



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118613285 A

(43) 申请公布日 2024. 09. 06

(21) 申请号 202280071624.5

(22) 申请日 2022.09.09

(30) 优先权数据

21195975.4 2021.09.10 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.04.24

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2022/075109 2022.09.09

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/036932 EN 2023.03.16

(71) 申请人 卢万天主教大学

地址 比利时卢万拉努富

申请人 那慕尔大学

(72) 发明人 大卫·阿尔斯滕斯

斯特凡妮·文森特

(74) 专利代理机构 北京柏杉松知识产权代理事

务所(普通合伙) 11413

专利代理师 于作琛 王春伟

(51) Int.Cl.

A61K 47/54 (2006.01)

C07H 1/00 (2006.01)

C07H 15/26 (2006.01)

C07H 23/00 (2006.01)

A61P 31/14 (2006.01)

权利要求书5页 说明书40页

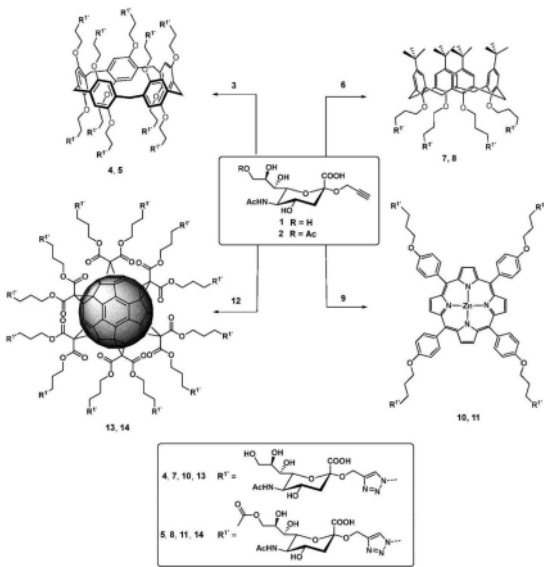
序列表(电子公布) 附图8页

(54) 发明名称

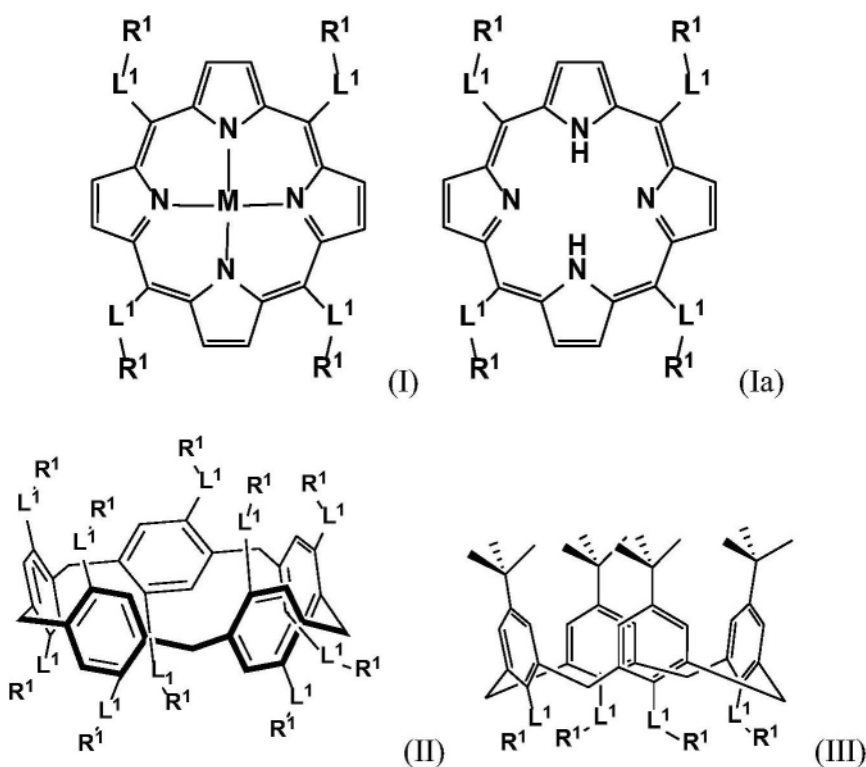
乙酰化唾液酸糖簇分子及其用于治疗感染性疾病的用途

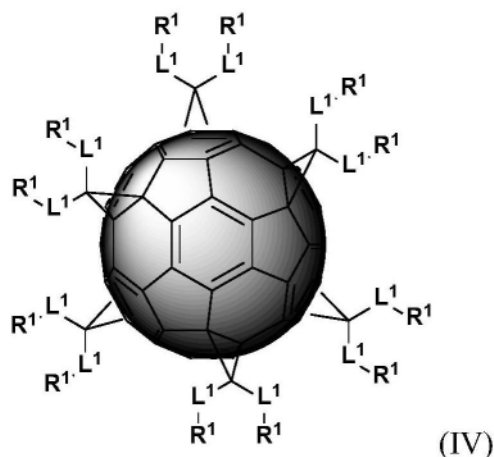
(57) 摘要

本发明涉及糖簇分子,其包含至少两个共价连接至大环的乙酰化-唾液酸,其中所述大环选自卟啉、柱芳烃、杯芳烃和富勒烯。根据一个实施方案,每个乙酰化-唾液酸独立地选自4-O-乙酰化-唾液酸、7-O-乙酰化-唾液酸、8-O-乙酰化-唾液酸和9-O-乙酰化-唾液酸。本发明还涉及用于治疗 and/或预防感染性疾病如冠状病毒感染的糖簇分子。



1. 一种糖簇分子,其包含至少两个共价连接至大环的乙酰化-唾液酸,其中所述大环选自卟啉、柱芳烃、杯芳烃和富勒烯;并且其中每个乙酰化-唾液酸独立地选自4-O-乙酰化-唾液酸、7-O-乙酰化-唾液酸、8-O-乙酰化-唾液酸和9-O-乙酰化-唾液酸。
2. 根据权利要求1所述的糖簇分子,其中所述糖簇分子包含至少四个共价连接至所述大环的乙酰化-唾液酸。
3. 根据权利要求1或权利要求2所述的糖簇分子,其中每个乙酰化-唾液酸独立地选自7-O-乙酰化-唾液酸和9-O-乙酰化-唾液酸。
4. 根据权利要求3所述的糖簇分子,其中每个乙酰化-唾液酸是9-O-乙酰化-唾液酸。
5. 根据权利要求1至4中任一项所述的糖簇分子,其中所述大环选自卟啉,优选选自[Zn(四苯基卟啉)]和四苯基卟啉。
6. 根据权利要求1至5中任一项所述的糖簇分子,其中所述糖簇分子还包含至少一种血管紧张素转换酶2(ACE2)结合抑制剂;优选地,血管紧张素转换酶2(ACE2)结合抑制剂选自ACE2结合抑制剂肽、ACE2结合抑制剂蛋白和抗ACE2抗体或其抗原结合片段。
7. 根据权利要求1至6中任一项所述的糖簇分子,其中所述糖簇分子是式(I)、(Ia)、(II)、(III)或(IV)的化合物





或其药学上可接受的盐和/或其溶剂合物；

其中

每个 L^1 独立地是：

-单键或

-选自烷基、杂烷基、烯基、炔基、芳基、烷基芳基、芳基烷基、杂芳基、杂芳基烷基和烷基杂芳基的接头；

其中所述烷基、杂烷基、烯基、炔基、芳基、烷基芳基、芳基烷基、杂芳基、杂芳基烷基或烷基杂芳基任选包含至少一种偶联生成物；

每个 R^1 独立地选自乙酰化-唾液酸和ACE2结合抑制剂；条件是至少两个 R^1 是乙酰化-唾液酸；并且

M是金属阳离子。

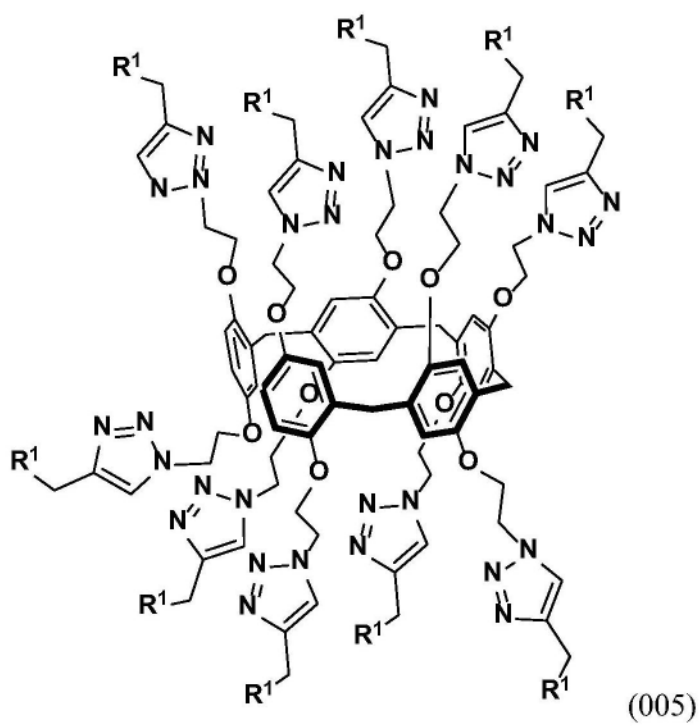
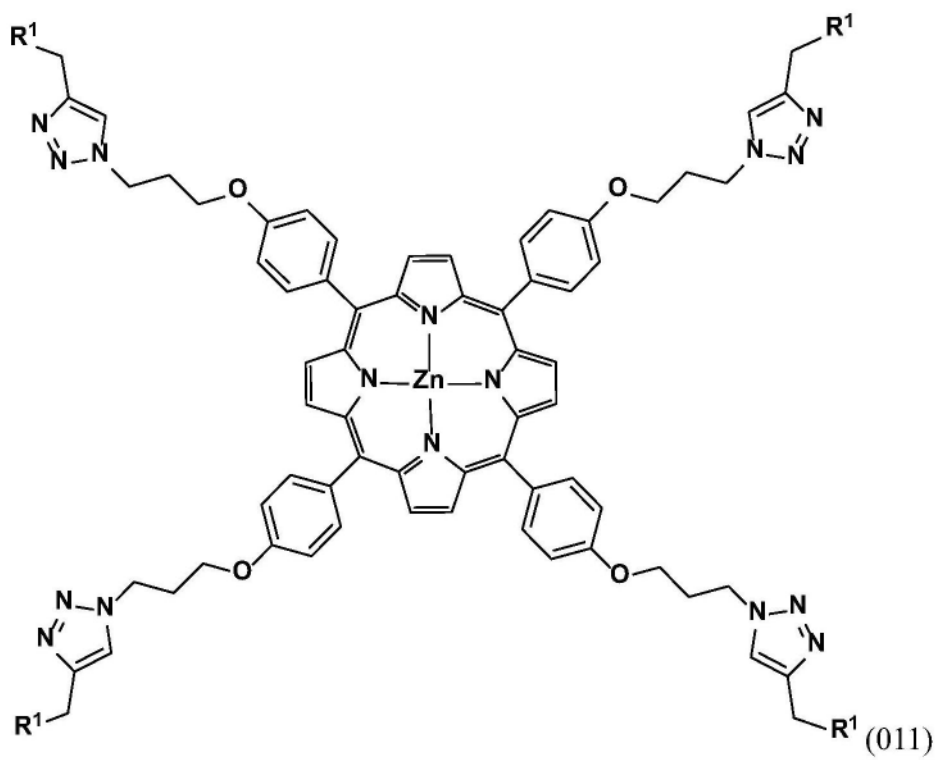
8. 根据权利要求7所述的糖簇分子，其中每个 L^1 是选自烷基、杂烷基、烷基芳基、芳基烷基、杂芳基烷基和烷基杂芳基的接头；其中所述烷基、杂烷基、烷基芳基、芳基烷基、杂芳基烷基或烷基杂芳基包含一种或两种偶联生成物；优选地，所述偶联生成物中的至少一种是三唑基。

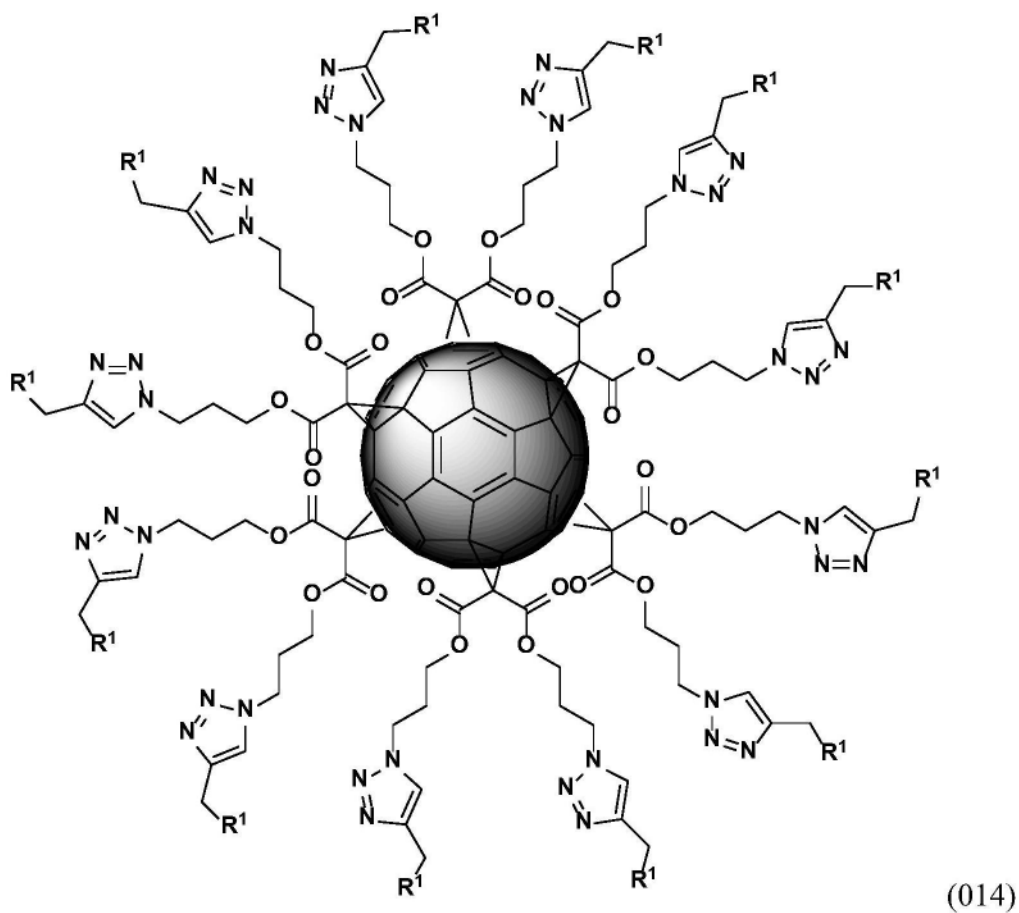
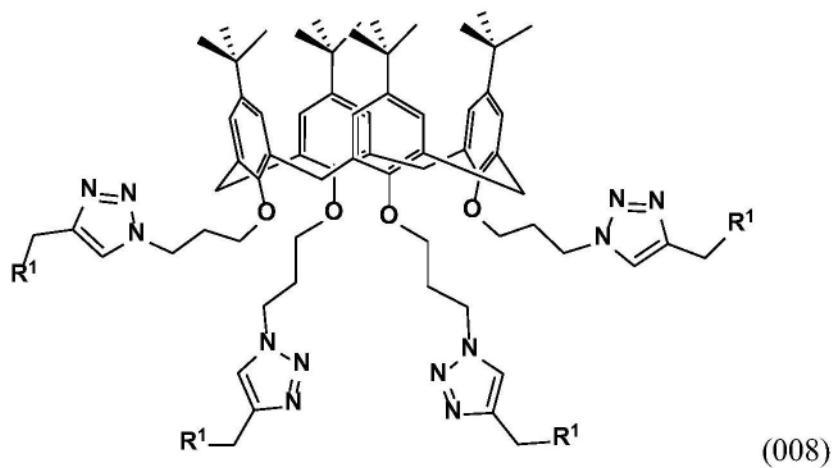
9. 根据权利要求7或权利要求8所述的糖簇分子，其中每个 L^1-R^1 选自 $-(CH_2)_m-R^C-(CH_2)_n-R^1$ 、 $-O-(CH_2)_m-R^C-(CH_2)_n-R^1$ 、 $-C(O)-(CH_2)_m-R^C-(CH_2)_n-R^1$ 、 $-C(O)O-(CH_2)_m-R^C-(CH_2)_n-R^1$ 、-苯基- $-(CH_2)_m-R^C-(CH_2)_n-R^1$ 和-苯基- $-O-(CH_2)_m-R^C-(CH_2)_n-R^1$ ；

其中 R^C 是偶联生成物，优选三唑基；m和n独立地是1至8的整数，优选1至4的整数；并且每个 R^1 如权利要求7中所定义。

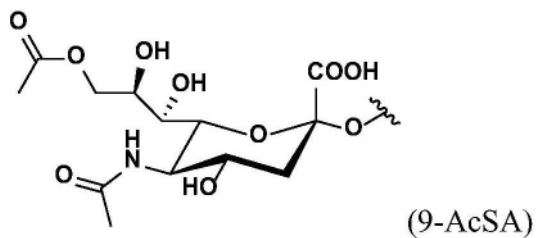
10. 根据权利要求7至9中任一项所述的糖簇分子，其中每个 R^1 为9-0-乙酰化-唾液酸。

11. 根据权利要求10所述的糖簇分子，其中所述糖簇分子是式(011)、(005)、(008)或(014)的化合物





或其药学上可接受的盐和/或其溶剂合物;其中每个R¹为式(9-AcSA)



其中波浪线代表R¹与糖簇分子的连接点。

12. 一种药物组合物,其包含根据权利要求1至11中任一项所述的糖簇分子和至少一种药学上可接受的载体。

13. 根据权利要求1至11中任一项所述的糖簇分子或根据权利要求12所述的药物组合物,其用作药物。

14. 根据权利要求1至11中任一项所述的糖簇分子或根据权利要求12所述的药物组合物,其用于治疗和/或预防感染性疾病,所述感染性疾病优选为冠状病毒感染或小RNA病毒感染,更优选为SARS-CoV-2感染。

15. 一种制造根据权利要求1至11中任一项所述的糖簇分子的方法,其包括将所述乙酰化-唾液酸中的每个与所述大环偶联的步骤;优选其中末端炔烃和叠氮化物之间的反应导致三唑基形成的偶联。

乙酰化唾液酸糖簇分子及其用于治疗感染性疾病的用途

发明领域

[0001] 本发明属于感染性疾病的治疗领域,并涉及用于治疗感染性疾病,尤其是SARS-CoV-2感染的包含多个乙酰化唾液酸的新型糖簇分子。

背景技术

[0002] 冠状病毒 (CoV) 是冠状病毒科 (Coronaviridae) 中正冠状病毒亚科 (Orthocoronavirinae) 的病毒。冠状病毒是包膜病毒,具有正义单链核糖核酸 (RNA) 基因组和螺旋核衣壳。冠状病毒的名称是由于其独特的形态,即从其包膜表面伸出的一系列棒状突起,使其具有冠样外观。冠状病毒的另一个特征是异常庞大的RNA基因组和特定的复制策略。RNA病毒,尤其是冠状病毒,是哺乳动物和鸟类广泛的呼吸道、全身、胃肠道和神经系统疾病的罪魁祸首。

[0003] 大约50年前,在英国和美国首次在人体中发现了冠状病毒。此后,人们普遍认为冠状病毒只引起轻微的呼吸道感染性疾病,如普通感冒。20世纪初,首次确定了两种高致病性冠状病毒:严重急性呼吸综合征冠状病毒 (SARS-CoV) 和中东呼吸综合征冠状病毒 (MERS-CoV)。与以前的冠状病毒感染相比,SARS和MERS是严重的呼吸道疾病,并导致数百人死亡。新的感染性呼吸道疾病爆发,其病因最终被确定为新的人类冠状病毒SARS-CoV-2。SARS-CoV-2的基因组与SARS-CoV的基因组有约80%的同一性,与蝙蝠冠状病毒BatCoV RaTG13的基因组有约96%的同一性。由SARS-CoV-2感染引起的疾病被命名为“2019冠状病毒病”(“COVID-19”)。2020年,COVID-19迅速成为严重的世界级疫情。

[0004] 据认为,对于大量受感染对象而言,SARS-CoV-2感染仍无症状。对于有症状的患者,COVID-19通常(约80%)表现为轻度严重的呼吸系统疾病,其症状可能包括发烧、咳嗽或其他呼吸系统症状(如轻度气短或胸闷)、头痛、疲劳或肌肉疼痛以及嗅觉和味觉丧失。然而,一些患者(约15%)出现严重症状,包括呼吸困难、缺氧或肺炎(“COVID-19肺炎”)。在少数病例(约5%)中,观察到呼吸衰竭、休克或多器官衰竭等严重症状。据估计,约20%的COVID-19患者需要住院治疗,其中一些人(约5%)甚至不得不住入重症监护病房。在一些病例中观察到了器官的永久性损伤,一些患者甚至在康复数月后仍会经历一系列影响(“长期COVID”)。因此,COVID-19造成大量痛苦和死亡,并危及世界上的许多卫生系统。

[0005] 几种针对SARS-CoV-2的疫苗已获得批准并在多个国家分发。相比之下,尽管开发用于预防和/或治疗目的的抑制病毒药物的工作正在进行中,但COVID-19的主要治疗仍然是对症治疗,以及支持性护理和隔离等辅助措施。此外,许多国家的一些大规模疫苗接种活动面临重大缺陷,许多人很可能在不久的将来受到COVID-19的影响。

[0006] 因此,仍然需要有效治疗和/或预防冠状病毒感染,特别是引起诸如SARS、MERS或COVID-19等疾病的冠状病毒呼吸道感染。特别地,需要高效抗冠状病毒复制、几乎没有或没有显著副作用、具有良好化学稳定性和/或低成本的治疗剂。

[0007] SARS-CoV进入宿主细胞是由其跨膜突起(S)糖蛋白介导的,该糖蛋白形成从病毒表面突出的同源三聚体。S糖蛋白包含两个功能亚基,一个负责与宿主细胞受体结合(S1亚

基,包括受体结合结构域(RBD)),另一个负责病毒和细胞膜的融合(S2亚基)。血管紧张素转换酶2(ACE2)以前被确定为SARS-CoV的细胞受体,也是新冠病毒(SARS-CoV-2)的受体。在SARS-CoV的情况下,病毒体表面的S糖蛋白介导受体识别和膜融合。最近,在存在SARS-CoV-2的S糖蛋白RBD的情况下,在全长人ACE2上获得的高分辨率冷冻电镜结构表明两个S糖蛋白三聚体同时与ACE2二聚体结合。S2亚基被位于融合肽上游的宿主蛋白酶进一步切割,导致糖蛋白的活化,经历广泛的不可逆构象变化,这有利于膜融合过程。

[0008] 虽然已经广泛研究了S蛋白与ACE2的结合,并就其在感染中的核心作用达成了共识,但几项研究表明其他细胞表面分子的共受体/附着因子具有关键作用。特别是,最近有人提出,除了ACE2之外,9-0-乙酰基-唾液聚糖也可能参与了SARS-CoV-2与细胞结合的早期阶段(Yang,J.等人,Nature Communications,2020,Vol.11,Article number:4541)。乙酰化-唾液酸与冠状病毒S糖蛋白和冠状病毒血凝素酯酶的结合也有报道(Tortorici,M.A.等人,Nature Structural Molecular Biology,2019,Vol.26,pp.481-489)。因此,基于这些初步信息,可以认为唾液酸衍生物可能具有作为竞争性抑制剂的潜力,以阻断SARS-CoV-2突起蛋白S和宿主细胞之间的相互作用,该相互作用通常介导感染的第一步(Tortorici,M.A.等人,Nature Structural Molecular Biology,2019,Vol.26,pp.481-489)。

[0009] 然而,尽管有人认为唾液酸及其乙酰化衍生物可能与SARS-CoV-2的突起蛋白结合(至少是弱结合),但没有直接的定量证据来确定这两种糖类中的哪一种是最佳配偶体(Yang,J.等人,Nature Communications,2020,Vol.11,Article number:4541;Nguyen,K.等人,Viruses,May 2021,Vol.13,No.5,p.927)。

[0010] 此外,本领域已知单个聚糖如唾液酸或其衍生物通常对其蛋白靶标具有相对较低的亲和力,通常最多为中等亲和力(Sauter,N.K.等人,Biochemistry 1989,Vol.28,p.8388;Dormitzer,P.R.等人,Journal of Virology,October 2002,Volume 76,No.20,pp.10512-10517)。这在本申请的实施例中得到进一步证明。单个唾液酸及其衍生物的有限亲和力使得这种聚糖不适合直接用于病毒感染的实际治疗和/或预防。

[0011] 出乎意料的是,申请人证明,当至少两个唾液酸或其衍生物与特定的大环(如卟啉、柱芳烃、杯芳烃和富勒烯)连接时,尽管唾液酸的亲和力低,但获得的糖簇分子是SARS-CoV-2早期附着于宿主细胞的有力竞争者。因此,和不与大环连接的唾液酸(“游离”唾液酸)形成鲜明对比的是,本发明的糖簇分子适用于治疗和/或预防感染性疾病如COVID-19。因此,本发明为对抗病毒感染如COVID-19的新药物开辟了道路。

发明内容

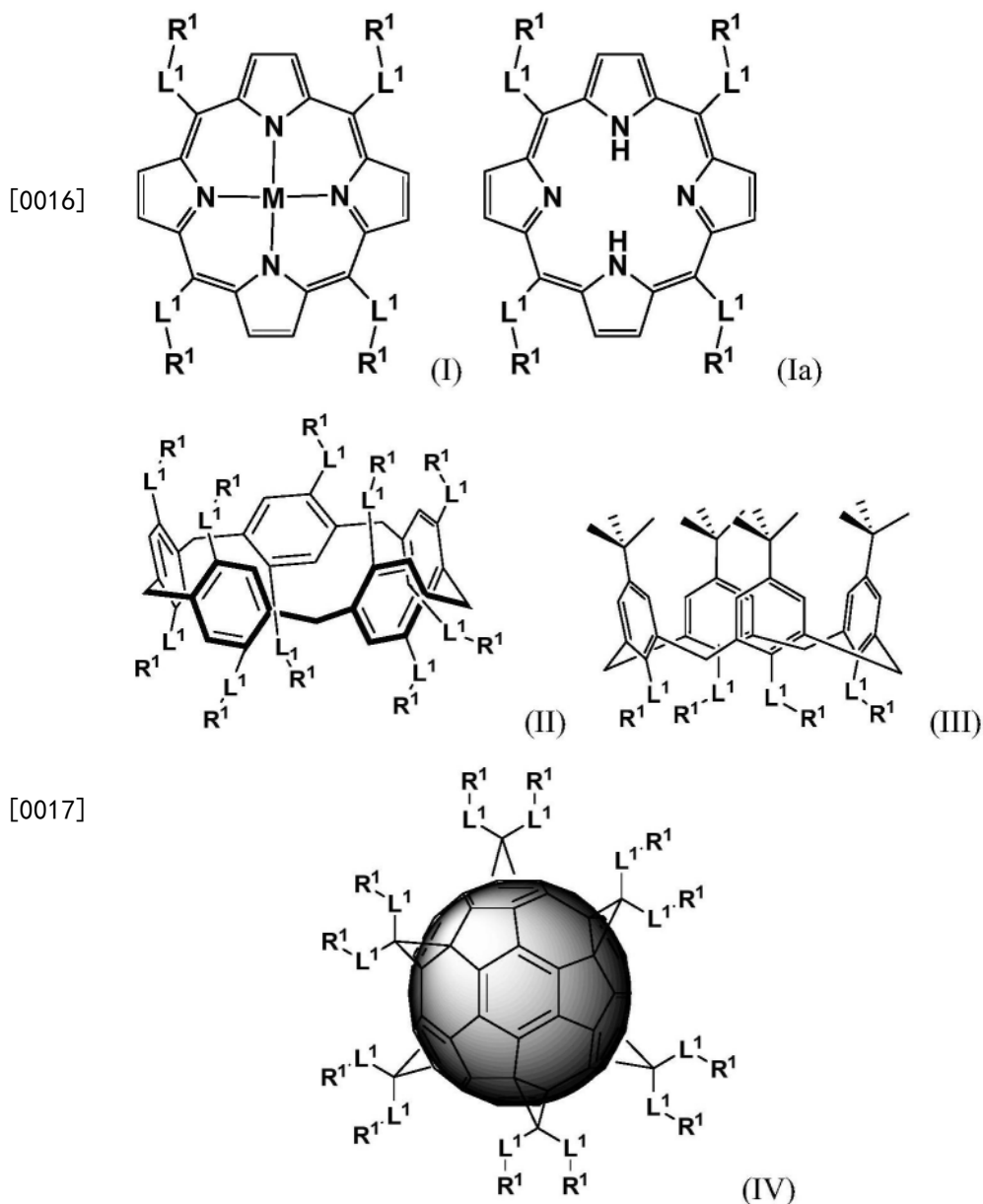
[0012] 本发明涉及糖簇分子,其包含至少两个共价连接至大环的乙酰化-唾液酸,其中所述大环选自卟啉、柱芳烃、杯芳烃和富勒烯;并且其中每个乙酰化-唾液酸独立地选自4-0-乙酰化-唾液酸、7-0-乙酰化-唾液酸、8-0-乙酰化-唾液酸和9-0-乙酰化-唾液酸。

[0013] 根据一个实施方案,糖簇分子包含至少四个共价连接至所述大环的乙酰化-唾液酸。根据一个实施方案,每个乙酰化-唾液酸独立地选自7-0-乙酰化-唾液酸和9-0-乙酰化-唾液酸。在一个实施方案中,每个乙酰化-唾液酸是9-0-乙酰化-唾液酸。

[0014] 根据一个实施方案,大环选自卟啉,优选选自[Zn(四苯基卟啉)]和四苯基卟啉。根据一个实施方案,糖簇分子还包含至少一种血管紧张素转换酶2(ACE2)结合抑制剂;优选

地,血管紧张素转换酶2(ACE2)结合抑制剂选自ACE2结合抑制剂肽、ACE2结合抑制剂蛋白和抗ACE2抗体或其抗原结合片段。

[0015] 根据一个实施方案,糖簇分子是式(I)、(Ia)、(II)、(III)或(IV)的化合物



[0018] 或其药学上可接受的盐和/或其溶剂合物;

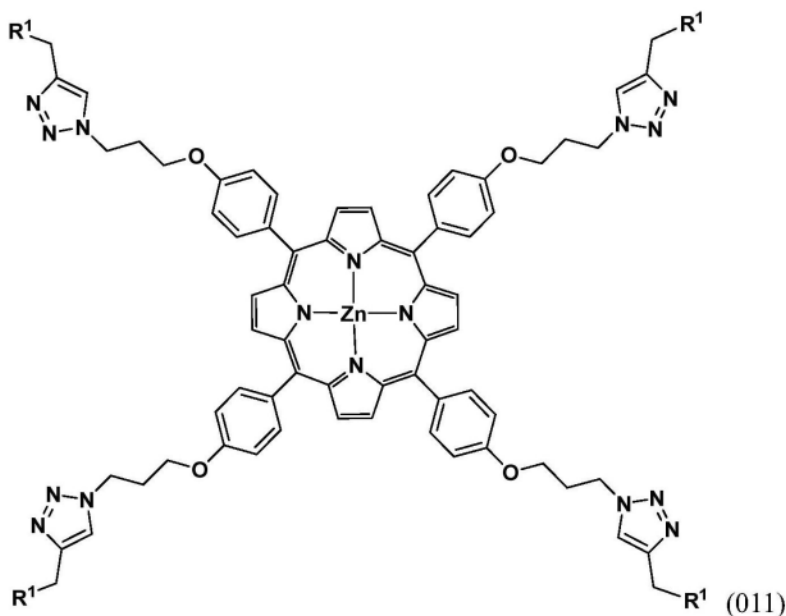
[0019] 其中每个 L^1 独立地是:单键或选自烷基、杂烷基、烯基、炔基、芳基、烷基芳基、芳基烷基、杂芳基、杂芳基烷基和烷基杂芳基的接头;其中所述烷基、杂烷基、烯基、炔基、芳基、烷基芳基、芳基烷基、杂芳基、杂芳基烷基或烷基杂芳基任选包含至少一种偶联生成物;每个 R^1 独立地选自乙酰化-唾液酸和ACE2结合抑制剂;条件是至少两个 R^1 是乙酰化-唾液酸;并且M是金属阳离子。

[0020] 根据一个实施方案,每个 L^1 是选自烷基、杂烷基、烷基芳基、芳基烷基、杂芳基烷基和烷基杂芳基的接头;其中所述烷基、杂烷基、烷基芳基、芳基烷基、杂芳基烷基或烷基杂芳基包含一种或两种偶联生成物;优选地,所述偶联生成物中的至少一种是三唑基。

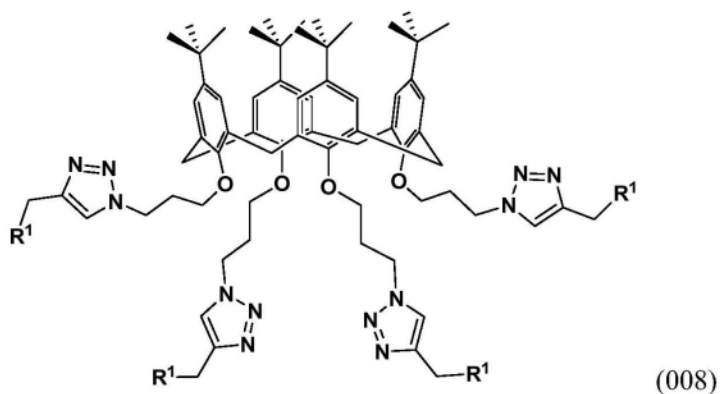
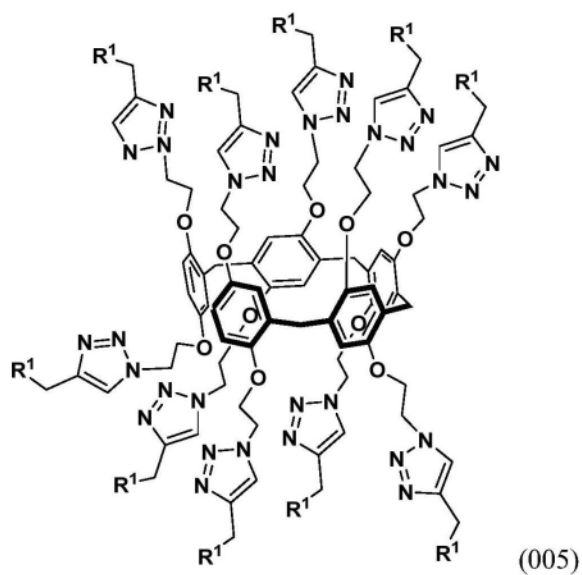
[0021] 根据一个实施方案,每个 L^1-R^1 选自 $-(CH_2)_m-R^C-(CH_2)_n-R^1$ 、 $-O-(CH_2)_m-R^C-(CH_2)_n-$

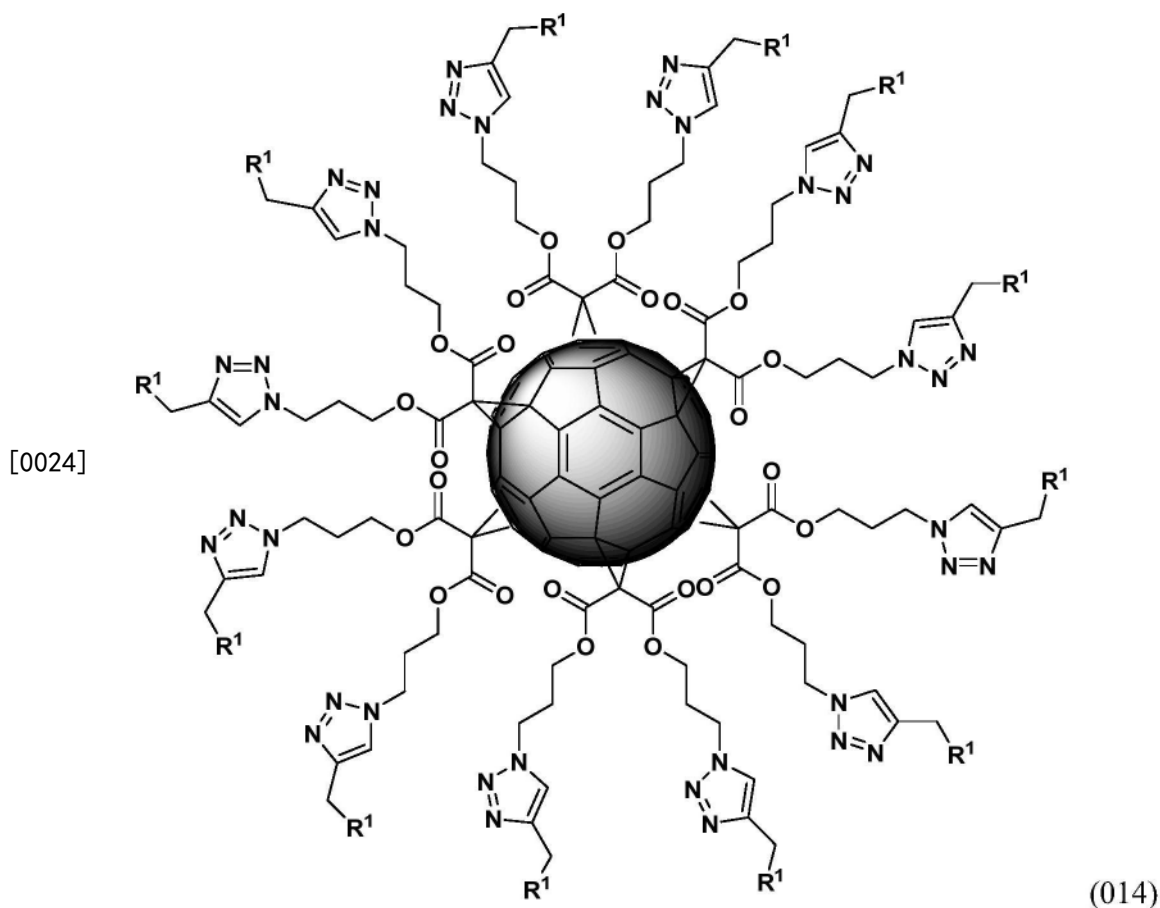
R^1 、 $-C(O)-(CH_2)_m-R^C-(CH_2)_n-R^1$ 、 $-C(O)O-(CH_2)_m-R^C-(CH_2)_n-R^1$ 、-苯基- $(CH_2)_m-R^C-(CH_2)_n-R^1$ 和-苯基- $O-(CH_2)_m-R^C-(CH_2)_n-R^1$ ；其中 R^C 是偶联生成物，优选三唑基； m 和 n 独立地是1至8的整数，优选1至4的整数；并且每个 R^1 如上文所定义。根据一个实施方案，每个 R^1 是9-O-乙酰化-唾液酸。

[0022] 根据一个实施方案，糖簇分子是式(011)、(005)、(008)或(014)的化合物



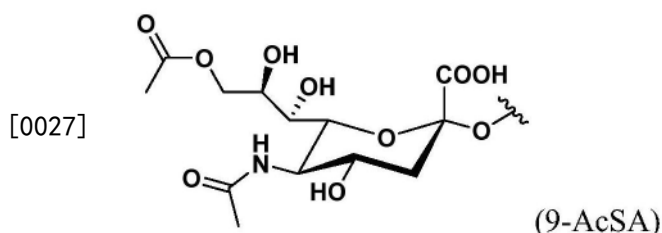
[0023]





[0025] 或其药学上可接受的盐或其溶剂合物；

[0026] 其中每个R¹为式(9-AcSA)



[0028] 其中波浪线代表R¹与糖簇分子的连接点。

[0029] 本发明还涉及包含根据本发明的糖簇分子和至少一种药学上可接受的载体的药物组合物。本发明还涉及根据本发明的糖簇分子或根据本发明的药物组合物,其用作药物。本发明还涉及根据本发明的糖簇分子或根据本发明的药物组合物,其用于治疗 and/或预防感染性疾病,所述感染性疾病优选为冠状病毒或小RNA病毒感染,更优选为SARS-CoV-2感染。

[0030] 本发明还涉及制造根据本发明的糖簇分子的方法,包括将所述乙酰化-唾液酸中的每个与所述大环偶联的步骤;优选其中末端炔烃和叠氮化物之间的反应导致三唑基形成的偶联。

[0031] 定义

[0032] 在本发明中,以下术语具有以下含义:

[0033] 化学定义

[0034] 当描述本发明的化合物时,除非另有说明,否则所用术语应根据以下定义来解释。当化学取代基是化学基团的组合时,取代基与分子的连接点是最后列举的化学基团。例如,芳基烷基取代基通过烷基部分与分子的其余部分结合,其可以表示为:“芳基-烷基-”。

[0035] 由符号“Ac”表示的“乙酰基”或“乙酰”是指式 $\text{CH}_3\text{-C(=O)-}$ 的甲基酰基部分。

[0036] “烯基”或“烯基”是指包含至少一个双键且通常具有2个至12个碳原子、优选3个至6个碳原子的直链烯基或支链烯基。烯基的非限制性实例包括乙烯基、2-丙烯基、2-丁烯基、3-丁烯基、2-戊烯基及其异构体、2-己烯基及其异构体和2,4-戊二烯基。

[0037] “烷基”是指饱和的直链烯基或支链烯基,通常包含1个至12个碳原子,优选1个至6个碳原子,更优选1个至3个碳原子。在本发明中,烷基可以是一价或二价的(即“亚烷基”包含在“烷基”的定义中)。烷基的非限制性实例包括甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、仲丁基和叔丁基、戊基及其异构体(例如正戊基、异戊基)和己基及其异构体(例如正己基、异己基)。优选的烷基包括甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、仲丁基和叔丁基。

[0038] “烷基芳基”是指经烷基取代的芳基:烷基-芳基-。

[0039] “烷基杂芳基”指经烷基取代的杂芳基:烷基-杂芳基-。

[0040] “炔”或“炔基”是指包含至少一个三键且通常具有2个至12个碳原子、优选3个至6个碳原子的直链烯基或支链烯基。炔基的实例包括乙炔基、2-丙炔基、2-丁炔基、3-丁炔基、2-戊炔基及其异构体和2-己炔基及其异构体。

[0041] “酰胺”是指具有连接性 -C(=O)-NH- 的官能团。

[0042] “酰氨基”是指 -C(=O)-NH_2 基团。

[0043] “胺”是指 -NH_2 基团和 -NHR 仲胺,其中R不同于氢,优选其中R是烷基。

[0044] “氨基”是指基团 -NH_2 。

[0045] “羟胺”是指 -O-NH_2 基团。

[0046] “芳基”是指包含至少一个芳环的环状、多不饱和、芳族烯基。芳基可以具有单个环(即苯基)或多个稠合在一起的芳环(如萘基)或共价连接的芳环。典型地,芳基具有5个至12个碳原子,优选6个至10个碳原子。芳环可以任选包括一个至两个与其稠合的附加环(环烷基、杂环烷基或杂芳基)。芳基还包括本文列举的碳环系统的部分氢化衍生物,只要至少一个环是芳香性的。芳基的非限制性实例包括苯基、联苯基、亚联苯基、5-四氢化萘基或6-四氢化萘基、萘-1-基或萘-2-基、4-茛基、5-茛基、6-茛基或7-茛基、1-茛基、2-茛基、3-茛基、4-茛基或5-茛基、3-二氢茛基、4-二氢茛基或5-二氢茛基、1-并环戊二烯基或2-并环戊二烯基、4-茛满基或5-茛满基、5-四氢萘基、6-四氢萘基、7-四氢萘基或8-四氢萘基、1,2,3,4-四氢萘基、1,4-二氢萘基、1-茛基、2-茛基、3-茛基、4-茛基或5-茛基。优选的芳基是苯基。

[0047] “芳基烷基”指经芳基取代的烷基:芳基-烷基-。

[0048] “叠氮化物”是指式 -N_3 的基团。

[0049] 根据化学领域的常用术语,基团前的“(C_x至C_y)”表示该基团包含x个至y个碳原子。

[0050] “羧酸”是指式为 -COOH 的基团。

[0051] “偶联官能团”是指能够与另一个官能团反应形成共价连接(例如键或线性原子团)的官能团。因此,在合适的反应条件下具有活性的偶联官能团能够与不同分子上的另一个偶联官能团发生化学反应,形成新的共价连接。偶联官能团通常代表另一个分子的连接点。偶联官能团通常包括亲核试剂、亲电试剂和/或光活化基团。偶联官能团的非限制性示

例包括醇;烯烃;炔烃(如 $C\equiv CH$);胺;酰胺;羟胺;酞例如戊二酸酞、琥珀酸酞或马来酸酞;叠氮化物;羧酸;经活化的羧酸,如酸酞或卤化酰基;氯甲酸酯;经活化的酯,如N-羟基琥珀酰亚胺酯、N-羟基戊二酰亚胺酯或马来酰亚胺酯;谷氨酸盐/酯;卤化物(卤素原子);卤代乙酰胺(即 $-NH-C(O)CH_2X$ 部分,其中X是卤素原子)如氯乙酰胺、溴乙酰胺或碘乙酰胺;酰肼;异氰酸酯;异硫氰酸酯;酮;马来酰亚胺;降冰片烯;膦酸;甲硅烷氧基;四嗪和硫醇。两个偶联官能团之间的反应可以产生本文定义的“偶联生成物”。

[0052] “偶联生成物”是指不同分子中两个偶联官能团反应产生的偶联官能团残基,例如官能相关的原子团(如酰胺 $-C(O)-NH-$ 基团或双键)或杂环(如二价三唑基)。换句话说,偶联生成物是一个或两个偶联官能团之间发生偶联反应后的剩余物。例如,两个偶联官能团A和B之间的偶合反应可以产生如下表1所示的偶合产物,其中X代表卤素原子(例如Br或Cl)。偶联生成物可以包含在本文定义的“接头”中。

[0053] 表1:偶联官能团和生成物的示例

R-偶联官能团A	R'-偶联官能团B	R-偶联生成物-R'
R-N ₃	R'-C≡CH	R-三唑基-R'
R-NH ₂	R'-COOH	R-NH(C=O)-R'
R-SH	R'-SH	R-S-S-R'
R-OH	R'-(环氧化物)	R-OCH ₂ CH(OH)-R'
R-NH ₂	R'-(环氧化物)	R-NHCH ₂ CH(OH)-R'
R-SH	R'-(环氧化物)	R-SCH ₂ CH(OH)-R'
R-NH ₂	R'-CHO	R-N=CH-R'
R-NH ₂	R'-NCO	R-NH(C=O)NH-R
R-NH ₂	R'-NCS	R-NH(C=S)NH-R'
R-SH	R'-(C=O)CH ₃	R-(C=O)CH ₂ S-R'
R-SH	R'-O(C=O)X	R-S(C=O)O-R'
R-CH=CH ₂	R'-SH	R-CH ₂ CH ₂ S-R'
R-OH	R'-NCO	R-O(C=O)NH-R'
R-SH	R'-(C=O)CH ₂ X	R-SCH ₂ (C=O)-R'
R-NH ₂	R'-(C=O)N ₃	R-NH(C=O)-R'
R-COOH	R'-COOH	R-(C=O)O(C=O)-R'
R-SH	R'-X(R-卤素)	R-S-R'
R-NH ₂	R'-CH ₂ -C(NH ₂ ⁺)-OCH ₃ (“平纳盐”)	R-NH-C(NH ₂ ⁺)-CH ₂ -R'
R-NHNH ₂	R'-CHO	R-NHNH=CH-R'
R-CH=CH-B(OH) ₂	R'-X	R-CH=CH-R'
R-C≡CH	R'-X	R-C≡C-R'

[0055] “共价连接”是指两个部分直接共价结合在一起,即通过共价单键、共价双键或共价三键(通常为单键),或者间接共价结合在一起,即通过本文所述的包含多个共价键的“接

头”共价结合在一起。

[0056] “糖簇分子”是指聚糖簇分子,即包含多个聚糖单元分子或分子集合。因此,糖簇分子包含至少两个多糖、寡糖和/或单糖部分,通常至少两个单糖。在糖簇分子中,聚糖单元通过与共同的支架(例如大环、聚合物或金属纳米颗粒)结合而聚集在一起,并且彼此相对靠近。糖簇分子通常用于药物递送,然而在本发明中,糖簇分子可用作细胞结合和/或感染性的抑制剂,用于治疗感染性疾病。

[0057] “卤化物”、“卤代”或“卤素”是指氟、氯、溴或碘原子;优选氯或溴原子。

[0058] “杂烷基”是指如上定义的烷基,其中一个或多于一个碳原子被选自氧、氮和硫的杂原子取代。在杂烷基中,杂原子仅沿烷基链与碳原子结合,即每个杂原子与任何其他杂原子之间至少相隔一个碳原子。氮和硫杂原子可以任选被氧化,并且氮杂原子可以任选被季铵化。杂烷基仅通过碳原子与另一个基团或分子键合,即键合原子不选自包含在杂烷基中的杂原子。杂烷基的非限制性实例包括烷氧基、醚和聚醚、仲胺、叔胺和硫醚。

[0059] “杂芳基”是指包含5个至12个碳原子、优选6个至10个碳原子的芳香环或芳香环系统,具有一个或两个稠合在一起或共价连接的环,其中至少一个环是芳香的,并且其中一个或多于一个这些环中的一个或多于一个碳原子被氧、氮和/或硫原子取代。“杂芳基”也可视为本文定义的“芳基”基团,其中芳基中的至少一个碳原子被杂原子取代,并且其中所得分子是化学稳定的。氮和硫杂原子可以任选被氧化,并且氮杂原子可以任选被季铵化。杂芳基的非限制性实例包括呋喃基、噻吩基、吡唑基、咪唑基、**噁唑基**、**异噁唑基**、噻唑基、**异噻唑基**、三唑基、**噁二唑基**、噻二唑基、四唑基、**噁三唑基**、噻三唑基、吡啶基、嘧啶基、吡嗪基、哒嗪基、**噁嗪基**、二氧杂环己烯基、噻嗪基、三嗪基、咪唑并[2,1-b][1,3]噻唑基、噻吩并[3,2-b]呋喃基、噻吩并[3,2-b]噻吩基、噻吩并[2,3-d][1,3]噻唑基、噻吩并[2,3-d]咪唑基、四唑并[1,5-a]吡啶基、吡啶基、吡嗪基、异吡啶基、苯并呋喃基、异苯并呋喃基、苯并噻吩基、异苯并噻吩基、吡唑基、苯并咪唑基、1,3-苯并**噁唑基**、1,2-苯并**异噁唑基**、2,1-苯并**异噁唑基**、1,3-苯并噻唑基、1,2-苯并**异噻唑基**、2,1-苯并**异噻唑基**、苯并三唑基、1,2,3-苯并**噁二唑基**、2,1,3-苯并**噁二唑基**、1,2,3-苯并噻二唑基、2,1,3-苯并噻二唑基、噻吩并吡啶基、嘌呤基、咪唑并[1,2-a]吡啶基、6-氧代-哒嗪-1(6H)-基、2-氧代吡啶-1(2H)-基、6-氧代-哒嗪-1(6H)-基、2-氧代吡啶-1(2H)-基、1,3-苯并二氧杂环戊烯基、喹啉基、异喹啉基、噌啉基、喹唑啉基和喹喔啉基。

[0060] “杂芳基烷基”指经杂芳基取代的烷基:杂芳基-烷基-。

[0061] “羟基”是指-OH基团。

[0062] “酮”是指具有连接性C-(C=O)-C的官能团。

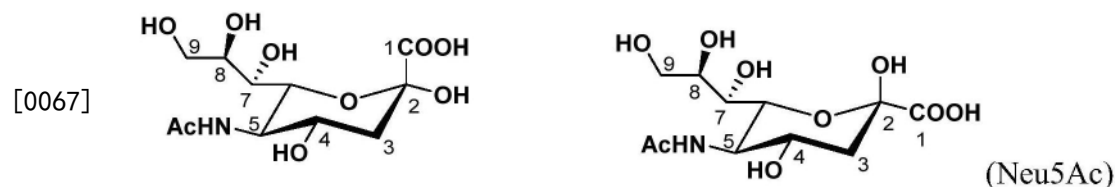
[0063] “接头”是指将两个分子共价结合在一起的部分,包括通过稳定的共价键结合在一起的一系列选自C、N、O、S和P的多价原子。该部分通常包含1个至30个原子,例如1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、15个、20个、25个或30个原子。接头可以是线性的或非线性的,一些接头具有侧链或侧官能团或两者兼有。在一个实施方案中,接头由单键、双键、三键或芳香碳碳键、碳氮键、氮氮键、碳氧键和碳硫键的任意组合组成。在一个实施方案中,接头由选自烷基、-C(O)NH-、-C(O)O-、-NH-、-S-、-O-、-C(O)-、-S(O)-、-S(O)₂和5元单环芳

基或6元单环芳基或杂芳基的部分的组合组成。在一个实施方案中,接头包含至少一种本文定义的“偶联生成物”,通常是一种或两种偶联生成物。在本文中,“包含”是指接头可以被至少一种偶联生成物中断(即偶联生成物并入到接头的原子链中)和/或接头可以以至少一种偶联生成物结束(即偶联生成物终止接头)。在该实施方案中,偶联生成物被认为是接头的一部分,这特别意味着偶联生成物的原子被计入接头的原子总数中。

[0064] “大环”是指含有12元环或多于12元环的分子或离子,例如柱芳烃、杯芳烃、卟啉、富勒烯、冠醚和环糊精。为了简单和清楚起见,在本申请中,“大环”术语及其任何特定种类(例如,柱芳烃、杯芳烃、卟啉和富勒烯)既指大环本身,也指由大环与另一分子直接通过单键或通过本文定义的“接头”偶联而产生的任何基于大环的部分。如果需要,后者将被具体称为“大环残基”。

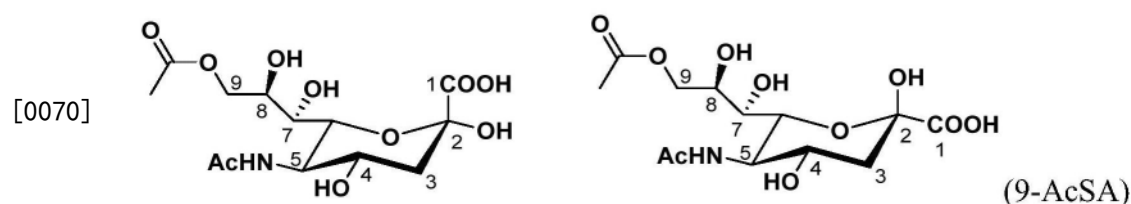
[0065] “肽”是指少于50个氨基酸通过肽键连接在一起的氨基酸的线性聚合物。

[0066] 根据本领域的常识,“唾液酸”或“SA”是指属于具有九碳主链的 α -酮酸糖类的单糖。特别地,唾液酸是指下式的乙酰神经氨酸(Neu5Ac)。



[0068] 羧酸处于轴向位置的构型是 α -端基异构体,而羧酸处于平伏位置的构型是 β -端基异构体。当与另一个分子结合时,唾液酸主要是 α -端基异构体。唾液酸的碳数如上式所示(左: α -端基异构体,右: β -端基异构体)。

[0069] 根据本领域的一般含义,唾液酸可以被“乙酰化”,即唾液酸中的基团(通常为氢原子)可以被乙酰基取代。尽管Neu5Ac包括乙酰化胺(AcHN),但在本申请中,只有在羟基(OH)和胺上都进行了乙酰化的唾液酸才被认为是本发明意义上的“乙酰化的”。具体而言,“乙酰化-唾液酸”是其中4号位、7号位、8号位和9号位上的至少一个羟基(-OH)被乙酰基取代的唾液酸,从而产生乙酸酯部分(-OC(O)CH₃)。唾液酸中一个或多个位置乙酰化的合成方法,包括与乙酸的酯化反应,是本领域众所周知的。特别地,乙酰化-唾液酸可以指下式的9-O-乙酰基-唾液酸(9-AcSA)(左: α -端基异构体,右: β -端基异构体)。

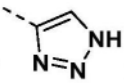
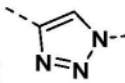


[0071] 唾液酸或乙酰化-唾液酸可以直接通过共价单键或通过接头与另一种天然或人工化合物结合。例如,在本发明中,唾液酸和/或乙酰化-唾液酸结合到大环上以形成糖簇分子。非乙酰化的羟基尤其可以用作偶联官能团以获得共价键。为了简单和清楚起见,在本申请中,“唾液酸”术语及其任何特定种类(例如乙酰化-唾液酸)是指唾液酸单糖本身和由唾液酸与另一分子直接通过单键或通过本文定义的“接头”偶联而产生的任何基于唾液酸的部分。如果需要,后者将被具体称为“唾液酸残基”。当唾液酸通过非乙酰化的羟基(例如,2号位的羟基)与另一个分子结合时,出于定义和表示的目的,剩余的氧被认为是唾液酸残基

的一部分。

[0072] “甲硅烷氧基”是指官能团 $-O-Si(R)_3$,其中R代表例如烷基或芳基。

[0073] “三唑基”是指通式杂芳基的单价衍生物、二价衍生物或三价衍生物  (即三

唑),例如  或  基团。

[0074] 一般定义

[0075] “约”在本文中用于表示近似地、粗略地、大约地或在其范围内。数字前的术语“约”表示该数字值的 $\pm 10\%$ 。当术语“约”与数值范围结合使用时,它通过将数值上下的边界延伸 10% 来修饰该范围。

[0076] “施用”或其变体是指将治疗剂(例如,本发明的化合物)单独或作为药学上可接受的组合物的一部分提供给要治疗和/或预防其病症、症状或疾病的患者。

[0077] “人”指处于任何发育阶段的男性或女性对象,包括新生儿、婴儿、少年、青少年和成人。

[0078] “患者”是指动物,通常是温血动物,优选人,其正在等待接受或正在接受医疗护理,或将成为医疗程序的对象。患者也可能是预防性护理或程序的对象。

[0079] “药学上可接受的”是指组合物的成分彼此相容,并且对施用该组合物的患者无害。

[0080] “药学上可接受的载体”是指当施用于动物,优选人时,不会产生任何不利、过敏或其他不良反应的赋形剂。其包括任何和所有溶剂、分散介质、涂层、抗菌和抗真菌剂、等渗和吸收延迟剂等。对于人体施用,制剂应符合监管机构如FDA办公室或EMA所要求的无菌性、热原性、一般安全性和纯度标准。

[0081] “预防”是指延迟或阻止病症和/或疾病和/或其任何一种伴随症状的发作,阻止患者患上病症或疾病,或降低患者患上病症和/或疾病和/或其任何一种伴随症状的风险。

[0082] “前体药物”是指治疗剂(例如本发明的化合物)的药理学上可接受的衍生物,其体内生物转化产物是治疗剂(活性药物)。前体药物的典型特征是生物利用度增加,并且在体内容易代谢成活性化合物。前体药物的非限制性实例包括酰胺前体药物和羧酸酯前体药物,特别是烷基酯、环烷基酯和芳基酯。

[0083] “溶剂合物”是指包含化合物以及化学计量或亚化学计量的一种或多种于一种溶剂的一种或多种分子的分子复合物,通常该溶剂是药学上可接受的溶剂,例如乙醇。术语“水合物”是指当溶剂是水(H_2O)时。

[0084] “治疗剂”、“活性药物成分”和“活性成分”是指用于治疗用途并与健康相关的化合物。特别地,治疗剂(例如本发明的化合物)可用于治疗和/或预防疾病,优选感染性疾病。活性成分也可用于提高另一种治疗剂的治疗活性。

[0085] “治疗有效量”(简称“有效量”)是指治疗剂(例如本发明的化合物)足以在接受施用的患者中实现所需治疗或预防效果的量。

[0086] “治疗”是指缓解、减轻或消除病症和/或疾病和/或其任何一种伴随症状,例如感染性疾病。

具体实施方式

[0087] 糖簇分子

[0088] 本发明涉及糖簇分子,其包含至少两个共价连接至大环的乙酰化-唾液酸。在本申请中,“糖簇分子”和“本发明的化合物”以及类似的措辞是同义词。

[0089] 根据一个实施方案,糖簇分子包含至少3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、14个、15个或16个共价连接至大环的乙酰化唾液酸。在一个实施方案中,糖簇分子包含至少四个共价连接至大环的乙酰化唾液酸。根据一个实施方案,糖簇分子包含四个共价连接至大环的乙酰化唾液酸(“四聚体”)。根据一个实施方案,糖簇分子包含十个共价连接至大环的乙酰化唾液酸(“十聚体”)。在一个实施方案中,糖簇分子包含12个共价连接至大环的乙酰化唾液酸(“十二聚体”)。

[0090] 根据一个实施方案,每个乙酰化-唾液酸未被完全乙酰化,即其中4号位、7号位、8号位和9号位上的至少一个OH基团未被乙酰基取代。在一个实施方案中,每个乙酰化-唾液酸在4号位、7号位、8号位和9号位中的1个、2个、3个或4个位置被乙酰化。在一个实施方案中,每个乙酰化-唾液酸在1个、2个或3个位置被乙酰化。在一个实施方案中,每个乙酰化-唾液酸在1个或2个位置被乙酰化。在一个实施方案中,每个乙酰化-唾液酸在7号位和9号位被乙酰化。

[0091] 根据一个实施方案,每个乙酰化-唾液酸包含至少一个OH基团。在一个实施方案中,每个乙酰化-唾液酸包含一个OH基团。在一个实施方案中,每个乙酰化-唾液酸包含两个OH基团。在一个实施方案中,每个乙酰化-唾液酸包含三个OH基团。在一个实施方案中,每个乙酰化-唾液酸包含四个OH基团。

[0092] 根据一个实施方案,每个乙酰化-唾液酸仅在一个位置被乙酰化,即每个乙酰化-唾液酸独立地选自4-0-乙酰化-唾液酸、7-0-乙酰化-唾液酸、8-0-乙酰化-唾液酸和9-0-乙酰化-唾液酸。根据一个实施方案,每个乙酰化-唾液酸独立地选自7-0-乙酰化-唾液酸、8-0-乙酰化-唾液酸和9-0-乙酰化-唾液酸。根据一个实施方案,每个乙酰化-唾液酸独立地选自7-0-乙酰化-唾液酸和9-0-乙酰化-唾液酸。在一个实施方案中,每个乙酰化-唾液酸是4-0-乙酰化-唾液酸。在一个实施方案中,每个乙酰化-唾液酸是7-0-乙酰化-唾液酸。在一个实施方案中,每个乙酰化-唾液酸是8-0-乙酰化-唾液酸。在一个实施方案中,每个乙酰化-唾液酸是9-0-乙酰化-唾液酸。

[0093] 不受任何理论的束缚,申请人认为未完全乙酰化的唾液酸,特别是其中只有一个OH被乙酰化的唾液酸,在病毒亲和力或抑制作用方面是有利的,特别是对于SARS-CoV-2。

[0094] 通常,大环选自卟啉、柱芳烃、杯芳烃和富勒烯。

[0095] 根据一个实施方案,大环选自卟啉。在一个实施方案中,卟啉选自卟吩或四苯基卟啉。在一个实施方案中,卟啉具有由四个氮原子配位的金属阳离子,并且没有氢连接到氮原子上(“卟啉螯合物”)。非限制性实例包括[Zn(卟吩)]和[Zn(四苯基卟啉)]。在另一个实施方案中,卟啉没有任何由四个氮原子配位的阳离子,并且两个氢原子连接到氮原子上(“卟啉游离碱”)。

[0096] 根据一个实施方案,大环选自柱芳烃。在一个实施方案中,柱芳烃选自柱[5]芳烃。

[0097] 根据一个实施方案,大环选自杯芳烃。在一个实施方案中,杯芳烃选自杯[4]芳烃。

[0098] 根据一个实施方案,大环选自富勒烯。在一个实施方案中,大环选自C₆₀-富勒烯,也

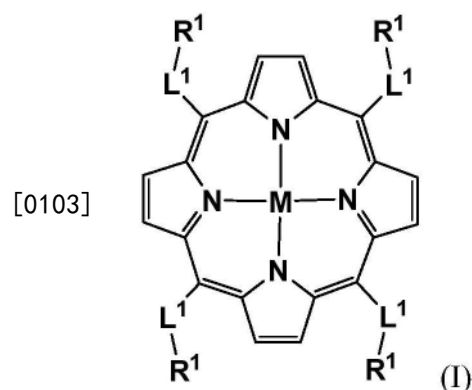
称为巴克敏斯特富勒烯。

[0099] 在本发明中,除了乙酰化-唾液酸取代基之外,大环可以是未经取代的(未被取代的)。在本发明中,大环可以包含其他取代基,例如水溶性取代基或易与病毒相互作用的取代基。

[0100] 根据一个实施方案,糖簇分子包含至少一种血管紧张素转换酶2 (ACE2) 结合抑制剂。在一个实施方案中,ACE2结合抑制剂是ACE2结合抑制剂肽或ACE2结合抑制剂蛋白。在一个实施方案中,ACE2结合抑制剂是ACE2结合抑制剂肽。在一个实施方案中,ACE2结合抑制剂是ACE2结合抑制剂蛋白。在一个实施方案中,ACE2结合抑制剂是抗ACE2抗体或其抗原结合片段,例如抗ACE2单克隆抗体。在一个实施方案中,根据与S1糖蛋白的RBD结构域复合的ACE2受体的序列设计ACE2结合抑制剂肽。在一个实施方案中,ACE2结合抑制剂肽选自由氨基酸序列EEQAKTFLDKFNHEAEDLFYQSS (SEQ ID NO:1) 组成的肽[22-44]、由氨基酸序列LGKGDFR (SEQ ID NO:2) 组成的肽[351-357]、由氨基酸序列EEQAKTFLDKFNHEAEDLFYQSSLASWNYNTNITEE (SEQ ID NO:3) 组成的肽[22-57]和由氨基酸序列EEQAKTFLDKFNHEAEDLFYQSSGLKGDFR (SEQ ID NO:4) 组成的肽[22-44-g-351-357];如参考文献所述:Yang, J. 等人, Nature Communications, 2020, Vol.11, Article number:4541。

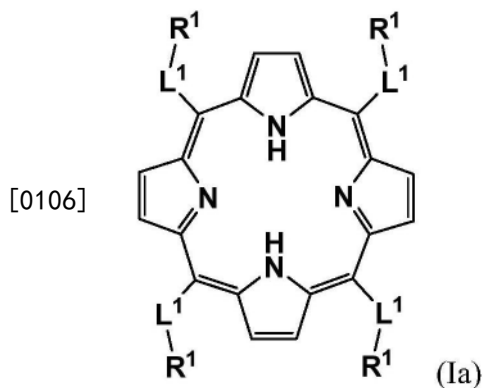
[0101] 根据一个实施方案,糖簇分子包含至少一种易与S蛋白结合的其他取代基,例如抗体、抗体片段、纳米抗体或凝集素。

[0102] 根据一个实施方案,糖簇分子是式(I)的化合物



[0104] 在式(I)中,M是金属阳离子,例如锌阳离子、铁阳离子、铜阳离子、锰阳离子、银阳离子、金阳离子、钴阳离子、镍阳离子、锡阳离子、镉阳离子、铅阳离子或钷阳离子。在一个实施方案中,金属阳离子具有两个或三个正电荷,优选两个正电荷。在一个实施方案中,M是选自锌(II)、铁(II)、铁(III)、铜(II)、铜(III)、锰(II)、锰(III)、银(II)、银(III)、金(III)、钴(II)、钴(III)、镍(II)、镍(III)、锡(II)、镉(II)、铅(II)、钷(II)和钷(III)的金属阳离子。

[0105] 根据一个实施方案,糖簇分子是式(Ia)的化合物



[0107] 在式(I)和(Ia)中,每个 L^1 独立地是单键或选自烷基、杂烷基、烯基、炔基、芳基、烷基芳基、芳基烷基、杂芳基、杂芳基烷基和烷基杂芳基的接头;其中烷基、杂烷基、烯基、炔基、芳基、烷基芳基、芳基烷基、杂芳基、杂芳基烷基或烷基杂芳基任选包含至少一种偶联生成物。在一个实施方案中,每个 L^1 是选自烷基、杂烷基、烷基芳基、芳基烷基、杂芳基烷基和烷基杂芳基的接头;其中烷基、杂烷基、烷基芳基、芳基烷基、杂芳基烷基或烷基杂芳基包含至少一种偶联生成物。在一个实施方案中,接头包含一种或两种偶联生成物。在一个实施方案中,接头包含一种偶联生成物(即只有一种偶联生成物)。在一个实施方案中,偶联生成物中的至少一种是三唑基。

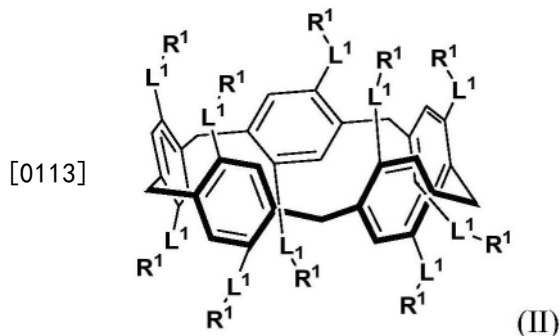
[0108] 在式(I)和(Ia)中,每个 R^1 独立地选自乙酰化-唾液酸和ACE2结合抑制剂;条件是至少两个 R^1 是乙酰化-唾液酸。

[0109] 在一个实施方案中,每个 L^1-R^1 选自 $-(CH_2)_m-R^C-(CH_2)_n-R^1$ 、 $-O-(CH_2)_m-R^C-(CH_2)_n-R^1$ 、 $-C(O)-(CH_2)_m-R^C-(CH_2)_n-R^1$ 、 $-C(O)O-(CH_2)_m-R^C-(CH_2)_n-R^1$ 、 $-\text{苯基}-(CH_2)_m-R^C-(CH_2)_n-R^1$ 和 $-\text{苯基}-O-(CH_2)_m-R^C-(CH_2)_n-R^1$;其中 R^C 是偶联生成物, m 和 n 独立地是1至8的整数。在一个实施方案中, R^C 是三唑基。在一个实施方案中, m 是1至6的整数,优选1至4的整数,更优选2至4的整数,更优选2或3。在一个实施方案中, n 是1至4的整数,优选1至3的整数,更优选1或2,更优选1。

[0110] 在一个实施方案中,每个 L^1-R^1 是 $-\text{苯基}-O-(CH_2)_m-R^C-(CH_2)_n-R^1$;其中 R^C 是偶联生成物, m 和 n 独立地是1至8的整数。

[0111] 在一个实施方案中,每个 R^1 选自7-O-乙酰化-唾液酸和9-O-乙酰化-唾液酸。在一个实施方案中,每个 R^1 是7-O-乙酰化-唾液酸。根据一个实施方案,每个 R^1 是9-O-乙酰化-唾液酸。

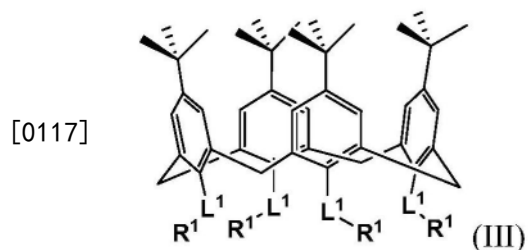
[0112] 根据一个实施方案,糖簇分子是式(II)的化合物



[0114] 其中 L^1 和 R^1 如上文式(I)和(Ia)中所定义。

[0115] 在一个实施方案中,每个 L^1-R^1 是 $-O-(CH_2)_m-R^C-(CH_2)_n-R^1$;其中 R^C 是偶联生成物, m 和 n 独立地是1至8的整数。在一个实施方案中, R^C 是三唑基。在一个实施方案中, m 是1至6的整数,优选1至4的整数,更优选2至4的整数,更优选2或3。在一个实施方案中, n 是1至4的整数,优选1至3的整数,更优选1或2,更优选1。

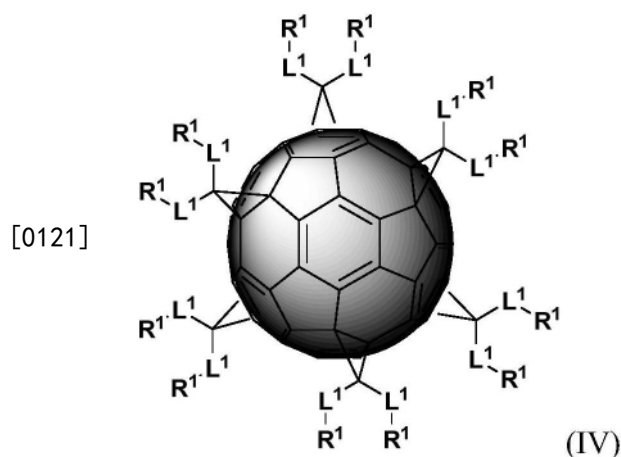
[0116] 根据一个实施方案,糖簇分子是式(III)的化合物



[0118] 其中 L^1 和 R^1 如上文式(I)和(Ia)中所定义。

[0119] 在一个实施方案中,每个 L^1-R^1 是 $-O-(CH_2)_m-R^C-(CH_2)_n-R^1$;其中 R^C 是偶联生成物, m 和 n 独立地是1至8的整数。在一个实施方案中, R^C 是三唑基。在一个实施方案中, m 是1至6的整数,优选1至4的整数,更优选2至4的整数,更优选2或3。在一个实施方案中, n 是1至4的整数,优选1至3的整数,更优选1或2,更优选1。

[0120] 根据一个实施方案,糖簇分子是式(IV)的化合物

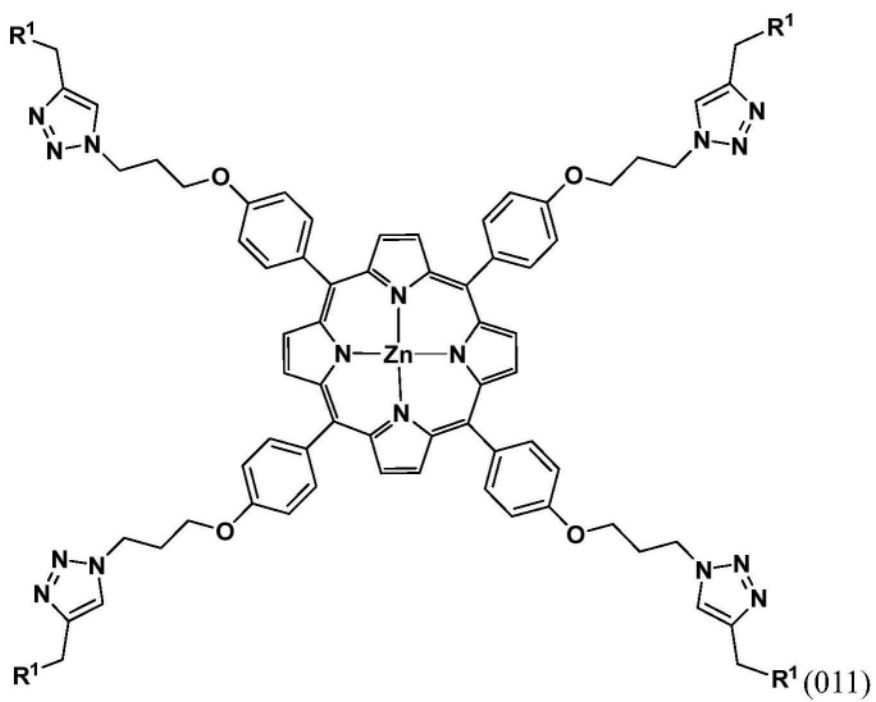


[0122] 其中 L^1 和 R^1 如上文式(I)和(Ia)中所定义。

[0123] 在一个实施方案中,每个 L^1-R^1 是 $-C(O)O-(CH_2)_m-R^C-(CH_2)_n-R^1$;其中 R^C 是偶联生成物, m 和 n 独立地是1至8的整数。在一个实施方案中, R^C 是三唑基。在一个实施方案中, m 是1至6的整数,优选1至4的整数,更优选2至4的整数,更优选2或3。在一个实施方案中, n 是1至4的整数,优选1至3的整数,更优选1或2,更优选1。

[0124] 根据一个实施方案,糖簇分子是式(011)的化合物

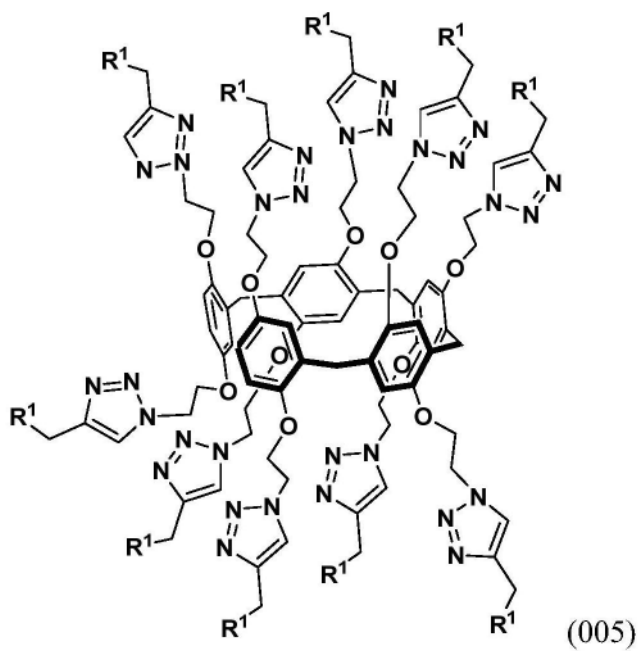
[0125]



[0126] 或其药学上可接受的盐或其溶剂合物。

[0127] 根据一个实施方案,糖簇分子是式 (005) 的化合物

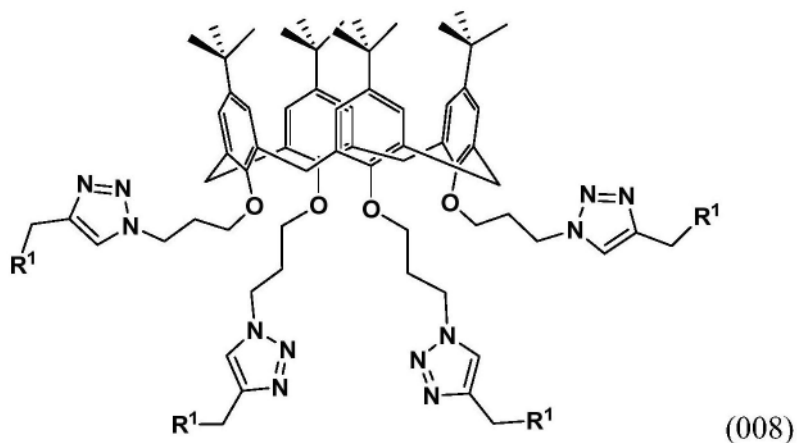
[0128]



[0129] 或其药学上可接受的盐或其溶剂合物。

[0130] 根据一个实施方案,糖簇分子是式 (008) 的化合物

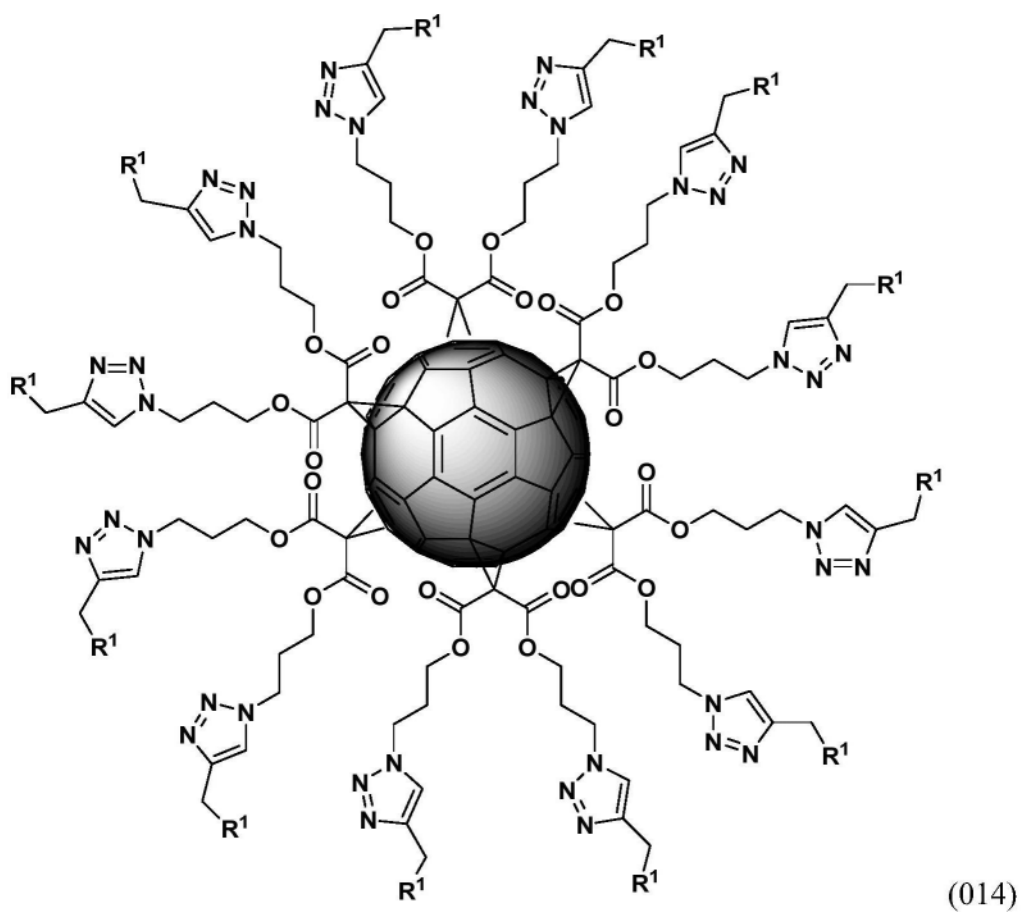
[0131]



[0132] 或其药学上可接受的盐或其溶剂合物。

[0133] 根据一个实施方案,糖簇分子是式 (014) 的化合物

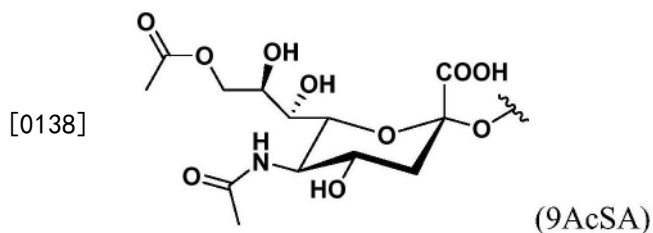
[0134]



[0135] 或其药学上可接受的盐或其溶剂合物。

[0136] 在上式 (011)、(005)、(008) 和 (014) 中,每个R¹如式 (I) 和 (Ia) 中所述。

[0137] 在一个实施方案中,在上文的式 (011)、(005)、(008) 和 (014) 中,每个R¹为式 (9AcSA)



[0139] 其中波浪线代表 R^1 与糖簇分子的连接点。

[0140] 在一个实施方案中,糖簇分子选自上述式(011)、(005)、(008)和(014)的化合物或其药学上可接受的盐或其溶剂合物,其中每个 R^1 为式(9AcSA),即本文实施例1中所示的化合物011、005、008和014或其药学上可接受的盐或其溶剂合物。

[0141] 本文对本发明化合物(例如,“糖簇分子”或“式(I)”)的所有引用包括对其盐的引用,优选药学上可接受的盐、溶剂合物、多组分络合物和/或液晶。本文对本发明化合物的所有引用包括对其多晶型物和/或晶体习性的引用。对本发明化合物的所有引用包括对其药学上可接受的前体药物的引用。对本发明化合物的所有引用包括对同位素标记的化合物的引用,包括氘代化合物。

[0142] 本发明的化合物(例如“糖簇分子”或“式(I)”)及其子结构式包含至少一个不对称中心,因此可以不同的立体异构形式存在。因此,对本发明化合物的所有引用包括对所有可能的立体异构体的引用,不仅包括外消旋化合物,还包括单独的对映体及其非-外消旋混合物。当需要单一对映体的化合物时,这种单一对映体可以通过立体专一性合成,通过拆分最终产物或任何方便的中间体,或通过本领域已知的手性色谱方法获得。终产物、中间体或原料的拆分可以通过本领域已知的任何合适的方法进行。

[0143] 本发明的化合物可以是药学上可接受的盐形式。药学上可接受的盐包括其酸加成盐和碱盐。合适的酸加成盐由形成无毒盐的酸形成。实例包括乙酸盐、己二酸盐、天冬氨酸盐、苯甲酸盐、苯磺酸盐、碳酸氢盐/碳酸盐、硫酸氢盐/硫酸盐、硼酸盐、樟脑磺酸盐、柠檬酸盐、环磺酸盐、乙二磺酸盐、乙磺酸盐、甲酸盐、延胡索酸盐、葡庚糖酸盐、葡萄糖酸盐、葡萄糖醛酸盐、六氟磷酸盐、羟苯酰苯酸盐、盐酸盐/氯化物、氢溴酸盐/溴化物、氢碘化物/碘化物、羟乙基磺酸盐、乳酸盐、苹果酸盐、马来酸盐、丙二酸盐、甲磺酸盐、甲硫酸盐、萘酸盐、2-萘磺酸盐、烟酸盐、硝酸盐、乳清酸盐、草酸盐、棕榈酸盐、双羟萘酸盐、磷酸盐/磷酸氢盐/磷酸二氢盐、焦谷氨酸盐、蔗糖盐、硬脂酸盐、琥珀酸盐、丹宁酸盐、酒石酸盐、甲苯磺酸盐、三氟乙酸盐和昔美酸盐。合适的碱盐由形成无毒盐的碱形成。实例包括铝盐、精氨酸盐、苺星盐、钙盐、胆碱盐、二乙胺盐、2-(二乙胺基)乙醇盐、二乙醇胺盐、氨基乙醇盐、甘氨酸盐、4-(2-羟乙基)-吗啉盐、赖氨酸盐、镁盐、葡甲胺盐、吗啉盐、乙醇胺盐、钾盐、钠盐、氨丁三醇盐和锌盐。也可以形成酸和碱的半盐,例如半硫酸盐和半钙盐。当化合物含有酸性基团和碱性基团时,该化合物也可以形成内盐,这种化合物在本发明的范围内。当化合物含有供氢杂原子(例如NH)时,本发明还涵盖通过将所述氢原子转移到分子内的碱性基团或原子而形成的盐和/或异构体。

[0144] 本发明化合物的药学上可接受的盐可以通过以下一种或多种方法制备:(i)使化合物与所需的酸反应;(ii)使化合物与所需的碱反应;(iii)通过从合适的化合物前体中除去对酸或碱不稳定的保护基团,或者通过使用所需的酸开环合适的环状前体,例如内酯或内酰胺;和/或(iv)通过与合适的酸反应或通过合适的离子交换柱将该化合物的一种

盐转化成另一种盐。所有这些反应通常在溶液中进行。盐可以从溶液中沉淀出来,通过过滤收集,或者可以通过蒸发溶剂回收。盐的电离程度可以从完全电离到几乎不电离。

[0145] 药物组合物

[0146] 本发明还涉及药物组合物,其包含本文所述的本发明化合物和至少一种药学上可接受的载体。

[0147] 根据一个实施方案,药物组合物还包含至少另一种治疗剂。在一个实施方案中,治疗剂是抗病毒剂。在一个实施方案中,所述至少另一种治疗剂是本文所述的血管紧张素转换酶2(ACE2)结合抑制剂。在一个特定的实施方案中,酶2(ACE2)结合抑制剂被糖簇分子载体化。

[0148] 本发明的化合物可以单独或一起配制成合适的剂量单位制剂,其中含有适用于每种施用途的常规无毒的药学上可接受的载体、佐剂和赋形剂。

[0149] 医疗用途和治疗方法

[0150] 本发明还涉及如本文所述的本发明化合物或如本文所述的本发明药物组合物,其用作药物。

[0151] 本发明还涉及如本文所述的本发明化合物或如本文所述的本发明药物组合物,其用于治疗 and/or 预防感染性疾病。

[0152] 根据一个实施方案,感染性疾病是冠状病毒感染或小RNA病毒感染。在一个实施方案中,感染性疾病是冠状病毒感染。

[0153] 在一个实施方案中,冠状病毒是甲型冠状病毒或乙型冠状病毒,优选乙型冠状病毒。甲型冠状病毒的非限制性实例包括人类冠状病毒229E(HCoV-229E)和人类冠状病毒NL63(HCoV-NL63),有时也被称为HCoV-NH或纽黑文人类冠状病毒。乙型冠状病毒的非限制性实例包括人类冠状病毒OC43(HCoV-OC43)、人类冠状病毒HKU1(HCoV-HKU1)、以前称为新型冠状病毒2012或HCoV-EMC的中东呼吸综合征相关冠状病毒(MERS-CoV)、也称为SARS-CoV-1或SARS-典型的严重急性呼吸综合征冠状病毒(SARS-CoV)以及也称为2019-nCoV或新型冠状病毒2019的严重急性呼吸综合征冠状病毒(SARS-CoV-2)。在一个实施方案中,冠状病毒选自HCoV-229E、HCoV-NL63、HCoV-OC43、HCoV-HKU1、MERS-CoV、SARS-CoV-1和SARS-CoV-2。在一个实施方案中,冠状病毒选自MERS-CoV、SARS-CoV-1和SARS-CoV-2。

[0154] 根据一个实施方案,冠状病毒是SARS冠状病毒。在一个实施方案中,冠状病毒是SARS-CoV-1或SARS-CoV-2。在一个实施方案中,冠状病毒是引起严重急性呼吸综合征(SARS)的SARS-CoV(也称为SARS-CoV-1)。在一个实施方案中,冠状病毒是引起COVID-19的SARS-CoV-2。

[0155] 在本申请中,对“冠状病毒”或“SARS-CoV-2”的任何提及包括其目前已鉴定的任何变体。根据一个实施方案,冠状病毒是SARS-CoV-2疫情的原始单倍型(谱系A或B)或其变体。在一个实施方案中,冠状病毒是SARS-CoV-2 α (谱系B.1.1.7及其亚谱系)。在一个实施方案中,冠状病毒是SARS-CoV-2 β (谱系B.1.351及其亚谱系)。在一个实施方案中,冠状病毒是SARS-CoV-2 γ (谱系P.1及其亚谱系)。在一个实施方案中,冠状病毒是SARS-CoV-2 δ (谱系B.1.617.2、XD、XF、XS及其亚谱系)。在一个实施方案中,冠状病毒是SARS-CoV-2 ϵ (谱系B.1.427、B1.429及其亚谱系)。在一个实施方案中,冠状病毒是SARS-CoV-2 ζ (谱系P.2及其亚谱系)。在一个实施方案中,冠状病毒是SARS-CoV-2 η (谱系B.1.525及其亚谱系)。在一个

实施方案中,冠状病毒是SARS-CoV-2θ(谱系P.3及其亚谱系)。在一个实施方案中,冠状病毒是SARS-CoV-2ι(谱系B.1.526及其亚谱系)。在一个实施方案中,冠状病毒是SARS-CoV-2κ(谱系B.1.617.1及其亚谱系)。在一个实施方案中,冠状病毒是SARS-CoV-2λ(谱系C.37及其亚谱系)。在一个实施方案中,冠状病毒是SARS-CoV-2μ(谱系B.1.621及其亚谱系)。在一个实施方案中,冠状病毒是SARS-CoV-2ο(谱系B.1.1.529、BA.1、BA.2、BA.3、BA.4、BA.5、XE及其亚谱系)。可在CoV谱系网站https://cov-lineages.org/lineage_list.html上找到所有SARS-CoV-2变体的列表。

[0156] 在一个实施方案中,COVID-19是中度的COVID-19。在一个实施方案中,COVID-19是轻度至中度的COVID-19。在一个实施方案中,COVID-19是轻度的COVID-19。在一个实施方案中,COVID-19是轻度至重度的COVID-19。在一个实施方案中,COVID-19是重度的COVID-19。患有COVID-19的对象可以住院也可以不住院。

[0157] 在一个实施方案中,根据世界卫生组织(世卫组织)的严重程度标准评估COVID-19严重程度,该标准如下:-轻度:临床症状轻微,影像学上无肺炎迹象的病例。-中度:出现发热和呼吸道症状的病例,伴有肺炎的放射学表现,需要(O_2):3L/分钟<氧气<5L/分钟。-重度:符合以下任一标准的病例:呼吸窘迫(呼吸频率(RR) ≥ 30 次呼吸/分钟);静息下环境空气中氧饱和(SpO_2) $\leq 93\%$;或 $O_2 > 5L/分钟$ 情况下 $SpO_2 \leq 97\%$;动脉氧分压/吸入氧分数的比值(PaO_2/FiO_2) $\leq 300mmHg$ ($1mmHg = 0.133kPa$),高海拔地区(海拔1000米以上)的 PaO_2/FiO_2 应通过以下公式进行校正: PaO_2/FiO_2 [乘以][大气压力(mmHg)/760];和/或在24小时至48小时内显示明显病变进展的胸部影像 $> 50\%$ 。-危急:符合以下任何标准的病例:呼吸衰竭并需要机械通气;休克;和/或其他需要ICU护理的器官衰竭。在一个实施方案中,COVID-19的严重程度和/或进展用世卫组织10分进展量表进行评估,如下表2所示。

[0158] 表2:COVID-19的世卫组织10分进展量表

[0159]	世卫组织 10 分进展量表	描述	得分
	未感染的	未感染的；未检测到病毒 RNA	0
	能走动的	无症状；检测到病毒 RNA	1
	能走动的	有症状；自主的	2
	能走动的	有症状；需要援助	3
	住院：轻症	住院；没有氧疗	4
	住院：轻症	住院；通过面罩或鼻管吸氧	5
	住院：重症	住院；通过无创机械通气(NIV)或高流量吸氧	6
	住院：重症	插管和机械通气， $\text{PaO}_2/\text{FIO}_2 \geq 150$ mmHg 或氧饱和度与吸入氧比值 ($\text{SpO}_2/\text{FIO}_2$) ≥ 200 mmHg	7
	住院：重症	机械通气， $\text{PaO}_2/\text{FIO}_2 < 150$ mmHg 或 $\text{SpO}_2/\text{FIO}_2 < 200$ mmHg，或升压药（去甲肾上腺素 $> 0.3 \mu\text{g/kg/分钟}$ ）	8
	住院：重症	机械通气， $\text{PaO}_2/\text{FIO}_2 < 150$ mmHg 和升压药（去甲肾上腺素 $> 0.3 \mu\text{g/kg/分钟}$ ），或透析或 ECMO	9
	死亡	死亡的	10

[0160] 在一个实施方案中，要根据本发明治疗的对象患有COVID-19，并且在COVID-19的世卫组织10分疾病进展量表（如表2中所述）上的得分范围为1至5，优选范围为2至4；范围从3至6，优选范围从4至5；或者范围从5至9，优选范围从6至8。

[0161] 本发明的化合物或药物组合物可以通过口服、肠胃外（例如肌内、腹膜内、静脉内、ICV、脑池内注射或输注、皮下注射或植入）、吸入喷雾、鼻、阴道、直肠、舌下或局部施用途途径施用。在感染性疾病的治疗和/或预防中，合适的剂量水平可以是每天每kg患者体重约0.01mg至500mg (mg/kg/天)，可以单剂量或多剂量施用。通常，剂量水平为约0.1mg/kg/天至约250mg/kg/天，优选约0.5mg/kg/天至约100mg/kg/天，更优选约2.5mg/kg/天至约20mg/kg/天。该化合物可以每天1次至4次的方案施用，优选每天1次或2次。然而，可以理解的是，任何具体患者的具体剂量水平和剂量频率可以变化，并取决于多种因素，包括所用具体化合物的活性、该化合物的代谢稳定性和作用时间、年龄、体重、总体健康状况、性别、饮食、施用方式和时间、排泄率、药物组合、特定病症的严重程度和接受治疗的宿主。

[0162] 本发明还涉及本文所述的本发明化合物或本文所述的本发明药物组合物在制备

用于治疗 and/或预防感染性疾病的药物中的用途。本发明还涉及用于治疗 and/或预防有需要的对象的感染性疾病的方法,包括给予对象治疗有效量的本文所述的本发明化合物或本文所述的本发明药物组合物的步骤。本发明还涉及本文所述的本发明化合物或本文所述的本发明药物组合物在治疗 and/或预防感染性疾病中的用途。

[0163] 糖簇分子合成

[0164] 在本发明中,糖簇分子可以通过本领域已知的任何合成方法制备。特别地,用于在乙酰化-唾液酸和大环之间产生共价连接的合适合成方法是有机化学领域技术人员常识的一部分。

[0165] 根据一个实施方案,乙酰化-唾液酸可以通过2号位、4号位、7号位、8号位或9号位上的至少一个非乙酰化的羟基连接至大环。在一个实施方案中,乙酰化-唾液酸通过2号位或4号位的羟基连接至大环。在一个实施方案中,乙酰化-唾液酸通过2号位的羟基连接至大环。2号位上的羟基特别有利于将乙酰化-唾液酸连接至大环,而不损害乙酰化-唾液酸另一侧的生物活性。

[0166] 根据一个实施方案,非乙酰化的羟基用作偶联官能团,并与大环的相应偶联官能团(例如卤代烃、羧酸或胺)反应,以形成乙酰化-唾液酸和大环之间的连接(例如醚、酯或酰胺键)。根据另一个实施方案,羟基首先被包含除羟基以外的偶联官能团的基团取代和/或转化成除羟基以外的偶联官能团,然后该另外的偶联官能团与大环的相应偶联官能团反应以形成乙酰化-唾液酸和大环之间的连接。

[0167] 根据一个实施方案,糖簇分子通过铜(I)催化的叠氮-炔环加成(CuAAC)制备。在一个实施方案中,糖簇分子在铜(I)催化剂如铜(I)盐(例如溴化铜或碘化铜)或铜(II)盐(例如硫酸铜)和还原剂(例如抗坏血酸钠)的混合物的存在下制备。

[0168] 根据一个实施方案,糖簇分子通过至少两当量的包含叠氮化物($-N_3$)的乙酰化-唾液酸与包含至少两个末端炔烃($-C\equiv CH$)的大环反应来制备。在一个实施方案中,乙酰化-唾液酸包含 $-O-(CH_2)_n-N_3$ 基团,其中n是1至8的整数。在一个实施方案中,大环包含至少两个 $-O-(CH_2)_m-C\equiv CH$ 基团,其中m是1至8的整数。

[0169] 根据另一个实施方案,糖簇分子通过至少两当量的包含末端炔烃($-C\equiv CH-$)的乙酰化-唾液酸与包含至少两个叠氮化物($-N_3$)的大环反应来制备。在一个实施方案中,乙酰化-唾液酸包含 $-O-(CH_2)_n-C\equiv CH$ 基团,其中n是1至8的整数。在一个实施方案中,大环包含至少两个 $-O-(CH_2)_m-N_3$ 基团,其中m是1至8的整数。

附图说明

[0170] 图1是显示从 α -炔丙基唾液酸(α -p-SA) 001或 α -炔丙基乙酰化唾液酸(α -p-9-AcSA) 002和叠氮化合物003、006、009和012制备SA-或9-AcSA-衍生的糖簇分子004至014的方法的方案(在实施例1-d的方案3中显示)。

[0171] 图2是显示在用游离1mM 9-AcSA封闭之前和之后,在S1功能化的尖端和用9-AcSA、SA或链霉亲和素包被的表面之间测量的特异性结合概率(BP)的箱线图,如实施例2.1所述。一个数据点代表1024条FD曲线的结合频率(BF)。方框中的正方形表示平均值,彩色方框表示第25和第75百分位数,虚线表示最高和最低值。方框中的线表示中间值。N=9张图,在3次独立实验中进行了检查。P值由Origin的双样本t检验确定。

[0172] 图3是显示S1和9-AcSA之间的结合频率(BF)作为保持时间的函数的图,如实施例2.2中所述。数据与单-指数衰减曲线(线)的最小二乘拟合提供了探测相互作用的平均动力学开启率(k_{on})。进一步计算(k_{off}/k_{on})得出 K_D 。一个数据点代表1024条FD曲线获得的BF。

[0173] 图4至图9显示了如实施例2.5中所述的SA-或9-AcSA-衍生的糖簇分子的抗结合特性的筛选结果。

[0174] 图4至图8是直方图,显示了受试分子的抑制效率,该抑制效率是通过测量在以递增浓度(1 μ M至100 μ M)与受试分子孵育前后9-AcSA和SARS-CoV-2之间相互作用的结合概率(BP)来评估的。归一化直方图显示了在与1 μ M、10 μ M或100 μ M游离乙酰化唾液酸(9-AcSA)(图4)、SA-和9-AcSA-柱[5]芳烃004和005(图5)、SA-和9-AcSA-富勒烯013和014(图6)、SA-和9-AcSA-卟啉010和011(图7)或SA-和9-AcSA-杯[4]芳烃007和008(图8)孵育前后9-AcSA和SARS-CoV-2之间相互作用的相对BP。

[0175] 图9显示了如实施例2.5所述,在与乙酰化测试分子9-AcSA- α -p、005、008、011和014一起孵育后,随着浓度的增加(1 μ M至100 μ M),结合概率(BP)的降低。数据代表每SA树枝状聚合物浓度至少N=3次独立实验(尖端和样品)。P值由Origin的双样本t检验确定。误差条表示平均值的标准偏差(s.d.)。

[0176] 图10和图11显示了如实施例2.6中所述的低浓度下9-AcSA-卟啉糖簇分子011抑制模型表面(9-0-乙酰化SA)和活细胞(CHO细胞)上SARS-CoV-2与乙酰化SA结合的效率的探测结果。

[0177] 图10为箱线图,显示了在以递增浓度(0.001 μ M至100 μ M)用9-AcSA-卟啉糖簇分子011孵育前后SARS-Cov-2和9-0-乙酰化SA模型表面之间相互作用的相对结合值。

[0178] 图11为箱线图,显示了在以递增浓度(0.1 μ M至10 μ M)用9-AcSA-卟啉糖簇分子011孵育前后SARS-Cov-2和CHO细胞之间相互作用的相对结合值。

[0179] 图12是显示感染性测定结果的直方图,即在游离SA、游离9-AcSA、SA-卟啉010和9-AcSA卟啉011存在下测量的感染性,如实施例2.7中所述。每个点显示一个孔的感染性。彩色方框表示平均值,虚线表示平均值的标准差。方框中的线表示中间值。P值由Origin的双样本t检验确定。

[0180] 图13A至图13B是S1和Lec2或CHO细胞之间(图13A)或SARS-CoV-2和Lec2或CHO细胞之间(图13B)的结合概率(BP,单位%)的两个箱线图。 $n=10$ (图13A)或12(图13B)的图在三个独立的实验中进行了检查。P值由Origin的双样本t-检验确定。

[0181] 实施例

[0182] 通过以下实施例进一步说明本发明。

[0183] 实施例1:合成和表征的材料、方法和结果

[0184] 实施例1-a:一般材料和方法

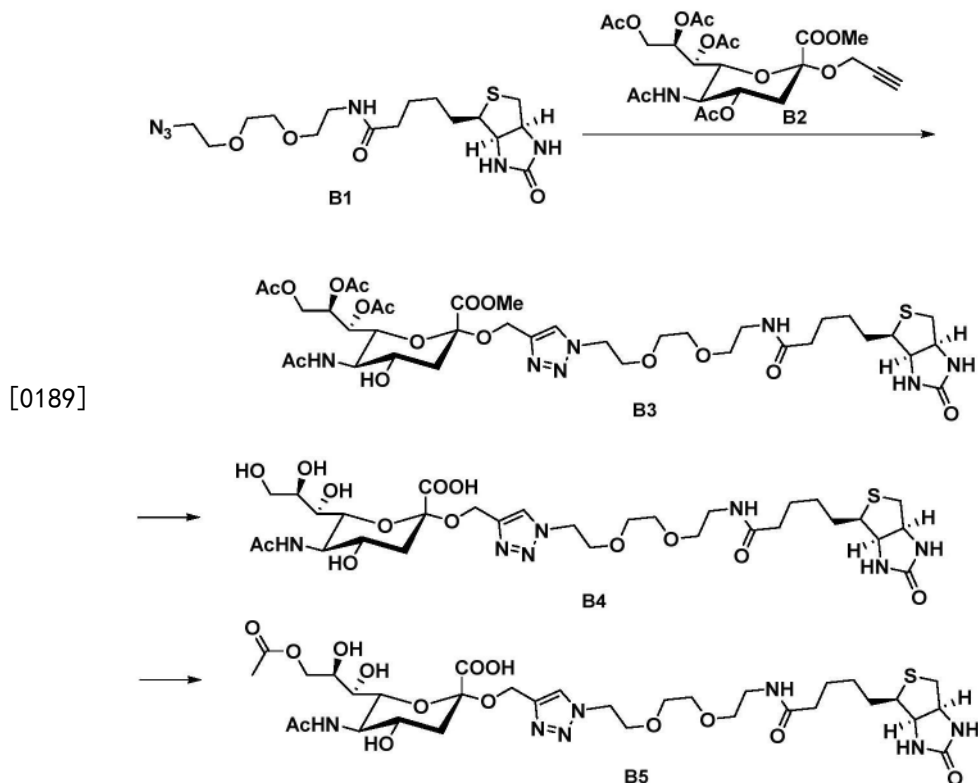
[0185] 用于色谱的溶剂是以工业级购买的,并在使用前进一步蒸馏。试剂和化学品从Sigma-Aldrich或Acros公司购买,属于ACS等级,使用时未经纯化。

[0186] 使用 $KMnO_4$ 和磷钼酸溶液作为展开剂,通过在Merck铝辊硅胶60-F₂₅₄上进行的薄层色谱(TLC)监测所有反应。采用Merck硅胶(60,粒度40 μ m至63 μ m)进行快速柱色谱。核磁共振谱在JEOL ECX 400或JEOL ECX 500上记录,以溶剂峰作为参考。这些化合物通过¹H和¹³C核磁共振以及¹H-¹H和¹H-¹³C相关实验进行了表征。用于定义多重性的缩写为:s=单峰,d=双

峰,t=三峰,q=四峰,m=多峰和br=宽峰。化学位移(δ)以ppm为单位报告,并间接参考残留溶剂信号。高分辨率质谱(HRMS)在Bruker maXis Impact QTOF质谱仪和Bruker MicroTOF-Q II XL光谱仪上进行。

[0187] 实施例1-b:生物素化唾液酸的合成及表征

[0188] 如方案1所示制备化合物B4和B5。



[0190] 方案1:生物素化唾液酸B4和B5的合成

[0191] 根据已知方法制备中间体化合物B1 (Jung, D. 等人 Chemical Communications, 2014, Vol. 50, pp. 3044-3047)。根据已知方法制备中间体化合物B2 (Gan, Z. & Roy, R., Canadian Journal of Chemistry, 2002, Vol. 80, pp. 908-916)。按照先前描述的方法将化合物B5乙酰化 (Ogura, H. 等人 Carbohydrate Research, 1987, Vol. 167, pp. 77-86)。

[0192] 中间体化合物(B3):在氩气气氛下,向在无水二甲基甲酰胺(DMF)(20mL)中的化合物B1(401mg, 1.0毫摩尔, 1当量)、化合物B2(636mg, 1.2毫摩尔, 1.2当量)和Et₃N(0.278mL, 2.0毫摩尔, 2当量)的溶液中加入CuI(38mg, 0.2毫摩尔, 0.2当量)。溶液在室温下搅拌12小时。真空蒸发溶剂后,加入EtOAc(30mL)和饱和氯化铵(30mL),分离各相。有机层用盐水(30mL)洗涤,用MgSO₄干燥,过滤,滤液减压浓缩。残留物通过硅胶柱色谱纯化,使用二氯甲烷(DCM)/甲醇(20:1)作为洗脱剂,得到白色固体(975mg, 1.15毫摩尔, 96%产率)。

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) 7.79 (s, 1H, H-12), 6.68 (br, 1H, NH), 6.43 (br, 1H, NH), 5.47 (d, *J* = 46.4 Hz, 1H, 10a), 5.45-5.42 (m, H-8), 5.35-5.32 (m, 1H, H-7), 4.92-4.87 (m, 2H, H-4, H-10b), 4.60-4.53 (m, 4H, H-13, H-17), 4.38-4.33 (m, 2H, H-9a, H-25), 4.16-4.05 (m, 3H, H-5, H-6, H-9b), 3.91 (t, *J* = 5.1 Hz, 2H, H-14), 3.80 (s, 3H, COCH₃), 3.61 (dd, *J* = 6.0, 2.7 Hz, 2H, H-15), 3.56 (dd, *J* = 5.9, 2.7 Hz, 2H, H-15), 3.50 (t, *J* = 5.2 Hz, 2H, H-17), 3.41-3.40 (m, 2H, H-18), 3.17 (dd, *J* = 11.8, 7.3 Hz, 1H, H-24), 2.95-2.88 (m, 1H, H-28a), 2.77 (d, *J* = 12.9 Hz, 1H, H-3a), 2.62 (dd, *J* = 12.8, 4.6 Hz, 1H, H-28b), 2.24 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, H-20), 2.16 (s, 3H, OCOCH₃), 2.15 (s, 3H, OCOCH₃), 2.03 (s, 3H, OCOCH₃), 2.02 (s, 3H, OCOCH₃), 1.97 (t, *J* = 12.5 Hz, 1H, H-3b), 1.88 (s, 3H, NCOCH₃), 1.77-1.63 (m, 4H, H-21, H-23), 1.48-1.42 (m, 2H, H-22). ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 173.5 (C-19), 171.0, 170.80, 170.5, 170.3, 170.2 (C=O, NCOCH₃, OAc), 168.2 (C-1), 164.0 (Cq, C-26), 143.8 (C-11), 124.4 (C-12), 98.6 (C-2), 72.8 (C-6), 70.4 (C-16), 70.1 (C-17), 69.9 (C-15), 69.4 (C-14), 69.2 (C-4), 68.5 (C-8), 67.5 (C-7), 62.6 (C-9), 61.9 (C-25), 60.3 (C-27), 58.4 (C-10), 55.7 (C-24), 53.0 (OCH₃), 50.2 (C-13), 49.2 (C-5), 40.5 (C-28), 39.1 (C-18), 37.9 (C-3), 35.9 (C-20), 28.3 (C-22), 28.1 (C-23), 25.6 (C-21), 23.2 (NCOCH₃), 21.2, 21.0, 2 x 20.9 (OCOCH₃).

[0194] HRMS (TOF-MS-ESI⁺, *m/z*): 计算为C₃₉H₆₀N₇O₁₇S[M+H]⁺ 930.3761; 实测为930.3750。

[0195] 化合物 (B4) (“biot-SA”): 将化合物B3 (345mg, 0.371毫摩尔, 1当量) 和NaOMe (40mg, 0.742毫摩尔, 2当量) 在无水甲醇 (20mL) 中的溶液在0℃下搅拌30分钟, 然后升温至室温并再搅拌1.5小时。之后, 加入Amberlyst®15离子交换树脂以中和碱。过滤树脂并用水洗涤 (2 × 5mL)。滤液在减压下蒸发, 得到白色固体。无需进一步纯化, 将白色固体溶于水 (15mL) 中并加入LiOH·H₂O (35mg, 0.831毫摩尔, 3当量)。溶液在室温下搅拌1小时, 然后加入Amberlyst®15离子交换树脂。之后, 过滤反应混合物, 用水 (2 × 5mL) 洗涤树脂, 并将滤液冻干以获得白色固体 (186mg, 0.249毫摩尔, 90%产率)。

¹H NMR (500 MHz, D₂O) δ 8.06 (s, 1H, H-12), 4.92–4.89 (m, 1H, H-10a), 4.68–4.66 (m, 1H, H-10b), 4.62–4.60 (m, 2H, H-13), 4.57–4.53 (m, 1H, H-27), 4.38–4.34 (m, 1H, H-25), 3.95–3.93 (m, 2H, H-14), 3.88–3.79 (m, 4H, H-5, H-8, H-6, H-9a), 3.76–3.71 (m, 1H, H-4), 3.65–3.55 (m, 6H, H-15, H-16, H-9b, H-7), 3.52–3.49 (m, 2H, H-17), 3.32–3.30 (m, 2H, H-18), 3.27–3.24 (m, 1H, H-24), 2.95–2.90 (m, 1H, H-28a), 2.74–2.68 (m, 2H, H-3a, H-28b), 2.21 (dd, *J* = 13.2, 6.5 Hz, 2H, H-20), 2.01–2.00 (m, 3H, NAc), 1.74 (t, *J* = 12.2 Hz, 1H, H-3b), 1.61–1.48 (m, 4H, H-21, H-23), 1.36–1.33 (m, 2H, H-22). ¹³C NMR (126 MHz, D₂O) δ 176.8 (C=O, NCOCH₃), 175.0 (C-1), 171.8 (C=O, C-19), 165.3 (C=O, C-26), 143.6 (C-11), 125.7 (C-12), 99.5 (C-2), 72.9 (C-6), 71.1 (C-8), 69.7 (C-16), 69.3 (C-17), 68.9 (C-15), 68.7 (C-14), 68.3 (C-7), 67.7 (C-4), 62.9 (C-9), 62.1 (C-25), 60.3 (C-27), 57.2 (C-10), 55.4 (C-24), 51.8 (C-5), 50.1 (C-13), 2 x 39.7 (C-28, C-3), 38.9 (C-18), 35.5 (C-20), 27.9 (C-22), 27.7 (C-23), 25.2 (C-21), 22.1 (NCOCH₃).

[0197] HRMS (TOF-MS-ESI⁺, *m/z*): 计算为C₃₀H₅₀N₇O₁₃S[M+H]⁺748.3182; 实测为748.3173。

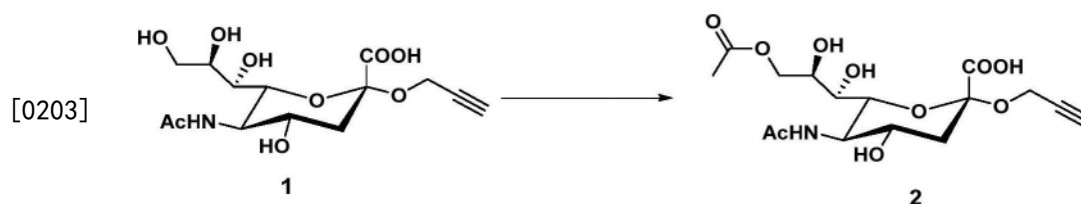
[0198] 化合物(B5) (“biot-9-AcSA”): 向在无水二甲基亚砜(DMSO) (1.2mL) 中的化合物B4 (200mg, 0.267毫摩尔, 1当量) 和原乙酸三甲酯(0.34mL, 2.67毫摩尔, 10当量) 的溶液中加入对甲苯磺酸一水合物(5.0mg, 0.027毫摩尔, 0.1当量)。溶液在室温下搅拌12小时。然后加入DCM(50mL) 沉淀粗产物。使用H₂O/甲醇(0-1/3, 梯度) 作为洗脱剂, 通过C₁₈硅胶快速色谱法纯化粗产物。将含有化合物B5的馏分合并并减压浓缩。将浓缩溶液冻干, 得到白色固体形式的所需化合物(25mg, 0.0316毫摩尔, 12%)。

¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ 8.02 (s, 1H, H-12), 4.94 (d, *J* = 12.1 Hz, 1H, H-10a), 4.67 (d, *J* = 12.1 Hz, 1H, H-10b), 4.55–4.55 (m, 2H, H-13), 4.49 (dd, *J* = 7.8, 4.7 Hz, 1H, H-27), 4.38 (dd, *J* = 11.2, 1.8 Hz, 1H, H-25), 4.31 (dd, *J* = 7.9, 4.5 Hz, 1H, H-9a), 4.14–4.06 (m, 2H, H-8, H-9b), 3.90 (t, *J* = 5.1 Hz, 2H, H-14), 3.74–3.71 (m, 2H, H-5, H-4), 3.64–3.60 (m, 3H, H-6, H-16), 3.58–3.56 (m, 2H, H-17), 3.51–3.48 (m, 3H, H-7, H-15), 3.35–3.33 (m, 2H, H-18), 3.20–3.17 (m, 1H, H-24), 2.94–2.84 (m, 2H, H-3a, H-28a), 2.69 (d, *J* = 12.7 Hz, 1H, H-28b), 2.21 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, H-20), 2.05 (s, OCOCH₃), 2.02 (s, NCOCH₃), 1.74–1.71 (m, 1H, H-3b), 1.66–1.5 (m, 4H, H-21, H-23), 1.45–1.41 (m, 2H, H-22). ¹³C NMR (126 MHz, CD₃OD) δ 176.2 (C=O, NCOCH₃), 175.5 (C-1), 174.0 (C=O, 9-O-Ac), 173.1 (C=O, C-19), 166.1 (C=O, C-26), 146.5 (C-11), 125.9 (C-12), 101.9 (C-2), 74.2 (C-6), 71.4 (C-16), 71.2 (C-17), 70.7 (C-8), 2 x 70.6 (C-7, C-15), 70.3 (C-14), 69.6 (C-4), 67.3 (C-9), 63.3 (C-25), 61.6 (C-27), 58.9 (C-10), 57.0 (C-24), 54.1 (C-5), 51.3 (C-13), 42.6 (C-3), 41.1 (C-28), 40.3 (C-18), 36.7 (C-20), 29.7 (C-22), 29.5 (C-23), 26.8 (C-21), 22.6 (NCOCH₃), 20.8 (OCOCH₃).

[0200] HRMS (TOF-MS-ESI⁺, *m/z*): 计算为C₃₂H₅₂N₇O₁₄S[M+H]⁺790.3287; 实测为790.3287。

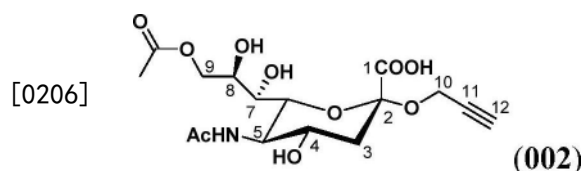
[0201] 实施例1-c:唾液酸衍生物的合成与表征

[0202] 根据已知方法制备中间体化合物001 (Daskhan, G. 等人, ChemistryOpen, 2016, Vol. 5, pp. 477-484)。根据已知方法制备中间体化合物002 (Ogura, H. 等人, Carbohydrate Research, 1987, Vol. 167, pp. 77-86), 如方案2所示。



[0204] 方案2: 中间体化合物002的合成

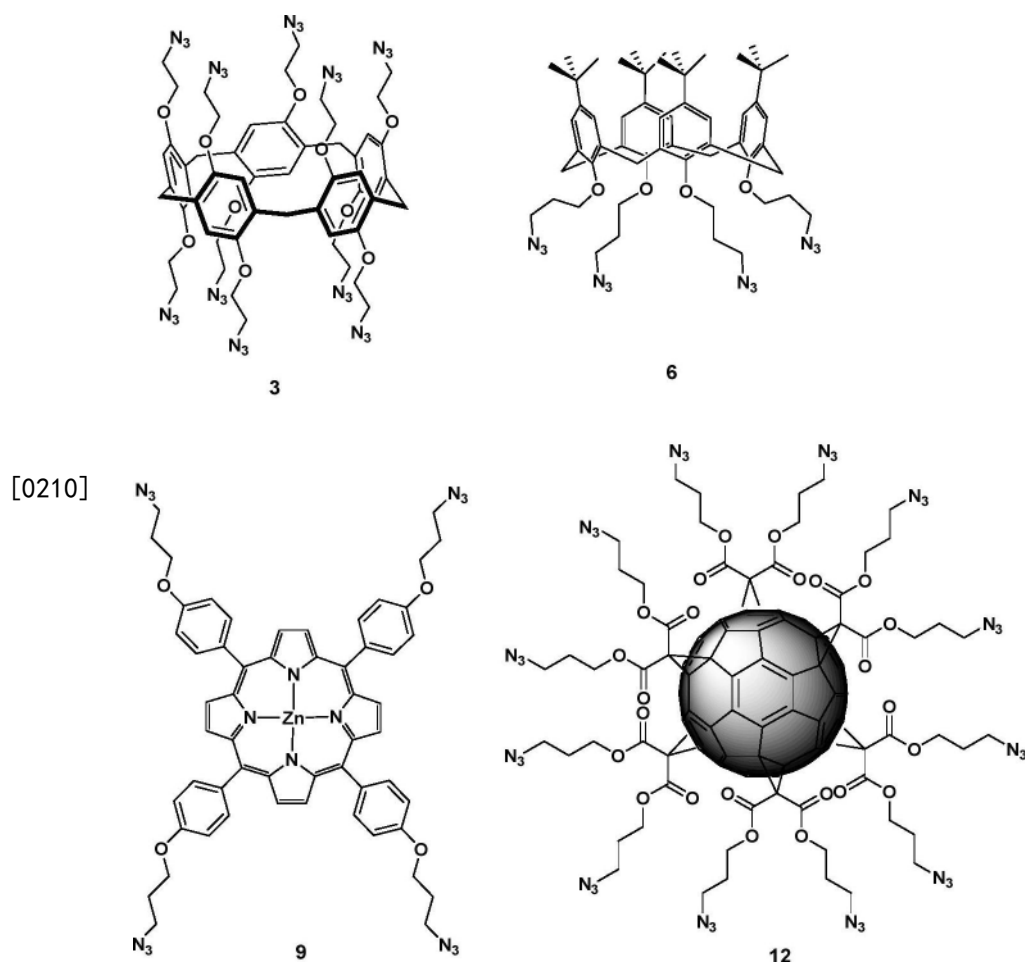
[0205] 丙-2-炔基5-乙酰氨基-9-O-乙酰基-3,5-双脱氧-D-甘油- α -D-半乳糖-2-酮吡喃糖 (002): 向在无水DMSO (4mL) 中的化合物001 (380mg, 1.1毫摩尔, 1当量) 和原乙酸三甲酯 (1.4mL, 11毫摩尔, 10当量) 的溶液中加入对甲苯磺酸一水合物 (10mg, 0.05毫摩尔, 0.05当量)。溶液在室温下搅拌12小时。然后加入DCM (20mL) 沉淀粗产物。在缓慢的棉花过滤后, 滤液中的固体重新溶解在甲醇中, 并转移以蒸发溶剂。残余物通过使用DCM/甲醇 (20:3) 的硅胶色谱纯化, 得到白色固体形式的所需化合物 (2) (167mg, 0.429毫摩尔, 39%产率)。



¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ : 4.42-4.35 (m, 2H, H-9a, H-10a), 4.17-4.03 (m, 3H, H-10b, H-9b, H-8), 3.74-3.65 (m, 2H, H-4, H-5), 3.57-3.54 (m, 1H, H-6), 3.49 (dd, J = 9.2, 1.9 Hz, 1H, H-7), 2.83 (dd, J = 12.3, 4.4 Hz, 1H, H-3a), 2.75 (t, J = 2.4 Hz, 1H, H-13), 2.06 (s, 3H, OCOCH₃), 2.03 (s, 3H, NHCOCCH₃), 1.60 (t, J = 11.7 Hz, 1H, H-3b). ¹³C NMR (126 MHz, CD₃OD) δ 175.6 (C=O, NAc), 173.5 (C-1), 173.1 (C=O, 9-O-Ac), 101.6 (C-2), 80.6 (C-11), 75.0 (C-12), 74.1 (C-6), 70.6 (C-8), 70.5 (C-7), 69.2 (C-4), 67.2 (C-9), 54.0 (C-5), 53.1 (C-10), 42.2 (C-3), 22.7 (NCOCH₃), 20.8 (OCOCH₃).

[0207] HRMS (TOF-MS-ESI⁺, m/z): 计算为C₁₆H₂₄NO₁₀ [M+H]⁺ 390.1395; 实测为390.1395。

[0208] 实施例1-d: 糖簇分子的合成与表征



[0211] 方案3:中间体化合物003、006、009和012的结构

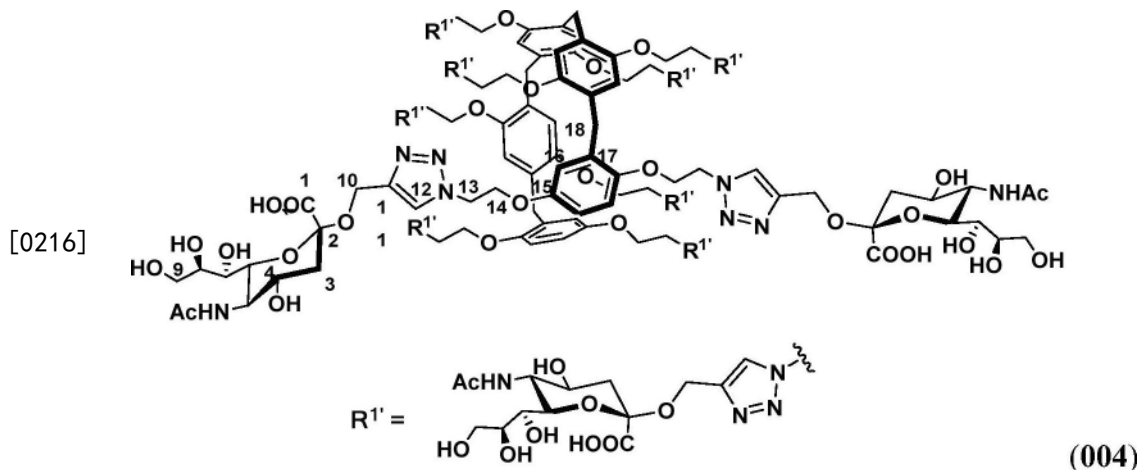
[0212] 根据已知方法制备中间体化合物003 (Nierengarten, I. 等人, Chemical Communications, 2012, Vol. 48, pp. 8072-8074)。根据已知方法制备中间体化合物006 (Tikad, A. 等人, Chemistry: A European Journal, 2016, Vol. 22, pp. 13147-13155)。根据已知方法制备中间体化合物009 (Tikad, A. 等人, Chemistry: A European Journal, 2016, Vol. 22, pp. 13147-13155; 和Liu, Y. 等人, Angewandte Chemie (International Edition English), 2016, Vol. 55, pp. 7952-7957)。根据已知方法制备中间体化合物012 (Nierengarten, J.F. 等人, Chemical Communications, 2010, Vol. 46, pp. 3860-3862)。

[0213] 如图1所示,化合物004、007、010和013(“SA-糖簇分子”)和005、008、011和014(“9-As-SA-糖簇分子”)是通过使用硫酸铜(II)和L-抗坏血酸钠的组合或溴化二甲基硫化铜(I)将可点击的 α -炔丙基唾液酸001和002接枝到多聚叠氮化物003、006、009和0012上而制备的。

[0214] 更具体地说,在混合溶剂系统(1,4-二氧六环/ H_2O , 2:1)中,用催化量的硫酸铜(II)和L-抗坏血酸钠将过量的001或002与四-叠氮柱[5]芳烃003在室温下偶联过夜。然后,004和005用丙酮沉淀,并通过铜清除(Quadrasil MP)和尺寸排阻Sephadex®G-25色谱纯化。纯化的十价柱[5]芳烃004和005分别以74%和62%的产率获得。优化了卟啉四聚体010和011的特定方法,以避免铜和锌之间的离子交换并应对009的溶解性。因此,使用较低的催化剂量和三元溶剂系统(THF/DMSO/ H_2O , 3:3:1)。四价卟啉缀合物010和011的产率分别为61%和87%。使用类似的偶联和纯化方案也以高产率获得了杯[4]芳烃007和008以及富勒烯013

和014。所有多聚体种类通过 ^1H NMR、 ^{13}C NMR和质谱进行表征,以确认所有反应的完成。

[0215] 化合物(004):在氩气气氛下,向在1,4-二氧六环(2mL)中的化合物003(21mg,0.01毫摩尔,1当量)和化合物001(70mg,0.20毫摩尔,12当量)的溶液中加入新制备的在 H_2O (1mL)中的 CuSO_4 (3.2mg,0.02毫摩尔,2当量)和NaAsc(13mg,0.066毫摩尔,6.6当量)的溶液。反应混合物在室温下剧烈搅拌过夜。然后加入丙酮(40mL)沉淀粗产物。离心后,将粗产物溶于水(2mL)中,用Quadrasil MP(40mg)处理以除去残留的铜离子。通过45 μm 无菌过滤器过滤后,滤液通过Sephadex®G-25柱,用水洗脱。收集不能通过用DCM/甲醇(1:0.3, KMnO_4 染色)进行TLC洗脱而迁移的级分。将合并的级分冻干,得到白色固体(59mg,0.0124毫摩尔,74%产率)。

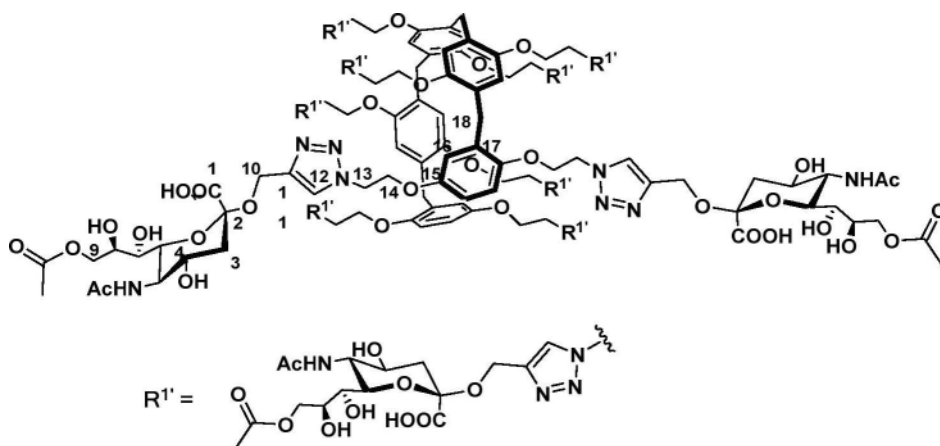


[0217] ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 8.17-8.06 (m, 10H, 10 x H-12), 6.57 (s, 10H, 10 x H-16), 4.77-4.13 (m, 60H, 10 x H-10, 10 x H-13, 10 x H-14), 3.61-3.31 (m, 80H, 10 x H-4, 10 x H-5, 10 x H-6, 10 x H-7, 10 x H-8, 10 x H-9, 10 x H-18), 2.63 (s, 10H, 10 x H-3a), 1.87 (s, 30H, 10 x NCOCH_3), 1.43 (s, 10H, 10 x H-3b). ^{13}C NMR (126 MHz $\text{DMSO}-d_6$) δ 173.9 ($\text{C}=\text{O}$, NCOCH_3), 172.0 (C-1), 149.7 (Cq, C-15), 145.2 (Cq, C-11), 129.6 (Cq, C-17), 125.2 (C-12), 116.1 (C-16), 100.5 (C-2), 73.5 (C-6), 72.1 (C-8), 69.3 (C-7), 68.1 (C-4, C-14), 63.6 (C-9), 57.8 (C-10), 53.2 (C-5), 50.8 (C-13), 41.6 (C-3), 29.0 (C-18), 23.2 (NCOCH_3).

[0218] HRMS (TOF-MS-ESI $^-$, m/z): 计算为 $\text{C}_{195}\text{H}_{267}\text{N}_{40}\text{O}_{100}$ $[\text{M}-3\text{H}]^{3-}$ 1590.2365;实测为1590.2262。

[0219] 化合物(005):在氩气气氛下,向在1,4-二氧六环(1.2mL)中的化合物003(13mg,0.01毫摩尔,1当量)和化合物002(47mg,0.12毫摩尔,12当量)的溶液中加入新制备的在 H_2O (0.6mL)中的 CuSO_4 (3.2mg,0.02毫摩尔,2当量)和NaAsc(13mg,0.066毫摩尔,6.6当量)的溶液。反应混合物在室温下剧烈搅拌过夜。然后加入丙酮(20mL)沉淀粗产物。离心后,将粗产物溶于水(2mL)中,用Quadrasil MP(40mg)处理以除去残留的铜离子。通过45 μm 无菌过滤器过滤后,滤液通过Sephadex®G-25柱,用水洗脱。收集不能通过用DCM/甲醇(1:0.3)和 KMnO_4 染色进行TLC洗脱而迁移的级分。将合并的级分冻干,得到白色固体(32mg,0.0062毫摩尔,62%产率)。

[0220]



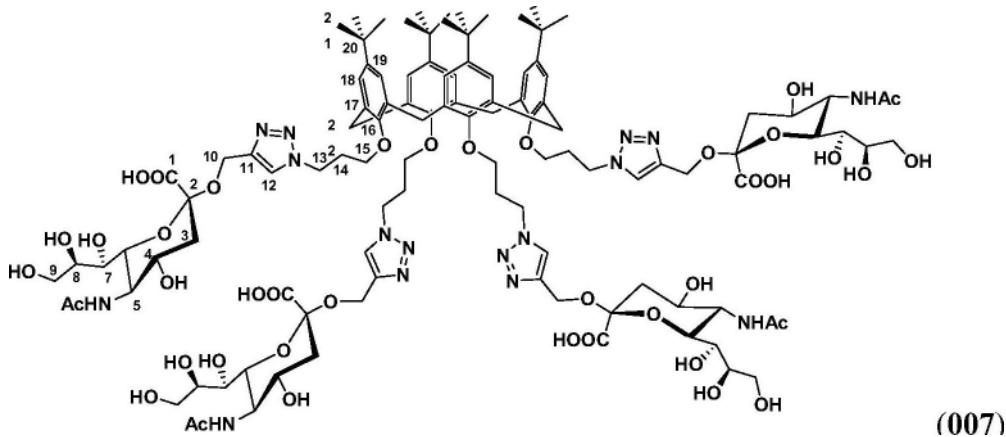
[0221]

^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ 8.16 (br, 10H, 10 x H-12), 6.62 (br, 10H, 10 x H-16), 4.69 (br, 30H, 10 x H-10b, 10 x H-13), 4.37 (br, 20H, 10 x H-9), 4.09 (br, 30H, 10 x H-8, 10 x H-14), 3.76 (br, 40H, 10 x H-4, 10 x H-5, 10 x H-6, 10 x H-18), 3.53 (br, 10H, 10 x H-7), 2.83 (br, 10H, 10 x H-3a), 2.03 (br, 60H, 10 x OCOCH_3 , 10 x NCOCH_3), 1.65 (br, 10H, 10 x H-13b). ^{13}C NMR (126 MHz, CD_3OD) δ 175.3 ($\text{C}=\text{O}$, NCOCH_3), 173.9 ($\text{C}-1$), 173.3 ($\text{C}=\text{O}$, 9-O-Ac), 151.0 (C_q , C-15), 146.3 (C_q , C-11), 130.1 (C_q , C-17), 126.0 ($\text{C}-12$), 117.1 ($\text{C}-16$), 101.7 ($\text{C}-2$), 74.3 ($\text{C}-6$), 70.6 ($\text{C}-8$), 69.3 ($\text{C}-7$), 68.6 ($\text{C}-4$, C-14), 67.3 ($\text{C}-9$), 58.9 ($\text{C}-10$), 54.0 ($\text{C}-5$), 51.4 ($\text{C}-13$), 42.1 ($\text{C}-3$), 31.0 ($\text{C}-18$), 22.9 (NCOCH_3), 21.0 (OCOCH_3).

[0222] HRMS (TOF-MS-ESI $^+$, m/z): 计算为 $\text{C}_{215}\text{H}_{293}\text{N}_{40}\text{O}_{110}$ $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ 1732.2869; 实测为 1732.2863。

[0223] 化合物(007): 在氩气氛下, 向在无水DMSO (1mL) 中的化合物006 (36mg, 0.03毫摩尔, 1当量) 和化合物001 (46mg, 0.132毫摩尔, 4.4当量) 的溶液中加入 $\text{CuBr} \cdot \text{CH}_3\text{SCH}_3$ (3.7mg, 0.018毫摩尔, 0.6当量)。在80℃下微波辐射4小时后, 将粗产物冷却并通过加入DCM (30mL) 沉淀。然后将沉淀物溶解在水 (2mL) 中, 用Quadrasil®MP (70mg) 处理以除去残留的铜离子。通过45 μm 无菌过滤器过滤后, 滤液通过Sephadex® G-15柱, 用水洗脱。收集不能通过用DCM/甲醇 (1:0.3) 和 KMnO_4 染色进行TLC洗脱而迁移的级分。将合并的级分冻干, 得到白色固体 (70mg, 0.0276毫摩尔, 92%产率)。

[0224]

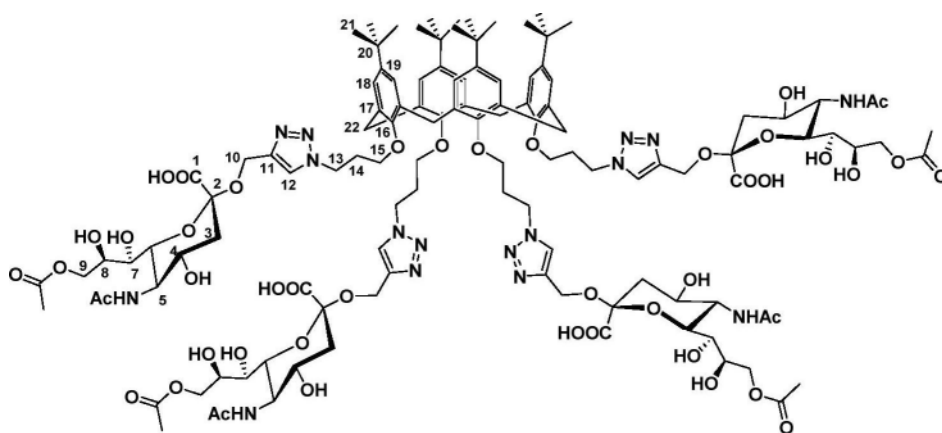


[0225] ^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ 8.03 (s, 4H, 4 x H-12), 6.82 (s, 8H, 8 x H-18), 4.62 (br, 8H, 8 x H-13), 4.35 (br, 4H, 4 x H-22a), 3.89-3.58 (m, 52H, 4 x H-4, 4 x H-5, 4 x H-6, 4 x H-7, 4 x H-8, 4 x H-9, 4 x H-15, 16 x OH), 3.13 (br, 4H, 4 x H-22b), 2.82 (br, 4H, 4 x H-3a), 2.52 (br, 8H, 4 x H-14), 2.02 (s, 12H, 4 x NCOCH_3), 1.66 (br, 4H, 4 x H-3b), 1.08 (s, 36H, 12 x H-21). ^{13}C NMR (126 MHz, CD_3OD) δ 175.3 (C=O, NCOCH_3), 173.9 (C-1), 154.2 (Cq, C-16), 146.1 (Cq, C-11, C-19), 134.9 (Cq, C-17), 126.4 (C-18), 125.6 (C-12), 101.3 (C-2), 74.50 (C-6), 73.0 (C-15), 70.1 (C-7, C-8), 69.2 (C-4), 64.3 (C-9), 58.4 (C-10), 53.9 (C-5), 48.5 (C-13), 41.9 (C-3), 34.7 (Cq, C-20), 32.0 (C-14, C-21, C-22), 22.9 (NCOCH_3).

[0226] HRMS (TOF-MS-ESI $^+$, m/z): 反卷积后计算为 $\text{C}_{120}\text{H}_{170}\text{N}_{16}\text{O}_{44}$ [M] 2369.0978; 实测为 2369.0877。

[0227] 化合物(008): 在氩气气氛下, 向在无水DMSO (1mL) 中的化合物006 (37mg, 0.03毫摩尔, 1当量) 和化合物002 (51mg, 0.132毫摩尔, 4.4当量) 的溶液中加入 $\text{CuBr} \cdot \text{CH}_3\text{SCH}_3$ (3.7mg, 0.018毫摩尔, 0.6当量)。在80℃下微波辐射4小时后, 将粗产物通过加入DCM (30mL) 沉淀。然后将沉淀物溶解在水 (2mL) 中, 用Quadrasil®MP (70mg) 处理以除去残留的铜离子。通过45 μm 无菌过滤器过滤后, 滤液通过Sephadex® G-15柱, 用水洗脱。收集不能通过用DCM/甲醇 (1: 0.3, KMnO_4 染色) 进行TLC洗脱而迁移的级分。将合并的级分冻干, 得到白色固体 (62mg, 0.0244毫摩尔, 81%产率)。

[0228]



(008)

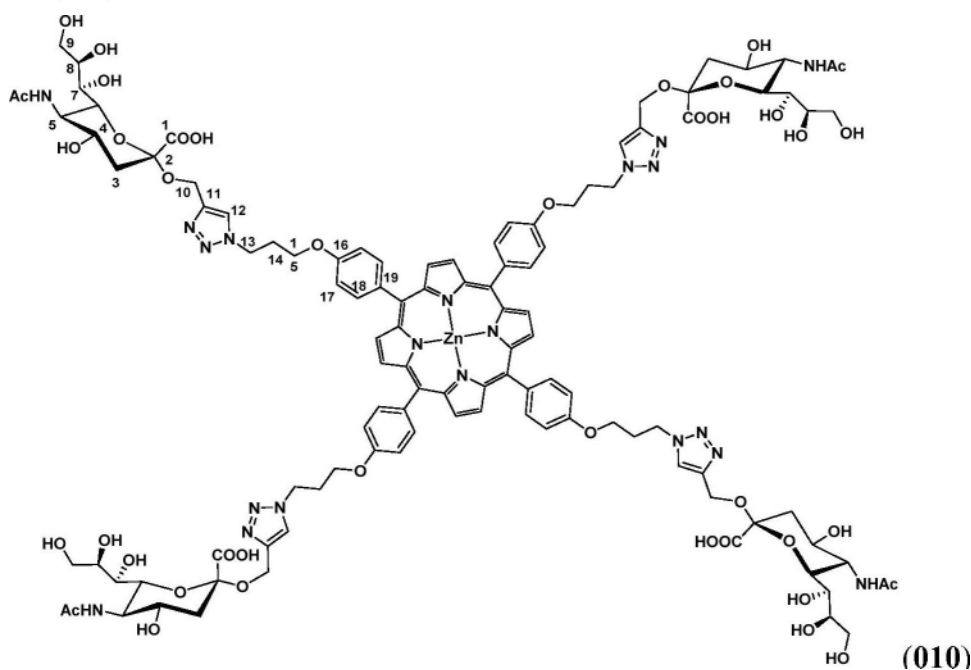
[0229]

^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ 8.21–8.06 (m, 4H, 4 x H-12), 6.82 (s, 8H, 8 x H-18), 4.63 (br, 8H, 4 x H-13), 4.37 (s, 8H, 4 x H-9a, 4 x H-22a), 4.13 (br, 8H, 4 x H-8, 4 x H-9b), 3.88–3.52 (m, 24H, 4 x H-4, 4 x H-5, 4 x H-6, 4 x H-7, 4 x H-15), 3.13 (s, 4H, 4 x H-22b), 2.79 (br, 4H, 4 x H-3a), 2.53 (br, 8H, 4 x H-14), 2.02 (br, 24H, 4 x NCOCH_3 , 4 x OCOCH_3), 1.70 (br, 4H, 4 x H-3b), 1.33 (s, 6H, 2 x H-21), 1.08 (s, 24H, 8 x H-21), 0.85 (s, 6H, 2 x H-21). ^{13}C NMR (126 MHz, CD_3OD) δ 175.3 ($\text{C}=\text{O}$, NCOCH_3), 173.1 ($\text{C}=\text{O}$, C-1, 9-O-Ac), 154.2 (Cq, C-16), 146.4 (Cq, C-11), 146.0 (Cq, C-19), 134.9 (Cq, C-17), 126.4 (Cq, C-12, C-18), 100.8 (C-2), 74.4 (C-6), 72.9 (C-15), 70.5 (C-8), 70.4 (C-7), 69.1 (C-4), 67.4 (C-9), 58.7 (C-10), 53.8 (C-5), 42.0 (C-3), 34.7 (Cq, C-20), 32.0 (C-14, C-21, C-22), 22.75 (OCOCH_3), 20.9 (OCOCH_3).

[0230] HRMS (TOF-MS-ESI $^+$, m/z): 反卷积后计算为 $\text{C}_{120}\text{H}_{170}\text{N}_{16}\text{O}_{44}$ [M] 2537.1400; 实测为 2537.1298。

[0231] 化合物(010): 在氩气气氛下, 向在THF/DMSO (1.5mL, 2:3) 中的化合物009 (40mg, 0.037毫摩尔, 1当量) 和化合物001 (57mg, 0.164毫摩尔, 4.4当量) 的溶液中加入新制备的在 H_2O (0.3mL) 中的 CuSO_4 (2.36mg, 0.0148毫摩尔, 0.4当量) 和NaAsc (8.7mg, 0.0439毫摩尔, 1.2当量) 的溶液。反应混合物在室温下剧烈搅拌过夜。然后加入丙酮 (30mL) 沉淀粗产物。然后将粗产物溶解在水 (2mL) 中, 用Quadrasil®MP (80mg) 处理以除去残留的铜离子。通过45 μm 无菌过滤器过滤后, 滤液通过Sephadex®G-15柱, 用水洗脱。收集不能通过用DCM/甲醇 (1:0.3, KMnO_4 染色) 进行TLC洗脱而迁移的级分。将合并的级分冻干, 得到深绿色固体 (56mg, 0.0227毫摩尔, 61%产率)。

[0232]



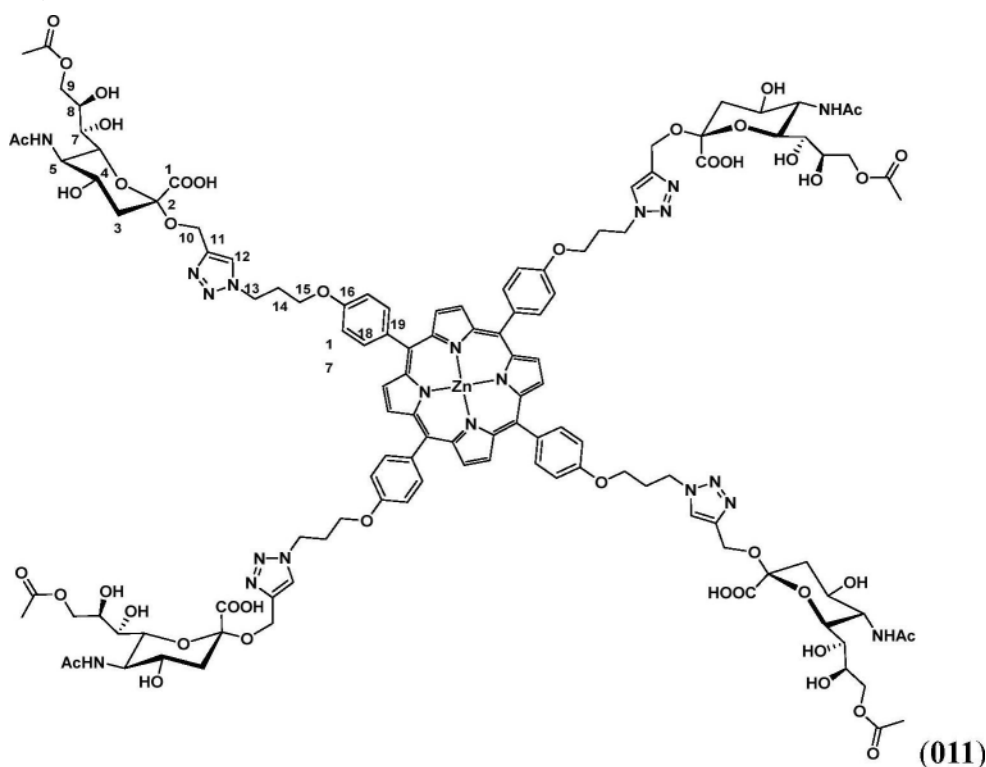
[0233]

^1H NMR (400 MHz, $\text{D}_2\text{O}/\text{DMSO}-d_6$) δ 9.07 (br, 8H, 8 x H-Porph), 8.32 (br, 12H, 4 x H-12, 8 x H-18), 7.51 (br, 8H, 8 x H-17), 3.74 (br, 28H, 4 x H-4, 4 x H-5, 4 x H-6, 4 x H-7, 4 x H-8, 4 x H-9), 2.78 (br, 12H, 4 x H-14, 4 x H-3a), 2.05 (br, 16H, 4 x H-3b, 4 x NCOCH₃). ^{13}C NMR (101 MHz, $\text{D}_2\text{O}/\text{DMSO}-d_6$) δ 176.3 (C=O, NCOCH₃), 173.9 (C-1), 159.5 (C-16), 151.3 (Cq, C-19), 146.6 (Cq, C-11), 137.2 (C-18), 135.5 (Cq, C-Porph), 133.3 (C-Porph), 127.0 (C-12), 121.5 (Cq, C-Porph), 114.5 (C-17), 101.9 (C-2), 74.3 (C-6), 73.1 (C-8), 69.7 (C-4, C-7), 67.0 (C-15), 64.1 (C-9), 59.1 (C-10), 53.4 (C-5), 49.4 (C-13), 41.8 (C-3), 30.9 (C-14), 23.6 (NCOCH₃).

[0234] HRMS (TOF-MS-ESI⁺, m/z): 计算为 $\text{C}_{112}\text{H}_{134}\text{N}_{20}\text{O}_{40}\text{Zn}[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ 1232.4186; 实测为 1232.4390.

[0235] 化合物(011): 在氩气气氛下, 向在THF/DMSO (1.8mL, 1:1) 中的化合物009 (40mg, 0.037毫摩尔, 1当量) 和化合物002 (63mg, 0.162毫摩尔, 4.4当量) 的溶液中加入新制备的在 H_2O (0.3mL) 中的 CuSO_4 (2.36mg, 0.0148毫摩尔, 0.4当量) 和 NaAsc (8.7mg, 0.0439毫摩尔, 1.2当量) 的溶液。将反应混合物在室温下剧烈搅拌过夜。然后加入丙酮 (30mL) 沉淀粗产物。然后将粗产物溶解在水 (2mL) 中, 用Quadrasil®MP (80mg) 处理以除去残留的铜离子。通过45 μm 无菌过滤器过滤后, 滤液通过Sephadex® G-15柱, 用水洗脱。收集不能通过用DCM/甲醇 (1:0.3) 进行TLC洗脱而迁移的级分。将合并的级分冻干, 得到深绿色固体 (82mg, 0.0323毫摩尔, 87%产率)。

[0236]



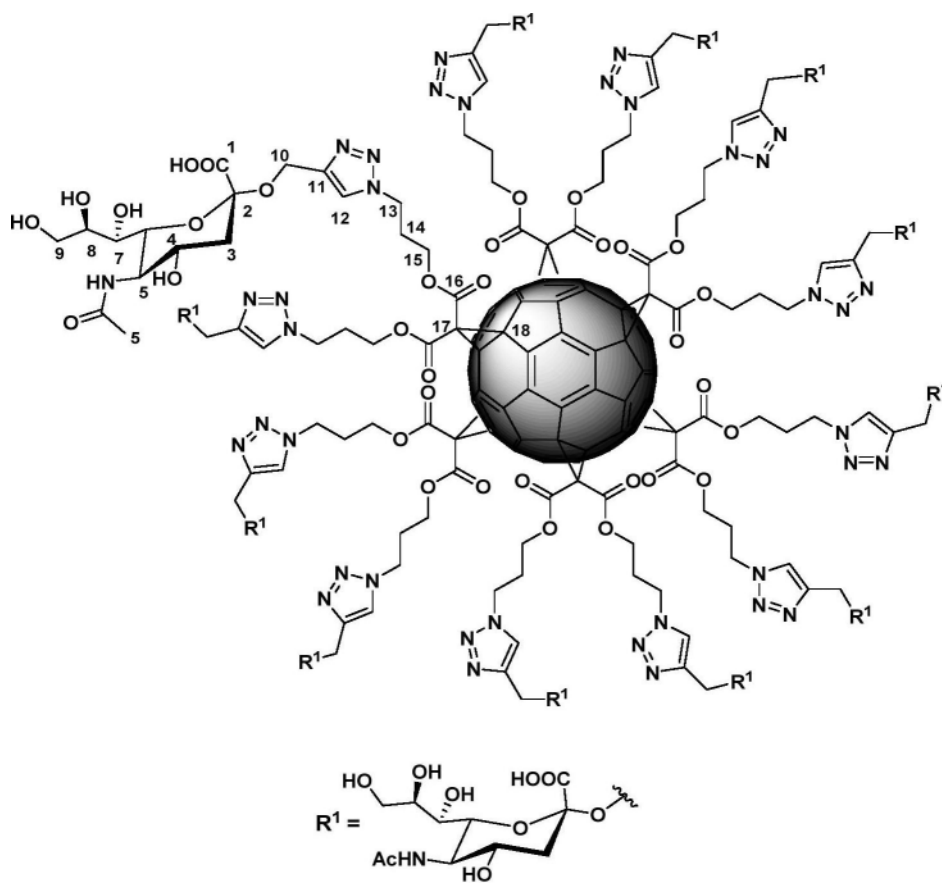
[0237]

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8.60 (br, 8H, 8 x H-Porph), 8.11 (br, 4 x H-12), 7.72 (br, 8H, 8 x H-18), 6.89 (br, 8H, 8 x H-17), 4.18–4.04 (m, 56H, 4 x H-4, 4 x H-5, 4 x H-8, 4 x H-9, 4 x H-10, 4 x H-13, 4 x H-15, 12 x OH, 4 x NH), 3.46–3.33 (m, 8H, 4 x H-6, 4 x H-7), 2.26 (8H, 4 x H-14), 1.88 (br, 28H, 4 x NCOCH₃, 4 x OCOCH₃, 4 x H-3b). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 174.0 (C=O, NCOCH₃), 172.3 (C=O, C-1, 9-O-Ac), 158.3 (Cq, C-16), 150.3 (Cq, C-19), 135.7 (C-18), 132.2 (C-Porph), 120.7 (Cq, C-Porph), 113.2 (C-17), 73.1 (C-6), 69.6 (C-8), 68.0 (C-4, C-7), 67.0 (C-9), 65.2 (C-15), 58.1 (C-10), 53.1 (C-5), 47.8 (C-13), 41.8 (C-3), 30.1 (C-14), 23.1 (NCOCH₃), 21.3 (OCOCH₃).

[0238] HRMS (TOF-MS-ESI⁺, m/z): 计算为C₁₂₀H₁₄₀N₂₀O₄₄Zn[M+2H]²⁺ 1313.4228; 实测为 1313.3966.

[0239] 化合物(013): 在氩气气氛下, 向在DMSO(1.4mL)中的化合物012(40mg, 0.0172毫摩尔, 1当量)和化合物001(95mg, 0.274毫摩尔, 16当量)的溶液中加入CuBr·CH₃SCH₃(3.5mg, 0.017毫摩尔, 1当量)。在80℃微波辐射4小时后, 将溶液冷却并用DCM(30mL)沉淀, 并离心。然后将粗产物重新溶解在水(2mL)中, 用Quadrasil®MP(80mg)处理以除去残留的铜离子。通过45μm无菌过滤器过滤后, 滤液通过Sephadex™G-25柱, 用水洗脱。收集不能通过用DCM/甲醇进行TLC洗脱而迁移的级分。将合并的级分冻干, 得到橙色固体(89mg, 0.0137毫摩尔, 80%产率)。

[0240]



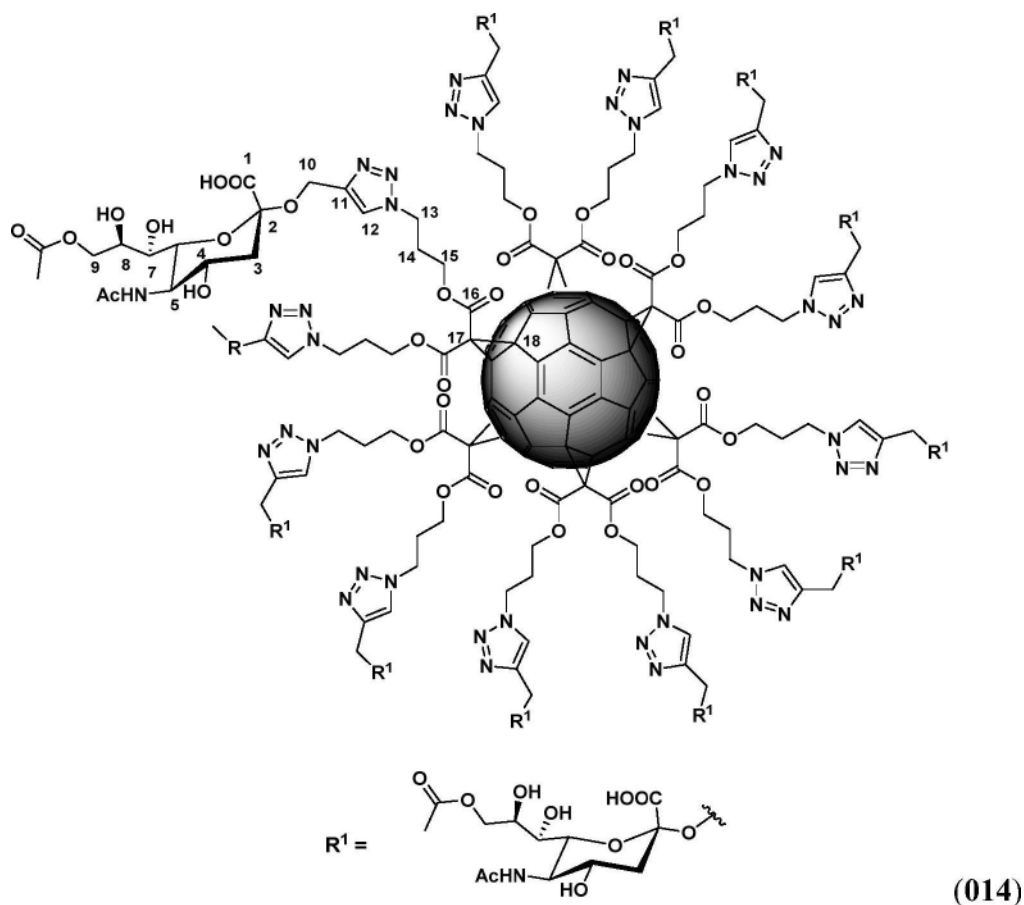
[0241]

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.07–7.97 (m, 12H, 12 x H-12), 4.67 (s, 12H, 12 x H-10a), 4.40 (s, 36H, 12 x H-10b, 12 x H-15), 4.15 (br, 84H, 12 x H-12, 48 x OH, 12 x NH), 3.69–3.29 (m, 84H, 12 x H-4, 12 x H-5, 12 x H-6, 12 x H-7, 12 x H-8, 12 x H-9), 2.67 (s, 12H, 12 x H-3a), 2.15 (s, 24H, 12 x H-14), 1.86 (s, 36H, 12 x NAc), 1.36 (m, 12H, 12 x H-3b). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 174.0 (C=O, NCOCH $_3$), 171.9 (C=O, C-1), 164.0 (Cq, C-16), 145.6, 141.5 (C-11, C $_{sp2}$), 125.2 (C-12), 100.7 (C-2), 73.4 (C-6), 72.1, 69.4, 68.2 (C-18, C-8, C-7, C-4), 65.1 (C-15), 63.6 (C-9), 57.8 (C-10), 53.3 (C-5), 47.2 (C-17, C-13), 41.9 (C-3), 29.4 (C-14), 23.2 (NCOCH $_3$).

[0242] HRMS (ESI+-MS, m/z): 计算为 $\text{C}_{282}\text{H}_{328}\text{N}_{48}\text{O}_{132}[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$ 1623.2468; 实测为 1623.2138。

[0243] 化合物(014): 在氩气气氛下, 向在DMSO (0.8mL) 中的化合物012 (22mg, 0.0096毫摩尔, 1当量) 和化合物002 (60mg, 0.154毫摩尔, 16当量) 的溶液中加入 $\text{CuBr} \cdot \text{CH}_3\text{SCH}_3$ (2mg, 0.0096毫摩尔, 1当量)。在80℃微波辐射4小时后, 将溶液冷却并用DCM (30mL) 沉淀, 并离心。然后将粗产物重新溶解在水 (2mL) 中, 用Quadrasil®MP (60mg) 处理以除去残留的铜离子。通过45 μm 无菌过滤器过滤后, 滤液通过Sephadex™G-25柱, 用水洗脱。收集不能通过用DCM/甲醇 (1:0.3, KMnO_4 染色) 进行TLC洗脱而迁移的级分。将合并的级分冻干, 得到橙色固体 (55mg, 0.00785毫摩尔, 82%产率)。

[0244]



^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8.24-8.01 (m, 12H, 12 x H-12), 4.94-3.25 (m, 192H, 12 x H-4, 12 x H-5, 12 x H-6, 12 x H-7, 12 x H-8, 12 x H-9, 12 x H-10, 12 x H-13, 12 x H-15), 2.68 (br, 12H, H-3a), 2.16–1.15 (m, 80H, 12 x H-3b, 12 x H-14, 12 x NCOCH₃, 12 x OCOCH₃). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 173.5 (C=O, NCOCH₃), 171.5 (C=O, C-1, 9-O-Ac), 163.57 (Cq, C-16), 145.7, 145.2 (C-11, C_{sp2}), 124.5 (C-12), 100.4 (C-2), 72.9 (C-6), 69.4 (C-18, C-8, C-7), 67.8 (C-4), 66.5 (C-9), 64.5 (C-15), 57.64 (C-10), 53.1 (C-5), 46.7 (C-17, C-13), 41.6 (C-3), 29.2 (C-14), 22.9 (NCOCH₃), 21.2 (OCOCH₃).

[0246] HRMS (ESI+-MS, m/z): 计算为C₃₀₆H₃₄₈N₄₈O₁₄₄ [M+5H]⁵⁺ 1400.6350; 实测为1400.6368。

[0247] 实施例2: AcSA-衍生的糖簇分子是SARS-CoV-2细胞结合和感染性的有效抑制剂

[0248] 材料和方法

[0249] 产生紫外线-灭活的SARS-CoV-2

[0250] SARS-CoV-2 (BavPat1株, 欧洲病毒学档案) 在Vero E6中生长并在第3代使用。将500 μL 第3代原液(感染细胞的上清液)加入到6-孔培养皿中。将6-孔培养皿放置在没有盖子的UVStratainker 1800 (Stratagene) 中, 将含有病毒的上清液暴露于5000焦耳的UV照射下。通过将10 μL 经UV处理的上清液添加到含有50000个天然Vero E6细胞的48-孔板中, 并在48小时后通过间接免疫荧光分析监测感染情况, 从而确认病毒灭活。

[0251] 唾液酸涂覆的表面

[0252] 首先用乙醇清洗涂金的硅衬底, 并通过UV-0处理 (Jetlight) 清洁15分钟。然后将表面在生物素化的牛血清白蛋白 (BSA) 溶液 (25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 于PBS, Sigma) 中于4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。用PBS冲洗后, 在4 $^{\circ}\text{C}$ 下将链霉亲和素液滴 (10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 于PBS, Sigma) 移液至BSA表面1小时, 随后用PBS冲洗。最后, 将BSA-链霉亲和素表面浸入生物素化的biot-SA (B4) 或biot-9-AcSA (B5) 溶液 (10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 于PBS) 中1小时, 然后进行最终的PBS冲洗。在重复扫描下, 表面显示出均匀和稳定的形态, 并显示出1.1nm $\pm$ 0.1nm的厚度。沉积层的厚度是通过在高作用力下扫描表面的一小块区域 (1 $\mu\text{m}\times$ 1 μm) 以去除附着的生物分子, 然后在较低作用力下对同一区域的较大正方形 (5 $\mu\text{m}\times$ 5 μm) 成像来估计的。

[0253] 病毒粒子成像

[0254] 将80- μL 的病毒溶液液滴 (约 $\sim 10^7$ 个颗粒 $\cdot\text{mL}^{-1}$) 滴在新切割的云母基底上, 并在+4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育1小时。用MilliQ水冲洗10次后, 将样品在37 $^{\circ}\text{C}$ 下干燥1小时。使用PeakForce-Hirs-F-A尖端 (标称弹簧常数0.4N $\cdot\text{m}^{-1}$, Bruker) 在空气中以PeakForce Tapping模式进行AFM成像。使用的成像参数是: 尖端振荡频率为1kHz, 最大峰值力为250pN, 扫描速率为0.25kHz, 每行显示256个像素。

[0255] AFM尖端功能化

[0256] 对于AFM尖端功能化, 使用NHS-PEG₂₄-Ph-醛接头 (Broadpharm)。将AFM尖端 (MSCT-D探针, Bruker) 浸入氯仿中10分钟, 用乙醇冲洗, 在柔和的过滤氮气流中干燥, 在紫外线辐射和臭氧清洁剂 (JetLight) 中清洁15分钟, 并浸入乙醇胺溶液中过夜 [在6.6mL二甲基亚砜 (DMSO) 中的3.3g乙醇胺盐酸盐]。然后将悬臂用DMSO洗涤三次, 用乙醇洗涤三次, 并用氮气干燥。同时, 将3.3mg NHS-PEG₂₄-Ph-醛接头溶解在0.5mL氯仿中。乙醇胺涂覆的悬臂与30 μL 三乙胺一起浸入该溶液中。孵育2小时后, 用氯仿洗涤三次, 用氮气干燥, 并以星形构象 (尖

端相互面对)置于石蜡膜(Bemis NA)上。将5 μ L S1-亚基蛋白溶液(0.1mg mL⁻¹,Genscript Z03501)或UV-灭活的SARS-CoV-2颗粒(10⁸颗粒mL⁻¹)和2 μ L新鲜制备的NaCNBH₃溶液(6重量%vol⁻¹,溶于0.1M NaOH(aq))移至其上,并在4℃下孵育1小时。最后,将5 μ L 1M乙醇胺(pH=8)加入液滴中10分钟以终止反应。在PBS中清洗后,尖端储存在PBS中直到实验开始。

[0257] 结合概率(BP)分析

[0258] 在力-体积(接触)模式下操作Nanoscope Multimode 8(Bruker)以在模型表面上进行力谱实验(Nanoscope软件v9.1)。MSCT-D探头(标称弹簧常数为0.03N m⁻¹)用于记录5 μ m $\times$ 5 μ m图,斜坡尺寸为200nm,最大力为500pN,无表面延迟。使用1Hz的线频率和每行32个像素(32行)扫描样品。接近和回缩速度都保持在1 μ m s⁻¹。

[0259] 抑制潜能的筛选

[0260] 为了研究唾液酸在SARS-CoV-2与细胞宿主表面结合的第一步中的作用,使用基于FD-曲线的AFM比较SARS-CoV-2与SA(Neu5Ac)和9-AcSA的结合,并表征与9-AcSA相互作用的结合自由能景观。为了模拟体外细胞表面聚糖的暴露,将生物素化-SA,即biot-9-AcSA(B5)或biot-SA(B4)固定在链霉亲和素涂覆的表面上,并通过AFM成像和划痕实验进行验证,显示出1.1nm $\pm$ 0.1nm厚的沉积层。通过基于FD的AFM监测突起S1亚基和SA-涂覆的表面之间的相互作用。

[0261] 为了研究合成的(9-Ac)-SA-衍生糖簇分子(参见实施例1-d)对SARS-CoV-2和9-AcSA之间结合亲和力的抑制潜力,在与不同浓度(分别为0 μ M、1 μ M、10 μ M和100 μ M)的SA-糖簇分子(004、007、010和/或013)和四种9-AsSA-糖簇分子(005、008、011和/或014)孵育前后测量了结合概率(BP)(显示结合事件的曲线分数)。如前所述,在没有任何糖簇分子的情况下,在三个不同的区域记录了三张力-体积图。此后,将测试的糖簇分子加入流体池中,并记录每个浓度的三个图。

[0262] 动态力光谱学

[0263] 使用ForceRobot 300(JPK)进行动态力谱实验。使用与结合概率(BP)分析相同的参数,不同的回缩速度为0.1 μ m s⁻¹、0.2 μ m s⁻¹、1 μ m s⁻¹、5 μ m s⁻¹、10 μ m s⁻¹和20 μ m s⁻¹。Origin软件(OriginLab)用于显示DFS图中的结果,生成不同LR范围的破裂力直方图,并应用各种力谱模型,如前所述(Alsteens,D.等人,Nature Nanotechnology,2017,Vol.12, pp.177-183)。这些模型用于量化这种相互作用的能量景观,并提取动力学解离速率k_{off}以及到过渡态x_‡的距离。对于动力学速率分析,在一定的接触时间(t)下测定BP,该接触时间是尖端与表面接触的时间。

[0264] 如前所述拟合这些数据并计算KD(Rank1,C.等人,Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,2008,Vol.105,pp.17778-17783)。简而言之,相互作用时间(τ)和BP之间的关系由以下等式描述:

$BP = A \times [1 - \exp\left(\frac{-(t-t_0)}{\tau}\right)]$ (1),其中A是最大BP,t₀是滞后时间。Origin软件用于拟合数

据并提取 τ 。在下一步中,通过以下等式计算k_{on}: $k_{on} = \frac{\frac{1}{2}4\pi r_{eff}^2 N_A}{3\eta_b \tau}$ (2)其中r_{eff}是球体的半径,n_b是结合配偶体的数量,N_A是阿伏伽德罗常数。有效体积V_{eff}(4 π r_{eff}³)代表可以发生相互作用的体积。这形成了半球,因为只有一半的S1分子可以与基质上相应的受体相互作用。

[0265] 细胞系培养

[0266] CHO细胞在添加了10% FBS(胎牛血清)、青霉素(100U mL^{-1})、链霉素($100\mu\text{g mL}^{-1}$) (Invitrogen)和2mM L-谷氨酰胺(Sigma)的Ham's F12培养基中培养。细胞在 37°C 、5% CO_2 和湿度饱和的环境中培养。

[0267] Lec2细胞的转导

[0268] 使用H2BeGFP和表达肌动蛋白-mCherry的慢病毒转导Lec2细胞以表达细胞核eGFP和细胞质mCherry。

[0269] 使用Atto488 NHS酯染料标记UV灭活的SARS-CoV-2病毒颗粒

[0270] 在500 μL 乙酸盐缓冲液(pH 4.5)中,将200 μL 10^8 颗粒/ml的UV灭活的SARS-CoV-2病毒颗粒溶液与10 μL Atto488 NHS酯染料(Atto-Tec) (10mM,在干燥的DMSO中)在温和搅拌下混合2小时。然后去除游离染料,通过使用Amicon Ultra-0.5离心过滤单元(MWCO 10kDa (Sigma))过滤,将荧光标记的病毒颗粒浓缩至初始浓度(10000g离心10分钟用于纯化,1000g离心2分钟用于回收产物)。

[0271] 病毒结合分析

[0272] 将CHO和Lec2(用肌动蛋白-mCherry荧光标记)的共培养物在冰上(以防止内化)与 10^8 颗粒. mL^{-1} UV灭活的SARS-CoV-2病毒颗粒溶液和Atto488 NHS酯染料一起孵育1小时。然后用PBS冲洗细胞三次,并用甲醛固定(4% PBS溶液15分钟)(Invitrogen,Thermo Fisher Scientific)。用PBS最后一次洗涤后,使用40 $\times$ 水物镜用激光扫描共聚焦显微镜(Zeiss LSM 980)对细胞成像。用Zen blue 2.3软件(Zeiss)分析图像。执行最大强度投影以从z叠堆获得单个图像。

[0273] 活细胞上的基于FD的AFM和荧光显微镜检查

[0274] 使用PeakForce QNM模式(Nanoscope软件v9.2)下的Bioscope Resolve AFM (Bruker)获得CHO细胞的AFM相关图像,该图像与倒置落射荧光显微镜(Zeiss Observer Z.1)或共焦激光扫描显微镜(Zeiss LSM 900)相连。所有实验都是使用40x油物镜($\text{NA}=0.95$)进行的。使用具有17 μm 的尖端长度、65nm的尖端半径和 15° 的开口角的PFQNM-LC探针(Bruker)以500pN的力记录细胞图像($30\mu\text{m}^2$ 至 $50\mu\text{m}^2$)。所有荧光和AFM实验都是在细胞培养条件下进行的,使用AFM和荧光显微镜组合室,在 37°C 下在Mem α 、核苷或Ham's F12培养基中进行,具体取决于细胞类型(Alsteens, D.等人, Nature Nanotechnology, 2017, Vol.12, pp.177-183)。使用热噪声方法校准悬臂(Hutter, J.L.&Bechhoefer, J., Review of Scientific Instruments, 1993, Vol.64, pp.1868-1873),产生范围从0.08N/m到0.14N/m的值。AFM尖端以正弦方式在0.25kHz下振荡,振幅为750nm。使用0.125Hz的频率和每行128像素或256像素扫描样品。使用Nanoscope分析软件(v1.9, Bruker)、Origin和ImageJ (v1.52e)分析AFM图像和FD曲线。使用Nanoscope分析软件和Origin软件分析检测细胞表面和S1或SARS-CoV-2之间未结合事件的单个FD曲线。回缩曲线的基线使用回缩曲线的后30%进行线性拟合进行校正。使用力-时间曲线,确定每个破裂事件的加载速率(斜率)。使用Zen Blue软件(Zeiss)分析光学图像。

[0275] 监测9-AcSA卟啉添加的效果

[0276] 通过扫描细胞汇合层的合适区域,然后向培养基中加入10nM、100nM、1 μM 或10 μM 的9-AcSA卟啉011,以与上述相同的方式进行活细胞实验。然后再次扫描同一区域,以监测添

加9-AcSA低聚物后的潜在变化。

[0277] SARS-CoV-2突起伪型VSV病毒的生产

[0278] 将具有18个氨基酸残基的C端截短的pCG1 SARS-CoV-2突起蛋白质粒转染到HEK-293细胞中。第二天,在细胞中转导VSV- δ g病毒颗粒,每个细胞的MOI为5FFU。在37℃、5% CO₂和湿度饱和的环境中孵育1小时后,除去培养基并用PBS洗涤细胞。转导的细胞在补充有5% FBS、1%青霉素、1%链霉素、2mM L-谷氨酰胺、1mM丙酮酸钠和NEAA以及抗VSV-G抗体(1:1000)的DMEM中培养。转导后第二天从培养基中收集产生的病毒。通过离心(1250×g,10分钟)并用0.22 μ m过滤器清除细胞碎片。

[0279] 感染性测定

[0280] 将A549或A549 ACE2稳定细胞(1×10^4)接种在96-孔板中。将MOI为5的伪型病毒与浓度递增(0.001 μ M、0.01 μ M、0.1 μ M、1 μ M、10 μ M)的SA(Neu5Ac)、9-AcSA、SA-吡啶糖簇分子010或9-AcSA-吡啶糖簇分子011(如实施例1-d所示)的混合物在室温下孵育15分钟。将混合物加入培养基中,并将细胞孵育1小时。用PBS洗涤细胞,并在新鲜细胞培养基中孵育24小时。通过荧光监测感染性,并用生物成像设备(Amersham Typhoon)拍摄图像。通过Fiji确定感染细胞的数目。

[0281] 结果

[0282] 1.S1亚基与9-0-乙酰化唾液酸的结合

[0283] 引人注目的是,在乙酰化(B5)和非乙酰化SA(B4)之间观察到约三倍的显著差异,证明S1亚基对9-AcSA的亲合力明显高于SA。

[0284] 此外,通过进行额外的独立对照实验证实了相互作用的特异性。使用游离9-AcSA(图2)或表面仅涂覆链霉亲和素(无SA)的两种竞争分析均导致明显较低的结合概率(BP),证实了9-AcSA与SARS-CoV-2S1结构域相互作用的特异性。

[0285] 2.S1亚基与9-0-AcSA相互作用的动力学

[0286] 使用单分子动态力谱(DFS)表征S1和9-AcSA之间相互作用的结合自由能景观。通过监测接触时间对血压的影响(图3),结合率(k_{on})通过假设受体-键复合物可以用伪一级动力学近似来估计。通过对数据进行单指数增长拟合,提取了 $(4.2 \pm 0.2) \times 10^4 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ 的 k_{on} ,并计算了作为 k_{off} 和 k_{on} 之间的比值的亲和常数(K_D),得出 $5.7 \mu\text{M} \pm 5 \mu\text{M}$ 的值。

[0287] μM 范围内的值对应于中等亲和力,支持SARS-CoV-2使用聚糖(如9-AcSA)作为宿主细胞表面的第一个中等亲和力立足点的假设,从而促进随后与ACE2受体的强结合。

[0288] 3.在SARS-CoV-2病毒颗粒水平上结合

[0289] 非复制性SARS-CoV-2颗粒(即通过UV辐射灭活的天然SARS-CoV-2病毒颗粒)用于评估所探测的相互作用的生理相关性。通过将完整的病毒颗粒移植到AFM尖端上,评估了这些非复制性SARS-CoV-2颗粒与9-AcSA的结合。以中速(1 $\mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$)和快速(20 $\mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$)提拉速度探测相互作用,重建DFS图,并用纯化的S1域获得的数据覆盖。

[0290] 观察到仅用纯化的S1结构域或用完整的病毒颗粒收集的数据之间有很好的一致性。单分子水平的不同破裂力非常接近,动力学参数也非常接近。在病毒颗粒水平上,也记录了与多种接触相容的更高的力。

[0291] 4.对活细胞相互作用的验证

[0292] 接下来,通过探测纯化的S1或完整的非复制性病毒颗粒与未标记的天然表达唾液

酸(SA)的CHO细胞和Lec2细胞(用核蛋白H2B-GFP和肌动蛋白-mCherry进行荧光标记)的共培养物之间的相互作用,直接在活细胞上验证了相互作用。为了证明SA作为表面受体的作用,我们对CHO和Lec2细胞的共培养物进行了激光扫描共聚焦显微镜检查,观察到UV灭活的SARS-CoV-2病毒颗粒(用Atto488-NHS染料进行荧光标记)优先与表达SA的CHO细胞结合。然后,使用S1糖蛋白或完整的病毒颗粒功能化的AFM尖端,使用增殖两种细胞类型的条件通过AFM扫描共培养的CHO和Lec2细胞的汇合单层。

[0293] CHO细胞的黏附事件密度明显更高(S1约为9%,SARS-CoV-2约为13%,图13a,对于S1,n=10个细胞,对于SARS-CoV-2,n=12个细胞),而Lec2细胞的黏附事件分布很少(S1约为3%,SARS-CoV-2约为5%,图13b,对于S1,n=10个细胞,对于SARS-CoV-2,n=12个细胞),这证实了活细胞上SARS-CoV-2与SA的特异性结合。

[0294] 5. 使用SA-和AcSA-糖簇分子抑制SARS-Cov-2结合

[0295] 使用我们的SMFS方法和完整的非复制性SARS-CoV-2颗粒测试了八种用SA或9-AcSA修饰的糖簇分子的阻断特性。首先,在0 μ M、1 μ M、10 μ M和100 μ M处评估了市售单价9-乙酰化-唾液酸(9-AcSA)(Carbo synth)的抑制能力(图4)。在所研究的浓度范围内,仅观察到结合频率(BF)轻微降低20%至30%。这一结果是意料之中的,因为之前已经确定,即使活性更高的AcSA(与SA相比)对SARS-Cov-2突起也仅表现出中等亲和力,这一点也在实施例2.2中得到证明。

[0296] 比较了用SA或9-AcSA功能化的四种糖簇分子(图5至图8)。相对结合频率(BF)图显示对SA-糖簇分子没有抑制或轻微抑制,而对9-AcSA-糖簇分子观察到BF逐渐且有效的降低。此外,对于所有9-AcSA-簇,观察到约10 μ M的减少量为50%。9-AcSA-衍生的吡啶011似乎是最有效的抑制剂,在1 μ M时已经达到约50%的减少量(图7和图9)。

[0297] 因此,申请人出乎意料地证明,尽管游离AcSA的亲和力低,但与吡啶、柱芳烃、杯芳烃和富勒烯共价连接的多个AcSA可有效抑制SARS-CoV-2。因此,本发明的糖簇分子可以用于治疗和/或预防感染性疾病,例如COVID-19。

[0298] 6. AcSA-衍生吡啶抑制作用的表征

[0299] 由于第一次筛选(本文实施例2.5)指出基于吡啶的糖簇分子(化合物011)是用于SARS-CoV-2抗结合的最有效的9-AcSA-衍生糖簇分子,因此更详细地表征了其结合效力。

[0300] 令人震惊的是,发现9-AcSA-吡啶011导致SARS-CoV-2和9-AcSA之间的探测相互作用在10nM时减少了50%以上,并随浓度呈指数衰减(图10)。

[0301] 研究了对活细胞的抑制潜力,并在生理相关条件下证实了这一趋势(图11)。

[0302] 因此,申请人出乎意料地证明,尽管游离AcSA的亲和力低,但即使在低浓度下,与吡啶共价连接的多个AcSA也导致对SARS-CoV-2的特别显著的抑制作用。因此,本发明的基于AcSA-吡啶的糖簇分子可以用于治疗和/或预防诸如COVID-19的感染性疾病。

[0303] 7. AcSA-衍生吡啶中和性能的表征

[0304] 在证明了抗黏附能力(实施例2.5和2.6)后,评估AcSA-吡啶糖簇分子011的中和特性是令人感兴趣的,即其防止病毒进入并因此防止感染的能力。使用了可以在低生物安全条件下进行的可靠的病毒感染性分析。简而言之,将与SARS-CoV-2突起蛋白反式互补并编码GFP报告蛋白的无繁殖能力的G缺失水疱性口炎病毒(VSV)(VSV-SARS-CoV-2)用于A549细胞和ACE2受体转导的A549细胞,使用或不使用不同浓度的干扰分子。用MOI为5的VSV-SARS-

CoV-2感染A549-ACE2。通过在感染后24小时测量细胞中的GFP荧光来监测感染性。虽然A549细胞没有被VSV-SARS-CoV-2感染,但ACE2的过表达强烈增强了感染。接下来,在将VSV-SARS-CoV-2与水杨酸、9-氨基水杨酸、水杨酸卟啉10和水杨酸卟啉11一起孵育时进行了感染性测定。

[0305] 正如预期的那样,SA和9-SA都没有显著降低VSV-SARS-CoV-2的感染性(图12)。此外,虽然SA-卟啉010没有显著降低VSV-SARS-CoV-2的感染性,但我们观察到9-AcSA-卟啉011显著降低了VSV-SARS-CoV-2的感染性,估计的 IC_{50} 为0.1 μ M至1 μ M(图12)。

[0306] 这种基于细胞的分析证实了先前关于唾液酸对SARS-CoV-2结合的影响的结果,并进一步证明了通过本发明的糖簇分子有效抑制病毒与其受体的结合导致感染性显著下降。

[0307] 8.9-AcSA卟啉与不同SARS-CoV-2谱系结合的比较

[0308] 为了评估在最后一个循环变异体中观察到的SARS-CoV-2突变是否对抑制病毒与其受体结合的效力有影响,对9-AcSA卟啉011与来自原始毒株或最新的Omicron毒株的S1结构域的亲和力进行了测量。简而言之,来自一种或另一种毒株的突起蛋白的S1结构域共价连接到生物层干涉传感器上,并评估9-AcSA卟啉011的结合。

[0309] 没有观察到亲和力的损失,分析给出原始毒株的亲和力常数为 $141\text{nM} \pm 4\text{nM}$,Omicron毒株的亲和力常数为 $100\text{nM} \pm 3\text{nM}$ 。

[0310] 这些结果证实了乙酰化唾液酸糖簇分子对SARS-CoV-2原始毒株以及Omicron毒株的功效,尽管Omicron毒株在原始单倍型出现近2年后出现并包含大量突变。

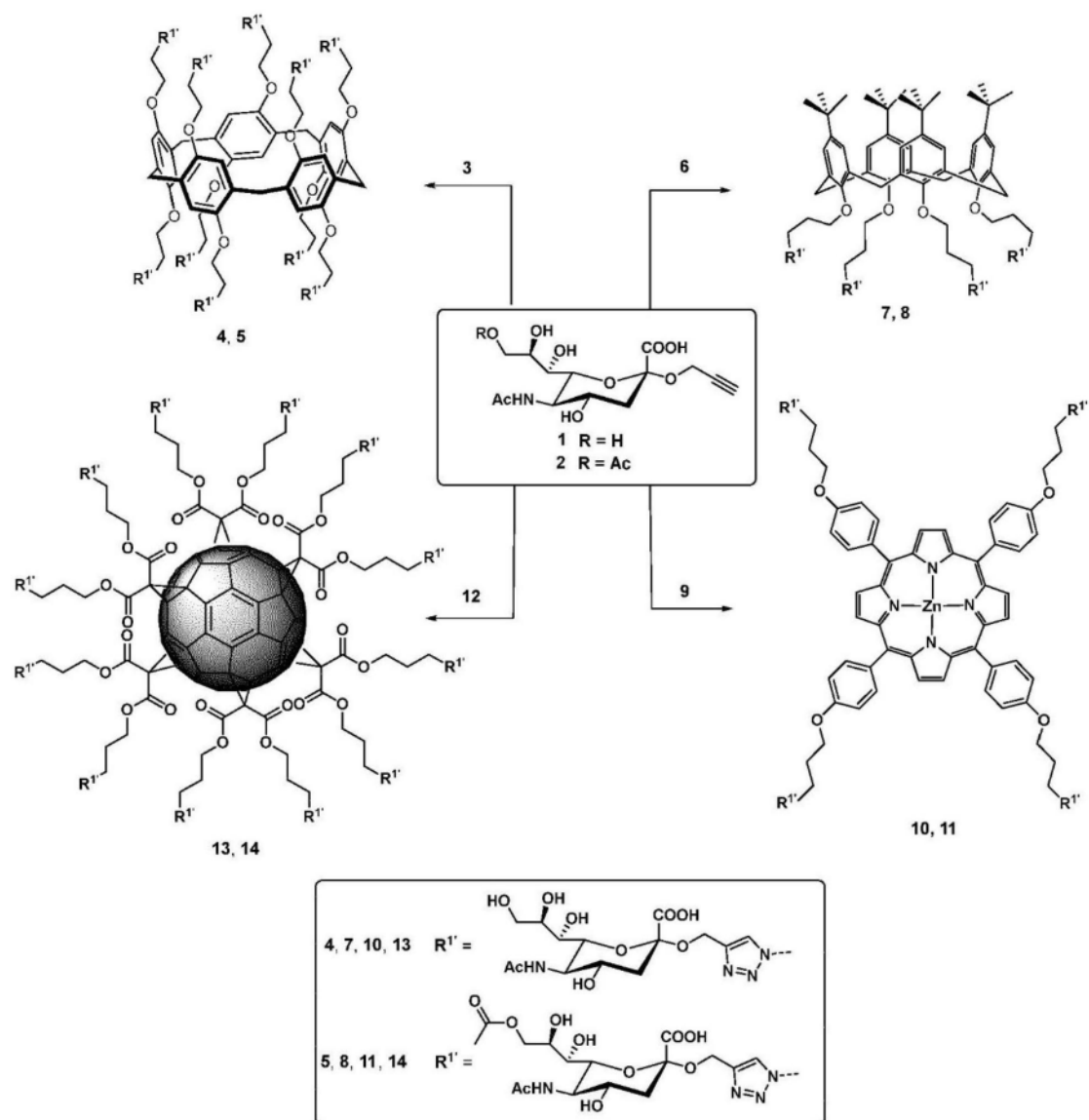


图1

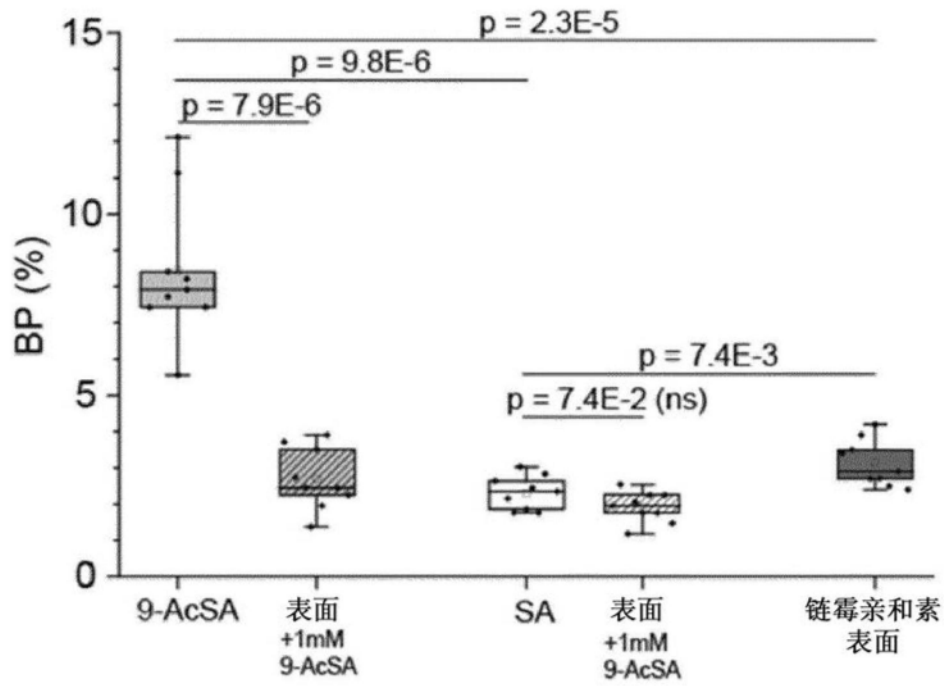
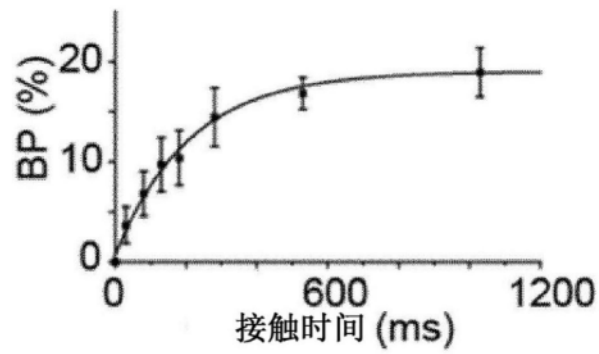


图2



$$k_{\text{off}} = 0.24 \pm 0.20 \text{ s}^{-1}$$

$$x_u = 0.5 \pm 0.1 \text{ nm}$$

$$k_{\text{on}} = (4.2 \pm 0.3) \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$$

$$K_D = 5.7 \pm 5.0 \text{ } \mu\text{M}$$

图3

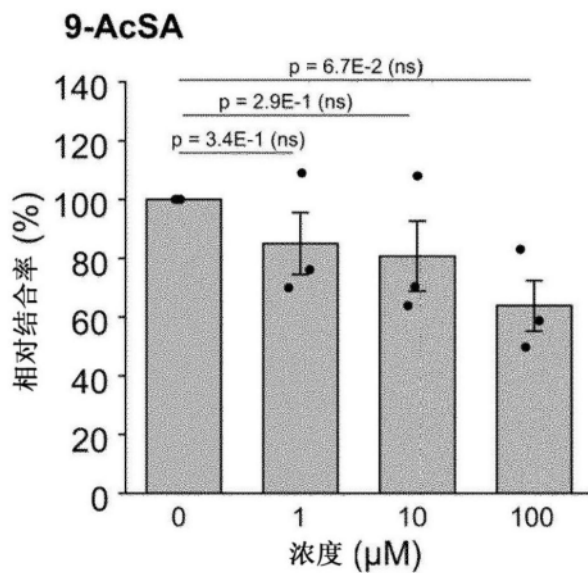


图4

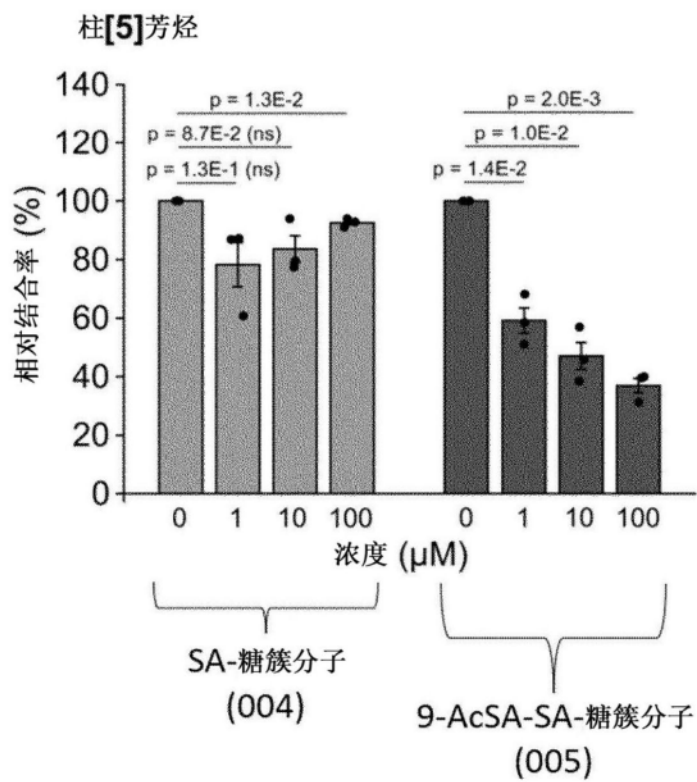


图5

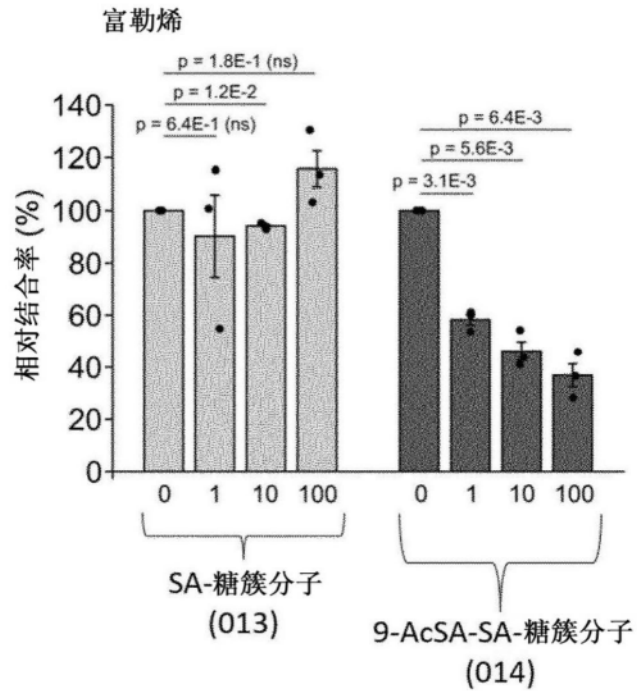


图6

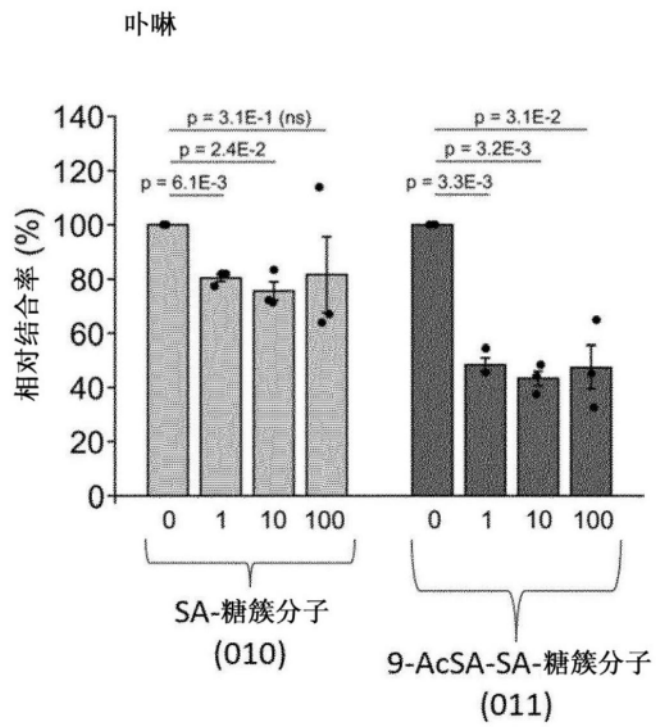


图7

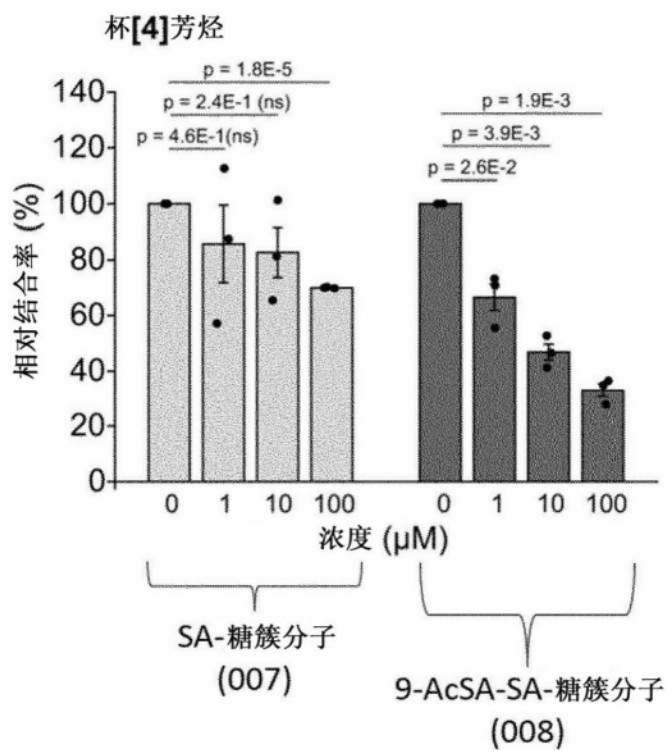


图8

9-AcSA-糖簇分子

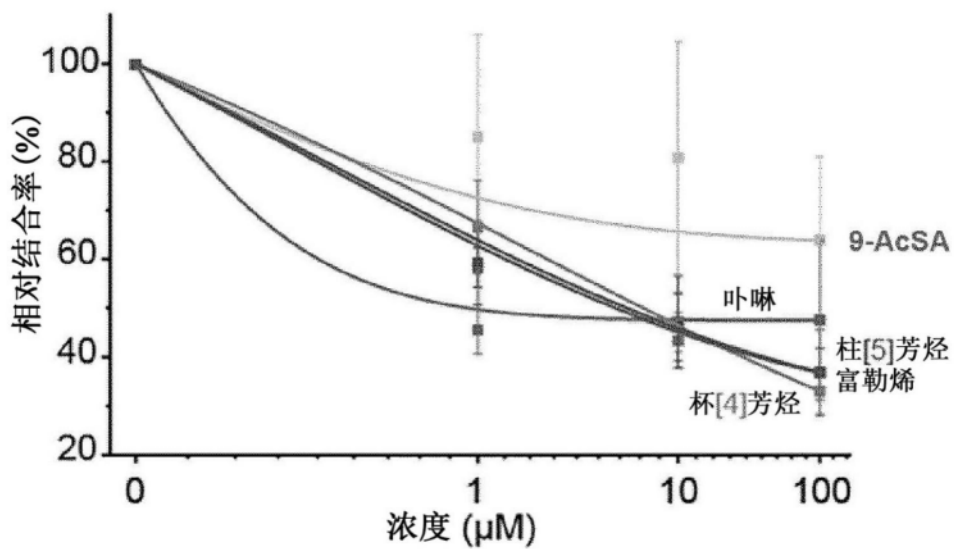


图9

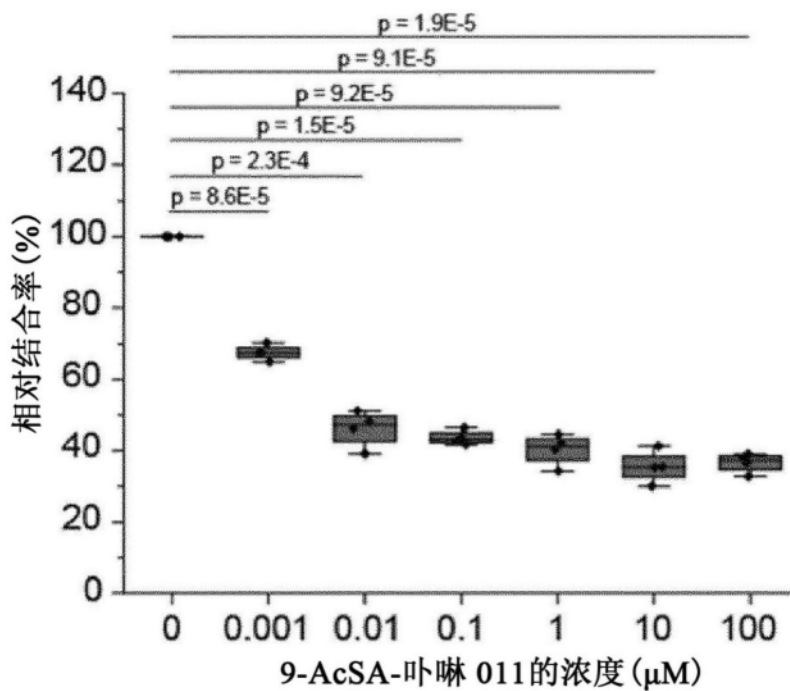


图10

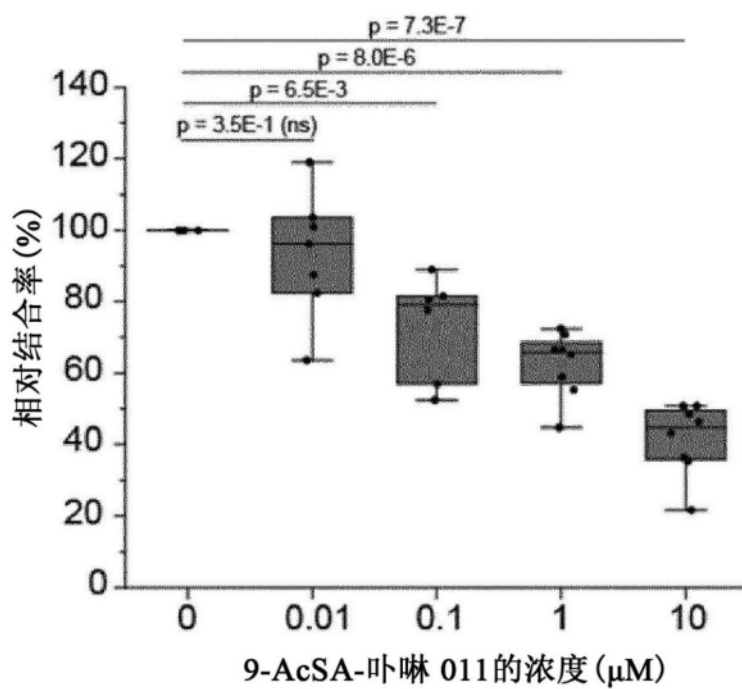


图11

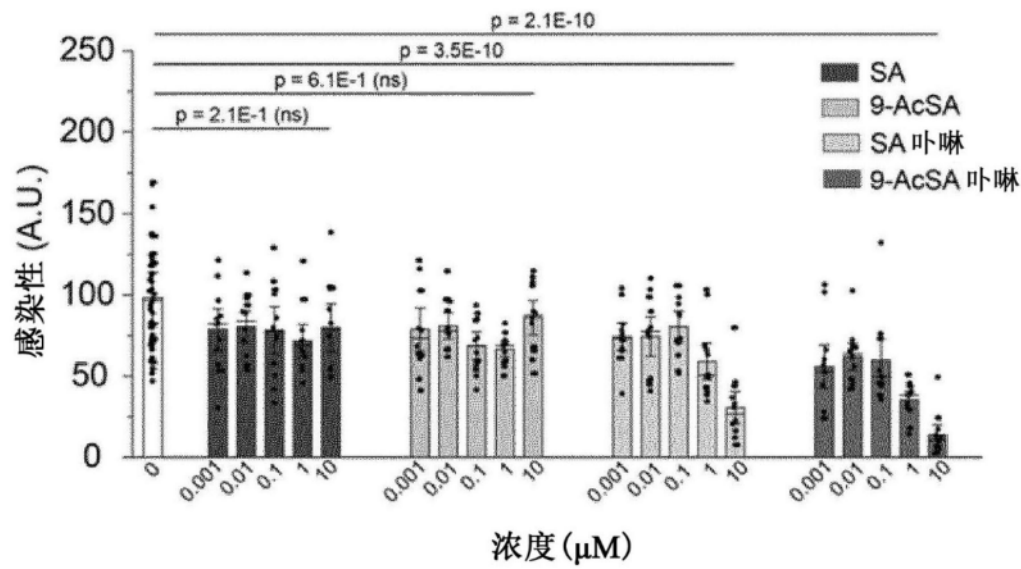


图12

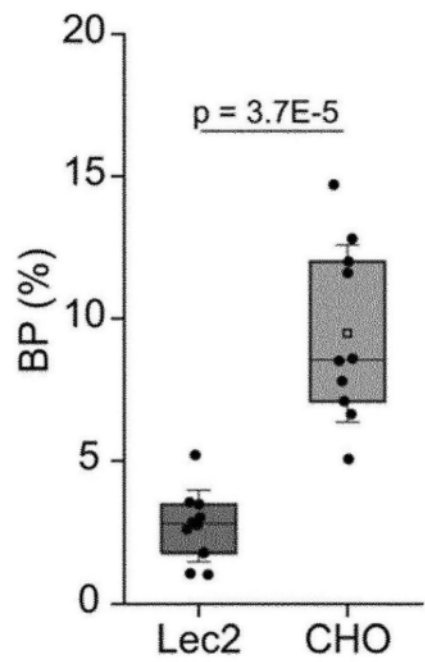


图13A

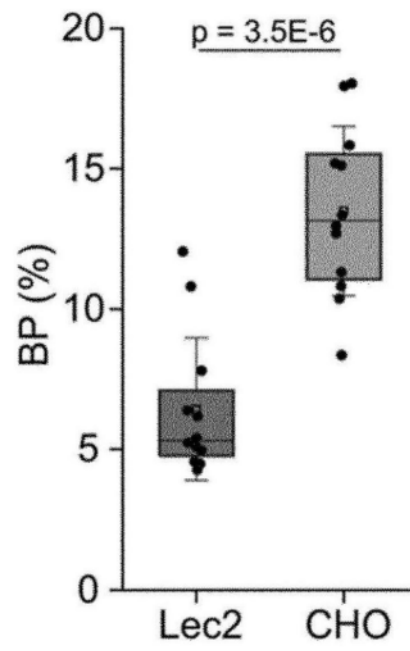


图13B