(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国 际 局

(43) 国际公布日
2021 年 9 月 10 日 (10.09.2021)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2021/175295 A1

(51) 国际专利分类号:
A61K 31/353 (2006.01) *A61P 31/12* (2006.01)
A61P 31/14 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2021/079138

(22) 国际申请日: 2021 年 3 月 4 日 (04.03.2021)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
202010153446.3 2020年3月6日 (06.03.2020) CN

(71) 申请人: 中国科学院上海药物研究所(SHANGHAI INSTITUTE OF MATERIA MEDICA, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) [CN/CN]; 中国上海市浦东张江祖冲之路 555 号, Shanghai 201203 (CN)。

(72) 发明人: 姚胜 (YAO, Sheng); 中国上海市浦东张江祖冲之路555号, Shanghai 201203 (CN)。 蒋翔锐 (JIANG, Xiangrui); 中国上海市浦东张江祖冲之路555号, Shanghai 201203 (CN)。 许叶春 (XU, Yechun); 中国上海市浦东张江祖冲之路555号, Shanghai 201203 (CN)。 王震 (WANG, Zhen); 中国上海市浦东张江祖冲之路555号, Shanghai 201203 (CN)。 谢元超 (XIE, Yuanchao); 中国上海市浦东张江祖冲之路555号, Shanghai 201203 (CN)。 沈敬山 (SHEN, Jingshan); 中国上海市浦东张江祖冲之路555号, Shanghai 201203 (CN)。 叶阳 (YE, Yang); 中国上海市浦东张江祖冲之路555号, Shanghai 201203 (CN)。

(74) 代理人: 上海一平知识产权代理有限公司 (XU & PARTNERS, LLC.); 中国上海市普陀区真北路 958 号天地科技广场 1 号楼 106 室, Shanghai 200333 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明，要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

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

本国际公布:
— 包括国际检索报告 (条约第21条 (3))。

(54) **Title:** APPLICATION OF MYRICETIN COMPOUND IN PREPARATION OF DRUGS FOR PREVENTION AND TREATMENT OF NOVEL CORONAVIRUS PNEUMONIA

(54) 发明名称: 杨梅素类化合物在制备防治新冠肺炎药物中的应用

(57) **Abstract:** Application of a myricetin compound in the preparation of drugs for prevention and treatment of novel coronavirus pneumonia. Specifically, the present invention relates to use of a myricetin compound and a pharmaceutical composition as a 2019 novel coronavirus (SARS-CoV-2) 3CL protease inhibitor in the preparation of drugs for treatment and/or prevention and alleviation of related diseases such as respiratory tract infections and pneumonia caused by 2019 novel coronavirus infections.

(57) 摘要: 杨梅素类化合物在制备防治新冠肺炎药物中的应用。具体而言，涉及杨梅素类化合物及其药物组合物作为2019新型冠状病毒(SARS-CoV-2)3CL蛋白酶抑制剂在制备治疗和/或预防、缓解由2019新型冠状病毒感染引起的呼吸道感染、肺炎等相关疾病的药物中的用途。

WO 2021/175295 A1

杨梅素类化合物在制备防治新冠肺炎药物中的应用

技术领域

本发明涉及医药领域，具体地涉及杨梅素类化合物在制备防治新冠肺炎药物中的应用。

背景技术

在急性传染病中，绝大部分都是病毒性传染病，病毒性传染病的发病率高，死亡率也很高。由于检测和诊断手段有限，导致新病毒引发的新疫情爆发往往具有突发性、随机性和不可预测性等特点，一旦爆发，如无有效的防治手段，极易造成大规模流行，严重威胁人民健康生命安全。

新型冠状病毒(SARS-CoV-2)感染可引起严重肺炎。SARS-CoV-2 病毒传播途径未完全掌握，已知能通过飞沫和接触传播，且存在人传人、医务人员感染，一定社区传播风险，且病毒存在变异的可能。目前对于新型冠状病毒所致疾病没有特异的预防和治疗方法。

SARS-CoV-2 冠状病毒属于冠状病毒科冠状病毒属，为具有包膜的单链正义 RNA 病毒。和其他已知冠状病毒类似，SARS-CoV-2 冠状病毒也经过吸附、穿入、脱壳、生物合成、子代病毒的组装与释放等几个过程完成子代病毒的增殖。SARS-CoV-2 冠状病毒感染宿主细胞起始于病毒包膜表面的刺突糖蛋白与宿主细胞表面的受体结合，随后发生膜融合，病毒进入宿主细胞，在细胞溶酶体等细胞器作用下，释放出病毒的遗传物质单链正义 RNA，在宿主细胞的线粒体、核糖体等蛋白质合成元件以及必须的原料等作用下，翻译产生多聚蛋白，之后，SARS-CoV-2 冠状病毒的两大必需半胱氨酸蛋白酶：木瓜样蛋白酶(papain-like protease,PL^{pro})和 3C 样蛋白酶(3C-like protease,$3CL^{pro}$)在特定位点切割加工多聚蛋白前体，产生多个对病毒生命周期非常重要的非结构蛋白。在这些非结构蛋白的作用下，病毒 RNA 复制出子代病毒核酸物质，并大量翻译出所需的结构蛋白，完成子代病毒的组装和释放。SARS-CoV-2 冠状病毒感染细胞的生命周期的任何环节或关键酶均可以作为抗病毒药物的研究靶点，如水解切割多聚蛋白前体的半胱氨酸蛋白酶 PL^{pro} 和 $3CL^{pro}$，负责完成子代病毒遗传物质复制的 RNA 聚合酶等。

3CL 蛋白酶(3 chymotrypsin-like protease,$3CL^{pro}$)，又称主蛋白酶(M^{pro})，是冠状病毒 RNA 翻译出多聚蛋白 pp1a 和 pp1ab 后水解产生多个非结构蛋白过程中的关键蛋白酶，对病毒的复制和感染至关重要，抑制 3CL 蛋白酶的催化功能可有效抑制病毒多聚蛋白前体的切割，阻断病毒复制，抑制子代病毒生成。$3CL^{pro}$ 属于半胱氨酸蛋白酶，是催化单正链 RNA 病毒前体蛋白水解的关键蛋白酶，对 SARS-CoV-2 等冠状病毒的复制活性具有重要的作用。因此，$3CL^{pro}$ 是目前公认的研发抗冠状病毒药物的理想靶点。

目前，针对 SARS-CoV-2 冠状病毒导致的严重肺炎疾病尚无特效的疫苗和抗病毒药物。这些感染性疾病严重影响了人们的生命健康，研发效果好的抗病毒药物迫在眉睫。针对 SARS-CoV-2 冠状病毒 $3CL^{pro}$ 开发出低毒高效的抗病毒药物，以满足国内外 SARS-CoV-2 冠状病毒感染患者的临床需求，具有重大的社会意义。

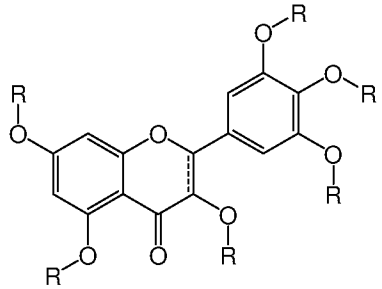
综上所述，本领域迫切需要开发针对 SARS-CoV-2 冠状病毒 3CL 蛋白酶的抑制剂用于治疗新型冠状病毒感染引起的肺炎。

发明内容

本发明的目的是提供一种可有效抑制冠状病毒 3CL 蛋白酶的活性成分及其在抑制冠状病毒方面的新用途。

具体地，本发明提供了式 I 所示的杨梅素类化合物及其组合物在抗冠状病毒尤其是新型冠状病毒(SARS-CoV-2)中的用途。

在本发明第一方面，提供了一种活性成分或含所述活性成分的制剂的用途(或制药用途)，所述的活性成分为式 I 化合物或其药学上可接受的盐：



(I)

式中，

每个R各自独立地为H、C_1-C_3烷基、或乙酰基；

┅为双键或单键；

并且，所述的活性成分或含所述活性成分的制剂被用于制备(a)抑制 2019 新型

冠状病毒(SARS-CoV-2) 3CL 蛋白酶的抑制剂；和/或(b)治疗和/或预防、缓解由2019新型冠状病毒(SARS-CoV-2)感染引起的相关疾病的药物。

在另一优选例中，所述由2019新型冠状病毒感染引起的相关疾病选自下组：呼吸道感染、肺炎及其并发症、或其组合。

在另一优选例中，所述的活性成分选自下组：

(Z1) 杨梅素、或其药学上可接受的盐

(Z2) 二氢杨梅素、或其药学上可接受的盐

(Z3) 3-O-乙酰二氢杨梅素、或其药学上可接受的盐；

(Z4) 上述Z1～Z3的任意组合。

在另一优选例中，所述的活性成分选自下组：杨梅素、二氢杨梅素、3-O-乙酰二氢杨梅素。

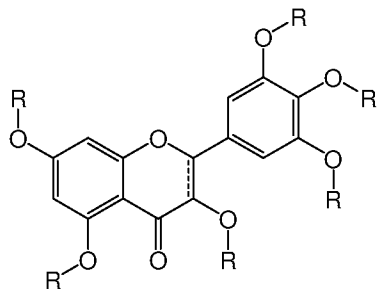
在另一优选例中，所述的药物还包括选自下组的额外组分：抗逆传录病毒的药物或增强免疫力的药物。

在另一优选例中，所述的组合物或药物包括：口服制剂和非口服制剂。

在另一优选例中，所述的制剂包括：粉剂、颗粒剂、胶囊剂、注射剂、酊剂、口服液、片剂、含片、或滴丸。

在本发明的第二方面，提供了一种药物组合物，所述的药物组合物含有：

(a1)第一活性成分，所述的第一活性成分为式I所示的杨梅素类化合物或其药学上可接受的盐：



(I)

式中，

每个R各自独立地为H、C_1-C_3烷基、或乙酰基；

┅为双键或单键；

(a2)任选的第二活性成分，所述的第二活性成分选自下组：(Y1) RNA复制酶抑制剂(如Remdesivir(瑞德西韦或GS-5734))；(Y2) 洛匹那韦(Lopinavir)；(Y3) 利托那韦(Ritonavir)；(Y4) 法匹拉韦；(Y5) 氯喹(Chloroquine,Sigma-C6628)、羟氯喹、或其药学上可接受的盐(如磷酸氯喹)、(Y6)上述Y1～Y5的任意组合；

以及(b)药学上可接受的载体。

在另一优选例中，每个R各自独立地为H、或乙酰基；

在另一优选例中，R为H。

在另一优选例中，所述的第一活性成分选自下组：

(Z1) 杨梅素、或其药学上可接受的盐；

(Z2) 二氢杨梅素、或其药学上可接受的盐；

(Z3) 3-O-乙酰二氢杨梅素、或其药学上可接受的盐；

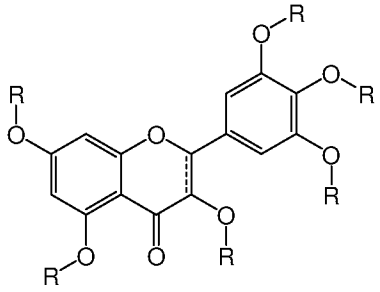
(Z4) 上述Z1～Z3的任意组合。

在另一优选例中，所述的药物组合物为用于抑制2019新型冠状病毒(SARS-CoV-2) 3CL蛋白酶的药物组合物。

在本发明的第三方面，提供了本发明第二方面中所述的药物组合物的用途，它被用于制备(a)抑制2019新型冠状病毒(SARS-CoV-2) 3CL蛋白酶的抑制剂；和/或(b)治疗和/或预防、缓解由2019新型冠状病毒(SARS-CoV-2)感染引起的相关疾病的药物。

在本发明的第四方面，提供了一种抑制2019新型冠状病毒(SARS-CoV-2) 3CL蛋白酶的方法，包括步骤：将第一活性成分或含所述第一活性成分的制剂与2019新型冠状病毒(SARS-CoV-2)的3CL蛋白酶接触，从而抑制所述3CL蛋白酶的活性；

其中，所述的第一活性成分为式I化合物或其药学上可接受的盐：



(I)

式中，

每个R各自独立地为H、C_1-C_3烷基、或乙酰基；

------为双键或单键；

在另一优选例中，所述的第一活性成分为选自下组的杨梅素类化合物：

(Z1) 杨梅素、或其药学上可接受的盐

(Z2) 二氢杨梅素、或其药学上可接受的盐

(Z3) 3-O-乙酰二氢杨梅素、或其药学上可接受的盐；

(Z4) 上述 Z1～Z3 的任意组合。

在另一优选例中，所述的方法中与 2019 新型冠状病毒(SARS-CoV-2)的 3CL 蛋白酶接触的式 I 化合物或其药学上可接受的盐的浓度为 0.5-20 μM，较佳地为 1-10 μM。

在另一优选例中，所述方法是体外方法。

在另一优选例中，所述方法是非治疗性和非诊断性的。

应理解，在本发明范围内中，本发明的上述各技术特征和在下文(如实施例)中具体描述的各技术特征之间都可以互相组合，从而构成新的或优选的技术方案。限于篇幅，在此不再一一累述。

附图说明

图1显示了杨梅素对SARS-CoV-2蛋白酶的抑制曲线。

图2显示了二氢杨梅素对SARS-CoV-2蛋白酶的抑制曲线。

图3显示了3-O-乙酰二氢杨梅素对SARS-CoV-2蛋白酶的抑制曲线。

具体实施方式

本发明人经过广泛而深入的研究，通过大量筛选，首次意外地开发了一类可有效抑制 2019 新型冠状病毒(SARS-CoV-2)等冠状病毒的 3CL 蛋白酶的活性成分。实验表明，本发明的活性成分(以杨梅素、二氢杨梅素、3-O-乙酰二氢杨梅素为代表的式 I 化合物或其药学上可接受的盐)可高效地抑制 2019 新型冠状病毒(SARS-CoV-2)等冠状病毒的 3CL 蛋白酶的活性，从而抑制 SARS-CoV-2 冠状病毒的复制和活力。在此基础上完成了本发明。

具体地，本发明揭示了杨梅素、二氢杨梅素、3-O-乙酰二氢杨梅素及其组合物在抗冠状病毒的用途，尤其是在抗 SARS-CoV-2 病毒治疗中的用途。杨梅素、二氢杨梅素、3-O-乙酰二氢杨梅素及其组合物对冠状病毒复制必不可少且高度保守的 3CL 水解酶具有优良的抑制作用，具有良好的临床应用前景。

术语

如本文所用，“本发明的活性化合物”、“本发明的活性成分”、“本发明的抑制 3CL 蛋白酶的活性化合物”可互换使用，指具有优异的 3CL 蛋白酶抑制活性

的杨梅素类化合物，包括式 I 所示的化合物，例如杨梅素、二氢杨梅素、3-O-乙酰二氢杨梅素或其药学上可接受的盐、或其组合。

如本文所用，“本发明的制剂”指含有本发明活性化合物的制剂。

如本文所用，术语“包括”或其变换形式如“包含”或“包括有”等等，被理解为包括所述的元件或组成部分，而并未排除其它元件或其它组成部分。

如本文所用，术语“新型冠状病毒”、“2019-nCov”或“SARS-CoV-2”可互换使用，该 2019 新型冠状病毒是已知感染人的第 7 种冠状病毒，并且造成新冠肺炎(COVID-19)，是威胁全球人类健康的严重传染性疾病之一。

冠状病毒和 3CL 蛋白酶

冠状病毒(Coronavirus，CoV)属于套式病毒目(Nidovirales)冠状病毒科(Coronaviridae)，是一种有包膜的正链 RNA 病毒，其亚科包含α、β、δ及γ四属。

目前已知的感染人的冠状病毒中，HCoV-229E 和 HCoV-NL63 属于α属冠状病毒，HCoV-OC43、SARS-CoV、HCoV-HKU1、MERS-CoV 和 SARS-CoV-2 均为β属冠状病毒。SARS-CoV-2 也被称为 2019-nCov。

2003 年和 2012 年分别爆发的高致病性冠状病毒“非典”SARS-CoV 和“中东呼吸综合征”MERS-CoV 均属于 β 属冠状病毒。2019 年年底爆发的新型冠状病毒(SARS-CoV-2)与 SARS-CoV 有约 80%相似性、与 MERS-CoV 有 40%的相似性，也属于 β 属冠状病毒。

该类病毒的基因组是一条单股正链 RNA，是基因组最大的 RNA 病毒之一，编码包括复制酶、刺突蛋白、囊膜蛋白、包膜蛋白和核壳蛋白等。在病毒复制的初始阶段，基因组被翻译成两条长达几千个氨基酸的肽链即前体多聚蛋白(Polyprotein)，随后前体蛋白被蛋白酶切割生成非结构蛋白(如 RNA 聚合酶和解旋酶)和结构蛋白(如刺突蛋白)及辅助蛋白。

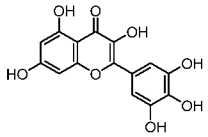
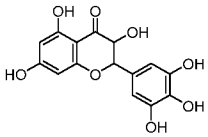
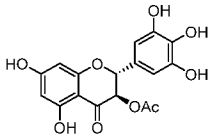
3CL 蛋白酶(3 Chymotrypsin-like protease，3CLpro)是冠状病毒中负责切割前体蛋白的主蛋白酶(所以又称为 M^{pro})，对病毒的复制不可或缺。

3CLpro 属于半胱氨酸水解酶，在各类冠状病毒中高度保守，与小 RNA 病毒中的 3C 蛋白酶也比较相似，而人体中却没有与其相似的蛋白酶，因而是研发广谱抗单正链 RNA 病毒药物的理想靶点。

本发明的活性化合物和活性成分

在本发明中，提供了一种可有效抑制 2019 新型冠状病毒(SARS-CoV-2)等冠状病毒复制的活性成分。该活性成分选自下组：杨梅素、二氢杨梅素、3-O-乙酰二氢杨梅素、或其药学上可接受的盐、或其组合、或其晶体、或其溶剂化物。

杨梅素、二氢杨梅素、3-O-乙酰二氢杨梅素的结构式如下：

名称	结构
杨梅素	
二氢杨梅素	
3-O-乙酰二氢杨梅素	

试验表明，本发明的活性成分可有效地抑制 2019 新型冠状病毒(SARS-CoV-2)的 3CL 蛋白酶，从而抑制 2019 新型冠状病毒(SARS-CoV-2)的复制，进而预防、治疗和/或缓解 SARS-CoV-2 相关疾病。

如本文所用，“本发明的活性化合物”、“本发明的抑制 3CL 蛋白酶的活性化合物”可互换使用，指具有优异的 3CL 蛋白酶抑制活性的化合物，包括杨梅素、二氢杨梅素、3-O-乙酰二氢杨梅素、或其药学上可接受的盐、或其晶体、或其溶剂化物。

应理解，本发明的活性成分包括本发明的抑制 3CL 蛋白酶的活性化合物、或其药学上可接受的盐、对映异构体、非对映异构体或外消旋体、或其前药。应理解，本发明的活性成分还包括本发明的活性化合物的晶型、无定形化合物、以及氘代化合物等形式。

所述“药学上可接受的盐”为本发明的活性化合物与无机酸或有机酸反应形成常规的无毒盐。例如，常规的无毒盐可通过本发明的活性化合物与无机酸或有机酸反应制得，所述无机酸包括盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、胺基磺酸和磷酸等，所述有机酸包括柠檬酸、酒石酸、乳酸、丙酮酸、乙酸、苯磺酸、对甲苯磺酸、甲磺酸、萘磺酸、乙磺酸、萘二磺酸、马来酸、苹果酸、丙二酸、富马酸、琥珀酸、丙

酸、 草酸、三氟乙酸、硬酯酸、扑酸、羟基马来酸、苯乙酸、苯甲酸、水杨酸、谷氨酸、抗坏血酸、对胺基苯磺酸、2-乙酰氧基苯甲酸和羟乙磺酸等；或者本发明的活性化合物与丙酸、草酸、丙二酸、琥珀酸、富马酸、马来酸、乳酸、苹果酸、酒石酸、柠檬酸、天冬氨酸或谷氨酸形成酯后再与无机碱形成的钠盐、钾盐、钙盐、铝盐或铵盐；或者本发明的活性化合物与赖氨酸、精氨酸、鸟氨酸形成酯后再与盐酸、氢溴酸、氢氟酸、硫酸、硝酸或磷酸形成的对应的无机酸盐或与甲酸、乙酸、苦味酸、甲磺酸或乙磺酸形成的对应的有机酸盐。

此外，本发明的活性成分还特别适合与其他抗病毒的药物联用。代表性的其他的抗病毒药物包括(但并不限于)：逆转录酶抑制剂、蛋白酶抑制剂、辅助受体拮抗剂、逆转录病毒整合酶抑制剂、病毒吸附抑制剂、特异性病毒转录抑制剂、抗体、或其组合。

本发明的活性成分可抑制 SARS-CoV-2 等新型冠状病毒的感染活性。因此，当在治疗上施用或给予本发明的的活性成分时，可抑制 3CL 蛋白酶活性，从而抑制 2019 新型冠状病毒(SARS-CoV-2)的感染，进而达到抗病毒作用。

药物组合物和应用

本发明还提供了以本发明的抑制 3CL 蛋白酶的活性化合物、或其药学上可接受的盐、或其前药、或其提取物、或其药材中的一种或多种的混合物为有效成分在制备治疗和/或预防、缓解由 2019 新型冠状病毒感染引起的呼吸道感染、肺炎等相关疾病的药物中的用途。

本发明所提供的药物组合物优选含有重量比为 0.001-99wt%的活性成份，优选的比例是本发明的活性化合物作为活性成分占总重量的 0.1wt%～90wt%或 1wt%～50wt%，其余部分为药学可接受的载体、稀释液或溶液或盐溶液。

需要的时候，在本发明药物中还可以加入一种或多种药学上可接受的载体。所述载体包括药学领域常规的稀释剂、赋形剂、填充剂、粘合剂、润湿剂、崩解剂、吸收促进剂、表面活性剂、吸附载体、润滑剂等。

本发明所提供的化合物和药物组合物可以是多种形式，如片剂、胶囊、粉剂、糖浆、溶液状、悬浮液和气雾剂等，并可以存在于适宜的固体或液体的载体或稀释液中和适宜的用于注射或滴注的消毒器具中。

本发明的药物组合物的各种剂型可按照药学领域的常规制备方法制备。其制剂配方的单位计量中通常包含 0.05-400mg 本发明的活性化合物，优选地，制剂配方的单位计量中包含 1mg-500mg 本发明的活性化合物。

本发明的化合物和药物组合物可对哺乳动物临床使用，包括人和动物，可以通过口、鼻、皮肤、肺或者胃肠道等的给药途径。最优选为口服。最优选日剂量为0.01-400 mg/kg 体重，一次性服用，或 0.01-200 mg/kg 体重分次服用。不管用何种服用方法，个人的最佳剂量应依据具体的治疗而定。通常情况下是从小剂量开始，逐渐增加剂量一直到找到最适合的剂量。

本发明的药物或抑制剂可通过各种不同方式施用，例如可通过注射、喷射、滴鼻、滴眼、渗透、吸收、物理或化学介导的方法导入机体如肌肉、皮内、皮下、静脉、粘膜组织；或是被其他物质混合或包裹导入机体。

本发明的主要优点包括：

(a)本发明活性化合物可高效地抑制SARS-CoV-2 3CL蛋白酶，IC_{50}值小于2μM，最优的杨梅素的IC_{50}值为约0.64μM

(b)本发明活性化合物的毒副作用低，成药性好。这提示着本发明的杨梅素类化合物在抗新冠肺炎领域有很好的药用前景。

下面结合具体实施例，进一步阐述本发明。应理解，这些实施例仅用于说明本发明而不用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件，或按照制造厂商所建议的条件。除非另外说明，否则百分比和份数按重量计算。

实施例 1：杨梅素类化合物针对 SARS-CoV-2 M^{pro}蛋白酶的实验测试

1.1.方法

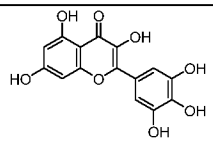
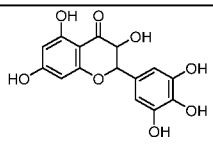
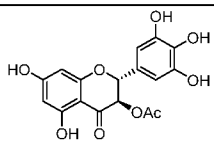
在本实施例中，测定不同的化合物对 SARS-CoV-2 M^{pro}蛋白酶(SARS-CoV-2 3CLpro)的抑制活性，方法为：利用荧光共振能量转移 (fluorescence resonance energy transfer FRET)技术测定针对 3CL 蛋白酶的抑制剂的酶水平抑制活性。整个酶促反应体系的体积为 120 μL，蛋白酶的终浓度为 30 nM，底物终浓度为 20 μM。反应体系的缓冲液包括 50 mM Tris pH7.3、1 mM EDTA。在 96 孔板中加入 2019 新型冠状病毒(SARS-CoV-2)的 3CL 蛋白酶和不同浓度的测试化合物，30℃孵育 10 min，加入底物并迅速放入酶标仪中读数。激发光和发射光分别为 320 nm 和 405 nm。测试时间为 10 min，每隔 30 s 读一次荧光值，拟合出反应速率，并与对照组(DMSO)比较，计算抑制率和 IC50 值。

1.2 结果

如图 1、图 2、图 3 以及表 1 所示，杨梅素抑制新型冠状病毒(SARS-CoV-2)的 3CL 蛋白酶活活性的 IC50 值为 0.64 μM，二氢杨梅素抑制新型冠状病毒(SARS-CoV-2)的 3CL 蛋白酶活活性的 IC50 值为 1 μM，3-O-乙酰二氢杨梅素抑制新型冠状病毒(SARS-CoV-2)的 3CL 蛋白酶活活性的 IC50 值为 1.72 μM。

由此可见以杨梅素、二氢杨梅素、3-O-乙酰二氢杨梅素为代表的杨梅素类化合能有效抑制新型冠状病毒(SARS-CoV-2)的 3CL 蛋白酶活性，从而有效帮助预防和/或治疗新型冠状病毒引起的疾病。

表 1. 杨梅素类化合物对 SARS-CoV-2 蛋白酶的抑制活性

名称	结构	2019-CoV-3CL水解酶IC_{50}
杨梅素		0.640 μM
二氢杨梅素		1.0 μM
3-O-乙酰二氢杨梅素		1.72 μM

讨论

在本发明之前，杨梅素、二氢杨梅素、3-O-乙酰二氢杨梅素或其药学上可接受的盐对 2019 新型冠状病毒(SARS-CoV-2) 3CL 水解酶的抑制作用尚未见报道。

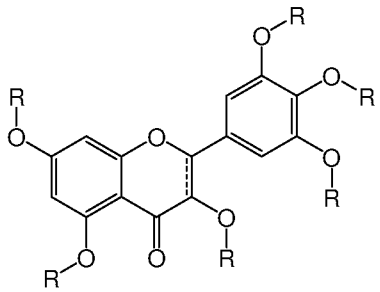
在本发明中，本发明人首次公开了杨梅素、二氢杨梅素、3-O-乙酰二氢杨梅素或其药学上可接受的盐对 SARS-CoV-2 的 3CLpro 具有显著的抑制作用，IC_{50}达到个位数微摩尔级别，尤其是杨梅素的 IC50 仅为 0.640 μM。因此，杨梅素、二氢杨梅素、3-O-乙酰二氢杨梅素或其药学上可接受的盐具有优异的抗 2019 新型冠状病毒(SARS-CoV-2)活性，具有良好的临床应用前景。

在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考，就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解，在阅读了本发明的上述讲授内容之后，本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改，这些等价形式同样落于本申请所附权

利要求书所限定的范围。

权利要求

1. 一种活性成分或含所述活性成分的制剂的用途，其特征在于，所述的活性成分为式 I 化合物或其药学上可接受的盐：



(I)

式中，

每个R各自独立地为H、C_1-C_3烷基、或乙酰基；

为双键或单键；

并且，所述的活性成分或含所述活性成分的制剂被用于制备(a)抑制 2019 新型冠状病毒(SARS-CoV-2) 3CL 蛋白酶的抑制剂；和/或(b)治疗和/或预防、缓解由 2019 新型冠状病毒(SARS-CoV-2)感染引起的相关疾病的药物。

2. 如权利要求 1 所述的用途，其特征在于，所述由 2019 新型冠状病毒感染引起的相关疾病选自下组：呼吸道感染、肺炎及其并发症、或其组合。

3. 如权利要求 1 所述的用途，其特征在于，所述的活性成分选自下组：

(Z1) 杨梅素、或其药学上可接受的盐；

(Z2) 二氢杨梅素、或其药学上可接受的盐；

(Z3) 3-O-乙酰二氢杨梅素、或其药学上可接受的盐；

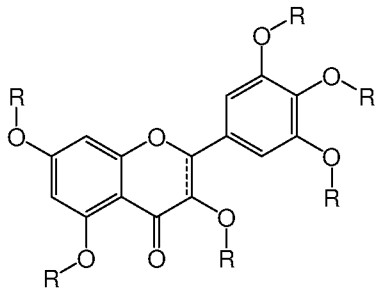
(Z4) 上述 Z1～Z3 的任意组合。

4. 如权利要求1所述的用途，其特征在于，R为H。

5. 如权利要求1所述的用途，其特征在于，所述的组合物或药物包括：口服制剂和非口服制剂。

6. 一种药物组合物，其特征在于，所述的药物组合物含有：

(a1)第一活性成分，所述的第一活性成分为式 I 所示的杨梅素类化合物或其药学上可接受的盐：



(I)

式中，

每个R各自独立地为H、C_1-C_3烷基、或乙酰基；

-----为双键或单键；

(a2)任选的第二活性成分，所述的第二活性成分选自下组：(Y1) RNA 复制酶抑制剂(如 Remdesivir(瑞德西韦或 GS-5734))；(Y2) 洛匹那韦(Lopinavir)；(Y3) 利托那韦(Ritonavir)；(Y4) 法匹拉韦；(Y5) 氯喹(Chloroquine,Sigma-C6628)、羟氯喹、或其药学上可接受的盐(如磷酸氯喹)、(Y6)上述 Y1～Y5 的任意组合；

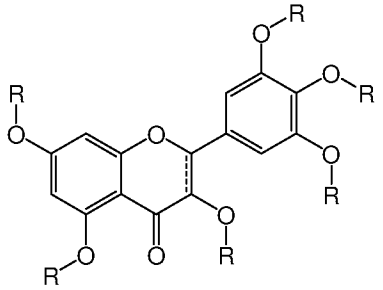
以及(b)药学上可接受的载体。

7. 如权利要求 6 所述的药物组合物，其特征在于，所述的药物组合物为用于抑制 2019 新型冠状病毒(SARS-CoV-2) 3CL 蛋白酶的药物组合物。

8. 一种权利要求 6 所述的药物组合物的用途，其特征在于，用于制备(a)抑制 2019 新型冠状病毒(SARS-CoV-2) 3CL 蛋白酶的抑制剂；和/或(b)治疗和/或预防、缓解由 2019 新型冠状病毒(SARS-CoV-2)感染引起的相关疾病的药物。

9.一种抑制 2019 新型冠状病毒(SARS-CoV-2) 3CL 蛋白酶的方法，其特征在于，包括步骤：将第一活性成分或含所述第一活性成分的制剂与 2019 新型冠状病毒(SARS-CoV-2)的 3CL 蛋白酶接触，从而抑制所述 3CL 蛋白酶的活性；

其中，所述的第一活性成分为式 I 化合物或其药学上可接受的盐：



(I)

式中，

每个R各自独立地为H、C_1-C_3烷基、或乙酰基；

-----为双键或单键。

10.如权利要求9所述的方法，其特征在于，与2019新型冠状病毒(SARS-CoV-2)的 3CL 蛋白酶接触的式 I 化合物或其药学上可接受的盐的浓度为 0.5-20 μM。

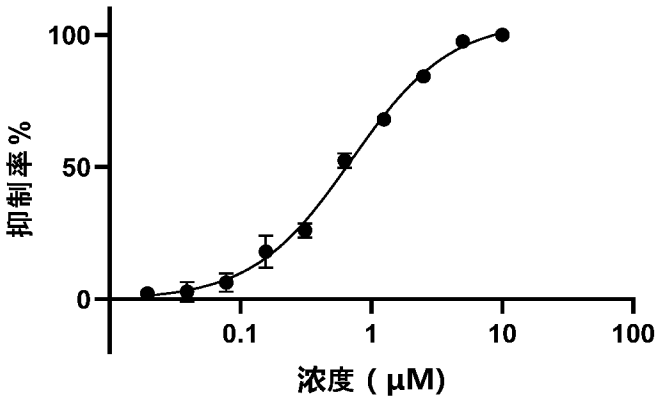

100
50
0
抑制率%
0.1
1
10
100
浓度（μM)

图 1

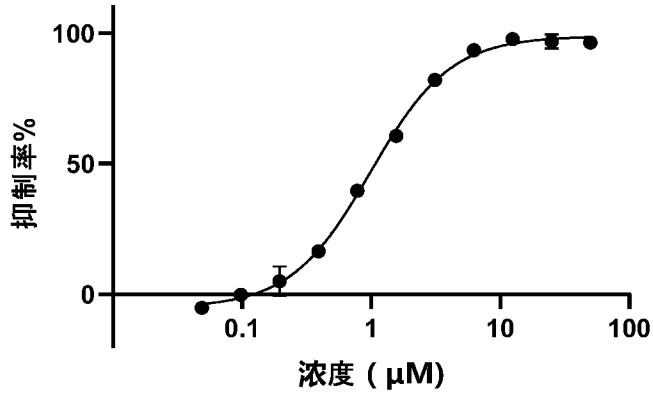

100
50
0
抑制率%
0.1
1
10
100
浓度（μM)

图 2

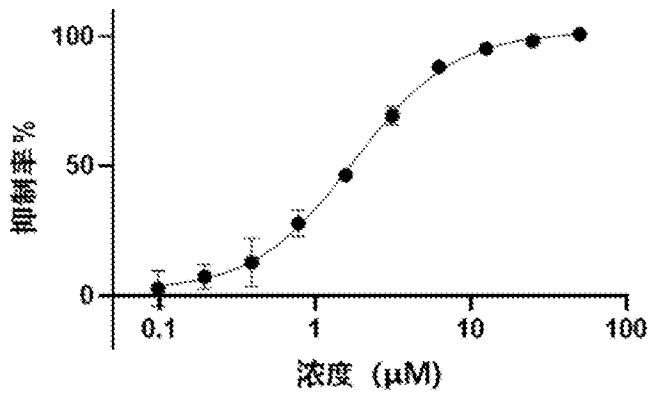

100
50
0
抑制率%
0.1
1
10
100
浓度（μM)

图 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2021/079138

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 31/353(2006.01)i; A61P 31/14(2006.01)i; A61P 31/12(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K; A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNABS, CNTXT, SIPOABS, DWPI, WOTXT, EPTXT, USTXT, CNKI, 万方, WANFANG, 读秀, DUXIU, PUBMED, ISI_Web of Science, Science Direct, STNext: 杨梅素, 结构检索, 冠状病毒, 新冠, 肺炎, 蛋白酶, 主蛋白酶, 瑞德西韦, 洛匹那韦, 利托那韦, 利托那维, 法匹拉韦, 羟基氯喹, 羟氯奎, 氯喹啉, 氯化喹啉, 氯奎, 磷酸氯喹, 氯喹啉二磷酸盐, 二磷酸氯喹, 磷酸氯奎, 氯喹磷酸盐, 磷酸氯哇, 氯喹二磷酸盐, structure, Coronavirus, SARS-cov, 2019-nCoV, COVID19, sars-cov, SARS-COV-2, 3C-like protease, 3CL, GS 5734, Remdesivir; GS-5734, ABT 378, Kaletra, Lopinavir, A-84538, NORVIR, ABT-538, A 84538, Abbott 84538, ABT 538, Norvir, NSC 693184, Ritonavir, RTV, Favipiravir, T 705, T-705, QD-Z0212, favipiravird, T705, Avigan, Oxychloroquine, Hydroxychloroquine, Plaquenil; Ercoquin, Quensyl, chloroquine, CQ, CAS: 1809249-37-3, 155213-67-5, 118-42-3, 259793-96-9, 118-42-3, 54-05-7, 50-63-5

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	MANI, J. S. et al. "Natural Product-derived Phytochemicals as Potential Agents against Coronaviruses: A Review" *Virus Research,* Vol. 284, 30 April 2020 (2020-04-30), pp. 1-16	1-10
PX	LIU, H. B. et al. "Scutellaria Baicalensis Extract and Baicalein Inhibit Replication of SARS-CoV-2 and its 3C-like Protease in Vitro" *BioRxiv,* 10 April 2020 (2020-04-10), pp. 1-18	1-10
X	NGUYEN, T. T. H. et al. "Flavonoid-mediated Inhibition of SARS Coronavirus 3C-like Protease Expressed in Pichia Pastoris" *Biotechnol Lett.,* Vol. 34, 15 February 2012 (2012-02-15), pp. 831-838	1-5, 9, 10

☑ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
24 May 2021	**03 June 2021**
Name and mailing address of the ISA/CN **China National Intellectual Property Administration (ISA/CN)** **No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088** **China** Facsimile No. **(86-10)62019451**	Authorized officer Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	陈君 等 (CHEN, Jun et al.). "氯喹对杨梅素诱导HeLa细胞凋亡的影响 (Effect of Chloroquine on Myricetin Induced Apoptosis in HeLa Cells)" *中国妇幼保健 (Maternal & Child Health Care of China),* Vol. 30, 31 December 2015 (2015-12-31), pp. 3894-3897	6
X	JO, S. et al. "Characteristics of Flavonoids as Potent MERS-CoV 3C-like Protease Inhibitors" *Chem. Biol. Drug Des.,* Vol. 94, 31 December 2019 (2019-12-31), pp. 2023-2030	1-5, 9, 10
X	YU, M. S. et al. "Identification of Myricetin and Scutellarein as Novel Chemical Inhibitors of the SARS Coronavirus Helicase, nsP13" *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters,* Vol. 22, 25 April 2012 (2012-04-25), pp. 4049-4054	1-5, 9, 10
X	CN 103391777 A (THE TRUSTEES OF PRINCETON UNIVERSITY) 13 November 2013 (2013-11-13) claims 1-57	6, 7
Y	NGUYEN, T. T. H. et al. "Flavonoid-mediated Inhibition of SARS Coronavirus 3C-like Protease Expressed in Pichia Pastoris" *Biotechnol Lett.,* Vol. 34, 15 February 2012 (2012-02-15), pp. 831-838	7, 8
Y	陈君 等 (CHEN, Jun et al.). "氯喹对杨梅素诱导HeLa细胞凋亡的影响 (Effect of Chloroquine on Myricetin Induced Apoptosis in HeLa Cells)" *中国妇幼保健 (Maternal & Child Health Care of China),* Vol. 30, 31 December 2015 (2015-12-31), pp. 3894-3897	7, 8
A	US 2014194500 A1 (KOOKMIN UNIVERSITY INDUSTRY ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION et al.) 10 July 2014 (2014-07-10) claims 1-4	1-10
A	CN 1644199 A (REN, Qisheng et al.) 27 July 2005 (2005-07-27) claims 1-16	1-10
A	CN 101701245 B (INSTITUTE OF BIOPHYSICS, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES et al.) 19 June 2013 (2013-06-19) claim 1	1-10
A	CN 1605335 A (REN, Qisheng et al.) 13 April 2005 (2005-04-13) claims 1-13	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2021/079138

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

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

1. ☑ Claims Nos.: **9-10**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

[1] Claims 9 and 10 set forth a method of inhibiting 2019 novel coronavirus (SARS-CoV-2)3 protease, comprising a therapeutic regimen for human or animal subjects, which does not comply with PCT Rule 39.1(iv). The search on claims 9 and 10 is made on the basis of the following modification: the use of a compound of formula I or a pharmaceutically acceptable salt thereof in the preparation of a drug for the inhibition of 2019 novel coronavirus (SARS-CoV-2) 3 protease.

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2021/079138

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	103391777	A	13 November 2013	US	2016296523	A1	13 October 2016
				DK	2670404	T3	19 November 2018
				US	2013338178	A1	19 December 2013
				JP	2014505705	A	06 March 2014
				EP	2670404	A1	11 December 2013
				WO	2012106509	A1	09 August 2012
				US	10813934	B2	27 October 2020
				EP	2670404	B1	29 August 2018
US	2014194500	A1	10 July 2014		None		
CN	1644199	A	27 July 2005		None		
CN	101701245	B	19 June 2013	CN	101701245	A	05 May 2010
CN	1605335	A	13 April 2005		None		

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2021/079138

A. 主题的分类

A61K 31/353(2006.01)i; A61P 31/14(2006.01)i; A61P 31/12(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

A61K; A61P

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称，和使用的检索词（如使用））

CNABS,CNTXT,SIPOABS,DWPI,WOTXT,EPTXT,USTXT,CNKI,万方,读秀,PUBMED,ISI_Web of Science,Science Direct, STNext: 杨梅素，结构检索，冠状病毒，新冠，肺炎，蛋白酶，主蛋白酶，瑞德西韦，洛匹那韦，利托那韦,利托那维,法匹拉韦,羟基氯喹,羟氯奎,氯喹啉,氯化喹啉,氯奎,磷酸氯喹，氯喹啉二磷酸盐，二磷酸氯喹，磷酸氯奎，氯喹磷酸盐，磷酸氯哇，氯喹二磷酸盐，structure, Coronavirus, SARS-cov，2019-nCoV，COVID19，sars-cov，SARS-COV-2，3C-like protease，3CL，GS 5734,Remdesivir;GS-5734，ABT 378，Kaletra，Lopinavir，A-84538，NORVIR，ABT-538，A 84538，Abbott 84538，ABT 538，Norvir，NSC 693184，Ritonavir，RTV，Favipiravir，T 705，T-705，QD-Z0212，favipiravird，T705，Avigan，Oxychloroquine，Hydroxychloroquine，Plaquenil;Ercoquin，Quensyl，chloroquine，CQ，CAS: 1809249-37-3, 155213-67-5, 118-42-3, 259793-96-9, 118-42-3, 54-05-7, 50-63-5

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
PX	MANI, J. S. 等，. "Natural product-derived phytochemicals as potential agents against coronaviruses: A review, " Virus Research, 第284卷，2020年 4月 30日 (2020-04-30)，第1-16页	1-10
PX	LIU, H. B. 等，. "Scutellaria baicalensis extract and baicalein inhibit replication of SARS-CoV-2 and its 3C-like protease in vitro, " bioRxiv, 2020年 4月 10日 (2020-04-10)，第1-18页	1-10
X	NGUYEN, T. T. H. 等，. "Flavonoid-mediated inhibition of SARS coronavirus 3C-like protease expressed in Pichia pastoris, " Biotechnol Lett., 第34卷，2012年 2月 15日 (2012-02-15)，第831-838页	1-5，9-10

☑ 其余文件在C栏的续页中列出。

☑ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型：

"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

"L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件，或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件（如具体说明的）

"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

"P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

"T" 在申请日或优先权日之后公布，与申请不相抵触，但为了理解发明之理论或原理的在后文件

"X" 特别相关的文件，单独考虑该文件，认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

"Y" 特别相关的文件，当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时，要求保护的发明不具有创造性

"&" 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期
2021年 5月 24日	2021年 6月 3日
ISA/CN的名称和邮寄地址 中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451	受权官员 焦士勇 电话号码 (86-10) 53961915

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
X	陈君 等，. "氯喹对杨梅素诱导HeLa细胞凋亡的影响" 中国妇幼保健, 第30卷，2015年 12月 31日 (2015-12-31)， 第3894-3897页	6
X	JO, S. 等，. "Characteristics of flavonoids as potent MERS-CoV 3C-like protease inhibitors, " Chem. Biol. Drug Des., 第94卷，2019年 12月 31日 (2019-12-31)， 第2023-2030页	1-5, 9-10
X	YU, M. S. 等，. "Identification of myricetin and scutellarein as novel chemical inhibitors of the SARS coronavirus helicase, nsP13, " Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 第22卷，2012年 4月 25日 (2012-04-25)， 第4049-4054页	1-5, 9-10
X	CN 103391777 A (普林斯顿大学理事会) 2013年 11月 13日 (2013-11-13) 权利要求1-57	6-7
Y	NGUYEN, T. T. H. 等，. "Flavonoid-mediated inhibition of SARS coronavirus 3C-like protease expressed in Pichia pastoris, " Biotechnol Lett., 第34卷，2012年 2月 15日 (2012-02-15)， 第831-838页	7-8
Y	陈君 等，. "氯喹对杨梅素诱导HeLa细胞凋亡的影响" 中国妇幼保健, 第30卷，2015年 12月 31日 (2015-12-31)， 第3894-3897页	7-8
A	US 2014194500 A1 (Kookmin University Industry Academic Cooperation Foundation 等) 2014年 7月 10日 (2014-07-10) 权利要求1-4	1-10
A	CN 1644199 A (任启生 等) 2005年 7月 27日 (2005-07-27) 权利要求1-16	1-10
A	CN 101701245 B (中国科学院生物物理研究所 等) 2013年 6月 19日 (2013-06-19) 权利要求1	1-10
A	CN 1605335 A (任启生 等) 2005年 4月 13日 (2005-04-13) 权利要求1-13	1-10

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2021/079138

第II栏　某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下:

1. ☑ 权利要求： 9-10
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：

[1] 权利要求9-10要求保护一种抑制2019新型冠状病毒（SARS-CoV-2）3蛋白酶的方法，其包含了对人体或动物体的治疗方案，不符合PCT细则第39.1（iv）的规定。对权利要求9-10的检索是基于如下修改作出的：式I化合物或其药学上可接受的盐在制备抑制2019新型冠状病毒（SARS-CoV-2）3蛋白酶的药物中的用途。

2. ☐ 权利要求：
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索， 具体地说：

3. ☐ 权利要求：
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2021/079138

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	103391777	A	2013年 11月 13日	US	2016296523	A1	2016年 10月 13日
				DK	2670404	T3	2018年 11月 19日
				US	2013338178	A1	2013年 12月 19日
				JP	2014505705	A	2014年 3月 6日
				EP	2670404	A1	2013年 12月 11日
				WO	2012106509	A1	2012年 8月 9日
				US	10813934	B2	2020年 10月 27日
				EP	2670404	B1	2018年 8月 29日
US	2014194500	A1	2014年 7月 10日		无		
CN	1644199	A	2005年 7月 27日		无		
CN	101701245	B	2013年 6月 19日	CN	101701245	A	2010年 5月 5日
CN	1605335	A	2005年 4月 13日		无		