核苷类化合物在治疗冠状病毒感染性疾病中的用途

技术领域

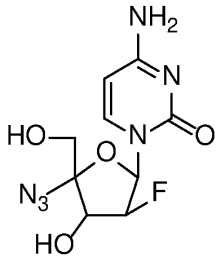
本发明涉及核苷类化合物新的抗病毒用途。

背景技术

冠状病毒（Coronavirus, CoV）是一类有包膜的正向单链 RNA 病毒，在人类、其他哺乳动物和鸟类中广泛传播，并可导致呼吸道、肠道、肝脏和神经系统等疾病。目前已知有七种 CoV 可导致人类疾病，其中四种 CoV-229E、-OC43、-NL63 和-HKU1 在人群中流行，并通常引起普通感冒症状。而其他三种 SARS-CoV、MERS-CoV 和新冠状病毒（2019-nCoV，或称 COVID-19）都具有发病快、传染性强和致死率高的严重危害性。因此，快速研发直接抗病毒药物，治疗新冠状病毒感染，十分迫切。

发明内容

化合物 1 作为抗艾滋病药物已经完成 II 期临床试验，安全性良好。



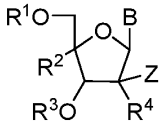
1

发明人在新冠状病毒感染的 MRC-5 细胞内，测定了化合物 1 的体外抗病毒活性。结果表明，化合物 **1** 只有微弱的抑制新冠状病毒的活性（EC_{50} 为 25 μM）。

然而，发明人直接用式（1）化合物进行研究性临床试验，惊奇地发现，较对照性常规治疗，用式（1）化合物治疗新冠状病毒肺炎病人，在病毒核酸试验转阴率、转阴疗程、治愈出院时间都显示明显优势。发明人认为，化合物 1 没有显示明显抑制病毒作用，可能与其在体外中不能有效地磷酸酯化有关。

鉴于此，本文中一方面，提供式（I）所示的化合物、或其药学上可接受的盐在制备预防或治疗冠状病毒感染性疾病的药物中的用途，另一方面，本文中提供一种预防或治疗冠状病毒感染性疾病的方法，包括向有此需要的患者给予治疗或预防有效量的式（I）化合物或其药学上可接受的盐，

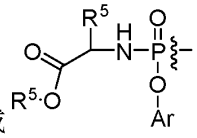
其中式（I）结构式如下：



（I）

式（I）中，

R^1 为 OR^1 基团可以在体内代谢释放出羟基，或者形成 O-磷酸基的任何基团；

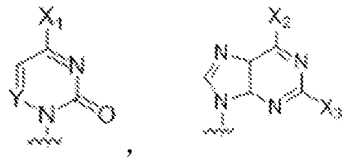
OR^1 优选为酯基，R^1 优选为 H、R^5-CO-、或  ，其中 Ar 是苯基和取代苯基，萘基和取代萘基，所述取代基选自 C_{1-6} 烷基、F、 Cl、 Br、I、CN、N_3、OH、 NH_2、OR^5、NHR^5；

R^2 选自: H、叠氮基、C_1-C_6 烷基（例如甲基、乙基）、C_1-C_6 烷氧基（例如甲氧基、乙氧基）、C_2-C_6 炔基（例如乙炔基）、C_2-C_6 烯基（例如乙烯基）、卤代 C_1-C_6 烷基（例如 2-氯乙基、2-氟乙基、三氟乙基）；

R^3 选自 H、任选被取代的 R-CO-、任选被取代的 R-O(C=O)-、和任选被取代的 RNH-CO-，其中 R 选自 C_1-C_6 烷基（例如甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基、戊基、异戊基等）；其中，取代基选自 C_1-C_6 烷基、卤素（如 F、Cl）、CN、N_3、和 OR^5。

R^4 选自 H、OH、卤素（例如 F）、C_1-C_6 烷基（例如甲基，乙基）、C_1-C_6 烷氧基（例如甲氧基，乙氧基）；

B 选自：



，

其中，X_1 选自-OH、-NH_2、R^5CONH-、R^5COO-、R^5O（C=O）NH-;

X_2 选自-OH、-SH、$-NH_2$、R^5COO-、R^5COS-、R^5CONH_2-、R^5O（C=O）NH-；

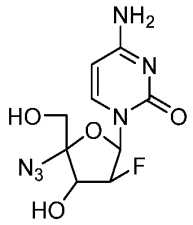
X_3 选自 H、F、-OH 和$-NH_2$；

Y 选自 CH 和 N；

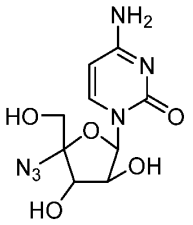
Z 为 H、-OH 或 F；

R^5 选自 H、C_1-C_6 烷基（例如甲基、乙基、丙基、异丙基）、C_2-C_6 炔基（例如乙炔基）、C_2-C_6 烯基（例如乙烯基）、卤代 C_1-C_6 烷基（例如 2-氯乙基、2-氟乙基、三氟乙基）、任选被 $C_{1\text{-}6}$ 烷基、$C_{1\text{-}6}$ 烷氧基、CN、N_3、OH、NH_2、卤素（例如 F、Cl、Br、I）取代的苯基、任选被 $C_{1\text{-}6}$ 烷基、$C_{1\text{-}6}$ 烷氧基、CN、N_3、OH、NH_2、卤素（例如 F、Cl、Br、I）取代的萘基。

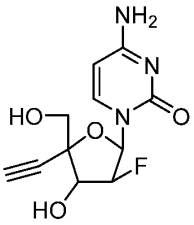
优先如下化合物或其药学上可接受的盐：



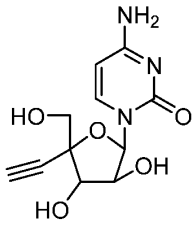
1



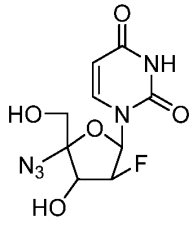
2



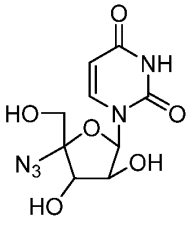
3



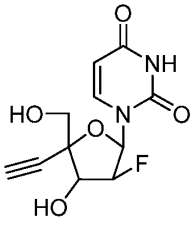
4



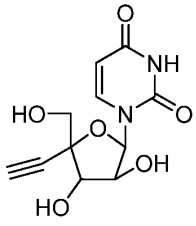
5



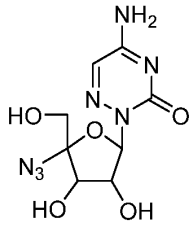
6



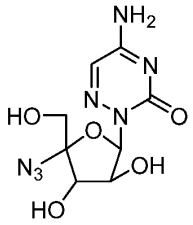
7



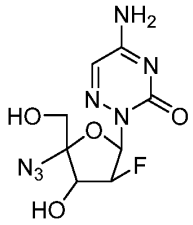
8



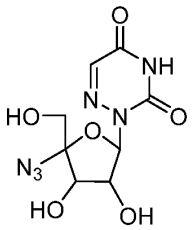
9



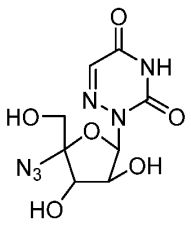
10

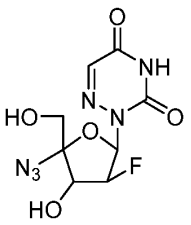


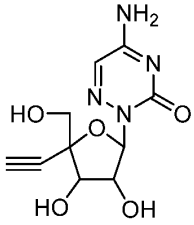
11

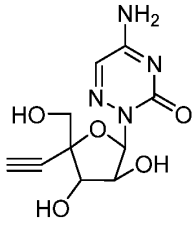


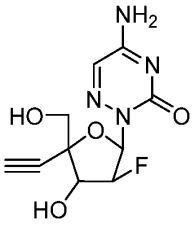
12

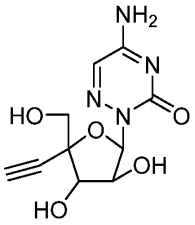

13

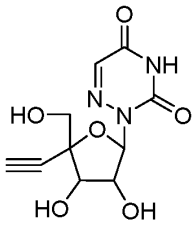

14

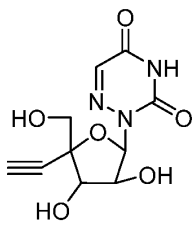

15

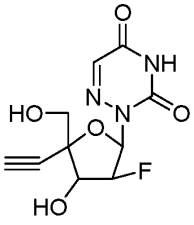

16

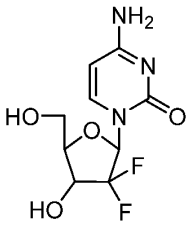

17

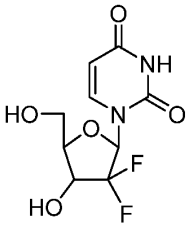

18

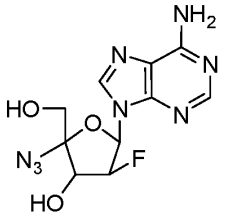

19

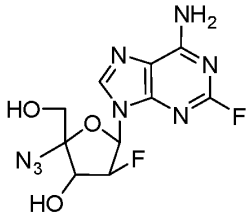

20

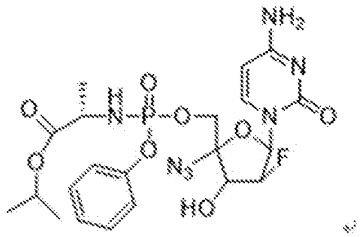

21


22


23


24


25


CL-236。

式（I）化合物的药学上可接受的盐包括，但不限于，例如式（I）化合物与以下酸形成的盐：盐酸、氢溴酸、氨基磺酸、硫酸、磷酸、硝酸、甲酸、乙酸、丙酸、草酸、乙醇酸、丙二酸、苯甲酸、乳酸、葡糖酸、柠檬酸、酒石酸、琥珀酸、富马酸、马来酸、杏仁酸、苹果酸、甲磺酸、乙磺酸、羟乙基磺酸、苯磺酸、对甲苯磺酸、萘磺酸、萘二磺酸、樟脑磺酸、抗坏血酸棕榈酸、水杨酸、磺基水杨酸、2-羟基-3-萘甲酸、邻苯二甲酸、赖氨酸、精氨酸、谷氨酸、甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸等。

式（I）化合物可通过商业渠道购买或者已知的方法制得。

本文中冠状病毒感染性疾病，是由冠状病毒科病毒感染所引发的疾病，包括感染人或其他动物所引起的疾病。特别是人冠状病毒感染人类所引发的疾病，包括但不限于 CoV-229E、-OC43、-NL63、-HKU1、SARS-CoV、MERS-CoV 和新冠状病毒（2019-nCoV，或称 COVID-19）感染引起的疾病。

式（I）化合物的治疗和预防冠状病毒感染性疾病的有效量可由本领域技术人员根据本文提供的信息确定。例如，成年人用量可以为 1-500mg/天，可选为 1-50mg/天，可选为 1-20mg/天；可选为 1-10mg/天，可选为 5mg/天。可以单次或分多次给药。

给药方式可以为口服或者胃肠外给药。可以是速释剂型，也可以是缓释剂型、控释剂型。具体剂型可是本领域的各种常规剂型。例如，口服制剂可以列举片剂、硬或软胶囊剂、水性或油性混悬剂、颗粒剂、乳剂、糖浆剂或酏剂等。注射剂可以列举注射液、粉针剂等。

具体实施方式

以下对本发明的具体实施方式进行详细说明。应当理解的是，此处所描述的具体实施方式仅用于示例性地对本发明进行说明，并不用于限制本发明。

试验例 1. 阿兹夫定磷酸酯胺前药 CL-236 抗新冠病毒活性测试

（一）实验材料与试剂

1. 细胞系：Huh 7 细胞，本实验室保存；

2. 病毒株：2019-nCoV（COVID-19）；

3. 测试药物：阿兹夫定磷酸酯胺前药（CL-236）

4. 阳性对照药物：瑞德西韦；

5. 试剂：DMEM 培养基（Gibco），胎牛血清（Gibco），双抗，胰酶，MTT（Amresco）等；

6. 试剂盒：QIAamp viral RNA mini kit（52906，Qiagen），One Step TB Green PrimeScript PLUS RT-PCR Kit(Perfect Real Time)（RR096A TaKaRa）

7. 耗材：细胞培养板，96 孔酶标板等；

8. 仪器：多功能酶标仪，StepOnePlus 荧光定量 PCR 仪，二氧化碳培养箱等。

（二）实验步骤

1. 阿兹夫定磷酸酯胺前药 CL-236 对细胞毒性测定

利用MTT法检测阿兹夫定磷酸酯胺前药CL-236对Huh 7细胞的毒性。MTT全称为3-(4,5)-dimethylthiahiazo (-z-y1)-3,5-di- phenytetrazoliumromide，是一种黄颜色的染料。MTT比色法，是一种检测细胞存活和生长的方法。其检测原理为活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶能使外源性MTT还原为水不溶性的蓝紫色结晶甲瓒（Formazan）并沉积在细胞中，而死细胞无此功能。10%SDS（溶于0.01 mol/L HCl溶液中）能溶解细胞中的甲瓒，用多功能酶标仪在570nm波长处测定其光吸收值，可间接反映活细胞数量。在一定细胞数范围内，MTT结晶形成的量与细胞数成正比。通过检测不同干扰素浓度下570nm波长处光吸收值，即可计算该药物浓度下细胞的存活率，从而计算该药物的半数中毒浓度（CC_{50}）。

提前一天接种Huh 7细胞于96孔板中，每孔1×10^4个（注意96孔板最边缘的孔勿用作实验孔，加PBS防止其他孔培养基挥发）；观察细胞状态，达到约50%时，将阿兹夫定磷酸酯胺前药CL-236用含2% FBS的DMEM培养基进行2倍比稀释后，以100 μL/孔加至细胞板中，每种浓度设6个重复；同时设置对照组（不含药物组）和空白组（不含细胞组），置于37℃，5% CO_2的培养箱中培养；于加药后48 h，每孔加入25 μL MTT溶液（5 mg/mL），继续培养4 h后，每孔加入125 μL 10% SDS（溶于0.01 mol/L HCl溶液中），轻轻吹打，放置2 h，使结晶物充分溶解，以空白组调零，测定OD570，按以下公式计算：存活率（%）＝加药组OD570/对照组OD570×100%。同时计算药物的半数中毒浓度（CC50）。

2. 阿兹夫定磷酸酯胺前药CL-236对2019-nCoV（COVID-19）病毒的抑制效果评价

在Huh 7细胞模型上进行抗病毒活性测定，每次试验均设3复孔，共重复3次。

1）于24孔细胞培养板每孔中接种5×10^4个Huh 7细胞，在37 ℃，5% CO_2培养条件下，待汇合度达到60%时，按照感染复数MOI为0.005，分别向每孔中加入200 μL用含2%FBS的DMEM培养基稀释后的2019-nCoV（COVID-19）病毒液，37 ℃、5% CO_2培养箱中吸附1 h后，弃病毒液，将阳性对照药物和阿兹夫定磷酸酯胺前药CL-236用含2%FBS的DMEM培养基从最大无毒浓度开始进行2倍比稀释，以500 μL/孔加至细胞板中，同时设置对照组（不含药物组），于感染后48 h收集上清病毒液。

2）利用real-time RT-PCR (qRT-PCR)对收集的病毒进行RNA定量：

收集的上清病毒液分别取140 μL，按照QIAamp viral RNA mini kit试剂盒说

明书进行 RNA 提取。用 One Step TB Green PrimeScript PLUS RT-PCR Kit(Perfect Real Time)试剂盒进行 qRT-PCR 检测，

引物为 RBD-qF1: 5'-CAATGGTTTAACAGGCACAGG-3';

RBD-qR1:5'-CTCAAGTGTCTGTGGATCACG-3'。

反应体系总体积为 20 μL：10 μL 2X One Step TB Green RT-PCR Buffer 4，1.2 μL TaKaRa Ex Taq HS Mix，0.4 μL PrimeScript PLUS RTase Mix，RBD-qF1 和 RBD-qR1 各 0.8 μL，0.4 μL ROX Reference Dye（50X），2 μL 病毒 RNA，4.4 μL RNase Free dH2O。反应参数为：反转录 42℃ 5 min，预变性 95℃ 10 s，PCR 40 个循环包括变性 95℃ 10 s，退火和延伸 60℃ 30s。

3）计算每种浓度下的药物抑制率。抑制率（%）＝1-实验组病毒 RNA 拷贝数/不含药物组病毒 RNA 拷贝数×100%。同时计算药物的半数有效浓度（EC_{50}）和治疗指数（TI）=半数中毒浓度（CC_{50}）/半数有效浓度（EC_{50}）。

（三）实验结果计算

表 1. 阿兹夫定磷酸酯胺前药 CL-236 抑制新冠病毒（COVID-19）活性

受试药物	浓度（uM）	病毒抑制率（%）	EC_{50}	CC_{50}	SI
CL-236	0.1	9.38	3.20 uM	66.15uM	20.7
	0.4	18.75			
	1.6	37.50			
	6.4	65.63			
	25.6	75.00			
	102.4	81.25			
瑞德西韦			1.50 uM	>45.0 uM	>30.0

试验例 2

临床试验验证化合物 1 用于治疗新冠状病毒（COVID-19）肺炎的有效性和安全性。

选择 20 例通过核酸试剂测定确诊新冠状病毒感染的患者，分为阿兹夫定（化合物 1）组和克力芝对照组，每组 10 例。阿兹夫定组治疗方案：每天服用 5 毫克（口服，5 片，每片 1 毫克）；克力芝对照组治疗方案：克力芝（口服，2 片/日，250mg/片）+阿比多尔片（口服 200mg/次，3 次/日）+干扰素（500 万 U，每日两次雾化吸入）。测定核酸变化，体温变化，观察各种症状。

结果如下表所示。

病人号	克力芝对照组 核酸检测确诊入组至转阴/出院	阿兹夫定片组 核酸检测确诊入组至转阴/出院
病人 1	转阴：第 6 天，继续治疗	
病人 2	转阴：第 3 天 出院：第 5 天	
病人 3	转阴：第 4 天 出院：第 7 天	
病人 4	第 7 天继续治疗中	
病人 5	第 6 天继续治疗中	
病人 6	转阴：第 4 天	
病人 7	转阴：第 2 天 出院：第 5 天	
病人 8	第 6 天继续治疗中	
病人 9	第 5 天继续治疗中	
病人 10	转阴：第 3 天	
病人 11		转阴：第 4 天 出院：第 7 天
病人 12		转阴：第 4 天 出院：第 6 天
病人 13		转阴：第 4 天 出院：第 6 天
病人 14		转阴：第 4 天 出院：第 8 天
病人 15		转阴：第 2 天 出院：第 7 天
病人 16		一周后转阴
病人 17		一周后转阴
病人 18		转阴：第 3 天 出院：第 6 天
病人 19		转阴：第 2 天 出院：第 5 天
病人 20		转阴：第 3 天

临床试验结果表明，10 例新冠状病毒感染患者中，阿兹夫定组全部患者核酸检测转阴，其中 7 例第 8 天内出院。

上述临床试验结果表明，化合物 1 治疗新冠病毒肺炎在病人核酸转阴率、转阴疗程、治愈率和治愈疗程几个指标都显示显著临床治疗优势。

其中一例使用克力芝支持治疗 20 多天仍不能转阴的病人，采用化合物 1 治疗后 3 天转阴。治疗中，没有发现任何药物有关的毒副作用。

在体外测试系统，阿兹夫定不能有效地被磷酸酯化活化，所以用阿兹夫定的

磷酸酯胺前药（CL-236）间接测定其抗新冠病毒的活性。因为，在用阿兹夫定治疗艾滋病的试验中知道，阿兹夫定在人体内可以有效地被活化，所以在人体临床试验中，直接使用阿兹夫定，而不是阿兹夫定磷酸酯胺前药，治疗新冠病毒性肺炎。