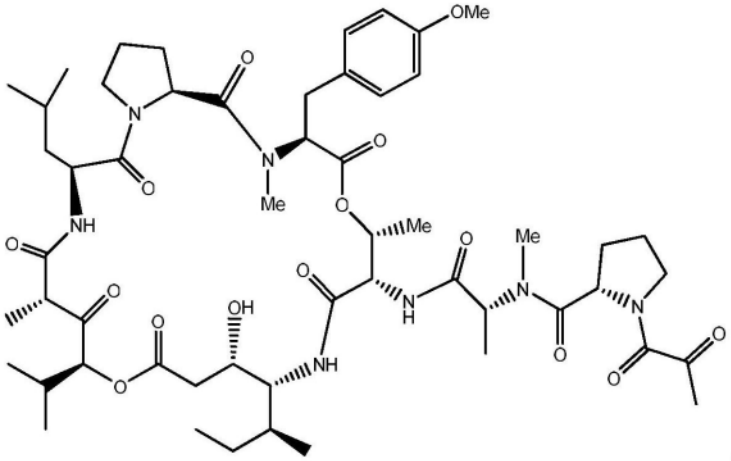


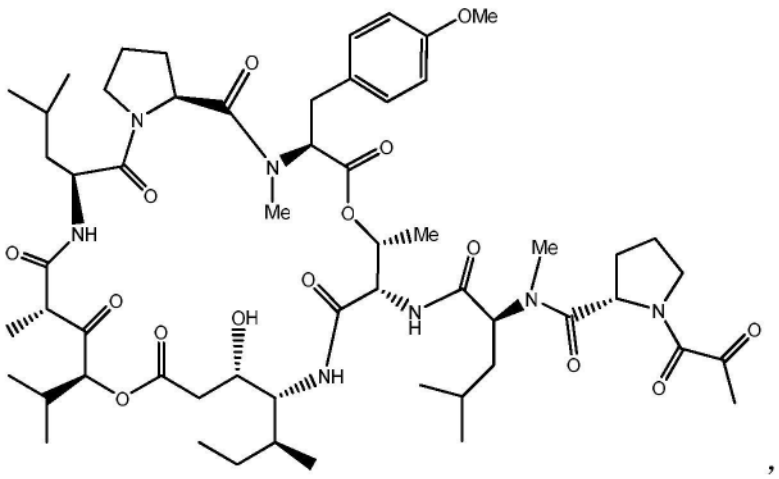
,



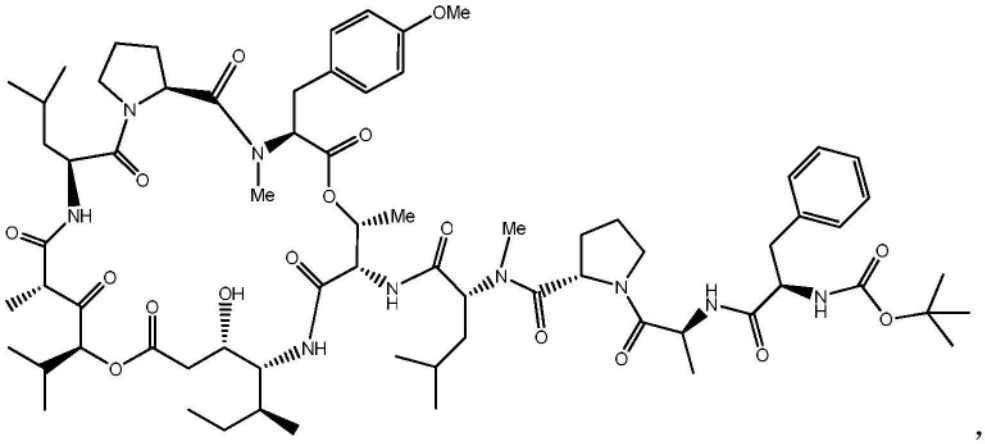
[0324]



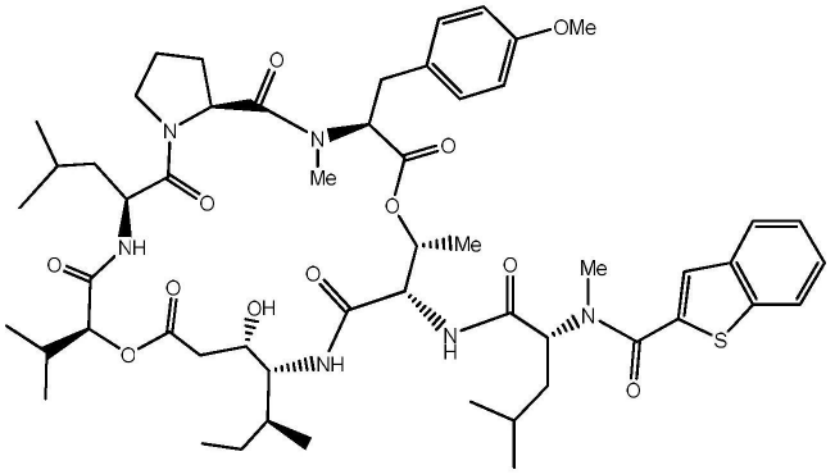




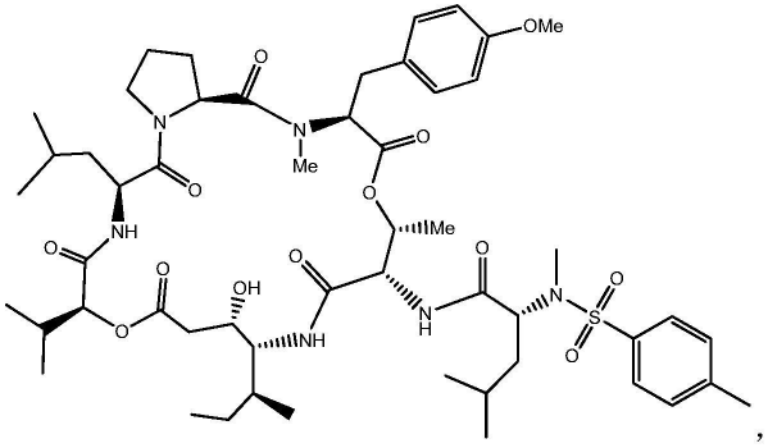
[0325]



[0326]



以及

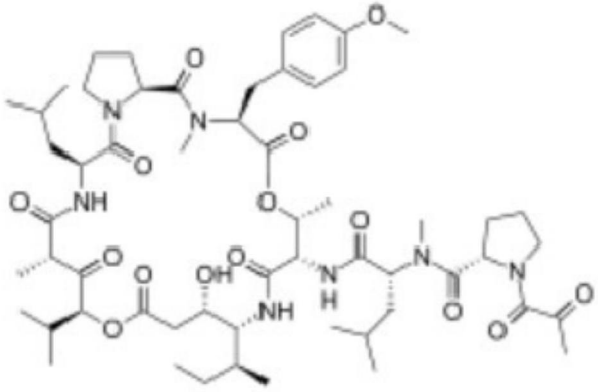
[0327] 

[0328] 或其药学上可接受的盐或立体异构体。

[0329] 通式I、II和III的化合物可以按照Vera等人.Med.Res.Rev.2002,22(2),102-145,WO 2011/020913(见示例1-5),WO 02/02596,WO 01/76616,以及WO 2004/084812(它们引入此作为参考)公开的任何合成方法制备。

[0330] 优选的化合物是PLD或其药学上可接受的盐或立体异构体。最优选的是PLD。

[0331] 普立肽的化学名称为(-)-(3S,6R,7S,10R,11S,15S,17S,20S,25aS)-11-羟基-3-(4-甲氧基苄基)-2,6,17-三甲基-15-(1-甲基乙基)-7-[[[(2R)-4-甲基-2-[甲基[[(2S)-1-(2-氧代丙酰基)吡咯烷-2-基]羰基]氨基]戊酰基]氨基]-10-[(1S)-1-甲基丙基]-20-(2-甲基丙基)十四氢-15H-吡咯并[2,1-f]-[1,15,4,7,10,20]二氧杂环戊环三环烷-1,4,8,13,16,18,21(17H)-庚酮((-)-(3S,6R,7S,10R,11S,15S,17S,20S,25aS)-11-hydroxy-3-(4-methoxybenzyl)-2,6,17-trimethyl-15-(1-methylethyl)-7-[[(2R)-4-methyl-2-[methyl[[(2S)-1-(2-oxopropano yl)pyrrolidin-2-yl]carbonyl]amino]pentanoyl]amino]-10-[(1S)-1-methylpropyl]-20-(2-methylpropyl)tetradecahydro-15H-pyrrolo[2,1-f]-[1,15,4,7,10,20]dioxatetrazac yclotricosine-1,4,8,13,16,18,21(17H)-heptone),对应分子式$C_{57}H_{87}N_7O_{15}$。它的相对分子质量为1110.34g/mol,结构如下:

[0332] 

[0333] 普立肽是一种环酯肽,最初从地中海海洋海鞘白色念珠菌(marine tunicate Aplidium albicans)中分离,目前通过全化学合成(full chemical synthesis)生产。它在澳大利亚被授权和销售,品牌名称为普立肽,用于治疗多发性骨髓瘤。

[0334] 在真核细胞中,已证明普立肽靶向真核延伸因子(eEF1A),真核延伸因子在调节与其它蛋白质的相互作用中具有关键作用,其中一些蛋白质被认为在病毒复制中是必需的。值得注意的是,上述蛋白之一是冠状病毒N蛋白,其在感染细胞内大量产生,并且已知与延

伸因子EF1A相互作用。如上所述，普立肽与EF1A之间的相互作用可因此降低从头合成病毒衣壳的效率，并因此导致病毒载量的降低。

[0335] 本发明提供本发明化合物在治疗炎症中的用途。特别地，本发明提供了本发明的化合物在治疗炎症，特别是与Toll样受体激活相关的炎症和/或由病原体感染引起的炎症中的用途。

[0336] 在本发明的一方面，提供了用于治疗炎症的本发明化合物。在本发明的另一方面，提供了本发明化合物在制备用于治疗炎症的药物中的用途。在本发明的另一方面，提供了治疗炎症的方法，所述方法包括向有需要的个体给药治疗有效量的本发明化合物。

[0337] 在一实施例中，炎症的特征在于过量或增加的促炎细胞因子，优选IL-12、IL-10、IL-1、IL-6、IL-8、CCL-2和TNF-α中的至少一种，更优选IL-1、IL-6、IL-8和TNF-α中的至少一种的产生或分泌。在另一实施例中，炎症是高炎症。高炎症的特点是细胞因子的产生或分泌过多(也称为细胞因子风暴)。在一实施例中，通过高水平(高于正常水平)的至少一种以下细胞因子来定义高炎症：白细胞介素(IL)-1、IL-2、IL-6、GM-CSF、IFN-γ和TNF，以及趋化因子、C-C基序趋化因子配体(CCL)-2、CCL-3和CCL-5。在另一实施例中，炎症是慢性炎症。

[0338] 在具体实施例中，病毒是SARS-CoV-2和相关的COVID-19疾病。与COVID-19疾病相关的死亡率似乎与a)呼吸窘迫继发的严重呼吸衰竭和b)由细胞因子风暴引起的炎症状态有关。因此，在来自中国的最初系列患者中，需要在有或没有高流量氧气补充的情况下住院的重症疾病患者和需要机械通气支持的患者的比例估计分别接近15％和5％。然而，在欧洲，卫生当局报告的数字更高，达到30％的需要住院治疗而不需要机械通气的重症病例(在马德里市)，接近10％的患者需要机械通气。同样，中国系列患者需要机械通气的时间比马德里等城市报道的要短得多，因此，患者长时间居留改变了患者通常的流向重症监护室的情况。这给医院服务带来了巨大的负担，这使得有必要采取前所未有的特别措施。相信通过在患有早期COVID-19肺炎的患者中使用本发明可以避免或减少最初描述的并发症的程度，因为一旦发生细胞因子风暴和呼吸窘迫，抗病毒药物通常更难具有有益的治疗效果。然而，在实施例中，本发明的化合物还可用于病毒感染的后期阶段，例如在发生细胞因子风暴和呼吸窘迫的患者中。

[0339] 如上所述，在真核细胞中，FLIM-FRET实验证明，普立肽位于足够接近eEF1A的位置以提示药物-蛋白质复合物的形成。用14C-普立肽和从兔肌肉纯化的eEF1A进行的单独的一组实验表明，普立肽以高亲和力和低解离速率结合eEF1A。

[0340] 普立肽对SARS-CoV-2的体外作用

[0341] 进行了旨在确定普立肽对SARS-CoV-2的作用的若干体外实验并在本文公开。分别使用用SARS-CoV-2感染的Vero E6细胞和直接定量SARS-CoV-2核衣壳(N)蛋白(其明确涉及到普立肽诱导的抗病毒活性的机制)的两个研究显示，普立肽在体外是SARS-CoV-2生长的有效抑制剂，其IC_{50}为0.7至3.0nM。在另一项研究中，将人干细胞衍生的肺细胞样细胞预防性地暴露于10nm普立肽1小时，然后用SARS-CoV-2(4×10^4空斑形成单位)感染。在48小时孵育期后，确定抗病毒和细胞毒性普立肽的效果。结果表明，普立肽完全消除了SARS-CoV-2的复制，对肺细胞样细胞没有明显的细胞毒性。

[0342] 普立肽对体内SARS-CoV-2的影响

[0343] 使用先前描述的用SARS-CoV-2感染的腺病毒介导的hACE2的小鼠模型，证明了普

立肽在体内有效的抗病毒效果。使用先前描述的表达由用SARS-CoV-2感染的细胞角蛋白-18基因启动子(K18-hACE2)驱动的hACE2的转基因小鼠模型,证明了普立肽在体内也有效的抗病毒效果。

[0344] 普立肽对宿主炎症反应的影响

[0345] 与SARS-CoV类似,SARS-CoV-2感染也会产生多种细胞因子的高度分泌,随着疾病的发展,血浆水平也会增加,这表明细胞因子的释放与疾病严重程度之间可能存在联系。

[0346] 固有免疫是抵御入侵病原体的第一道防线。在SARS-CoV-2的情况下,病毒进入宿主上皮细胞是由病毒包膜刺突(S)蛋白和细胞表面受体ACE2之间的相互作用介导的。病毒RNA,作为病原体相关的分子模式,然后被宿主模式识别受体检测,宿主模式识别受体包括toll样受体家族。然后,Toll样受体通过激活转录因子核因子κB(NF-κB)上调抗病毒和促炎介质(antiviral and proinflammatory mediator),如白细胞介素(IL)6、IL-8和干扰素(IFN)-γ。在非临床物种和患者中探索SARSCoV感染的研究中,已经强调了NF-κB对促炎基因表达(特别是在肺中)的重要性。在感染SARS CoV的小鼠中,NF-κB的药理学抑制导致肺中肿瘤坏死因子α(TNF)、CCL2和CXCL2的较高的存活率和降低的表达。

[0347] 如本文所示,普立肽诱导肿瘤细胞中NFκB的下调。随后,还进行了体外和离体研究,以评估普立肽对免疫细胞的作用。

[0348] 使用THP-1细胞进行体外研究,THP-1细胞是一种自发永生化的单核细胞样细胞系,来自急性单核细胞白血病儿童患者的外周血,广泛用于研究单核细胞结构和功能。如图1和图2所示,所有与病原体相关的分子模式模拟化合物(mimicking compound)都能诱导在THP-1细胞中产生促炎细胞因子,且添加普立肽可显著减少促炎细胞因子的分泌。

[0349] 离体研究评估了普立肽对小鼠肺中细胞因子IL 6、IL 10和TNFα表达的影响。如图51所示,来自安慰剂处理的小鼠的分化簇(CD)45+细胞能够在LPS-B5刺激下产生IL 6、IL 10和TNFα。然而,与未刺激的对照组相比,来自用普立肽处理的小鼠的CD45+细胞未能显示出IL 6、IL 10和TNFα的显著增加。这些结果表明,体内暴露于普立肽阻止了在从支气管肺泡灌洗液分离的CD45+细胞中增加由LPS-B5介导的促炎细胞因子的产生。

[0350] 在本发明的一方面,提供了本文所定义的化合物,用于治疗与Toll样受体的激活相关(或由其引起)的炎症。在本发明的另一方面,提供了如本文所定义的化合物在制备用于治疗与Toll样受体的激活相关的炎症的药物中的用途。在本发明的另一方面,提供了用于治疗与Toll样受体的激活相关的炎症的方法,所述方法包括向有需要的个体给药治疗有效量的本文所定义的化合物。

[0351] “与Toll样受体的激活相关的炎症”是指由一种或多种Toll样受体(TLR)的激动作用(即刺激)和Toll样受体信号传递级联的激活或通过至少一种TLR的增加的信号(其可由至少一种TLR的增加的表达引起)引起的炎症。用于测量响应于已知的或可能的TLR激动剂的TLR信号传递的激活的方法将是本领域技术人员公知的,但在一示例中,NF-κB转录的水平可用作TLR激活的指示(indicator)。如本文所述,可以使用实施例中所述的荧光素酶标记的NF-κB转录来测量NF-κB转录。在另一实施例中,TLR激活可以通过测量IRAK1(IL-受体相关激酶)、IRAK4磷酸化和TAK1激活(转化生长因子-β-激活激酶-1)中的任何一种来确定。TLR激活的其它指示在本领域是已知的(例如,见Kawai&Akira,2007,其描述了TLR通路(TLR pathway))。在一实施例中,TLR是TLR-3、TLR4、TLR7或TLR8。

[0352] Toll样受体或TLR可被微生物病原体激活。在一实施例中，微生物病原体可以是细菌、病毒、寄生虫、真菌或其它微生物。

[0353] 在优选的实施例中，Toll样受体被病毒激活。在一实施例中，病毒是RNA病毒。

[0354] 在一实施例中，病毒是单链(+)RNA病毒。在进一步优选的实施例中，病毒选自以下家族：黄病毒科、小RNA病毒科、披膜病毒科、杯状病毒科、反转录病毒科、冠状病毒科。在替代的实施例中，病毒是呼吸道病毒。

[0355] 在一实施例中，当所述病毒是黄病毒科病毒时，所述病毒选自丙型肝炎、黄热病毒(YFV)、西尼罗病毒(WNV)、登革热病毒(DENV)、日本脑炎病毒(JEV)、蜱传脑炎病毒(TBEV)、猪瘟病毒和寨卡病毒(ZIKV)。在一实施例中，当所述病毒是小RNA病毒时，所述病毒选自口蹄疫病毒、肠道病毒A71、柯萨奇病毒、鼻病毒和甲型肝炎。在另一实施例中，当所述病毒是披膜病毒科病毒(Togaviridae virus)时，所述病毒选自甲病毒科，特别是，基孔肯雅病毒、辛德毕斯病毒、塞姆利基森林病毒、东部马脑炎病毒/西部马脑炎病毒/委内瑞拉马脑炎病毒和风疹病毒。在另一实施例中，当病毒是杯状病毒科病毒时，病毒选自兔病毒属(Lagovirus)、诺如病毒属(Norovirus)、纽布病毒属(Nebovirus)、Recovirus、札幌病毒属(Sapovirus)、Valovirus和水泡疹病毒属(Vesivirus)，特别是诺沃克病毒(Norwalk virus)。

[0356] 在一实施例中，病毒感染是CoV感染。术语“CoV”感染是指来自冠状病毒科和正冠状病毒亚科的病毒的任意感染。在一实施例中，感染来自乙型冠状病毒属(betacoronavirus)中的病毒，乙型冠状病毒属包括乙型冠状病毒属1、人冠状病毒HKU1、鼠冠状病毒、蝙蝠冠状病毒HKU5、果蝠冠状病毒HKU9、严重急性呼吸综合征相关冠状病毒(SARS-CoV)、扁颅蝠冠状病毒HKU4、中东呼吸综合征相关冠状病毒、人冠状病毒OC43和刺猬冠状病毒1(EriCoV)。优选地，所述病毒选自α-型HCoV-229E、HCoV-NL63；β-型HCoV-HKU1、SARS-CoV、MERS-CoV和HCoV-OC43；以及SARS-CoV-2。SARS-CoV-2先前称为2019-nCoV，并且这些术语在本文中可互换使用。

[0357] 在另一实施例中，当病毒是反转录病毒科时，病毒是HIV(人类免疫缺陷病毒)。

[0358] 在另一实施例中，所述病毒是反义单链RNA病毒。在一实施例中，所述病毒选自正粘病毒科、白蛉病毒属科和沙状病毒科。

[0359] 在一实施例中，正粘病毒科病毒选自A型流感病毒、B型流感病毒、C型流感病毒、托高土病毒属(Thogotovirus)、夸兰扎病毒属(Quaranjavirus)和传染性鲑鱼贫血病毒属(Isavirus)。在另一实施例中，正粘病毒科病毒是A型流感病毒，优选选自H1N1、H1N2和H3N2。在另一实施例中，正粘病毒科病毒是B型流感病毒，优选选自Yamagata或Victoria谱系。

[0360] 在一实施例中，当病毒来自于白蛉病毒属科时，病毒是白蛉热病毒组(SFV)或裂谷热病毒。在一实施例中，当所述病毒选自沙状病毒科时，所述病毒是皮钦德病毒(Pichinde virus)。

[0361] 在另一实施例中，病毒是双链DNA病毒。在一实施例中，病毒选自疱疹病毒科，优选单纯疱疹病毒1或2。

[0362] 在另一实施例中，病毒是呼吸道病毒。呼吸道病毒包括鼻病毒和肠道病毒(小RNA病毒科Picornaviridae)，正粘病毒科，流感(副流感病毒)，偏肺病毒(metapneumoviruses)

和呼吸道合胞病毒(副黏液病毒科(Paramyxoviridae)),冠状病毒(冠状病毒科)和几种腺病毒。除腺病毒外,所有病毒都有RNA基因组。

[0363] 在另一实施例中,本发明化合物可进一步与抗病毒剂组合给药。抗病毒剂可以与本发明化合物的给药同时、顺序或分开给药。在该实施例中,本发明的化合物可用作抗炎剂以治疗与病毒感染相关或病毒感染引起的炎症或高炎症。

[0364] 在本发明的另一方面,提供本文所定义的化合物,用于治疗选自肺炎和免疫病理,特别是高细胞因子血症(细胞因子风暴综合征)、败血症和移植物抗宿主病的疾病。在本发明的另一方面,提供本文所定义的化合物在制备用于治疗选自肺炎和免疫病理,特别是高细胞因子血症(细胞因子风暴综合征)、败血症和移植物抗宿主病的疾病的药物中的用途。在本发明的另一方面,提供了一种治疗选自肺炎和免疫病理,特别是高细胞因子血症(细胞因子风暴综合征)败血症和移植物抗宿主病的疾病的方法,该方法包括向有需要的个体给药治疗有效量的本文所定义的化合物。在特别优选的实施例中,所述疾病是免疫病理,特别是高细胞因子血症。

[0365] 在本发明的另一方面,提供了本文所定义的化合物,用于治疗病原体诱导的炎症。在本发明的另一方面,提供了如本文所定义的化合物在制备用于治疗病原体诱导的炎症的药物中的用途。在本发明的另一方面,提供了治疗病原体诱导的炎症的方法,该方法包括向有需要的个体给药治疗有效量的本文所定义的化合物。

[0366] 在本发明的另一方面,提供本文所定义的化合物,用于联合治疗病毒感染和与Toll样受体激活相关的炎症或与病原体感染相关的炎症。在本发明的另一方面,提供了如本文所定义的化合物在制备联合治疗病毒感染和与Toll样受体激活相关的炎症或与病原体感染相关的炎症的药物中的用途。在本发明的另一方面,提供了联合治疗病毒感染和与Toll样受体激活相关的炎症或与病原体感染相关的炎症的方法,该方法包括向有需要的个体给药治疗有效量的本文定义的化合物。

[0367] 在一实施例中,炎症可以是高细胞因子血症。

[0368] “病原体诱导的炎症”是指由病原体感染引起的任何炎症或免疫病理。因此,在本发明的一方面,提供了本文所述的用于治疗免疫病理的化合物和方法。病原体可以是微生物病原体。更优选地,微生物病原体可以是细菌、病毒、寄生虫、真菌或其它微生物。在一实施例中,病原体引起TLR的激活。在另一实施例中,病原体不引起TLR的激活。在另一实施例中,病原体引起巨噬细胞激活。炎症可能是慢性炎症。在优选的实施例中,病原体是病毒。

[0369] 在优选的实施例中,Toll样受体被病毒激活。

[0370] 在一实施例中,病毒是正义单链(+)RNA病毒。在进一步优选的实施例中,病毒选自以下科:黄病毒科(Flaviviridae)、小RNA病毒科(Picornaviridae)、披膜病毒科(Togaviridae)、杯状病毒科(Caliciviridae)、反转录病毒科(Retroviridae)和冠状病毒科(Coronaviridae)。在一实施例中,当所述病毒是黄病毒科病毒时,所述病毒选自丙型肝炎、黄热病毒(YFV)、西尼罗病毒(WNV)、登革热病毒(DENV)、日本脑炎病毒(JEV)、蜱传脑炎病毒(TBEV)、猪瘟病毒和寨卡病毒(ZIKV)。在一实施例中,当所述病毒是小RNA病毒时,所述病毒选自口蹄疫病毒、肠道病毒A71、柯萨奇病毒、鼻病毒和甲型肝炎。在另一实施例中,当所述病毒是披膜病毒科病毒时,所述病毒选自甲病毒科,特别是,基孔肯雅病毒、辛德毕斯病毒、塞姆利基森林病毒、东部马脑炎病毒/西部马脑炎病毒/委内瑞拉马脑炎病毒和风疹

病毒。在另一实施例中，当病毒是杯状病毒科病毒时，病毒选自兔病毒属(Lagovirus)、诺如病毒属(Norovirus)、纽布病毒属(Nebovirus)、Recovirus、札幌病毒属(Sapovirus)、Valovirus和水泡疹病毒属(Vesivirus)，特别是诺沃克病毒(Norwalk virus)。

[0371] 在一实施例中，病毒感染是CoV感染。术语“CoV”感染是指来自冠状病毒科和正冠状病毒亚科的病毒的任意感染。在一实施例中，感染来自乙型冠状病毒属(betacoronavirus)中的病毒，乙型冠状病毒属包括乙型冠状病毒属1、人冠状病毒HKU1、鼠冠状病毒、蝙蝠冠状病毒HKU5、果蝠冠状病毒HKU9、严重急性呼吸综合征相关冠状病毒(SARS-CoV)、扁颅蝠冠状病毒HKU4、中东呼吸综合征相关冠状病毒、人冠状病毒OC43和刺猬冠状病毒1(EriCoV)。优选地，所述病毒选自α-型HCoV-229E、HCoV-NL63;β-型HCoV-HKU1、SARS-CoV、MERS-CoV和HCoV-OC43;以及SARS-CoV-2。SARS-CoV-2先前称为2019-nCoV，并且这些术语在本文中可互换使用。

[0372] 在另一实施例中，当病毒是反转录病毒科时，病毒是HIV(人类免疫缺陷病毒)。

[0373] 在另一实施例中，所述病毒是反义单链RNA病毒。在一实施例中，所述病毒选自正粘病毒科、白蛉病毒属科和沙状病毒科。

[0374] 在一实施例中，正粘病毒科病毒选自A型流感病毒、B型流感病毒、C型流感病毒、托高土病毒属(Thogotovirus)、夸兰扎病毒属(Quaranjavirus)和传染性鲑鱼贫血病毒属(Isavirus)。在另一实施例中，正粘病毒科病毒是A型流感病毒，优选选自H1N1、H1N2和H3N2。在另一实施例中，正粘病毒科病毒是B型流感病毒，优选选自Yamagata或Victoria谱系。

[0375] 在一实施例中，当病毒来自于白蛉病毒属科时，病毒是白蛉热病毒组(SFV)或裂谷热病毒。在一实施例中，当所述病毒选自沙状病毒科时，所述病毒是皮钦德病毒(Pichinde virus)。

[0376] 在另一实施例中，病毒是双链DNA病毒。在一实施例中，病毒选自疱疹病毒科，优选单纯疱疹病毒1或2。

[0377] 在另一实施例中，病毒是呼吸道病毒。呼吸道病毒包括鼻病毒和肠道病毒(小RNA病毒科Picornaviridae)、副流感病毒、偏肺病毒和呼吸道合胞病毒(副黏液病毒科)、冠状病毒(冠状病毒科)和几种腺病毒。除腺病毒外，所有病毒都有RNA基因组。

[0378] 因此，在一个具体实施例中，提供了如本文所定义的化合物，用于联合治疗SARS-CoV-2感染和高细胞因子血症。宿主对感染的炎症反应也可能导致肺炎或ARDS。因此，在另一实施例中，提供了用于联合治疗SARS-CoV-2感染和(相关)肺炎(也称为COVID-19肺炎)或相关ARDS的如本文所定义的化合物。在本发明的另一方面，提供了如本文所定义的化合物在制备用于联合治疗SARS-CoV-2感染和高细胞因子血症的药物中的用途。在另一方面，提供了如本文所定义的化合物在制备用于联合治疗SARS-CoV-2感染和COVID-19肺炎的药物中的用途。在本发明的另一方面，提供了如本文所定义的化合物在制备用于联合治疗SARS-CoV-2感染和ARDS的药物中的用途。在本发明的另一方面，提供了联合治疗SARS-CoV-2感染和高细胞因子血症的方法，该方法包括向有需要的个体给药治疗有效量的本文所定义的化合物。在另一实施例中，提供了联合治疗SARS-CoV-2感染和COVID-19肺炎的方法，该方法包括向有需要的个体给药治疗有效量的本文所定义的化合物。在另一实施例中，提供了一种用于联合治疗SARS-CoV-2感染和ARDS的方法，该方法包括向有需要的个体给药治疗有效量

的本文所定义的化合物。目前治疗病毒感染和宿主对感染的炎症反应(即高细胞因子血症)(其可能导致肺炎或ARDS)的策略需要多种药物的存在,以分别靶向每种适应症(即病毒复制和消除)和炎症。如例12和图39-42所示,我们发现PLD可用作单一药剂以治疗感染和随后的高细胞因子血症或高炎症(这些术语在本文中可互换使用)。

[0379] 或者,病毒感染是HIV(人类免疫缺陷病毒)感染。因此,在一个具体实施例中,提供本文定义的化合物用于联合治疗HIV感染和高细胞因子血症。在本发明的另一方面,提供了如本文所定义的化合物在制备用于联合治疗HIV感染和高细胞因子血症的药物中的用途。在本发明的另一方面,提供了联合治疗HIV感染和高细胞因子血症的方法,该方法包括向有需要的个体给药治疗有效量的本文所定义的化合物。

[0380] 本发明的化合物可用于具有治疗上述病症的生物/药理学活性的药物组合物中。这些药物组合物包含本发明的化合物和药学上可接受的载体。术语“载体(carrier)”是指与活性成分一起给药的稀释剂、佐剂、赋形剂或载体(vehicle)。E.W.Martin的“Remington's Pharmaceutical Sciences”,1995,中有描述合适的药物载体。药物组合物的示例包括用于口服、局部或胃肠外给药的任何固体(片剂、丸剂、胶囊剂、颗粒剂等)或液体(溶液、混悬剂、乳剂等)组合物。含有本发明化合物的药物组合物可以通过脂质体或纳米球包封、以缓释制剂的方式或通过其它标准递送方式递送。

[0381] 一种示例性组合物是用于注射的溶液的粉末形式。例如WO9942125中描述的组合物。例如包括水溶性材料,其次是混合溶剂的重构溶液的本发明化合物的冻干制剂。具体的例子是PLD和甘露醇和混合溶剂的重构溶液(例如PEG-35蓖麻油、乙醇和注射用水)的冻干制剂。每个小瓶例如可以包含2mg的PLD。重构后,每mL重构溶液可包含:0.5mg PLD、158mg PEG-35蓖麻油和0.15mL/mL乙醇。

[0382] 任何特定患者的特定剂量和治疗方案可以变化,并且将取决于多种因素,包括所使用的特定化合物的活性、所使用的特定制剂、应用模式、年龄、体重、综合健康、性别、饮食、给药时间、排泄率、药物组合、反应敏感性和所治疗的特定疾病或病症的严重性。

[0383] 在本发明的实施例中,本发明的化合物可以根据每日剂量的给药方案给药。

[0384] 在本发明的实施例中,本发明的化合物可以根据每日一次剂量的给药方案给药。

[0385] 在进一步的实施例中,本发明的化合物可以根据每日剂量给药10天、9天、8天、7天、6天、5天、4天、3天、2天或1天的给药方案给药。优选的方案是2-5天,或3-5天,或3、4或5天,最优选3天或5天。

[0386] 剂量可为每天5mg或以下、每天4.5mg或以下、每天4mg或以下、每天3.5mg或以下、每天3mg或以下、每天2.5mg或以下或2mg或以下。

[0387] 具体剂量包括0.5mg/天、1mg/天、1.5mg/天、2mg/天、2.5mg/天、3mg/天、3.5mg/天、4mg/天、4.5mg/天或5mg/天。优选的剂量为1mg/天、1.5mg/天、2mg/天和2.5mg/天。

[0388] 在进一步的实施例中,本发明的化合物可以根据1-50mg、1-40mg、1-30mg、1-20mg、1-15mg、3-15mg、3-12mg、4-12mg、4-10mg或4.5-10mg的总剂量给药。总剂量可为4mg、4.5mg、5mg、5.5mg、6mg、6.5mg、7mg、7.5mg、8mg、8.5mg、9mg、9.5mg或10mg。优选的总剂量为4.5mg、5mg、6mg、7.5mg、8mg、9mg或10mg。总剂量可以分成1、2、3、4、5、6、7、8、9或10天,优选3天或5天。

[0389] 在一个具体实施例中,本发明的化合物可根据每日一次,每天2.5mg或更少的剂

量,给药5天的给药方案给药。

[0390] 在另一个实施例中,本发明的化合物可根据每日一次,每天2mg或更少的剂量,给药5天的给药方案给药。

[0391] 在另一个实施例中,本发明的化合物可以根据每日一次,每天1.5mg或更少的剂量,给药3天的给药方案给药。

[0392] 在另一个实施例中,本发明的化合物可根据每日一次,每天2mg或更少的剂量,给药3天的给药方案给药。

[0393] 在另一个实施例中,本发明的化合物可以根据每日一次,每天2.5mg或更少的剂量,给药3天的给药方案给药。

[0394] 在另一个实施例中,本发明的化合物可以根据每日一次,每天1.5mg的剂量,给药3天的给药方案给药。

[0395] 在另一个实施例中,本发明化合物可以根据每日一次,每天2.0mg的剂量,给药3天的给药方案给药。

[0396] 在另一个实施例中,本发明的化合物可以根据每日一次,每天2.5mg的剂量,给药3天的给药方案给药。

[0397] 在另一个实施例中,本发明的化合物可以根据每日一次,每天1.5至2.5mg的剂量,给药3天的给药方案给药。

[0398] 另一种方案是在第1天单剂量给药。单次剂量可以是1-10mg、4-10mg、4.5-10mg;4mg、4.5mg、5mg、5.5mg、6mg、6.5mg、7mg、7.5mg、8mg、8.5mg、9mg、9.5mg或10mg;优选4.5mg、5mg、6mg、7.5mg、8mg、9mg或10mg;更优选5-9mg、6.5-8.5mg、7-8mg或7.5mg。

[0399] 在另一个实施例中,本发明的化合物可根据本发明给药,其中本发明的化合物与皮质类固醇一起给药。优选地,皮质类固醇是地塞米松。

[0400] 皮质类固醇可以与本发明的化合物一起每日给药。给药可以是按次序的、同时的或连续的。皮质类固醇可在给药本发明化合物后的几天内进一步给药。例如,对于3天给药方案,皮质类固醇可以在第1-3天给药,然后每天进一步给药3、4、5、6、7、8、9或10天或更多天。

[0401] 在一个具体实施例中,皮质类固醇可以在第1-3天以静脉注射给药,然后在第6-10天以口服给药。在另一个实施例中,皮质类固醇的剂量在与本发明化合物的共同给药阶段期间可以更高,并且在随后的天数里降低。

[0402] 具体剂量时间表包括:

[0403] • 在第1天至第3天静脉注射(IV)1.5mg/天的普立肽以及6.6mg/天的盐酸地塞米松,然后从第4天到第10天口服(PO)/IV6 mg/天的地塞米松直至第10天(取决于医生根据患者临床状况和病情进展的判断)。

[0404] • 在第1天至第3天静脉注射(IV)2.0mg/天的普立肽并静脉注射6.6mg/天的地塞米松,然后从第4天到第10天口服(PO)/IV6 mg/天的地塞米松直至第10天(取决于医生根据患者临床状况和病情进展的判断)。

[0405] • 在第1天至第3天静脉注射(IV)2.5mg/天的普立肽并静脉注射6.6mg/天的地塞米松,然后从第4天到第10天口服(PO)/IV 6mg/天的地塞米松直至第10天(取决于医生根据患者临床状况和病情进展的判断)。

[0406] 在一个实施例中，为了避免与给药相关的输液反应，患者可以在开始注射根据本发明的化合物之前20至30分钟接受以下药物：

[0407] • 昂丹司琼8mg IV(或等同药物)

[0408] • 盐酸苯海拉明25mg IV(或等同药物)

[0409] • 雷尼替丁50mg IV(或等同药物)

[0410] • 地塞米松6.6mg静脉注射(包括在上述时间表中)

[0411] 另外，在第4天和第5天，用本发明化合物治疗的患者可PO接受每天两次的昂丹司琼4mg。

[0412] 地塞米松、昂丹司琼和雷尼替丁的剂量在此以碱形式为基础进行定义。盐酸苯海拉明的剂量以盐酸盐为基础给出。本发明化合物的剂量基于碱形式给出。

[0413] 日剂量可以注射给药。注射可以是1小时注射、1.5小时注射、2小时注射、3小时注射或更长时间。优选地，注射为1.5小时。

[0414] 在某些实施例中，可根据使用负荷剂量和维持剂量的方案来给药剂量。根据本发明的负荷/维持剂量包括：

[0415] 第1天2.5mg的负荷剂量，随后几天2mg/天的维持剂量；

[0416] 第1天2.5mg的负荷剂量，随后几天1.5mg/天的维持剂量；

[0417] 第1天2.5mg的负荷剂量，随后几天1mg/天的维持剂量；

[0418] 第1天2.5mg的负荷剂量，随后几天0.5mg/天的维持剂量；

[0419] 第1天2mg的负荷剂量，随后几天1.5mg/天的维持剂量；

[0420] 第1天2mg的负荷剂量，随后几天1mg/天的维持剂量；

[0421] 第1天2mg的负荷剂量，随后几天0.5mg/天的维持剂量；

[0422] 第1天1.5mg的负荷剂量，随后几天1mg/天的维持剂量；

[0423] 第1天1.5mg的负荷剂量，随后几天0.5mg/天的维持剂量；以及

[0424] 第1天1mg的负荷剂量，随后几天0.5mg/天的维持剂量。

[0425] 根据另一实施例，日剂量可在方案的最后一天或多天减少。

[0426] 根据另一实施方式，如果日剂量为2mg，则剂量可在第4天和第5天减少至1mg。

[0427] 具体的治疗方案包括：

[0428] -1mg普立肽，注射1.5小时，每天一次，连续5天。(总剂量5mg)；

[0429] -2mg普立肽，注射1.5小时，每天一次，连续5天。根据研究人员的判断，第4天和第5天的剂量可以减少到1mg/天(总剂量8-10mg)；

[0430] -1.5mg普立肽，注射1.5小时，每天一次，连续3天。(总剂量4.5mg)；

[0431] -2mg普立肽，注射1.5小时，每天一次，连续3天。(总剂量6mg)；以及

[0432] -2.5mg普立肽，注射1.5小时，每天一次，连续3天。(总剂量7.5mg)。

[0433] 单剂量方案包括：

[0434] • 给药普立肽，注射1.5小时，第1天一次，剂量为1-10mg、4-10mg、4.5-10mg、4mg、4.5mg、5mg、5.5mg、6mg、6.5mg、7mg、7.5mg、8mg、8.5mg、9mg、9.5mg或10mg，优选4.5mg、5mg、6mg、7.5mg、8mg、9mg或10mg，更优选5-9mg、6.5-8.5mg、7-8mg或最优选7.5mg。

[0435] • 单剂量方案可在注射普立肽前20-30分钟进一步包括以下预防性药物：

[0436] -静脉注射盐酸苯海拉明25mg，

[0437] -静脉注射雷尼替丁50mg，

[0438] -静脉注射地塞米松6.6mg，

[0439] -静脉注射昂丹司琼8mg，缓慢注射15分钟。

[0440] • 服用普立肽后，可每12小时口服昂丹司琼4mg，持续3天，以减轻药物引起的恶心和呕吐。如果在早晨给予普立肽，患者可以在下午接受第一剂量的昂丹司琼。

[0441] 根据另外的实施例，可以基于临床参数和/或患者特征选择患者用于使用普立肽的治疗。合适的参数可以是本申请中公开的测量。

[0442] 上述方案和剂量适用于根据本发明的治疗方法、用途、以及本文所定义的化合物在制备本文所定义的药物中的用途。

[0443] 在本发明的另一方面，提供了降低受试者或得自受试者的样品或细胞培养物中的一种或多种促炎细胞因子的表达和/或分泌的方法，所述方法包括给药本文定义的化合物。

[0444] 在本发明的另一方面，提供了增加受试者或得自受试者的样品或细胞培养物中的巨噬细胞激活的方法，所述方法包括给药本文定义的化合物。

[0445] 在实施例中，本发明涉及根据本发明使用的化合物，其中所述化合物与一种或多种以下预防性药物组合给药：盐酸苯海拉明、雷尼替丁、地塞米松、昂丹司琼。特别地，静脉注射25mg的一种或多种盐酸苯海拉明或等同药物；静脉注射50mg雷尼替丁或等同药物；静脉注射8mg地塞米松；静脉注射8mg的昂丹司琼或等同药物，并缓慢注射15分钟。患者可在注入普立肽前20-30分钟接受所述预防性药物。静脉注射8mg地塞米松可以是产生6.6mg地塞米松碱的磷酸地塞米松。

[0446] 为了提供更简洁的描述，本文给出的一些定量表达式没有限定术语“约”。应理解，无论是否明确使用术语“约”，本文给出的每一量均意指实际给定值，且其还意指将基于本领域技术人员合理地推断的对所述给定值的近似值，包括所述给定值的实验和/或测量条件导致的等效物和近似物。

[0447] 虽然上述公开提供了对包含在本发明范围内的主题(包括制造和使用本发明的方法及其最佳模式)的概述，但是提供以下实施例以进一步使本领域技术人员能够实践本发明并提供完整的书面描述。然而，本领域技术人员将认识到，这些实施例的细节不应理解为对本发明的限制，本发明的范围应从本公开的权利要求及其等同药物中理解。鉴于本公开，本发明的各种进一步的方面和实施例对于本领域技术人员将是显而易见的。

[0448] 示例

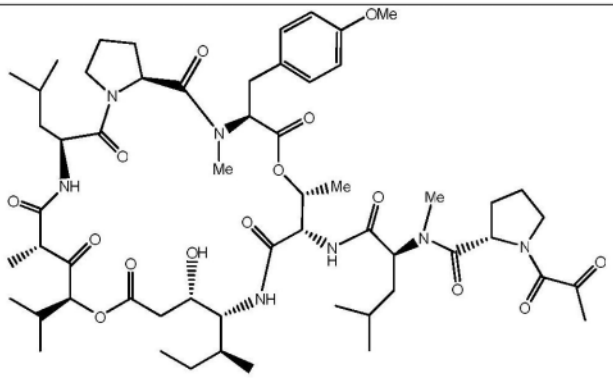
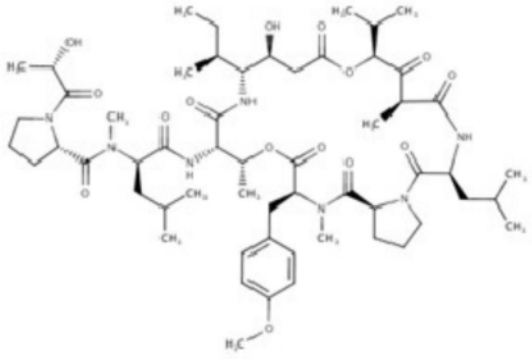
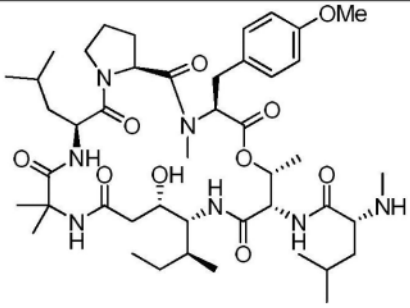
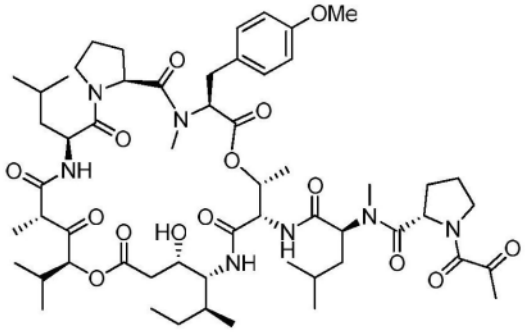
[0449] 本发明的化合物可根据文献中所述的方法获得，例如：Vera等人.Med.Res.Rev.2002,22(2),102-145,WO 2011/020913(具体见示例1-5),WO 02/02596,WO 01/76616,以及WO 2004/084812,这些内容通过引用结合于此。

[0450] 在本发明的实验中使用的具体化合物是：

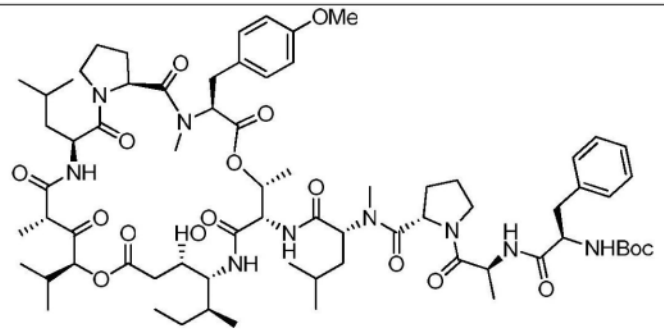
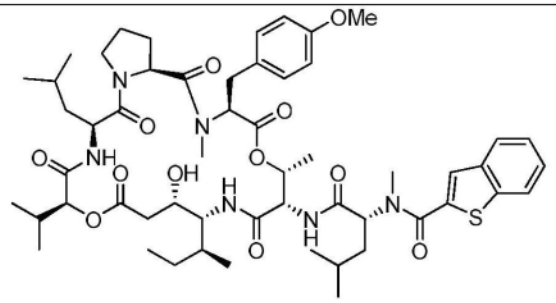
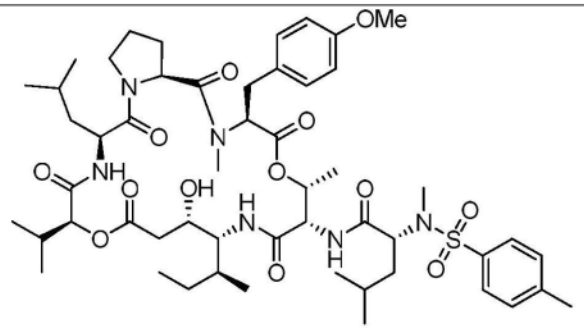
[0451]

化合物	结构

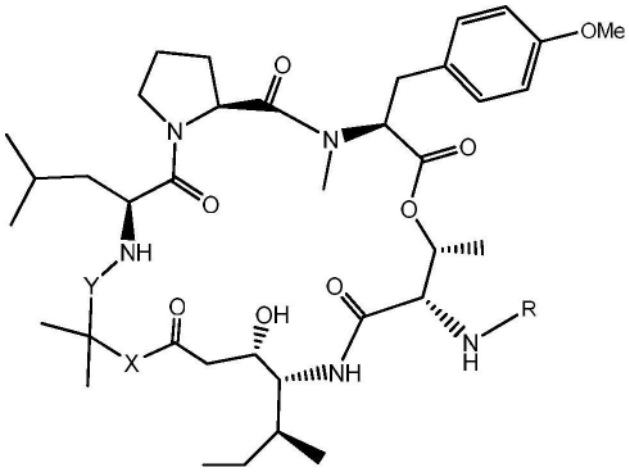
[0452]

PLD	
膜海鞘素 B （化合物 240）	
化合物 3	
化合物 8	

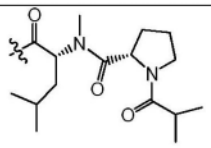
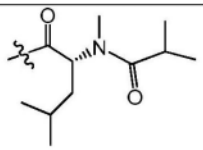
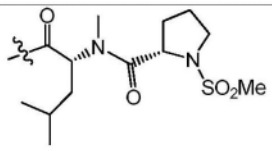
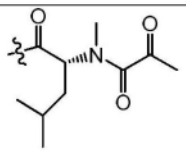
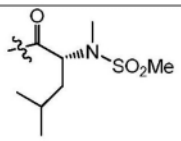
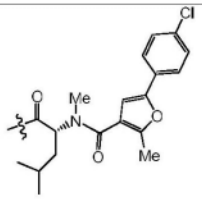
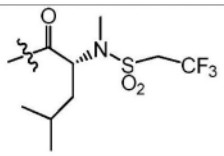
[0453]

化合物 9	
化合物 10	
化合物 11	

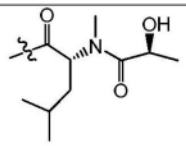
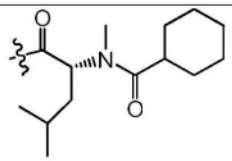
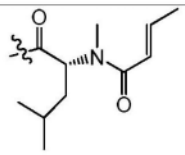
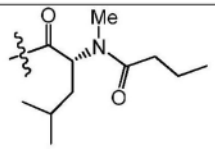
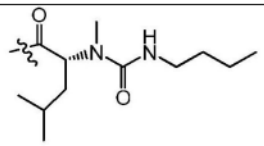
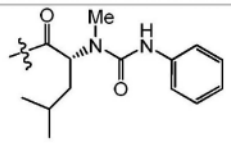
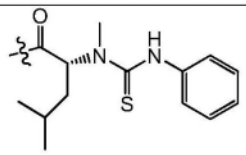
[0454] 按照WO02/02596和说明书中描述的方法，以及在前面的实施例中进一步公开的，可得到下列化合物：

[0455] 

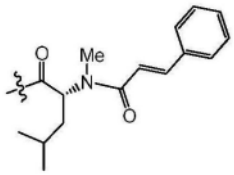
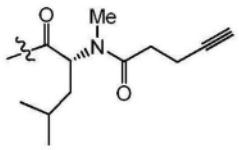
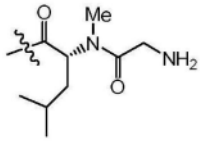
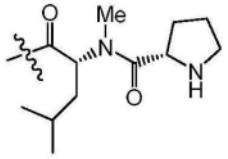
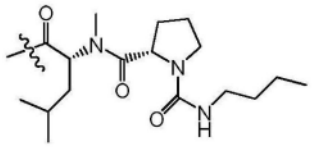
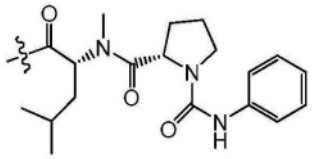
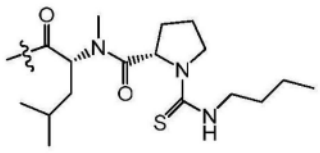
[0456]

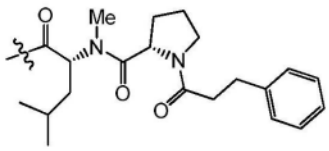
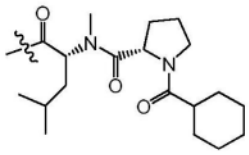
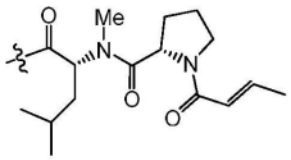
化合物	X	Y	R
12	O	CO	
13	NH	CO	
14	O	-COCH(CH$_3$)CO-	
15	NH	-COCH(CH$_3$)CO-	
16	O	CO	
17	NH	CO	
18	O	-COCH(CH$_3$)CO-	
19	NH	-COCH(CH$_3$)CO-	
20	O	CO	
21	NH	CO	
22	O	-COCH(CH$_3$)CO-	
23	NH	-COCH(CH$_3$)CO-	
24	O	CO	
25	NH	CO	
26	O	-COCH(CH$_3$)CO-	
27	NH	-COCH(CH$_3$)CO-	
28	O	CO	
29	NH	CO	
30	O	-COCH(CH$_3$)CO-	
31	NH	-COCH(CH$_3$)CO-	
32	O	CO	
33	NH	CO	
34	O	-COCH(CH$_3$)CO-	
35	NH	-COCH(CH$_3$)CO-	
36	O	CO	
37	NH	CO	
38	O	-COCH(CH$_3$)CO-	
39	NH	-COCH(CH$_3$)CO-	

[0457]

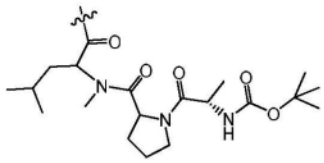
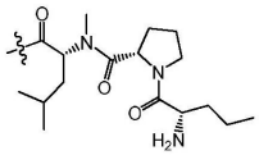
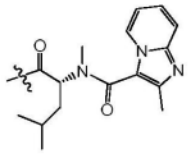
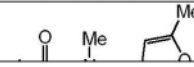
化合物	X	Y	R
40	O	CO	
41	NH	CO	
42	O	-COCH(CH$_3$)CO-	
43	NH	-COCH(CH$_3$)CO-	
44	O	CO	
45	NH	CO	
46	O	-COCH(CH$_3$)CO-	
47	NH	-COCH(CH$_3$)CO-	
48	O	CO	
49	NH	CO	
50	O	-COCH(CH$_3$)CO-	
51	NH	-COCH(CH$_3$)CO-	
52	O	CO	
53	NH	CO	
54	O	-COCH(CH$_3$)CO-	
55	NH	-COCH(CH$_3$)CO-	
56	O	CO	
57	NH	CO	
58	O	-COCH(CH$_3$)CO-	
59	NH	-COCH(CH$_3$)CO-	
60	O	CO	
61	NH	CO	
62	O	-COCH(CH$_3$)CO-	
63	NH	-COCH(CH$_3$)CO-	
64	O	CO	
65	NH	CO	
66	O	-COCH(CH$_3$)CO-	
67	NH	-COCH(CH$_3$)CO-	

[0458]

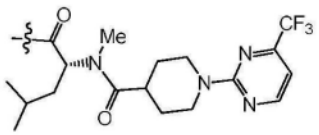
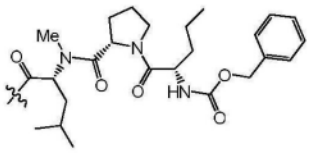
化合物	X	Y	R
68	O	CO	
69	NH	CO	
70	O	-COCH(CH$_3$)CO-	
71	NH	-COCH(CH$_3$)CO-	
72	O	CO	
73	NH	CO	
74	O	-COCH(CH$_3$)CO-	
75	NH	-COCH(CH$_3$)CO-	
76	O	CO	
77	NH	CO	
78	O	-COCH(CH$_3$)CO-	
79	NH	-COCH(CH$_3$)CO-	
80	O	CO	
81	NH	CO	
82	O	-COCH(CH$_3$)CO-	
83	NH	-COCH(CH$_3$)CO-	
84	O	CO	
85	NH	CO	
86	O	-COCH(CH$_3$)CO-	
87	NH	-COCH(CH$_3$)CO-	
88	O	CO	
89	NH	CO	
90	O	-COCH(CH$_3$)CO-	
91	NH	-COCH(CH$_3$)CO-	
92	O	CO	
93	NH	CO	
94	O	-COCH(CH$_3$)CO-	

95	NH	-COCH(CH$_3$)CO-	
96	O	CO	
97	NH	CO	
98	O	-COCH(CH$_3$)CO-	
99	NH	-COCH(CH$_3$)CO-	
100	O	CO	
101	NH	CO	
102	O	-COCH(CH$_3$)CO-	
103	NH	-COCH(CH$_3$)CO-	
104	O	CO	
105	NH	CO	
106	O	-COCH(CH$_3$)CO-	
107	NH	-COCH(CH$_3$)CO-	

[0459]

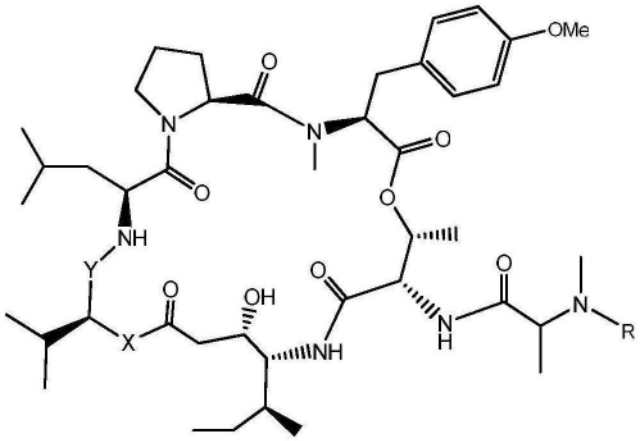
化合物	X	Y	R
108	O	CO	
109	NH	CO	
110	O	-COCH (CH$_3$) CO-	
111	NH	-COCH (CH$_3$) CO-	
112	O	CO	
113	NH	CO	
114	O	-COCH (CH$_3$) CO-	
115	NH	-COCH (CH$_3$) CO-	
116	O	CO	
117	NH	CO	
118	O	-COCH (CH$_3$) CO-	
119	NH	-COCH (CH$_3$) CO-	
120	O	CO	

[0460]

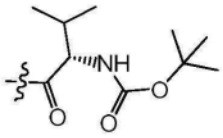
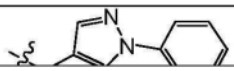
121	NH	CO	
122	O	-COCH（CH_3）CO-	
123	NH	-COCH（CH_3）CO-	
124	O	CO	
125	NH	CO	
126	O	-COCH（CH_3）CO-	
127	NH	-COCH（CH_3）CO-	
128	O	CO	
129	NH	CO	
130	O	-COCH（CH_3）CO-	
131	NH	-COCH（CH_3）CO-	

[0461] 按照WO 02/02596和说明书中描述的方法，以及在前面的实施例中进一步公开的，可得到下列化合物：

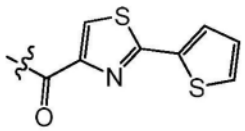
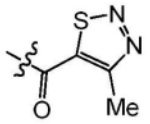
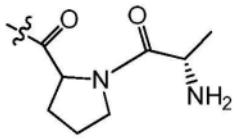
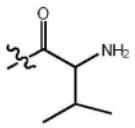
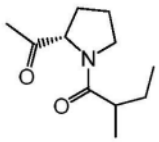
[0462]

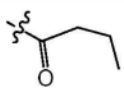


[0463]

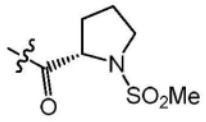
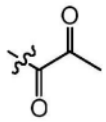
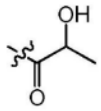
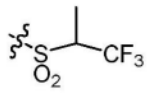
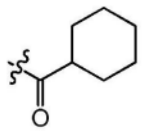
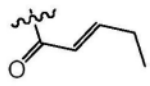
化合物	X	Y	R
132	O	CO	
133	NH	CO	
134	O	-COCH（CH_3）CO-	
135	NH	-COCH（CH_3）CO-	
136	O	CO	

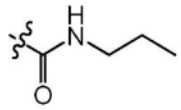
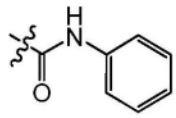
[0464]

化合物	X	Y	R
137	NH	CO	
138	O	-COCH（CH_3）CO-	
139	NH	-COCH（CH_3）CO-	
140	O	CO	
141	NH	CO	
142	O	-COCH（CH_3）CO-	
143	NH	-COCH（CH_3）CO-	
144	O	CO	
145	NH	CO	
146	O	-COCH（CH_3）CO-	
147	NH	-COCH（CH_3）CO-	
148	O	CO	
149	NH	CO	
150	O	-COCH（CH_3）CO-	
151	NH	-COCH（CH_3）CO-	
152	O	CO	
153	NH	CO	
154	O	-COCH（CH_3）CO-	
155	NH	-COCH（CH_3）CO-	
156	O	CO	
157	NH	CO	
158	O	-COCH（CH_3）CO-	
159	NH	-COCH（CH_3）CO-	

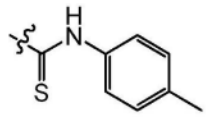
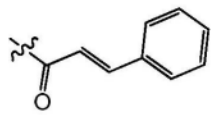
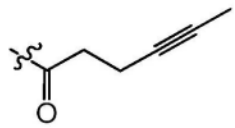
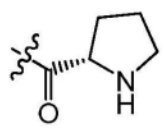
化合物	X	Y	R
160	O	CO	
161	NH	CO	

[0465]

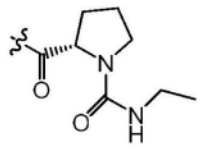
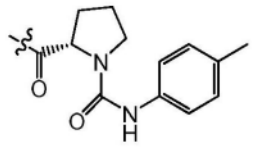
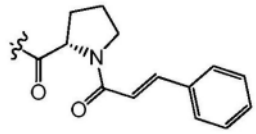
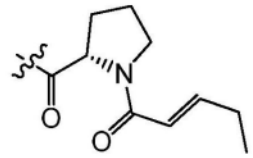
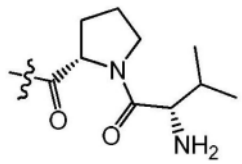
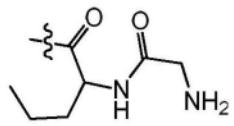
162	O	-COCH（CH_3）CO-	
163	NH	-COCH（CH_3）CO-	
164	O	CO	
165	NH	CO	
166	O	-COCH（CH_3）CO-	
167	NH	-COCH（CH_3）CO-	
168	O	CO	
169	NH	CO	
170	O	-COCH（CH_3）CO-	
171	NH	-COCH（CH_3）CO-	
化合物	**X**	**Y**	**R**
172	O	CO	
173	NH	CO	
174	O	-COCH（CH_3）CO-	
175	NH	-COCH（CH_3）CO-	
176	O	CO	$-SO_2Me$
177	NH	CO	
178	O	-COCH（CH_3）CO-	
179	NH	-COCH（CH_3）CO-	
180	O	CO	
181	NH	CO	
182	O	-COCH（CH_3）CO-	
183	NH	-COCH（CH_3）CO-	
184	O	CO	
185	NH	CO	
186	O	-COCH（CH_3）CO-	
187	NH	-COCH（CH_3）CO-	
188	O	CO	
189	NH	CO	

190	O	-COCH（CH_3）CO-	
191	NH	-COCH（CH_3）CO-	
192	O	CO	
193	NH	CO	
194	O	-COCH（CH_3）CO-	
195	NH	-COCH（CH_3）CO-	
196	O	CO	
197	NH	CO	
198	O	-COCH（CH_3）CO-	
199	NH	-COCH（CH_3）CO-	

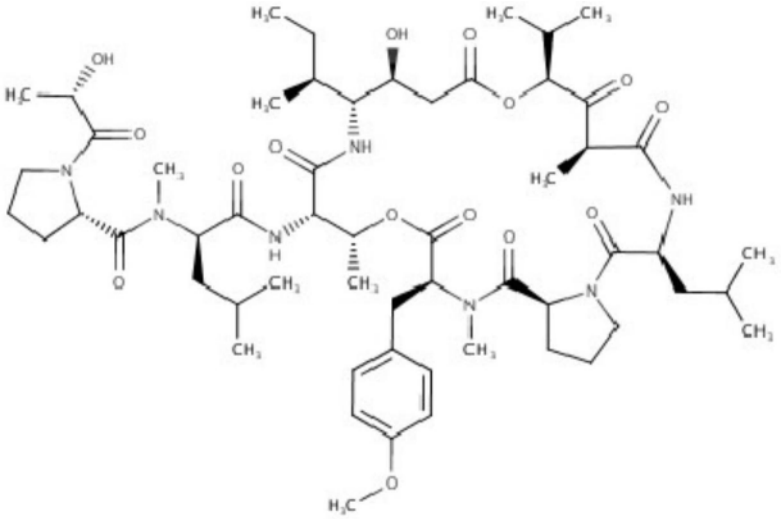
[0466]

化合物	X	Y	R
200	O	CO	
201	NH	CO	
202	O	-COCH（CH_3）CO-	
203	NH	-COCH（CH_3）CO-	
204	O	CO	
205	NH	CO	
206	O	-COCH（CH_3）CO-	
207	NH	-COCH（CH_3）CO-	
208	O	CO	
209	NH	CO	
210	O	-COCH（CH_3）CO-	
211	NH	-COCH（CH_3）CO-	
化合物	**X**	**Y**	**R**
212	O	CO	
213	NH	CO	
214	O	-COCH（CH_3）CO-	

[0467]

215	NH	-COCH（CH_3）CO-	
216	O	CO	
217	NH	CO	
218	O	-COCH（CH_3）CO-	
219	NH	-COCH（CH_3）CO-	
220	O	CO	
221	NH	CO	
222	O	-COCH（CH_3）CO-	
223	NH	-COCH（CH_3）CO-	
224	O	CO	
225	NH	CO	
226	O	-COCH（CH_3）CO-	
227	NH	-COCH（CH_3）CO-	
228	O	CO	
229	NH	CO	
230	O	-COCH（CH_3）CO-	
231	NH	-COCH（CH_3）CO-	
232	O	CO	
233	NH	CO	
234	O	-COCH（CH_3）CO-	
235	NH	-COCH（CH_3）CO-	
236	O	CO	
237	NH	CO	
238	O	-COCH（CH_3）CO-	
239	NH	-COCH（CH_3）CO-	

[0468] 另一种化合物是化合物240，称为膜海鞘素B，其结构如下所示：

[0469] 

[0470] 例1

[0471] 如图1所示,PLD在体外抑制NF-κB的转录。

[0472] 我们检验了普立肽是否调节NFκB的转录活性。为此,我们利用了用NFκB荧光素酶报告质粒稳定转染的THP-1细胞。我们用100ng/mL的TNFα(NF-κB激活剂)、500μg/mL的聚肌胞苷酸(poly I:C)(TLR3配体)、10μg/mL的LPS-B5(TLR4配体)或10μg/mL的雷西莫特(Resiquimod)(TLR-7/8配体)处理细胞。化合物单独使用(图1A灰色条)或与100nM普立肽(图1A黑色条)组合使用6小时,并定量每种条件下的荧光素酶活性。在每种TLR配体存在的情况下,普立肽明显抑制了荧光素酶的产生,表明在药物存在下,NF-κB的转录被抑制。用MTT法分析存活情况(图1B灰色条(激活剂)和红色条(激活剂与100nM普立肽结合))。未检测到细胞毒效应。

[0473] 如图2所示,PLD还在体外抑制人单核细胞中的促炎细胞因子IL-1、IL-6、IL-8和TNF-α的分泌。

[0474] 为了研究了普立肽对TLR诱导的细胞因子分泌的抑制作用,用100ng/mL的TNFα(NF-κB激活剂)、500μg/mL的poly I:C(TLR3配体)、10μg/mL的LPS-B5(TLR4配体)或10μg/mL的雷西莫特(TLR-7/8配体)处理THP-1细胞。化合物单独使用(灰色条)或与100nM普立肽组合使用(红色条)6小时。我们通过ELISA测定比较不同处理之间细胞培养物上清液中细胞因子分泌的变化。如图2所示,poly I:C、LPS和雷西莫特诱导IL-1、IL-6、IL-8和TNF-α的分泌。此外,普立肽明显抑制IL-1、IL-6、IL-8和TNF-α的产生。TNF-α不能促进IL-1和IL-6的分泌。THP-1细胞可能需要其他TNF-α暴露次数才能分泌这些细胞因子。而且,在TNF-α刺激的细胞中,普立肽不能降低IL-8和TNF-α。这是因为我们测量了分泌到细胞培养基中的TNF-α和加入到细胞培养基中的TNF-α。因此,用TNF-α治疗掩盖了分泌TNF-α的水平。

[0475] 在每种TLR配体存在的情况下,普立肽素明显抑制促炎细胞因子IL-1、IL-6、IL-8的分泌。

[0476] 在进一步的体外实验中,研究了普立肽(APL)预处理对THP-1细胞的影响。使用THP-1NFκB luc line,在用2.5或5μg/mL的雷西莫特(RQ)刺激前8小时添加1、10或50nM APL或DMSO(0.2%)。RQ是TLR7/8激动剂,模拟ssRNA。在24时测量细胞因子或细胞活力的水平。如图50所示,PLD预处理抑制了促炎细胞因子:RQ诱导IL-6、IL-8、IL-1β和TNF-α的分泌。值得注意地,在测定的任何2个RQ浓度下,PLD的加入都不会降低未处理的对照组的活力。虽然

RQ本身确实表现出一定程度的剂量相关毒性，但这种作用不会因培养物中PLD的存在而增加，因此细胞因子产生的变化与RQ诱导的轻微细胞毒性无关。

[0477] 例2

[0478] 如图3所示，在分离自BAL(支气管肺泡灌洗液)的小鼠中，PLD抑制促炎细胞因子IL-6、IL-8和TNF-α的体外分泌。

[0479] 我们检验了普立肽是否抑制肺泡巨噬细胞中LPS诱导的细胞因子分泌。为此，小鼠静脉内注射普立肽(1mg/kg)或载体，并在给药12小时后收集支气管肺泡灌洗液(BAL)。细胞接种并用15μg/mL LPS-B5离体或不离体处理3或6小时，并测量分泌的细胞因子。可以看出，LPS诱导IL-6、IL-10和TNF-α的分泌(灰色条)。此外，在用普立肽处理的动物中，药物明显抑制LPS(红条)诱导的促炎细胞因子IL-6和TNF-α的产生，并导致整体的抗炎效果。

[0480] 这在图51中进一步示出。在用普立肽处理的动物中，普立肽能够显著减少LPS-B5在3小时和6小时在从支气管肺泡灌洗液分离的CD45+细胞中诱导的IL-6、IL-10和TNFα的分泌。这种效应与细胞活力无关，如图51(b)所示。

[0481] 我们进一步检验了普立肽是否抑制BALF中雷西莫特(RQ)诱导的细胞因子分泌。在用雷西莫特鼻内接种50μg/小鼠之前1小时，将小鼠静脉内注射普立肽(1mg/kg)或载体。在鼻内给药RQ后1或3小时收集支气管肺泡灌洗液(BALF)。细胞接种并测量分泌的细胞因子。可以看出，RQ在给药后1小时和3小时都诱导TNFα的分泌。体内给药PLD阻止了TNFα产生的增加。如图52所示，RQ在给药后1小时和3小时都诱导TNFα分泌。体内给药PLD可防止TNFα产生的增加。

[0482] 我们还检验了普立肽对肺泡巨噬细胞募集的影响。激活的单核细胞衍生的巨噬细胞通过释放大量的促炎细胞因子而促成COVID-19细胞因子风暴。用流式细胞仪对支气管肺泡灌洗液细胞进行染色和分析。普立肽可降低支气管肺泡灌洗液中巨噬细胞的比例，无细胞毒效应。

[0483] 例3

[0484] 如图4所示，小鼠单次iv给药后，PLD减少了BAL中巨噬细胞的数量。

[0485] 为了研究普立肽是否降低急性炎症动物的肺泡巨噬细胞百分比，我们用普立肽(1mg/kg)i.v、在无菌生理盐水中的LPS(20μg/kg)i.p和普立肽(1mg/kg;i.v.)结合LPS(20μg/kg,i.p.)处理小鼠。三小时后，收集支气管肺泡灌洗液。通过离心获得支气管肺泡灌洗液细胞，并通过流式细胞术进行分析(图4b)。上图显示了对样品中存在的巨噬细胞群体进行分析的策略。右下图显示以细胞百分比表示的相同结果。左下图显示CD45+(白细胞标记物)活细胞的百分比。可以看出，LPS诱导肺泡巨噬细胞的募集。用普立肽处理可降低支气管肺泡灌洗液中巨噬细胞的百分比，而无细胞毒效应。

[0486] 例4

[0487] 如图5所示，PLD分布于小鼠(在药理学模型中使用的非临床物种)肺部。此外，在非临床物种和患者中也实现了类似的血浆暴露(plasma exposure)。

[0488] 在任何取样时间，肺中普立肽的浓度始终高于血浆中普立肽的浓度，小鼠、大鼠和仓鼠的肺与血浆比(计算为$^{lung}AUC_{0-\infty}/^{plasma}AUC_{0-\infty}$)分别为133、460和909，因此证实了普立肽在肺中的分布。

[0489] 表1

[0490]

物种（性别）	应变	剂量† (mg/kg)	C_{max} (ng/mL)	$AUC_{0-\infty}$ (ng·h/mL)	$t_{1/2}$ (h)	Cl (L/h/kg)	Vd_{ss} (L7kg)
小鼠（F）	C57BL6/J	1.0[a]	50.7	225.3	18.2	4.4	101.8
人（M/F）	-	0.135[b]	29.1	256.0	20-80	0.7-0.9	29-33
	-	0.02[c]	8.5[d]	174.0[d]	-	-	-

[0491] F,女;M,男。

[0492] †方案:

[0493] -非临床物种:单次静脉推注。

[0494] -患者:静脉输液3小时。

[0495] [a]最大耐受剂量。

[0496] [b]根据推荐剂量5mg/m2、3小时输注或9.5mg/患者计算。

[0497] [c]相当于1.5mg/患者,这是APLICOV中使用的剂量(在第1、2和3天注射1小时)。

[0498] [d]根据普立肽的群体PK模型(CPR/2016/01)评估,每天3次1.5mg/患者剂量。

[0499] 人体表面积,1.9。

[0500] 人体重量,60公斤

[0501] 材料与方法

[0502] 转录荧光素酶法。

[0503] 按照制造商的说明,使用Bright Glo™荧光素酶检测系统检测NF-κB转录。将用NF-κB-Luc质粒(含有4个NF-κB结合位点、1个最小启动子和1个荧光素酶基因)稳定转染的NF-κB报告基因(Luc)-THP-1人单核细胞暴露于100ng/mL TNFα(阳性对照组)、500μmg/mL poly(I:C)(Polyinosinic-polycytidylic聚肌胞苷酸)、10μg/mL LPS-B5(大肠杆菌055:B5的脂多糖)或10μg/mL雷西莫特。化合物单独使用或与100nM普立肽结合使用6小时。在Perkin-Elmer EnVision reader中测量发光。同时进行MTT(3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基溴化四唑)细胞增殖实验以控制化合物的细胞毒性。细胞存活以对照组细胞生长的百分比表示。所提供的数据是一式三份进行的三个独立实验的平均值。

[0504] 分泌细胞因子的ELISA检测

[0505] 如上所述地处理THP1-NFκB-LUC细胞培养物,并且在处理后6小时取样培养基以通过ELISA测定分泌的细胞因子。介质样品(media sample)储存在4℃下。用高度特异和敏感的ELISA试剂盒定量分泌到培养基中的IL-8、IL-1β、IL-6和TNF-α蛋白。人IL-1b、人IL-6、人IL-8和人TNF OptEIA™ELISA试剂盒获自BD Biosciences,并按制造商所述进行。所提供的数据是一式三份进行的三个独立实验的平均值。

[0506] MTT法

[0507] 将细胞接种在96孔微量滴定板中,并在上述处理之前在37℃和5%CO2下放置24小时。连续处理6小时后,通过将MTT转化为其有色反应产物MTT甲臜来评估细胞活力,MTT甲臜被溶解以测量其在540nm的吸光度。这里提供的数据代表了一式三份进行的一系列三个独立实验。

[0508] “体内”和“离体”处理。

[0509] 将小鼠随机分成待接受治疗的五只动物的组。给小鼠静脉注射(i.v.)普立肽

(1mg/kg)，给药后12小时安乐死。对照组用生理盐水(聚氧乙烯蓖麻油(Cremophor)/乙醇/水)稀释的普立肽载体。收集各组支气管肺泡灌洗液(BAL)，离心得到支气管肺泡灌洗液细胞。细胞经历红细胞裂解(Roche)，接种，并用15μg/mL的LPS-B5进行离体或不进行离体处理3或6小时。分泌的细胞因子使用高度特异性和敏感的ELISA试剂盒测量。小鼠IL-6、小鼠IL-10和小鼠TNF DuoSet ELISA试剂盒获自R&D Systems，并如制造商所述进行。这里提供的数据是来自一系列三个独立实验的代表。

[0510] 动物炎症模型。

[0511] 将小鼠随机分为待接受治疗的两只动物的组。小鼠接受普立肽(1mg/kg)(静脉注射，i.v.)、在无菌生理盐水中的LPS(20μg/kg)(腹膜内，i.p.)、或普立肽与LPS(20μg/kg，i.p.)结合。对照组接受用盐水稀释的普立肽载体(Cremophor/乙醇/水)。三小时后，对动物实施安乐死并收集支气管肺泡灌洗液(总共1.2ml，PBS)。通过离心获得支气管肺泡灌洗液细胞并通过流式细胞术分析。这里提供的数据是来自一系列三个独立实验的代表。

[0512] 在另一种炎症模型中，将小鼠随机分成接受治疗的两只动物的组。小鼠静脉内(i.v.)接受1mg/kg的普立肽，1小时后接受雷西莫特(50μg/小鼠，鼻内)。对照组接受用盐水稀释的普立肽载体(Cremophor/乙醇/水)。1小时和3小时后，对动物实施安乐死，收集支气管肺泡灌洗液(总量为1.2ml，PBS)，然后用ELISA试剂盒定量TNFα。这里提供的数据是来自一系列三个独立实验的代表。

[0513] 巨噬细胞的流式细胞术分析。

[0514] 用抗F4/80-BV510、CD45-APC700、CD11b-BV650、CD11c-APC-Fire、CD24-PC7和Ly6C-BV605单克隆抗体(Biolegend)和LIVE/DEAD™可固定的绿色死细胞染色试剂盒对支气管肺泡灌洗液细胞进行染色，用于488nm激发(ThermoFisher)。将巨噬细胞(F4/80+)门控(gated)在活免疫细胞(CD45+LIVE/DEAD dye-)上，而将肺泡巨噬细胞(F4/80+CD24-)特异性门控在来自活免疫细胞的CD11c+CD11b-群上。同型对照(isotype control)和补偿微球(compensation bead)用于设定补偿和门控策略。

[0515] 例5:本发明化合物的抗病毒活性已在HIV中得到证实。

[0516] 在预先用PHA+IL-2激活的MT-2细胞和PBMC中进行重组病毒测定。用从293t细胞获得的上清液感染细胞，所述293t细胞用全长感染性HIV-1质粒:pNL4.3-Luc(X4嗜性病毒)、pNL4.3-Renilla(X4嗜性病毒，能够进行多轮复制)、pNL4.3-Δenv-Luc加pVSV-env(用VSV的G蛋白假型化的HIV)或pJR-Renilla(R5嗜性病毒，能够进行多轮复制)转染。将来自不同感染供体的病毒的pol基因克隆到NL4.3-Renilla中获得抗性病毒。病毒9D携带以下突变:41L、67N、70R、98G、118I、184V、215F、219Q、74I和病毒4D:K65R、K70R、V75I、F77L、F116Y、Q151M、M184I、L10I。然后在96孔微板中进行检测，该微板接种100μl，每孔含有250.000(PBMC)或100.000(MT-2)细胞。将待测试化合物以50至0.0016μg/mL(100μl/孔)的浓度添加到培养物中。最后，用转染上述不同质粒获得的上清液感染细胞培养物。48小时后，除去细胞培养物上清液，并按照制造商的说明用荧光素酶(Luciferase)测定系统或海肾(Renilla)测定系统(均来自Promega)溶解细胞，在光度计(Berthold检测系统)中测量Luciferase-Renilla活性。所有实验用用载体(DMSO)处理的细胞和未处理的细胞控制。

[0517] HIV-1复制抑制通过测量光度计中萤光素酶-海肾活性或RLU(相对光单位)的降低来评估，是未处理细胞的感染的100％。

[0518] 化合物3(图6A和6B)在MT-2细胞和PBMC中都显示出抗病毒活性(IC_{50}分别为1.39μM和0.16μM)。这种化合物在PBMC中毒性更大,如图6所示。MT-2细胞在57.3μM时未达到毒性浓度,而在PBMCS中,CC_{50}值约为27μM。

[0519] 化合物8(图7A和7B)在MT-2细胞和PBMC中也显示出抗病毒活性。虽然浓度为50μM时是非特异性的,但在10μM时是特异性的,IC_{50}值低100倍。

[0520] 化合物9(图8A和图8B)、10(图9A和图9B)和11(图10A和图10B)是所有测试化合物中最有效的化合物。化合物9、10和11在PBMC中显示出纳摩尔范围内的IC_{50}值(分别为0.63、0.86和69.4nM),并且它们是文献中存在的体外抗病毒化合物中最有效的。

[0521] 例6:本发明化合物对冠状病毒科的抗病毒活性已得到证实。

[0522] 在用HCoV-229E感染的Huh-7细胞(人肝癌细胞系)中测试本发明化合物的抗病毒活性。HCoV-229E具有与SARS-COV-2非常相似的繁殖和传播机制。事实上,HCoV-229E的N蛋白与SARS-CoV-2中的同源N蛋白具有大于90%的蛋白同源性。所有冠状病毒都需要其N(核衣壳)蛋白与EF1A结合,以便有效地复制和合成病毒蛋白。减少或消除N与EF1A的结合降低了病毒传播的活力。

[0523] 在下表2中列出的本发明化合物在DMSO中重构,并在-20℃下储存。

[0524] 以0.01pfu的moi(感染复数)用HCoV-229E-GFP病毒感染在M96孔板中生长至融合(grown to confluence)的Hu-7细胞(人肝癌细胞系)。病毒原液(virus stock)为HCoV-229E-GFP(2013年1月31日起),$3x10^7$ pfu/ml。

[0525] 在8hpi(hours post infection,感染后的小时),用具有合适的化合物稀释液(DMSO终浓度2%)的培养基替换培养基,遵循以下方案:

[0526] 表2

[0527]

	1	2	3	4	5
A(图11-15)	50nM	5nM	0.5nM	5nM	0.5nM

[0528]

B(图16-19)	50nM	5nM	0.5nM	0.5nM	
C(图20-23)	50nM	5nM	0.5nM	0.5nM	
D(图24-26)	50nM	5nM	0.5nM		
E(图27-29)	50nM	5nM	0.5nM		
F(图30-33)	50nM	5nM	0.5nM	0.5nM	

[0529] A=DMSO(对照);B=化合物240(膜海鞘素B);C=PLD;D=化合物9;E=化合物10;F=PLD

[0530] 24hpi观察到荧光细胞。照片是使用自动系统获得的。用4%PFA固定细胞30分钟,用PBS洗涤,用PBS中1:200的DAPI对细胞核染色20分钟RT。绿色图像显示GFP标记的小瓶颗粒。蓝色图像显示DAPI染色的细胞核。

[0531] 短时间内,以0.01pfu/细胞的感染复数(MOI),用$3x10^7$pfu/ml的病毒接种物感染Huh-7融合培养物,8小时后,加入浓度为0.5nM至50μM的普立肽。将含有普立肽的培养物温

育48小时，然后通过荧光测量病毒活力。所获得的结果显示出浓度低至0.5nM(0.555μg/l)(远低于其他抗病毒药物)的普立肽诱导的抗病毒效果。

[0532] 显示本发明的化合物在测试浓度范围内是有效的抗病毒剂，同时保持细胞活力。

[0533] 例7

[0534] 进行了一项多中心、随机、平行和概念验证研究，以评估需要住院治疗的COVID-19患者中三剂普立肽的安全性。研究细节可通过ClinicalTrials.gov Identifier: NCT04382066获得。

[0535] 本研究的主要目的是确定根据提议的给药方案在COVID-19入院患者中给药的每个剂量水平下的普立肽的安全性和毒理学特性。

[0536] 次要目标是通过以下指标评估以建议剂量水平对COVID-19患者使用普立肽的疗效：自基线的SARS-CoV-2病毒载量的变化；PCR阴性检测到SARS-CoV-2的时间；疾病严重程度的累积发生率(评估依据：死亡率；对有创机械通气和/或ICU入院的需要；对无创机械通气的需要；对氧气治疗的需要)和普立肽II/III期疗效研究的推荐剂量水平的选择。

[0537] 研究中包括的患者以1:1:1:1的比例随机接受：

[0538] -组A)1.5mg普立肽，1.5小时注射给药，每天一次，连续3天(总剂量4.5mg)。

[0539] -组B)2.0mg普立肽，1.5小时注射给药，每天一次，连续3天(总剂量6.0mg)。

[0540] -组C)2.5mg普立肽，1.5小时注射给药，每天一次，连续3天(总剂量7.5mg)。

[0541] 所有患者在注入普立肽前20-30分钟接受以下预防性药物治疗：

[0542] -静脉注射25mg盐酸苯海拉明或等同药物。

[0543] -静脉注射50mg雷尼替丁或等同药物。

[0544] -静脉注射地塞米松6.6mg。

[0545] -静脉注射8mg昂丹司琼或等同药物，缓慢注射15分钟。

[0546] 包括在研究中的患者接受为期3天的治疗。

[0547] 提供粉末形式的普立肽用于浓度为2mg/小瓶的用于注射的浓缩溶液。在使用前，用4ml重构溶液重构小瓶以获得无色至浅黄色的溶液，该溶液包含0.5mg/ml的普立肽、25mg/ml的甘露醇、0.15ml/ml的聚乙二醇甘油蓖麻油(macrogolglycerol ricinoleate oil)、0.15ml/ml的乙醇和0.70ml/ml的注射用水。在注射前，应在任何合适的静脉溶液中进行额外稀释。

[0548] 2毫克普立肽装在一个I型透明玻璃瓶中，玻璃瓶带有一个用铝密封覆盖的溴丁基橡胶塞。每瓶含2毫克普立肽。

[0549] 在I型无色玻璃小瓶中提供用于重构聚乙二醇甘油蓖麻油(聚乙二醇35蓖麻油)/无水乙醇/注射用水15％/15％/70％(v/v/v)的溶剂。安瓿的体积为4毫升。

[0550] 普立肽将被标记研究方案代码、批号、内容物、有效期、储存条件、研究人员和发起人的名称。研究药物将按照《European Good Manufacturing Practices》附件13进行标记。普立肽应储存在2℃和8℃之间，小瓶应保存在外纸箱中，以保护它们免受光照。该药物在这些条件下稳定60个月。

[0551] 在用4ml用于重构聚乙二醇甘油蓖麻油酸酯/乙醇/水的溶液重构2mg普立肽小瓶后，应当将重构的溶液稀释并在制备后立即使用。如果不立即使用，用户应负责储存时间和使用前的条件。重构后的药物的浓缩溶液在冷藏条件下(5℃±3℃)下物理、化学和微生物

稳定24小时，在室温下在室内光照下储存在原小瓶中6小时。如果在给药前需要储存，溶液应冷藏储存，避光，并应在重构后24小时内使用。

[0552] 血浆浓度

[0553] 图34显示了1.0mg和2.0mg日剂量(D1-D5)后总血浆普立肽浓度曲线对时间的模拟。水平黑线表示体外相当于IC50、IC90和3xIC90的与肺中的浓度相关的总血浆浓度。对于两种剂量水平(1.0mg和2.0mg)，在整个治疗期间将获得高于IC50的血浆浓度，并且在大部分给药间隔期间将保持高于IC90。经过五次重复给药后的积累是最小的。

[0554] 另一个剂量方案是每天1.5mg，持续5天。另一种方案如图35所示，其模拟了与初始固定剂量(flat dose)相关的普立肽总血浆浓度，1小时静脉注射给予1mg(第1天)，随后是0.5mg(D2-D5)的日剂量。在该剂量方案中，在整个治疗期间，普立肽血浆浓度保持在IC50以上，且在分别注射1mg和0.5mg剂量后18和14小时期间保持在IC90以上。值得注意的是，预计在反复给药后积累最少。该方案在治疗的第一天提供1mg的普立肽的负荷剂量，1小时静脉注射，随后维持剂量为0.5mg，每日一次，持续4天。

[0555] 图36示出了在1.5mg、2.0mg和2.5mg的日剂量(D1-D3)之后总血浆普立肽浓度曲线相对时间的模拟。水平黑线表示体外相当于IC50、IC90和3xIC90的与肺中浓度相关的总血浆浓度。对于所有三个剂量水平(1.5mg、2.0mg和2.5mg)，在整个治疗期间将获得高于IC50的血浆浓度，并且在大部分给药间隔期间将保持高于IC90。三次重复用药后的积累很少。

[0556] 中期结果

[0557] 到目前为止，有9名患者的数据。在基线、第4天、第7天和第15天和第31天通过PCR评估病毒载量的情况下，PLD以90分钟静脉注射每天给药，持续3天(第1-3天)。

[0558] 患者1-50岁男性，双侧肺炎。接受PLD 1.5mg x 3。PCR COVID 19检测:基线阳性，到第4天转化为阴性(无病毒载量)。急性临床好转。第7天出院。因此，PLD 1.5mg x 3在第4天去除病毒载量。PLD获得了急性临床改善，包括消除所有病毒负荷和治疗双侧肺炎，以便在第7天出院。

[0559] 患者2:40岁男性，双侧肺炎。接受PLD 1.5mg x 3。到第六天，缺乏改善，并过渡到瑞德西韦(Remdesivir)+TOL+皮质固醇+阿片类药物。第15天PCR转为阴性，第19天出院。

[0560] 患者3:53岁男性，双侧肺炎。接受PLD 1.5mg x 3。PLD防止了临床恶化。第10天出院，第31天PCR转为阴性。

[0561] 患者4:42岁男性，双侧肺炎。接受PLD 2.0mg x 3。需要激素治疗。PCR COVID 19检测:基线时为阳性，第7天仍为阳性。到第15天，患者PCR阴性，如图42a所示。患者在第10天充分康复出院。

[0562] 患者5:33岁女性，双侧肺炎。接受PLD 1.5mg x 3。PCR COVID 19检测:基线阳性，到第4天转化为阴性(无病毒载量)，如图42b所示。双侧肺炎在第6天消失(正常Rx肺)。临床有重大改善。第8天出院。X射线显示肺炎消退，如图39a-c所示。双侧肺炎如图39a所示。在用PLD治疗后，在第6天观察到改善。层状肺不张(Laminar atelectasis)如图39b所示。第15天的后续x射线显示恢复正常，图39c。PLD 1.5mg x 3在第4天去除病毒载量。PLD取得了重大的临床改善，包括消除了所有的病毒负荷，治疗了双侧肺炎，使第8天出院。

[0563] 患者6:69岁女性，症状严重的COPD。登记时有单侧肺炎。接受PLD 1.5mg x 3。PCR COVID19检测:基线阳性，到第7天转化为阴性(无病毒载量)，如图42c所示。出现重大临床改

善。患者在第8天出院。X射线显示肺炎进展，如图40a-c所示。单侧肺炎在图40a中表现明显，在图40b中发展为双侧肺炎。在图40c中，可以看到改善。PLD取得了重大的临床改善，包括消除所有病毒负荷和治疗肺炎，如图40d所示，使第8天出院。

[0564] 患者7:39岁女性，肺部浸润。接受PLD 2.0mg x 3。PCR COVID19检测:基线阳性，到第7天转化为阴性(无病毒载量)，如图42d所示。PLD治疗后，取得了重大的临床改善。第8天出院。

[0565] 患者8:32岁男性。接受PLD 1.5mg x 3。无法评估疗效，第4天出院。

[0566] 患者9:34岁男性。接受PLD 2.0mg x 3。PCR COVID 19检测:基线时为阳性，第7天仍为阳性。然而，到第8天重大临床改善并出院。

[0567] C-反应蛋白试验

[0568] 也进行了PLD对患者5、7和9的炎性细胞因子的影响的测量，C反应蛋白测试的结果如图41所示。对于患者5(图41a)，在给药PLD后，在第2天出现急性下跌。患者7(图41b)和9(图41c)在服用PLD后，在第3天出现急性下跌。这些数据证明了PLD的抗炎特性。

[0569] 讨论

[0570] 对COVID-19患者的PLD临床试验的初步结果进一步证明了PLD在治疗SARS-CoV-2感染和COVID-19方面的显著特性。

[0571] 8名可评价患者中有6名显示SARS-CoV-2PCR转化为阴性，PCR转化的中位时间为7天(4-31)。PLD对CoV感染，即SARS-CoV-2的抗病毒特性，在临床上被证明完全消除了病毒负荷。

[0572] 值得注意的是，在目前测试的9名患者中，由于服用PLD，没有一名患者需要机械通气或ICU入院，研究中没有死亡。8名可评价患者中有6名PDL诱导疾病控制和重大临床改善，其中8名患者中只有2名需要后PLD特异性抗COVID 19治疗。出院的中位时间为8天(7-19天)。这些结果表明PLD对于SARS-CoV-2感染和COVID-19以及由SARS-CoV-2感染引起的肺炎是有效的疗法。

[0573] 对第一组1.5mg和2mg的特别分析证实，在给药剂量下的PLD是有效的，实现了急性改善和完全的疾病控制。注意到绝大多数患者的病毒负荷都完全消除。

[0574] 结果

[0575] 研究完成后，45名因COVID 19住院的患者随机接受每天1.5、2.0和2.5mg的普立肽的治疗，持续3天。治疗在所有3个剂量组中的耐受性都很好。由出院率评估的治疗结果由基线时的疾病严重程度和病毒载量决定。在整个剂量组中，100％(9/9)的轻度疾病患者、82％(23/28)的中度疾病患者和57％(4/7)的重度疾病患者在第15天出院。在整个剂量组中，基线时的病毒载量中值为6.2(0至10.6)$\log_{10}$ copies/mL，到第7天达到病毒载量的平均减少为-3.1$\log_{10}$ copies/mL，到第15天达到-4.5$\log_{10}$ copies/mL。

[0576] 这项研究是一项1期、多中心、开放标签研究，其中45名因COVID 19治疗而住院的患者被随机分为3个剂量组，包括1.5、2.0和2.5mg普立肽，每天一次1.5小时的静脉注射，连续3天。本研究的主要目的是根据(1)采用美国国家癌症研究所(NCI)《不良事件通用术语标准》(CTCAE)5.0版标准，在第3、7、15和31天出现≥3级治疗期间出现的不良事件(TEAE)的频率，(2)无法完成治疗的患者百分比和原因，(3)第3、7、15和31天出现TEAE和SAE的患者百分比，(4)第3天、第7天、第15天和第31天的血液学和非血液学参数基线变化，以及(5)第2天、

第3天、第4天、第5天、第6天、第7天、第15天和第31天出现心电图异常的患者百分比，确定各剂量水平下的安全性和毒理学特征。第二个目标是选择关键研究的推荐剂量。

[0577] 协议规定的安全性终点的结果总结如下：

[0578] • 等级≥3AE：只有31％(14/45)的患者出现等级≥3AE，只有2名患者出现与治疗相关的等级≥3AE：在第一次普立肽注射过程中发生过敏反应各1例，导致停止治疗，1例腹泻，对普立肽治疗没有影响。与主要由COVID 19感染引起的等级≥3AE相一致，等级≥3AE的患病率在很大程度上反映了每个组中严重疾病患者的百分比，其中2.5mg组的患病率最高(26.7％的严重疾病患者，40.0％的等级≥3AE)，1.5mg组的百分比较低(13.3％的严重疾病患者，33.3％的等级≥3AE)，2.0mg组的百分比最低(6.7％的严重疾病患者，20.0％的等级≥3AE)。除1例等级≥3ALT升高外，其余均未发生特别关注事件。

[0579] • 无法完成治疗的患者：只有1例患者未能完成普立肽治疗。

[0580] • 严重不良事件(SAE)患者：共有10名患者经历了SAE，包括6名1.5mg剂量、1名2.0mg剂量和3名2.5mg剂量。除1例过敏反应外，其余均与COVID 19感染有关。

[0581] • 不良事件(AE)患者：对于任何报告的不良事件，没有发现与剂量相关的趋势，最常报告的不良事件(不包括感染)与接受单药普立肽的晚期血液恶性肿瘤和实体肿瘤患者的安全性一致，包括胃肠道便秘疾病(癌症和COVID 19患者分别为29％比18％)、腹泻(31％比18％)、恶心(64％比42％)、呕吐(38％比18％)、乏力/疲劳的体质症状(83％比13％)和发热(28％比47％)。

[0582] • 实验室参数变化：尽管大约一半的患者(51％)的血液学参数变化≥1级，大多数患者(89％)的化学参数变化≥1级，但很少有患者出现>1级变化。就血液学参数而言，6例患者的淋巴细胞减少症加重2～3级，2例中性粒细胞减少症加重2级。就化学参数而言：5例ALT升高2～3级2例，AST升高2～3级，2例GGT升高2～3级，1例CPK升高2级。

[0583] 基于这些发现，结论是，普立肽治疗具有良好的耐受性，并且不可能检测到所研究的3个剂量之间的安全性差异。

[0584] COVID 19患者的疗效-

[0585] 共有44名患者的疗效可评估；在1.5mg组中，有1名患者在首次注射普立肽时出现过敏反应，已停止治疗，疗效不可评估。协议规定的疗效终点的结果在3个剂量组中显示了相同的结果(表3)。治疗结果受基线疾病严重程度和病毒载量的影响。与这些发现一致，最近的一项研究表明，SARS-CoV-2病毒载量与疾病严重程度和死亡率增加有关。在整个剂量组中，100％(9/9)轻度疾病患者在第15天出院，而82％(23/28)中度疾病患者和57％(4/7)重度疾病患者出院。

[0586]

终点	剂量组			
	1.5mg N=14[A]	2.0mg N=15	2.5mg N=15	总的 N=44
出院的患者	n（%）			
第 8 天	6	9	10	25
	（42.9）	（60.0）	（66.7）	（56.8）
第 15 天	11	14	11	36
	（78.6）	（93.3）	（73.3）	（81.8）
第 31 天	13	14	13	40
	（92.9）	（93.3）	（86.7）	（90.9）
死亡率（第 1 天到				
第 7 天	0	0	0	0
第 15 天	0	0	0	0
第 31 天）	1	0	1	2

[0587]

	(7.1)		(6.7)	(4.5)
需要有创机械通气和/或 ICU 入院的患者				
(第 1 天到				
第 7 天	2	1	2	5
	(14.3)	(6.7)	(13.3)	(11.4)
第 15 天	2	1	3	6
	(14.3)	(6.7)	(20.0)	(13.6)
第 31 天)	2	1	3	6
	(14.3)	(6.7)	(20.0)	(13.6)
需要无创机械通气的患者(从第 1 天到				
第 7 天	3	0	1	4
	(21.4)		(6.7)	(9.1)
第 15 天	3	0	2	5
	(21.4)		(13.3)	(11.4)
第 31 天)	3	1	2	6
	(21.4)	(6.7)	(13.3)	(13.6)
需要 ICU 入院的患者(从第 1 天到				
第 7 天	2	1	2	5
	(14.3)	(6.7)	(13.3)	(11.4)
第 15 天	2	1	3	6
	(14.3)	(6.7)	(20.0)	(13.6)
第 31 天)	2	1	3	6
	(14.3)	(6.7)	(20.0)	(13.6)
需要氧气治疗的患者				
第 7 天	10	10	11	31
	(71.4)	(66.7)	(73.3)	(70.5)
第 15 天	4	1	4	9
	(28.6)	(6.7)	(26.7)	(20.5)
第 31 天	0	2	1	3
		(13.3)	(6.7)	(6.8)

[0588]

病毒载量的平均变化（从基线到[B]	log_{10} copies/mL			
第4天	-1.58	-1.92	-2.16	-1.90
第7天	-3.39	-2.69	-3.21	-3.07
第15天	-5.47	-3.62	-4.40	-4.48
第31天）	-6.06	-4.71	-5.20	-5.27
从基线到检测不到病毒载量的平均时间，天	7	13	12	11

[0589] 表3研究APLICOV-PC中协议规定的疗效终点汇总表

[0590] 缩写:ICU＝重症监护病房

[0591] A:在第一次注射普立肽过程中出现过敏反应的患者已停止治疗,其疗效不可评价

[0592] B:根据39名患者的结果:1名患者错过了基线病毒载量评估,4名患者的基线病毒载量低于定量极限,尽管在加入前48小时内进行了阳性聚合酶链反应检测

[0593] 收益-风险考虑因素

[0594] 在APLICOV-PC研究中,大多数患者(84%)患有轻度至中度疾病,82%的患者在第15天出院。由于呼吸功能的进行性恶化和细胞因子释放综合征的发展通常在症状出现后平均10天发生,因此认为第15天的出院率终点反映了威胁生命的并发症的成功改善。

[0595] 事后分析表明,通过出院率评估的治疗反应与基线疾病严重程度和病毒载量相关。在整个剂量组中,100%(9/9)的轻度疾病患者在第15天出院,而82%(23/28)的中度疾病患者和57%(4/7)的重度疾病患者出院。

[0596] 在APLICOV-PC研究中,中值基线病毒载量为6.1log_{10} copies/mL,到第15天,观察到病毒载量的平均减少-4.2log_{10}。这些结果支持这样的结论,即普立肽减少病毒复制。

[0597] 考虑到与药物相关的等级≥3AE的低发生率和第15天的高出院率,以及到第15天基线病毒载量平均减少4.2-log_{10}(中度疾病患者被报告减少-3.0-log),证明普立肽对治疗COVID 19感染住院患者有积极的获益风险。

[0598] 例8

[0599] 在使用vero细胞的体外测定中进一步证实了普立肽对抗SARS-CoV-2的活性。

[0600] 病毒和细胞

[0601] SARS-CoV-2获自韩国疾病控制和预防中心(KCDC)。Vero细胞从美国典型培养物保藏中心((ATCC CCL-81)获得。

[0602] 通过免疫荧光法进行剂量反应曲线(DRC)分析

[0603] 化合物分别用DMSO和Ampolla(聚氧乙烯蓖麻油:乙醇:水(15:15:70))在20点浓度(20-point concentrations)下用两倍连续稀释法制备。细胞接种后24小时,在细胞中以最高浓度5uM处理化合物。一小时后,将板转移到BSL-3安全设施中进行病毒感染,并以0.0125的感染复数(MOI)加入SARS-CoV-2。板在37℃下培养24小时。用4%多聚甲醛(PFA)固定细胞24hpi用于透化(permeabilization)。处理抗SARS-CoV-2核衣壳(N)1抗体和488缀合的山羊抗兔IgG 2抗体到细胞,并将Hoechst 33342处理以染色细胞用于免疫荧光分析。使用内部软件分析用Operetta(Perkin Elmer)获得的图像以量化细胞数和感染率,并将抗病毒活性标准化为每个测定板中的阳性(空白对照(mock))和阴性(0.5%DMSO)对照。

[0604] DRC通过S形剂量-反应模型,利用以下方程:Y＝Bottom+(Top Bottom)/(1+

[0605] (IC_{50}/X)Hillslope),使用XLfit 4软件或Prism7拟合。从标准化的活性数据集拟合曲线计算IC_{50}值。所有的IC_{50}和CC_{50}值一式两份测量,并且每个测定的质量由Z'因子和百分比变异系数(%CV)控制。

[0606] 剂量-反应曲线如图37A-C所示(三次重复)。蓝色方块表示对病毒感染的抑制(%),红色三角形表示细胞活力(%)。由重复实验计算平均值±SD。在所有实验中未观察到药物的细胞毒效应(圆圈)的浓度下,普立肽能够抑制病毒诱导的致细胞病变效应(方块)。在本实验中,普立肽的IC_{50}为0.0033-0.0039μM,而CC_{50}为0.178-0.431μM,SI为49.95-129.92。

[0607] 例9

[0608] 在使用vero细胞的不同体外测定中进一步证实了普立肽对抗SARS-CoV-2的活性。

[0609] 细胞培养

[0610] Vero E6细胞(ATCC CRL-1586)在Dulbecco改良的Eagle培养基(DMEM;Lonza)中培养,该培养基补充了5%胎牛血清(FCS;EuroClone)、100U/mL链霉素和2mM谷氨酰胺(均为ThermoFisher Scientific)。

[0611] 病毒分离、滴定和测序

[0612] 从鼻咽拭子中分离SARS-CoV-2病毒,该拭子从89岁男性患者收集,该患者给予知情同意,并在样品收集前用倍泰龙和羟氯喹治疗2天。将拭子收集在3mL培养基(Deltaswab VICUM)中以降低粘度,并在-80℃下储存直至使用。Vero E6细胞以1.5x10^6细胞在细胞培养瓶(25cm^2)中过夜,然后用1mL处理样品接种,在37℃和5%CO_2下培养1小时。然后,提供4mL补充了2%FCS的DMEM,并将细胞孵育48小时。收集上清液,在200x g下离心10分钟以去除细胞碎片,并在-80℃下储存。每天评估细胞病变效应,并使用SARS-CoV-2UPE、RdRp和N测定对上清进行病毒RNA提取和特异性RT-qPCR(Corman等人,2020年)。病毒繁殖两代,制备病毒原液,收集Vero E6的上清液。

[0613] 使用Indimag病原体试剂盒(Indical Biosciences)直接从病毒原液中提取病毒RNA,并使用PrimeScript™RT试剂盒(Takara,使用oligo-dT和hexamer引物,根据制造商协议)将病毒RNA转录成cDNA。使用SWIFT扩增子SARS-CoV-2板(Swift Biosciences)进行DNA文库制备。测序准备好的文库,然后加载到Illumina MiSeq平台和300bp双端测序试剂盒上。对序列读数(sequence reads)进行质量过滤,并使用trimmomatic修剪衔接子引物序列。使用cutadapt去除扩增引物序列。然后使用bowtie2工具绘制序列读数相对冠状病毒参考序列(NC_045512.2)的图(Langmead,B.and Salzberg,S,2012)。使用samtools以18x1800x879平均覆盖度进行比对,得到共有基因组序列。基因组序列以登录ID EPI_ISL_510689保藏于GISAID储存库(http://gisaid.org)。

[0614] 化合物

[0615] 在1/5连续稀释下使用浓度范围为100μM至0.0512nM的普立肽,并在1/3稀释下测定浓度范围为100μM至0.5nM的普立肽。

[0616] 抗病毒活性

[0617] 向Vero E6细胞中加入浓度渐增的普立肽以及$10^{1.8}$$TCID_{50}$/mL的SARS-CoV-2,浓度$10^{1.8}$$TCID_{50}$/mL达到50%的细胞病变效应。未暴露的细胞用作感染的阴性对照。为了检测任

何药物相关的细胞毒效应,在存在增加的药物浓度但不存在病毒的情况下,同样培养Vero E6细胞。在感染后3天使用CellTiter-Glo发光法细胞活力测定(Promega)测量病毒或药物的细胞病变或细胞毒效应。在Fluoroskan Ascent FL光度计(ThermoFisher Scientific)中测量发光。

[0618] IC_{50}计算与统计分析

[0619] 将反应曲线调整到非线性拟合回归模型,用具有可变斜率的四参数logistic曲线计算。未暴露于病毒的细胞用作感染的阴性对照并设定为100%活力,并用于标准化数据和计算细胞病变效应的百分比。使用一个样本t检验评估与100%的统计差异。所有分析和图形均使用GraphPad Prism v8.0b软件生成。

[0620] 图38显示了在存在渐增浓度的普立肽的情况下,暴露于固定浓度的SARS-CoV-2的Vero E6细胞的细胞病变效应。使用浓度范围为10μmM至0.5nM的药物,稀释度为1/3。示出了来自一个具有两个重复的代表性实验的可变反应曲线的非线性拟合(方形)。该实验的具体IC_{50}值在图中示出。还示出了在没有病毒的情况下,暴露于渐增浓度的普立肽的Vero E6细胞的细胞毒效应(圆圈)。

[0621] 将恒定浓度的SARS-CoV-2与渐增浓度的普立肽混合并加入Vero E6细胞中。为了控制药物诱导的细胞毒性,还在不存在SARS-CoV-2的情况下用渐增浓度的普立肽培养Vero E6细胞。在没有观察到药物的细胞毒效应的浓度下(灰色圆圈),普立肽能够抑制病毒诱导的细胞病变效应(红色方块)。在具有两个重复的两个实验中,普立肽的平均IC_{50}值和标准偏差为0.06±0.02μM。

[0622] 例10

[0623] 此处的目的是在体内评价普立肽在治疗由小鼠适应的A/H1N1流感病毒感染(A/Puerto Rico/8/34)引起的重症肺炎中的效果,以及对病毒滴度水平的影响。

[0624] 实验装置:为了实现该目的,我们采用了基于给药高剂量PR8流感病毒(2x105pfu)的病毒发病机制的体内模型,所述PR8流感病毒在肺中产生严重感染。然后我们评价了普立肽对小鼠中的严重流感病毒感染的治疗效果。9周的雌性小鼠通过腹膜内注射氯胺酮-赛拉嗪溶液(ketamine-xylazine solution)来麻醉,并且通过将病毒溶液PBS以每鼻孔20ul鼻内给药来进行感染。

[0625] 接受治疗的小鼠皮下注射0.3mg/kg或0.15mg/kg的普立肽。随后,监测存活情况和体重减轻,直到第3天。在治疗期间没有记录到死亡小鼠或减重超过起始体重30%的小鼠。

[0626] 呼吸道流感感染的控制是通过支气管肺泡灌洗液(BALF)炎症的增强来实现的。图43显示了用或不用普立肽治疗的受感染小鼠的BALF中的炎症图形。在主要的促炎细胞因子中,普立肽可显著降低IL-6、CCL2、IL-1α、IFN-γ和TNF-α的水平。只接受一半剂量药物的小鼠受保护较少,表现出中间表型(intermediated phenotype)。

[0627] 还评估了肺中的病毒滴度。如图44所示,在0.3mg/kg和0.15mg/kg时,普立肽可降低肺部病毒滴度。

[0628] BALF细胞组合物被定义为肺免疫应答病毒感染的标志物。在流感感染的小鼠中评估与炎性细胞因子水平相关的浸润细胞的定量测量。用普立肽治疗没有减少BALF的总细胞组合物($CD45^{+}x\ 10^{6}$)。如图45所示,我们还发现肺泡巨噬细胞(AM)浸润增加,这表明AM有助于病毒清除。

[0629] 总之,这些结果证实了在流感感染的小鼠中连续三次给药(总剂量为0.9mg/kg)普立肽可积极地减少炎症,如通过治疗减少早期促炎细胞因子所显示的。此外,我们检测到肺泡巨噬细胞绝对数量的增加,这可能表明AM在病毒传播和保护中起着关键作用。我们还观察到在受高剂量普立肽治疗的小鼠的肺中减少的病毒滴度。

[0630] 例11

[0631] 在本实施例中,研究了在细胞培养物中普立肽对西尼罗病毒传播的抗病毒活性。

[0632] (a)人肝癌细胞(Huh7)和非洲绿猴肾细胞(Vero-E6)中的重组病毒WNV-GFP(谱系2;分子克隆WN956)。

[0633] 为了确定普立肽对WNV-GFP的抗病毒能力,在存在浓度增加的普立肽(从2.3pM或2.5pg/ml开始,以4.5μM或5μg/mL为最高浓度)的情况下,用感染性病毒原液稀释液(infectious virus stock dilution)接种目标细胞系Vero-E6和Huh7。在病毒已经扩散到载体处理的培养物中的大部分靶细胞后48小时评估感染效率。

[0634] 通过自动荧光显微镜在绿色通道中评估相对感染效率,并且通过在蓝色通道中用DAPI核染色评估总细胞生物量/孔,作为化合物有效剂量以及总化合物细胞毒性的初步评估。

[0635] 如图46所示,在VeroE6细胞中,WNV-GFP感染效率在5nM左右迅速降低,在36nm及以上达到背景荧光水平。细胞数保持不变直到36nM,但在更高的浓度下显著降低(180nM;$p<0.05$),表明在36nM以上的浓度下,普立肽干扰细胞复制能力。评估的普立肽在VeroE6细胞中的EC50值为4.9nM,EC90值为9.5nM。基于细胞生物量,CC50值为2330nM。因此,以VeroE6细胞中的CC50/EC50比表示的治疗指数为475。

[0636] 在Huh7细胞中,如图47所示,感染效率呈剂量依赖性降低,EC50和EC90值分别为0.665nM和3.86nM。这种减少与孔中细胞生物量的平行损失相关,在7.2nm处具有统计显著性($p<0.05$),CC50值为14.7,治疗指数22。

[0637] 以上数据表明,在Vero-E6和Huh-7细胞的细胞培养物感染模型中,普立肽均会干扰WNV-GFP繁殖。在一实施例中,在不存在可测量的对细胞活力的干扰的情况下,可以在Huh-7细胞中1.5nM($p<0.05$)和Vero-E6细胞中7.2nM($p<0.05$)下观察到抗病毒活性。

[0638] (b)Huh7人肝癌细胞和非洲绿猴肾细胞(Vero-E6)中具有野生型WNV-NY99基因组的重组病毒(谱系1;分子克隆NY99)。

[0639] 在该实施例中,使用病毒RNA载量作为感染效率的读数,评估了普立肽对WNV-NY99繁殖的影响。用基于NY99 WNV株的重组病毒接种Vero-E6或Huh-7细胞(MOI 0.01)。感染是在存在在WNV-GFP模型中显示生物活性(45、15、5、1.5nM;见上文)的载体或一定剂量范围的普立肽的情况下进行的。将接种的细胞孵育48小时,在该时间处理上清液的样品,以通过细胞外感染性滴定来确定感染效率。此外,从对照组细胞和经普立肽处理的细胞中提取总RNA,以确定病毒RNA载量并独立地评估总病毒感染效率。

[0640] 如图48所示,细胞外感染性滴度显示,普立肽的存在强烈干扰了WNV的繁殖,在VeroE6和Huh-7细胞中在45nm处减少>3个数量级。这种现象在两种细胞系中都是剂量依赖性的。

[0641] 通过RT-qPCR测定对照组细胞和普立肽处理的细胞中的细胞内WNV RNA载量。值得注意地,如图49所示,从用45nM普立肽处理的Huh-7细胞中不能回收RNA。然而,在两个细胞

系的其余样品组中测定病毒RNA载量。与细胞外感染性滴度显示的趋势一致，Vero-E6细胞在15nM和45nM处的病毒RNA载量以剂量依赖性方式显著降低，而在5nM和1.5nM处的病毒载量与对照组没有区别(图49)。类似地，Huh-7在15nM处病毒载量显著降低，其幅度以剂量依赖性方式下降。

[0642] WNV感染繁殖效率数据表明，在高于5nM的剂量下，普立肽在Vero-E6和Huh-7细胞中都干扰病毒复制，尽管在Huh-7细胞中在低浓度下可以观察到一定程度的干扰。基于用WNV-GFP获得的数据，使用功能性(感染性)以及分子(RT-qPCR)方法测量总体繁殖效率的结果证实，在预期浓度范围内，普立肽降低病毒繁殖效率。

[0643] 总之，在两种感染(WNV-GFP和WNV/NY99)模型中以及在Vero-E6和Huh-7细胞中，用增加剂量的普立肽补充细胞培养基导致WNV繁殖效率的强烈降低。

[0644] (c)方法

[0645] 化合物制备：将预称重的固体稀释至最终的1mg/ml的二甲基亚砜(DMSO)溶液，并在-20℃下等分，直至进一步使用。细胞培养：将亚融合Vero-E6细胞和Huh-7细胞培养物保持在完全培养基[(DMEM，补充10mM HEPES、1x非必需氨基酸(Gibco)、100U/mL青霉素链霉素(Gibco)和10％胎牛血清(56℃下热灭活30分钟)]中。

[0646] 病毒：WNV(NY99)和WNV-GFP重组病毒如前所述从克隆的cDNA中拯救(rescue)出来。如前文所述，通过Vero-E6细胞上的空斑测定(plaque assay)来测定原液感染性滴度(Stock infectivity titer)。

[0647] 第一部分：WNV-GFP模型

[0648] 感染实验：将细胞接种到96孔板上(2×104细胞/孔)。第二天，在含2％FCS的完全培养基中制备5倍连续稀释液，以达到指示的最终浓度。将WNV-GFP原液(WNV-GFP stock)在含有2％FCS的完全培养基中稀释，以获得所需的感染复数(MOI 0.01)。将化合物和病毒稀释液1:1混合并添加到靶细胞上。细胞在37℃、5％ CO2和95％湿度下孵育48小时。在室温下，加入5X甲醛溶液固定细胞30分钟，达到4％的最终浓度。按照制造商的建议，用PBS洗涤细胞并用DAPI(4′,6-二脒基-2-苯基吲哚)染色。通过在自动显微镜装置(Tecan Spark Cyto)中的图像分析来评估相对感染效率。未感染的细胞和载体处理的对照组包括在每个板中。

[0649] 第二部分：WNV(NY99)模型

[0650] 使用1.2×105细胞/孔将细胞接种到24孔板上。第二天，用WNV/NY99原液接种细胞以获得0.01的感染复数(MOI 0.01)和指示的在1ml最终体积中的普立肽浓度。培养物在37℃下保持48小时，收集上清液并在-80℃下保存。通过将TrizolTM试剂直接加入细胞中并遵循制造商的说明书，从细胞收集总RNA。

[0651] 感染性滴定：使用终点稀释和免疫荧光显微镜，使用抗黄病毒E蛋白的单克隆抗体(4G2;ATCC®HB-112™)测定感染性滴度。简言之，Huh-7细胞用96孔形式的上清稀释液接种。感染后48小时，在室温下用PBS中的4％的甲醛溶液将细胞固定30分钟，用PBS洗涤两次，并用结合缓冲液(0.3％Triton X100，PBS中的3％的BSA)孵育1小时。一级抗体(primary antibody)在结合缓冲液中稀释，并与细胞一起孵育1小时，之后用PBS洗涤细胞，随后用与Alexa488(ThermoFisher)缀合的山羊抗小鼠的1:500稀释液孵育。用DAPI(4′,6-二脒基-2-苯基吲哚;ThermoFisher)作为细胞核染色剂以评估细胞数目。用PBS洗涤细胞，在荧光显微

镜下测定感染灶数(infection foci number)。

[0652] 反转录和qPCR:使用NZYSpeedy One-Step(一步法)qPCR probe master mix,使用制造商的建议和引物(primer),对60ng的总细胞RNA进行RT-qPCR。

[0653] 统计分析:用Excel计算平均值和SEM。使用单向ANOVA和使用IBM-spss的Dunnet事后分析(2尾(2-tails);α=0.05)比较平均值。

[0654] 例12 3阶段,多中心、随机、对照试验,以确定需要住院以治疗中度COVID 19感染的成人患者中两种剂量水平的普立肽相对对照组的效力和安全性

[0655] 指示:中度COVID 19感染住院患者的治疗

[0656] 目标:

[0657] 主要目标:

[0658] •比较1.5或2.5mg普立肽相对对照组在第8天(±1)实现完全恢复的患者百分比,完全恢复定义为(i)满足在世界卫生组织(WHO)临床进展量表中的以下11类的0至2类,(ii)出院时Barthel指数>90/100,(iii)到第31天没有COVID 19感染

[0659] 0:未感染,未检测到病毒RNA

[0660] 1:无症状,检测到病毒RNA

[0661] 2:有症状,自主的

[0662] 3:有症状,需要帮助的

[0663] 4:住院,无氧气治疗(如果住院仅为隔离,记录为非卧床患者状态)

[0664] 5:住院,用口罩或鼻塞吸氧

[0665] 6:住院,通过无创通气(NIV)或高流量供氧

[0666] 7:插管和机械通气,$pO_2/FIO_2 \geq 150$或$SpO_2/FIO_2 \geq 200$

[0667] 8:机械通气$pO_2/FIO_2 < 150$($SpO_2/FIO_2 < 200$)或血管加压

[0668] 9:机械通气$pO_2/FIO_2 < 150$和血管加压、透析或体外膜肺氧合(ECMO)

[0669] 10:死亡本研究的主要次要目标是在以下方面比较1.5和2.5mg普立肽与对照组:

[0670] •完成恢复的时间(以天计),定义为第一天,从第1天到后续的第31天,患者(i)满足上述的WHO临床进展量表11类中的第0至2类,(ii)出院时Barthel指数>90/100,

[0671] (iii)没有因COVID 19感染而再次入院

[0672] •第8天(±1)的临床状况(按11类WHO临床进展量表评定)

[0673] 本研究的其他次要目标是:

[0674] •安全性和耐受性,基于治疗期间出现的不良事件(TEAE)、等级≥3TEAE、严重不良事件(SAE)和严重不良反应(SARs)

[0675] •在主要终点时两普立肽组明显优于对照组的情况下,比较两普立肽组(1.5mg比2.5mg)之间的疗效和安全性/耐受性

[0676] •比较在第8天(±1)天达到完全恢复的患者百分比,如上文所定义,合并的普立肽组与对照组相比

[0677] •每个研究组因COVID 19感染需要重新入院的患者百分比

[0678] •在第4天、第15天和第31天,每个研究组的临床状况(通过11类WHO临床进展量表评估)

[0679] •每个研究组的氧疗持续时间(以天计)

[0680] • 在第4天、第8天、第15天和第31天每个研究组中需要高流量氧气的患者的百分比

[0681] • 第4天、第8天、第15天和第31天每个研究组中需要无创机械通气的患者百分比

[0682] • 第4天、第8天、第15天和第31天每个研究组中需要有创机械通气或ECMO的患者百分比

[0683] • 在第4天、第8天、第15天和第31天需要重症监护病房(ICU)入院的各研究组患者的百分比

[0684] • 每个研究组在ICU的住院时间

[0685] • 在第4、8、15和31天接受后续抗病毒治疗或免疫调节药物的患者百分比

[0686] • 各研究组医院内感染患者的百分比

[0687] • 第4天、第8天、第15天和第31天每个研究组的死亡率

[0688] • 从给药研究药物前第1天到第8天,每个研究组的严重急性呼吸综合征冠状病毒2(SARSCoV2)病毒载量的变化(通过定量聚合酶链式反应(qPCR)从口鼻咽分泌物样本测量)

[0689] • 每个研究组中在第8天具有不可检测的SARSCoV2病毒载量的患者的百分比(通过qPCR从口鼻咽分泌物样本测量)

[0690] 从基线到第2、3、4、8、15和31天,每个研究组的炎性生物标志物(C反应蛋白[CRP]、乳酸脱氢酶[LDH]、铁蛋白、白细胞介素[IL]-6、IL-1β、IL-10和肿瘤坏死因子α[TNFα])的变化

[0691] 方法/研究设计:

[0692] 这是一项多中心、开放标签、对照的三阶段研究,需要住院和补充氧气以治疗中度COVID19感染的成年人将以1:1:1:1随机分为:

[0693] • 1.5mg普立肽组:患者将在第1天至第3天静脉(IV)接受1.5mg/天的普立肽以及6.6mg/天的地塞米松,然后从第4天至第10天口服(PO)/IV地塞米松6mg/天(取决于医生根据患者临床状况和进展的判断)。

[0694] • 2.5mg普立肽组:患者将在第1至3天静脉接受2.5mg/天普立肽以及6.6mg/天地塞米松,然后从第4天到第10天(PO)/IV接受6mg/天的地塞米松(取决于医生根据患者临床状况和进展的判断)。

[0695] • 对照组:患者将在第1至3天静脉接受地塞米松6.6mg/天,然后从第4天到第10天PO/IV接受地塞米松6mg/天(取决于医生根据患者临床状况和进展的判断)。此外,根据当地治疗指南,患者可在第1天静脉接受瑞德西韦200mg,随后在第2至第5天静脉接受100mg/天。

[0696] 随机化将分为两个因素:

[0697] • 如果患者被随机分配到对照组(是与否),则有意使用瑞德西韦;以及

[0698] • 症严重度指标13,14(0-1vs.>1)

[0699] 从第1天开始治疗起,患者将在医院被跟踪至少4天,然后到第31天或到第31天发生消除/稳定的TEAE。在第8天之前出院的患者将在第8天和第31天返回门诊诊所进行评估(附录5)。

[0700] 一个独立的数据监察委员会(IDMC)将监督研究的实施(安全性和主要终点),包括根据试验要求对汇总的安全数据进行分析。

[0701] 纳入和排除的诊断和主要标准:

[0702] 纳入标准如下：

[0703] 1.在开始任何研究具体方法和研究治疗之前获得的签字知情同意书

[0704] 2.实验室确认的SARS-CoV-2感染(由当地实验室通过定性聚合酶链式反应(PCR)从在第1天的研究治疗前不超过48小时收集的口腔/鼻咽分泌物(或其他呼吸样本)

[0705] 确定)

[0706] 3.入院治疗中度SARS-CoV-2(COVID 19)感染,由以下标准定义：

[0707] •SARS-CoV-2PCR检测阳性

[0708] •伴有COVID 19的中度疾病症状,包括任何轻微疾病或用力呼吸急促的症状

[0709] •临床症状提示COVID 19的中度疾病,如呼吸频率每分钟≥20次但<30次,在海平面条件下吸入室内空气SpO2>93％但<95％,心率≥90但<125次/分钟,需要补充氧气

[0710] •无严重疾病的临床症状,包括休息时呼吸急促或呼吸窘迫

[0711] 4.不迟于第1天开始研究治疗前6天出现COVID 19症状

[0712] 5.年龄≥18岁的男性或女性

[0713] 6.充足的骨髓、肝脏、肾脏和代谢功能,由当地实验室进行的以下测试确定：

[0714] •中性粒细胞绝对计数≥1000/mm3(1.0x 109/L)

[0715] •淋巴细胞计数≥500/mm3(0.5x 109/L)

[0716] •血小板计数≥10万/mm3(100x 109/L)

[0717] •血红蛋白>9.0g/dL

[0718] •丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)≤3x正常上限(ULN)

[0719] •血清胆红素≤1x ULN(≤3x ULN,如果有吉尔伯氏综合征)

[0720] •计算的肌酐清除率≥30mL/min(Cockcroft和Gault公式)

[0721] •肌酸磷酸激酶≤2.5x ULN

[0722] 7.同意在第31天之前不参加另一项介入临床试验

[0723] 8.具有生殖能力的女性必须在研究登记时接受当地实验室的阴性血清妊娠测试,并且必须是非哺乳期的9.有生育潜力的伴侣的女性和男性在接受研究治疗时和最后一次服用普立肽后3个月内必须使用有效的避孕措施。

[0724] 以下是排除标准：

[0725] 1.由于COVID 19外的任何原因,基线前(即前一个月)全身健康状况受损、需要日常生活活动的帮助或慢性氧气治疗的受试者

[0726] 2.参与另一项治疗COVID 19感染的临床试验,或先前参加临床试验并正在跟进的患者,或先前接种COVID 19疫苗的患者

[0727] 3.随机化时呼吸衰竭的证据,基于至少需要以下一项的资源利用:气管插管和机械通气、高流量鼻导管输送氧气、无创正压通气、ECMO或呼吸衰竭的临床诊断(即,临床需要1种前述治疗,但在资源限制的情况下不能进行前述治疗)

[0728] 4.临床上需要治疗SARS-CoV-2(COVID 19)的患者,其基线疾病严重程度被评为严重(如果通过标准RT PCR测定或同等测试呈阳性,则症状提示COVID 19严重疾病,包括任何中度疾病症状或休息时呼吸短促,或呼吸窘迫,临床症状表明患有COVID 19的严重系统性疾病,如呼吸频率≥30/分钟,心率≥125/分钟,在海平面条件下吸入室内空气SpO2≤93％,或PaO2/FiO2<300)

[0729] 5.在登记前4周内接受抗病毒药物、IL 6受体抑制剂、皮质类固醇或免疫调节药物治疗COVID 19感染的患者

[0730] 6.研究登记前4周内的活疫苗接种史;受试者不得在登记前4周内或研究期间的任何时间接种活疫苗、减毒流感疫苗

[0731] 7.在登记前8周或研究期间接受氯喹或其衍生物治疗的患者

[0732] 8.接受强细胞色素P450 3A4(CYP3A4)抑制剂或诱导剂的治疗

[0733] 9.需要治疗的病毒性疾病(非COVID 19),但已经接受治疗并得到充分控制(检测不到)的人类免疫缺陷病毒感染的患者除外

[0734] 10.根据筛查时的三次心电图(ECG),使用Fridericia公式校正的QT间期延长男性>450msec,女性>470msec

[0735] 11.任何类型的等级≥2的预先存在的神经病变

[0736] 12.对活性成分或任何赋形剂(甘露醇、聚乙二醇甘油羟基硬脂酸酯和乙醇)过敏。

[0737] 13.怀孕的女性(筛查时所有有生育潜力的女性都需要血清妊娠试验阴性)或母乳喂养

[0738] 14.有生育潜力的伴侣的女性和男性(没有手术不孕或绝经12个月以上被定义为闭经的女性),她们没有使用至少1种协议规定的避孕方法

[0739] 15.研究者认为会危及患者安全或可能影响患者依从性或研究中的安全性/有效性观察结果的任何其他具有临床意义的医学状况或实验室异常。

[0740] 试验产品、剂量和给药方式:

[0741] 注射用普立肽装在含有2mg普立肽粉末的小瓶中。对于给药,通过添加4mL用于普立肽的溶剂来重构小瓶内容物,以获得含有0.5mg/mL普立肽与甘露醇、聚乙二醇甘油羟基硬脂酸酯和乙醇赋形剂的浅黄色溶液。将所需量的普立肽重构溶液加入到含有0.9%氯化钠注射液或5%葡萄糖注射液的IV袋中,并在60分钟内以IV注射形式给药。

[0742] 为了防止与普立肽相关的输液反应,所有患者必须在开始普立肽注射前20至30分钟接受以下药物:

[0743] • 昂丹司琼8mg静脉注射(或等同药物;注:在QT评估[第1至3天]期间,昂丹司琼是校正QT间期[QTc]子研究中患者的禁用药物)

[0744] • 盐酸苯海拉明25mg IV(或等同药物)

[0745] • 雷尼替丁50mg IV(或等同药物)

[0746] • 地塞米松6.6mg静脉注射

[0747] 此外,在第4天和第5天,用普立肽治疗的患者必须每天两次PO接受昂丹司琼4mg。

[0748] 参考治疗、剂量、剂型和给药方式:

[0749] 地塞米松:普立肽和对照组的患者均在第1天至第3天IV接受6.6mg/天的地塞米松,然后从第4天至第10天PO/IV给药6mg/天的地塞米松,直至第10天(取决于医生根据患者临床状况和进展的判断)。

[0750] 瑞德西韦:根据当地治疗指南,随机分配到对照组的患者可在第1天静脉注射瑞德西韦200mg,然后在第2至第5天静脉注射100mg/天。

[0751] 最佳支持性护理(BSC):符合国家卫生研究所COVID 19治疗指南(www.covid19treatmentguidelines.nih.gov)或其他国家指南的BSC将提供给所有研究参与者。

[0752] 实施例13.开放标签、随机II阶段研究,以评价在从急诊部出院的患有COVID-19的成人患者中用普立肽的单线治疗(single-line treatment)的安全性和病毒载量的减少

[0753] 指示:轻度COVID 19感染的治疗。

[0754] 如果患者出现急性临床感染(在前5天出现症状),患者将被纳入本研究,其中通过可以是阳性抗原测试或阳性PCR测试的诊断方法来诊断COVID-19感染。

[0755] 这项研究包括两个部分:

[0756] 组A)单剂量7.5mg普立肽,缓慢注射90分钟(±10分钟),并根据参与中心的常规临床实践进行对症治疗。

[0757] 组B)根据参与中心的常规临床实践进行对症治疗。

[0758] 所有患者在注入普立肽前20-30分钟接受以下预防性药物:

[0759] -盐酸苯海拉明25mg i.v,

[0760] -雷尼替丁50mg i.v,

[0761] -地塞米松6.6mg静脉注射,

[0762] -昂丹司琼8mg静脉注射,缓慢注射15分钟。

[0763] 昂丹司琼每12小时口服4mg,持续3天,以减轻药物引起的恶心和呕吐。如果在早晨给药普立肽,患者在下午接受第一剂量的昂丹司琼。

[0764] 该研究将显示,给予患者单剂量的普立肽导致病毒载量的减少。这可以表示为在给药后第6天,复制周期阈值(Ct)大于30(Ct>30)。例如,这项研究将表明,当给药要从急诊科出院的COVID-19感染患者单剂量的普立肽时,在出院后第6天表现出病毒载量的减少,表示为复制周期阈值(Ct)值大于30(Ct>30)。这可以表示为相对于基线的SARS-CoV-2病毒载量的减少。这可以表示为给药后需要住院治疗的患者百分比的降低。这可以表示为在给药后需要有创机械通气和/或进入ICU的患者百分比的降低。这这可以表现为出现与持续性疾病有关的后遗症的患者减少。这可以表示为被选择为不良预后标准(包括例如淋巴细胞减少症、LDH、D-二聚体或PCR)的分析参数正常化的患者百分比的增加。这可以表示为临床标准正常化(包括例如:头痛、发烧、咳嗽、疲劳、呼吸困难(气短)、关节肌痛或腹泻发症状消失)的患者百分比的增加。

[0765] 这项研究将表明,使用单剂量普立肽治疗可以消除患者第6天的SARS-CoV-2病毒载量,根据若干研究表明,这会导致临床改善,从而减少并发症,即减少住院、ICU和死亡。除了在短期内改善患者的预后外,病毒载量的降低被认为是其他两个目标的关键。首先,降低无症状或症状不明显的高病毒载量(TC<25)患者,即所谓的超级传染源的传染性。其次,减少病毒载量对于避免长期并发症(称为持续性COVID或长COVID)具有决定性意义。

[0766] 验证的普立肽群体药代动力学模型(Nalda-Molina R等,Population pharmacokinetics meta-analysis of plitidepsin(Aplidin)in cancer subjects.Cancer Chemother Pharmacol.2009Jun;64(1):97-108.Doi:10.1007/s00280-008-0841-4)用于确认总血浆浓度将达到估计的肺目标浓度。图53显示了结果,并且可以看出,可以获得高于IC50和IC90的血浆浓度超过6天。

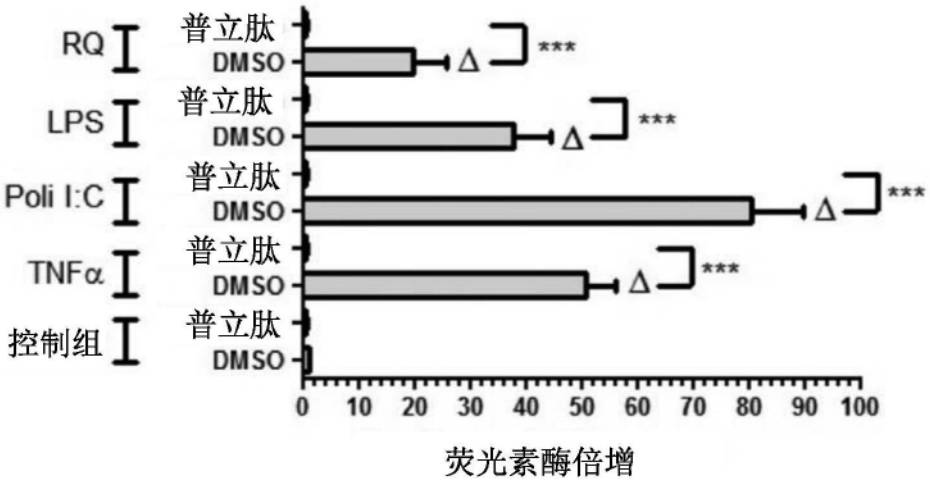

RQ
LPS
Poli I:C
TNFα
控制组
普立肽
DMSO
Δ
***
0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
荧光素酶倍增

图1a

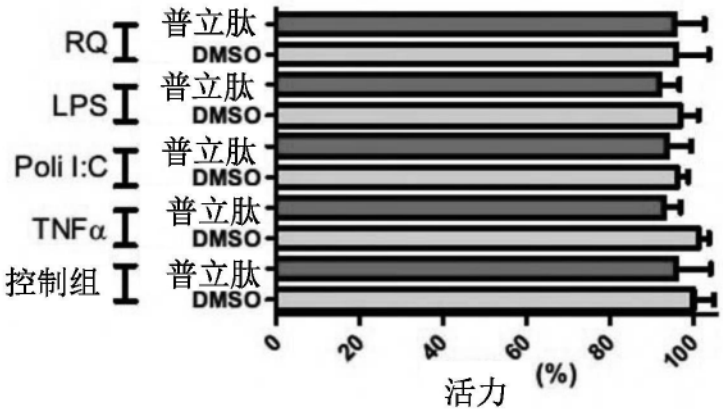

RQ
LPS
Poli I:C
TNFα
控制组
普立肽
DMSO
0 20 40 60 80 100
(%)
活力

图1b

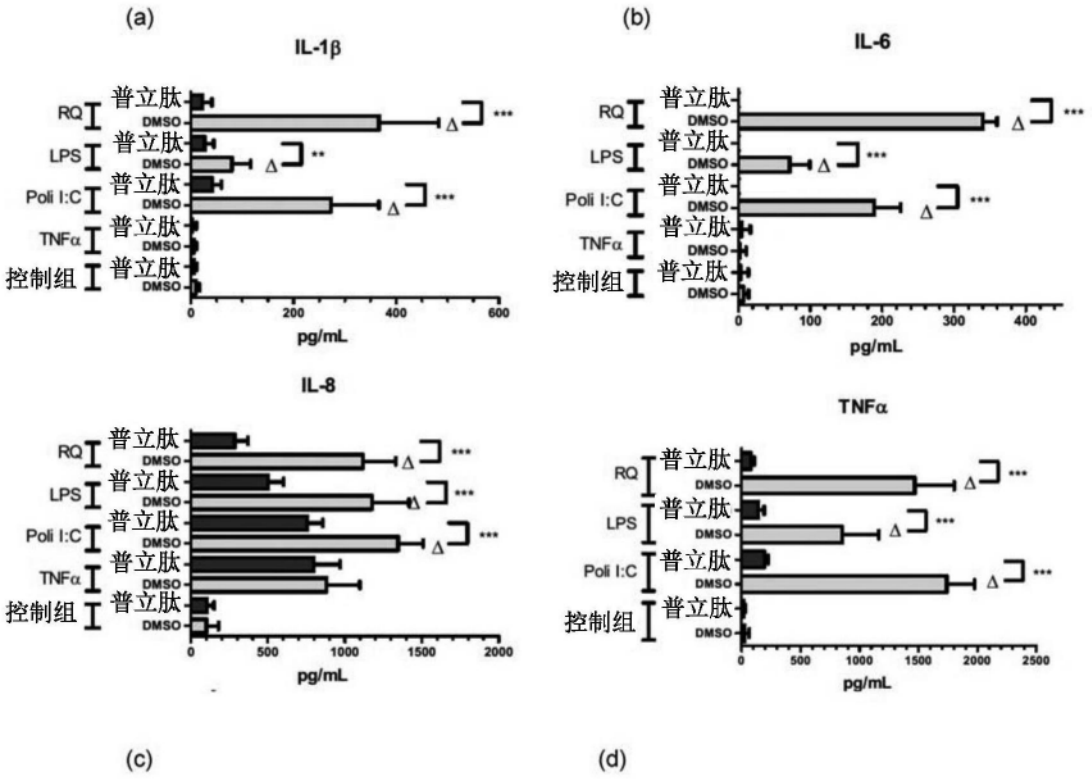

(a)
IL-1β
RQ
LPS
Poli I:C
TNFα
控制组
普立肽
DMSO
0
200
400
600
pg/mL
(b)
IL-6
0
100
200
300
400
pg/mL
IL-8
0
500
1000
1500
2000
pg/mL
(c)
TNFα
0
500
1000
1500
2000
2500
pg/mL
(d)

图2

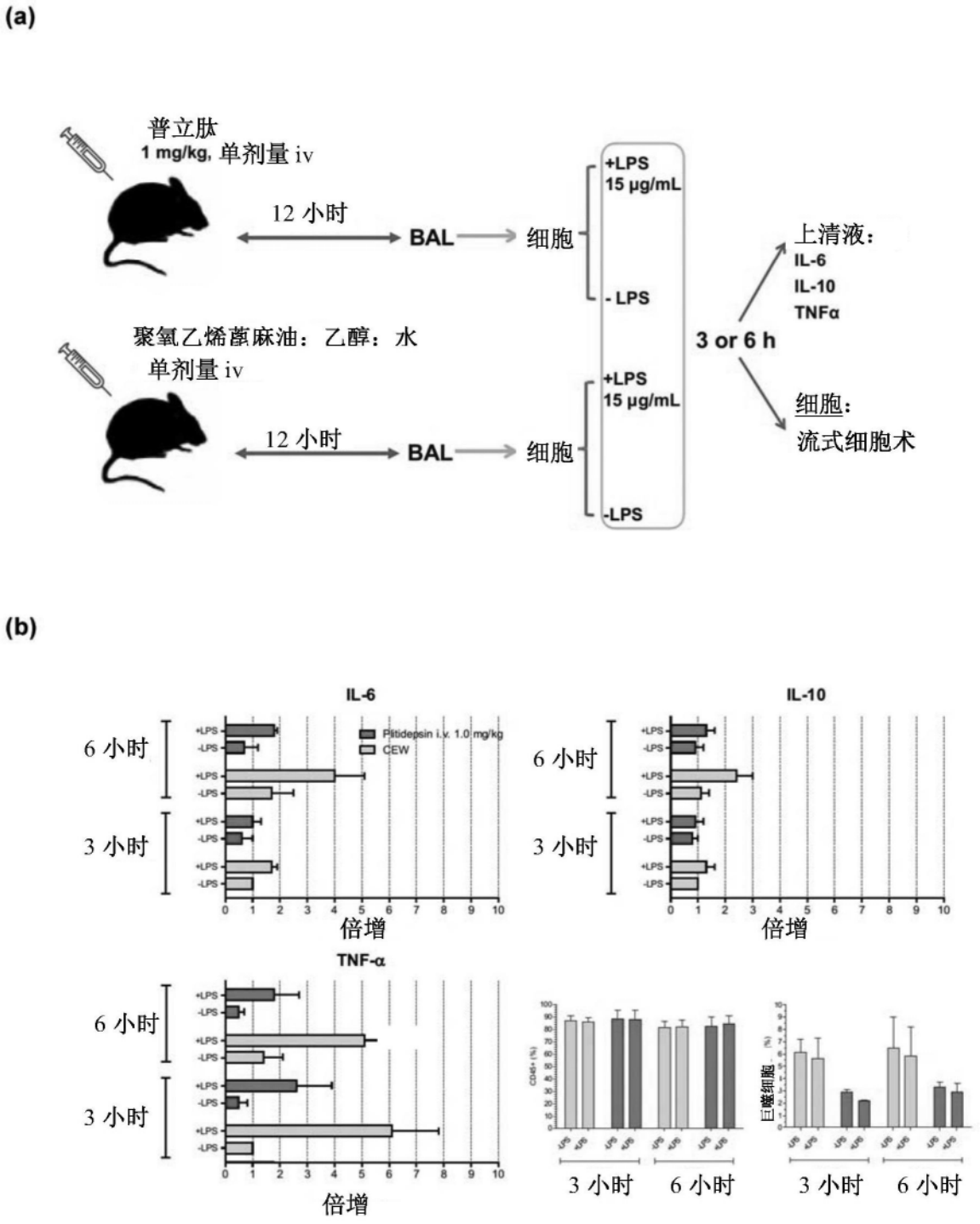

(a)
普立肽
1 mg/kg, 单剂量 iv
12 小时
BAL
细胞
+LPS
15 μg/mL
- LPS
聚氧乙烯蓖麻油：乙醇：水
单剂量 iv
12 小时
BAL
细胞
+LPS
15 μg/mL
-LPS
3 or 6 h
上清液：
IL-6
IL-10
TNFα
细胞：
流式细胞术
(b)
IL-6
Pitidepsin i.v. 1.0 mg/kg
CEW
6 小时
3 小时
+LPS
-LPS
倍增
IL-10
TNF-α
CD45+ (%)
巨噬细胞 (%)
3 小时
6 小时

图3

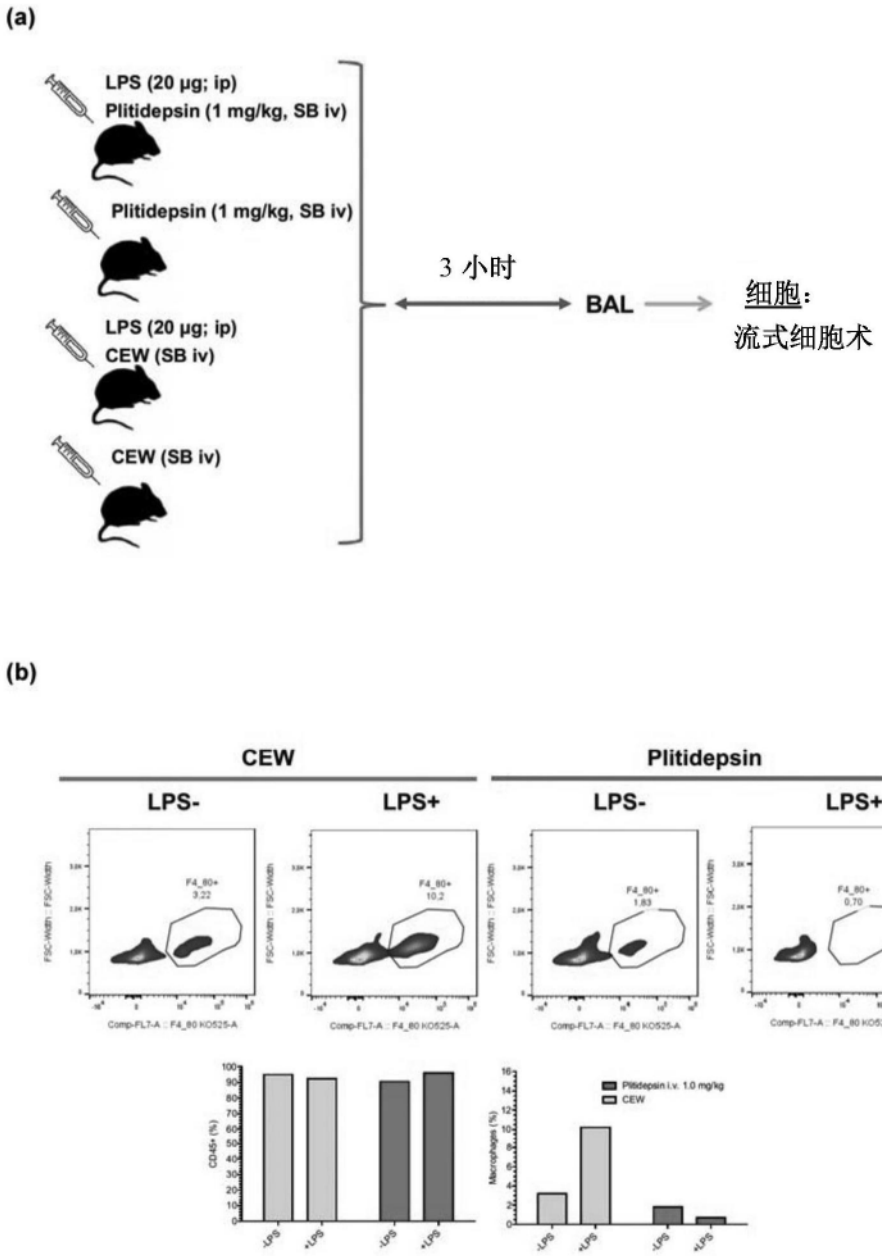

(a)
LPS (20 μg; ip)
Plitidepsin (1 mg/kg, SB iv)
Plitidepsin (1 mg/kg, SB iv)
LPS (20 μg; ip)
CEW (SB iv)
CEW (SB iv)
3 小时
BAL
细胞:
流式细胞术
(b)
CEW
Plitidepsin
LPS-
LPS+
LPS-
LPS+
F4_80+
3.22
F4_80+
10.2
F4_80+
1.83
F4_80+
0.70
Plitidepsin i.v. 1.0 mg/kg
CEW

图4

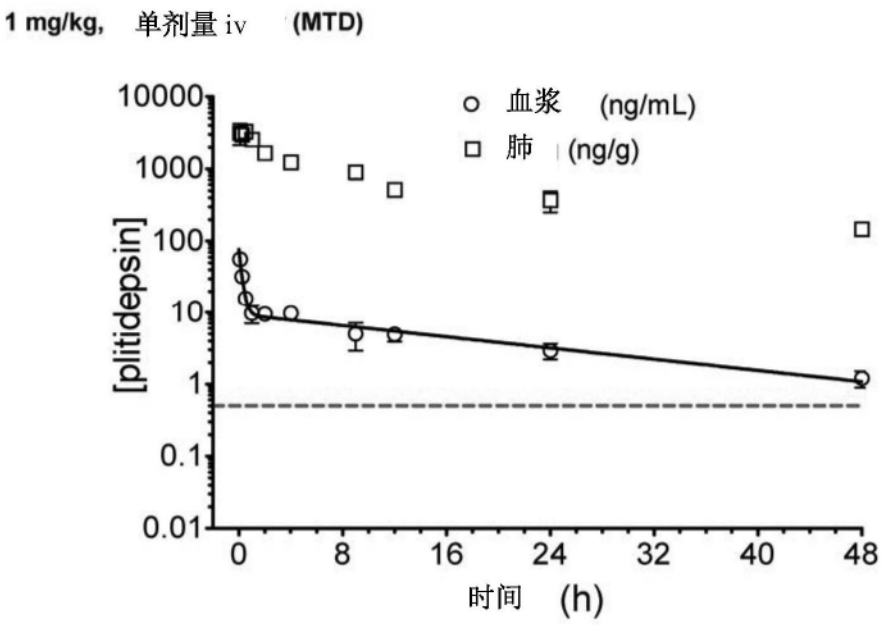

1 mg/kg, 单剂量 iv (MTD)
血浆 (ng/mL)
肺 (ng/g)
[plitidepsin]
10000
1000
100
10
1
0.1
0.01
0
8
16
24
32
40
48
时间 (h)

图5a

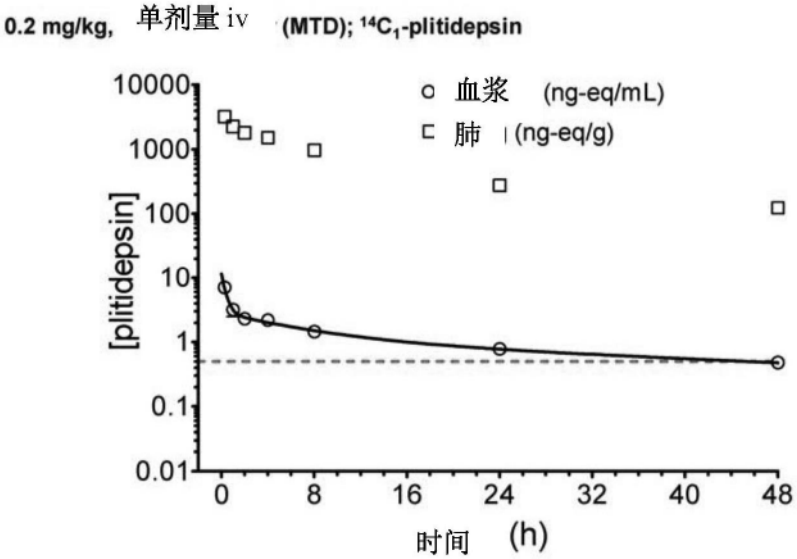

0.2 mg/kg, 单剂量 iv (MTD); $^{14}C_1$-plitidepsin
血浆 (ng-eq/mL)
肺 (ng-eq/g)
[plitidepsin]
10000
1000
100
10
1
0.1
0.01
0
8
16
24
32
40
48
时间 (h)

图5b

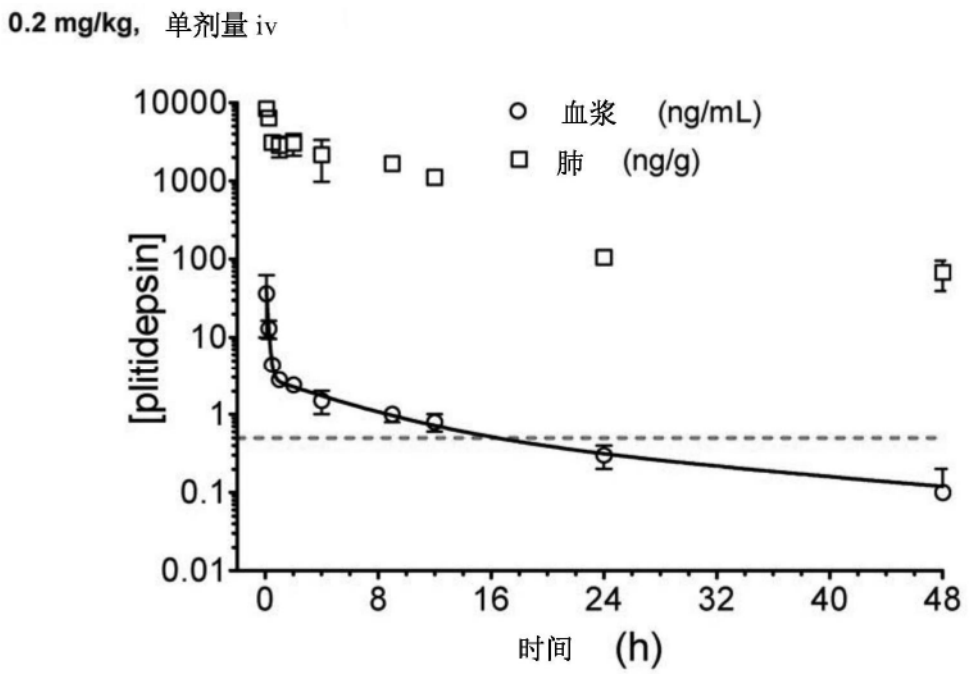

0.2 mg/kg, 单剂量 iv
血浆 (ng/mL)
肺 (ng/g)
[plitidepsin]
10000
1000
100
10
1
0.1
0.01
0
8
16
24
32
40
48
时间 (h)

图5c

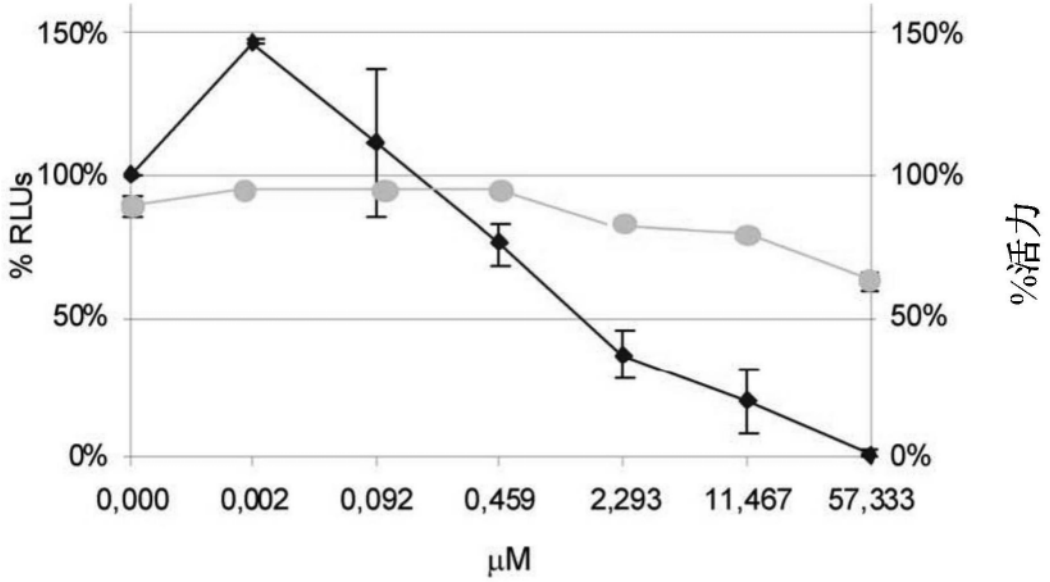

150%
100%
50%
0%
% RLUs
%活力
0,000
0,002
0,092
0,459
2,293
11,467
57,333
μM

图6A

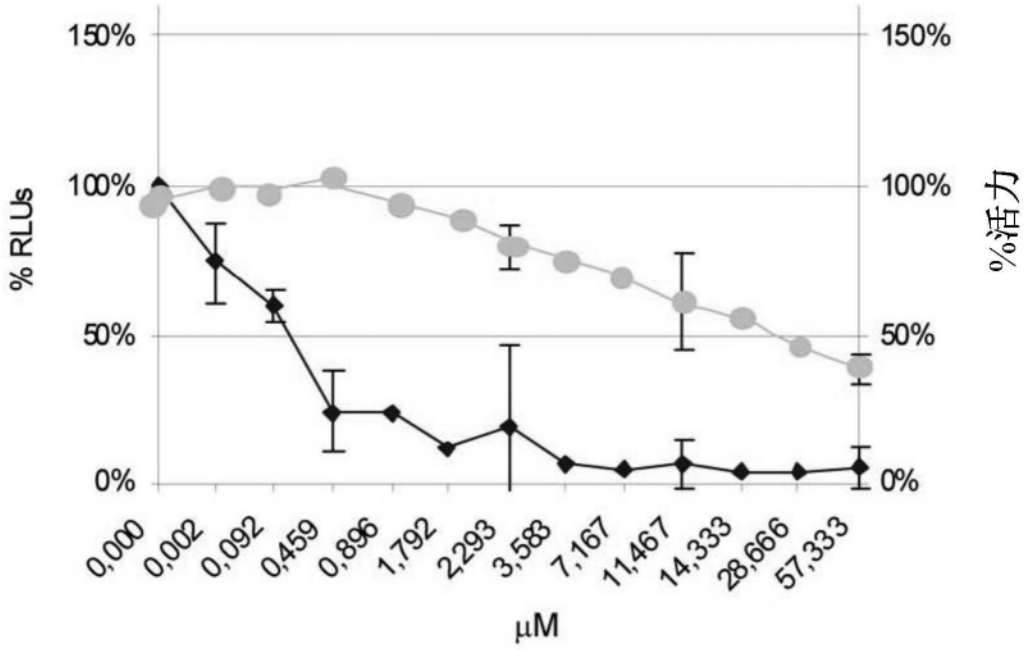

150%
100%
50%
0%
% RLUs
%活力
0,000
0,002
0,092
0,459
0,896
1,792
2293
3,583
7,167
11,467
14,333
28,666
57,333
μM

图6B

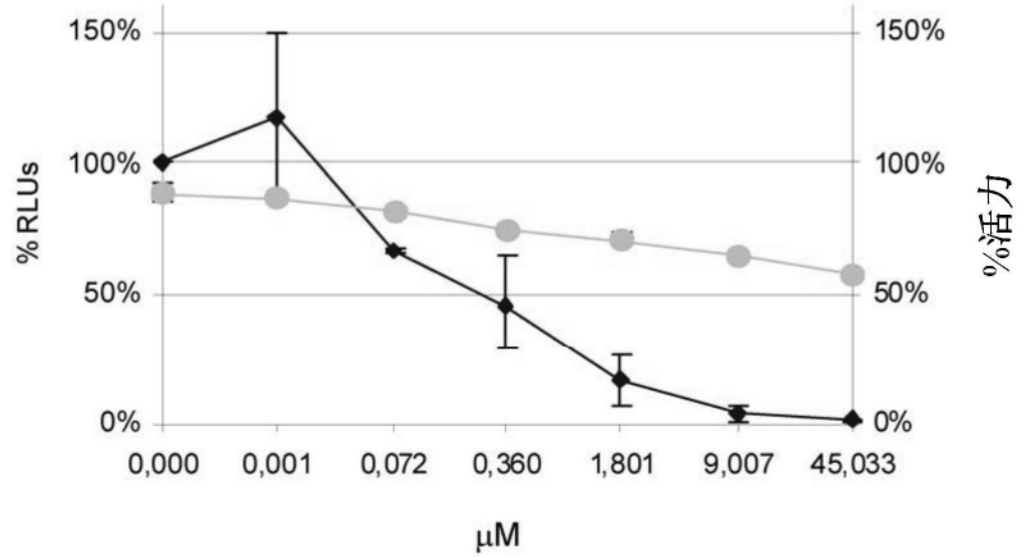

150%
100%
50%
0%
% RLUs
%活力
0,000
0,001
0,072
0,360
1,801
9,007
45,033
μM

图7A

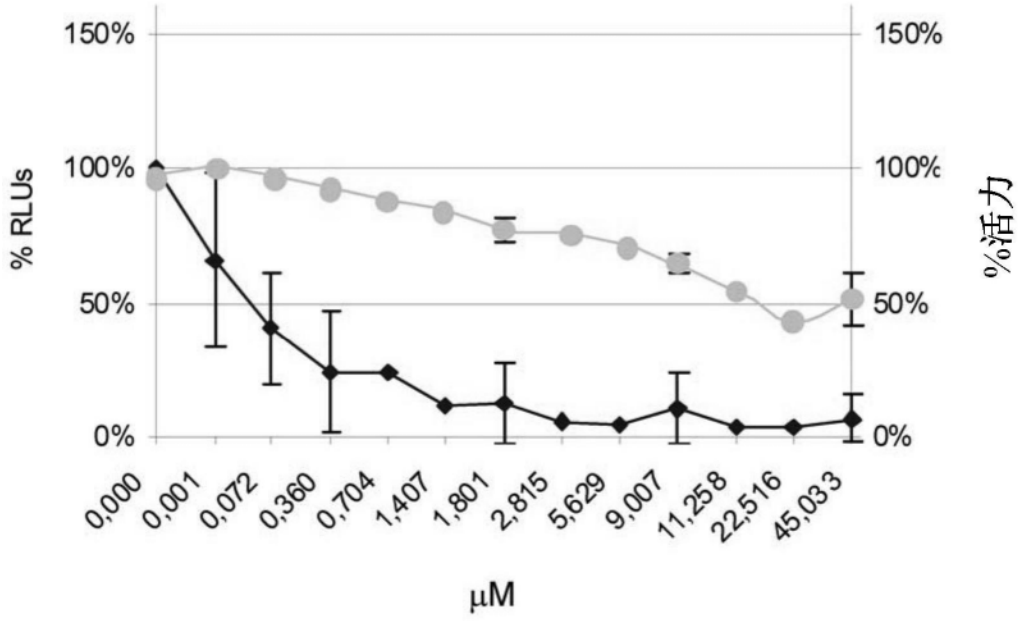

150%
100%
50%
0%
% RLUs
%活力
0,000
0,001
0,072
0,360
0,704
1,407
1,801
2,815
5,629
9,007
11,258
22,516
45,033
μM

图7B

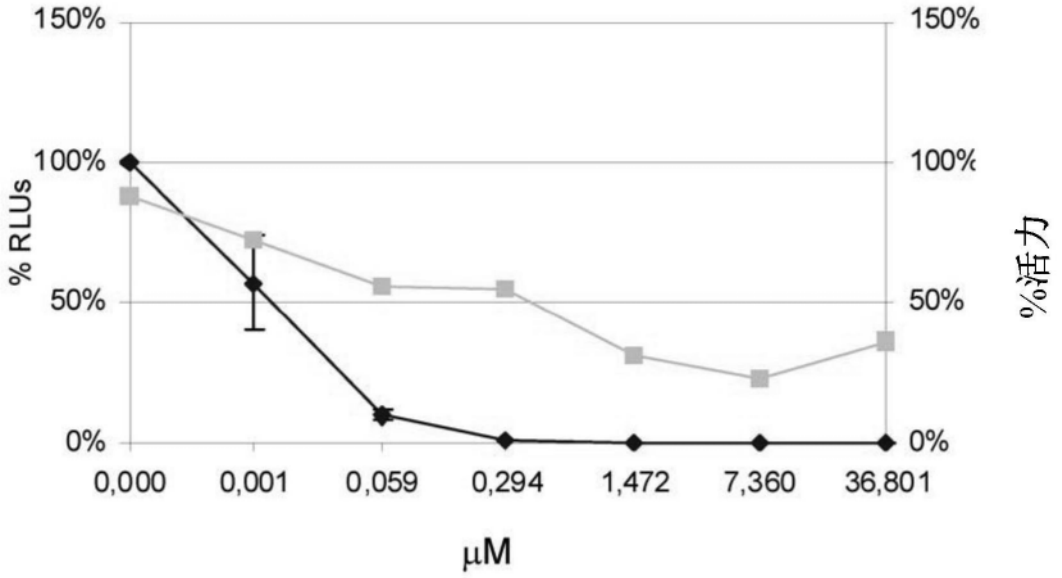

150%
100%
50%
0%
% RLUs
%活力
0,000
0,001
0,059
0,294
1,472
7,360
36,801
μM

图8A

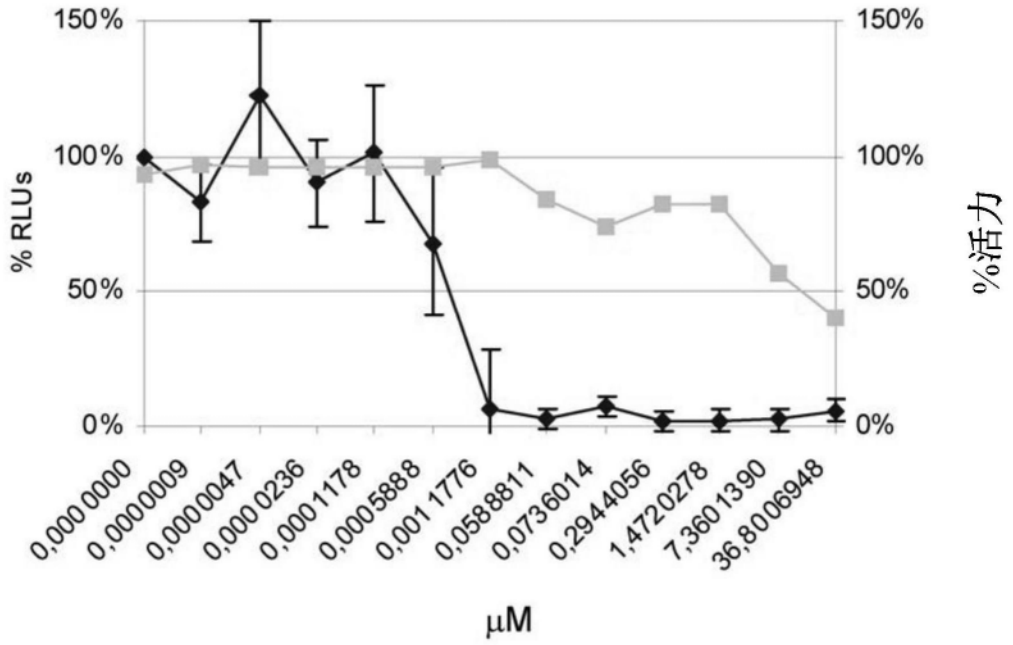

150%
100%
50%
0%
% RLUs
%活力
0,0000000
0,0000009
0,0000047
0,0000236
0,0001178
0,0005888
0,0011776
0,0588811
0,0736014
0,2944056
1,4720278
7,3601390
36,8006948
μM

图8B

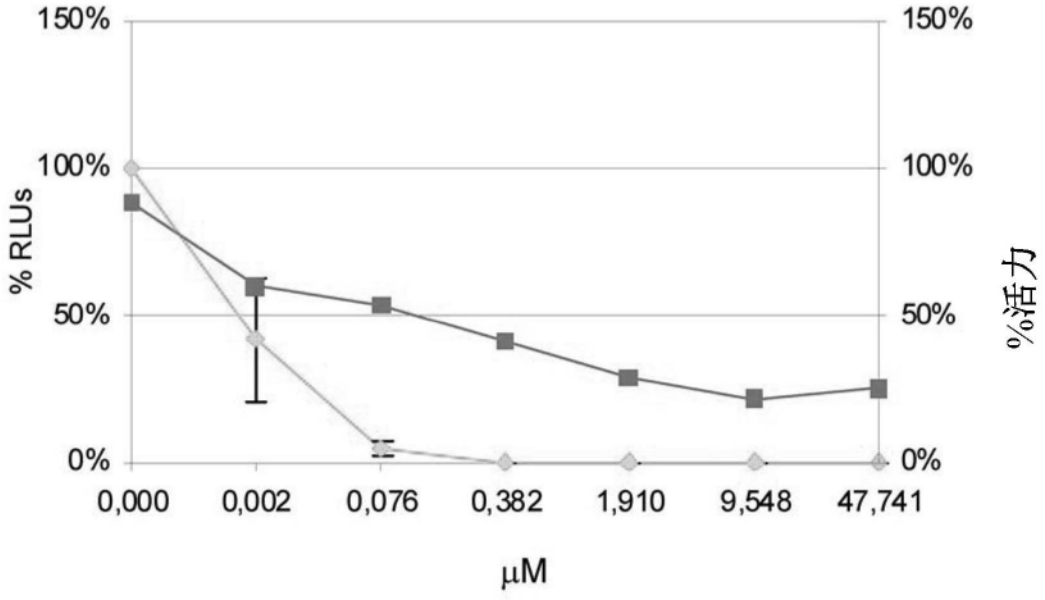

150%
100%
50%
0%
% RLUs
%活力
0,000
0,002
0,076
0,382
1,910
9,548
47,741
μM

图9A

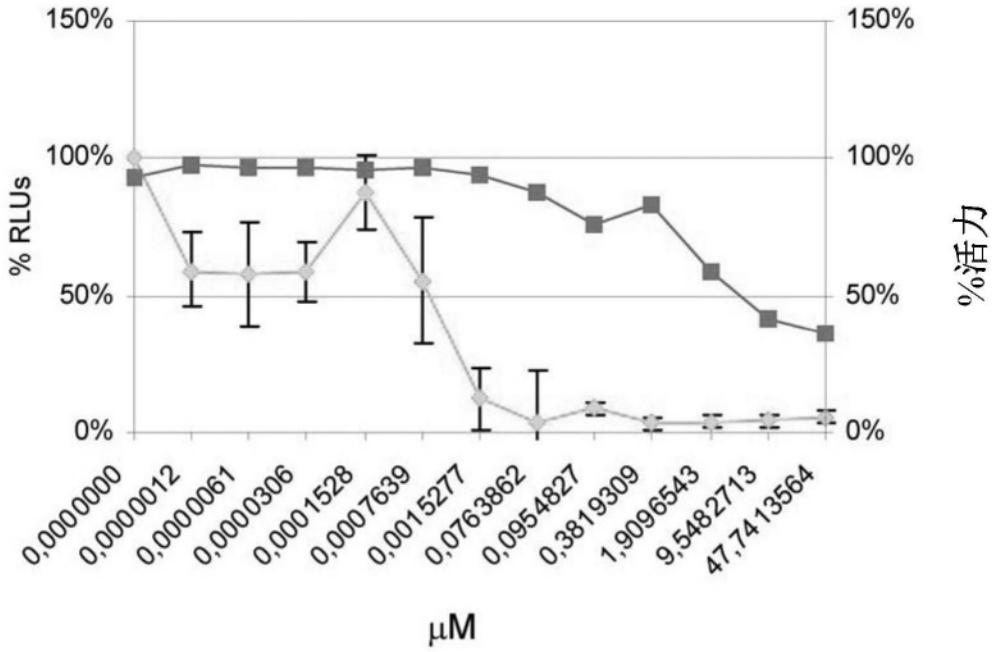

150%
100%
50%
0%
% RLUs
%活力
0,0000000
0,0000012
0,0000061
0,0000306
0,0001528
0,0007639
0,0015277
0,0763862
0,0954827
0,3819309
1,9096543
9,5482713
47,7413564
μM

图9B

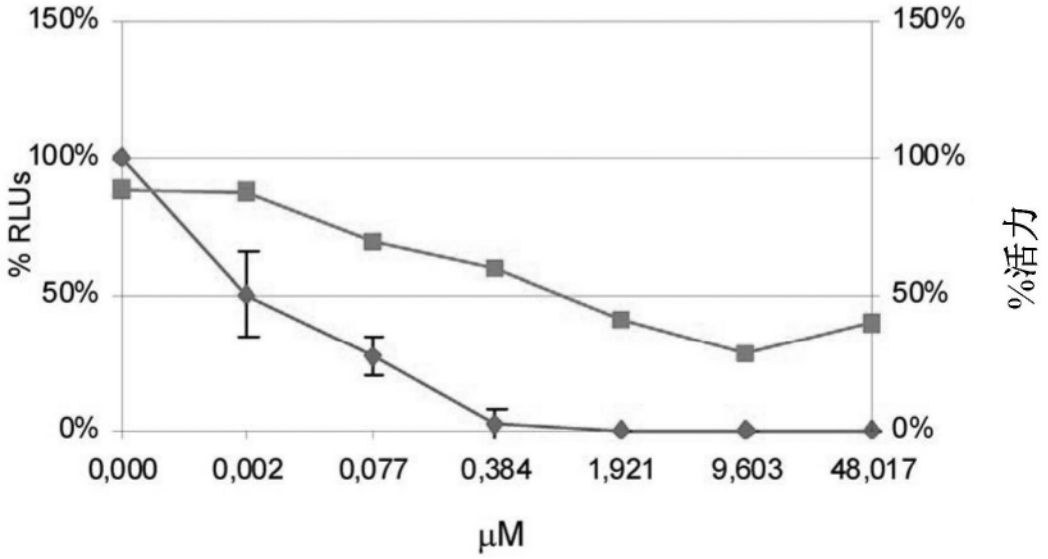

150%
100%
50%
0%
% RLUs
%活力
0,000
0,002
0,077
0,384
1,921
9,603
48,017
μM

图10A

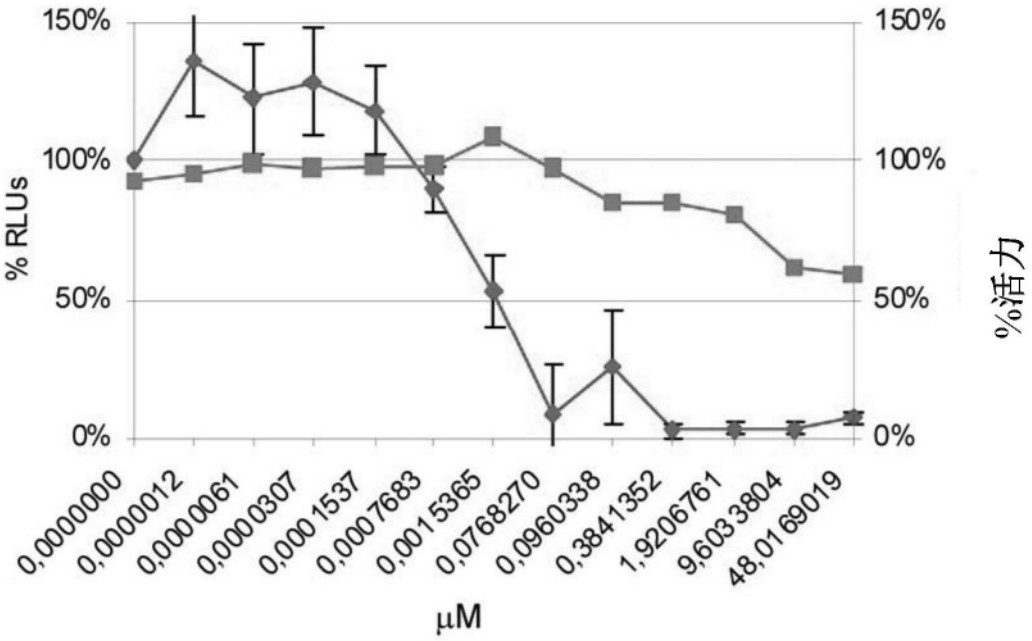

150%
100%
50%
0%
% RLUs
%活力
0,0000000
0,0000012
0,0000061
0,0000307
0,0001537
0,0007683
0,0015365
0,0768270
0,0960338
0,3841352
1,9206761
9,6033804
48,0169019
μM

图10B

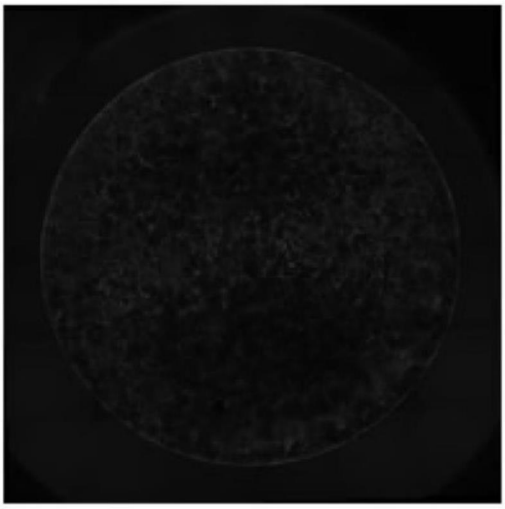


图11a

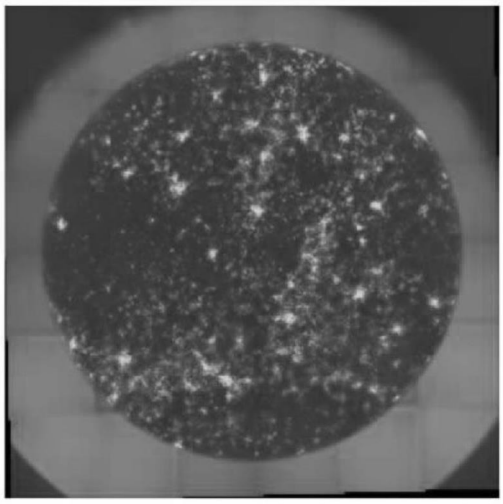


图11b

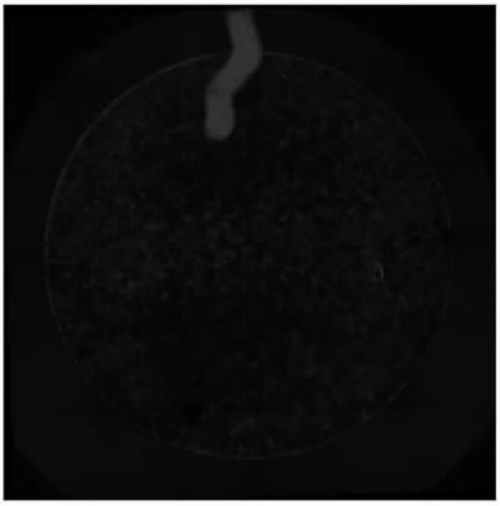


图12a

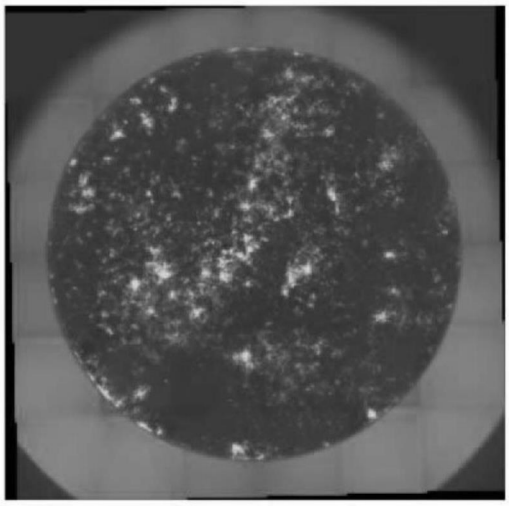


图12b

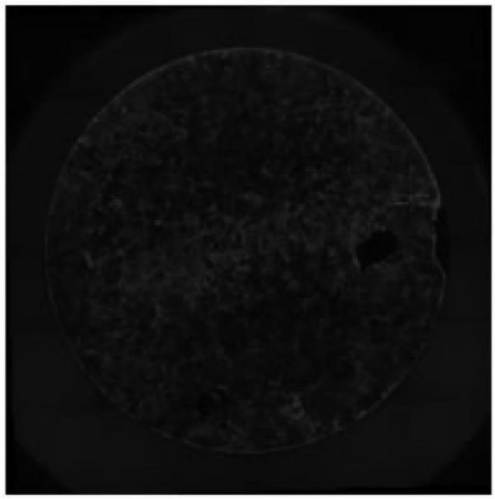


图13a

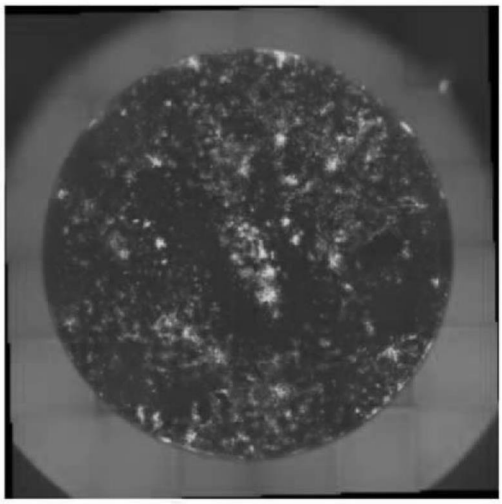


图13b

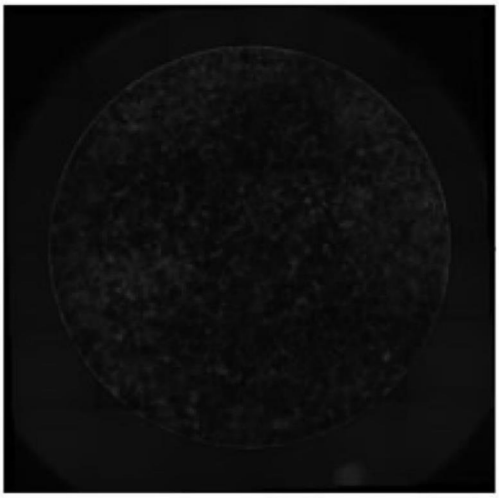


图14a

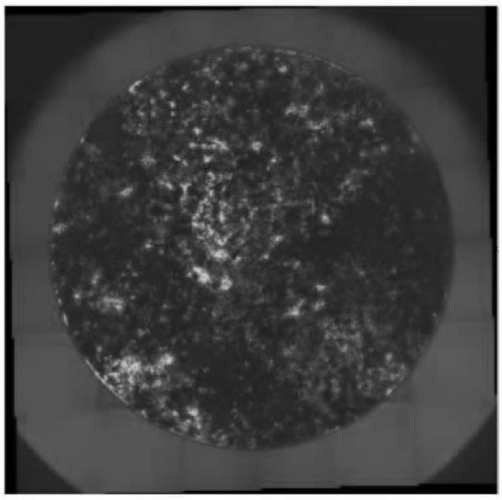


图14b

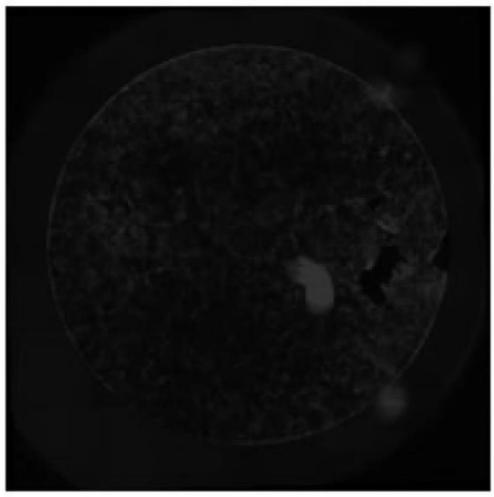


图15a

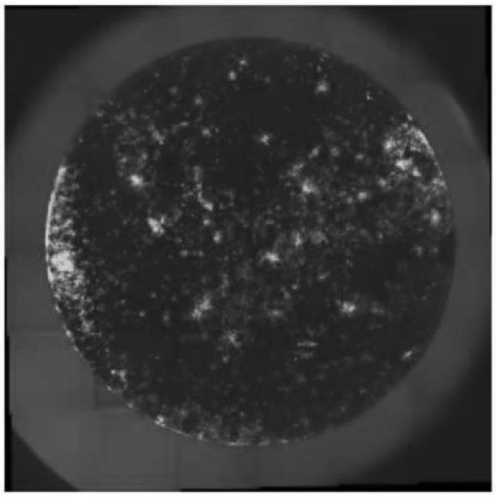


图15b

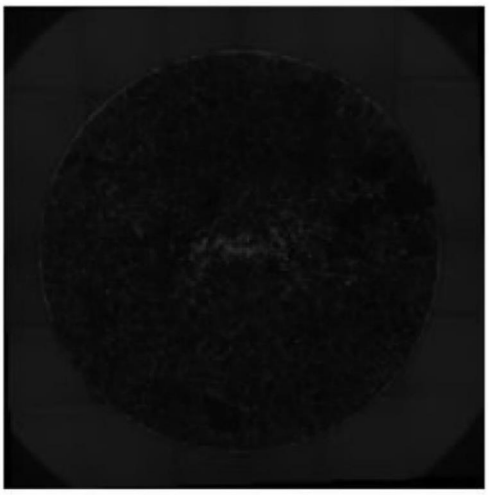


图16a

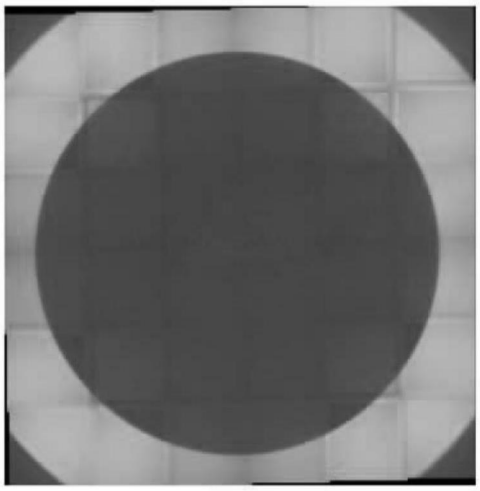


图16b

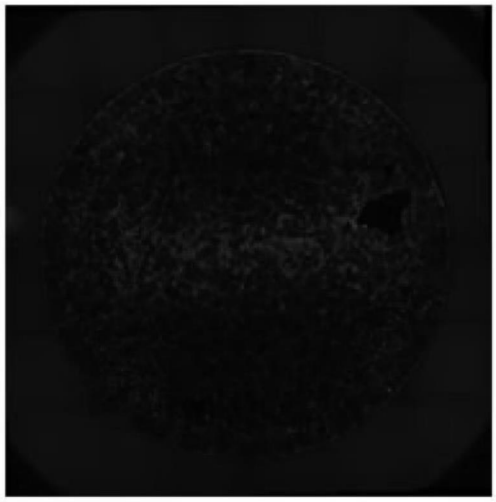


图17a

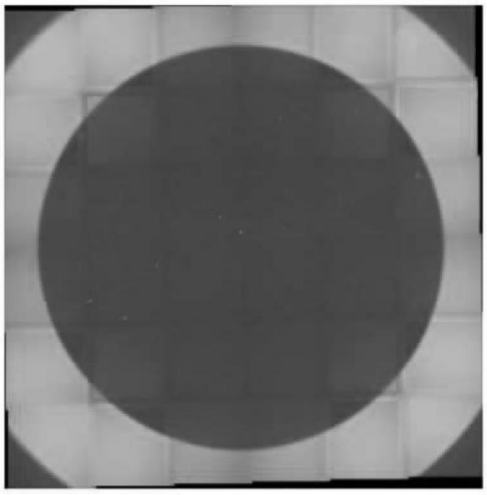


图17b

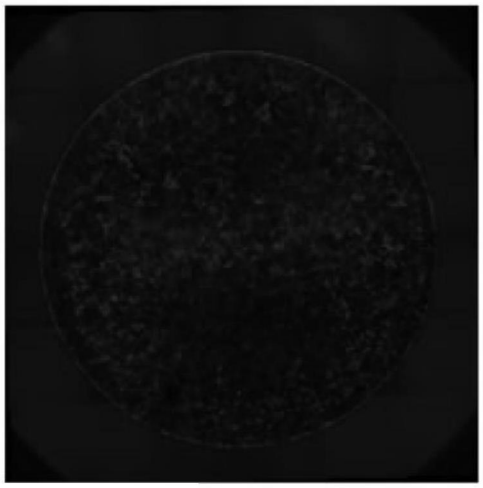


图18a

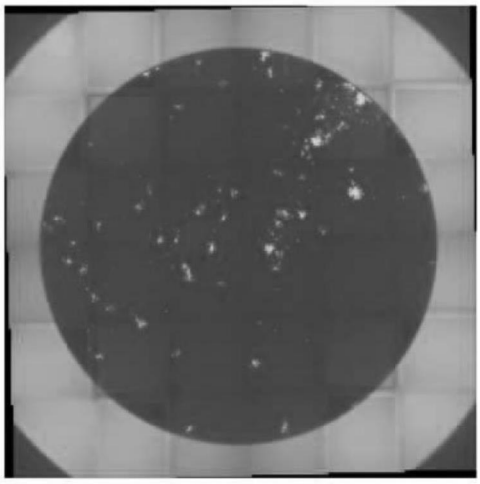


图18b

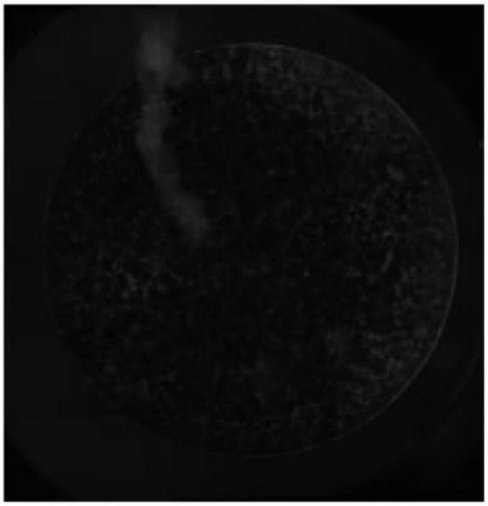


图19a

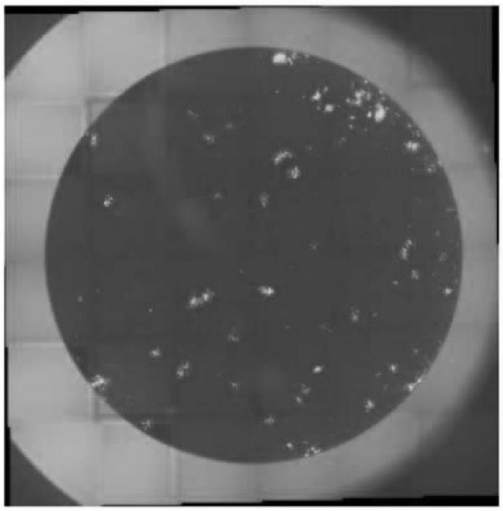


图19b

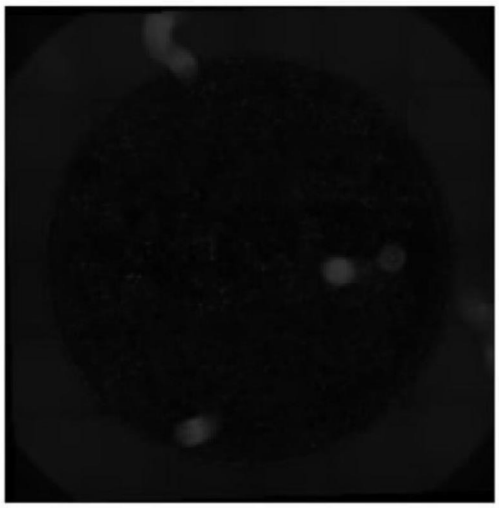


图20a

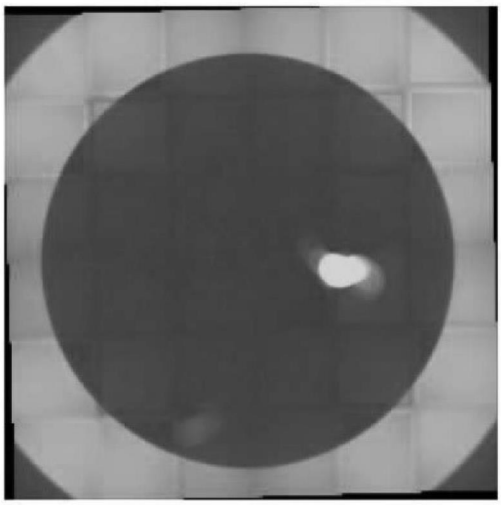


图20b

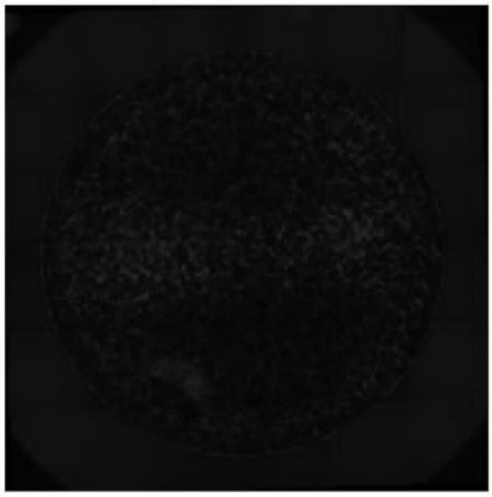


图21a

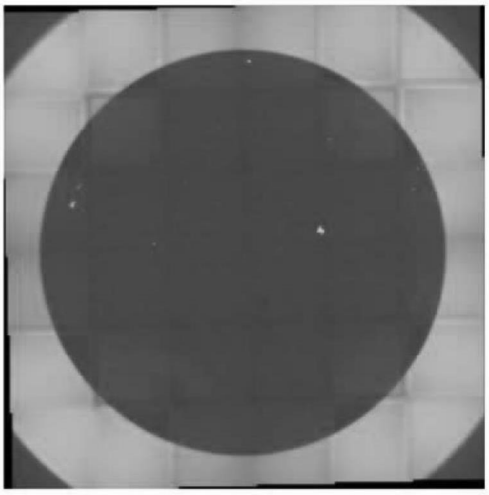


图21b

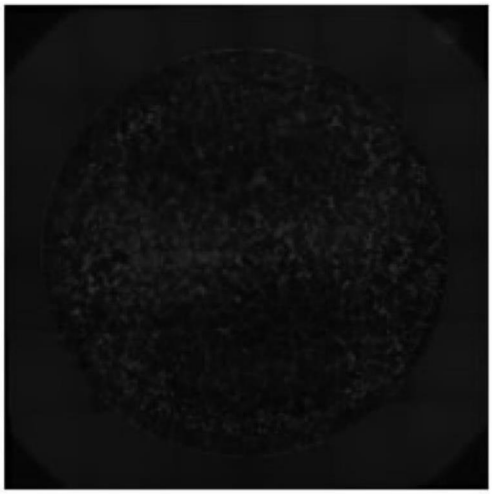


图22a

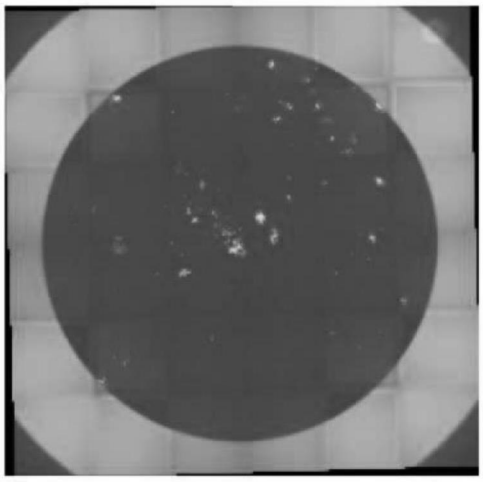


图22b

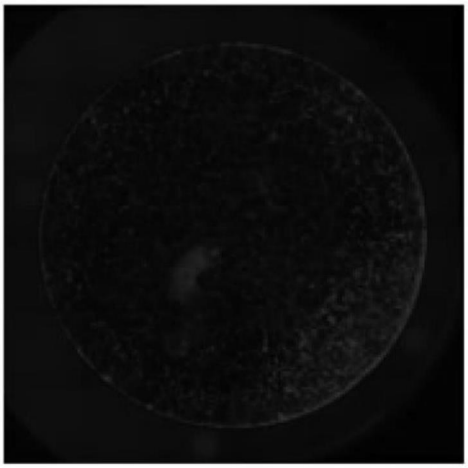


图23a

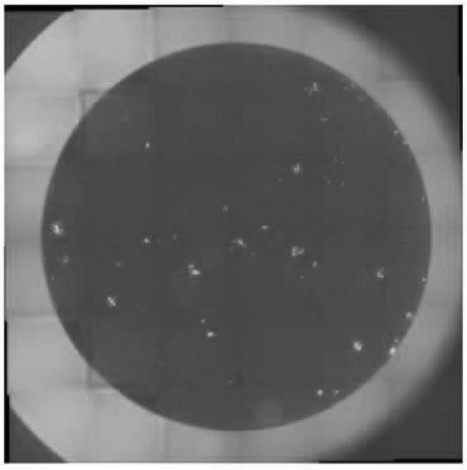


图23b

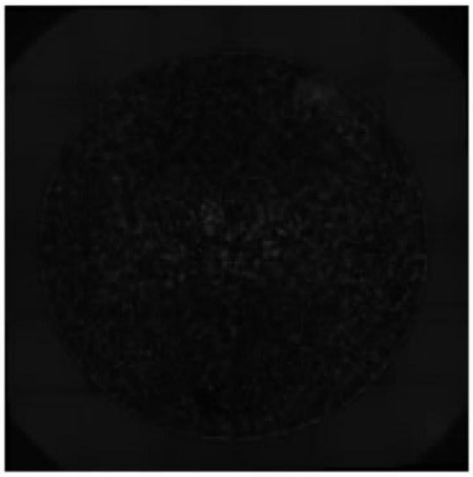


图24a

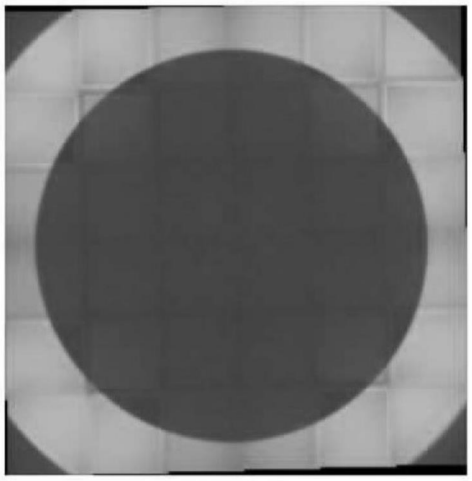


图24b

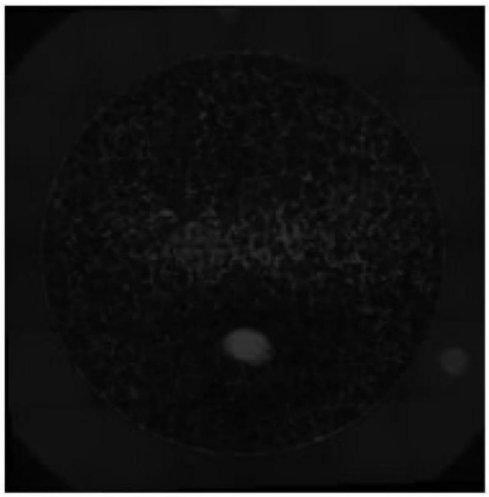


图25a

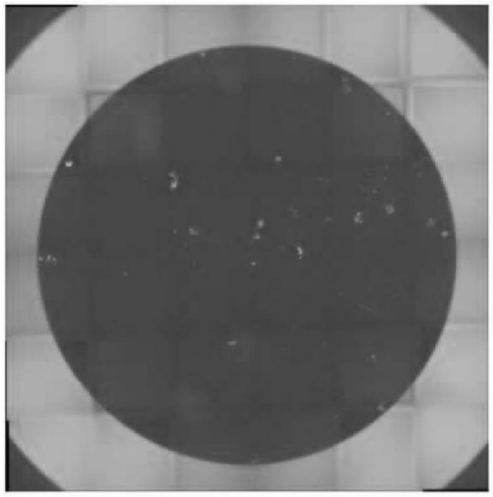


图25b

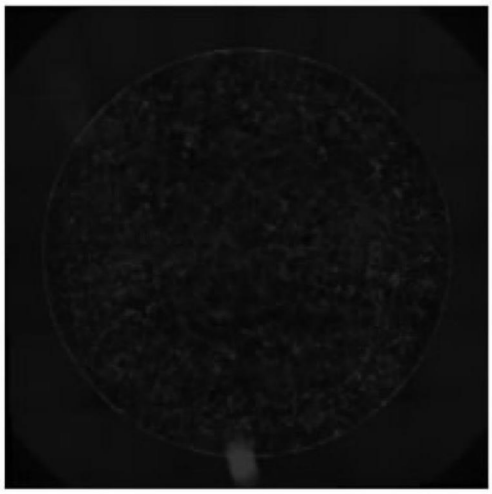


图26a

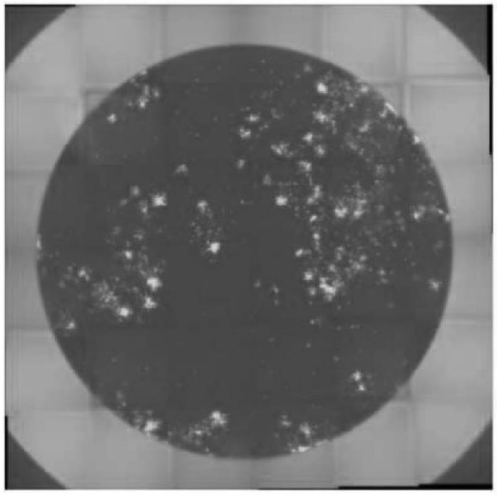


图26b

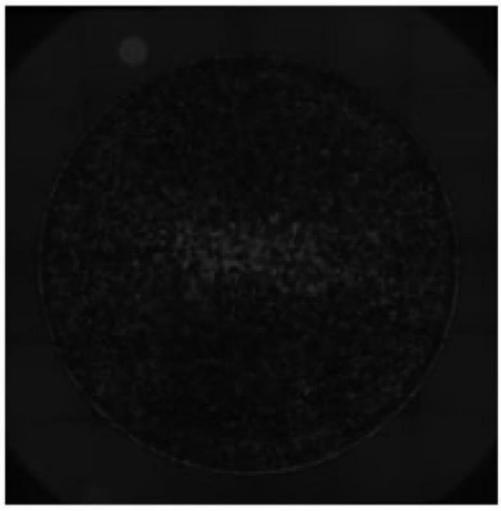


图27a

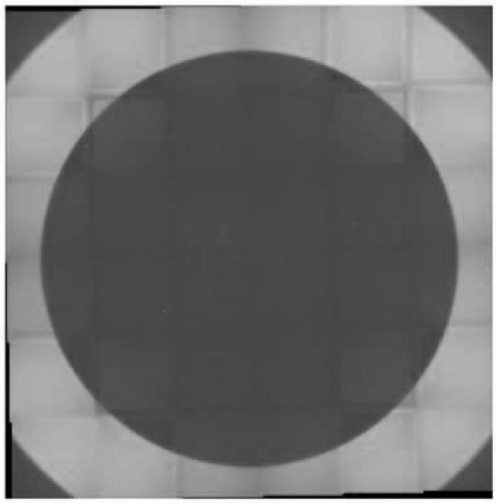


图27b

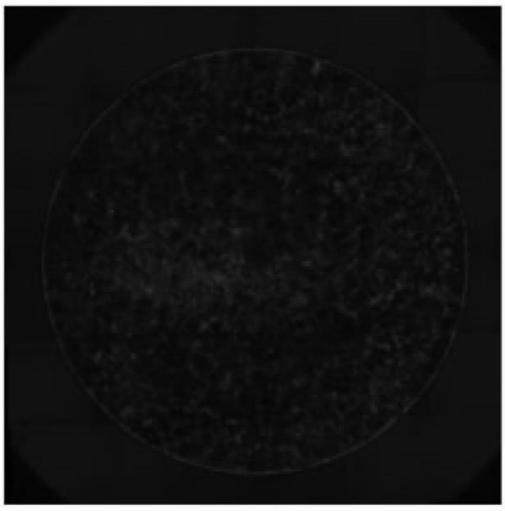


图28a

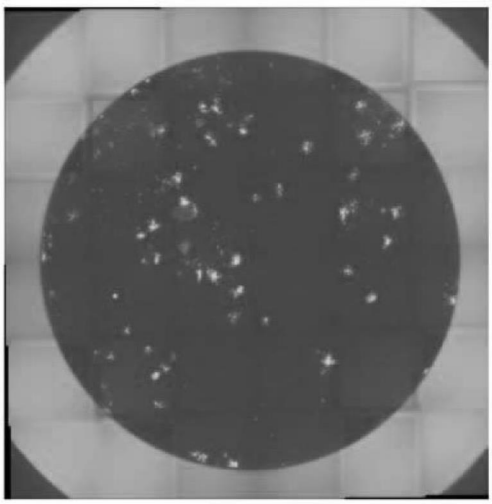


图28b

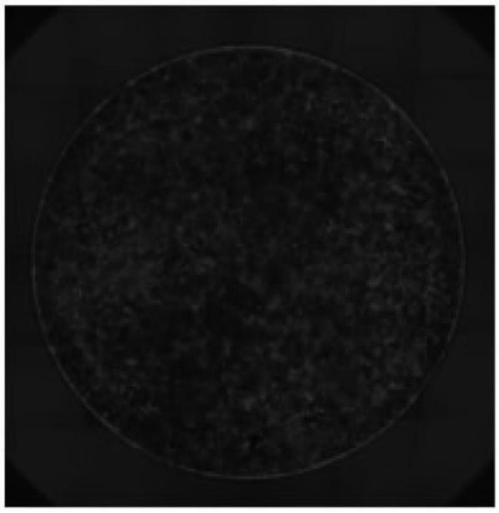


图29a

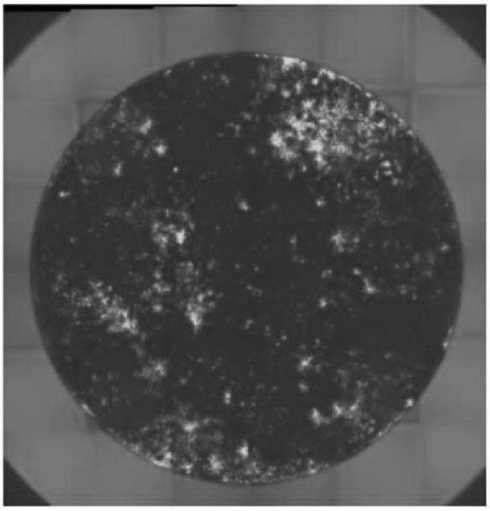


图29b

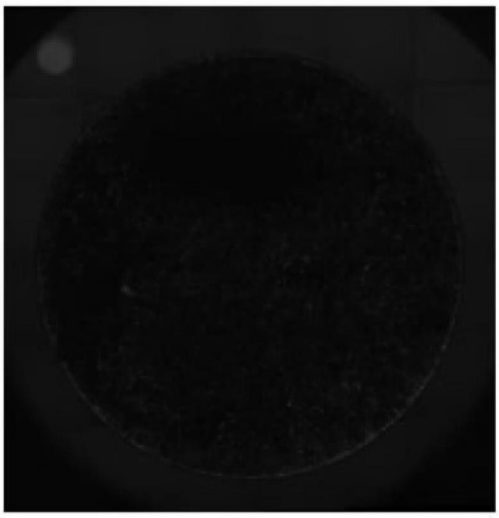


图30a

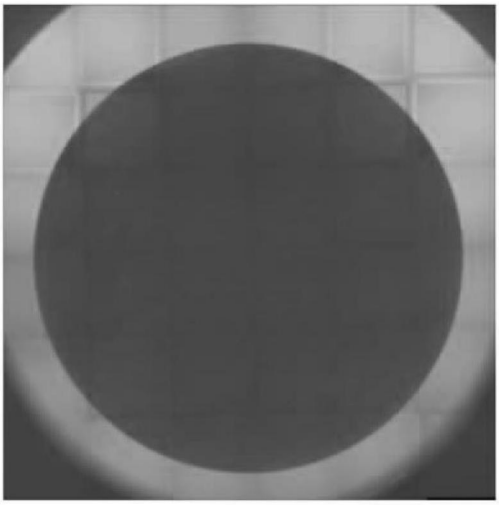


图30b

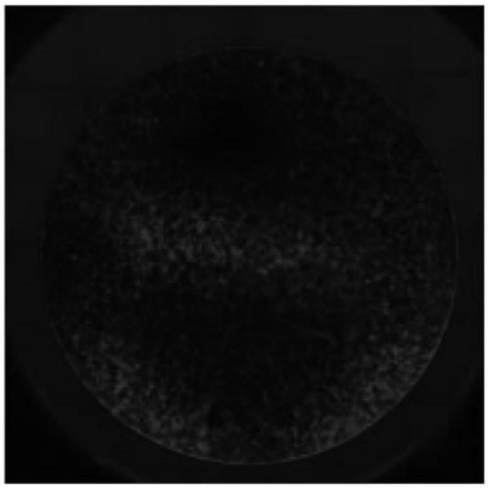


图31a

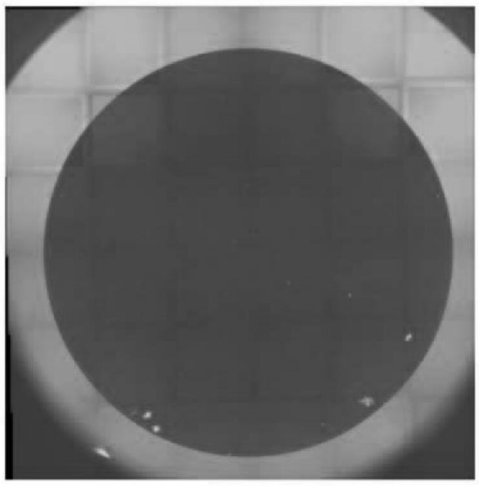


图31b

未示出

图32a

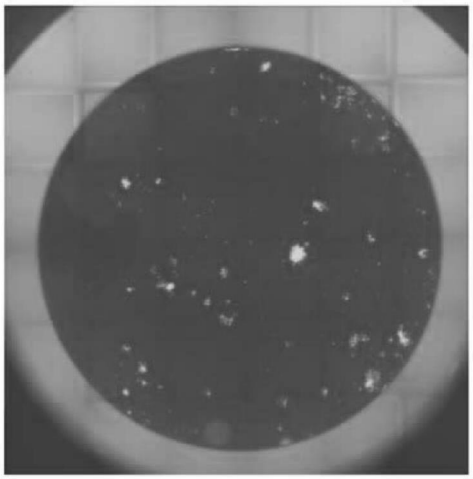


图32b

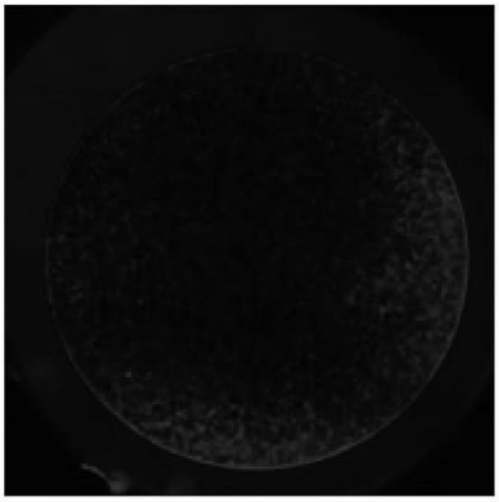


图33a

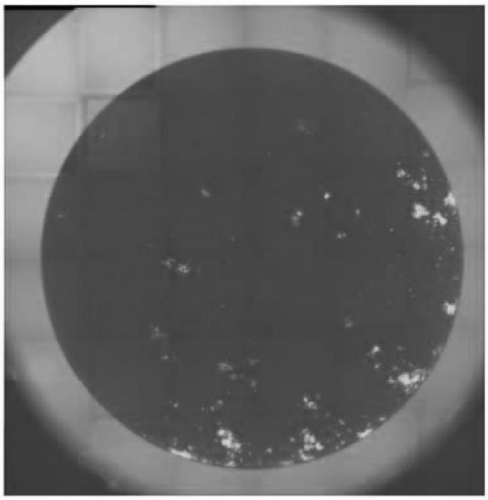


图33b

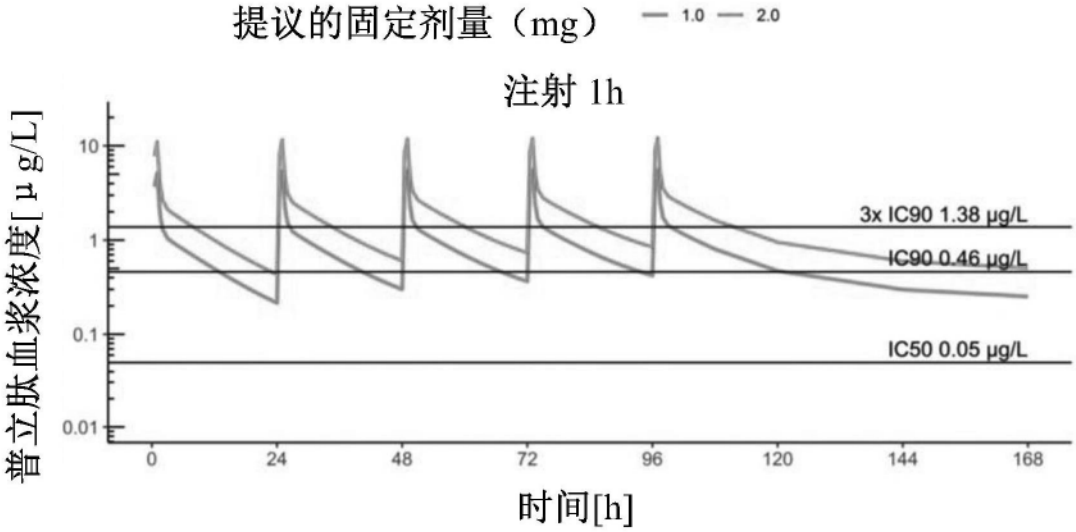

提议的固定剂量（mg）
1.0
2.0
注射 1h
普立肽血浆浓度[μg/L]
10
1
0.1
0.01
3x IC90 1.38 μg/L
IC90 0.46 μg/L
IC50 0.05 μg/L
0
24
48
72
96
120
144
168
时间[h]

图34

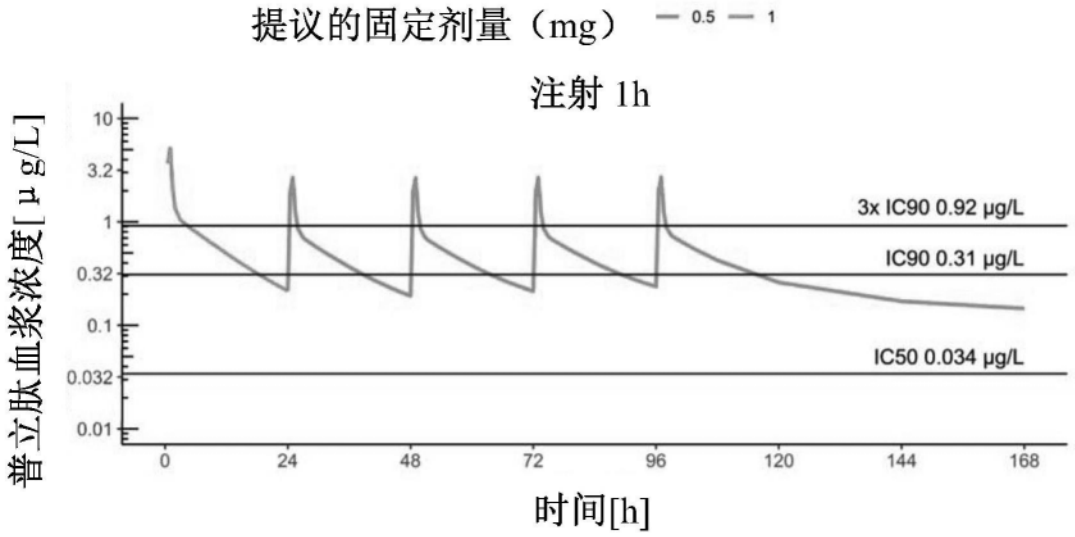

提议的固定剂量（mg）
0.5
1
注射 1h
普立肽血浆浓度[μg/L]
10
3.2
1
0.32
0.1
0.032
0.01
3x IC90 0.92 μg/L
IC90 0.31 μg/L
IC50 0.034 μg/L
0
24
48
72
96
120
144
168
时间[h]

图35

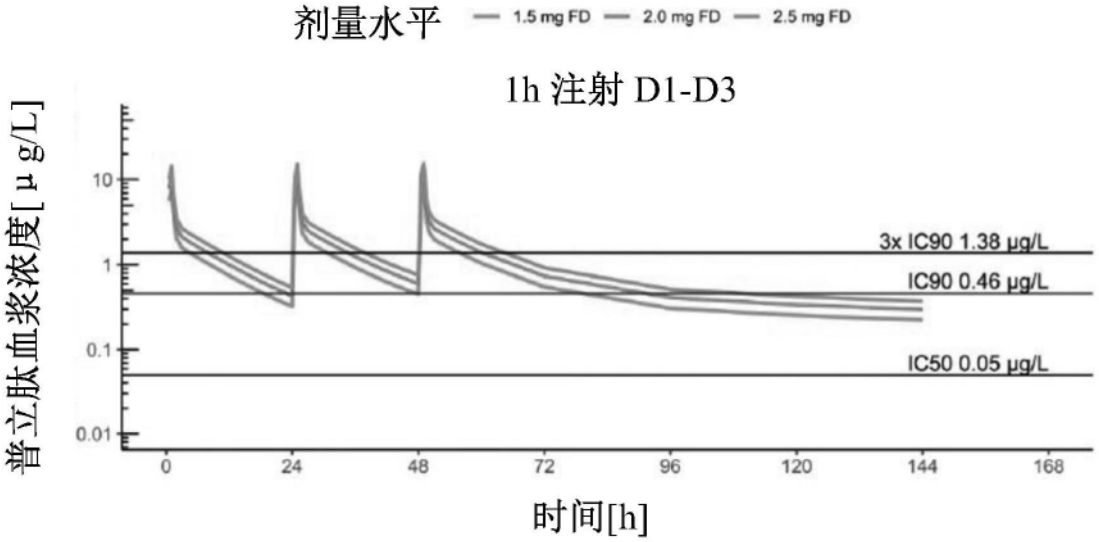

剂量水平
1.5 mg FD
2.0 mg FD
2.5 mg FD
1h 注射 D1-D3
普立肽血浆浓度[μg/L]
10
1
0.1
0.01
3x IC90 1.38 μg/L
IC90 0.46 μg/L
IC50 0.05 μg/L
0
24
48
72
96
120
144
168
时间[h]

图36

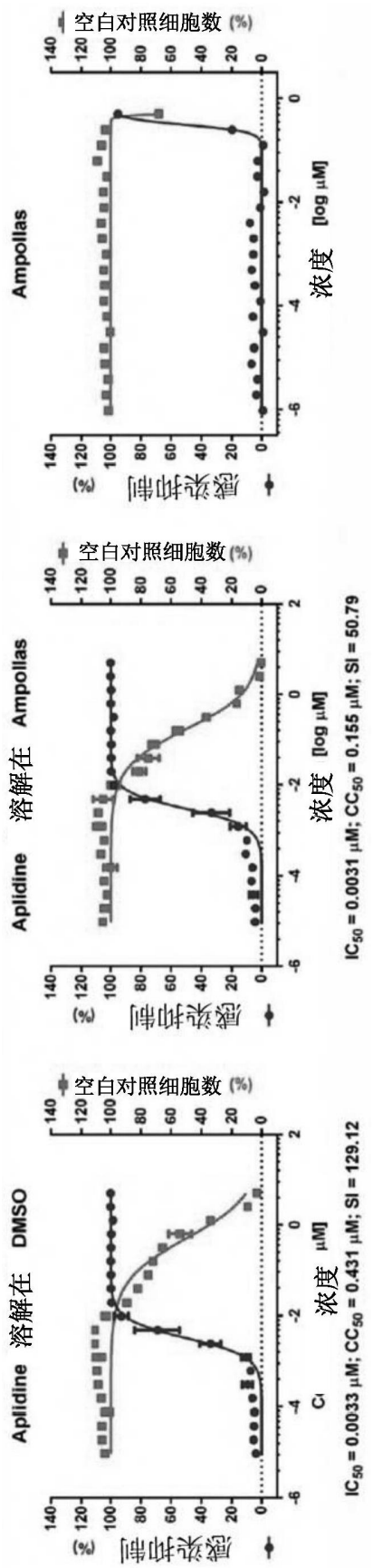

Aplidine 溶解在 DMSO
感染抑制 (%)
空白对照细胞数 (%)
浓度 [log µM]
IC50 = 0.0033 µM; CC50 = 0.431 µM; SI = 129.12
Aplidine 溶解在 Ampollas
感染抑制 (%)
空白对照细胞数 (%)
浓度 [log µM]
IC50 = 0.0031 µM; CC50 = 0.155 µM; SI = 50.79
Ampollas
感染抑制 (%)
空白对照细胞数 (%)
浓度 [log µM]

图37A

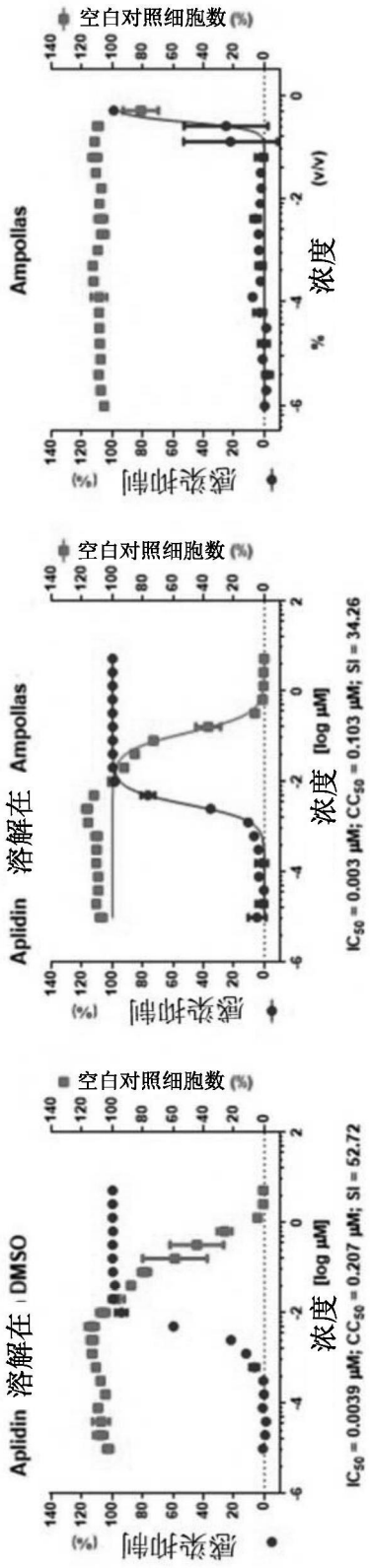

空白对照细胞数 (%)
感染抑制 (%)
Ampollas
浓度 % (v/v)
Aplidin 溶解在 Ampollas
浓度 [log μM]
IC50 = 0.003 μM; CC50 = 0.103 μM; SI = 34.26
Aplidin 溶解在 DMSO
浓度 [log μM]
IC50 = 0.0039 μM; CC50 = 0.207 μM; SI = 52.72

图37B

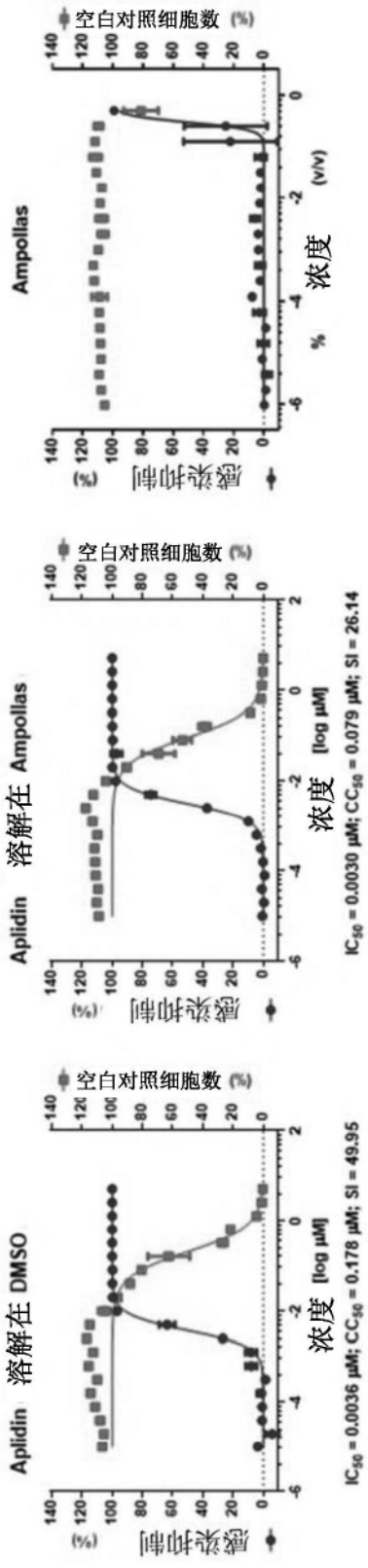

空白对照细胞数 (%)
感染抑制 (%)
Ampollas
浓度 % (v/v)
Aplidin 溶解在 Ampollas
浓度 [log μM]
IC50 = 0.0030 μM; CC50 = 0.079 μM; SI = 26.14
Aplidin 溶解在 DMSO
浓度 [log μM]
IC50 = 0.0036 μM; CC50 = 0.178 μM; SI = 49.95

图37C

普立肽

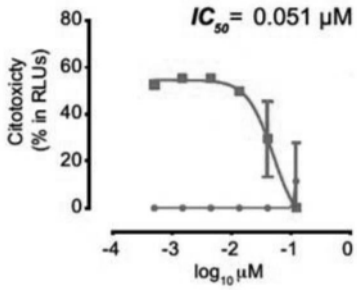

IC_{50}= 0.051 μM
Citotoxicty (% in RLUs)
80
60
40
20
0
-4
-3
-2
-1
0
log_{10} μM

图38

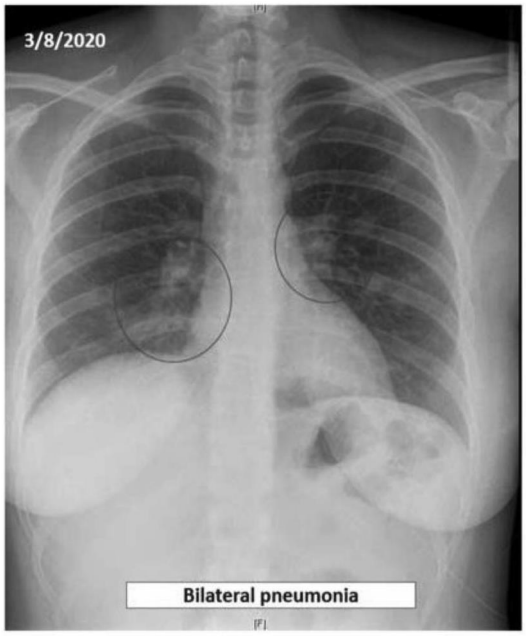

3/8/2020
Bilateral pneumonia

图39a



图39b

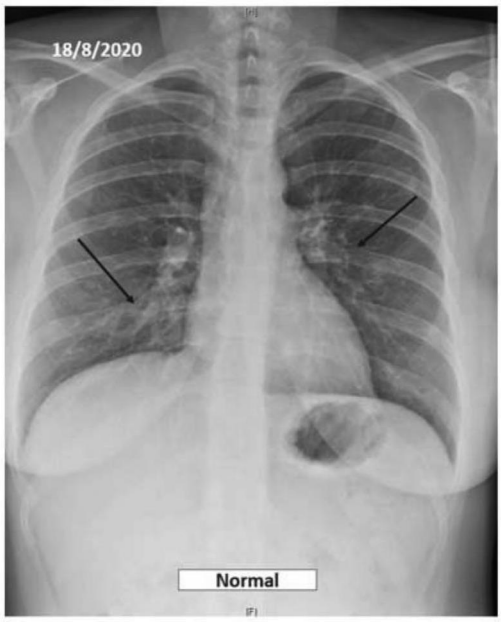


图39c

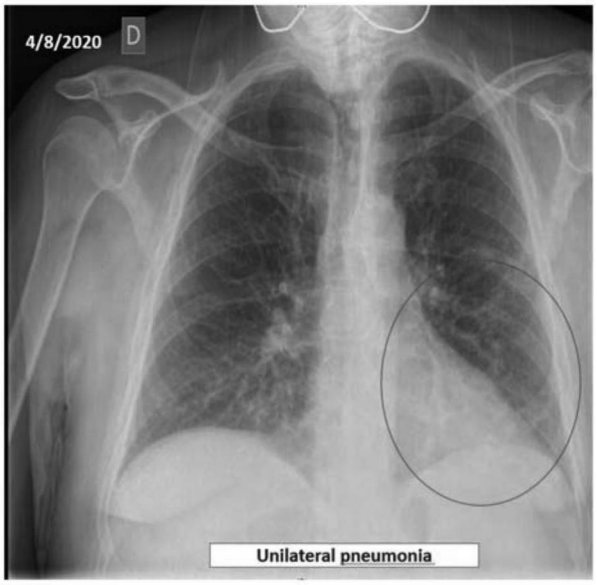

4/8/2020
D
Unilateral pneumonia

图40a

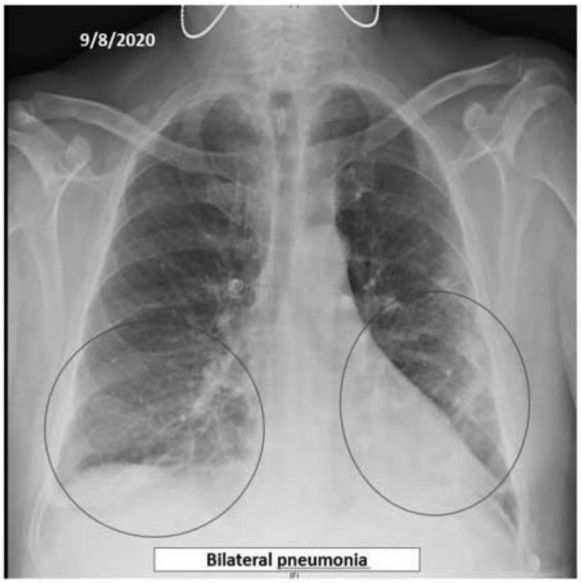

9/8/2020
Bilateral pneumonia

图40b

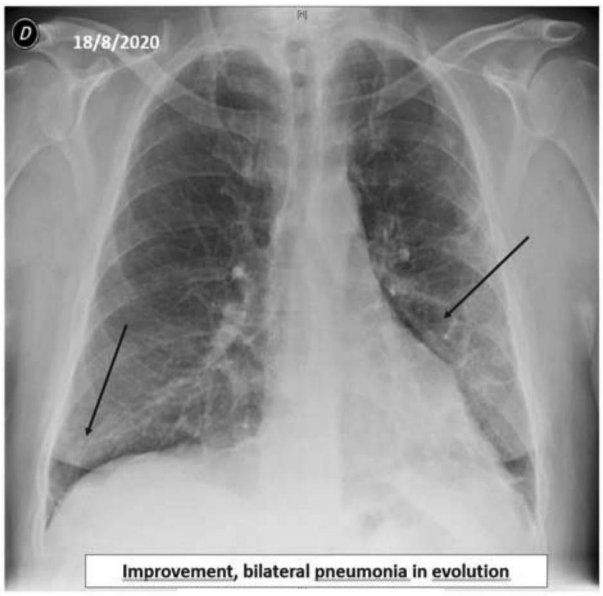

18/8/2020
Improvement, bilateral pneumonia in evolution

图40c

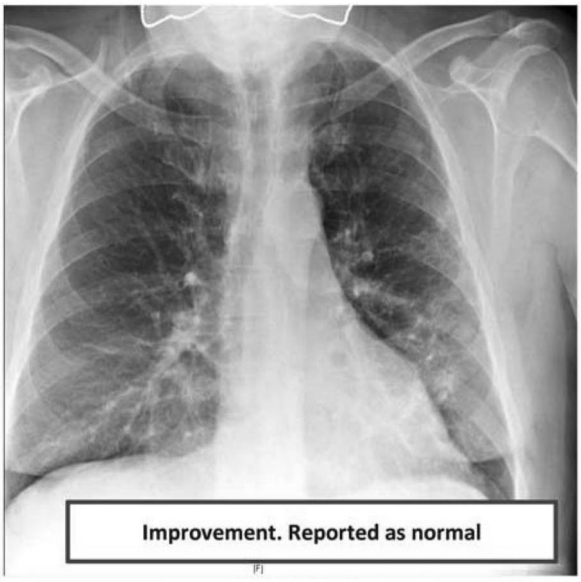

Improvement. Reported as normal

图40d

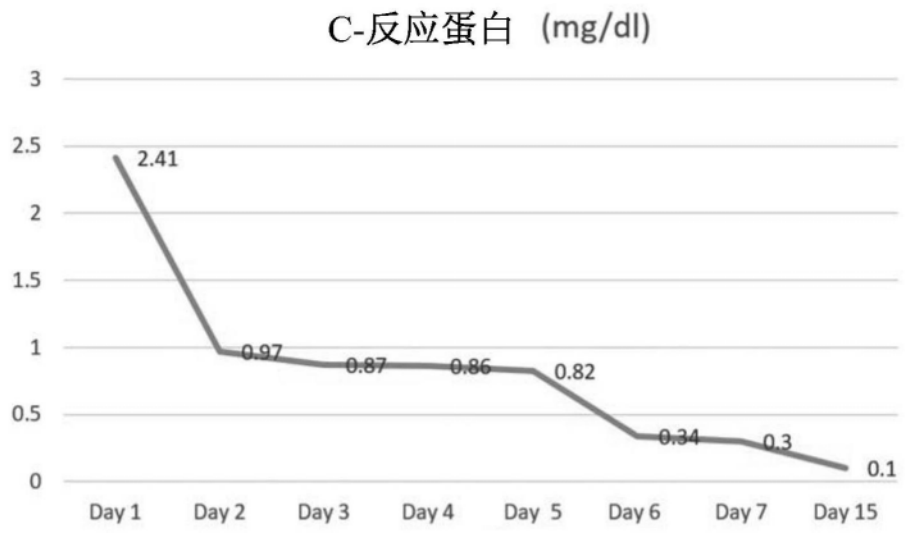

C-反应蛋白 (mg/dl)
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
2.41
0.97
0.87
0.86
0.82
0.34
0.3
0.1
Day 1
Day 2
Day 3
Day 4
Day 5
Day 6
Day 7
Day 15

图41a

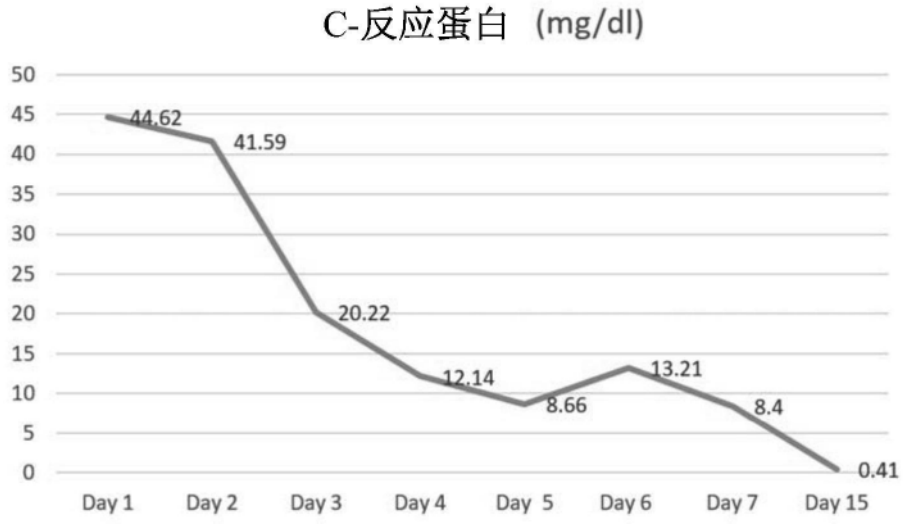

C-反应蛋白 (mg/dl)
50
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
44.62
41.59
20.22
12.14
8.66
13.21
8.4
0.41
Day 1
Day 2
Day 3
Day 4
Day 5
Day 6
Day 7
Day 15

图41b

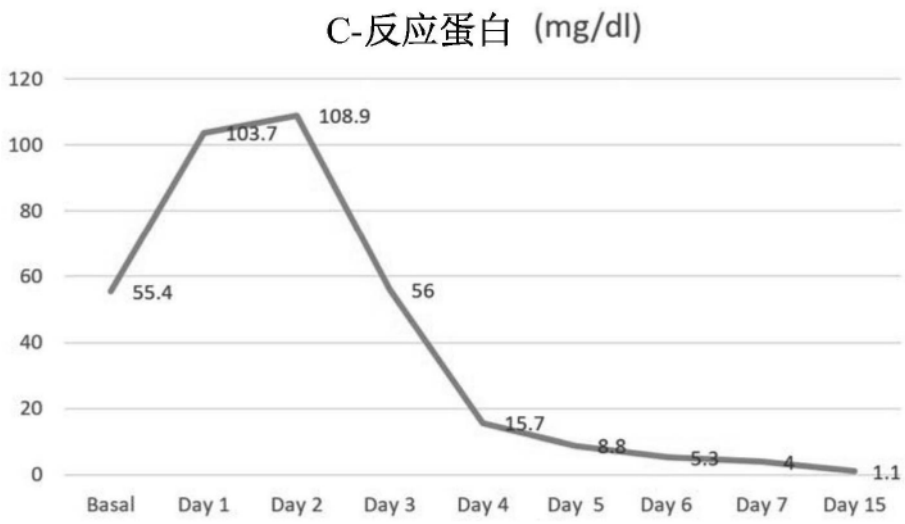


图41c

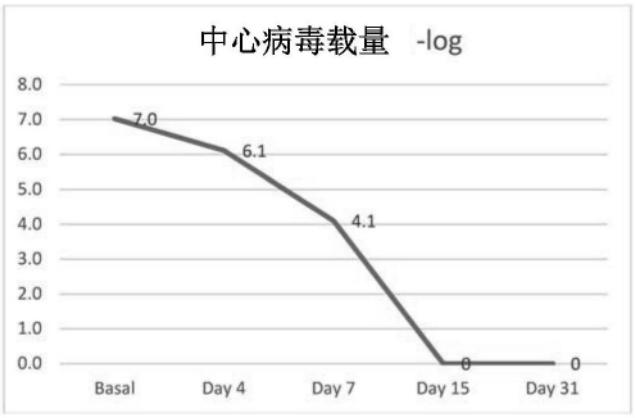


图42a

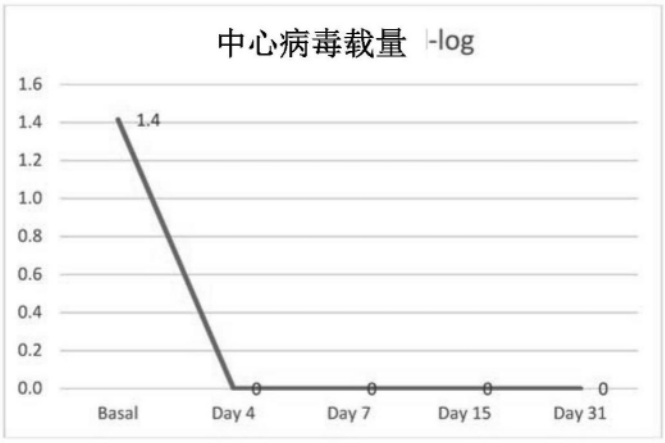


图42b

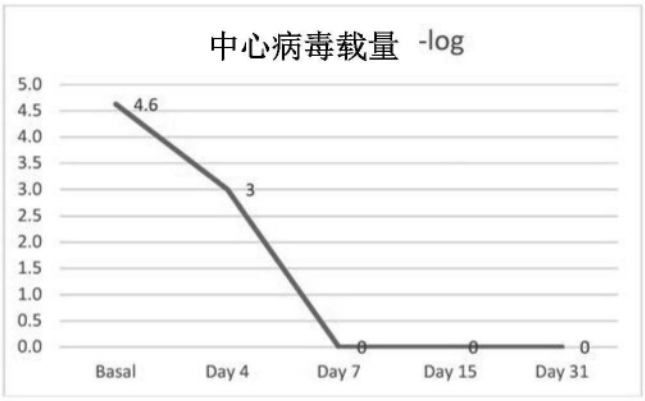

中心病毒载量 -log
5.0
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
4.6
3
0
0
0
Basal
Day 4
Day 7
Day 15
Day 31

图42c

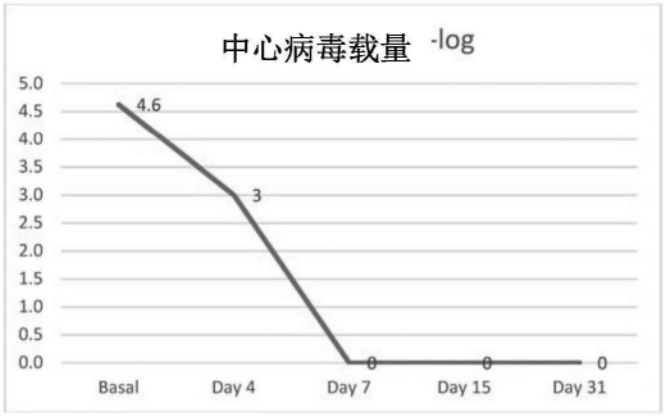

中心病毒载量 -log
5.0
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
4.6
3
0
0
0
Basal
Day 4
Day 7
Day 15
Day 31

图42d

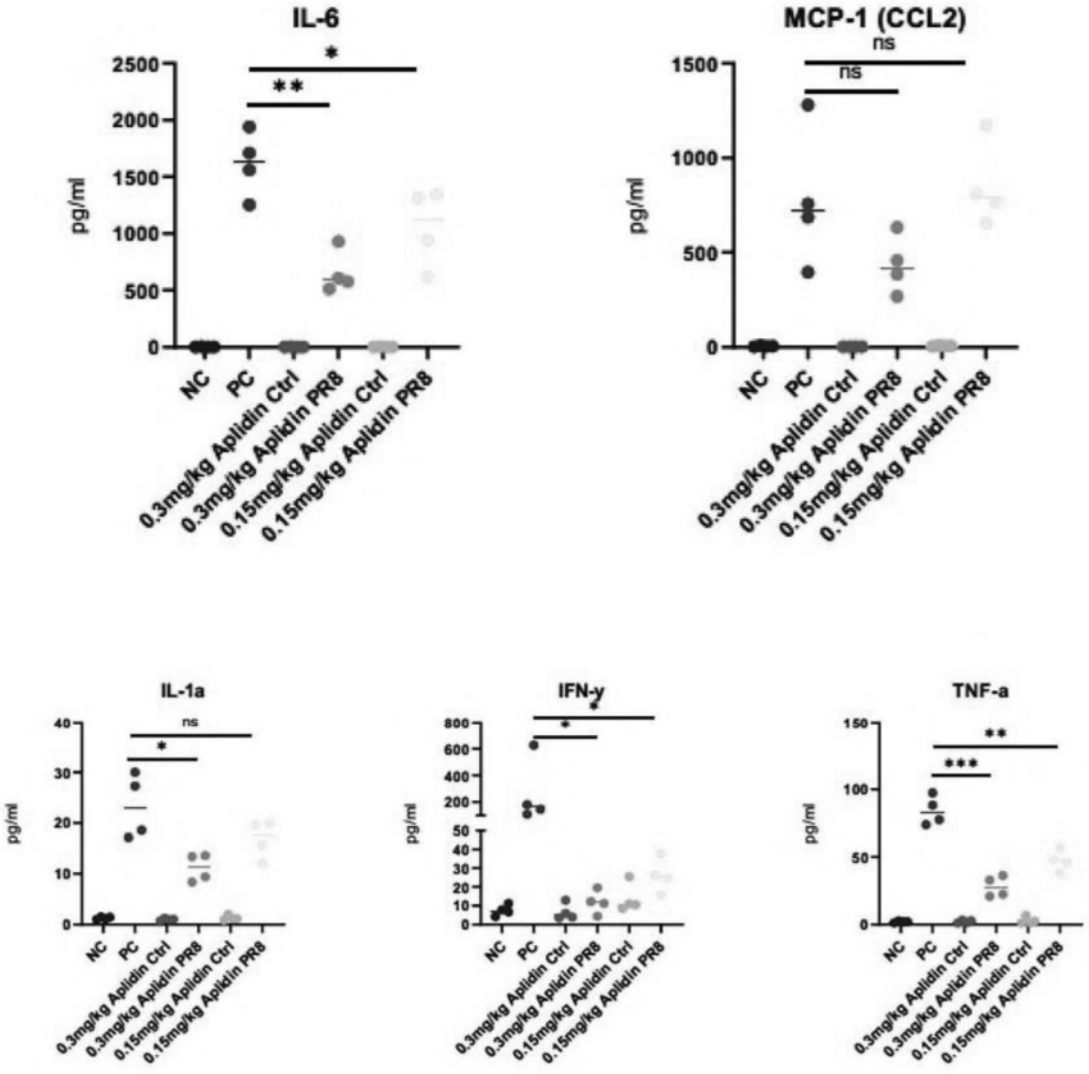

IL-6
MCP-1 (CCL2)
IL-1a
IFN-γ
TNF-a
pg/ml
NC
PC
0.3mg/kg Aplidin Ctrl
0.3mg/kg Aplidin PR8
0.15mg/kg Aplidin Ctrl
0.15mg/kg Aplidin PR8
ns
*
**
***

图43

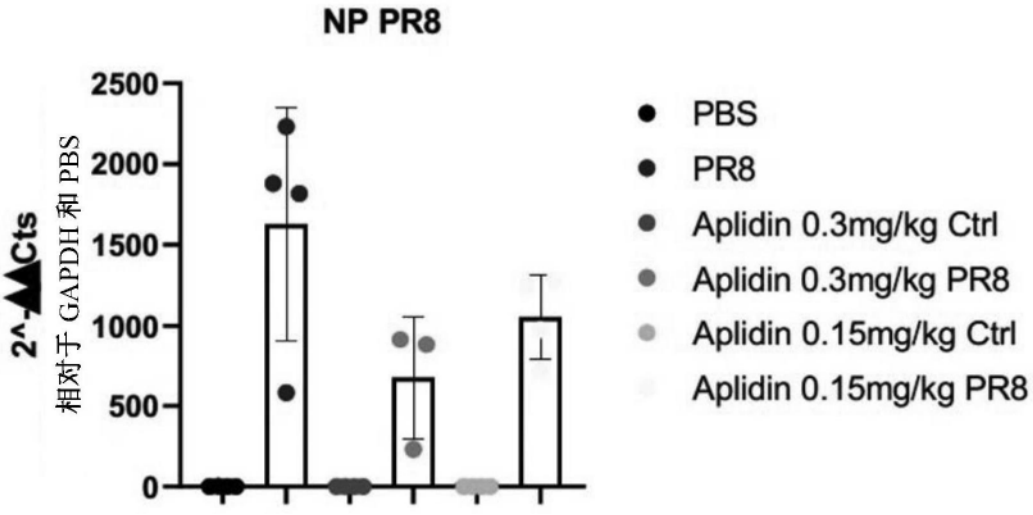

NP PR8
2^-ΔΔCts
相对于 GAPDH 和 PBS
PBS
PR8
Aplidin 0.3mg/kg Ctrl
Aplidin 0.3mg/kg PR8
Aplidin 0.15mg/kg Ctrl
Aplidin 0.15mg/kg PR8

图44

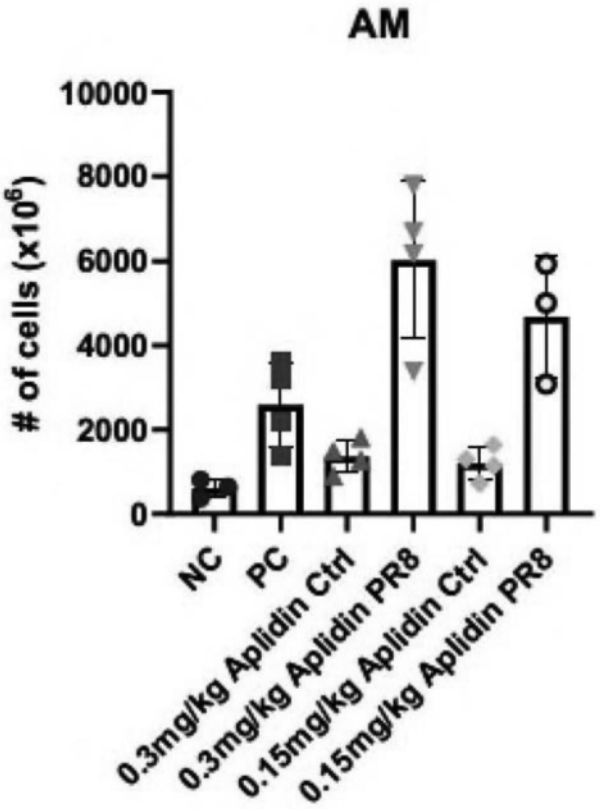

AM
# of cells (x10^6)
10000
8000
6000
4000
2000
0
NC
PC
0.3mg/kg Aplidin Ctrl
0.3mg/kg Aplidin PR8
0.15mg/kg Aplidin Ctrl
0.15mg/kg Aplidin PR8

图45

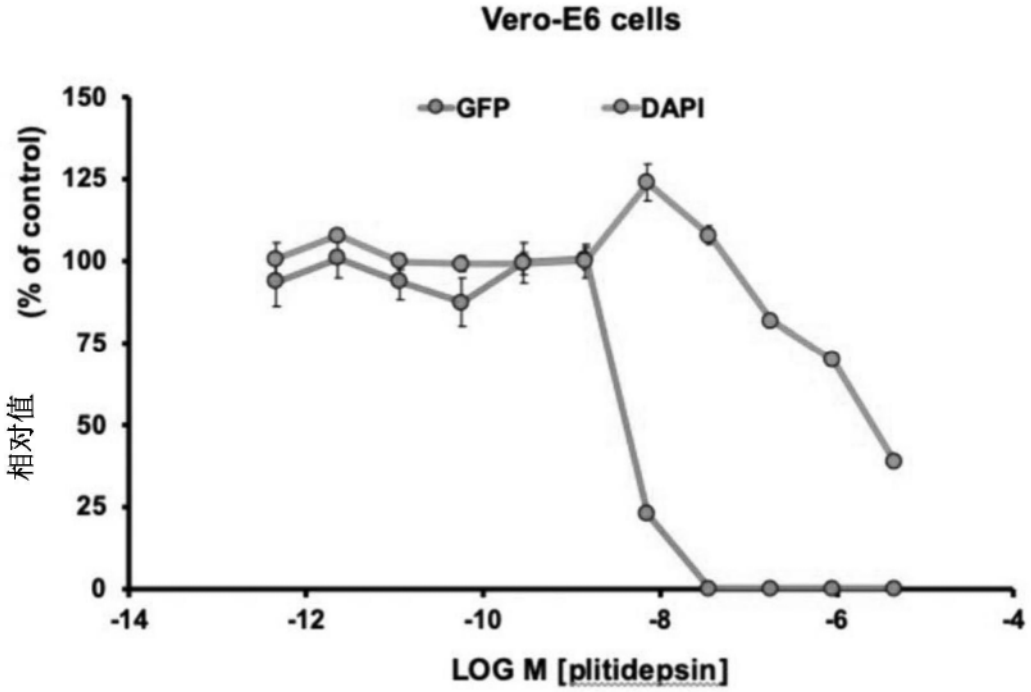

Vero-E6 cells
GFP
DAPI
(% of control)
相对值
150
125
100
75
50
25
0
-14
-12
-10
-8
-6
-4
LOG M [plitidepsin]

图46

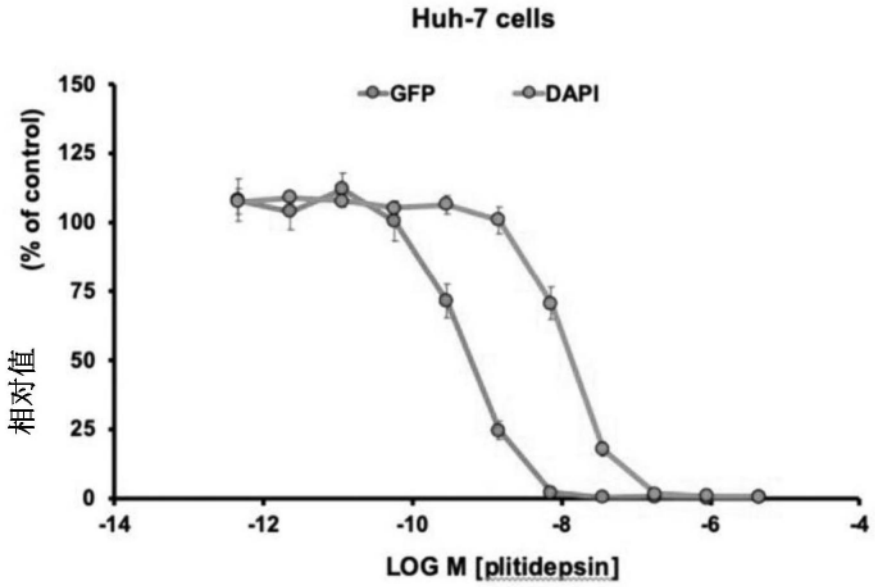

Huh-7 cells
GFP
DAPI
(% of control)
相对值
150
125
100
75
50
25
0
-14
-12
-10
-8
-6
-4
LOG M [plitidepsin]

图47

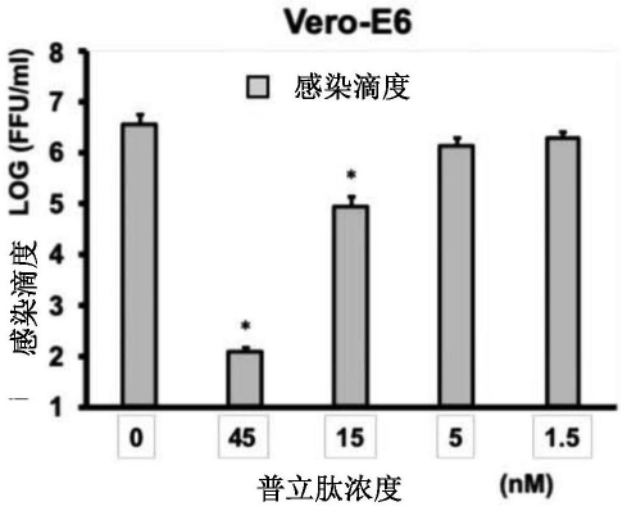

Vero-E6
感染滴度
LOG (FFU/ml)
感染滴度
8
7
6
5
4
3
2
1
*
*
0
45
15
5
1.5
普立肽浓度
(nM)

图48(a)

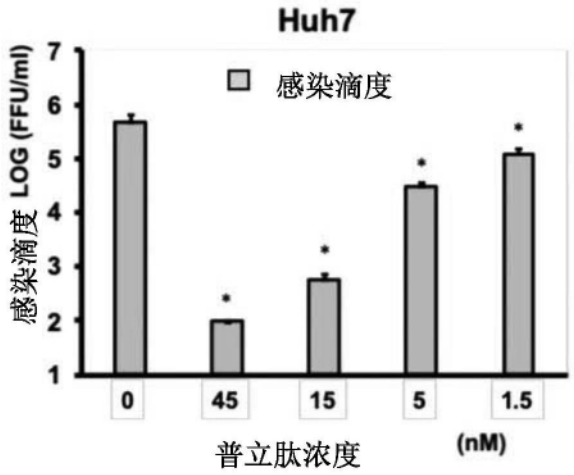

Huh7
感染滴度
感染滴度 LOG (FFU/ml)
7
6
5
4
3
2
1
0
45
15
5
1.5
(nM)
普立肽浓度

图48(b)

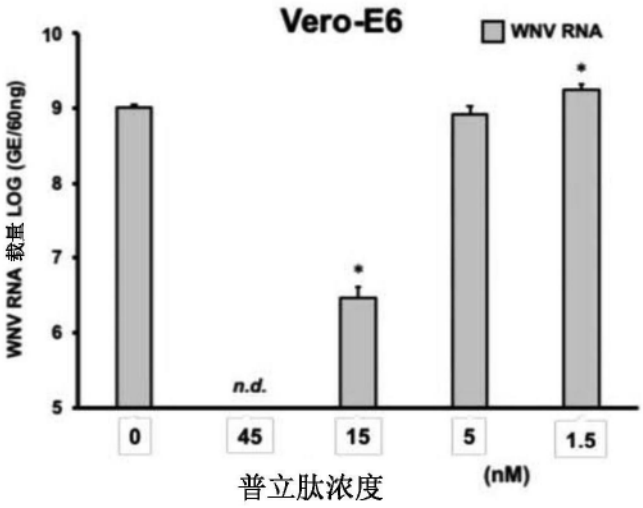

Vero-E6
WNV RNA
WNV RNA 载量 LOG (GE/60ng)
10
9
8
7
6
5
n.d.
0
45
15
5
1.5
(nM)
普立肽浓度

图49(a)

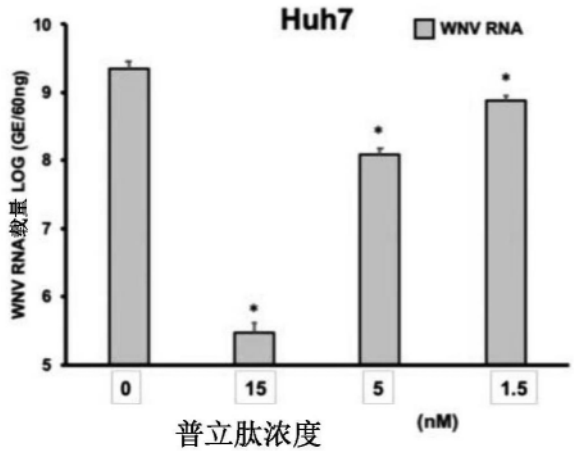


图49 (b)

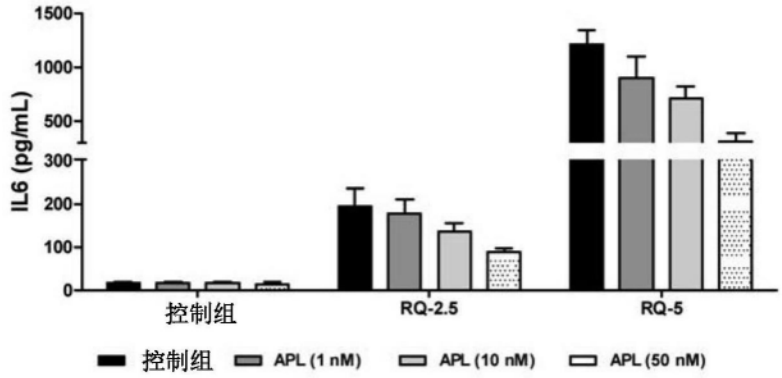


图50 (a)

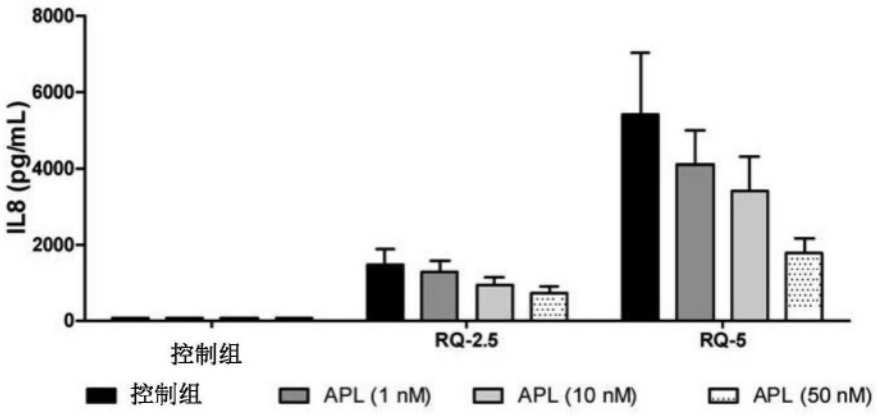


图50 (b)

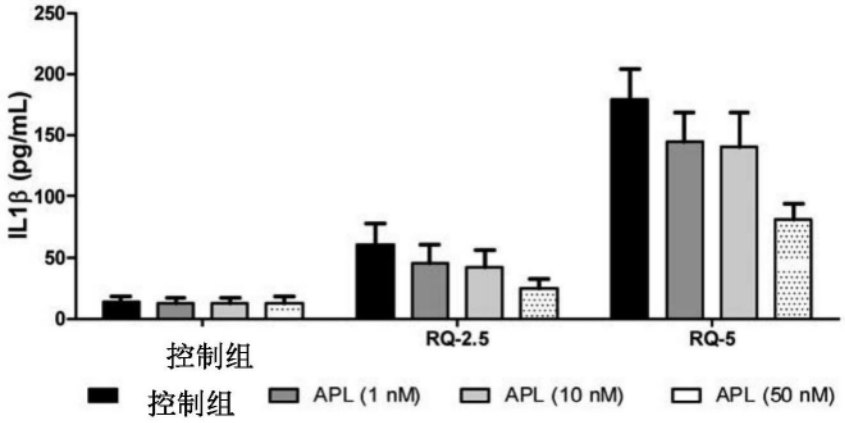


图50(c)

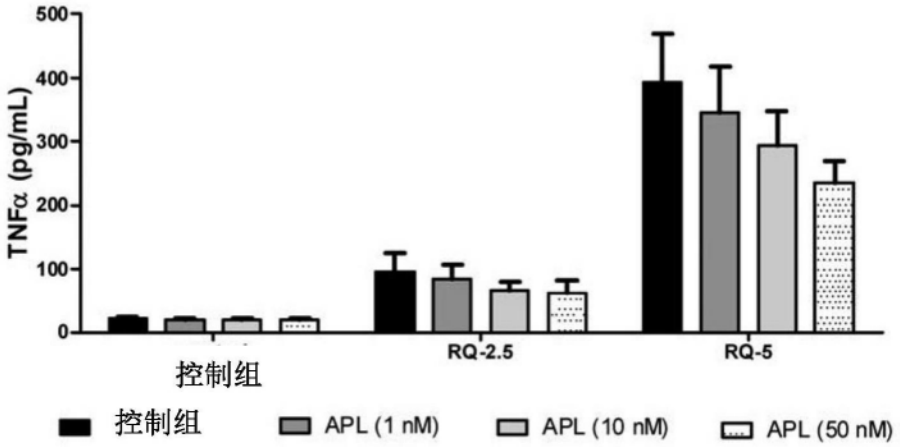


图50(d)

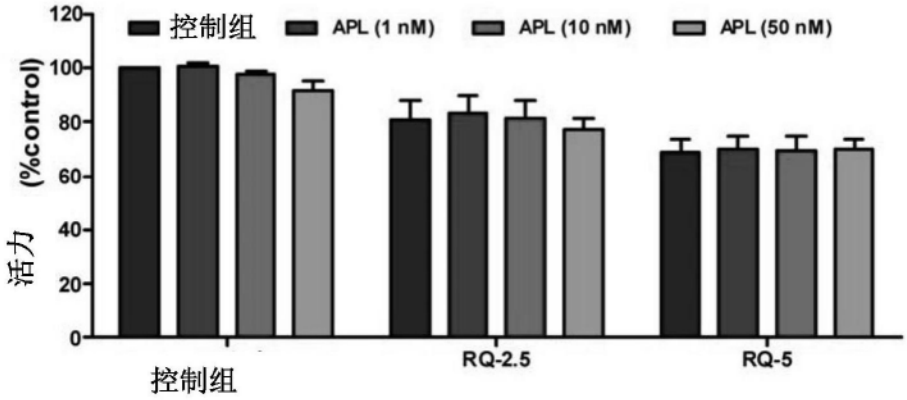


图50(e)

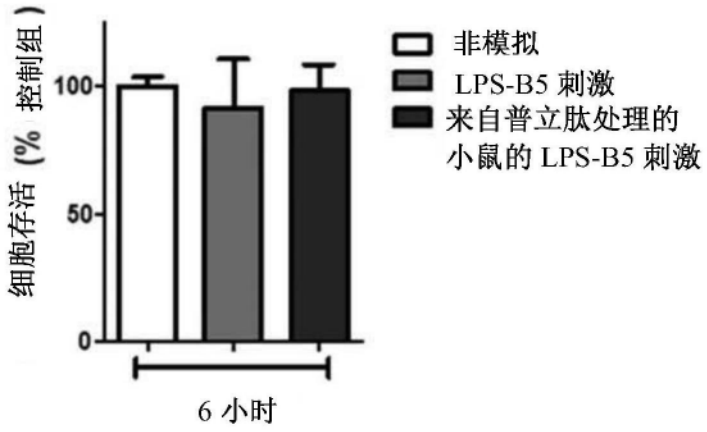


图51(a)

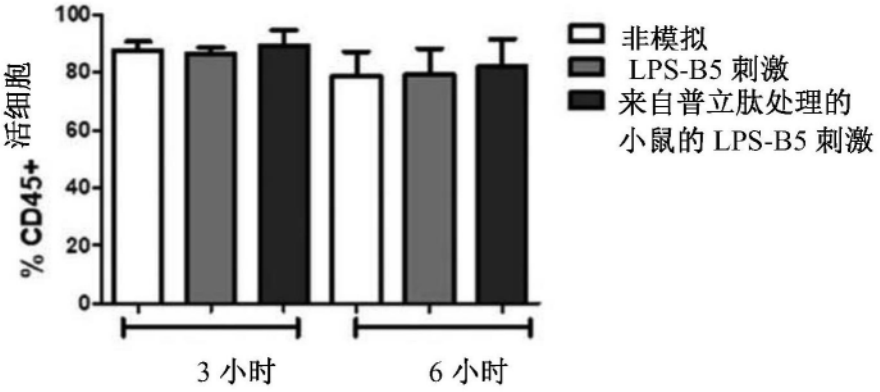


图51(b)

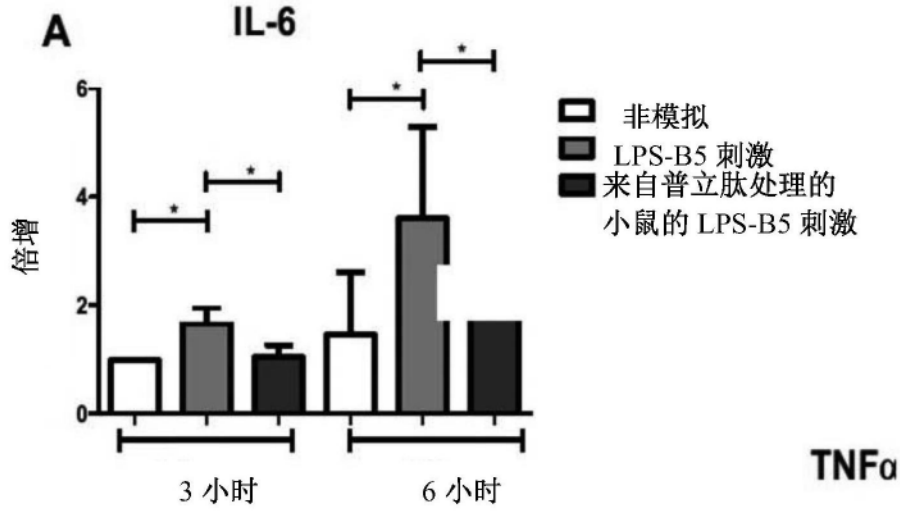


图51(c)

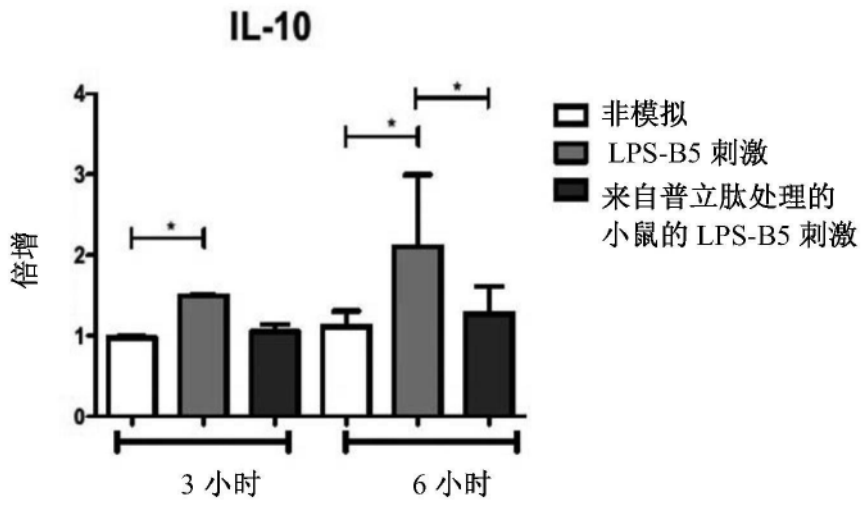

IL-10
倍增
4
3
2
1
0
*
*
*
3 小时
6 小时
非模拟
LPS-B5 刺激
来自普立肽处理的
小鼠的 LPS-B5 刺激

图51(d)

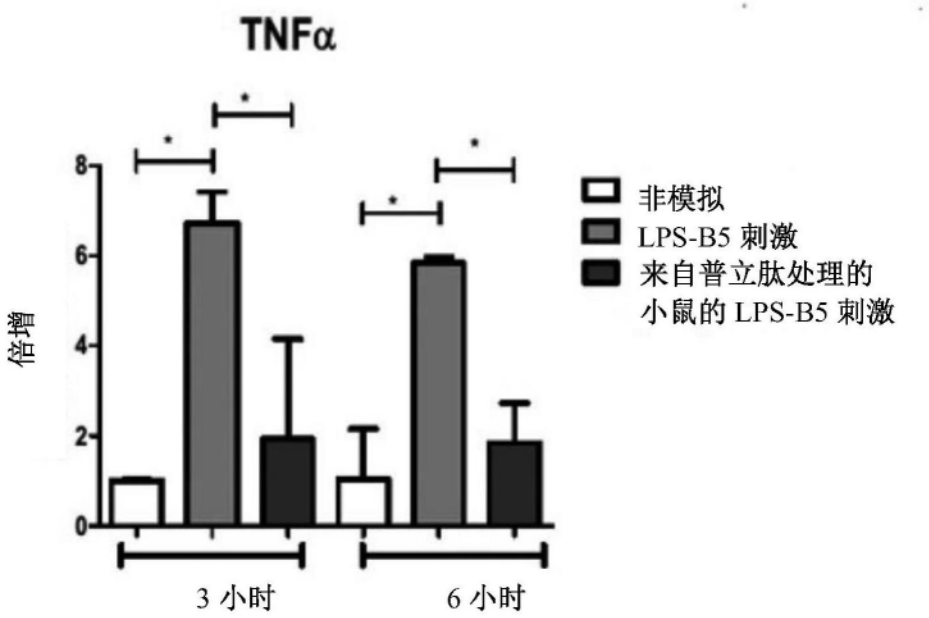

TNFα
倍增
8
6
4
2
0
*
*
*
*
3 小时
6 小时
非模拟
LPS-B5 刺激
来自普立肽处理的
小鼠的 LPS-B5 刺激

图51(e)

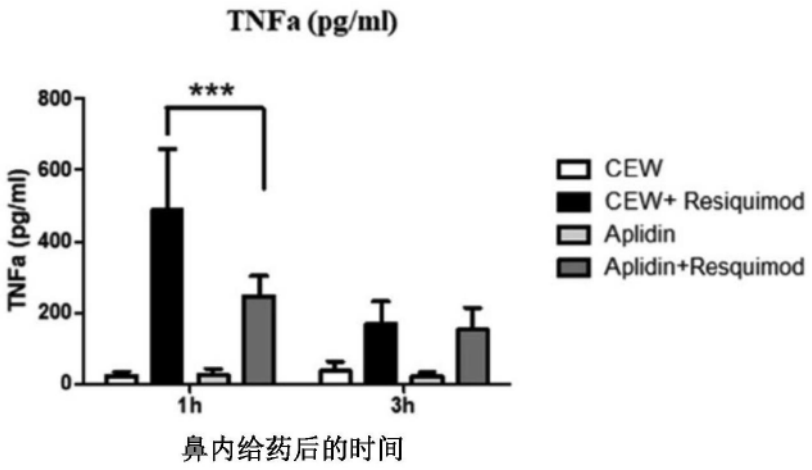

TNFa (pg/ml)
***
800
600
400
200
0
TNFa (pg/ml)
1h
3h
鼻内给药后的时间
CEW
CEW+ Resiquimod
Aplidin
Aplidin+Resquimod

图52

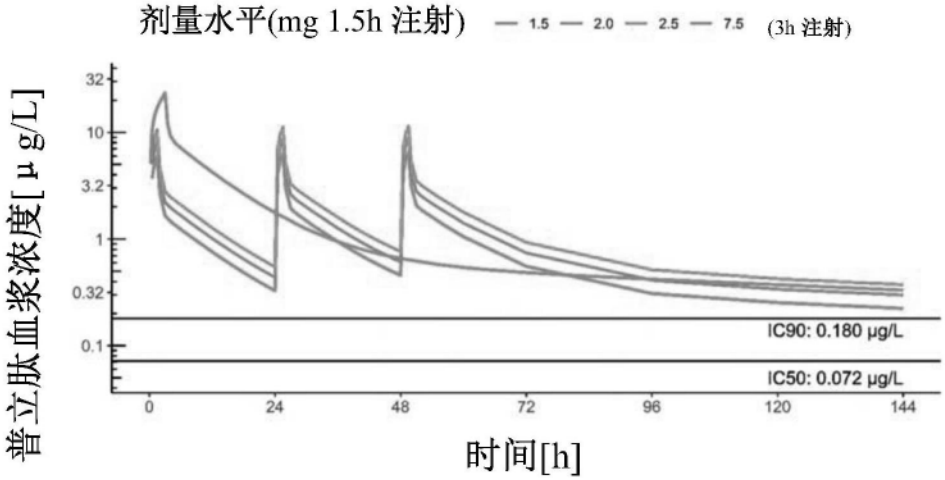

剂量水平(mg 1.5h 注射)
1.5
2.0
2.5
7.5
(3h 注射)
普立肽血浆浓度[μg/L]
32
10
3.2
1
0.32
0.1
IC90: 0.180 μg/L
IC50: 0.072 μg/L
0
24
48
72
96
120
144
时间[h]

图53