



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104744433 A

(43) 申请公布日 2015. 07. 01

(21) 申请号 201310746917. 1

A61P 31/14(2006. 01)

(22) 申请日 2013. 12. 30

(71) 申请人 中国科学院生物物理研究所
地址 100101 北京市朝阳区大屯路 15 号

(72) 发明人 饶子和 王祥喜 彭伟 李雪梅
杨诚 陈卫强 李爽
大卫·斯图尔德

(74) 专利代理机构 北京三聚阳光知识产权代理
有限公司 11250

代理人 李红团

(51) Int. Cl.

C07D 401/04(2006. 01)

A61K 31/4439(2006. 01)

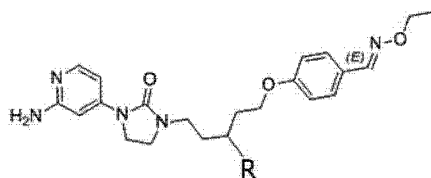
权利要求书2页 说明书8页 附图1页

(54) 发明名称

ALD 及其作为 EV71 病毒和 CAV16 病毒抑制剂的用途

(57) 摘要

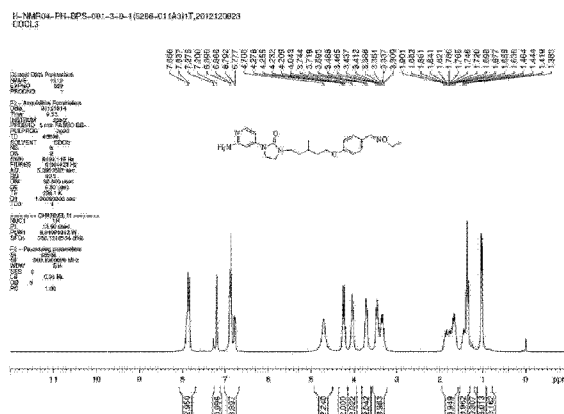
本发明公开了一种 ALD 衍生物或其药物学上可接受的盐类。本发明同时提供了该 ALD 衍生物或其药物学上可接受盐类作为 EV71 与 CAV16 抑制剂的用途及其在制备治疗手足口病的药物中的应用。ALD 衍生物的结构式如式(I)所示：



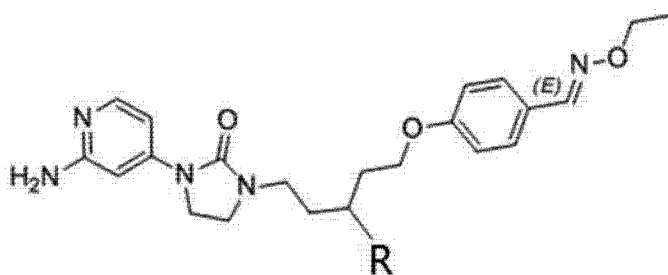
本发明提供

式(I)

了上述 ALD 衍生物或其药物学上可接受盐类的制备方法。



1. 一种抑制 EV71 和 / 或 CAV16 病毒的化合物或其药学上可接受的盐, 所述化合物如式 (I) 所示,



其中 :R 选自 H ;C1-6 烷基 ;C1-6 烷基氨基。

2. 如权利要求 1 所述的化合物或其药学上可接受的盐, 其中 R 选自甲基、甲氨基或乙氨基。

3. 权利要求 1-2 任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐在制备抑制 EV71 和 / 或 CAV16 病毒的药物中的用途。

4. 权利要求 1-2 任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐在制备预防或治疗手足口病以及相关并发症的药物中的用途。

5. 权利要求 1-2 中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐在制备治疗 EV71 和 CAV16 病毒感染所引起的手足口病以及相关并发症的药物中的用途。

6. 权利要求 1-2 中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐在制备 EV71 (A)、EV71 (B)、EV71 (C)、CAV16 (A)、CAV16 (B) 病毒感染及其所引起的手足口病以及相关并发症的药物中的用途。

7. 一种药物组合物, 含有权利要求 1-2 任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐作为活性成分。

8. 一种制剂, 含有权利要求 7 所述的药物组合物, 制剂形式选自片剂, 胶囊剂, 粉剂, 糖浆剂, 溶液, 悬浮液, 注射剂和局部施用剂型。

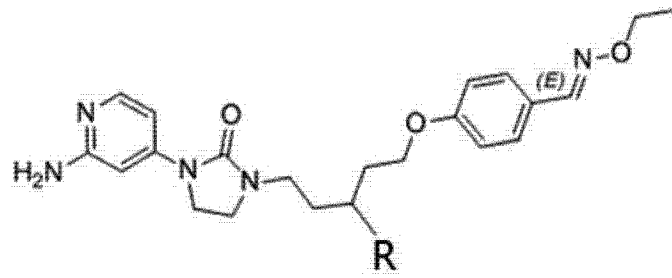
9. 权利要求 7 所述的药物组合物或权利要求 8 所述的制剂在制备抑制 EV71 和 / 或 CAV16 病毒的药物中的用途。

10. 权利要求 7 所述的药物组合物或权利要求 8 所述的制剂在制备预防或治疗手足口病以及相关并发症的药物中的用途。

11. 权利要求 7 所述的药物组合物或权利要求 8 所述的制剂在制备治疗 EV71 和 CAV16 病毒感染所引起的手足口病以及相关并发症的药物中的用途。

12. 权利要求 7 所述的药物组合物或权利要求 8 所述的制剂在制备 EV71 (A)、EV71 (B)、EV71 (C)、CAV16 (A)、CAV16 (B) 病毒感染及其所引起的手足口病以及相关并发症的药物中的用途。

13. 一种化合物的制备方法 :



其中 :R 为甲基 ;步骤如下 :

(1)4-溴吡啶-2-胺、碳酸二叔丁基酯、4-二甲氨基吡啶和叔丁醇,在室温下搅拌过夜,反应得N-叔丁氧羰基-4-溴-吡啶-2-胺;

(2)步骤(1)获得的N-叔丁氧羰基-4-溴-吡啶-2-胺与1-(5-[4-[(乙氧基亚胺)甲基]苯氧基]-3-甲基戊基)-咪唑啉-2-酮在2-(二叔丁基膦)联苯、Pd(dba)₂和磷酸钾存在下反应获得叔丁基-N-[4-[3-(5-[4-[(乙氧基亚胺)甲基]苯氧基]-3-甲基戊基)-2-氧咪唑啉-1-基]-吡啶-2-基]碳酸酯;

(3)步骤(2)获得的叔丁基-N-[4-[3-(5-[4-[(乙氧基亚胺)甲基]苯氧基]-3-甲基戊基)-2-氧咪唑啉-1-基]-吡啶-2-基]碳酸酯中加入三氟乙酸和二氯甲烷,室温搅拌反应,得到1-(2-氨基吡啶-4-基)-3-(5-[4-[(乙氧基亚胺)甲基]苯氧基]-3-甲基戊基)-咪唑啉-2-酮。

ALD 及其作为 EV71 病毒和 CAV16 病毒抑制剂的用途

技术领域

[0001] 本发明涉及 ALD 衍生物及其药物学上可接受的盐类以及它们在制备药物中的应用,尤其涉及 ALD 衍生物及其药物学上可接受的盐类在抑制 EV71 病毒和 CAV16 病毒中的应用。

背景技术

[0002] 人手足口病(Hand-foot-mouth disease, HFMD)是全球性常见传染病,我国一直以来都是人手足口病的高发地区,我国手足口病的新发病例数量在 2010、2011、2012 连续三年位居我国法定传染病之首,并有明显上升趋势。目前还没有针对手足口病的特效抗病毒药物上市。

[0003] 人肠道病毒 71 型(EV71 病毒)和柯萨奇 A16 型病毒(CAV16 病毒)是近年来在我国引起手足口病的主要病原体。EV71 和 CAV16 属于小 RNA 病毒科,肠道病毒属。EV71 与 CAV16 病毒颗粒呈正二十面体结构,整个病毒壳层由六十个原体(protoimer)组成,每一个原体是由 VP1, VP2, VP3 和 VP4 这四个蛋白亚基组成。临床上,CAV16 引起的症状通常较为轻微,而在 EV71 引起的手足口病病例中,有少数病例会发生严重的中枢神经系统疾病,导致较高的死亡率。

[0004] EV71 和 CAV16 在侵染宿主细胞时,先与宿主细胞膜上的特异性受体相结合,然后通过宿主细胞内吞作用所形成的内涵体,进入到宿主细胞内部。在内涵体内,EV71 和 CAV16 的病毒颗粒发生一系列的结构变化,并在病毒颗粒正二十面结构的二次轴位置形成一个孔洞,将病毒衣壳包裹的 RNA 从该孔洞释放至细胞胞浆内,这一过程称为病毒的脱衣壳过程。

[0005] 在 EV71 和 CAV16 的 VP1 中,存在一个保守的疏水口袋。这个疏水口袋在完整病毒中往往被一类来自于宿主细胞的脂类分子占据。通过设计特异性的抑制剂,结合在 VP1 的保守疏水口袋中,能够抑制肠道病毒的脱衣壳过程。因此推测,在病毒的脱衣壳过程中,这个疏水口袋将要发生明显的构象变化,而设计抑制这一构象变化的小分子抑制剂,将能够通过抑制肠道病毒脱衣壳而抑制其侵染宿主细胞的过程。

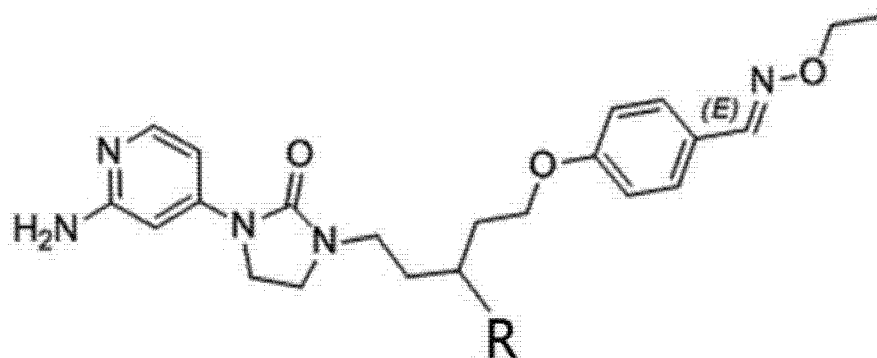
[0006] 发明人在其解析的 EV71 和 CAV16 全病毒颗粒的 VP1 中也发现了这一保守的疏水口袋的存在,并且发现这一口袋被一个鞘氨醇类的脂类分子占据。根据这一疏水口袋的三维空间结构信息,可以进一步筛选或设计小分子抑制剂,特异性地结合在这一疏水口袋中,以抑制 EV71 和 CAV16 病毒的脱衣壳过程。

发明内容

[0007] 本发明提供一种 ALD 衍生物或其药物学上可接受的盐类。

[0008] 上述 ALD 衍生物的结构式如式(I)所示:

[0009]



式 (I)

[0010] 其中 :R 选自 H ;C1-6 烷基 ;C1-6 烷基氨基,如甲氨基、乙氨基。

[0011] 本发明提供上述 ALD 衍生物或其药物学上可接受盐类的制备方法。

[0012] 以 R 为 $-\text{CH}_3$ 为例,本发明化合物的合成方法如下:

[0013] (1) 4- 溴吡啶 -2- 胺(4-bromopyridin-2-amine、碳酸二叔丁基酯($(\text{Boc})_2\text{O}$)、4- 二甲氨基吡啶(4-dimethylaminopyridine)和叔丁醇(tert-Butanol)在室温下搅拌过夜反应得 N- 叔丁氧羰基 -4- 溴 - 吡啶 -2- 胺(tert-butyl N-(4-bromopyridin-2-yl) carbamate);

[0014] (2)在氮气下,步骤(1)获得的 N- 叔丁氧羰基 -4- 溴 - 吡啶 -2- 胺与 1-(5-[4-[(乙氧基亚胺)甲基]苯氧基]-3-甲基戊基)-咪唑啉-2-酮(1-(5-[4-[(ethoxyimino)methyl]phenoxy]-3-methylpentyl)imidazolidin-2-one)在 Johnphos(2-(二叔丁基膦)联苯)、 $\text{Pd}(\text{dba})_2$ 和磷酸钾(K_3PO_4)存在下反应获得叔丁基 -N-[4-[3-(5-[4-[(乙氧基亚胺)甲基]苯氧基]-3-甲基戊基)-2-氧咪唑啉-1-基]-吡啶-2-基]碳酸酯(tert-butyl N-[4-[3-(5-[4-[(ethoxyimino)methyl]phenoxy]-3-methylpentyl)-2-oxoimidazolidin-1-yl]pyridin-2-yl]carbamate);

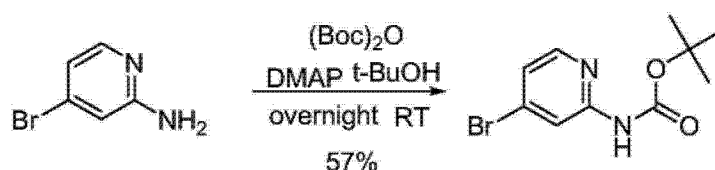
[0015] (3) 步骤(2)获得的叔丁基 -N-[4-[3-(5-[4-[(乙氧基亚胺)甲基]苯氧基]-3-甲基戊基)-2-氧咪唑啉-1-基]-吡啶-2-基]碳酸酯中加入三氟乙酸/二氯甲烷($\text{TFA}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 体积比 =1:1)室温搅拌反应,得到 1-(2-氨基吡啶-4-基)-3-(5-[4-[(乙氧基亚胺)甲基]苯氧基]-3-甲基戊基)-咪唑啉-2-酮

[0016] (1-(2-aminopyridin-4-yl)-3-(5-[4-[(ethoxyimino)methyl]phenoxy]-3-methylpentyl)imidazolidin-2-one)。

[0017] 以反应式表示的上述合成路线如下:

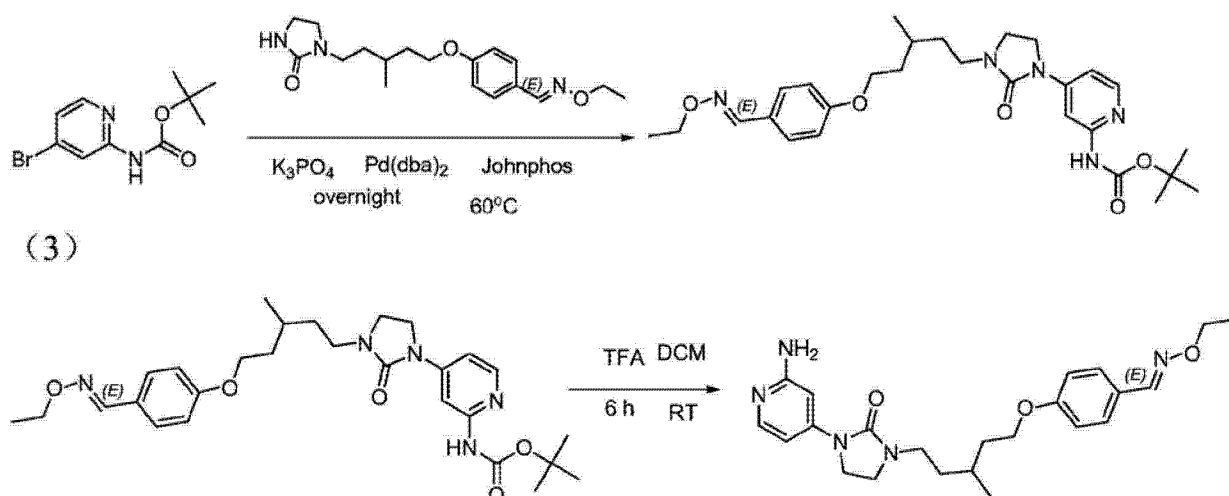
[0018]

(1)



(2)

[0019]



[0020] 以上仅为例举,本领域技术人员根据上述反应路线可以选用其它相应的起始物质,以相同的反应原理和路线制备获得本发明中其它化合物。同样,本领域技术人员可以根据本领域常规方法获得本发明化合物的药学上可接受的盐类。

[0021] 本发明提供的ALD类衍生物是一类新型的EV71和CAV16病毒小分子抑制剂,在细胞水平的药效学试验中,该类小分子抑制剂对五种不同来源的EV71和CAV16病毒株均展现了良好的抑制作用。因而本发明还提供上述ALD衍生物或其药物学上可接受盐类作为EV71与CAV16抑制剂的用途及其在制备治疗手足口病的药物中的应用。

[0022] 本发明还提供上述ALD类衍生物及其药物学上可接受的盐类单独或结合其它药物的应用,用于制备治疗EV71和CAV16感染及其所引起的手足口病以及相关并发症的药物。

[0023] 本发明的化合物可以添加药学上可接受的载体制备成药物组合物,药物组合物的制剂形式和制备方法均为本领域常规技术,如片剂,胶囊剂,粉剂,糖浆剂,溶液,悬浮液,注射剂,局部施用剂型等。

附图说明

[0024] 图1:利用核磁共振对实施例1合成的ALD化合物进行确证的图谱

[0025] 图2:实施例1合成的化合物的质谱检测图谱

具体实施方式

[0026] 以下将结合制备实施例和效果实施例对本发明做进一步的详细说明,但是本发明要求保护的范围并不局限于下述实施例表示的范围。

[0027] 实施例1:R为 $-\text{CH}_3$ 的本发明化合物的合成:

[0028] (1)向250毫升圆底瓶中加入4-溴吡啶-2-胺(4-bromopyridin-2-amine)(5g,28.90mmol),碳酸二叔丁基酯($(\text{Boc})_2\text{O}$)(6.8g,31.16mmol),4-二甲氨基吡啶(4-dimethylaminopyridine)(0.32g),叔丁醇(*tert*-Butanol)(70mL)。室温搅拌过夜,真空浓缩,所得混合物用体积比为5:1的正己烷/乙醚(hexane/ether)30ml洗涤,得N-叔丁氧羰基-4-溴-吡啶-2-胺(*tert*-butyl N-(4-bromopyridin-2-yl)carbamate)(4.5g,57%),为白色固体。

[0029] (2) 在氮气下, 向 50 毫升圆底瓶中加入叔丁基 -N-(4-溴吡啶-2-基) 碳酸酯(即步骤(1) 制备的 N-叔丁氧羰基-4-溴-吡啶-2-胺) (820mg, 3.00mmol), 1-(5-[4-[(乙氧基亚胺) 甲基] 苯氧基]-3-甲基戊基)-咪唑啉-2-酮(1-(5-[4-[(ethoxyimino)methyl]phenoxy]-3-methylpentyl)imidazolidin-2-one) (500mg, 1.50mmol), Johnphos (2-(二叔丁基膦) 联苯) (45mg), Pd(dba)₂ (38.9mg), 磷酸钾 K₃PO₄ (637mg, 3.0mmol), 和 1,4-二氧六环 25ml。所得溶液在 60℃ 搅拌过夜, 冷却后真空浓缩, 用 15 毫升水洗涤, 所得溶液用乙酸乙酯(每次 15ml) 萃取三次, 有机层合并, 真空浓缩干燥后所得残余物上硅胶柱层析分离, 得 200 毫克白色固体, 为产物: 叔丁基 -N-[4-[3-(5-[4-[(乙氧基亚胺) 甲基] 苯氧基]-3-甲基戊基)-2-氧咪唑啉-1-基]-吡啶-2-基] 碳酸酯(tert-butyl N-[4-[3-(5-[4-[(ethoxyimino)methyl]phenoxy]-3-methylpentyl)-2-oxoimidazolidin-1-yl]pyridin-2-yl]carbamate)。

[0030] (3) 向 50 毫升圆底瓶中加入步骤(2) 获得的叔丁基 -N-[4-[3-(5-[4-[(乙氧基亚胺) 甲基] 苯氧基]-3-甲基戊基)-2-氧咪唑啉-1-基]-吡啶-2-基] 碳酸酯 (200mg, 0.38mmol), 三氟乙酸/二氯甲烷(TFA/CH₂Cl₂ 体积比=1:1) 20ml。所得溶液室温搅拌 6 小时, 真空浓缩后, 用闪式-制备高效液相色谱分离, 得 30mg (19%) 淡黄色固体, 为产物: 1-(2-氨基吡啶-4-基)-3-(5-[4-[(乙氧基亚胺) 甲基] 苯氧基]-3-甲基戊基)-咪唑啉-2-酮

[0031] (1-(2-aminopyridin-4-yl)-3-(5-[4-[(ethoxyimino)methyl]phenoxy]-3-methylpentyl)imidazolidin-2-one); ¹H-NMR(CDCl₃, ppm): 7.866-7.837(m, 3H), 7.200(s, 1H), 6.896-6.777(m, 4H), 4.708(s, 2H), 4.278-4.209(m, 2H), 4.043(s, 2H), 3.744-3.693(m, 2H), 3.488-3.409(m, 4H), 1.901-1.821(m, 4H), 1.786-1.677(m, 4H), 1.464-1.383(m, 3H). LC-MS(ES, m/z): 426[M+H]⁺(100%)。

[0032] 本发明使用的各种术语和短语具有本领域技术人员公知的一般含义, 即便如此, 本发明仍然希望在此对这些术语和短语作更详尽的说明和解释, 提及的术语和短语如有与公知含义不一致的, 以本发明所表述的含义为准。本文所用的缩略语通常为本领域技术人员所熟知的, 或者可以根据基础知识易于理解的。所用的缩略语及其含义如下所示:

[0033]

PF	Pocket Factor 口袋因子
ALD	本发明式 (I) 化合物的简称
DMSO	二甲基亚砷
ddH ₂ O	双蒸水
ep 管 Eppendorf	微量离心管
DMEM	细胞培养基
FBS	胎牛血清蛋白
PS	双抗青霉素/链霉素
PBS	磷酸缓冲液
IC ₅₀	半数抑制浓度
EV71	肠道病毒 71 型
CAV16	柯萨奇病毒 A 16 型
RD	人恶性胚胎横纹肌肉瘤细胞
Vero	非洲绿猴肾细胞
eGFP	增强型绿色荧光蛋白
TCID ₅₀	半数组织细胞培养物感染量

[0034] 作为手足口病致病病毒抑制剂的 ALD 类化合物可溶于二甲基亚砷(DMSO) 溶剂, 具体使用的化合物由实施例 1 制备, 本申请实施例中采用的其他化合物均购买于西格玛公司。

[0035] 本发明化合物抑制病毒活性的检测方法:

[0036] 采用观察病毒侵染细胞后的细胞病变和荧光测定法。即先将不同浓度的抑制剂加入一定滴度的病毒中, 并于 37°C 二氧化碳培养箱孵育 1-1.5 小时, 然后再用抑制剂与病毒的混合液去侵染细胞, 同时设立不加抑制剂和不加病毒的对照组, 于 37°C 二氧化碳培养箱培养 5 天, 肉眼观察细胞病变情况, 并对病变的细胞以及未病变的细胞进行计数, 以直接计算出抑制剂对病毒侵染的抑制作用。

[0037] 荧光测定法是构建的带 eGFP 的病毒: 在病毒基因组的前端构建 eGFP 基因, 通过转录得到病毒的 RNA, 将 RNA 转染进 RD 细胞, 产生带 eGFP 的病毒, 当在荧光显微镜下观察时就可以看到绿色的病毒。将梯度稀释的抑制剂与病毒孵育 1-1.5 小时后加入 96 孔板中, 同时设置不加抑制剂和不加病毒的对照组。一段时间后病毒开始侵染细胞, 当病毒进入细胞后就会产生荧光斑。不同抑制剂浓度下进入细胞的病毒量不同, 病毒感染细胞 24 小时后在荧光显微镜下观察, 根据光斑的多少检测抑制剂的有效浓度。如无特别说明, 以下测试所用病毒毒株均为带 eGFP 的病毒。

[0038] 本发明的活性测试方法包括以下 6 个步骤:

[0039] 步骤 1. 病毒抑制剂 ALD 类化合物的准备

[0040] 测试用的病毒抑制剂化合物由实施例 1 的方法制备, 纯度大于 98%。

[0041] 步骤 2. 化合物的处理

[0042] 将病毒抑制剂化合物在 95%DMSO+5%ddH₂O 中溶解,配制成 10mM 浓度的溶液,然后将配制好的化合物溶液放置在 1.5ml ep 管中,于 4℃ 下保存备用。

[0043] 步骤 3. RD、Vero 细胞复苏和传代

[0044] 从液氮罐中取出一支 RD 细胞和一支 Vero 细胞,将细胞冻存管放入 37℃ 水浴锅中迅速解冻,待完全解冻后将细胞加入盛有 20mlDMEM+10%FBS+1%PS 的培养基的 50ml 离心管中,混匀。然后将 50ml 离心管放入离心机中,800rpm 离心 3min,倒掉上清,再用 25ml 上述培养基重悬细胞,转移至 T75 培养瓶中,在 37℃,5%CO₂ 的培养箱中培养。将 RD 和 Vero 培养瓶中的培养基吸去,分别加入 10ml PBS 清洗,每瓶 T75 瓶中加入 5ml 0.25% 胰酶,37℃ 消化 5min,转移至两个离心管中,800rpm 离心 3min,倒掉上清,加入 50ml 培养基,再将细胞各转移至 T75 培养瓶中,在 37℃,5%CO₂ 的培养箱中培养。

[0045] 步骤 4. EV71、CAV16 病毒扩增

[0046] 取 5 个 RD 细胞 T75 细胞瓶,细胞浓度为 90% 左右,分别加入 50 μ l 的 5 种手足口病致病病毒毒株,分别为 EV71(A)、EV71(B)、EV71(C)、CAV16(A) 和 CAV16(B),在 37℃,5%CO₂ 的培养箱中培养。原始病毒滴度(TCID₅₀/ml)分别为:

[0047]

EV71(A)	10 ^{6.5}
EV71(B)	10 ^{8.2}
EV71(C)	10 ⁸
CAV16(A)	10 ⁸
CAV16(B)	10 ^{6.2}

[0048] 步骤 5. EV71、CAV16 病毒扩增后病毒滴度测定

[0049] 5 种病毒滴度测定方法相同,以 EV71(A) 为例:在一块 96 孔板中每孔均加入 100 μ l 浓度为 2×10⁵ 个细胞/ml 的 RD 或 Vero 细胞,在 37℃,5%CO₂ 的培养箱中培养 12h,此时细胞贴壁,为 90% 满度。每孔再加入 100 μ l 培养基,体积为 200 μ l。从 -80℃ 冰箱中取出一管冻存的 EV71(A) 病毒,在 37℃ 水浴锅中迅速解冻,取 22 μ l 加入到第二列的 6 个孔中,混匀后用排枪吸 22 μ l 加入到下一列 6 个孔中,依次类推,直至稀释到第 11 列,在 37℃,5%CO₂ 的培养箱中培养。

[0050] 加入梯度稀释的病毒后开始观察细胞病变,如果细胞完全病变记作“++++”,75% 细胞病变记作“+++”,50% 细胞病变记作“++”,25% 细胞病变记作“+”,没有细胞病变记作“-”。50% 以上细胞病变记为阳性,50% 以下的细胞病变记为阴性,连续观察 4~5 天,直至细胞病变固定。采用 Reed&Muench Calculate 方法计算 TCID₅₀。

[0051] 扩增后 5 种病毒在 RD 和 Vero 细胞上的滴度分别为:

[0052] RD 细胞:

[0053]

EV71(A)	5×10^8 TCID ₅₀
EV71(B)	2.8×10^9 TCID ₅₀
EV71(C)	2.8×10^9 TCID ₅₀
CAV16(A)	2.8×10^8 TCID ₅₀
CAV16(B)	5×10^7 TCID ₅₀

[0054] Vero 细胞

[0055]

EV71(A)	5×10^5 TCID ₅₀
EV71(B)	8.9×10^8 TCID ₅₀
EV71(C)	2.5×10^6 TCID ₅₀
CAV16(A)	2.8×10^6 TCID ₅₀
CAV16(B)	5×10^6 TCID ₅₀

[0056] 步骤 6. 病毒抑制剂 ALD 类化合物在 RD 和 Vero 细胞系上对 5 种手足口病病毒的抑制活性测定

[0057] 6.1 分别接种 $100 \mu\text{l}$ 浓度为 2×10^5 个细胞 /ml RD 和 Vero 细胞于 96 孔板中, 在 37°C , $5\%\text{CO}_2$ 的培养箱中培养 12h, 此时细胞贴壁, 为 90% 满度。

[0058] 6.2 将起始浓度为 $400 \mu\text{M}$ 的本发明的抑制剂化合物溶液用 DMEM 培养基按 1:2 (体积比) 的比例进行等比稀释, 共稀释为 C1-C28 共 28 个浓度梯度, 具体如表 1。

[0059] 表 1

[0060]

编号	浓度 (μM)	编号	浓度 (μM)	编号	浓度 (μM)	编号	浓度 (μM)
C1	100	C8	0.78	C15	6.1×10^{-3}	C22	4.8×10^{-5}
C2	50	C9	0.39	C16	3.1×10^{-3}	C23	2.4×10^{-5}
C3	25	C10	0.20	C17	1.5×10^{-3}	C24	1.2×10^{-5}
C4	12.5	C11	0.10	C18	7.6×10^{-4}	C25	6.0×10^{-6}
C5	6.25	C12	4.9×10^{-2}	C19	3.8×10^{-4}	C26	3.0×10^{-6}
C6	3.13	C13	2.4×10^{-2}	C20	1.9×10^{-4}	C27	1.5×10^{-6}
C7	1.56	C14	1.2×10^{-2}	C21	9.5×10^{-5}	C28	7.5×10^{-7}

[0061] 6.3 将步骤 4 扩增的 RD 和 Vero 两种细胞系上的 5 种手足口病致病病毒 EV71(A)、EV71(B)、EV71(C)、CAV16(A)、CAV16(B) 用 DMEM 培养基稀释至 2000TCID_{50} 。

[0062] 6.4 将 6.2 中的 28 种不同浓度梯度的抑制剂化合物与 6.3 中稀释至 2000TCID_{50} 的

RD 和 Vero 两种细胞系上的 5 种手足口病致病病毒等体积混合,此时药物作用浓度均为 6.2 表中的 1/2。在 37°C 5%CO₂ 的培养箱中孵育 1-1.5 小时。

[0063] 6.5 将 6.4 中孵育后的 5 种手足口病致病病毒与不同浓度梯度的抑制剂的混合液(即病毒与药物的混合液)加入到 6.1 中接种了细胞的 96 孔板中,在 37°C,5%CO₂ 的培养箱中培养 4~5 天。

[0064] 6.6 按照步骤 5 中的方法观察和记录细胞病变情况,连续观察 4~5 天,直至细胞病变固定。通过显微镜观察及细胞计数来确定抑制剂对 5 种手足口病致病病毒抑制活性,半数细胞发生病变时(++) 对应的抑制剂浓度及为抑制剂对该种病毒的 IC₅₀ 值。

[0065] 实施例 2:实施例 1 制备的抑制剂化合物抑制 5 种手足口病致病病毒 EV71(A)、EV71(B)、EV71(C)、CAV16(A) 和 CAV16(B) 侵染细胞的活性测定

[0066] 将实施例 1 制备的抑制剂化合物在 95%DMSO 中溶解,配制成 10mM 浓度的溶液,于 4°C 下保存备用。

[0067] 按照实验步骤 6(抑制剂抑制病毒侵染 IC₅₀ 值的测定)中所述的内容进行操作,分别测试抑制剂化合物对两种细胞(RD 细胞、Vero 细胞)在上述五种病毒侵染下的保护作用。根据实验步骤 5 中的方法观察半数细胞发生病变时对应的抑制剂浓度,并得到 IC₅₀ 值。最后测得的结果表 2 所示:

[0068] 表 2

[0069]

Vero 细胞		RD 细胞	
病毒种类	IC ₅₀ (μM)	病毒种类	IC ₅₀ (μM)
EV71 (A)	1.2×10 ⁻² μM	EV71 (A)	1.2×10 ⁻² μM
EV71 (B)	4.8×10 ⁻⁵ μM	EV71 (B)	2.4×10 ⁻² μM
EV71 (C)	4.8×10 ⁻⁵ μM	EV71 (C)	1.5×10 ⁻³ μM
CAV16 (A)	6×10 ⁻³ μM	CAV16 (A)	1.2×10 ⁻² μM
CAV16 (B)	4.8×10 ⁻⁵ μM	CAV16 (B)	4.8×10 ⁻⁵ μM

[0070]

[0071] 由以上实验可以看出,本申请的化合物对于 RD 和 Vero 两种细胞系上的 5 种手足口病致病病毒 EV71(A)、EV71(B)、EV71(C)、CAV16(A)、CAV16(B) 均有显著的抑制作用,在防治相关病毒感染和手足口病中具有广阔的应用前景。

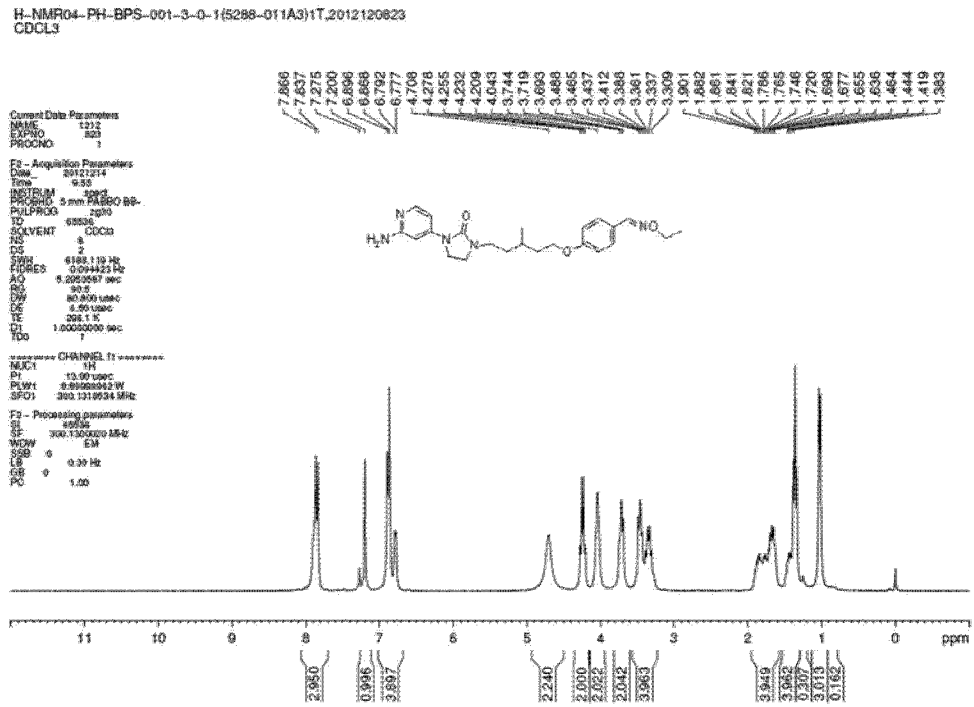


图 1

Mass Spectrum

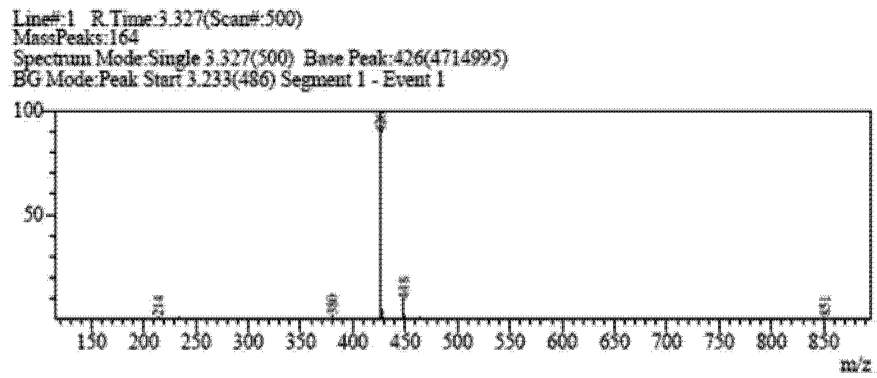


图 2