



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115867276 A

(43) 申请公布日 2023. 03. 28

(21) 申请号 202180048053.9

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所
11105

(22) 申请日 2021.05.10

专利代理师 许斐斐

(30) 优先权数据

202021019866 2020.05.11 IN

(51) Int.Cl.

A61K 31/4709 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.01.05

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/IN2021/050451 2021.05.10

(87) PCT国际申请的公布数据

W02021/229602 EN 2021.11.18

(71) 申请人 戈达瓦里生物炼制有限责任公司

地址 印度孟买

(72) 发明人 M.阿塔瓦尔 S.加瓦德 P.卡卡

S.斯里瓦斯塔瓦

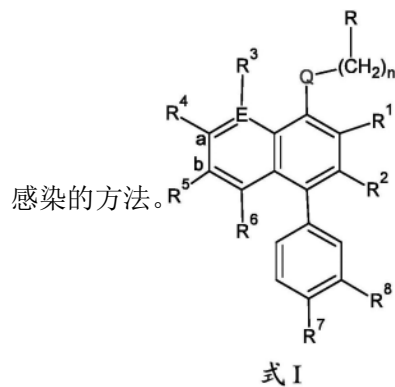
权利要求书7页 说明书19页 附图7页

(54) 发明名称

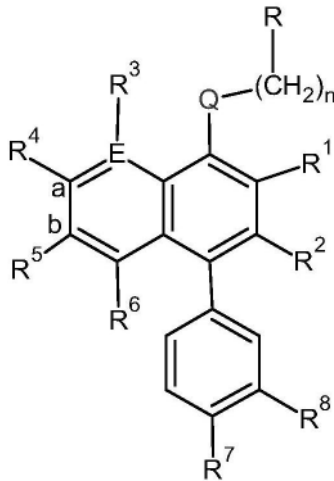
化合物用于治疗病毒感染的用途

(57) 摘要

本发明涉及式I化合物用于抑制细胞中V-ATP酶活性的用途以及使用式I化合物治疗病毒



1. 式I化合物用于抑制细胞中的V-ATP酶活性的用途，



式 I

其中，

E选自C、N；

Q为O、-NH；

n为0-6；

R¹和R²选自-H、-C(O)O-烷基如-C(O)OC₂H₅，或R¹和R²一起形成取代或未取代的5或6元环如内酯；

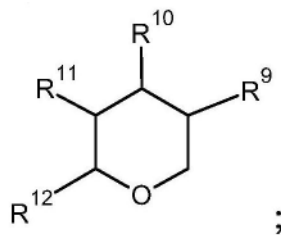
R³、R⁴、R⁵和R⁶各自独立地选自-H、-OH、烷氧基；

R⁷和R⁸选自-H、-OH、烷氧基、-X，其中X可以是F、Cl、Br或R⁷和R⁸一起形成含有一个或多个杂原子如O的5元环；

a和b指示在对应位置存在或不存在双键；

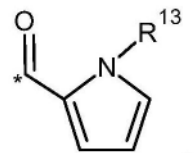
R¹¹和R¹²各自独立地选自-H，或者R¹¹和R¹²可以是取代或未取代的5或6元环，例如内酯、-C(O)O-烷基；

R选自取代或未取代的苯环，

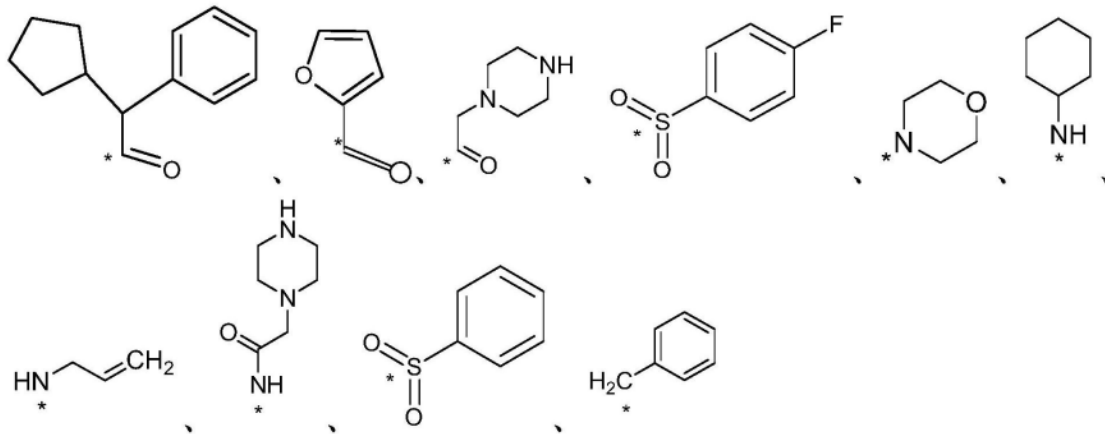


；

其中R⁹、R¹⁰、R¹¹和R¹²各自独立地选自-H、-OH、烷氧基、

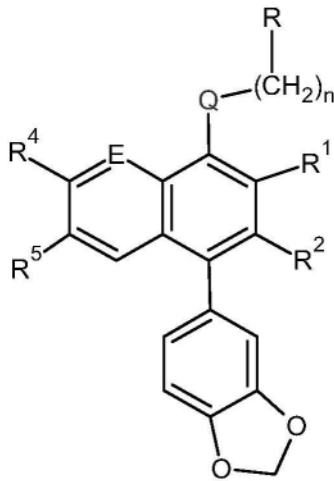


、



其中R¹³为H、烷基；和
*表示与Q或-CH₂基团的连接。

2. 如权利要求1所述的化合物的用途，其中所述化合物为式II，



式 II

其中，

E选自C、N；

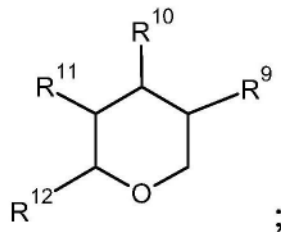
Q为O、-NH；

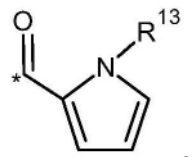
n为0-6；

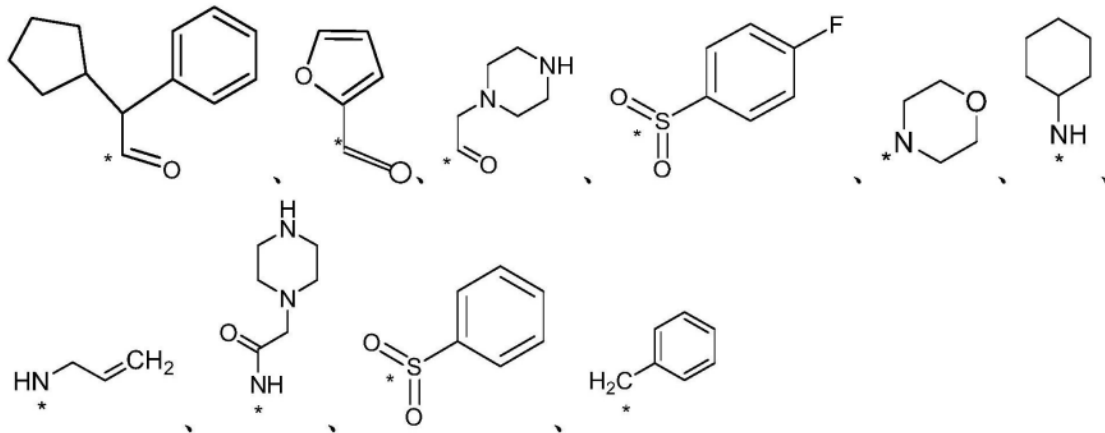
R¹和R²选自-H、-c(O)O-烷基，或R¹和R²一起形成取代或未取代的5或6元环如内酯；

R⁴和R⁵各自独立地选自-H、-OH、烷氧基；

R选自取代或未取代的苯环，

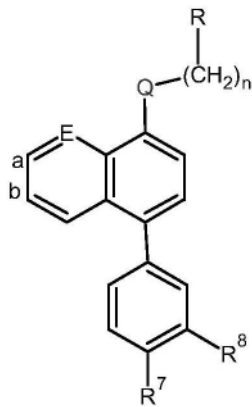


其中R⁹、R¹⁰、R¹¹和R¹²各自独立地选自-H、-OH、烷氧基、、



其中R¹³为H、烷基；和
*表示与Q或-CH₂基团的连接。

3. 如权利要求1所述的化合物的用途，其中所述化合物为式III，



式 III

其中，

E选自C、N；

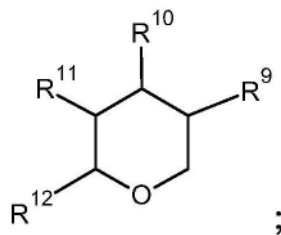
Q为O、-NH；

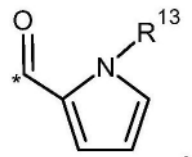
n为0-6；

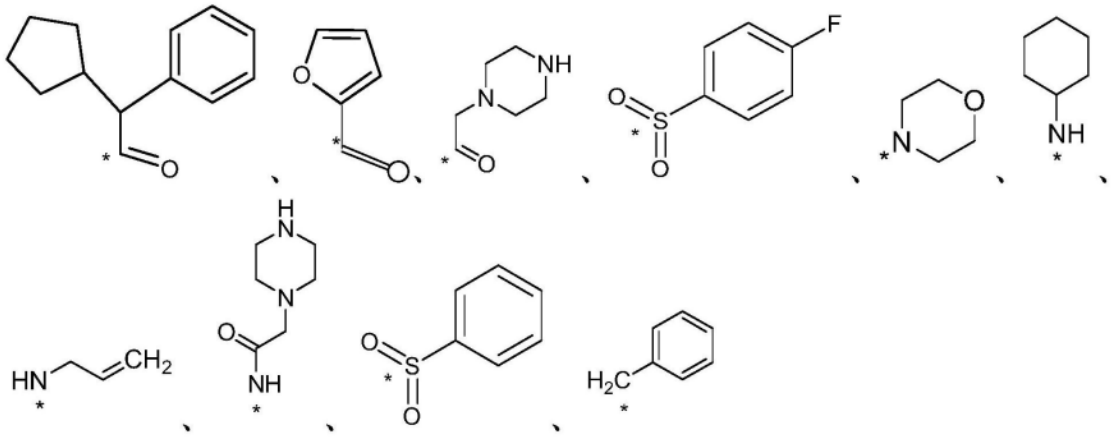
R⁷和R⁸选自-H、-OH、烷氧基、-X，其中X可以是F、Cl、Br或R⁷和R⁸一起形成含有一个或多个杂原子如O的5元环；

a和b指示在对应位置存在或不存在双键；

R选自取代或未取代的苯环，

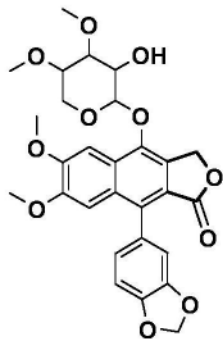


其中R⁹、R¹⁰、R¹¹和R¹²各自独立地选自-H、-OH、烷氧基、、

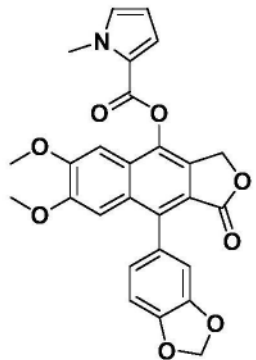


其中R¹³为H、烷基；和
*表示与Q或-CH₂基团的连接。

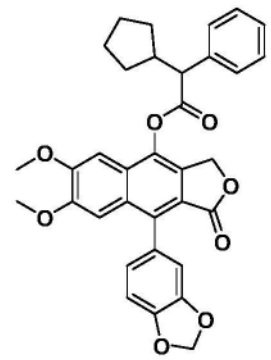
4. 如前述权利要求中任一项所述的化合物的用途，其中所述化合物为



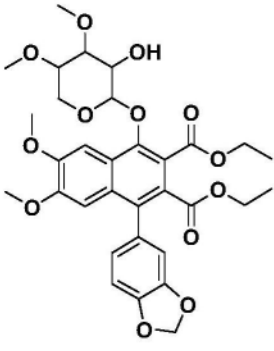
式 A,



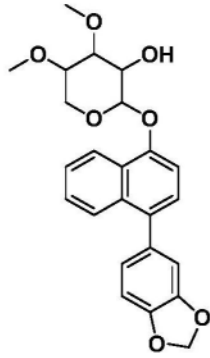
式 B,



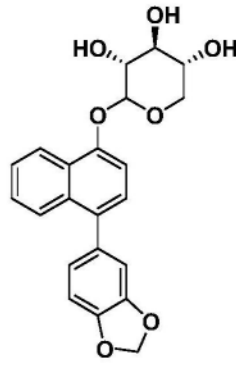
式 C,



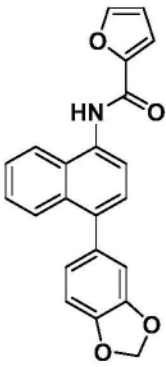
式 D,



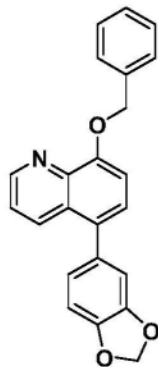
式 E,



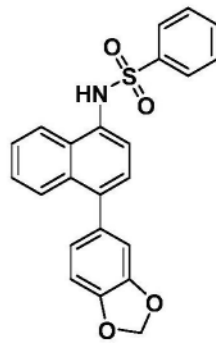
式 F,



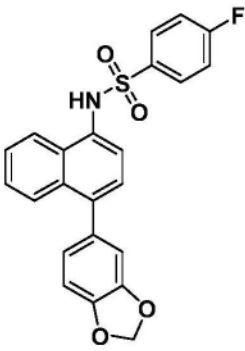
式 G,



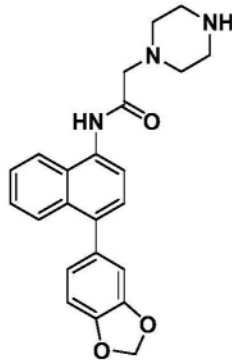
式 H,



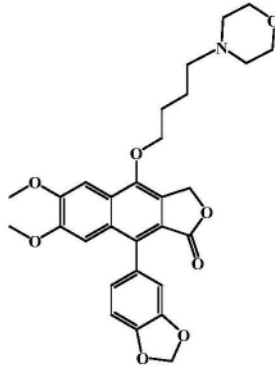
式 I,



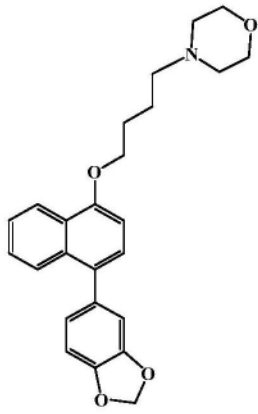
式 J,



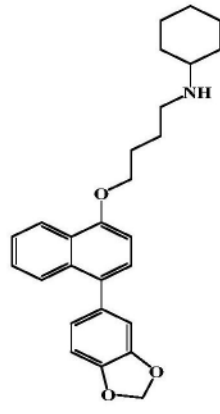
式 K,



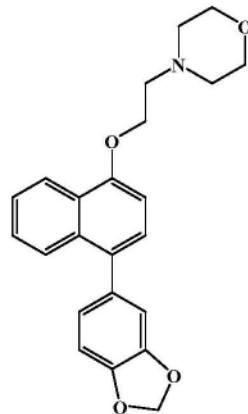
式 L,



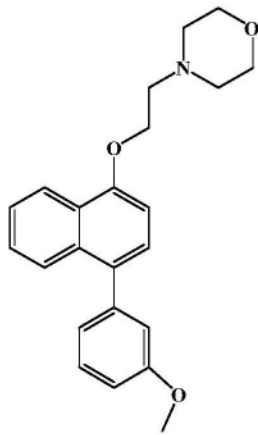
式 M,



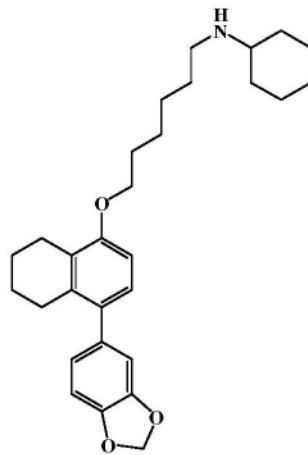
式 N,



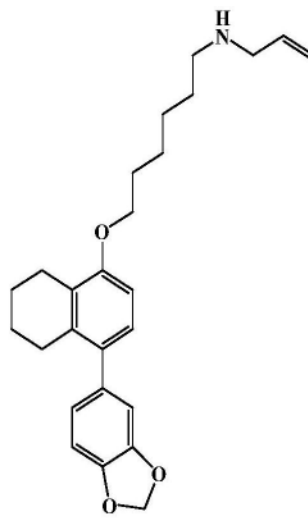
式 O,



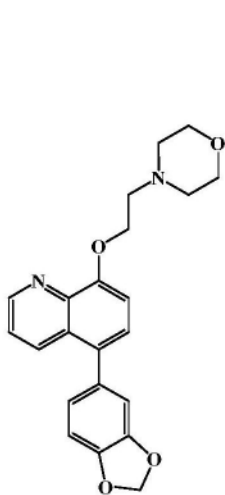
式 P,



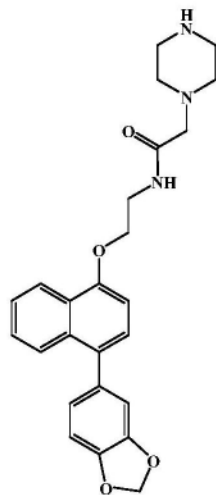
式 Q,



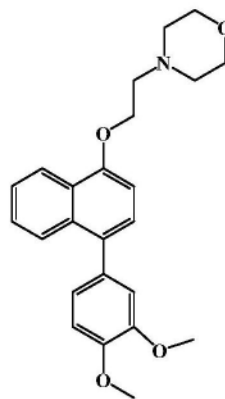
式 R,



式 S,

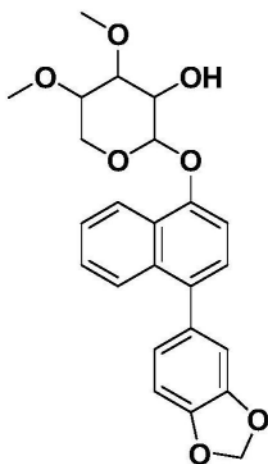


式 T, 或



式 U.

5. 式E化合物用于抑制细胞中的V-ATP酶活性的用途,



式 E。

6. 如前述权利要求中任一项所述的化合物的用途,其中所述化合物为其前药、代谢物、药学上可接受的盐、溶剂化物或多晶型物。

7. 如前述权利要求中任一项所述的化合物的用途,其用于通过抑制细胞中的V-ATP酶活性来抑制病毒。

8. 如权利要求7所述的化合物的用途,其用于抑制SARS-CoV-2病毒或流感病毒。

9. 式I化合物用于抑制SARS-CoV-2病毒或流感病毒的用途。

10. 式E化合物用于抑制SARS-CoV-2病毒或流感病毒的用途。

11. 抑制细胞中的V-ATP酶活性的方法,其包括使细胞与至少一种或多种如权利要求1-5中任一项所述的化合物接触。

12. 抑制病毒的方法,其包括使病毒感染的细胞与至少一种或多种如权利要求1-5中任一项所述的化合物接触。

13. 如权利要求12所述的抑制方法,其中所述病毒为SARS-CoV-2病毒或流感病毒。

14. 如权利要求11-13任一项所述的抑制方法,其中所述化合物为式E。

15. 治疗病毒感染的方法,其包括给药治疗有效量的一种或多种如权利要求1-5中任一项所述的化合物以抑制SARS-CoV-2病毒或流感病毒。

16. 如权利要求15所述的治疗方法,其中如权利要求1-5中任一项所述的化合物与至少一种具有V-ATP酶抑制活性的其他化合物组合。

17. 如权利要求15或16所述的治疗方法,其中所述化合物为式E。

18. 式I化合物在制备抑制细胞中的V-ATP酶活性用于治疗病毒感染的药物中的用途。

化合物用于治疗病毒感染的用途

发明领域

[0001] 本发明涉及化合物用于抑制细胞中的V-ATP酶活性的用途,特别是作为病毒如SARS-CoV-2病毒或流感病毒的V-ATP酶活性的抑制剂用于治疗病毒感染的用途。

背景技术

[0002] SARS-CoV-2病毒和COVID-19疾病在全球范围内造成了没有任何文化、人口、技术和宗教差异的严重破坏。

[0003] 在开发治疗COVID-19的解决方案时,计算和实验药物再利用或验证第二医疗用途等逻辑解决方案派上用场。现有药物可以提供起点并显著缩短临床开发时间线。文献中充满了针对病毒生命周期中各种事件的药物再利用运动,从病毒进入到成熟病毒颗粒的释放。使用羟氯喹、氯喹和其他抗病毒药物作为COVID-19的可能治疗选择证明了这种方法的潜力。

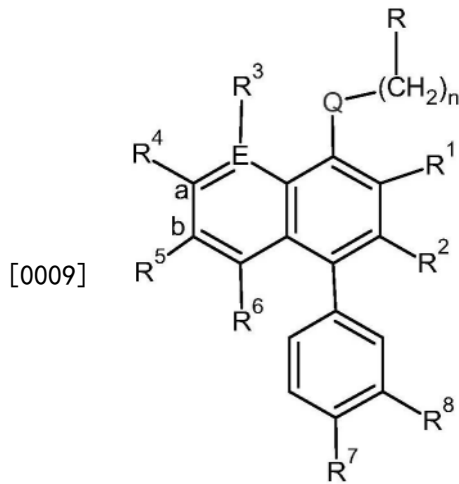
[0004] 一个这样有前途的靶点是液泡ATP酶(V-ATP酶),这是从V-ATP酶抑制剂(如巴弗洛霉素)的抗病毒功效推断出来的。V-ATP酶已被提议作为拦截病毒进入宿主细胞的有前途的靶点。V-ATP酶是普遍存在于内膜系统(即所有真核细胞的内质网(ER)、高尔基体等)的质子泵。流感病毒、虫媒病毒、痘苗病毒、博尔纳病毒(bomaviruses)、弹状病毒(rhabdoviruses)和冠状病毒等病毒利用V-ATP酶介导的内体酸化作为进入宿主细胞的关键细胞过程。

[0005] V-ATP酶抑制剂可能是病毒进入的潜在干预措施,对耐药性发展的敏感性要低得多,因为V-ATP酶是一种宿主蛋白。已经研究了几种V-ATP酶抑制剂的抗病毒潜力,例如巴弗洛霉素(首次发现且最著名的例子)。尽管它们具有强大的抗病毒功效,毒性是其临床应用的主要障碍。此外,V-ATP酶抑制剂的水溶性差对于药物递送形式是一个问题。

[0006] 鉴于V-ATP酶在冠状病毒(例如SARS-CoV-2感染)中的关键作用及其抑制剂在对抗COVID-19中的用途,需要开发强力、有效的V-ATP酶抑制剂作为靶向冠状病毒感染的潜在疗法。

[0007] 发明概述

[0008] 在一方面,本发明涉及式I的化合物用于抑制细胞中的V-ATP酶活性的用途,



式 I

[0010] 其中,

[0011] E选自C、N;

[0012] Q为O、-NH;

[0013] n为0-6;

[0014] R¹和R²选自-H、-C(O)O-烷基如-C(O)OC₂H₅,或R¹和R²一起形成取代或未取代的5或6元环如内酯;

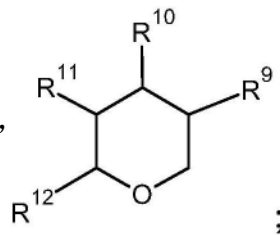
[0015] R³、R⁴、R⁵和R⁶各自独立地选自-H、-OH、烷氧基;

[0016] R⁷和R⁸选自-H、-OH、烷氧基、-X,其中X可以是F、Cl、Br或R⁷和R⁸一起形成含有一个或多个杂原子如O的5元环;

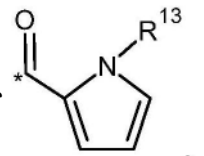
[0017] a和b指示在对应位置存在或不存在双键;

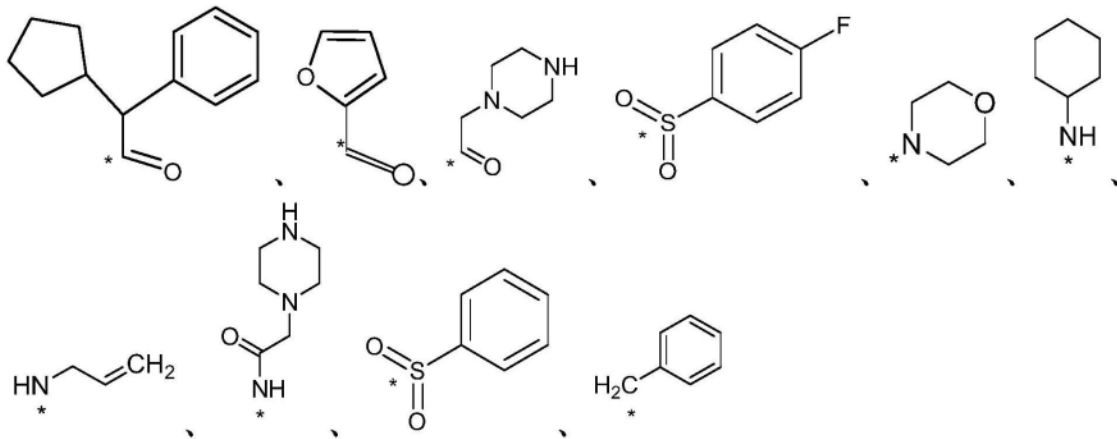
[0018] R¹¹和R¹²各自独立地选自-H,或者R¹¹和R¹²可以是取代或未取代的5或6元环,例如内酯、-C(O)O-烷基;

[0019] R选自取代或未取代的苯环,



[0020] 其中R⁹、R¹⁰、R¹¹和R¹²各自独立地选自-H、-OH、烷氧基、

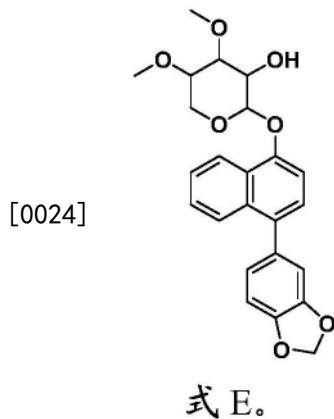




[0021] 其中R¹³为H、烷基;和

[0022] *表示与Q或-CH₂基团的连接。

[0023] 在另一个方面,本发明涉及式E化合物用于抑制细胞中的V-ATP酶活性的用途,



附图说明

[0025] 图1:说明了ELISA测定的示意图。

[0026] 图2:说明了浓度范围为31.25pg/ml至2000pg/ml的V-ATP酶的标准曲线。

[0027] 图3:说明了瑞德西韦的剂量响应曲线。

[0028] 图4:说明了本发明的式E化合物的剂量响应曲线。

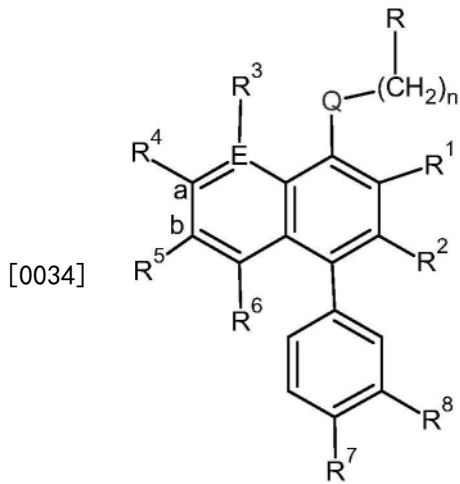
[0029] 图5:说明了式E化合物的给药对仓鼠中SARS-CoV-2感染的影响,图5(A)显示了从攻击当天到感染后第4天,仓鼠体重的百分比变化;图5(B)显示了从显示炎症和肺炎的安乐死动物中切除的整个肺的图像;图5(C)显示了显示脾脏肿大状况的脾脏图像。

[0030] 图6:说明了给药式E化合物对仓鼠中SARS-CoV-2感染的抗病毒和免疫调节功效,图6(A)显示了显示感染后第4天不同组中相对肺病毒载量的条形图;图6(B)显示了显示不同实验组脾脏中细胞因子的相对mRNA表达的条形图。每个条形代表平均值±SEM。

[0031] 图7:说明了式E化合物的给药对感染SARS-CoV-2的仓鼠的肺病理学的影响。

[0032] 发明详述

[0033] 本发明涉及式I化合物用于抑制细胞中V-ATP酶活性的用途,



式 I

[0035] 其中,

[0036] E选自C、N;

[0037] Q为O、-NH;

[0038] n为0-6;

[0039] R¹和R²选自-H、-C(O)O-烷基如-C(O)OC₂H₅,或R¹和R²一起形成取代或未取代的5或6元环如内酯;

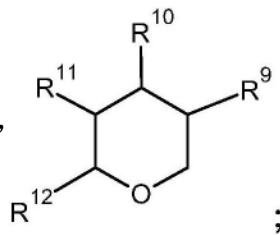
[0040] R³、R⁴、R⁵和R⁶各自独立地选自-H、-OH、烷氧基;

[0041] R⁷和R⁸选自-H、-OH、烷氧基、-X,其中X可以是F、Cl、Br或R⁷和R⁸一起形成含有一个或多个杂原子如O的5元环;

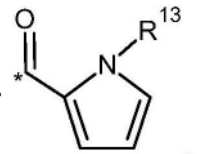
[0042] a和b指示在对应位置存在或不存在双键。

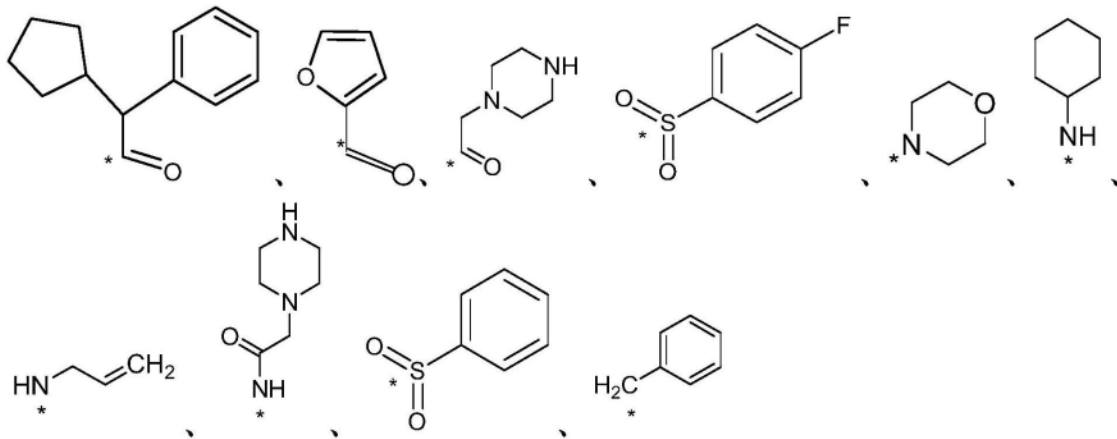
[0043] R¹¹和R¹²各自独立地选自-H,或者R¹¹和R¹²可以是取代或未取代的5或6元环,例如内酯、-C(O)O-烷基;

[0044] R选自取代或未取代的苯环,



[0045] 其中R⁹、R¹⁰、R¹¹和R¹²各自独立地选自-H、-OH、烷氧基、



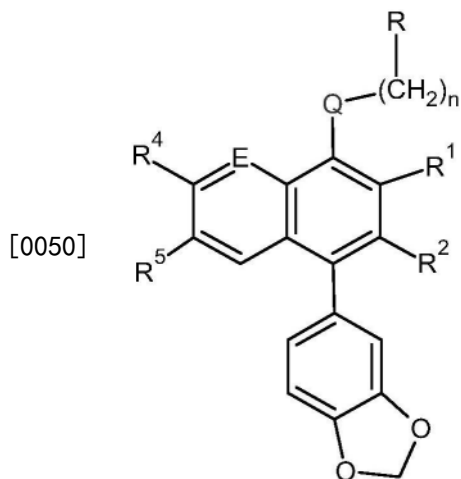


[0046] 其中R¹³为H、烷基;和

[0047] *表示与Q或-CH₂基团的连接。

[0048] 在一个实施方案中,式I中的a和b指示在对应位置存在或不存在双键。例如,当E为-N且存在R³时,对应位置的双键将不存在,或者当E为-N且R³不存在时,对应位置的双键将存在。

[0049] 在一个实施方案中,本发明涉及式II的化合物用于抑制细胞中的V-ATP酶活性的用途,

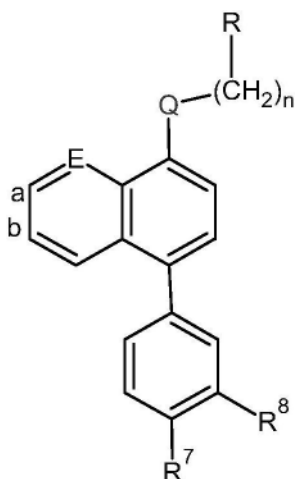


[0051]

式 II

[0052] 在一个实施方案中,本发明涉及式III的化合物用于抑制细胞中的V-ATP酶活性的用途,

[0053]



式 III

[0054] 这些基团与上面式I中定义的相同。

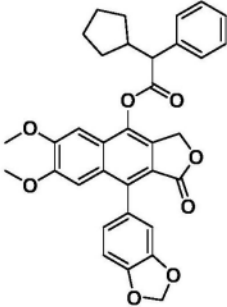
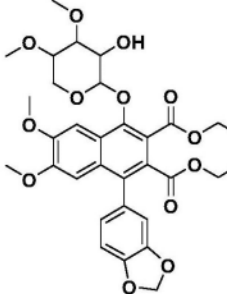
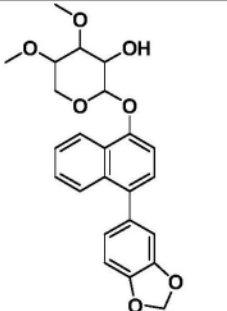
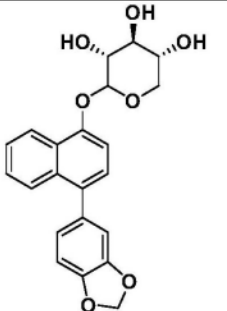
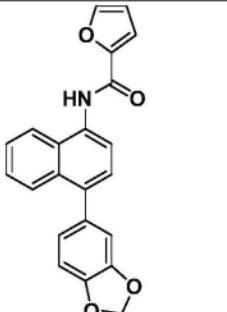
[0055] 在一个实施方案中,本发明涉及表1中所示的化合物用于抑制细胞中的V-ATP酶的用途。这些化合物在SARS-CoV-2或流感感染的治疗中充当抗病毒剂。

[0056] 表1:

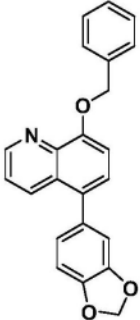
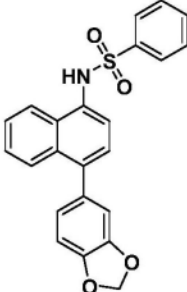
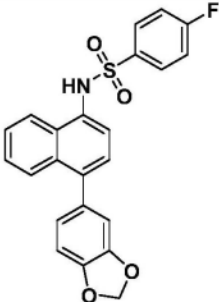
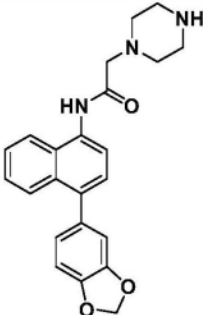
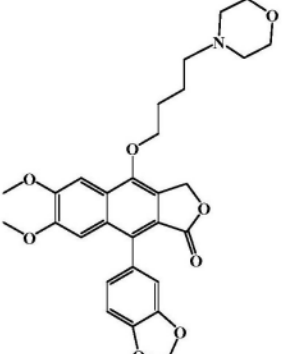
[0057]

式	IUPAC 名称	结构
A	9-(苯并[d][1,3]二氧杂环戊烷-5-基)-6,7-二甲氧基-4-(四氢-3-羟基-4,5-二甲氧基-2H-吡喃-2-基氧基)萘并[2,3-c]呋喃-1(3H)-酮	
B	9-(苯并[d][1,3]二氧杂环戊烷-5-基)-1,3-二氢-6,7-二甲氧基-1-氧代萘并[2,3-c]呋喃-4-基-1-甲基-1H-吡咯-2-甲酸酯	

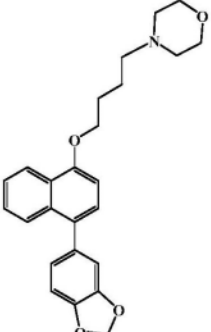
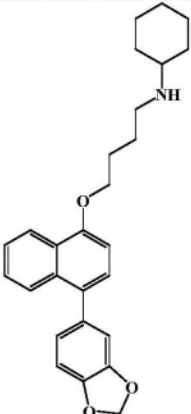
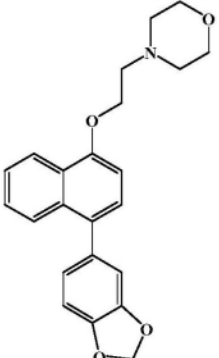
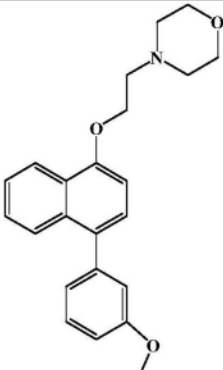
[0058]

C	9-(苯并[d][1,3]二氧杂环戊烷-5-基)-1,3-二氢-6,7-二甲氧基-1-氧代萘并[2,3-c]呋喃-4-基-2-环戊基-2-苯基乙酸酯	
D	1-(苯并[d][1,3]二氧杂环戊烷-5-基)-6,7-二甲氧基-4-(四氢-3-羟基-4,5-二甲氧基-2H-吡喃-2-基氧基)萘-2,3-二甲酸二乙酯	
E	2-(1-(苯并[d][1,3]二氧杂环戊烷-5-基)萘-4-基氧基)-四氢-4,5-二甲氧基-2H-吡喃-3-醇	
F	(3R,4S,5R)-2-(1-(苯并[d][1,3]二氧杂环戊烷-5-基)萘-4-基氧基)-四氢-2H-吡喃-3,4,5-三醇	
G	N-(1-(苯并[d][1,3]二氧杂环戊烷-5-基)萘-4-基)呋喃-2-甲酰胺	

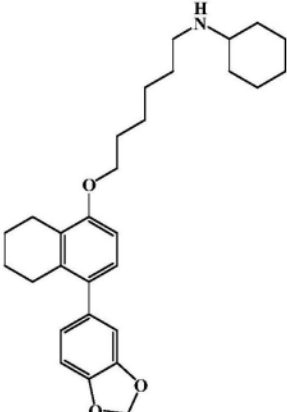
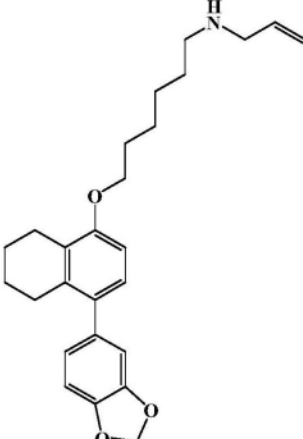
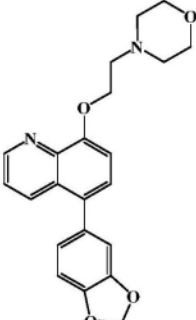
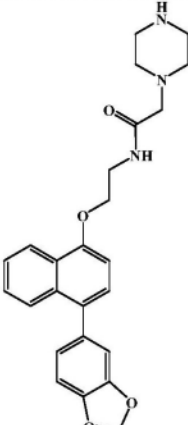
[0059]

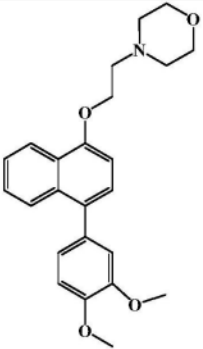
H	5-(苯并[d][1,3]二氧杂环戊烷-5-基)-8-(苄基氧基)喹啉	
I	N-(1-(苯并[d][1,3]二氧杂环戊烷-5-基)萘-4-基)苯磺酰胺	
J	N-(1-(苯并[d][1,3]二氧杂环戊烷-5-基)萘-4-基)-4-氟苯磺酰胺	
K	N-(1-(苯并[d][1,3]二氧杂环戊烷-5-基)萘-4-基)-2-(哌嗪-1-基)乙酰胺	
L	4-(4-吗啉代丁氧基)-9-(苯并[d][1,3]二氧杂环戊烷-5-基)-6,7-二甲氧基萘并[2,3-c]呋喃-1(3H)-酮	

[0060]

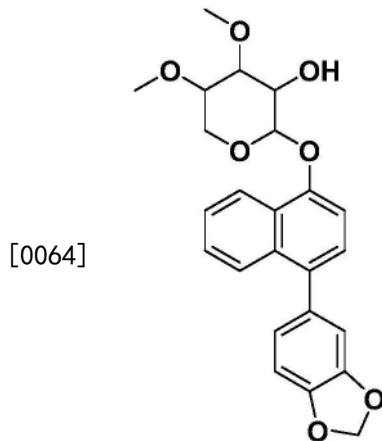
M	4-(4-(1-(苯并[d][1,3]二氧杂环戊烷-5-基)萘-4-基氧基)丁基)吗啉	
N	N-(4-(1-(苯并[d][1,3]二氧杂环戊烷-5-基)萘-4-基氧基)丁基)环己胺	
O	4-(2-(1-(苯并[d][1,3]二氧杂环戊烷-5-基)萘-4-基氧基)乙基)吗啉	
P	4-(2-(1-(3-甲氧基苯基)萘-4-基氧基)乙基)吗啉	

[0061]

Q	N-(6-(5-(苯并[d][1,3]二氧杂环戊烷-5-基)-1,2,3,4-四氢萘-8-基氧基)己基)环己胺	
R	6-(5-(苯并[d][1,3]二氧杂环戊烷-5-基)-1,2,3,4-四氢萘-8-基氧基)-N-烯丙基己烷-1-胺	
S	8-(2-(吗啉代乙氧基)-5-(苯并[d][1,3]二氧杂环戊烷-5-基)喹啉	
T	N-(2-(1-(苯并[d][1,3]二氧杂环戊烷-5-基)萘-4-基氧基)乙基)-2-(哌嗪-1-基)乙酰胺	

[0062]	U 4-(2-(1-(3,4-二甲氧基苯基)萘-4-基氧基)乙基)吗啉	
--------	--	--

[0063] 另一方面,本发明涉及式E化合物用于抑制细胞中V-ATP酶活性的用途。式E化合物可有效治疗SARS-CoV-2和流感感染。



式 E.

[0065] 式E化合物的分子量约为450,分配系数(log P)值接近4。该化合物可溶于二甲基亚砜(DMSO)、甲醇、乙酸乙酯等溶剂。

[0066] 式I至III和式A至U的化合物可以作为其前药、代谢物、药学上可接受的盐、溶剂化物或多晶型物使用。

[0067] 式I至III和式A至U的化合物用于抑制病毒的用途。感染病毒的细胞中的V-ATP酶活性受到抑制。可以理解,抑制细胞中的V-ATP酶活性会抑制病毒。

[0068] 式I至III和式A至U化合物的用途是用于抑制病毒,例如SARS-CoV-2病毒或流感病毒。

[0069] 式E化合物用于抑制SARS-CoV-2病毒或流感病毒的用途。

[0070] 本发明还涉及通过使细胞与至少一种或多种式I至III和式A至U的化合物接触来抑制细胞中V-ATP酶活性的方法。

[0071] 本发明还涉及通过使病毒感染的细胞与至少一种或多种式I至III和式A至U的化合物接触来抑制病毒的方法,优选地,该抑制方法是针对SARS-CoV-2病毒或流感病毒。

[0072] 抑制细胞中V-ATP酶活性的方法包括使细胞或病毒感染的细胞与式E的化合物接触。

[0073] 本发明还涉及治疗病毒感染的的方法,该方法通过给药治疗有效量的一种或多种式I至III和式A至U的化合物来抑制细胞中的V-ATP酶活性。治疗方法优选用于治疗SARS-CoV-2病毒或流感病毒感染。

[0074] 在一个实施方案中,该治疗方法包括给药与至少一种另外的具有V-ATP酶抑制活性的其他化合物组合的治疗有效量的式I至III和式A至U的化合物。

[0075] 在另一个实施方案中,该治疗方法包括给药作为化合物之一的式E化合物。

[0076] 本发明的化合物对于抑制细胞中的V-ATP酶活性非常有效。这些化合物在体外和体内研究中都显示出良好的抗病毒作用结果,而且对正常人淋巴细胞没有细胞毒性作用。这表明这些化合物可以有效且安全地用于治疗病毒感染,特别是SARS-CoV-2感染。

[0077] 在一个实施方案中,本发明涵盖的化合物用于制备用于通过抑制细胞中的V-ATP酶活性来治疗病毒感染如SARS-CoV-2或流感感染的药物。

[0078] 在此公开了本发明范围内的很少的化合物。必须注意,所公开的化合物不限制本发明的范围。

实施例

[0079] 本发明的化合物通过已知方法制备。W02018193476和W02020129082中公开的化合物的制备方法通过引用并入本文。

[0080] 实施例1

[0081] 细胞中V-ATP酶抑制活性的测定

[0082] 液泡ATP酶(V-ATP酶)是一种质子泵,负责控制细胞的胞内和胞外pH值。V-ATP酶的结构在所有真核细胞中高度保守,并参与跨物种的多种功能。V-ATP酶以其内体和溶酶体的酸化而闻名,并且对于特定细胞的管腔酸化也很重要。

[0083] 在可靶向用于抗病毒治疗的宿主因子中,V-ATP酶是拦截病毒进入宿主细胞的有前景的靶标。在病毒威胁中,例如流感病毒、虫媒病毒、痘苗病毒、博尔纳病毒、弹状病毒和冠状病毒。因此,V-ATP酶介导的内体酸化可能为具有广泛适用性和对耐药突变的低敏感性的新抗病毒治疗铺平道路。

[0084] 使用人V型质子ATP酶ELISA试剂盒(My BioSource目录号:MBS911862)进行ELISA测试,以确定本发明化合物的V-ATP酶抑制作用。

[0085] 程序:

[0086] 一百万个MDAMB231细胞(富含V-ATP酶的细胞系)在37°C和5%CO₂在60mm板上培养24小时。用测试化合物(式A至U)以100nM(0.1μM)/10,000个细胞的浓度处理细胞并孵育48小时。孵育后弃去上清液,用D.P.B.S.(Dulbecco磷酸盐缓冲盐水)洗涤细胞,刮下细胞并在-80°C储存48小时。将细胞解冻、涡旋、均质化7分钟,然后以3000R.P.M.离心3分钟。取上清液用于V-ATP酶测定。

[0087] 该测定采用定量夹心酶免疫测定技术(sandwich enzyme immunoassay technique),如图1所示。

[0088] 将标准品和样品移液至孔中。V-ATP酶特异性抗体被预包被到微孔板上。标准品/样品中存在的任何V-ATP酶都会被固定化抗体结合。孵化期间后,通过洗涤去除任何未结合的物质,并将对V-ATP酶具有特异性的生物素偶联抗体添加到孔中,并将板在37°C和5%CO₂再孵育。洗涤后,将亲和素偶联的辣根过氧化物酶(HRP)添加到孔中。清洗以去除任何未结合的亲和素-酶试剂后,将底物溶液添加到孔中,显色与初始步骤中结合的V-ATP酶的量成正比。停止显色,用分光光度法在450nm处测量光密度。然后通过从标准品获得的回归方

程中代入光密度来计算V-ATP酶的浓度。通过从未处理中减去获得的V-ATP酶的数量/未处理中V-ATP酶的浓度X100来计算V-ATP酶减少的百分比(%)。

[0089] 结果

[0090] 在31.25pg/ml到2000pg/ml范围内绘制V-ATP酶浓度的标准曲线如图2所示,该图表现出良好的线性($R^2=0.954$)。

[0091] 表2显示了本发明化合物的V-ATP酶测定结果。

[0092] 表2:

样品	V-ATP 酶的减少(%)
[0093] *未处理的 MDAMB231 细胞	0
(100%浓度的 V-ATP 酶)	
式 A 化合物	13.31
式 B 化合物	15.33
式 C 化合物	14.69
式 D 化合物	18.2
式 E 化合物	15.6
式 F 化合物	61.0
式 G 化合物	62.37
式 H 化合物	61.34
式 I 化合物	20.56
[0094] 式 J 化合物	60.96
式 K 化合物	28.05
式 L 化合物	21.0
式 M 化合物	76.16
式 N 化合物	6.3
式 O 化合物	20.26
式 P 化合物	18.27
式 Q 化合物	77.42
式 R 化合物	16.2
式 S 化合物	75.5
式 T 化合物	81.9
式 U 化合物	16.57

[0095] *MDAMB231细胞系用于本研究,因为它们富含V-ATP酶

[0096] 结论

[0097] 结果表明式A至U的化合物导致细胞中V-ATP酶活性降低。

[0098] 实施例2

[0099] 本发明化合物对正常细胞的毒性研究

[0100] 对人外周血淋巴细胞进行毒性研究,该淋巴细胞通过差速离心分离的去纤维蛋白血获得。对本发明的化合物进行MTT测定以确定其毒性。MTT测定是一种简单且灵敏的测定,其中细胞的代谢降低活性被测量。其以如下方式进行。

[0101] 根据细胞接种效率制备所需体积的细胞悬浮液。将200 μ l制备的细胞悬浮液加入标记的96孔板中,并在37 $^{\circ}$ C和5%CO₂将板置于培养箱中18-24小时。然后,加入2 μ l对应的化合物稀释液,并将板置于37 $^{\circ}$ C和5%CO₂的培养箱中48小时。从板吸出悬浮液并加入100 μ l MTT工作溶液(0.5mg/ml MTT,从1X完全培养基中的5mg/ml MTT原液制备)。将板在培养箱中在37 $^{\circ}$ C和5%CO₂孵育4小时。将板旋转下来,去除上清液,加入200 μ l DMSO,轻轻混合并置于37 $^{\circ}$ C和5%CO₂培养箱中10分钟。读取在570nm的吸光度并使用回归分析计算化合物的存活百分比和IC₅₀值。

[0102] 表3显示了对本发明的化合物进行的MTT测定的结果。

[0103] 表3

[0104]

样品	IC ₅₀ (μ M)
式B化合物	无活性(无毒)
式C化合物	无活性(无毒)
式D化合物	无活性(无毒)
式E化合物	无活性(无毒)
式I化合物	无活性(无毒)
式L化合物	无活性(无毒)
式O化合物	无活性(无毒)
式P化合物	无活性(无毒)
式U化合物	无活性(无毒)

[0105] 结论

[0106] 从以上结果可以看出,式B至E、I、L、O、P、U的化合物在高达100 μ M对正常人淋巴细胞没有表现出任何毒性。这表明本发明的化合物对正常外周血淋巴细胞没有表现出任何毒性。

[0107] 其他安全性研究

[0108] 用式E化合物进行了各种临床前GLP(良好实验室规范,Good Laboratory Practice)和非GLP研究。这些研究包括对大鼠和狗的7天和28天研究,对大鼠、小鼠和狗的急性毒性研究。还研究了式E化合物对呼吸功能、神经系统和心血管系统、细菌突变、代谢、CaCo₂通透性、蛋白质结合和细胞色素效应的影响。这些研究表明,式E化合物无毒、无诱变性、无致染色体断裂性,并且对呼吸系统、神经系统和心血管系统没有影响。此外,式E化合物在大鼠、小鼠和狗中即使在2000mg/kg的更高剂量也没有表现出任何毒性或不利影响。这表明式E化合物用于给药是安全的。

[0109] 实施例3

[0110] 本发明化合物的体外抗SARS-CoV-2活性

[0111] 中性红(细胞病变作用/毒性测定)

[0112] 程序:

[0113] 减少病毒引起的细胞病变作用(主要CPE测定)

[0114] 在测试前一天,在96孔一次性微孔板中制备汇合或接近汇合的Vero 76细胞的细胞培养物单层。细胞维持在补充有5%FBS(胎牛血清)的MEM(最低必需培养基Eagle)中。对于抗病毒测定,使用相同的培养基,但FBS减少至2%并补充50- $\mu\text{g}/\text{ml}$ 庆大霉素。将化合物溶解在DMSO、盐水或稀释剂中。不易溶解化合物被涡旋、加热和超声处理,如果它们仍然没有进入溶液,则作为胶体悬浮液进行测试。测试化合物制备成四个连续的 \log_{10} 浓度,通常为0.1、1.0、10和100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 或 μM 。当提供的化合物不足时,使用较低的浓度。每次稀释使用五个微孔:三个用于感染的培养物,两个用于未感染的毒性培养物。实验的对照由每个板上的六个被感染但未处理的微孔(病毒对照)和六个未处理且未感染的微孔(细胞对照)组成。已知活性药物作为阳性对照药物使用与测试化合物相同的方法平行测试。每次测试运行都会测试阳性对照。

[0115] 从细胞中去除生长培养基,并将测试化合物以0.1ml体积以2X浓度施加到孔中。通常在 $\sim 60\text{CCID}_{50}$ (50%细胞培养感染剂量)以0.1ml体积将病毒添加到指定用于病毒感染的孔中。将不含病毒的培养基置于毒性对照孔和细胞对照孔中。将板在37 $^{\circ}\text{C}$ 和5% CO_2 孵育,直到在病毒对照孔中观察到标记的CPE(对于大多数病毒株 $> 80\%$ CPE)。然后在5% CO_2 培养箱中于37 $^{\circ}\text{C}$ 用0.011%中性红将板染色约两小时。通过完全抽吸去除中性红培养基,并且可以用磷酸盐缓冲溶液(PBS)漂洗细胞1X以去除残留染料。完全去除PBS,并用50%Sorensen柠檬酸盐缓冲液/50%乙醇洗脱掺入的中性红至少30分钟。中性红色染料渗透到活细胞中,因此,红色越深,孔中存在的活细胞数量越多。使用分光光度计在540nm波长量化每个孔中的染料含量。使用Microsoft Excel基于计算机的电子表格,将每组孔中的染料含量转换为未处理对照孔中存在的染料百分比,并根据病毒对照进行标准化。然后通过回归分析计算50%有效(EC_{50} ,病毒抑制)浓度和50%细胞毒性(CC_{50} ,细胞抑制)浓度。 CC_{50} 除以 EC_{50} 的商给出选择性指数(SI)值。

[0116] 表3显示了中性红的结果(细胞病变作用/毒性测定)。

[0117] 表3:

化合物	EC_{50} ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	CC_{50} ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	SI_{50}
对照	0.34	> 100	> 290
式A	> 0.1	< 0.1	0
式E	0.35	2.5	7.1
式F	2.9	32	11
式D	32	40	1.3
式L	> 0.34	0.34	0

[0119] 对于中性红测定,式E化合物的 EC_{50} 、 CC_{50} 和 SI_{50} 值分别为0.35 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 和7.1。这些值表明这些化合物,特别是式E化合物抑制病毒复制。

[0120] 结论

[0121] 由于式E化合物显示出 EC_{50} -0.35和 SI_{50} -7.1,而式F化合物显示出 EC_{50} -2.9和 SI_{50} -11,因此它们被认为具有良好的抗病毒活性。

[0122] 实施例4

[0123] 式E化合物的体外抗SARS-CoV-2活性(测定方法-IC₅₀估算)

[0124] 程序:

[0125] 对于每个样品,该测定以96孔板形式在3个孔中进行。每孔接种1 x 10e4VeroE6细胞,并在37°C孵育过夜以形成单层。第二天,将细胞与7个点浓度的测试物质(TS)一起孵育。对于瑞德西韦,使用以下浓度:10μM、3μM、1μM、0.3μM、0.1μM、0.03μM和0.01μM。对于式E化合物,10μM储备溶液在DMSO中连续稀释(2倍稀释)。从每个稀释液中取2微升用于筛选测定。式E化合物的7个点浓度为10μg、3μg、1μg、0.3μg、0.1μg、0.03μg和0.01μg。对照细胞仅与0.5% DMSO一起孵育。这些细胞以0.01的MOI感染了SARS-CoV-2。48小时后,从100μl培养物上清液中提取病毒RNA并进行qRT-PCR(一式两份),其中确定N和E基因序列的Ct值。与对照相比,基于TS处理细胞中Ct值的倍数变化来确定病毒复制的抑制。IC₅₀值使用AAT Bioquest IC₅₀计算器确定,如表4所示。

[0126] 表4

[0127]	化合物	IC ₅₀ 值(μM)	
		E 基因	N 基因
[0128]	瑞德西韦	0.15	0.11
	式E化合物	0.5713	0.5857

[0129] 图3显示了瑞德西韦的剂量响应曲线。图4显示了式E化合物的剂量响应曲线。

[0130] 结论

[0131] 结果表明,式E化合物在体外细胞毒性测定中表现出良好的抗SARS-CoV-2活性(IC₅₀<10μM)。

[0132] 实施例5

[0133] 式E化合物的体外抗SARS-CoV-2活性

[0134] 测定方法-细胞毒性

[0135] 程序

[0136] 对于每个样品,该测定以96孔板形式在3个孔中进行。每孔接种1 x 10e4Vero E6细胞,并在37°C孵育过夜以形成单层。第二天,将细胞与指定浓度的测试物质(Ts)一起孵育,最终DMSO浓度为0.5%。对照细胞仅与0.5% DMSO一起孵育。24和48小时后,细胞用Hoechst 33342和sytox橙色染料染色。使用ImageXpress Microconfocal (Molecular Devices)以10X、每孔16张图像来拍摄图像,所述图像覆盖90%的孔区域。Hoechst 33342核酸染色剂是一种通用的细胞永久核复染剂,当与dsDNA结合时会发出蓝色荧光。它会染色所有活细胞和死细胞。Sytox橙色染料染色细胞膜受损的细胞中的核酸。这种染色是细胞死亡的指标。首先,软件将计算Hoechst图像中的细胞总数。在Sytox图像中,其会计算在Hoechst阳性细胞中有多少细胞对Sytox呈阳性。

[0137] 抗病毒筛选

[0138] 程序:

[0139] 对于每个样品,该测定以96孔板形式在3个孔中进行。每孔接种1 x 10e4VeroE6细胞,并在37°C孵育过夜以形成单层。第二天,将细胞与指定浓度的测试物质(Ts)一起孵育,

最终DMSO浓度为0.5%。对照细胞仅与0.5%DMSO一起孵育。这些细胞以0.01的MOI感染了SARS-CoV-2。24和48小时后,从100 μ l培养物上清液中提取病毒RNA并进行qRT-PCR(一式两份),其中确定N和E基因序列的Ct值。与对照相比,基于TS处理细胞中Ct值的倍数变化来确定病毒复制的抑制。瑞德西韦用作病毒抑制的阳性对照。

[0140] 结果

[0141] 表5显示了式E化合物的细胞毒性和抗病毒活性的结果。

[0142] 表5

化合物名称	浓度(μ M)	%细胞存活率		%病毒复制的抑制			
		24 小时	48 小时	感染后 24 小时		感染后 48 小时	
				E	N	E	N
瑞德西韦	10	99.23	94.37	82.38	80.35	99.8	99.89
式 E 化合物	10	99.60	77.81	75.39	81.3	99.5	99.7

[0144] 从以上结果可以看出,式E化合物在24小时后的细胞存活率略高于瑞德西韦。感染24小时和48小时后通过式E化合物的病毒复制的抑制百分比与瑞德西韦相当。

[0145] 结论

[0146] 由于瑞德西韦对SARS-CoV-2病毒有效,式E化合物对SARS-CoV-2病毒也有抑制作用,可有效用于治疗SARS-CoV-2病毒感染。

[0147] 实施例6

[0148] 式E化合物的抗SARS-CoV-2活性的体内研究

[0149] 如下所述,对感染SARS-CoV-2的叙利亚仓鼠进行了体内研究。

[0150] 方法

[0151] 动物:从CDRI(中央药物研究所,Central Drug Research Institute)采购6-8周大的雄性金色叙利亚仓鼠并运送到小型动物设施(small animal facility,SAF),THSTI(转化健康科学技术研究所,Translational Health Science and Technology Institute)并在攻击研究前隔离7天。在预处理过程中,动物被安置在小型动物设施(SAF)中,然后被转移到用于SARS-CoV-2攻击研究的动物生物安全3级(ABSL-3)机构设施。将动物维持少于12小时的光照和黑暗循环,并随意喂食标准颗粒饮食和水。所有涉及免疫、加强剂量和动物攻击的实验方案均由机构伦理委员会IAEC(IAEC/THSTI/118)、IBS和RCGM批准。病毒培养和滴定SARS相关冠状病毒2,分离株USA-WA1/2020病毒在含有4.5g/L D-葡萄糖、100,000U/L青霉素-链霉素、100mg/L丙酮酸钠、25mM HEPES和2%FBS的Dulbecco改良Eagle培养基(DMEM)完全培养基中培养的Vero E6细胞系中生长和滴定。根据机构生物安全指南,在ABSL3内的THSTI IDRF设施中空斑纯化(plaque purified)病毒储备液。

[0152] 病毒培养和滴定

[0153] SARS相关冠状病毒2,分离株USA-WA1/2020病毒在含有4.5g/L D-葡萄糖、100,000U/L青霉素-链霉素、100mg/L丙酮酸钠、25mM HEPES和2%FBS的Dulbecco改良Eagle培养基(DMEM)完全培养基中培养的Vero E6细胞系中生长和滴定。根据机构生物安全指南,在

ABSL3内的THSTI IDRF设施中空斑纯化病毒储备液。

[0154] 金色叙利亚仓鼠中的SARS-CoV2感染和给药

[0155] 33只雄性金色叙利亚仓鼠被随机分配到不同的组(n=5), 1) 攻击对照组(n=5), 2) 瑞德西韦对照组(n=5) 和未攻击对照组(n=3) 被安置在单独的笼子里。预处理组(δ III/p400) 在攻击前2天开始通过口服强饲法接受400mpk的式E化合物(药物)。其他3组即 δ I/200、 δ II/800、 δ IV/400每天通过口服强饲法在攻击后分别接受200、800和400mpk的式E化合物, 直至终点。除了未攻击的对照组外, 所有动物都在ABSL3设施内在通过使用氯胺酮(150mg/kg) 和甲苯噻嗪(10mg/kg) 腹膜内注射的麻醉下通过导管在每个鼻孔中鼻内给药105PFU的SARS-CoV-250 μ l来攻击(Chan等人, 2020; Rizvi等人, 2021; Sia等人, 2020)。未经攻击的对照组鼻内接受模拟PBS。所有涉及病毒培养和动物感染处理的实验方案均经RCGM、机构生物安全和IAEC动物伦理委员会批准。

[0156] SARS-CoV-2感染的总体临床参数

[0157] 感染后4天对所有感染动物在ABSL3中实施安乐死。攻击后每天观察体重和动物活动的变化。处死后, 动物的肺和脾脏被切除并成像以观察总体形态变化。右下肺叶固定在10%中性福尔马林溶液中, 用于组织学分析。将完整的肺左叶在2ml Trizol溶液中均质化以估计病毒载量。将脾脏在2ml Trizol溶液中均质化。Trizol中的组织样品立即储存在-80 $^{\circ}$ C直至进一步使用。通过直接心脏穿刺抽取动物的血液, 分离血清并储存在-80 $^{\circ}$ C直至进一步使用。

[0158] 结果

[0159] 口服给药式E化合物对感染SARS-CoV-2的仓鼠的总体临床参数的影响。

[0160] 为了解式E化合物(根据给药方案) 在仓鼠中对SARS-CoV-2攻击的保护功效, 在接受不同剂量式E化合物即 δ I/200、 δ II/800、 δ III/p400、 δ IV/400的感染组中评估了针对实验对照未感染(UI)、SARS-CoV-2感染(I)、接受SC瑞德西韦(R)的仓鼠的与仓鼠中SARS-CoV-2感染相关的总临床参数。

[0161] 如图5A所示, 结果表明接受 δ III/p400的金色叙利亚仓鼠对体重减轻表现出最好的保护作用, 并且在感染后体重没有减轻。此外, δ I/200组在体重损失方面表现出第二好的恢复, 而其他2组对感染对照组表现出微小的保护, 但感染后表现出体重逐渐减少。

[0162] 一致地, 在攻击后第4天从安乐死动物身上分离出的肺在 δ III/p400组中, 随后在 δ II/800组中, 显示出显著较小的肺炎和炎症区域, 表明与感染组相比, 这两组中SARS-CoV2相关的肺损伤可能较少(图5B)。脾肿大是仓鼠中SARS-CoV2相关病理学的另一临床参数, 与感染对照组相比, δ III/p400组显示出显著缓解, 而其他药物组的脾脏大小几乎没有或没有减少(图5C)。

[0163] 式E化合物对感染SARS-CoV-2的仓鼠的抗病毒和免疫调节特性。

[0164] 为了解式E化合物的抗病毒功效, 对来自仓鼠的切离的肺的SARS-CoV2N2基因进行了相对病毒载量量化。

[0165] 图6A中的结果显示 δ I/200、 δ II/800和 δ III/p400组的相对肺病毒载量显著降低。在 δ III/p400中观察到最高的病毒载量减少, 与感染对照组相比显示病毒载量减少5倍, 而其他组如 δ I/200和 δ II/800显示肺病毒载量减少约2至2.5倍。有趣的是, δ IV/400组的肺病毒载量没有减少, 并且该组的肺病毒载量也存在非均匀性。

[0166] 为了了解式E化合物的免疫调节潜力,进行了来自不同组的脾细胞样品中针对HGPRT内源性对照的IFN γ 、IL4、IL17A基因的mRNA表达谱分析。数据表明所有组中IL4的显著抑制以及 δ I/200和 δ III/p400中IL17A表达的抑制(图6B)。有趣的是, δ I/200显示出在所有组中最高的INF γ 诱导。

[0167] 式E化合物治疗的仓鼠中与SARS-CoV2感染相关的肺部病理学的组织学评估。

[0168] 为了解给药式E化合物在肺病理学方面对SARS-CoV2感染的影响;对感染后4天分离的肺样本进行详细的组织学分析。

[0169] 肺病理学的组织学评估通过H&E染色在给药式E化合物的仓鼠中进行,并与对照组进行比较。图7显示了40X放大的H&E染色肺的组织学图像,显示了肺炎(蓝色箭头)、炎症(黑色箭头)、肺损伤(红色箭头)、肺泡上皮细胞(绿色箭头)的区域及其各自的肺样本的病理评分和总体疾病评分。

[0170] 所有药物治疗组的H&E染色肺样本显示肺炎、肺泡上皮损伤和肺部炎症评分都有良好的降低。 δ III/p400组对所有研究的组织学参数和总体疾病评分提供了最好的保护。有趣的是,与感染对照相比, δ IV/400药物组几乎没有或没有观察到保护作用。

[0171] 结论

[0172] 在金色叙利亚仓鼠中进行的SARS-CoV-2攻击研究表明,在测试的4种给药方案中,用400mpk的式E化合物进行预处理显示出针对SARS-CoV-2感染的最佳总体保护功效,其与瑞德西韦相比降低了肺病毒载量和肺炎。其还表现出减少的肺部病理学和抑制致病性IL4和IL17A免疫反应。

[0173] 上述测试表明使用式I化合物可有效减少细胞中的V-ATP酶,从而通过抑制SARS CoV-2病毒帮助治疗病毒感染。式I化合物,特别是式E化合物作为抗病毒剂在治疗病毒感染方面非常有效而不引起毒性。

[0174] 对本发明的上述描述仅用于说明本发明,并非用于限制本发明。由于本领域技术人员可以想到结合本发明的精神和实质对所公开的实施方案进行修改,因此本发明应被解释为包括本公开范围内的所有内容。

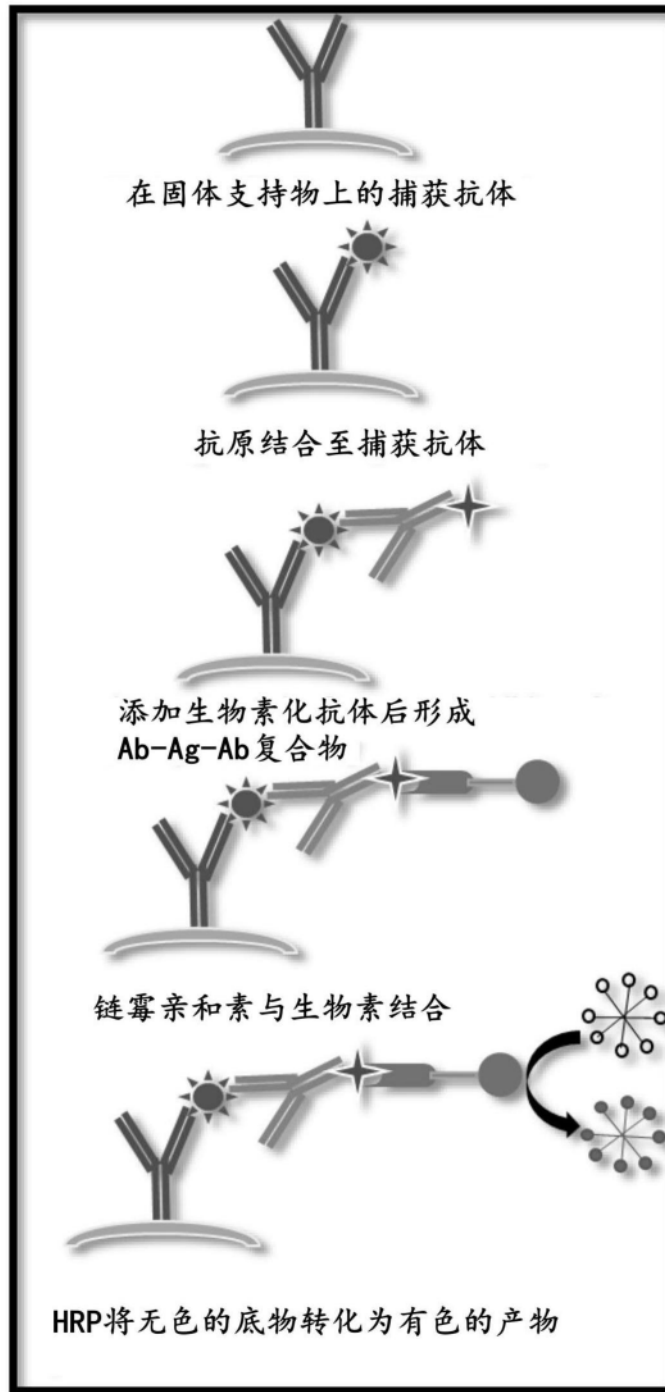


图1

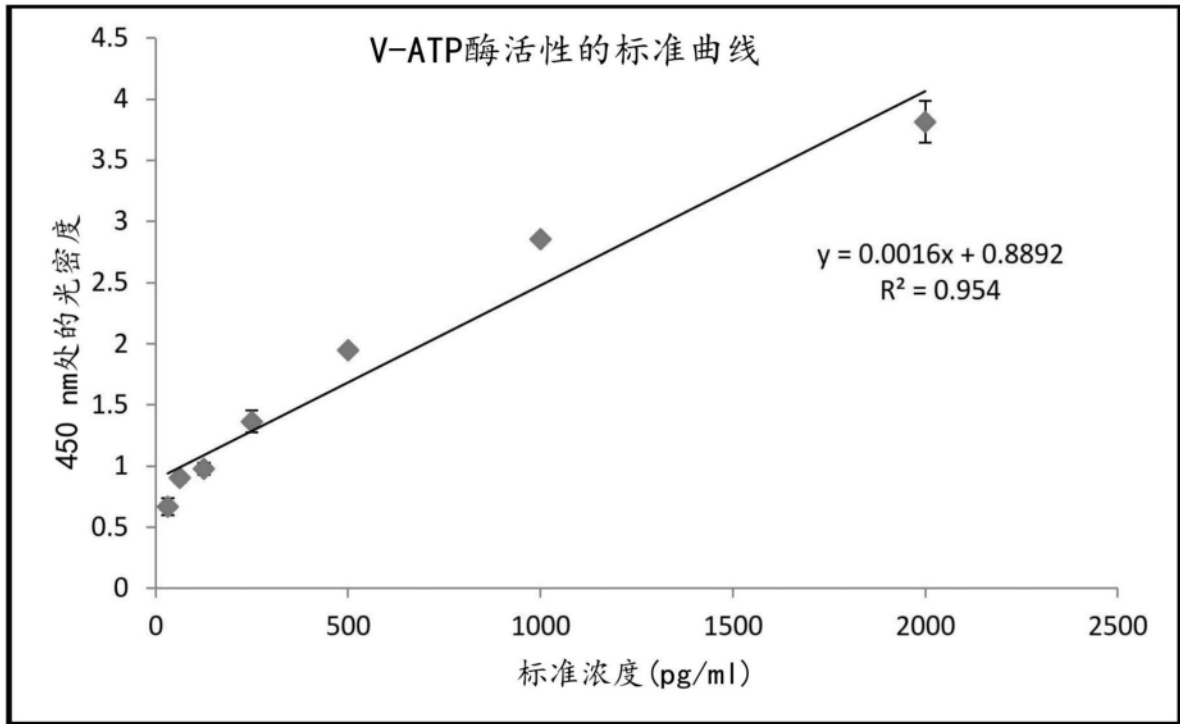
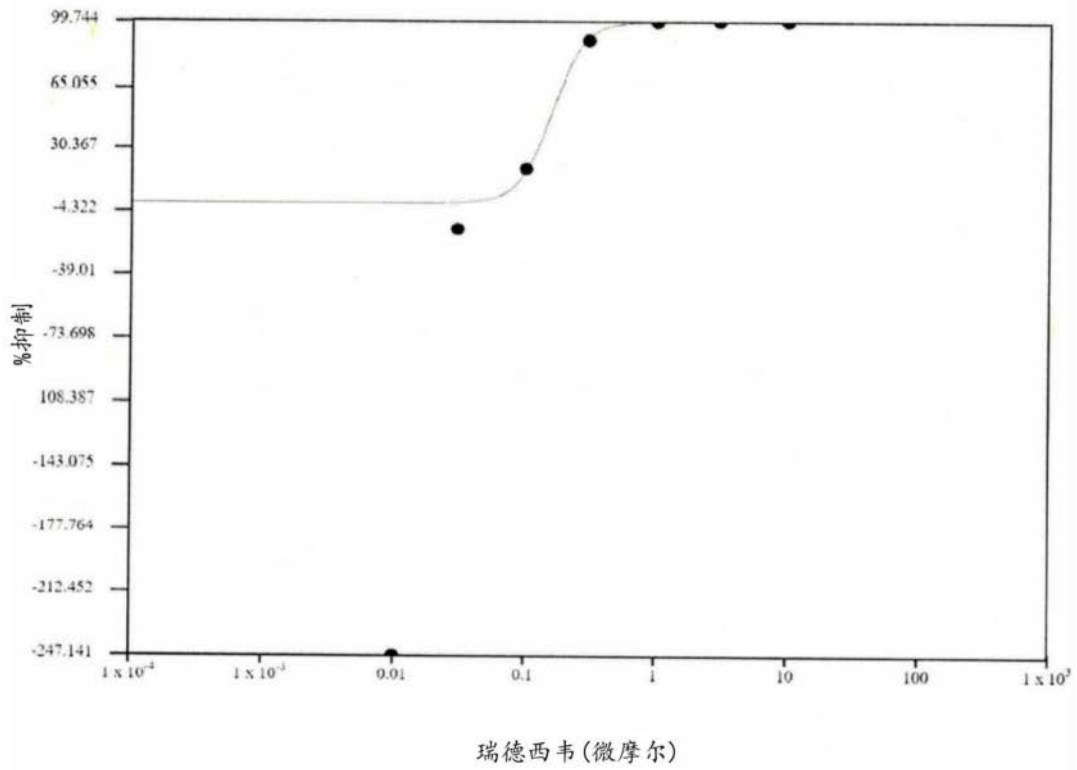


图2

瑞德西韦对E基因的剂量响应



瑞德西韦(微摩尔)

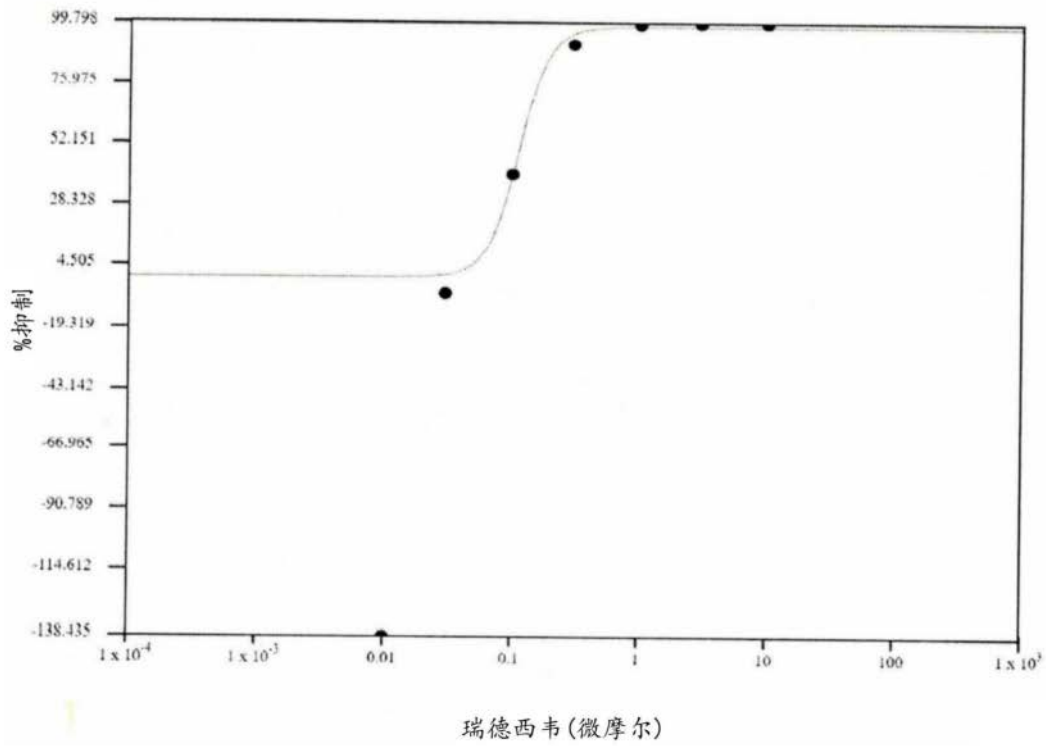
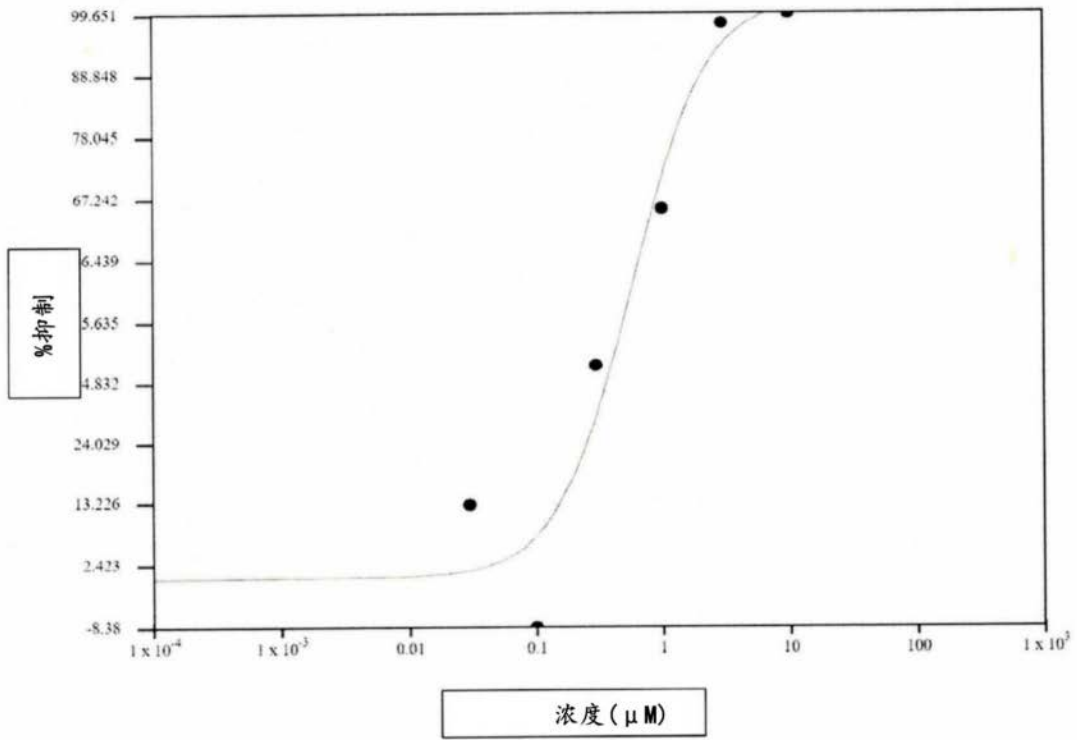


图3

式E化合物对E基因的剂量响应



式E化合物对N基因的剂量响应

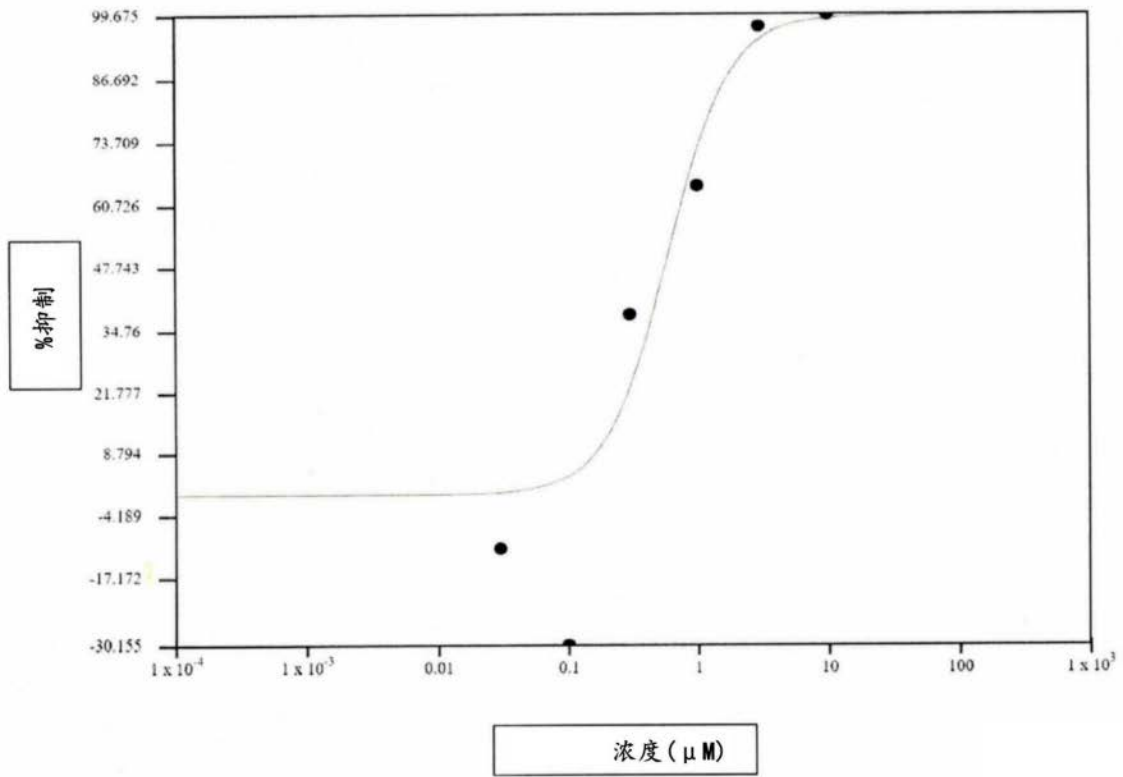


图4

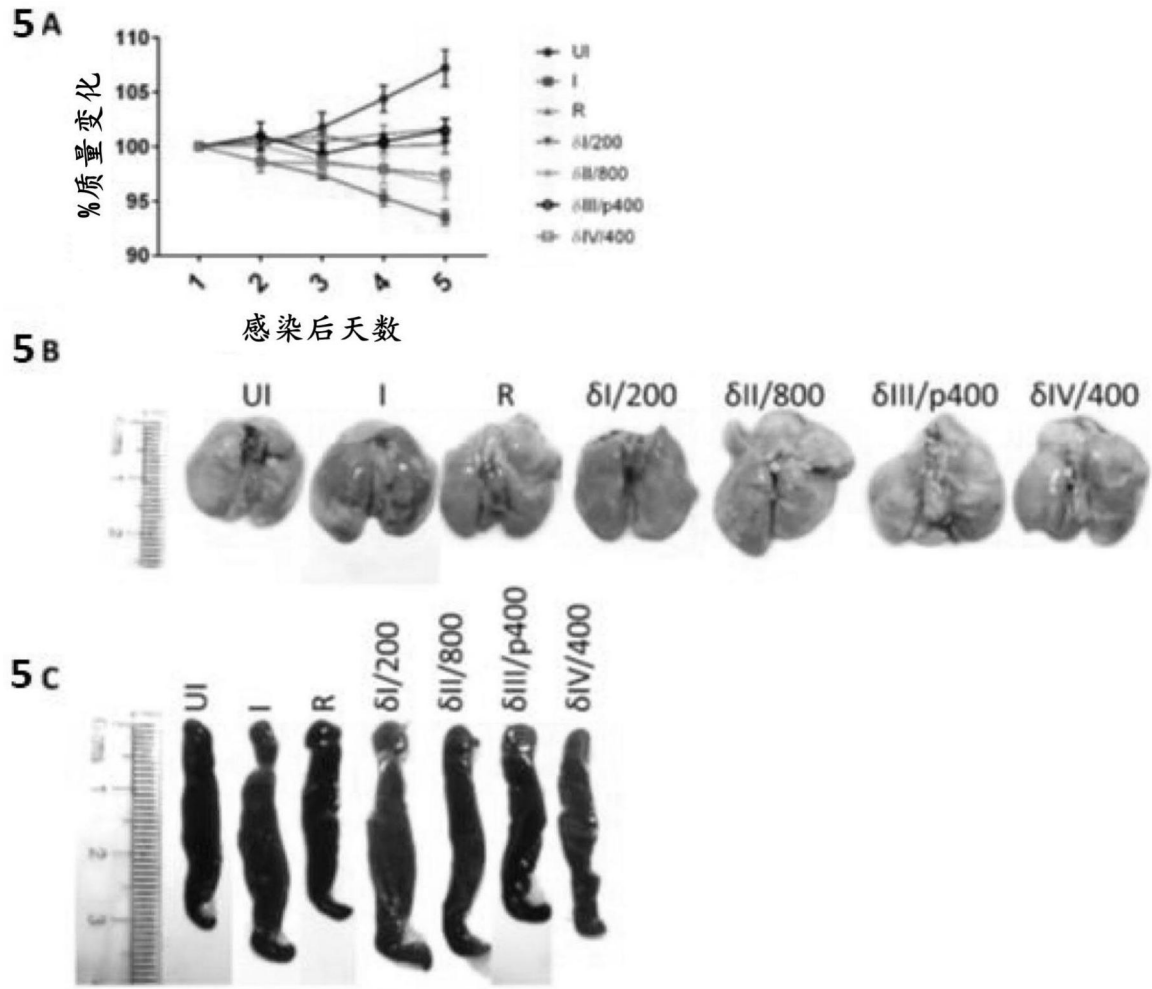


图5

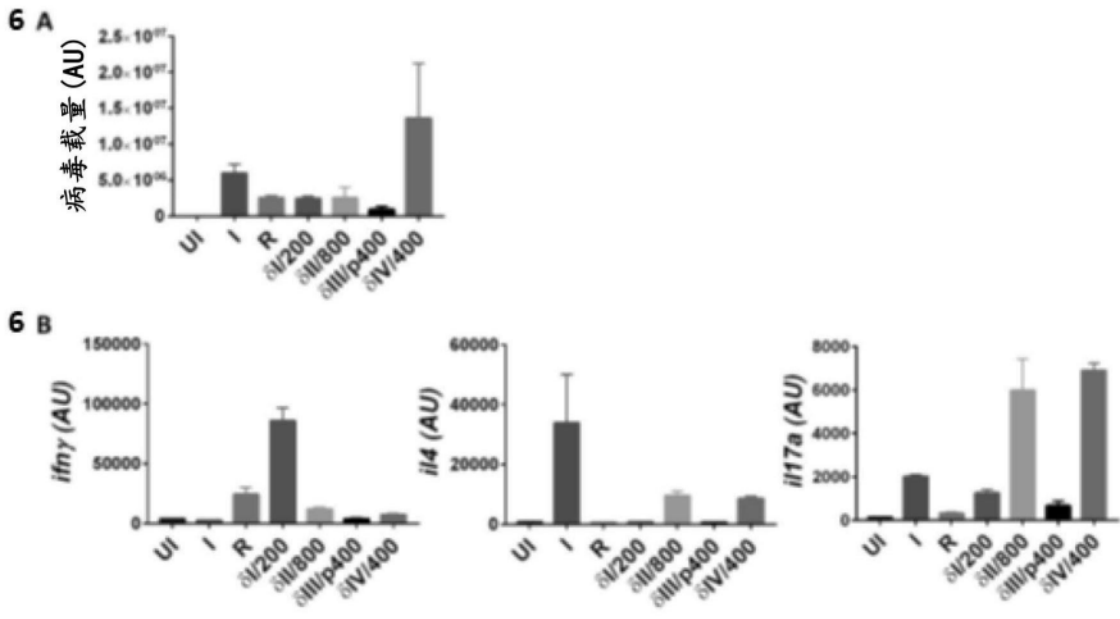


图6

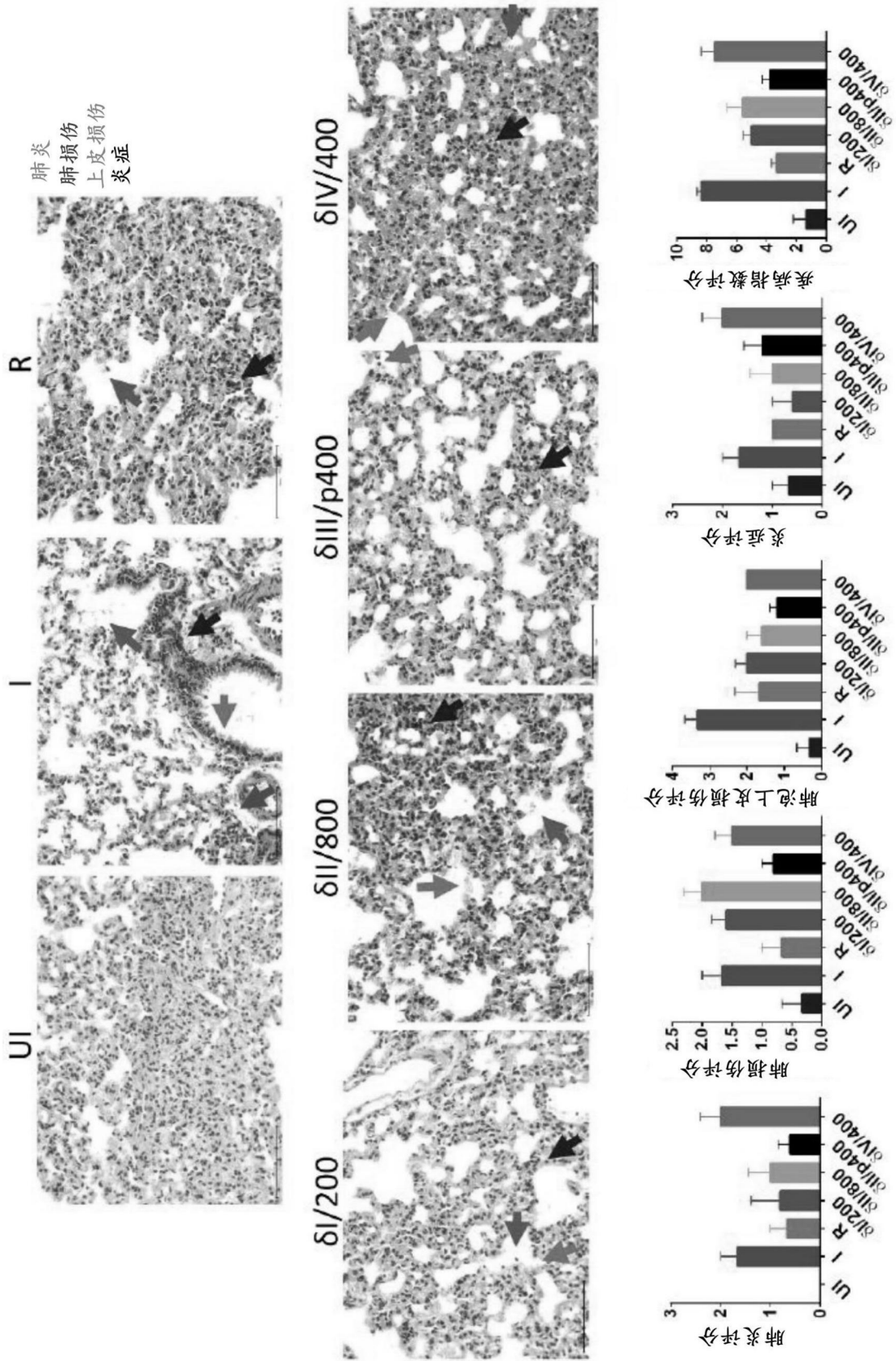


图7