



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106420740 A

(43)申请公布日 2017. 02. 22

(21)申请号 201610416182.X

(74)专利代理机构 广州三环专利代理有限公司

(22)申请日 2010.02.22

44202

代理人 温旭 郝传鑫

(30)优先权数据

61/202,367 2009.02.23 US

61/272,255 2009.09.04 US

(51)Int.Cl.

A61K 31/445(2006.01)

A61P 31/12(2006.01)

C07D 211/46(2006.01)

(62)分案原申请数据

201080017591.3 2010.02.22

(71)申请人 伊莫根特病毒学有限责任公司

地址 美国马里兰州

申请人 牛津大学之校长及学者

(72)发明人 厄本·拉姆斯泰特

布伦南·克洛斯 妮科尔·齐兹曼

雷蒙德·A·德韦克

特里·D·巴特斯

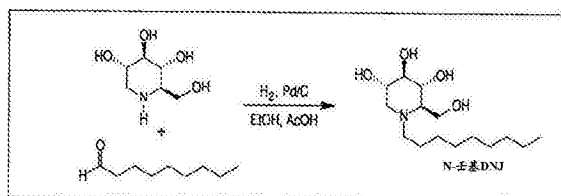
权利要求书2页 说明书11页 附图12页

(54)发明名称

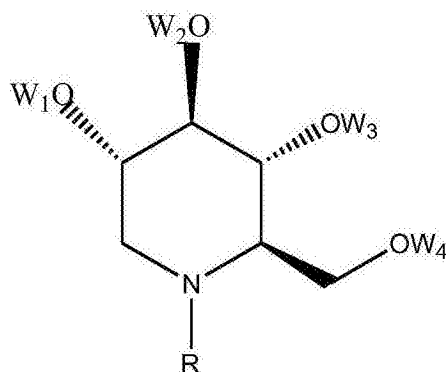
亚氨基糖以及治疗病毒性疾病的方法

(57)摘要

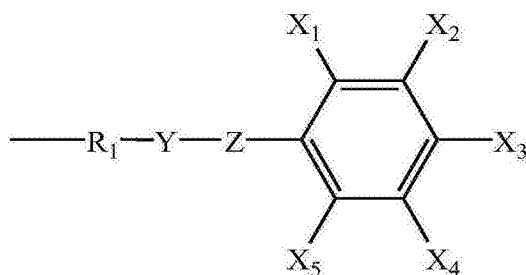
本发明提供使用亚氨基糖治疗或预防由登革病毒引起或与登革病毒有关的病毒感染的方
法。



1. 一种治疗或预防登革病毒感染的方法,所述方法包括将有效量的下式化合物或其药学上可接受的盐给药于有此需要的受治者,



其中,R是取代或未取代的烷氧基,或其中,R是



R₁是烷氧基;

X₁₋₅独立地选自H、NO₂、N₃或NH₂;

Y缺失或为取代或未取代的C₁-烷基,除羰基之外;并且

Z选自化学键或NH;在Z为化学键的条件下,Y缺失,在Z为NH的条件下,Y为取代或未取代的C₁-烷基,除羰基之外;

并且

其中,W₁₋₄独立地选自氢、取代或未取代的烷基、取代或未取代的卤代烷基、取代或未取代的烷酰基、取代或未取代的芳酰基或者取代或未取代的卤代烷酰基。

2. 如权利要求1所述的方法,其中,W₁、W₂、W₃和W₄中的每一个为氢。

3. 如权利要求1所述的方法,其中,R为烷氧基。

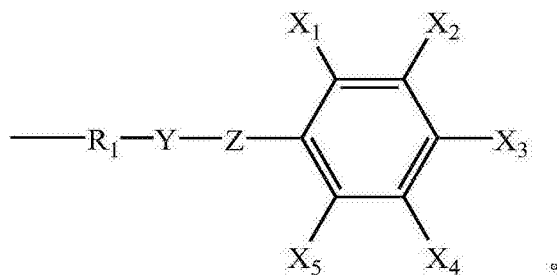
4. 如权利要求1所述的方法,其中,R为含有1至3个氧原子的C₂-C₁₆烷氧基。

5. 如权利要求1所述的方法,其中,R为含有1至2个氧原子的C₆-C₁₂烷氧基。

6. 如权利要求1所述的方法,其中,所述化合物为N-(7-癸氧基)脱氧野尻霉素或其药学上可接受的盐。

7. 如权利要求1所述的方法,其中,所述化合物为N-(9-甲氧基壬基)脱氧野尻霉素或其药学上可接受的盐。

8. 如权利要求1所述的方法,其中,R为



9. 如权利要求8所述的方法,其中,X₁为NO₂并且X₃为N₃。
10. 如权利要求8所述的方法,其中,X₂、X₄和X₅中的每一个为氢。
11. 如权利要求1所述的方法,其中,所述化合物为N-(N-{4'-叠氮-2'-硝基苯基}-6-氨基己基)脱氧野尻霉素或其药学上可接受的盐。
12. 如权利要求1所述的方法,其中,所述病毒感染由登革2型病毒引起或与登革2型病毒有关。
13. 如权利要求1所述的方法,其中,所述受治者是哺乳动物。
14. 如权利要求1所述的方法,其中,所述受治者是人类。
15. 如权利要求1所述的方法,其中,所述给药预防所述受治者中的登革感染。
16. 如权利要求15所述的方法,其中,R为烷氧基。
17. 如权利要求15所述的方法,其中,R为含有1至3个氧原子的C₂-C₁₆烷氧基。
18. 如权利要求15所述的方法,其中,R为含有1至2个氧原子的C₆-C₁₂烷氧基。
19. 如权利要求15所述的方法,其中,所述化合物为N-(9-甲氧基壬基)脱氧野尻霉素或其药学上可接受的盐。

亚氨基糖以及治疗病毒性疾病的方法

[0001] 本申请为2011年10月20日进入中国国家阶段、申请号为201080017591.3、申请日为2010年2月22日、发明名称为“亚氨基糖以及治疗病毒性疾病的方法”的发明专利申请的分案申请。

[0002] 相关申请

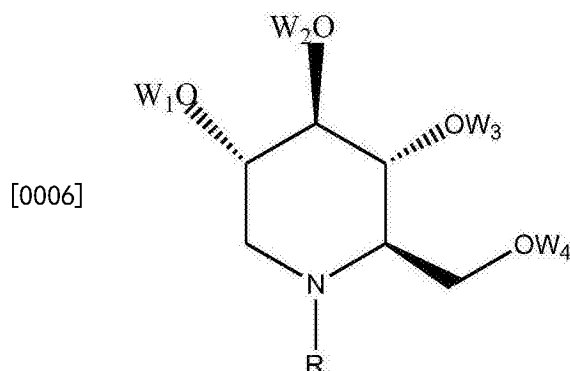
[0003] 本申请要求2009年2月23日提交的美国临时申请第61/202,367号的优先权和2009年9月4日提交的美国临时申请第61/272,255号的优先权,上述美国临时申请的全部内容通过引用并入本文。

技术领域

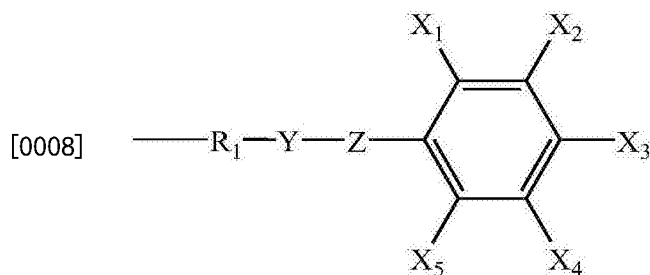
[0004] 本申请涉及亚氨基糖和用亚氨基糖治疗或预防病毒感染的方法,具体而言,本申请涉及亚氨基糖以及治疗或预防与登革(Dengue)病毒有关的病毒感染的方法。

发明内容

[0005] 治疗或预防登革病毒感染的方法包括将有效量的下式化合物或其药学上可接受的盐给药于有此需要的受治者,



[0007] 其中,R为取代或未取代的烷氧基(oxaalkyl);或其中,R是



[0009] R_1 是烷氧基;

[0010] X_{1-5} 独立地选自H, NO_2 , N_3 或 NH_2 ;

[0011] Y缺失或为取代或未取代的 C_1 -烷基(除羰基之外);以及

[0012] Z选自化学键或NH;在Z为化学键的条件下,Y缺失;在Z为NH的条件下,Y为取代或未取代的 C_1 -烷基(除羰基之外);并且

[0013] 其中, W_{1-4} 独立地选自氢、取代或未取代的烷基、取代或未取代的卤代烷基、取代或

未取代的烷基基、取代或未取代的芳基基或取代或未取代的卤代烷基基。

附图说明

[0014] 图1A至图1E表示下列亚氨基糖的化学通式：A) N-丁基-脱氧野尻霉素 (NB-DNJ或UV-1)；B) N-壬基脱氧野尻霉素 (NN-DNJ或UV-2)；C) N-(7-癸氧基)脱氧野尻霉素 (N7-O-DNJ或N7-DNJ或UV-3)；D) N-(9-甲氧基壬基)脱氧野尻霉素 (N9-DNJ或UV-4)；E) N-(N-{4'-叠氮-2'-硝基苯基}-6-氨基己基)脱氧野尻霉素 (NAP-DNJ或UV-5)。

[0015] 图2是表示通过NB-DNJ, NN-DNJ和N7-O-DNJ使细胞不受登革病毒感染的曲线。

[0016] 图3是NB-DNJ, NN-DNJ和N7-O-DNJ的细胞毒性的曲线图。

[0017] 图4是NN-DNJ的合成示意图。

[0018] 图5A至图5D是N7-O-DNJ的合成示意图。具体而言,图5A表示通过一系列反应生成N7-O-DNJ;图5B举例说明制备6-丙氧基-1-己醇;图5C举例说明制备6-丙氧基-1-己醛;图5D举例说明合成N7-O-DNJ。

[0019] 图6A至图6C涉及N-(9-甲氧基壬基)脱氧野尻霉素的合成。具体而言,图6A举例说明制备9-甲氧基-1-壬醇;图6B举例说明制备9-甲氧基-1-壬醛;图6C举例说明合成N-(9-甲氧基壬基)脱氧野尻霉素。

[0020] 图7表示N7-O-DNJ、N9-DNJ和NAP-DNJ抑制登革病毒释放的数据。

[0021] 图8是表示NB-DNJ (UV-1)、NN-DNJ (UV-2)、N7-O-DNJ (UV-3)、N9-DNJ (UV-4)和NAP-DNJ (UV-5)针对登革病毒的IC₅₀值的表格。

[0022] 图9表示下列UV亚氨基糖化合物抑制登革病毒释放的数据：NB-DNJ (UV-1)、NN-DNJ (UV-2)、N7-O-DNJ (UV-3)、N9-DNJ (UV-4)和NAP-DNJ (UV-5)。

[0023] 图10表示通过UV-4 (N9-DNJ)使小鼠不受登革病毒感染。

[0024] 图11A至图11C表示通过UV-4 (N9-DNJ)使小鼠不受登革病毒感染。

具体实施方式

[0025] 术语的定义

[0026] 除非另有说明,单数形式(“a”或“an”)是指一个(一种)或一个以上(一种以上)。

[0027] 如本文使用的术语“病毒感染”描述了疾病状态,其中,病毒入侵健康细胞,使用所述细胞的再生机制以繁殖或复制并且最终溶解所述细胞导致所述细胞死亡,释放病毒颗粒以及通过新产生的子代病毒感染其他细胞。一些病毒的潜伏性感染也可能是由病毒感染引起的。

[0028] 如本文使用的术语“治疗或预防病毒感染”是指抑制特定病毒的复制,抑制病毒传播或防止病毒在宿主中自身建立以及改善或缓解由病毒感染所引起的疾病症状。如果病毒载荷降低,那么,认为所述治疗在治疗上降低了死亡率和/或发病率。

[0029] IC₅₀或IC₉₀(50或90抑制浓度)分别是诸如亚氨基糖之类的治疗剂的浓度,所述浓度用于实现使病毒感染降低50%或90%。

[0030] 相关申请

[0031] 本申请通过引用并入2009年2月23日提交的美国临时申请第61/202,367号的全部内容。

[0032] 公开的内容

[0033] 本发明的发明人发现诸如脱氧野尻霉素衍生物之类的一些亚氨基糖可有效对抗登革1-4病毒。

[0034] 具体而言,亚氨基糖可用于治疗或预防由登革1-4病毒引起的或与登革1-4病毒有关的疾病或病症。在一些实施方式中,所述亚氨基糖可增加感染了登革病毒的受治者的存活率或存活可能性。

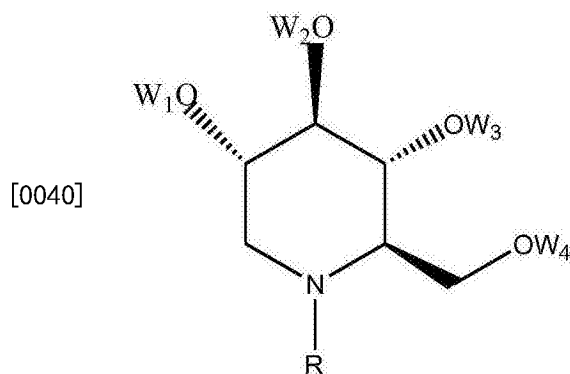
[0035] 登革病毒

[0036] 登革病毒属于黄病毒家族的黄病毒属并且导致登革出血热(DHF)。登革病毒包括四种紧密相关的血清型,通常称为登革1型、登革2型、登革3型和登革4型。从一种登革病毒感染中痊愈提供了对这种病毒的血清型的终身免疫,但是针对由其他三种病毒引起的感染仅仅赋予部分和暂时的预防。存在下述有力证据:连续感染增加了患上更加严重的疾病的风险,导致DHF。在美国和亚洲,急性DHF传染病正受到越来越多的关注,在美国和亚洲所有四种登革病毒都是地方病。在一些国家,DHF已成为儿童中住院治疗和死亡的主要病因。2007年,在美国报道了超过890,000个登革病例,其中26,000个病例是DHF。

[0037] 登革主要通过埃及伊蚊(*Aedes aegypti* mosquito)传播并且是最常见的人类蚊传播病毒疾病。全球有25亿人—全球人口的40%—生活在温暖地区,在该温暖地区中,埃及伊蚊是常见的并且可传播登革病毒。热带城市的快速发展及其人口和蚊子种群的快速增长正在使得更多人与传染媒介接触。蚊媒和病毒这两者的地理学上的扩散已导致流行性登革热和急性登革出血热(DHF)的全球复苏。

[0038] 亚氨基糖

[0039] 在一些实施方式中,亚氨基糖可以是N-取代的脱氧野尻霉素。在一些实施方式中,N-取代的脱氧野尻霉素可以是下式化合物:



[0041] 其中, W_{1-4} 独立地选自氢、取代或未取代的烷基、取代或未取代的卤代烷基、取代或未取代的烷酰基、取代或未取代的芳酰基或者取代或未取代的卤代烷酰基。

[0042] 在一些实施方式中,R选自取代或未取代的烷基、取代或未取代的环烷基、取代或未取代的芳基或者取代或未取代的烷氧基。

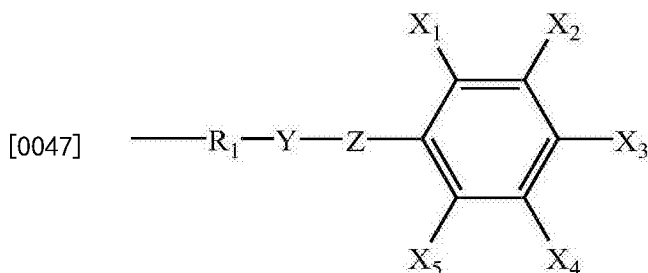
[0043] 在一些实施方式中,R可以是包含1至16个碳原子、4至12个碳原子或8至10个碳原子的取代或未取代的烷基和/或取代或未取代的烷氧基。术语“烷氧基”是指烷基衍生物,所述烷氧基可含有1至5个或1至3个或1至2个氧原子。术语“烷氧基”包括羟基为末端和甲氧基为末端的烷基衍生物。

[0044] 在一些实施方式中,R选自但不限于: $-(CH_2)_6OCH_3$, $-(CH_2)_6OCH_2CH_3$, $-(CH_2)_6O$

$(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$, $-(\text{CH}_2)_6\text{O}(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$, $-(\text{CH}_2)_2\text{O}(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$, $-(\text{CH}_2)_2\text{O}(\text{CH}_2)_6\text{CH}_3$, $-(\text{CH}_2)_2\text{O}(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$, $-(\text{CH}_2)_9\text{OH}$, $-(\text{CH}_2)_9\text{OCH}_3$ 。

[0045] 在一些实施方式中,R可以是分支的或未分支的、取代的或未取代的烷基。在一些实施方式中,烷基可以是长链烷基,所述烷基可以是C6-C20烷基;C8-C16烷基或C8-C10烷基。在一些实施方式中,R可以是长链烷氧基,即,可含有1至5个或1至3个或1至2个氧原子的长链烷基。

[0046] 在一些实施方式中,R可具有下式:



[0048] 其中, R_1 是取代或未取代的烷基;

[0049] X_{1-5} 独立地选自H、 NO_2 、 N_3 或 NH_2 ;

[0050] Y缺失或为取代或未取代的 C_1 -烷基(除羰基之外);并且

[0051] Z选自化学键或NH;在Z为化学键的条件下,Y缺失,在Z为NH的条件下,Y为取代或未取代的 C_1 -烷基(除羰基之外)。

[0052] 在一些实施方式中,Z是NH并且 R_1 -Y是取代或未取代的烷基,例如,C2-C20烷基或C4-C12烷基或C4-C10烷基。

[0053] 在一些实施方式中, X_1 是 NO_2 且 X_3 是 N_3 。在一些实施方式中, X_2 、 X_4 和 X_5 中的每一个是氢。

[0054] 在一些实施方式中,所述亚氨基糖可以是在美国专利申请公开第2007/0275998号中公开的DNJ衍生物,该美国专利申请公开通过引用并入本文。

[0055] 在一些实施方式中,所述亚氨基糖可以是图1所示的化合物中的一种。诸如脱氧野尻霉素衍生物之类的亚氨基糖可如下列美国专利或美国专利申请公开中所公开的来合成,例如,美国专利第5,622,972号,第5,200,523号,第5,043,273号,第4,994,572号,第4,246,345号,第4,266,025号,第4,405,714号,和第4,806,650号,以及美国专利申请公开US2007/0275998,上述美国专利或美国专利申请公开的全部内容通过引用并入本文。

[0056] 在一些实施方式中,所述亚氨基糖可以从无机酸或有机酸获得的盐的形式。药学上可接受的盐以及盐形式的制备方法在例如Berge等人(J.Pharm.Sci.66:1-18,1977)的文章中公开。合适的盐的例子包括但不限于下列盐:醋酸盐、己二酸盐、藻酸盐、柠檬酸盐、天冬氨酸盐、苯甲酸盐、苯磺酸盐、硫酸氢盐、丁酸盐、樟脑酸盐(camphorate)、樟脑磺酸盐、二葡萄糖酸盐、环戊烷丙酸盐、十二烷基硫酸盐、乙磺酸盐、葡庚酸盐(glucuheptanoate)、甘油磷酸盐、半硫酸盐、庚酸盐、己酸盐、富马酸盐、盐酸盐、氢溴酸盐、氢碘酸盐、2-羟基乙磺酸盐、乳酸盐、马来酸盐、甲磺酸盐、烟酸盐、2-萘磺酸盐、草酸盐、扑酸盐、果胶盐(pectinate)、过硫酸盐、3-苯基丙酸盐、苦味酸盐、新戊酸盐、丙酸盐、琥珀酸盐、酒石酸盐、硫氰酸盐、甲苯磺酸盐、甲磺酸盐和十一酸盐。

[0057] 在一些实施方式中,所述亚氨基糖也可以前药的形式来使用。诸如6-磷酸化DNJ衍

生物之类的DNJ衍生物的前药在美国专利第5,043,273号和第5,103,008号中公开。

[0058] 在一些实施方式中,所述亚氨基糖可用作组合物的一部分,所述组合物还包括药学上可接受的载体和/或用于将组合物递送至动物的组分。本领域已知多种用于将组合物递送至人体的药学上可接受的载体和用于将组合物递送至诸如牛之类的其他动物的组分。将这样的载体和组分加至本发明的组合物中恰好在本领域普通技术人员的水平之内。

[0059] 在一些实施方式中,药物组合物可基本上由亚氨基糖构成,这可意味着 亚氨基糖是组合物中唯一的活性成分。

[0060] 而在一些实施方式中,所述亚氨基糖可与一种或一种以上额外的抗病毒化合物一同给药。

[0061] 在一些实施方式中,所述亚氨基糖可在脂质体组合物中使用,所述脂质体组合物例如,美国专利申请公开第2008/0138351号、2009年3月25日提交的美国申请第12/410,750号以及2009年3月27日提交的美国临时申请第61/202,699号中所公开的那些脂质体组合物。

[0062] 所述亚氨基糖可给药于受病毒感染的细胞或个体。所述亚氨基糖可抑制病毒的形态发生或它可治疗个体。所述治疗可降低、减轻或消除动物中的病毒感染。可被登革病毒感染的动物包括诸如哺乳动物之类的脊椎动物,所述哺乳动物包括啮齿动物和灵长类动物,所述灵长类动物包括人类。

[0063] 本发明的方法中,给药于动物或动物细胞的亚氨基糖的量可以是有效抑制细胞中的登革病毒的形态发生的量。本文使用的术语“抑制”可以是指可检测的降低和/或消除在不存在亚氨基糖的条件下所表现出的生物活性。术语“有效量”可以是指为了实现所说明的效果所必需的亚氨基糖的量。本文使用的术语“治疗”可以是指减轻或缓解受治者的症状、预防症状恶化或加重、抑制或消除病原体或在未患病的受治者中预防与登革病毒有关的感染或失调。

[0064] 因此,例如,由登革病毒引起的或与登革病毒有关的感染的治疗可包括破坏传染原、抑制或干扰传染原的生长或成熟以及中和传染原的病理学作用。可给药于细胞或动物的亚氨基糖的量优选为不诱导任何毒性作用的量,所述毒性作用比所述亚氨基糖的给药所伴随的优势更重要。药物组合物中活性成分的实际剂量水平可不同,以使得对于特定患者而言,给药有效实现期望的治疗响应的活性化合物的量。

[0065] 选择的剂量水平可取决于亚氨基糖的活性、给药途径、所治疗的病症的严重性、病症以及所治疗的患者先前的药物历史。然而,本领域技术人员以低于实现期望的治疗效果所需的剂量水平为化合物的起始剂量并且逐渐增加剂量直至实现期望的效果。如果需要的话,每日有效剂量可根据给药目的分为多个剂量,例如,每天两个剂量至四个剂量。然而,可理解的是,任何特定患者的具体剂量水平可取决于包括体重、一般健康水平、饮食、给药时间和途径以及与其他治疗剂的联合、所治疗的病症或疾病的严重性在内的多种因素。成年人每日剂量可为约1mg亚氨基糖/10kg体重至约1g亚氨基糖/10kg体重或约10mg亚氨基糖/10kg体重至100mg亚氨基糖/10kg体重。当然,应当给药于细胞或动物的亚氨基糖的量可取决于本领域技术人员已经理解的多种因素,例如,亚氨基糖的分子量以及给药途径。

[0066] 在本发明的方法中有用的药物组合物可以口服固体剂型、眼用剂型、栓剂、气雾剂、局部剂型或其他类似剂型全身给药。例如,所述药物组合物可以是以下物理形式:粉末、

片剂、胶囊、锭剂、凝胶、溶液、悬浮液、糖浆,等等。除了亚氨基糖之外,这些药物组合物可含有药学上可接受的载体和其他已知的提高和促进药物给药的成分。其他可能的剂型,例如,纳米颗粒、脂质体再封装的红细胞以及基于免疫学的体系也可用于亚氨基糖的给药。这些药物组合物可通过多种途径给药。本文使用的术语“肠胃外”包括而限于:皮下、静脉内、动脉内、鞘内以及注射和注入技术。举例而言,药物组合物可口服给药、局部给药、肠胃外给药、全身给药或通过肺部途径给药。

[0067] 这些组合物可以单一剂量或多剂量给药,所述多剂量在不同时间施用。因为所述组合物对登革病毒的抑制效果可持续,可调整给药方案,这样阻止病毒繁殖而最低程度地影响宿主细胞。举例而言,可将一定剂量的本发明的组合物每周一次给药于动物,由此阻止病毒繁殖持续整周,而每周一次抑制宿主细胞功能仅仅持续较短时间段。

[0068] 本文所述的实施方式通过下列实施例来进一步举例说明,但不限于下列实施例。

[0069] 实施例

[0070] 1.N-壬基DNJ的合成

[0071] 表1.用于合成NN-DNJ的物质

[0072]	名称	量
	DNJ	500 mg
	壬醛	530 mg
	乙醇	100 mL
[0073]	AcOH	0.5 mL
	Pd/C	500 mg

[0074] 步骤:在室温下,向装配有磁力搅拌器的50-mL、单颈圆底烧瓶中装入DNJ (500mg)、乙醇 (100mL)、壬醛 (530mg) 和乙酸 (0.5mL)。将反应混合物加热至40℃至45℃并且在氮气条件下搅拌30分钟至40分钟。将反应混合物冷却至环境温度并加入Pd/C。由气球中的氢气排空并代替反应烧瓶中的空气。重复该过程三次。最后,在环境温度下搅拌反应混合物过夜。反应的进行由TLC来监测(标记1)。通过硅藻土垫过滤反应混合物并用乙醇洗涤。在真空中浓缩滤液,从而得到粗产物。通过柱层析(230目至400目硅胶)纯化粗产物。二氯甲烷中的甲醇的溶剂梯度(10%至25%)用于从柱上洗脱产物。将含有期望的产物的所有组分合并,在真空中浓缩,从而得到纯产物(420mg)。通过使用薄层硅胶板的薄层层析(TLC)来监测反应完成(洗脱剂,甲醇:二氯甲烷=1:2)。

[0075] 2.N-7-癸氧基DNJ的合成

[0076] 2a.6-丙氧基-1-己醇的合成

[0077] 表2.合成6-丙氧基-1-己醇的物质

[0078]

名称	量
1,6-己二醇	6.00g
1-碘代丙烷	8.63g

叔丁醇钾	5.413mg
THF	140mL

[0079] 步骤:在室温下,向装配有磁力搅拌器的500-mL、单颈圆底烧瓶中装入1,6-己二醇(6.00g)、叔丁醇钾(5.413g)。搅拌反应混合物持续1小时,然后加入1-碘代丙烷(8.63g)。将反应混合物加热至70℃至80℃并搅拌过夜。反应的进行通过TLC来监测(标记1)。反应完成之后,向反应混合物中加入水并用乙酸乙酯(2x100mL)萃取。在真空中浓缩合并的有机层,从而得到粗产物。将粗产物溶于二氯甲烷并用水洗涤、然后盐水洗涤,通过硫酸钠干燥。将有机层在真空中干燥,从而得到粗产物。该粗产物通过使用230目至400目硅胶的柱层析来纯化。己烷中的乙酸乙酯的溶剂梯度(10%至45%)用于从柱上洗脱产物。将含有期望的纯产物的所有组分合并,在真空中浓缩,从而得到纯的6-丙氧基-1-己醇(编号D-1029-048, 1.9g, 25%)。通过薄层层析(TLC)来监测反应完成(洗脱剂:己烷中60%乙酸乙酯)。

[0080] 2b. 6-丙氧基-1-己醛的制备

[0081] 表3. 制备6-丙氧基-1-己醛的物质

[0082]

名称	量
6-丙氧基-1-己醇	1.00g
PDC	4.70g
硅藻土	1.00g
NaOAc	100mg
CH ₂ Cl ₂	10mL

[0083] 步骤:向装配有磁力搅拌器的50-mL、单颈圆底烧瓶中装入6-丙氧基-己醇(1.0g)、PDC(4.7g)、二氯甲烷(10mL)、硅藻土(1.0g)和醋酸钠(100mg)。在室温、氮气条件下搅拌反应混合物持续5分钟。将PDC(4.70g)加至反应混合物中,并搅拌过夜。通过TLC(标记1)来监测反应的进行。反应完成之后,将反应混合物直接加载在柱(230目至400目硅胶)上。乙酸乙酯中的二氯甲烷的溶剂梯度(10%至20%)用于从柱上洗脱产物。将含有期望的纯产物的所有组分合并,在真空中浓缩,从而得到纯的6-丙氧基-1-己醛(编号,D-1029-050, 710mg, 71%)。反应的完成通过薄层层析(TLC)来监测(洗脱剂:己烷中60%乙酸乙酯)。

[0084] 2c. N-7-癸氧基-DNJ的合成

[0085] 表4. 合成N-7-癸氧基-DNJ的物质

[0086]

名称	量
DNJ	500mg
6-丙氧基-1-己醛	585mg
Pd/C	125mg
乙醇	15mL
乙酸	mL

[0087] 步骤:室温下,向装配有磁力搅拌器的50-mL、单颈圆底烧瓶中装入DNJ(500mg)、乙醇(15mL)、6-丙氧基-1-己醛(585mg)和乙酸(0.1mL)。将反应混合物加热至40℃至45℃并在氮气条件下搅拌30分钟至40分钟。将反应混合物冷却至环境温度并加入Pd/C。由气球中的

氢气排空并代替反应烧瓶中的空气。重复该过程三次。最后,在环境温度下搅拌反应混合物过夜。通过TLC(标记1)来监测反应的进行。通过硅藻土垫过滤反应混合物并用乙醇洗涤。在真空中浓缩滤液,从而得到粗产物。粗产物通过柱层析(230目至400目硅胶)来纯化。二氯甲烷中的甲醇的溶剂梯度(10%至40%)用于从柱上洗脱产物。合并含有期望的产物的所有组分并在真空中浓缩,从而得到纯的产物。(编号,D-1029-052(840mg))。通过薄层层析(TLC)来监测反应完成(洗脱剂:二氯甲烷中50%甲醇)。

[0088] 3.N-(9-甲氧基)-壬基DNJ的合成

[0089] 3a.9-甲氧基-1-壬醇的制备

[0090] 表5.制备9-甲氧基-1-壬醇的物质

[0091]

名称	量
1,9-壬二醇	10.0g
硫酸二甲酯	41.39g
氢氧化钠	5.0g
DMSO	100mL

[0092] 步骤:向装配有磁力搅拌器和搅拌棒的500-mL、单颈圆底烧瓶中装入溶于二甲亚砜(100mL)和水(100mL)中的1,9-壬二醇(10.00g,62.3mmol)。在室温下,向上述圆底烧瓶中缓慢加入氢氧化钠(5.0g,125.0mmol)的水(10mL)溶液。在加入氢氧化钠的过程中,反应混合物放热并且温度上升至约40℃。搅拌混合物1小时,然后将硫酸二甲酯(16.52g,131mmol)分为四份加入,同时保持反应混合物的温度为约40℃。在室温下搅拌反应混合物过夜。反应的进行通过TLC(标记1)来监测。TLC监测表明反应为25%转化。在这个阶段,加入额外的硫酸二甲酯(24.78g,196.44mmol)并在室温下再搅拌得到的混合物24小时。反应完成之后,将氢氧化钠(10%水溶液)加至反应混合物中以调节溶液的pH值为11至13。在室温下搅拌混合物2小时并用二氯甲烷(3x100mL)萃取。用H₂O(200mL)、盐水(150mL)洗涤合并的有机层,通过无水硫酸钠(20g)干燥,过滤,在真空中浓缩,从而得到粗产物(14g)。通过使用250目至400目硅胶的柱层析来纯化粗产物。己烷中的乙酸乙酯的溶剂梯度(10%至50%)用于从柱上洗脱产物。合并含有期望的纯产物的所有组分并在真空中浓缩,从而得到纯的9-甲氧基-1-壬醇(编号,D-1027-155,2.38g,21.9%)。反应的完成通过使用薄层硅胶平板的薄层层析(TLC)来监测,洗脱剂:己烷中60%的乙酸乙酯。

[0093] 3b.9-甲氧基-1-壬醛的制备

[0094] 表6.制备9-甲氧基-1-壬醛的物质

[0095]

名称	量
9-甲氧基-1-壬醇	1.0g
PDC	4.7g
分子筛,3A	1.0g
NaOAc	0.1g
CH ₂ Cl ₂	10mL

[0096] 步骤:在室温下,向装配有磁力搅拌器和搅拌棒的50-mL、单颈圆底烧瓶中装入9-

甲氧基-壬醇 (1.0g, 5.9mmol)、二氯甲烷 (10mL)、分子筛 (1.0g, 3A)、醋酸钠 (0.1g)。在室温、氮气条件下搅拌反应混合物5分钟。向反应混合物中加入重铬酸吡啶 (4.7g, 12.5mmol) 并搅拌过夜。反应的进行通过TLC (标记1) 来监测。反应完成之后, 通过硅胶床 (约15g) 来过滤反应混合物。真空中蒸发滤液, 从而得到粗化合物。该化合物通过使用硅胶柱 (250目至400目, 40g) 的柱层析来纯化。己烷中的乙酸乙酯的溶剂梯度 (10%至50%) 用于从柱上洗脱产物。合并含有期望的纯产物的所有组分并在真空中浓缩, 从而得到纯的9-甲氧基-壬醛 (编号, D-1027-156, 553mg, 54.4%)。反应的完成通过使用薄层硅胶平板的薄层层析 (TLC) 来监测, 洗脱剂: 己烷中60%乙酸乙酯。

[0097] 3c. N-(9-甲氧基)-壬基DNJ的合成

[0098] 表7. 合成N-(9-甲氧基)-壬基DNJ的物质

[0099]

名称	量
DNJ	300mg
9-甲氧基-1-壬醛	476mg
Pd/C	200mg
乙醇	20mL

[0100] 步骤: 室温下, 向装配有磁力搅拌器和搅拌棒的50-mL、双颈圆底烧瓶中装入DNJ (300mg, 1.84mmol)、乙醇 (20mL)、9-甲氧基-1-壬醛 (476mg, 2.76mmol)。在氮气条件下搅拌反应混合物5分钟至10分钟并在室温下加入Pd/C。由气球中的氢气排空并代替反应混合物中的空气。重复该过程三次, 然后在室温、大气氢气条件下搅拌反应混合物。反应的进行通过TLC (标记1) 来监测。反应混合物通过硅藻土床来过滤并用乙醇 (20mL) 洗涤。在真空中浓缩滤液, 从而得到粗产物。粗产物通过使用250目至400目硅胶 (20g) 的柱层析来纯化。乙酸乙酯中的甲醇的溶剂梯度 (5%至25%) 用于从柱上洗脱产物。合并含有期望的纯产物的所有组分, 并在真空中浓缩, 从而得到灰白色固体。将所述固体在乙酸乙酯 (20mL) 中研碎, 过滤并在高真空下干燥, 从而得到白色固体 (编号: D-1027-158 (165.3mg, 28.1%))。反应的完成通过使用薄层硅胶平板的薄层层析 (TLC) 来监测; 洗脱剂: 二氯甲烷中50%甲醇。

[0101] 4. 亚氨基糖对登革病毒的作用

[0102] 图2表示NB-DNJ、NN-DNJ和N7-O-DNJ保护细胞不受登革病毒感染。

[0103] 步骤。病毒诱导的细胞病理效应 (CPE) - 抑制分析在浓度为0.122uM至500uM的UV化合物上进行。

[0104] 筛选抑制2型登革病毒 (DENV2) (菌株New Guinea C) 的化合物。病毒原液通过使用1x改良的Eagle培养基 (MEM, Gibco), 在Vero细胞中的繁殖来制备, 所述培养基补充了2%胎牛血清、2mM L-谷氨酸、100U/ml青霉素、100ug/ml链霉素, 并且所述病毒原液使用标准噬菌斑法来滴定。将病毒原液储存于-80℃待用。

[0105] 在测试之前24小时, 将获自美国典型培养物收藏中心 (ATCC, Manassas, Virginia) 的Vero细胞 (非洲绿猴肾上皮细胞系) 接种于37℃条件下, 5%CO2培养箱中的细胞培养基处理的96孔平底平板中。测试在改良的Eagle培养基上进行, 所述培养基补充了2%胎牛血清、2mM L-谷氨酸、100U/ml青霉素、100ug/ml链霉素, 所述测试开始于500uM化合物, 降低至0.122uM化合物。在测试日, 将培养基吸出并用各种浓度的化合物处理细胞。在37℃, 药物预

处理1小时之后,将具有低感染复数(MOI)的登革病毒加至细胞。感染之后1小时,洗涤细胞并加入含有化合物的培养基。使所述分析在37℃下、5%CO₂的培养箱中进行6天,这6天过程中未处理的、病毒感染的对照孔表示为CPE。在后感染期间之后,从平板中除去培养基上清液并根据生产商的用于病毒诱导的细胞损伤(释放胞浆酶乳酸脱氢酶)的说明,通过LDH分析(CytoTox96,Promega,WI)进行测试。OD读数用于估算和比较用化合物处理的细胞或对照的细胞病理效应百分数。实验表明UV化合物以剂量依赖的方式在保护细胞不被登革病毒杀死方面有效。

[0106] 图3说明了NB-DNJ、NN-DNJ和N7-O-DNJ的细胞毒性数据。

[0107] 步骤。测试浓度为0.122uM至500uM的NB-DNJ、NN-DNJ和N7-O-DNJ对Vero细胞的细胞毒性。在分析之前24小时,将获自美国典型培养物收藏中心(ATCC,Manassas,Virginia)的Vero细胞(非洲绿猴肾上皮细胞系)接种在细胞培养基处理的96孔平底平板中。测试在改良的Eagle培养基上进行,所述培养基补充了2%胎牛血清、2mM L-谷氨酸、100U/ml青霉素、100ug/ml链霉素,所述测试开始于500μM化合物,降低至0.122uM化合物。在37℃下、5%CO₂培养箱中培养细胞并根据生产商的用于诱导的细胞损伤(释放胞浆酶乳酸脱氢酶)的说明,通过LDH分析(CytoTox96,Promega,WI)对平板接种物进行测试。OD读数用于估算和比较用化合物处理的细胞或对照的细胞病理效应百分数。实验表明N7-O-DNJ和NB-DNJ对Vero细胞没有毒性。NN-DNJ在浓度大于约20uM条件下开始对细胞表现出毒性。

[0108] 图7表示N7-O-DNJ、N9-DNJ和NAP-DNJ抑制登革病毒释放的数据。

[0109] 步骤。用病毒感染对照Vero细胞培养物和用100uM化合物处理的Vero细胞培养物并在37℃下、5%CO₂培养箱中培养7天。对用化合物处理的病毒感染的细胞培养物中的感染性病毒颗粒的产量的抑制通过噬菌斑法来确定。

[0110] 病毒噬菌斑法在1x改良的Eagle培养基(Gibco)中、以5x10⁵细胞/孔的浓度接种于6孔平板中的Vero细胞中进行,所述培养基补充了2%胎牛血清、2mM L-谷氨酸、100U/ml青霉素、100ug/ml链霉素。将从化合物处理的感染的细胞培养物中收集的上清液中的待滴定的病毒稀释于细胞培养基中,以100μl的体积接种于细胞上并使其在37℃下吸附1小时。用含0.6%的琼脂的1x改良的Eagle培养基(Gibco)覆盖细胞,所述培养基补充了2mM谷氨酸、100U/ml青霉素、100ug/ml链霉素。使代表已感染并杀死细胞的单个感染性病毒颗粒的死亡细胞的噬菌斑在37℃下、5%CO₂培养箱中生长并通过中性红对细胞单层进行活体染色使所述噬菌斑显现。实验表明感染性登革病毒的释放在用UV亚氨基糖化合物处理之后显著降低。

[0111] 图9表示下列UV亚氨基糖化合物抑制登革病毒释放的数据,所述UV亚氨基糖化合物为:NB-DNJ(UV-1)、NN-DNJ(UV-2)、N7-O-DNJ(UV-3)、N9-DNJ(UV-4)、NAP-DNJ(UV-5)。对照Vero细胞培养物和用所显示的浓度的UV化合物处理的Vero细胞培养物被病毒感染并在37℃、5%CO₂培养箱中培养7天。对用化合物处理的病毒感染的细胞培养物中的感染性病毒颗粒的产量的抑制通过噬菌斑法来确定。病毒噬菌斑法在1x改良的Eagle培养基(Gibco)中、以5x10⁵细胞/孔的浓度接种于6孔平板中的Vero细胞中进行,所述培养基补充了2%胎牛血清、2mM L-谷氨酸、100U/ml青霉素、100ug/ml链霉素。将从化合物处理的感染的细胞培养物中收集的上清液中的待滴定的病毒稀释于细胞培养基中,以100μl体积接种于细胞上并使其在37℃下吸附1小时。用含0.6%的琼脂的1x改良的Eagle培养基(Gibco)覆盖细胞,所述

培养基补充了2mM L-谷氨酸、100U/ml青霉素、100ug/ml链霉素。使代表已感染并杀死细胞的单个感染性病毒颗粒的死亡细胞的噬菌斑在37℃下、5%CO₂培养箱中生长并通过中性红对细胞单层进行活体染色来使所述噬菌斑显现。实验表明感染性登革病毒的释放在用UV亚氨基糖化合物处理之后显著降低。

[0112] 图10和图11A至图11C表示保护小鼠不受登革病毒UV-4 (N9-DNJ) 感染。在这个模型中,AG129小鼠是缺乏 α/β 干扰素受体和IFN- γ 受体的129/Sv小鼠,AG129小鼠通过静脉注射感染登革2型菌株S221。感染之后4天至5天,小鼠死于TNF- α 介导的急性/早期死亡,参见,Shresta,S等人,J Virol,2006,80 (20):p.10208-17。每个实验组包括5个性别匹配且5周至6周大的小鼠。在口服给药第一剂量N9-DNJ之后30分钟,通过尾静脉向小鼠静脉注射 10^{11} 的DENV2菌株S221的染色体组等同物。每天两次口服给药200mg/kg、100mg/kg、50mg/kg和10mg/kg的N9-DNJ。每天一次皮下给药100mg/kg抗病毒化合物利巴韦林并且抗病毒化合物利巴韦林与只有PBS的组一起作为阳性对照。将在实验过程中表现出严重疾病(如通过体重损失20%、非常不活泼、表皮褶皱(ruffled coat)或瘫痪来确定)的动物进行安乐死。在所有药物浓度条件下,小鼠表现出在存活率方面统计学上显著改善:100mg/kg ($p=0.002$ vs.PBS) 和10mg/kg ($p=0.034$ vs.PBS)。

[0113] 虽然上述内容涉及具体优选的实施方式,将会理解的是本发明不限于此。本领域普通技术人员会对所公开的实施方式作出各种修改并且这些修改意在本发明的范围内。

[0114] 本发明引用的所有公开出版物、专利申请和专利的全部内容通过引用并入本文。

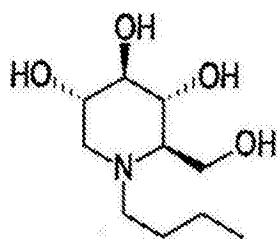


图1A

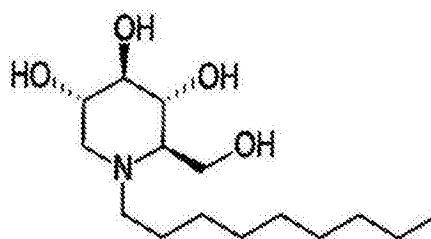


图1B

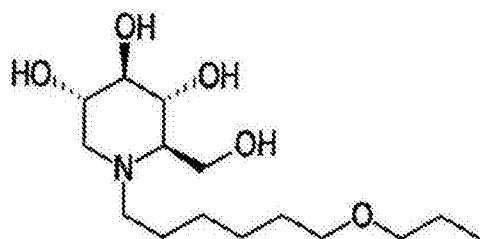


图1C

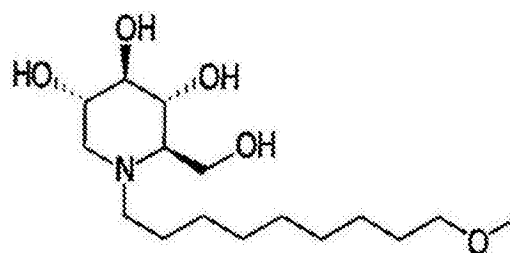


图1D

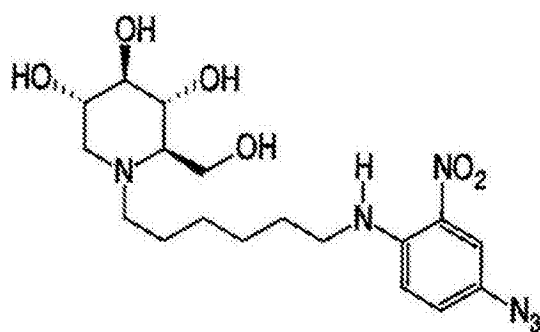


图1E

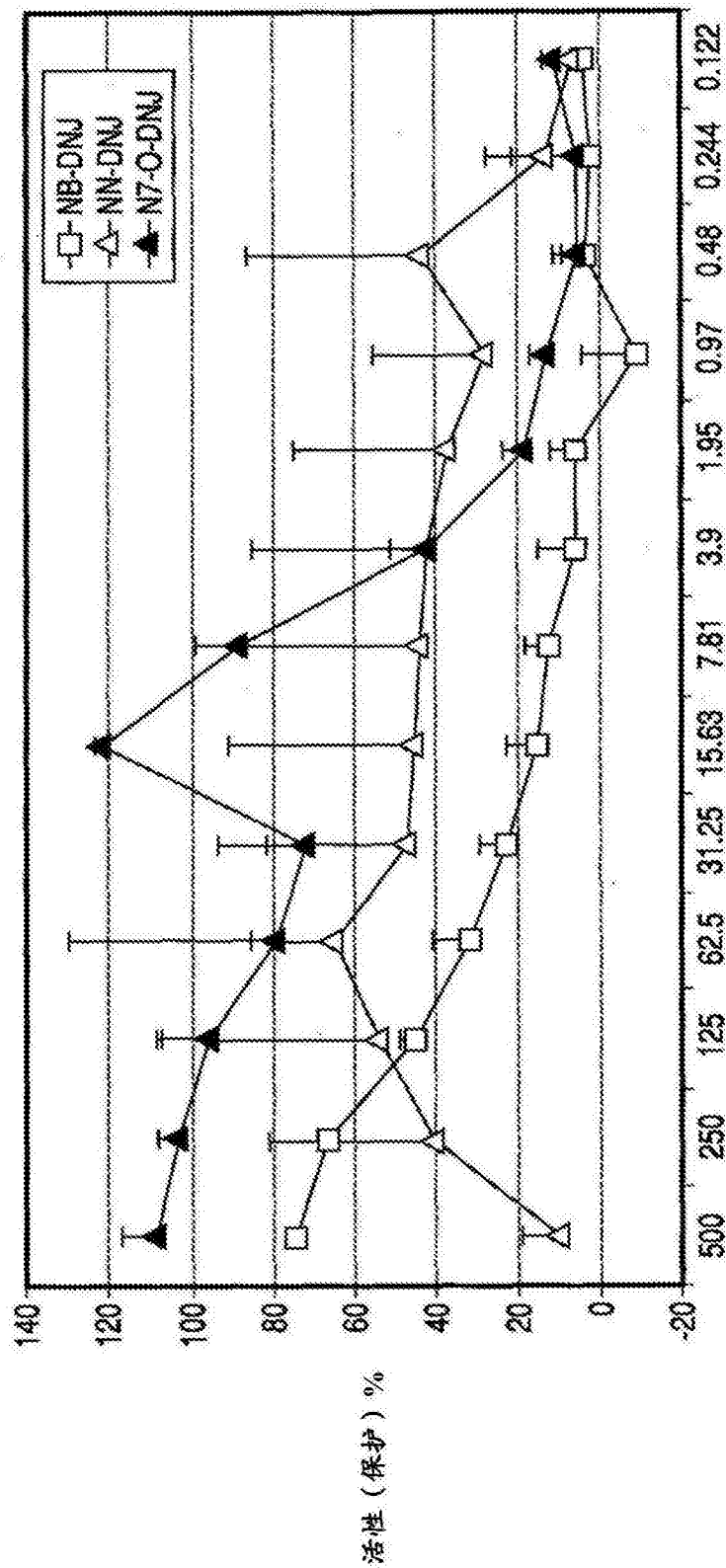


图2

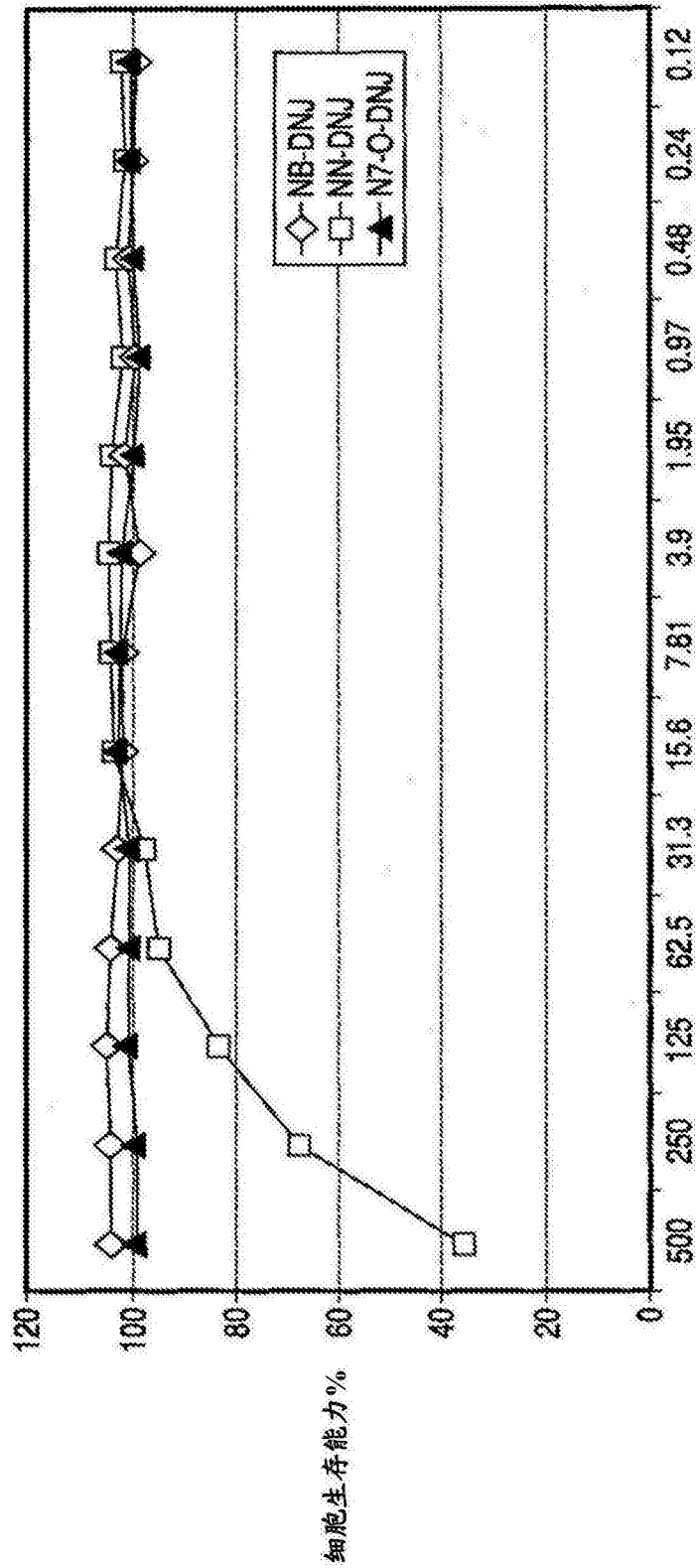


图3

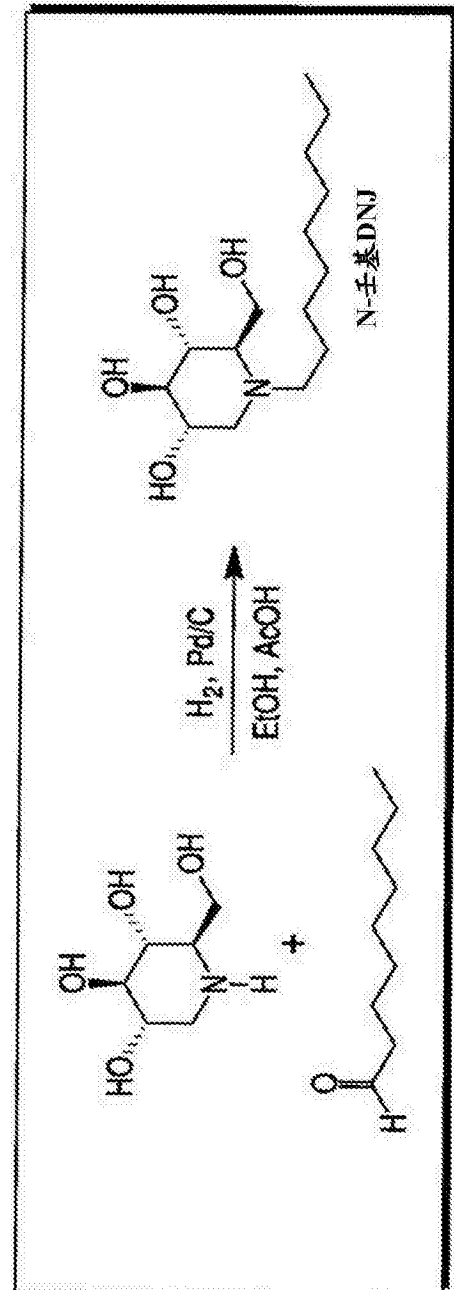


图4

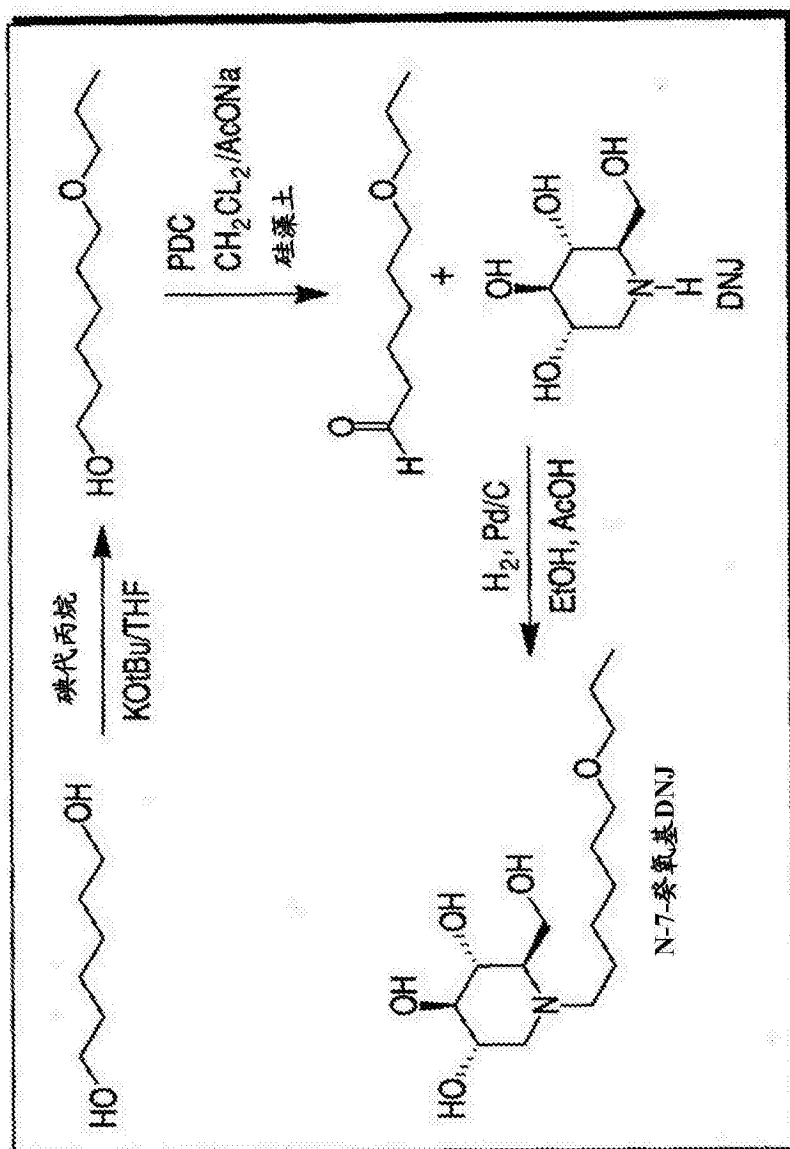


图5A

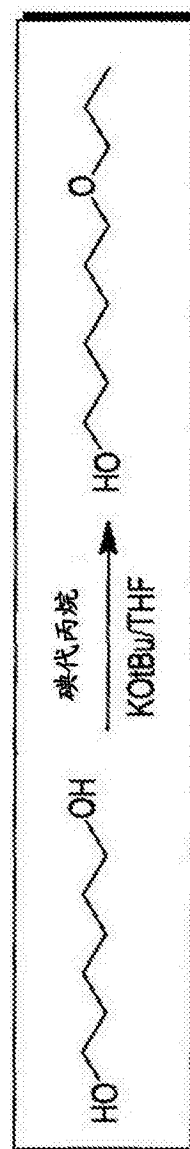


图5B

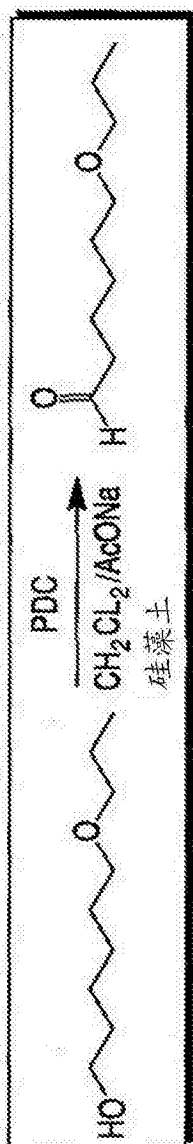


图5C

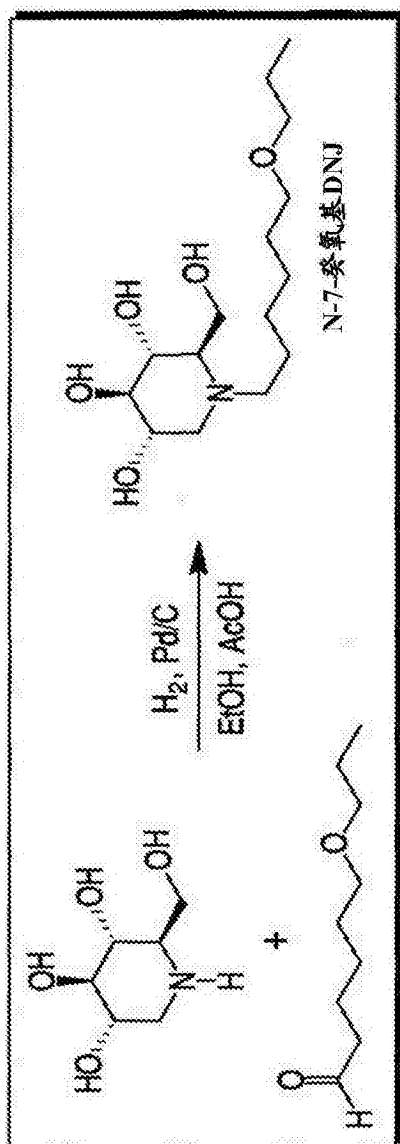


图5D

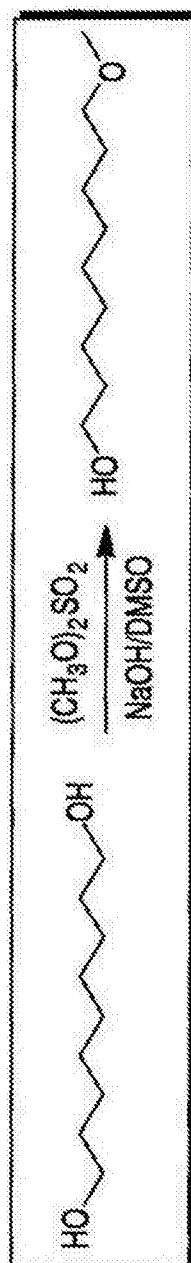


图6A

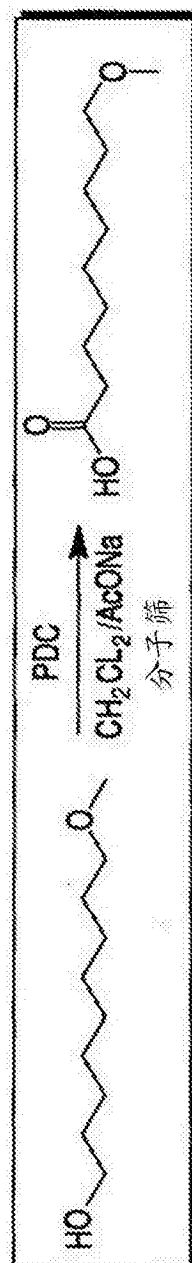


图6B

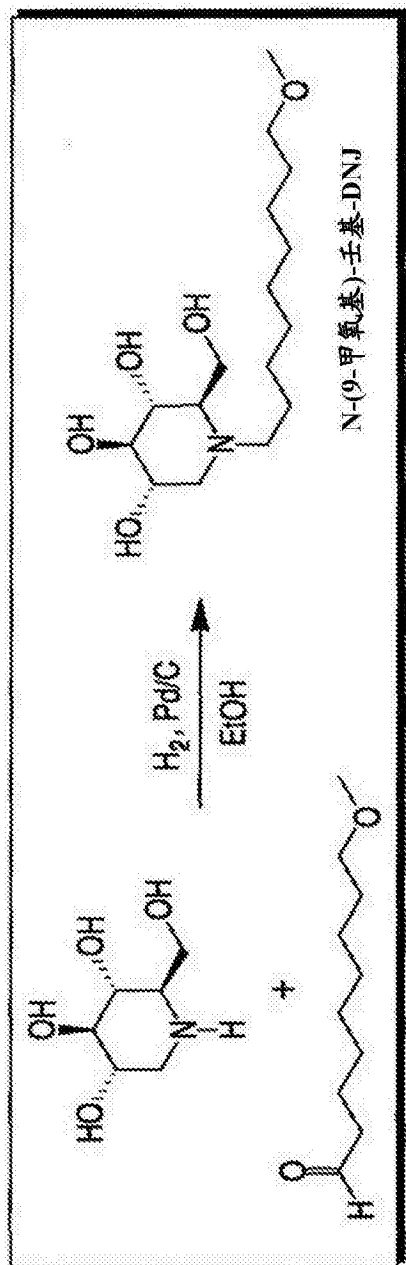


图6C

登革病毒结果
病毒释放百分比, 对照百分比
药物浓度100 μ M

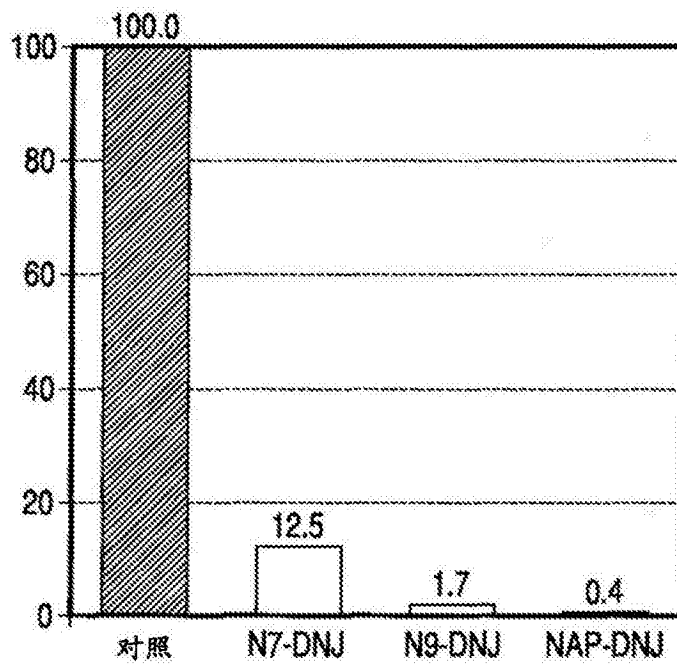


图7

DENV	
IC50	
uM	
化合物	
UV-1	162
UV-2	9
UV-3	41
UV-4	172
UV-5	2

DENV-登革病毒

图8

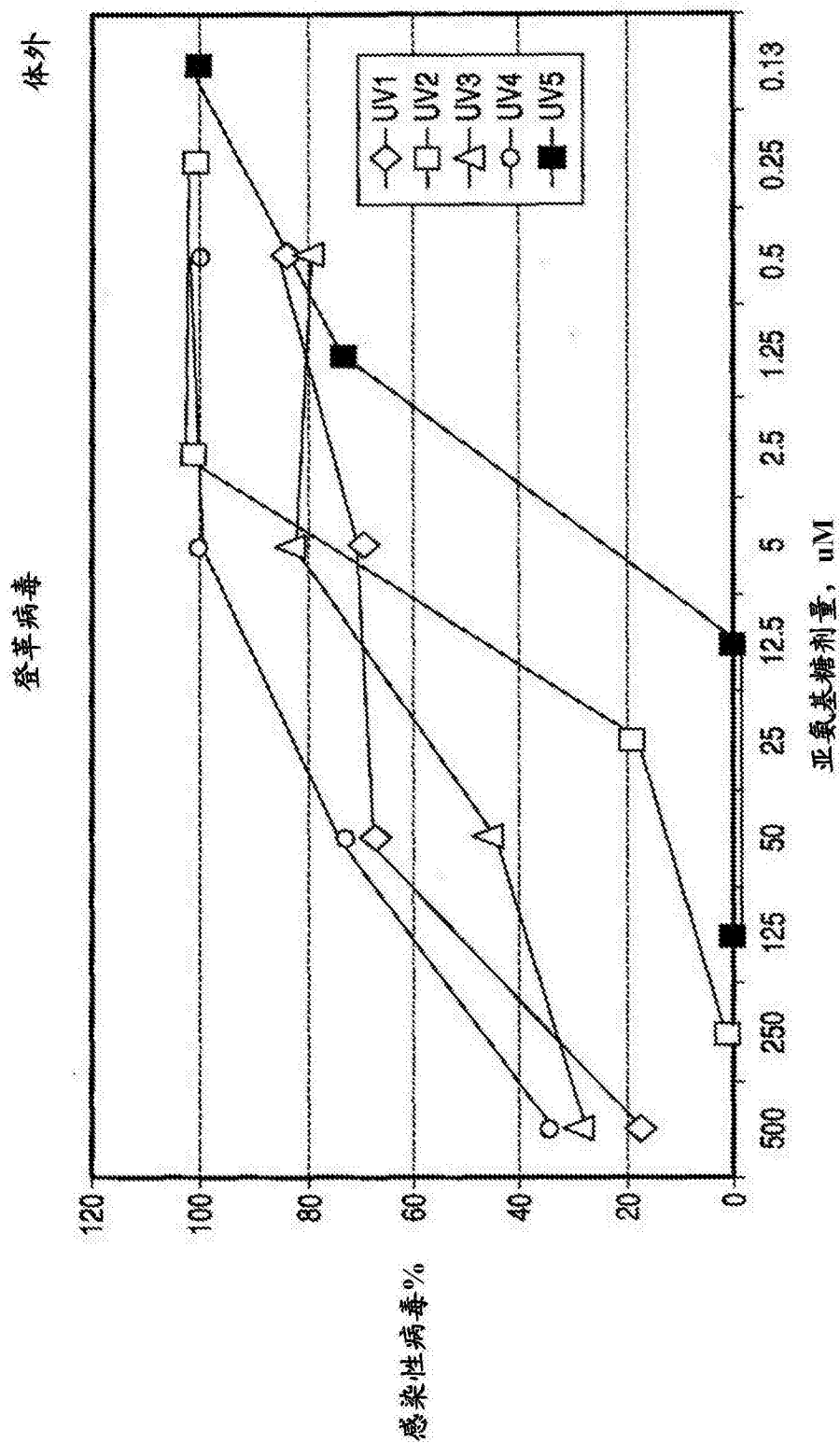
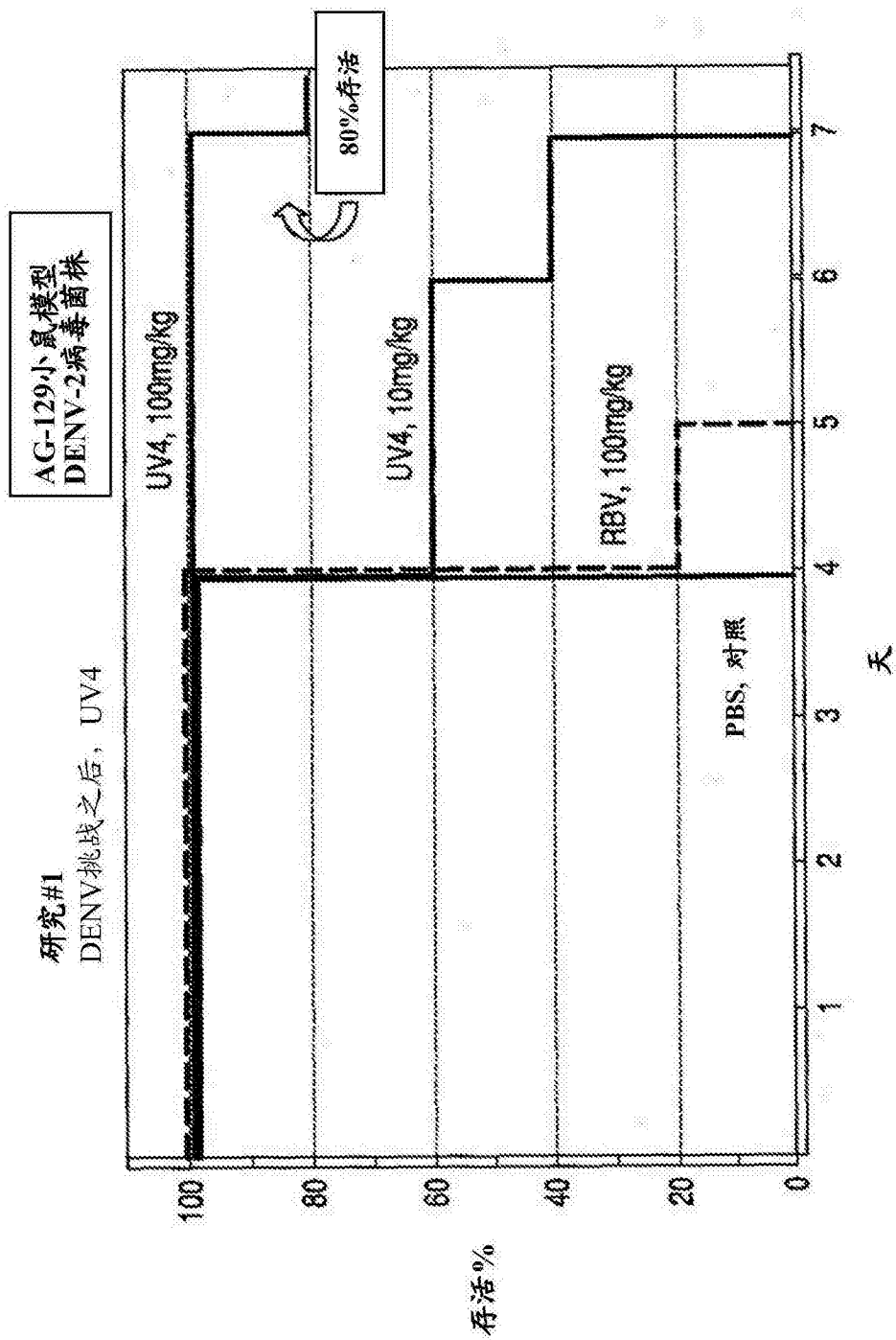


图9



缩写: DENV-登革病毒; PBS-磷酸缓冲盐水; RBV-利巴韦林

图10

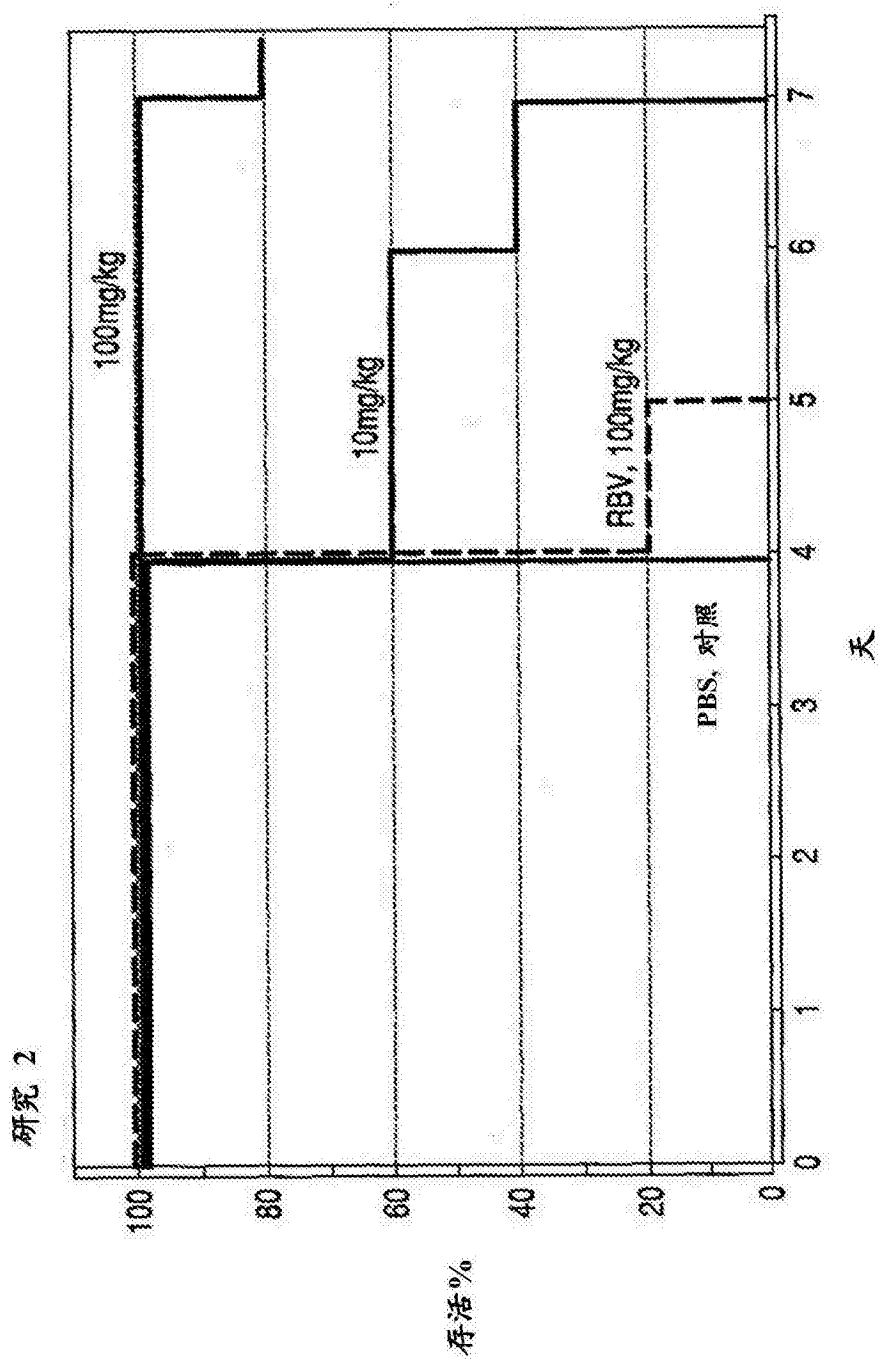


图11A

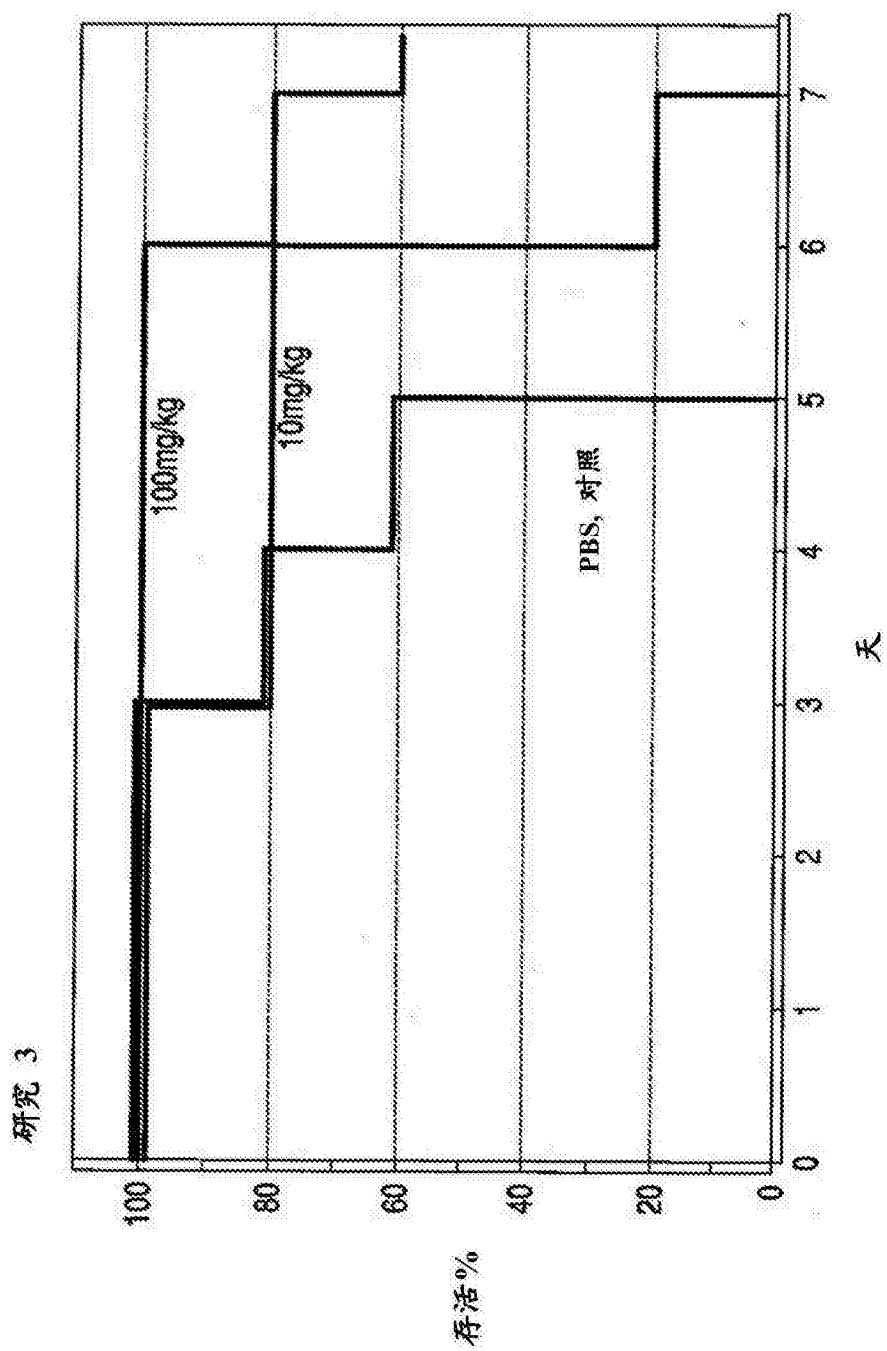


图11B

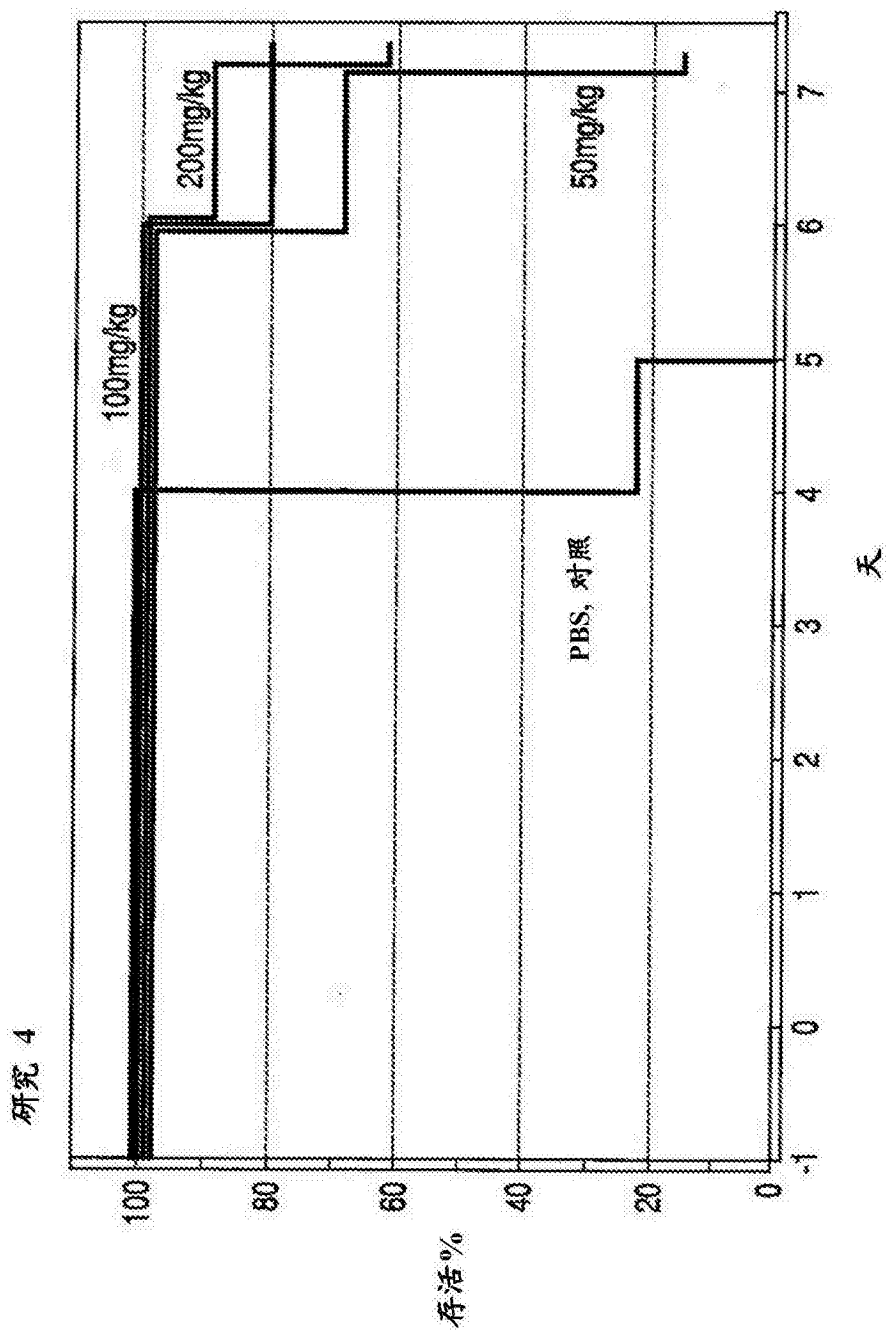


图11C