

一类氰基化合物、其制备方法及用途

本发明要求 2021 年 9 月 30 日向中国国家知识产权局提交的，专利申请号为 202111168232.4，发明名称为“一类氰基化合物、其制备方法及用途”以及 2022 年 8 月 15 日向中国国家知识产权局提交的，专利申请号为 202210973184.4，发明名称为“一类氰基化合物、其制备方法及用途”的中国专利申请的优先权。上述在先申请的全文通过援引整体并入本文中。

技术领域

本发明属于药物化学和化学合成领域，具体而言，本发明涉及一类氰基化合物、其制备方法及用途。

背景技术

冠状病毒为单链正义 RNA 病毒，部分冠状病毒能够在人群中大范围传播并可以引起严重症状。目前已知的可以感染人的冠状病毒有 7 种，分别是 HCoV-229E、HCoV-OC43、HCoV-NL63、HCoV-HKU1、SARS-CoV、MERS-CoV 和 SARS-CoV-2。冠状病毒大多数功能蛋白由 ORF1ab 基因编码，先翻译成一个多聚蛋白，再由 3CL 蛋白酶和 PL 蛋白酶切割成多个活性蛋白，因此抑制 3CL 蛋白酶活性能够有效抑制病毒的复制。不同冠状病毒 3CL 蛋白酶具有高度的结构同源性，因此 3CL 蛋白酶抑制剂具有广谱抗冠状病毒活性。

除冠状病毒以外，3CL 蛋白酶在小 RNA 病毒编码的多聚蛋白水解中也扮演重要角色，3CL 蛋白酶抑制剂能够有效抑制小 RNA 病毒复制。肠病毒 71 是一种小 RNA 病毒，它引起手足口病的常见病毒之一，还可能引起脑膜炎、脑干脑炎、心肌炎等多种疾病。近年来，肠病毒 71 多次在婴幼儿人群中爆发，临床上仍缺乏高效的治疗药物。

因此，仍需要可以抑制包括冠状病毒/肠病毒 71 等 RNA/小 RNA 病毒的化合物。

发明内容

发明人基于 3CL 蛋白酶的晶体结构，合理设计了一类氰基化合物，所述化合物可以有效抑制冠状病毒和/或小 RNA 病毒的 3CL 蛋白酶活性、在体外能够有效抑制包括肠病毒 71 在内的多种小 RNA 病毒的 3CL 蛋白酶活性，在细胞水平有效抑制小 RNA 病毒的复制，可以用于制备冠状病毒和/或小 RNA 病毒诱发疾病的药物。发明人在此基础上完成了本公开。

本发明的首要目的在于提供如通式 I 所示的氰基化合物、其外消旋体、对映异构体、非对映异构体及其药学上可接受的盐。

本发明的第二目的在于提供该类化合物的制备方法。

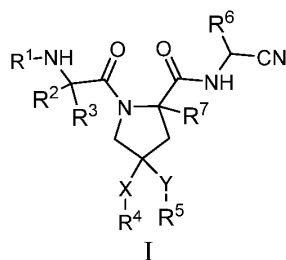
本发明的第三目的在于提供包含该类化合物的药物组合物。

本发明的第四目的在于该类化合物在制备 3CL 蛋白酶抑制剂方面的用途。

本发明的第五目的在于该类化合物在制备预防或治疗冠状病毒和/或小 RNA 病毒诱发疾病的药物方面的用途。

为了完成上述目的，本发明采用的技术方案为：

一方面，本发明提供一种如通式 I 所示的氰基化合物、其外消旋体、对映异构体、非对映异构体及其药学上可接受的盐。



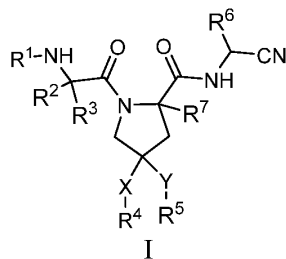
I

另一方面, 本发明提供通式 I 的化合物的制备方法。

本发明的技术方案至少具有以下技术效果:

本发明的化合物具有 3CL 蛋白酶抑制活性, 能抑制冠状病毒和小 RNA 病毒的基因表达的蛋白复合体水解, 进而抑制病毒复制和发展, 可用于冠状病毒或小 RNA 病毒感染引起疾病的预防与治疗。

本发明涉及通式 I 所示的氰基化合物、其外消旋体、对映异构体、非对映异构体或药学上可接受的盐:



I

其中,

R^1 选自 $-\text{COR}^8$ 和 $-\text{SO}_2\text{R}^9$;

R^2 与 R^3 各自独立地选自 H、D、 $\text{C}_1\sim\text{C}_{10}$ 烷基、金刚烷基和 $\text{C}_3\sim\text{C}_7$ 环烷基, 或者, R^2 与 R^3 和与之相连的碳原子形成 3~8 元碳环;

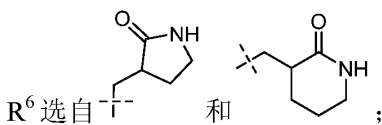
X 选自 O、S、 $\text{S}(=\text{O})_2$ 和 $\text{S}=\text{O}$;

Y 不存在或选自 O、S、 $\text{S}(=\text{O})_2$ 和 $\text{S}=\text{O}$;

R^4 选自 H、 $\text{C}_1\sim\text{C}_{10}$ 烷基、 $\text{C}_3\sim\text{C}_8$ 环烷基、 $\text{C}_6\sim\text{C}_{20}$ 芳基、 $\text{C}_1\sim\text{C}_{10}$ 烷基取代的 $\text{C}_6\sim\text{C}_{20}$ 芳基、 $\text{C}_1\sim\text{C}_{10}$ 烷氧基取代的 $\text{C}_6\sim\text{C}_{20}$ 芳基和卤代 $\text{C}_6\sim\text{C}_{20}$ 芳基;

R^5 选自 H、 $\text{C}_1\sim\text{C}_{10}$ 烷基和 $\text{C}_3\sim\text{C}_7$ 环烷基;

或者, R^4 与 R^5 彼此相连共同形成 $\text{C}_2\sim\text{C}_6$ 亚烷基, 从而连接 X 和 Y;



R^7 选自 H 和 D;

R^8 选自 H、 $\text{C}_1\sim\text{C}_{10}$ 烷基、 $\text{C}_1\sim\text{C}_{10}$ 烷氧基、 $\text{C}_3\sim\text{C}_7$ 环烷基、卤代 $\text{C}_1\sim\text{C}_{10}$ 烷基、卤代 $\text{C}_3\sim\text{C}_7$ 环烷基、 $-\text{NR}^{13}\text{R}^{14}$ 、 $\text{C}_6\sim\text{C}_{20}$ 芳基、卤代 $\text{C}_6\sim\text{C}_{20}$ 芳基、 $\text{C}_1\sim\text{C}_{10}$ 烷基取代的 $\text{C}_6\sim\text{C}_{20}$ 芳基、卤代 $\text{C}_1\sim\text{C}_{10}$ 烷基取代的 $\text{C}_6\sim\text{C}_{20}$ 芳基、5~20 元杂芳基和卤代 5~20 元杂芳基;

R^9 选自 $\text{C}_1\sim\text{C}_{10}$ 烷基、 $\text{C}_3\sim\text{C}_7$ 环烷基、卤代 $\text{C}_1\sim\text{C}_{10}$ 烷基、卤代 $\text{C}_3\sim\text{C}_7$ 环烷基、 $-\text{NR}^{15}\text{R}^{16}$ 、 $\text{C}_6\sim\text{C}_{20}$ 芳基、卤代 $\text{C}_6\sim\text{C}_{20}$ 芳基、 $\text{C}_1\sim\text{C}_{10}$ 烷基取代的 $\text{C}_6\sim\text{C}_{20}$ 芳基、卤代 $\text{C}_1\sim\text{C}_{10}$ 烷基取代的 $\text{C}_6\sim\text{C}_{20}$ 芳基、5~20 元杂芳基和卤代 5~20 元杂芳基;

R^{13} 和 R^{14} 各自独立地选自 H 和 $\text{C}_1\sim\text{C}_{10}$ 烷基;

R^{15} 和 R^{16} 各自独立地选自 H 和 $\text{C}_1\sim\text{C}_{10}$ 烷基。

在一些实施方式中, R^2 与 R^3 各自独立地选自 H、D、 $C_1\sim C_6$ 烷基、金刚烷基和 $C_3\sim C_7$ 环烷基, 或者, R^2 与 R^3 和与之相连的碳原子形成 3~8 元碳环。

在一些实施方式中, R^2 与 R^3 各自独立地选自 H、异丙基、叔丁基、环戊基和金刚烷基, 或者, R^2 与 R^3 和与之相连的碳原子形成环丙基和环戊基。

在一些实施方式中, R^2 与 R^3 中的一个选自 H, 另一个选自异丙基、叔丁基、环戊基和金刚烷基, 或者, R^2 与 R^3 和与之相连的碳原子形成环丙基和环戊基。

在一些实施方式中, R^4 选自 H、 $C_1\sim C_6$ 烷基、 $C_3\sim C_8$ 环烷基、 $C_6\sim C_{10}$ 芳基、 $C_1\sim C_6$ 烷基取代的 $C_6\sim C_{10}$ 芳基、 $C_1\sim C_6$ 烷氧基取代的 $C_6\sim C_{10}$ 芳基和卤代 $C_6\sim C_{10}$ 芳基;

R^5 选自 H、 $C_1\sim C_6$ 烷基和 $C_3\sim C_7$ 环烷基;

或者, R^4 与 R^5 彼此相连共同形成 $C_2\sim C_6$ 亚烷基, 从而连接 X 和 Y。

在一些实施方式中, X 选自 O、S、 $S(=O)_2$ 和 $S=O$; Y 不存在或选自 O、S 和 $S=O$; R^4 选自 $C_1\sim C_6$ 烷基和 $C_6\sim C_{10}$ 芳基, R^5 选自 H; 或者, R^4 与 R^5 彼此相连共同形成 $C_2\sim C_6$ 亚烷基, 从而连接 X 和 Y。

在一些实施方式中, R^4 与 R^5 彼此相连共同形成 CH_2CH_2 和 $CH_2CH_2CH_2$, 从而连接 X 和 Y。

在一些实施方式中, X、Y 各自独立地选自 O、S 和 $S=O$, R^4 与 R^5 彼此相连共同形成 CH_2CH_2 和 $CH_2CH_2CH_2$, 从而连接 X 和 Y。

在一些实施方式中, X、Y 各自独立地选自 O 和 S, R^4 与 R^5 彼此相连共同形成 CH_2CH_2 , 从而连接 X 和 Y。

在一些实施方式中, X、Y 均选自 S, 或者 X、Y 均选自 O, R^4 与 R^5 彼此相连共同形成 CH_2CH_2 , 从而连接 X 和 Y。

在一些实施方式中, X 选自 S, Y 不存在, R^4 选自苯基和异丙基, R^5 选自 H。



在一些实施方式中, R^6 选自 $-I^-$ 。

在一些实施方式中, R^7 选自 H。

在一些实施方式中, R^8 选自 H、 $C_1\sim C_6$ 烷基、 $C_1\sim C_6$ 烷氧基、 $C_3\sim C_7$ 环烷基、卤代 $C_1\sim C_6$ 烷基、卤代 $C_3\sim C_7$ 环烷基、 $-NR^{13}R^{14}$ 、 $C_6\sim C_{10}$ 芳基、卤代 $C_6\sim C_{10}$ 芳基、 $C_1\sim C_6$ 烷基取代的 $C_6\sim C_{10}$ 芳基、卤代 $C_1\sim C_6$ 烷基取代的 $C_6\sim C_{10}$ 芳基、5~10 元杂芳基和卤代 5~10 元杂芳基。

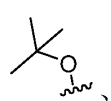
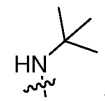
在一些实施方式中, R^8 选自 $C_1\sim C_6$ 烷基、卤代 $C_1\sim C_6$ 烷基、 $C_1\sim C_6$ 烷氧基、 $-NR^{13}R^{14}$ 、 $C_3\sim C_7$ 环烷基、卤代 $C_3\sim C_7$ 环烷基、苯基、卤代苯基、 $C_1\sim C_6$ 烷基取代的苯基、卤代 $C_1\sim C_6$ 烷基取代的苯基和 5~6 元杂芳基。

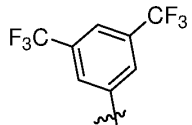
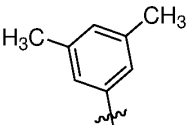
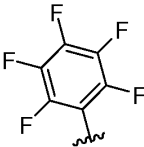
在一些实施方式中, R^9 选自 $C_1\sim C_6$ 烷基、 $C_3\sim C_7$ 环烷基、卤代 $C_1\sim C_6$ 烷基、卤代 $C_3\sim C_7$ 环烷基、 $-NR^{15}R^{16}$ 、 $C_6\sim C_{10}$ 芳基、卤代 $C_6\sim C_{10}$ 芳基、 $C_1\sim C_6$ 烷基取代的 $C_6\sim C_{10}$ 芳基、卤代 $C_1\sim C_6$ 烷基取代的 $C_6\sim C_{10}$ 芳基、5~10 元杂芳基和卤代 5~10 元杂芳基。

在一些实施方式中, R^9 选自 $C_1\sim C_6$ 烷基、 $C_3\sim C_7$ 环烷基、苯基、 $C_1\sim C_6$ 烷基取代的苯基和卤代 $C_1\sim C_6$ 烷基取代的苯基。

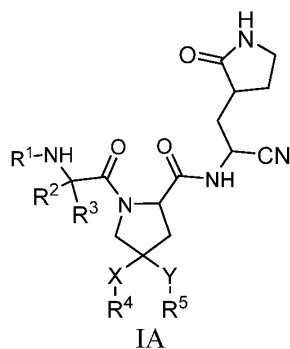
在一些实施方式中, R^{13} 和 R^{14} 各自独立地选自 H 和 $C_1\sim C_6$ 烷基。

在一些实施方式中, R^{15} 和 R^{16} 各自独立地选自 H 和 $C_1\sim C_6$ 烷基。

在一些实施方式中, R^8 选自 CH_3 、 CF_3 、 CH_2CF_3 、 CF_2CF_3 、甲氧基、、、

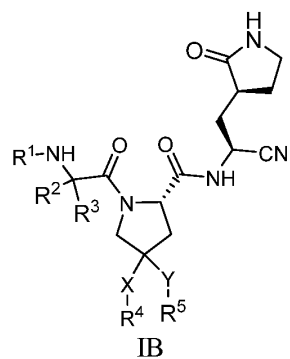
环丙基、、苯基、、、 和吡啶-3-基。

在一些实施方式中， R^9 选自 CH_3 、环丙基、苯基、对甲基苯基和对三氟甲基苯基。
 在一些实施方式中，通式 I 所示的氰基化合物选自通式 IA 所示的氰基化合物：



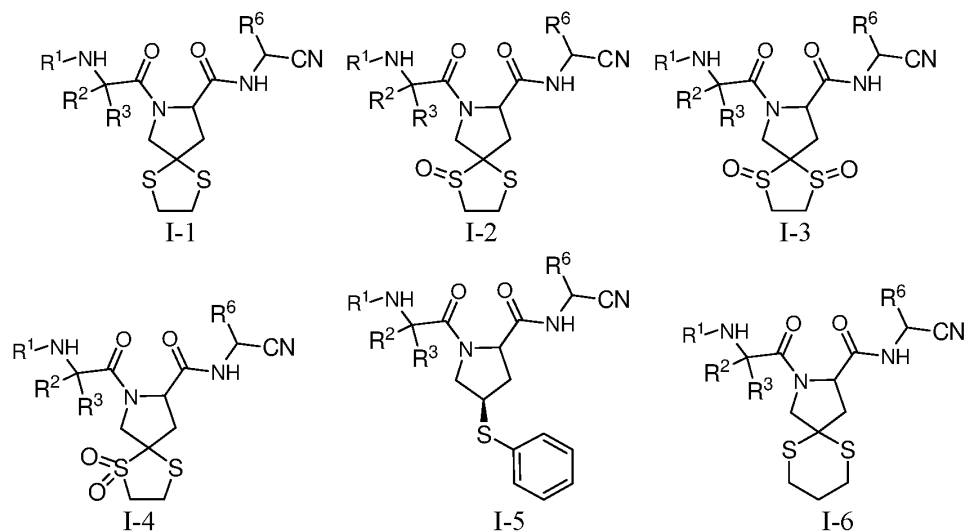
其中， R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、X 和 Y 如上文所定义。

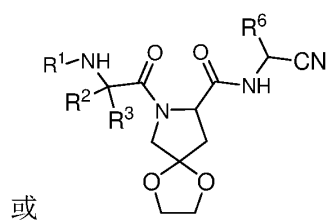
在一些实施方式中，通式 I 所示的氰基化合物选自通式 IB 所示的氰基化合物：



其中，各取代基定义如上所述。

在一些实施方式中，通式 I 所示的氰基化合物选自如下通式所示的氰基化合物中的一种：

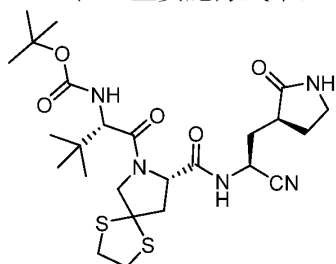




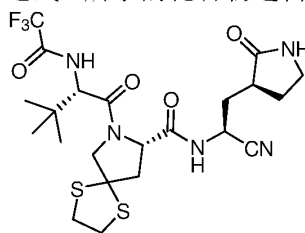
I-7

其中, R^1 、 R^2 、 R^3 和 R^6 如上文所定义。

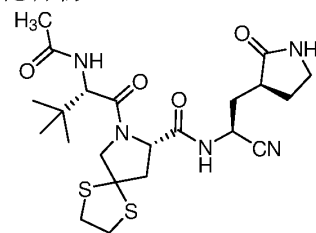
在一些实施方式中, 本发明通式 I 所示的化合物选自以下化合物:



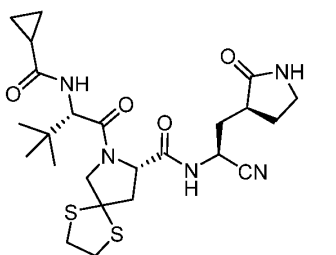
化合物 1



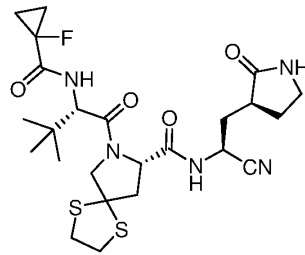
化合物 2



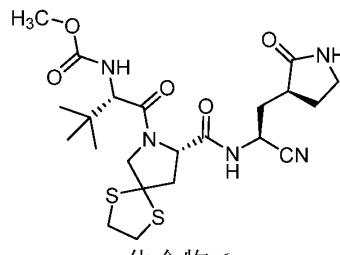
化合物 3



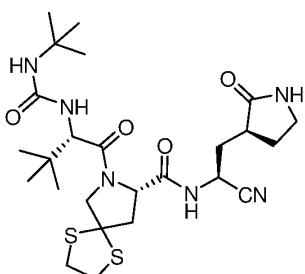
化合物 4



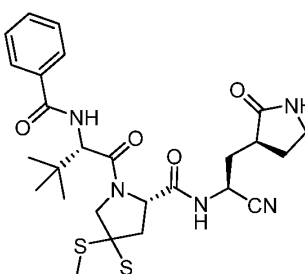
化合物 5



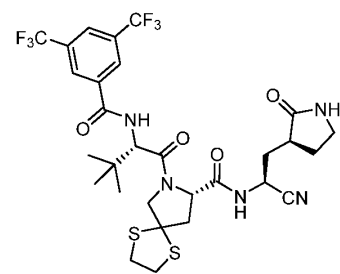
化合物 6



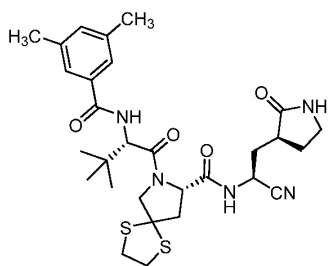
化合物 7



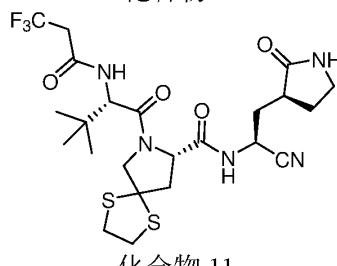
化合物 8



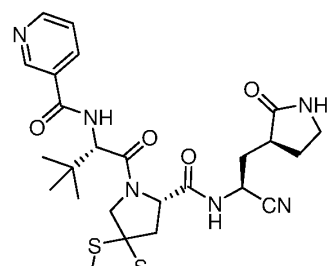
化合物 9



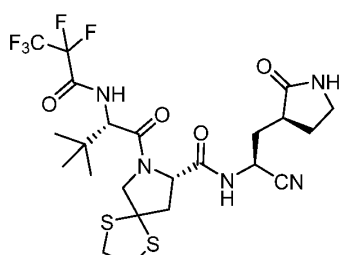
化合物 10



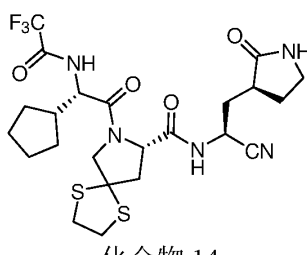
化合物 11



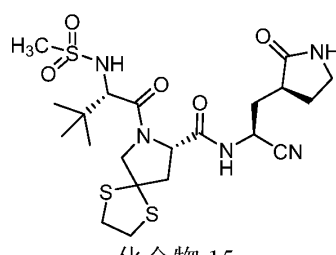
化合物 12



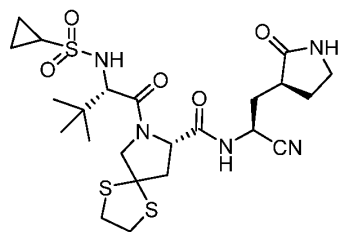
化合物 13



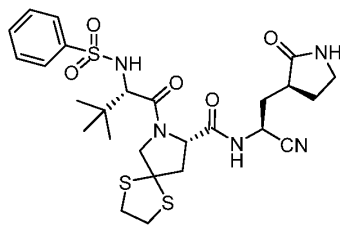
化合物 14



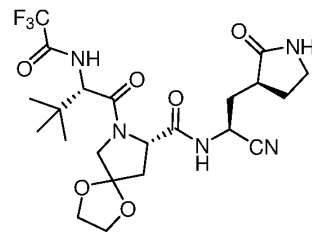
化合物 15



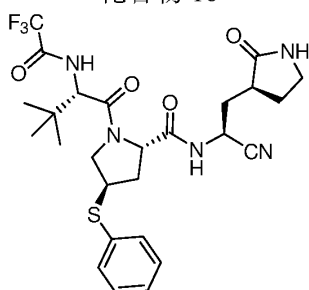
化合物 16



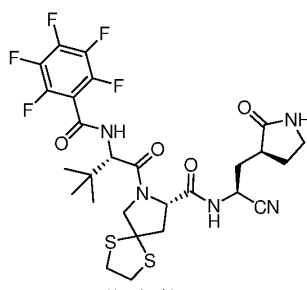
化合物 17



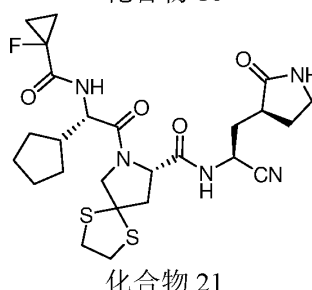
化合物 18



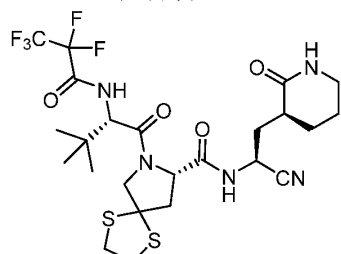
化合物 19



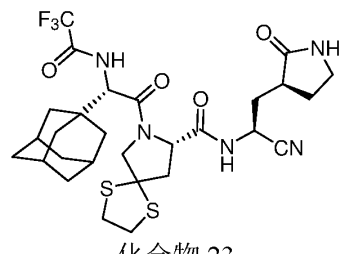
化合物 20



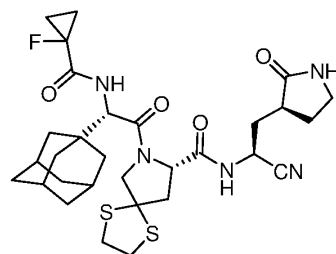
化合物 21



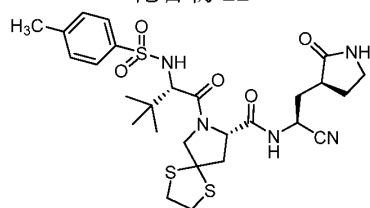
化合物 22



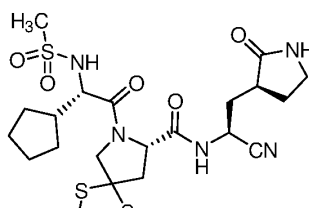
化合物 23



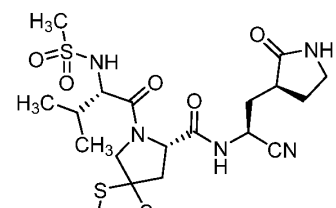
化合物 24



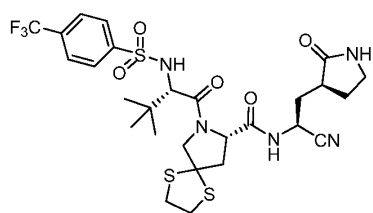
化合物 25



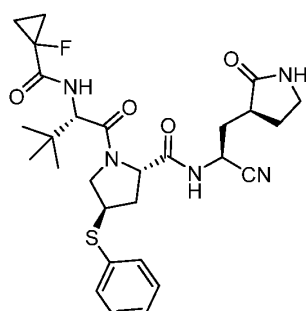
化合物 26



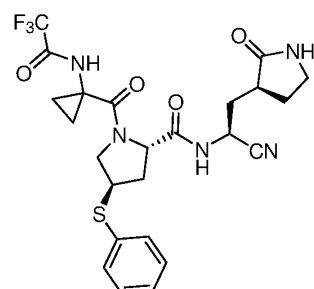
化合物 27



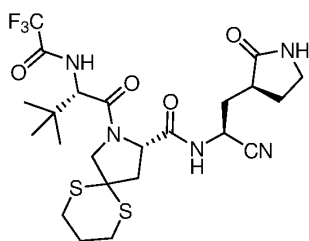
化合物 28



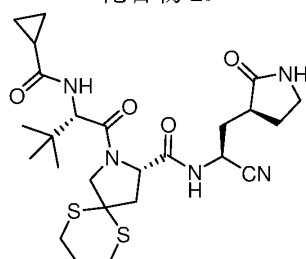
化合物 29



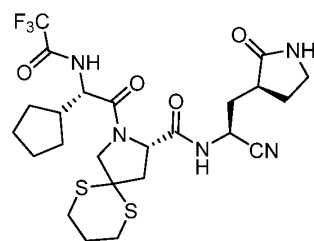
化合物 30



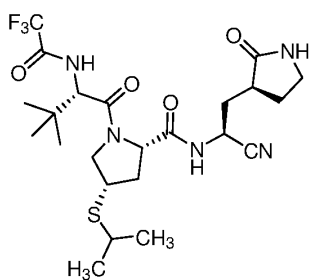
化合物 31



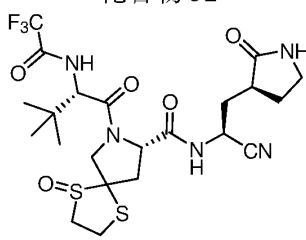
化合物 32



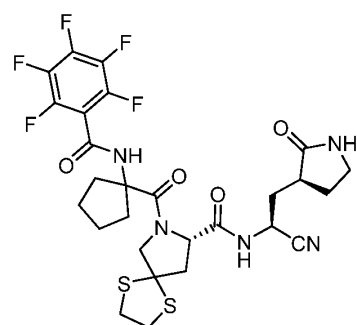
化合物 33



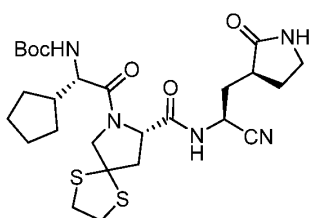
化合物 34



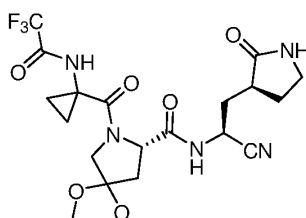
化合物 35



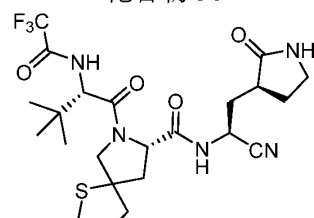
化合物 36



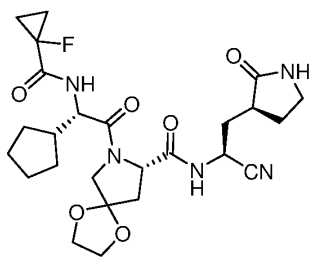
化合物 37



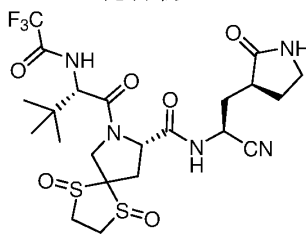
化合物 38



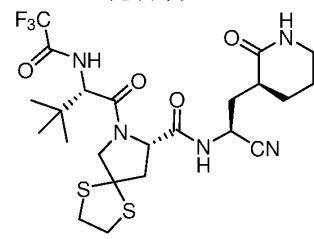
化合物 39



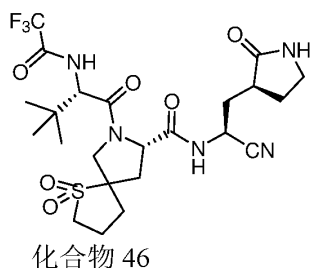
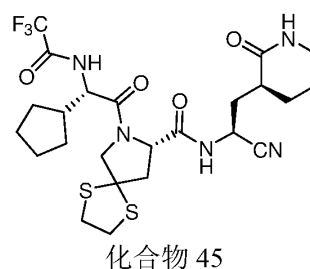
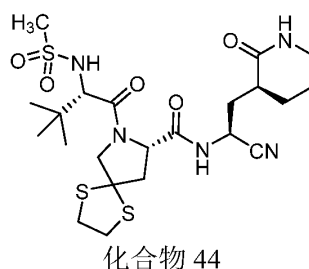
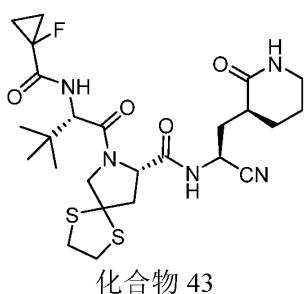
化合物 40



化合物 41



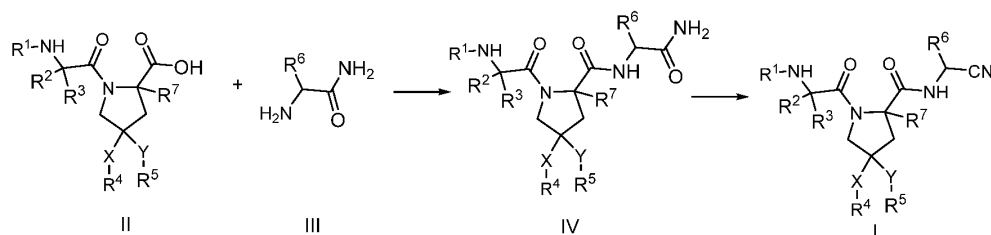
化合物 42



。

本发明提供了制备通式 I 所示化合物的方法，所述方法为以下方法之一：

方法 i：



ia) 由式 II 所示化合物与式 III 所示化合物通过缩合反应得到式 IV 所示化合物；

优选地，所述步骤 ia) 为：式 II 所示化合物在 -20℃~50℃ 温度下，在溶剂中，通过缩合剂和碱的作用与式 III 所示化合物反应 0.1-12h，从而得到式 IV 所示化合物；

其中，所述溶剂为以下的一种或几种混合，四氢呋喃、二氯甲烷、N,N-二甲基甲酰胺、N,N-二甲基乙酰胺、乙酸乙酯和 1,4-二氧六环；

任选地，所述缩合剂为以下的一种或几种混合：2-(7-氮杂苯并三氮唑)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸、1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐、1-羟基苯并三唑、2-羟基吡啶-N-氧化物、1-丙基磷酸酐、1H-苯并三唑-1-基氧三吡咯烷基六氟磷酸盐、N,N'-羰基二咪唑和 O-苯并三氮唑-四甲基脲六氟磷酸盐；

任选地，所述碱为 N,N-二异丙基乙胺、三乙胺和 N-甲基吗啉；

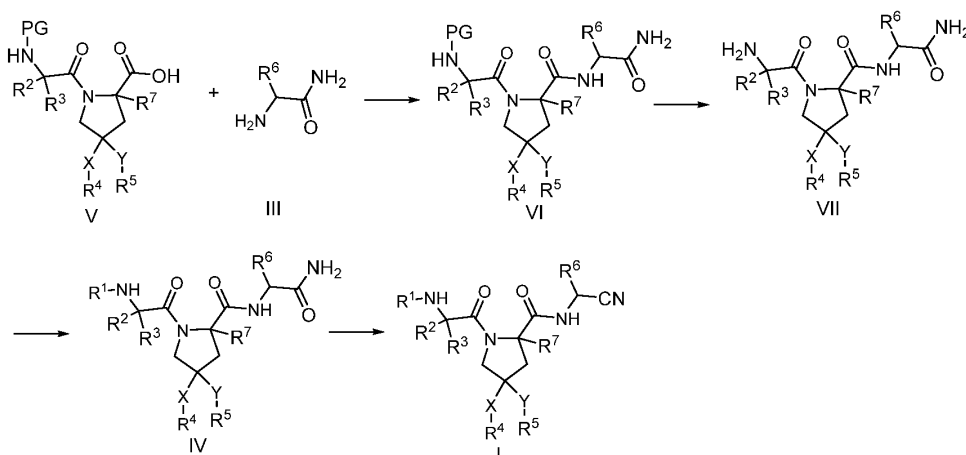
ib) 式 IV 所示化合物通过脱水得到通式 I 所示化合物；

优选地，所述步骤 ib) 为：式 IV 所示化合物在 -20℃~50℃ 温度下，在无水溶剂中，与脱水剂反应 1-24h 得到通式 I 所示化合物；

其中，所述无水溶剂为以下的一种或几种混合，四氢呋喃、二氯甲烷、甲苯、1,4-二氧六环和吡啶；

所述脱水剂为三氟醋酸酐和 N-(三乙基铵磺酰)氨基甲酸甲酯；或者

方法 ii：



ii a) 由式 V 所示化合物与式 III 所示化合物缩合得到式 VI 所示化合物，其中式 V 所示化合物中的 PG 为氨基的保护基团；

优选地，所述步骤 ii a) 为：式 V 所示化合物在 -20°C ~ 50°C 温度下，在溶剂中，通过缩合剂和碱的作用与式 III 所示化合物反应 0.1-12h，从而得到式 VI 所示化合物，

其中，所述溶剂为以下的一种或几种混合，四氢呋喃、二氯甲烷、N,N-二甲基甲酰胺、N,N-二甲基乙酰胺、乙酸乙酯和 1, 4-二氧六环，

所述缩合剂为以下的一种或几种混合，2-(7-氮杂苯并三氮唑)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸、1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐、1-羟基苯并三唑、2-羟基吡啶-N-氧化物、1-丙基磷酸酐、1H-苯并三唑-1-基氧三吡咯烷基六氟磷酸盐、N,N'-羰基二咪唑和 O-苯并三氮唑-四甲基脲六氟磷酸盐；

所述碱为 N,N-二异丙基乙胺、三乙胺和 N-甲基吗啉；

所述氨基的保护基团 PG 为叔丁氧羰基、苄基和对甲氧基苄基；

ii b) 式 VI 所示化合物脱保护得到式 VII 所示化合物；

优选地，所述步骤 ii b) 为：在 -20°C ~ 50°C 温度下，将式 VI 所示化合物与三氟醋酸或氯化氢的有机溶液或 Pd/C/H₂ 反应得到式 VII 所示化合物；

ii c) 式 VII 所示化合物通过氨基酰化、磺酰化或缩合反应得到式 IV 所示化合物；

优选地，所述步骤 ii c) 为：

在 -20°C ~ 50°C 温度下，将式 VII 所示化合物与酰氯或酸酐在加入碱的条件下进行氨基酰化反应得到式 IV 所示化合物；或者，

在 -20°C ~ 50°C 温度下，将式 VII 所示化合物与磺酰氯或磺酸酐在碱的条件下进行磺酰化反应得到式 IV 所示化合物；或者，

在 -20°C ~ 50°C 温度下，将式 VII 所示化合物与羧基化合物在缩合剂与碱的条件下进行缩合反应得到式 IV 所示化合物；

任选地，所述碱为 N,N-二异丙基乙胺、三乙胺和 N-甲基吗啉；

任选地，所述缩合剂为以下的一种或几种混合，2-(7-氮杂苯并三氮唑)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸、1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐、1-羟基苯并三唑、2-羟基吡啶-N-氧化物、1-丙基磷酸酐、1H-苯并三唑-1-基氧三吡咯烷基六氟磷酸盐、N,N'-羰基二咪唑和 O-苯并三氮唑-四甲基脲六氟磷酸盐，

ii d) 式 IV 所示化合物通过脱水得到式 I 所示化合物；

优选地，所述步骤 ii d) 为：式 IV 所示化合物在 -20°C ~ 50°C 温度下，在无水溶剂中，与脱水剂反应 1-24h 得到式 I 所示化合物；

其中，所述无水溶剂为以下的一种或几种混合，四氢呋喃、二氯甲烷、甲苯、1, 4-二氧六环和吡啶；

任选地，所述脱水剂为三氟醋酸酐和 N-(三乙基铵磺酰)氨基甲酸甲酯，

其中，各取代基定义如上所述。

本发明另一方面还提供一种药物组合物，其包含选自通式 I 的氰基化合物，其外消旋体、对映异构体和非对映异构体，和它们的药学上可接受的盐中的一种或多种。所述药物组合物还可以包括一种或者多种药学上可接受的辅料、稀释剂、载体、赋形剂或佐剂。

本发明另一方面还提供一种药物组合物，其包含选自通式 I 的氰基化合物，或其外消旋体、对映异构体、非对映异构体或药学上可接受的盐，以及药学上可接受的辅料；任选地，所述药物组合物还进一步包含利托那韦或其药学上可接受的盐。

本发明另一方面还提供一种药物组合，其包含选自通式 I 的氰基化合物，其外消旋体、对映异构体、非对映异构体或药学上可接受的盐，以及利托那韦或其药学上可接受的盐。

本发明另一方面还提供一种药物组合物，其包含选自通式 I 的氰基化合物或其药学上可接受的盐，利托那韦或其药学上可接受的盐，以及药学上可接受的辅料。

经实验证明，本发明化合物具有冠状病毒 3CL 蛋白酶和小 RNA 病毒的 3CL 蛋白酶抑制活性。

因此，本发明再一方面提供一种冠状病毒 3CL 蛋白酶抑制剂和/或一种小 RNA 病毒的 3CL 蛋白酶抑制剂，其包含选自通式 I 的氰基化合物，其外消旋体、对映异构体和非对映异构体，和它们的药学上可接受的盐中的一种或多种，或上述药物组合物。

本发明还提供上述氰基化合物，其外消旋体、对映异构体、非对映异构体、其药学上可接受的盐，或它们的混合物，或上述药物组合物在制备药物中的用途，所述药物选自用于抑制冠状病毒 3CL 蛋白酶活性的药物，用于预防和/或治疗冠状病毒感染的药物，用于抑制小 RNA 病毒的 3CL 蛋白酶活性的药物，和用于预防和/或治疗小 RNA 病毒感染的药物。

本发明还提供一种抑制 3CL 蛋白酶的方法，所述方法包括向需要处理的对象施用根据选自本发明的通式 I 的氰基化合物，其外消旋体、对映异构体和非对映异构体，和它们的药学上可接受的盐中的一种或多种，或者根据本发明的药物组合物。

本发明还提供一种预防和/或治疗疾病或病症的方法，所述方法包括向需要治疗的对象施用根据选自本发明的通式 I 的氰基化合物，其外消旋体、对映异构体和非对映异构体，和它们的药学上可接受的盐中的一种或多种，或者根据本发明的药物组合物，所述疾病或病症为 3CL 蛋白酶介导的疾病或病症，特别是与冠状病毒感染和/或小 RNA 病毒感染相关的疾病或病症。

本发明还提供上述通式 I 所示氰基化合物，其外消旋体、对映异构体和非对映异构体，和它们的药学上可接受的盐中的一种或多种，或其药物组合物在制备预防或治疗由冠状病毒和/或小 RNA 病毒感染引起的相关疾病的药物中的用途。

本发明还提供预防或治疗由冠状病毒和/或小 RNA 病毒感染引起的相关疾病的方法，该方法包括给以患者治疗上有效剂量的包含本发明通式 I 所示氰基化合物，其外消旋体、对映异构体和非对映异构体，和它们的药学上可接受的盐中的一种或多种的药物制剂。

在一些实施方式中，所述冠状病毒选自 SARS-CoV、MERS-CoV、H229E-CoV、HKU1-CoV、NL63-CoV、OC43-CoV 或 SARS-CoV-2。

在一些实施方式中，所述冠状病毒感染引起的相关疾病选自呼吸道感染、肺炎或其并发症。

术语定义和说明

“C₁~C₁₀ 烷基”表示具有 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个碳原子的直链或支链饱和和烃基。所述烷基的具体实例包括但不限于甲基、乙基、丙基、丁基、戊基、己基、异丙基、异丁基、仲丁基、叔丁基、异戊基、2-甲基丁基、1-甲基丁基、1-乙基丙基、1, 2-二甲基丙基、新戊基、1, 1-二甲基丙基、4-甲基戊基、3-甲基戊基、2-甲基戊基、1-甲基戊基、2-乙基丁基、1-乙基丁基、3, 3-二甲基丁基、2, 2-二甲基丁基、1, 1-二甲基丁基、2, 3-二甲基丁基、1, 3-二甲基丁基或 1, 2-二甲基丁基等；“C₁~C₆ 烷基”表示直链或支链的含有 1-6 个碳原子的烷基，包含但不限于甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基、叔丁基、戊基、异戊基、己基等。

“亚烷基”可理解为表示具有直链或支链饱和二价烃基。“C₂~C₆ 亚烷基”可理解为表示具有直链或支链饱和二价烃基，其具有 2-6 个碳原子，包含但不限于 CH₂CH₂、CH₂CH₂CH₂、

“C₃~C₈ 环烷基”表示含有 3-8 个环碳原子的环状烷基。“C₃~C₇ 环烷基”表示含有 3-7 个环碳原子的环状烷基，本公开的环烷基包括但不限于环丙基、甲基环丙基、乙基环丙基、二甲基环丙基、环丁基、甲基环丁基、乙基环丁基、环戊基、环己基等。

“芳基”是指具有共轭的 π 电子体系的全碳单环或稠合多环的芳香环基团。芳基可以具有 6-20 个碳原子, 6-14 个碳原子或 6-12 个碳原子。“ $C_6 \sim C_{20}$ 芳基”可理解为具有 6~20 个碳原子的芳基。特别是具有 6 个碳原子的环(“ C_6 芳基”), 例如苯基; 或者具有 9 个碳原子的环(“ C_9 芳基”), 例如茚满基或茚基; 或者具有 10 个碳原子的环(“ C_{10} 芳基”), 例如四氢化萘基、二氢萘基或萘基; 或者具有 13 个碳原子的环(“ C_{13} 芳基”), 例如芴基; 或者是具有 14 个碳原子的环(“ C_{14} 芳基”), 例如蒽基。“ $C_6 \sim C_{10}$ 芳基”可理解为具有 6~10 个碳原子的芳基。特别是具有 6 个碳原子的环(“ C_6 芳基”), 例如苯基; 或者具有 9 个碳原子的环(“ C_9 芳基”), 例如茚满基或茚基; 或者具有 10 个碳原子的环(“ C_{10} 芳基”), 例如四氢化萘基、二氢萘基或萘基。

“卤素”选自氟、氯、溴、碘。

“卤代”包括单卤代、多卤代或全卤代，即一个、多个或全部氢原子被卤素取代。

“取代”是指基团上的一个或多个氢原子被一个或多个取代基取代。

术语“任选”或“任选地”是指随后描述的事件或情况可以发生或不发生，该描述包括发生所述事件或情况和不发生所述事件或情况。

“治疗有效量”意指(i) 治疗特定疾病、病况或障碍, (ii) 减轻、改善或消除特定疾病、病况或障碍的一种或多种症状, 或(iii)延迟本文中所述的特定疾病、病况或障碍的一种或多种症状发作的本发明化合物的用量。构成“治疗有效量”的本发明化合物的量取决于该化合物、疾病状态及其严重性、给药方式以及待治疗的哺乳动物的年龄而改变, 但可例行性地由本领域技术人员根据其自身的知识及本公开内容而确定。

“药学上可接受的盐”是指药学上可接受的酸或碱的盐,包括化合物与无机酸或有机酸形成的盐,以及化合物与无机碱或有机碱形成的盐。

术语“药物组合”是指包含两种或两种以上的活性成分或其药学上可接受的盐的组合。在本发明的一些实施方式中，所述药物组合中的活性成分或其药学上可接受的盐可以同时施用，在本发明的一些实施方式中，所述药物组合中的活性成分或其药学上可接受的盐也可以分别或序贯施用。

“药物组合物”是指一种或多种本发明的化合物或其盐与药学上可接受的辅料组成的混合物。药物组合物的目的是有利于对有机体给予本发明的化合物。

“药学上可接受的辅料”是指对有机体无明显刺激作用，而且不会损害该活性化合物

的生物活性及性能的那些辅料。合适的辅料是本领域技术人员熟知的，例如碳水化合物、蜡、水溶性和/或水可膨胀的聚合物、亲水性或疏水性材料、明胶、油、溶剂、水等。

附图说明

图 1 为化合物 2 对 SARS-CoV-2 的 WIV04 株体外活性的抑制率-浓度的图。

图 2 为化合物 2 对 SARS-CoV-2 的 B.1.351 株体外活性的抑制率-浓度的图。

图 3 为实施例 26 中分别感染 2 天后(图 A)及 4 天后(图 B)化合物 2 对小鼠肺部病毒滴度的抑制效果图。

图 4 为实施例 26 中的小鼠体重变化图。

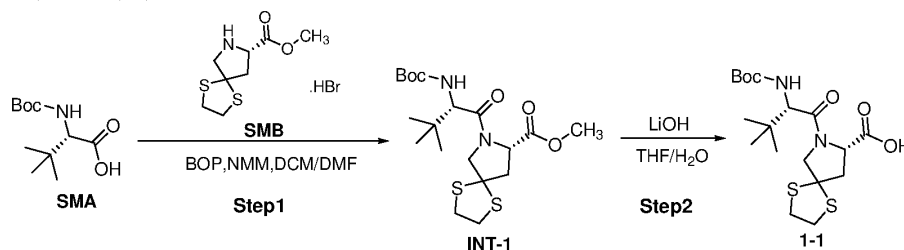
图 5 为实施例 26 中感染 4 天后化合物 2 对小鼠脑部病毒滴度的抑制效果图。

具体实施方式

以下通过实施例进一步描述本公开。在以下的实施例中，原料可商业购买，或者能够通过文献中记载的方法/本领域已知的有机合成方法制备。

实施例 1

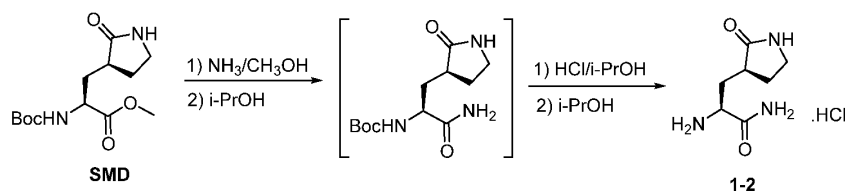
化合物 1-1 制备：



步骤 1：将起始原料 SMA (2.74g, 11.85mmol)、35ml 二氯甲烷和 35ml DMF 加入反应瓶中，降温至 0℃，依次加入起始原料 SMB (3.56g, 11.86mmol)、苯并三氮唑-1-基氧基三(二甲氨基)磷鎓六氟磷酸盐 (BOP, 6.29g, 14.22mmol) 和 N-甲基吗啉 (NMM, 3.91ml, 35.56mmol)，升温至室温反应 10h，反应结束后，加入适量二氯甲烷，有机相依次用 1N 盐酸水溶液、饱和食盐水洗涤，洗涤结束后有机相用无水硫酸钠干燥，有机相浓缩至干，柱层析得 3.71g INT-1；ESI-MS: 433.2 m/z [M+H]⁺；¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ_H: 6.75 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 4.38 (t, J = 8.2 Hz, 1H), 4.25 (d, J = 10.9 Hz, 1H), 4.11 (d, J = 9.3 Hz, 1H), 3.93 (t, J = 9.3 Hz, 1H), 3.62 (s, 3H), 3.40-3.31 (m, 4H), 2.70 (dd, J = 13.1, 7.9 Hz, 1H), 2.37 (dd, J = 13.2, 8.4 Hz, 1H), 1.37 (s, 9H), 0.94 (s, 9H)。

步骤 2：将 INT-1 (3.71g, 8.58mmol)、37ml 的 THF 和 37ml 的纯化水和一水合氢氧化锂 (0.72g, 17.16mmol) 加入反应瓶中，室温反应 2h，反应结束后，用浓盐酸调至 pH=4，过滤，得 3.4g 化合物 1-1；ESI-MS: 419.2 m/z [M+H]⁺；¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ_H: 12.68 (s, 1H), 6.71 (d, J = 9.4 Hz, 1H), 4.38-4.19 (m, 2H), 4.11 (d, J = 9.4 Hz, 1H), 3.88 (d, J = 10.9 Hz, 1H), 3.41-3.29 (m, 4H), 2.69 (dd, J = 13.1, 7.9 Hz, 1H), 2.34 (dd, J = 13.2, 8.9 Hz, 1H), 1.38 (s, 9H), 0.94 (s, 9H)。

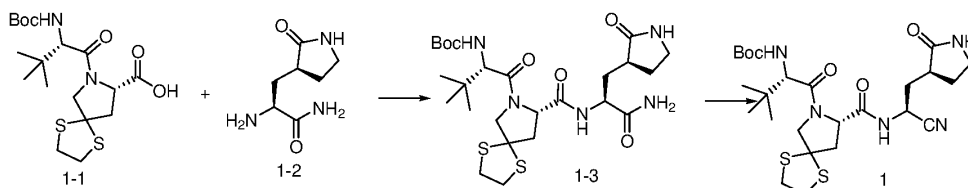
化合物 1-2 制备：



将氨气-甲醇溶液 (700ml, 7mol/L)、起始原料 SMD (100g, 0.349mol) 加入反应瓶

中, 搅拌溶清, 保温 $25 \pm 5^\circ\text{C}$, 反应 36h, 反应结束后, 将反应液浓缩至剩余反应液约为 250ml, 加入异丙醇 300ml 继续减压浓缩至剩余反应液约 250ml (重复三次), 氮气置换, 降温至 $10 \pm 5^\circ\text{C}$, 将 500ml 氯化氢-异丙醇溶液 (4mol/L) 加入反应釜中, 加入结束后, 升温至 $25 \pm 5^\circ\text{C}$, 保温 $25 \pm 5^\circ\text{C}$ 反应 9h。反应结束后, 将反应液减压浓缩至剩余反应液体积约 250ml, 加入 300ml 异丙醇继续减压浓缩至剩余反应液体积约 250ml (重复两次), 加入 100ml 异丙醇, 搅拌 $30 \pm 5\text{min}$, 过滤, 滤饼用 50ml 异丙醇淋洗, 得湿品; $45 \pm 5^\circ\text{C}$ 真空干燥, 得 66.7g 化合物 1-2, 收率: 92%; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ_{H} : 8.45 (d, $J = 5.1\text{ Hz}$, 3H), 8.25 – 8.04 (m, 1H), 7.95 (s, 1H), 7.67 – 7.49 (m, 1H), 3.85-3.80 (m, 1H), 3.19-3.13 (m, 2H), 2.59 – 2.51 (m, 1H), 2.32-2.27 (m, 1H), 2.05-1.98 (m, 1H), 1.82 – 1.66 (m, 2H); ESI-MS: 172.1 m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

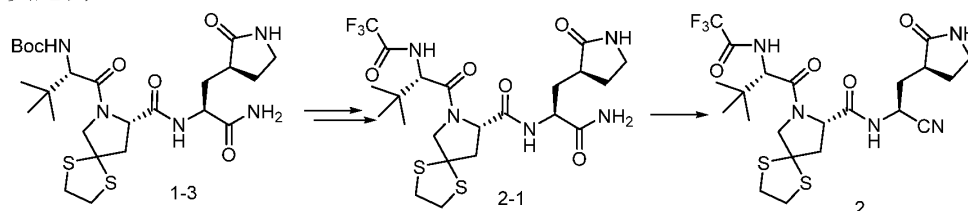
化合物 1 的制备:



化合物 1-1 (419 mg, 1 mmol) 置于双口瓶中, 氮气保护下加入 5 mL 二氯甲烷, 随后加入 2-(7-氮杂苯并三氮唑)-N,N,N',N'-四甲基脒六氟磷酸酯 (400 mg, 1.1 mmol) 室温下搅拌 1h。化合物 1-2 (1 mmol) 溶于 1 mL 二氯甲烷中加入到以上体系中, 随后在冰水浴下加入 N,N-二异丙基乙胺 (0.5 mL, 1 mmol), 撤去冰水浴, 体系置于室温搅拌过夜。后处理, 加二氯甲烷 50mL 后用 1M 盐酸水溶液洗三次, 碳酸氢钠饱和水溶液洗三次, 饱和食盐水洗有机相, 无水硫酸钠干燥, 过滤旋干得到化合物 1-3 (白色固体, 469 mg, 产率 82%)。ESI-MS: m/z 572.3 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

化合物 1-3 (114 mg, 0.2 mmol) 与伯吉斯试剂 (1.5 eq) 加入到双口瓶中, 充放氮气三次后加入分子筛干燥过的二氯甲烷, 室温搅拌过夜, 薄层层析检测显示原料基本反应完全。后处理, 柱层析得到化合物 1 (白色固体, 52 mg, 产率 47%), ESI-MS: 554.3 m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

实施例 2

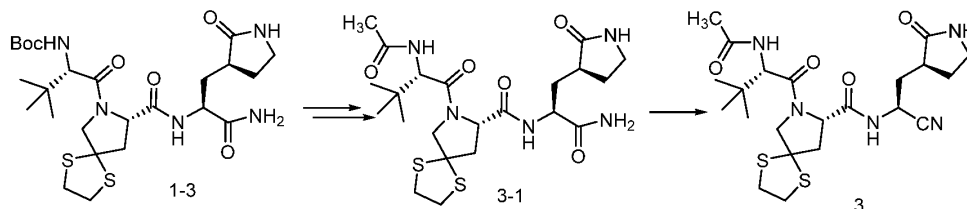


化合物 1-3 (572 mg, 1 mmol) 溶于 3 mL 4M 氯化氢/1, 4-二氧六环溶液中, 或者溶于 2 mL 二氯甲烷后逐滴加入 2 mL 三氟醋酸, 环境温度下搅拌, 薄层层析检测显示原料基本反应完全后充分旋干溶剂。得到的粗品溶于 2 mL 二氯甲烷, 氮气保护, 加入三乙胺 (3 mmol) 后将体系置于冰水浴中, 逐滴加入三氟醋酸酐 (1.2 mmol), 薄层层析检测显示原料基本反应完全后, 加二氯甲烷 50mL 后用 1M 盐酸水溶液洗三次, 碳酸氢钠饱和水溶液洗三次, 饱和食盐水洗有机相, 无水硫酸钠干燥, 过柱得到化合物 2-1 (白色固体, 265 mg, 产率 46%)。ESI-MS: m/z 568.3 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

化合物 2-1 (113 mg, 0.2 mmol) 与伯吉斯试剂 (1.5 eq) 加入到双口瓶中, 充放氮气三次后加入分子筛干燥过的二氯甲烷, 室温搅拌过夜, 薄层层析检测显示原料基本反应完全。后处理, 柱层析得到化合物 2 (白色固体, 41 mg, 产率 47%), $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 9.46 (d, $J = 8.7\text{ Hz}$, 1H), 9.05 (d, $J = 8.6\text{ Hz}$, 1H), 7.67 (s, 1H), 4.97 (ddd, $J = 11.0, 8.5, 5.0$

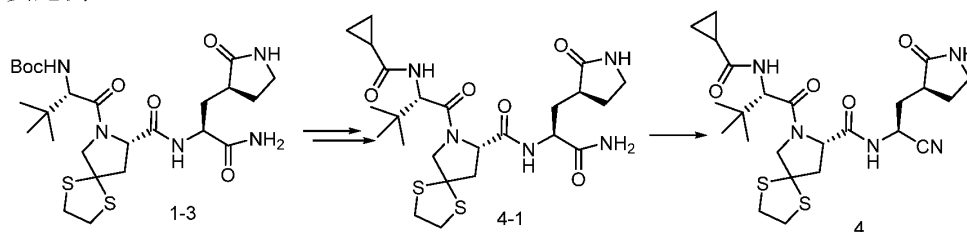
Hz, 1H), 4.53 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 4.34 (dd, $J = 9.9, 7.1$ Hz, 1H), 4.26–4.14 (m, 1H), 3.92 (d, $J = 10.9$ Hz, 1H), 3.50–3.34 (m, 4H), 3.22–3.11 (m, 1H), 3.06 (td, $J = 9.3, 7.1$ Hz, 1H), 2.68–2.58 (m, 1H), 2.50–2.43 (m, 1H), 2.31 (dd, $J = 13.0, 10.0$ Hz, 1H), 2.23–2.07 (m, 2H), 1.71 (tdd, $J = 14.9, 10.3, 7.4$ Hz, 2H), 0.99 (s, 9H). ESI-MS: 550.3 m/z $[M+H]^+$.

实施例 3



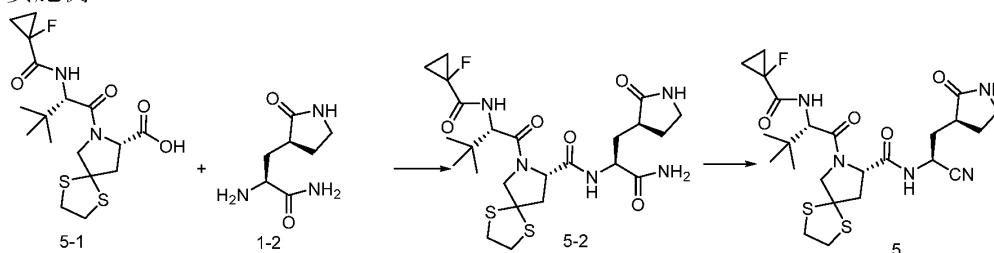
按照实施例 2 中相同的方法, 不同之处在于: 以醋酸酐代替三氟醋酸酐, 得到化合物 3(白色固体, 45 mg, 产率 45%), ESI-MS: 496.3 m/z $[M+H]^+$.

实施例 4



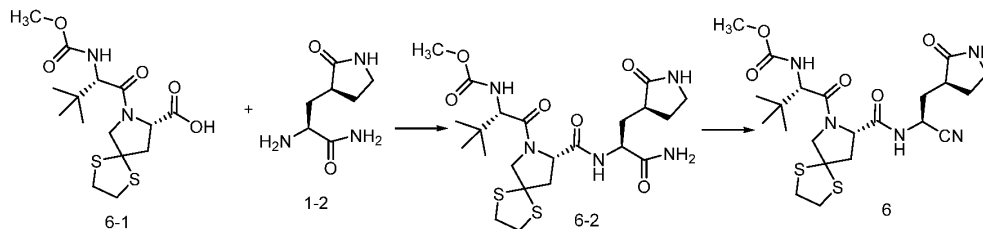
按照实施例 2 中相同的方法, 不同之处在于: 以环丙烷甲酸酐代替三氟醋酸酐, 得到化合物 4(白色固体, 32 mg, 产率 31%), ESI-MS: 522.3 m/z $[M+H]^+$.

实施例 5



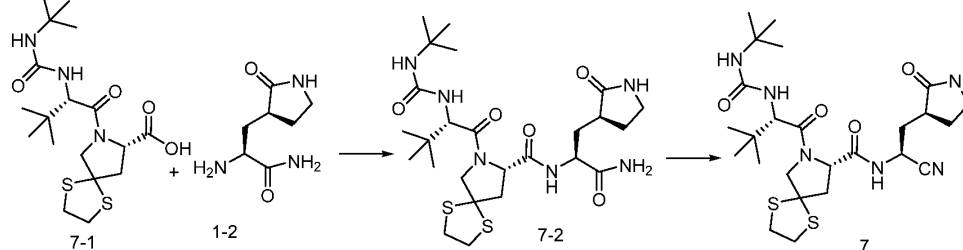
按照实施例 1 中相同的方法, 不同之处在于: 以 5-1 代替 1-1, 得到化合物 5(白色固体, 22 mg, 产率 20%), ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.03 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.67 (s, 1H), 7.41 (dd, $J = 9.1, 2.6$ Hz, 1H), 4.96 (ddd, $J = 10.6, 8.4, 5.4$ Hz, 1H), 4.58–4.50 (m, 1H), 4.34 (dd, $J = 9.8, 7.2$ Hz, 1H), 4.26–4.21 (m, 1H), 3.89 (d, $J = 11.0$ Hz, 1H), 3.45–3.33 (m, 4H), 3.22–3.03 (m, 2H), 2.64–2.57 (m, 1H), 2.45 (ddd, $J = 10.1, 8.5, 4.5$ Hz, 1H), 2.31 (dd, $J = 12.9, 9.8$ Hz, 1H), 2.20–2.10 (m, 2H), 1.84–1.67 (m, 2H), 1.39–1.31 (m, 2H), 1.24 (t, $J = 9.5$ Hz, 2H), 0.97 (s, 9H). ESI-MS: 540.2 m/z $[M+H]^+$.

实施例 6



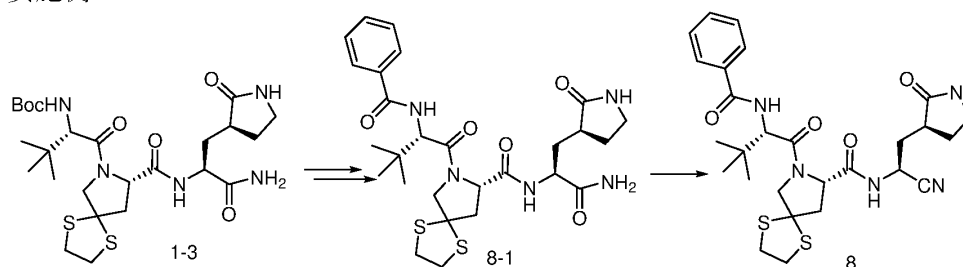
按照实施例 1 中相同的方法, 不同之处在于: 以 6-1 代替 1-1, 得到化合物 6(白色固体, 38 mg, 产率 37%), ESI-MS: 512.2 m/z [M+H]⁺.

实施例 7



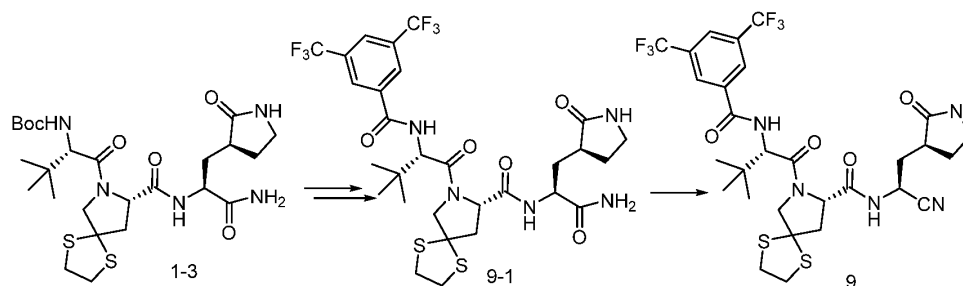
按照实施例 1 中相同的方法, 不同之处在于: 以 7-1 代替 1-1, 得到化合物 7(白色固体, 49 mg, 产率 44%), ESI-MS: 553.3 m/z [M+H]⁺.

实施例 8



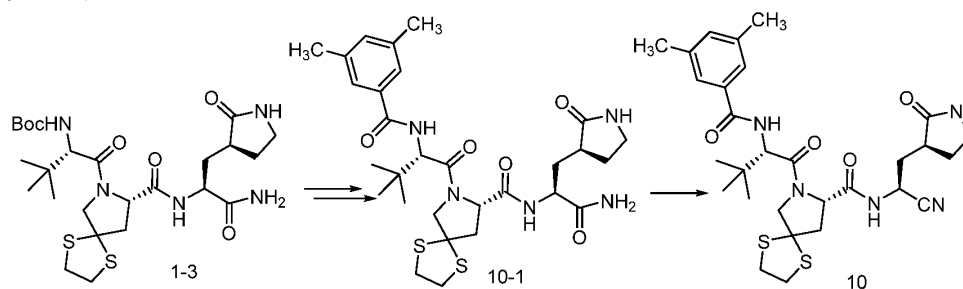
按照实施例 2 中相同的方法, 不同之处在于: 以苯甲酸酐代替三氟醋酸酐, 得到化合物 8(白色固体, 44 mg, 产率 39%), ESI-MS: 558.3 m/z [M+H]⁺.

实施例 9



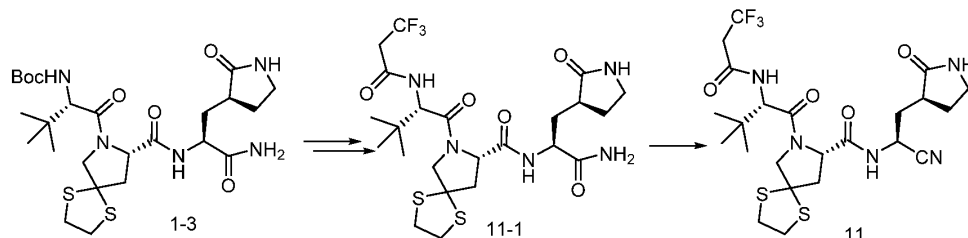
按照实施例 2 中相同的方法, 不同之处在于: 以 3,5-双(三氟甲基)苯甲酰氯代替三氟醋酸酐, 得到化合物 9(白色固体, 39 mg, 产率 28%), ESI-MS: 694.2 m/z [M+H]⁺.

实施例 10



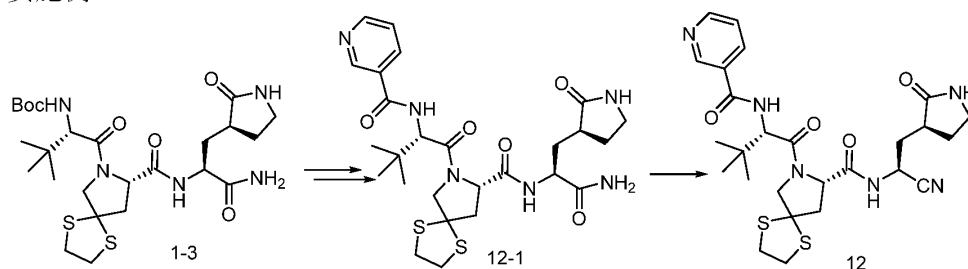
按照实施例 2 中相同的方法, 不同之处在于: 以 3,5-二甲基苯甲酰氯代替三氟醋酸酐, 得到化合物 10(白色固体, 31 mg, 产率 26%), ESI-MS: 586.2 m/z [M+H]⁺.

实施例 11



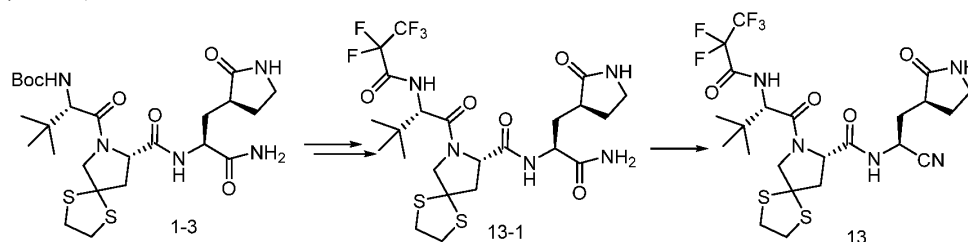
按照实施例 2 中相同的方法, 不同之处在于: 以 3,3,3-三氟丙酸酐代替三氟醋酸酐, 得到化合物 11(白色固体, 28 mg, 产率 25%), ESI-MS: 564.2 m/z [M+H]⁺.

实施例 12



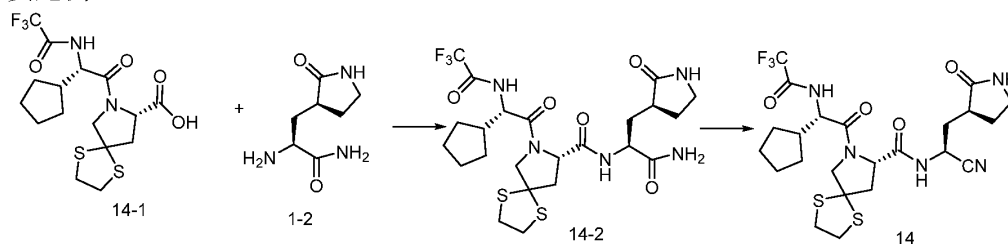
按照实施例 2 中相同的方法, 不同之处在于: 以 3-吡啶甲酰氯代替三氟醋酸酐, 得到化合物 12(白色固体, 39 mg, 产率 35%), ESI-MS: 559.2 m/z [M+H]⁺.

实施例 13



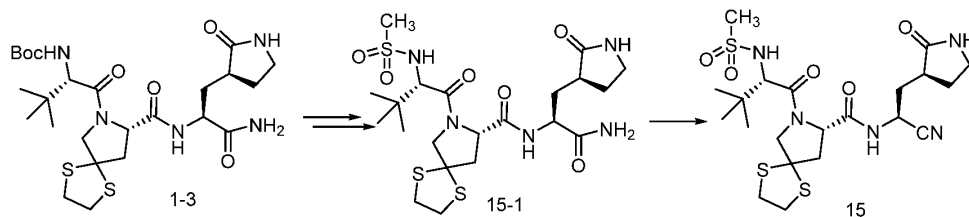
按照实施例 2 中相同的方法, 不同之处在于: 以五氟丙酰氯代替三氟醋酸酐, 得到化合物 13(白色固体, 41 mg, 产率 34%), ESI-MS: 600.2 m/z [M+H]⁺.

实施例 14



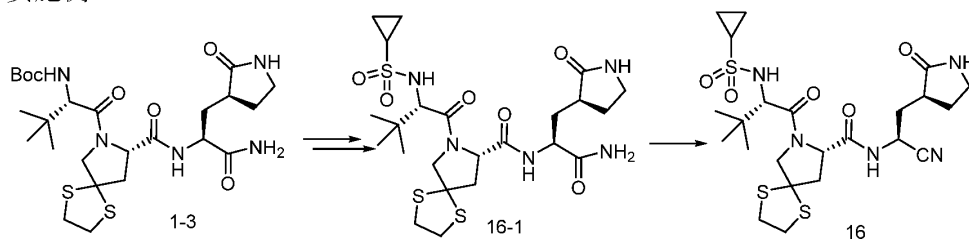
按照实施例 1 中相同的方法, 不同之处在于: 以 14-1 代替 1-1, 得到化合物 14(白色固体, 32 mg, 产率 29%), ESI-MS: 550.2 m/z [M+H]⁺.

实施例 15



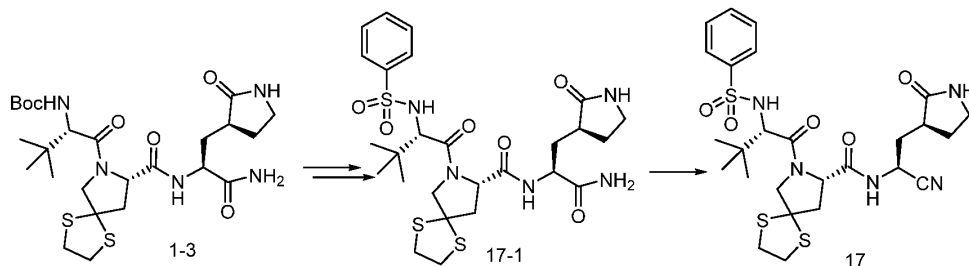
按照实施例 2 中相同的方法, 不同之处在于: 以甲基磺酸酐代替三氟醋酸酐, 得到化合物 15(白色固体, 38 mg, 产率 36%), ^1H NMR (400 MHz, Methanol- d_4) δ 5.06 (dd, $J = 11.5$, 4.5 Hz, 1H), 4.46 (dd, $J = 10.3$, 7.1 Hz, 1H), 4.27 (dd, $J = 11.0$, 1.6 Hz, 1H), 4.02–3.89 (m, 2H), 3.45 (qt, $J = 8.6$, 4.7 Hz, 4H), 3.30–3.23 (m, 1H), 2.92 (s, 3H), 2.78 (tdd, $J = 10.3$, 8.5, 4.0 Hz, 1H), 2.68 (ddd, $J = 13.0$, 7.2, 1.6 Hz, 1H), 2.51 (dd, $J = 13.0$, 10.3 Hz, 1H), 2.45–2.27 (m, 2H), 1.94–1.77 (m, 2H), 1.05 (s, 9H). ESI-MS: 532.2 m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$.

实施例 16



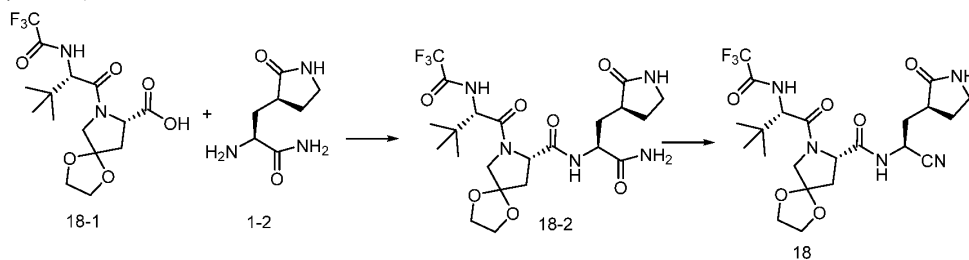
按照实施例 2 中相同的方法, 不同之处在于: 以环丙磺酰氯代替三氟醋酸酐, 得到化合物 16(白色固体, 29 mg, 产率 26%), ^1H NMR (400 MHz, Methanol- d_4) δ 5.06 (dd, $J = 11.5$, 4.5 Hz, 1H), 4.44 (dd, $J = 10.3$, 7.0 Hz, 1H), 4.28 (dd, $J = 11.0$, 1.6 Hz, 1H), 4.00–3.94 (m, 2H), 3.52–3.38 (m, 4H), 3.31–3.21 (m, 1H), 2.79 (tdd, $J = 10.4$, 8.5, 4.1 Hz, 1H), 2.72–2.65 (m, 1H), 2.57 (ddd, $J = 7.9$, 6.2, 3.9 Hz, 1H), 2.51 (dd, $J = 13.0$, 10.4 Hz, 1H), 2.43–2.29 (m, 2H), 1.92–1.74 (m, 2H), 1.34–1.29 (m, 1H), 1.14 (qt, $J = 6.4$, 3.8 Hz, 1H), 1.06 (s, 9H), 1.01 (ddt, $J = 7.9$, 5.8, 2.7 Hz, 2H), 0.97–0.87 (m, 1H). ESI-MS: 558.2 m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$.

实施例 17



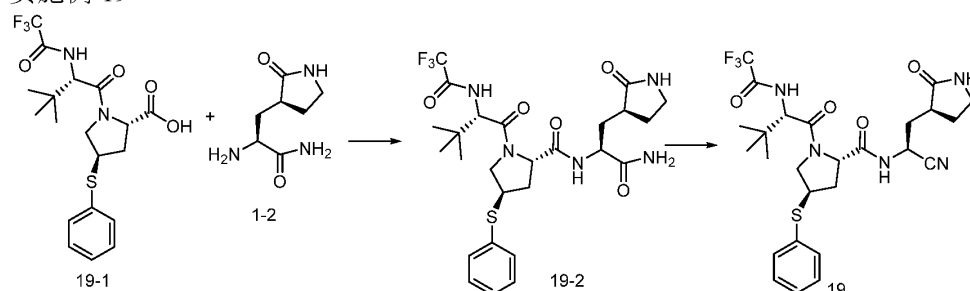
按照实施例 2 中相同的方法, 不同之处在于: 以苯磺酰氯代替三氟醋酸酐, 得到化合物 17(白色固体, 35 mg, 产率 29%), ESI-MS: 594.2 m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$.

实施例 18



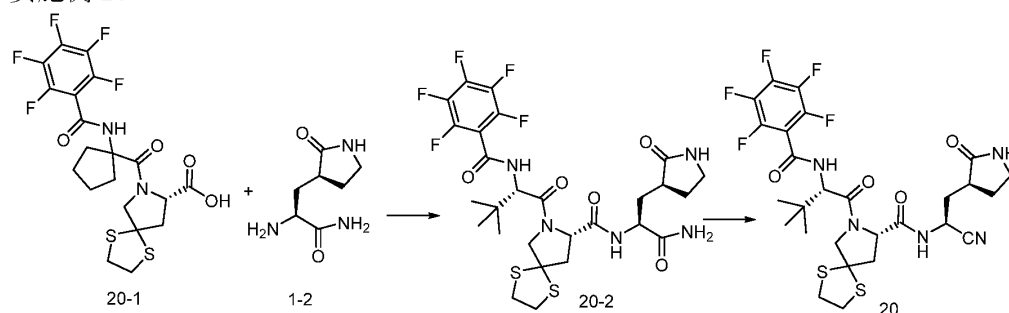
按照实施例 1 中相同的方法, 不同之处在于: 以 18-1 代替 1-1, 得到化合物 18(白色固体, 44 mg, 产率 42%), ESI-MS: 518.2 m/z [M+H]⁺.

实施例 19



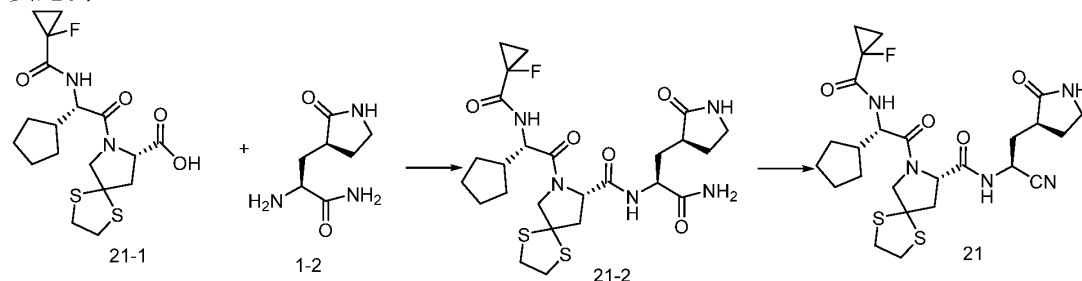
按照实施例 1 中相同的方法, 不同之处在于: 以 19-1 代替 1-1, 得到化合物 19(白色固体, 41 mg, 产率 36%), ESI-MS: 568.2 m/z [M+H]⁺.

实施例 20



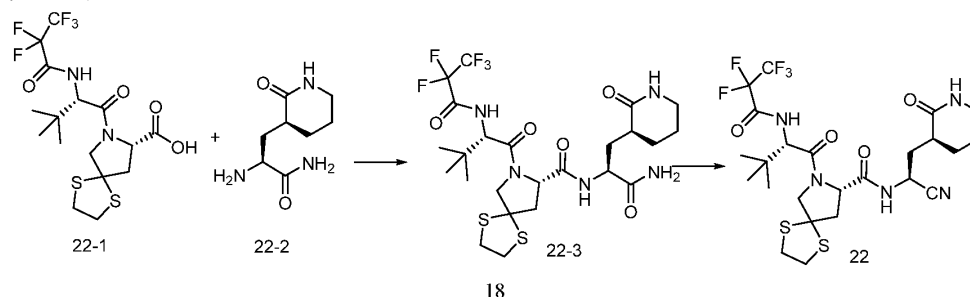
按照实施例 1 中相同的方法, 不同之处在于: 以 20-1 代替 1-1, 得到化合物 20(白色固体, 45 mg, 产率 35%), ESI-MS: 648.2 m/z [M+H]⁺.

实施例 21



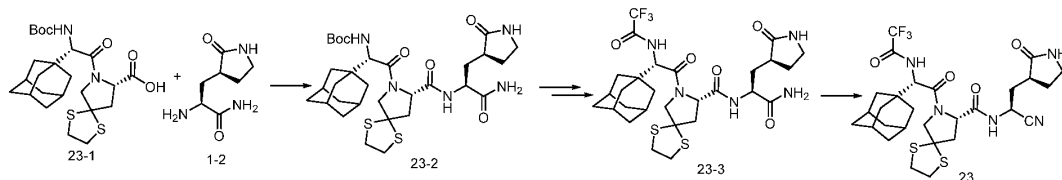
按照实施例 1 中相同的方法, 不同之处在于: 以 21-1 代替 1-1, 得到化合物 21(白色固体, 34 mg, 产率 31%), ESI-MS: 640.2 m/z [M+H]⁺.

实施例 22



按照实施例 1 中相同的方法, 不同之处在于: 以 22-1 代替 1-1, 22-1 代替 1-2, 得到化合物 22(白色固体, 22 mg, 产率 18%), ESI-MS: 614.2 m/z $[M+H]^+$.

实施例 23



化合物 23-1 (497 mg, 1 mmol) 置于双口瓶中, 氮气保护下加入 5 mL 二氯甲烷, 随后加入 2-(7-氮杂苯并三氮唑)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸酯 (400 mg, 1.1 mmol) 室温下搅拌 1h。化合物 1-2 (或其相应的盐, 1 mmol) 溶于 1 mL 二氯甲烷中加入到以上体系中, 随后在冰水浴下加入 N, N-二异丙基乙胺 (0.5 mL, 1 mmol), 撤去冰水浴, 体系置于室温搅拌过夜。后处理, 加二氯甲烷 50mL 后用 1M 盐酸水溶液洗三次, 碳酸氢钠饱和水溶液洗三次, 饱和食盐水洗有机相, 无水硫酸钠干燥, 过滤旋干得到化合物 23-2 (白色固体, 421 mg, 产率 65%)。ESI-MS: m/z 650.3 $[M+H]^+$ 。

化合物 23-2 (325 mg, 0.5 mmol) 溶于 1.5 mL 4M 氯化氢/1, 4-二氧六环溶液中, 或者溶于 1 mL 二氯甲烷后逐滴加入 1 mL 三氟醋酸, 环境温度下搅拌, 薄层层析检测显示原料基本反应完全后充分旋干溶剂。得到的粗品溶于 2 mL 二氯甲烷, 氮气保护, 加入三乙胺 (1.5 mmol) 后将体系置于冰水浴中, 逐滴加入三氟醋酸酐 (0.6 mmol), 薄层层析检测显示原料基本反应完全后, 加二氯甲烷 25 mL 后用 1M 盐酸水溶液洗三次, 碳酸氢钠饱和水溶液洗三次, 饱和食盐水洗有机相, 无水硫酸钠干燥, 过柱得到化合物 23-3 (白色固体, 167 mg, 产率 52%)。ESI-MS: m/z 646.3 $[M+H]^+$ 。

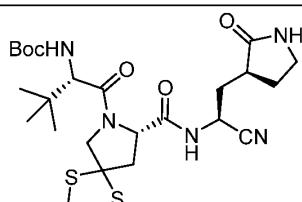
化合物 23-3 (130 mg, 0.2 mmol) 与伯吉斯试剂 (1.5 eq) 加入到双口瓶中, 充放氮气三次后加入分子筛干燥过的二氯甲烷, 室温搅拌过夜, 薄层层析检测显示原料基本反应完全。后处理, 柱层析得到化合物 23 (白色固体, 37 mg, 产率 29%), ESI-MS: 628.2 m/z $[M+H]^+$ 。

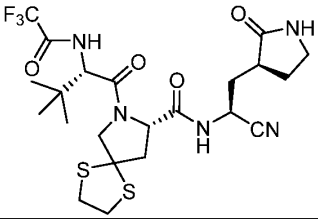
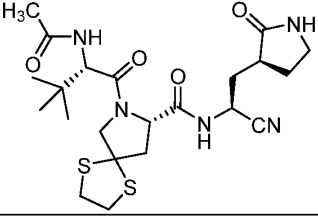
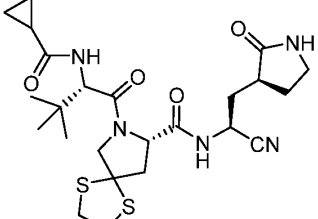
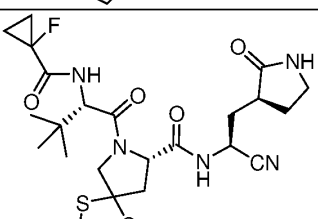
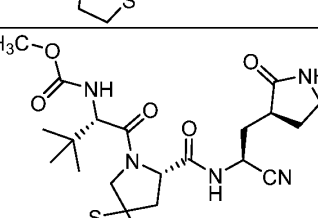
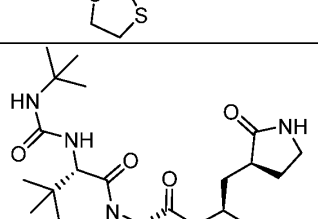
实施例 24: 化合物抑制 SARS-CoV-2 3CL^{pro} 活性测试

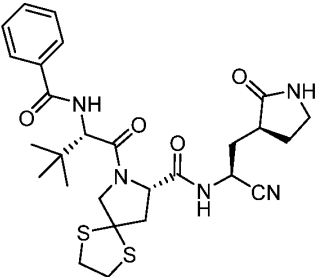
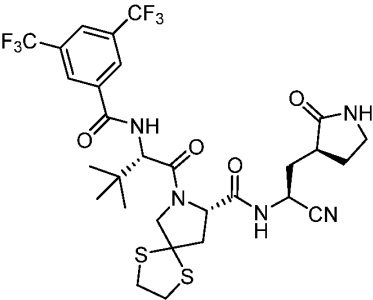
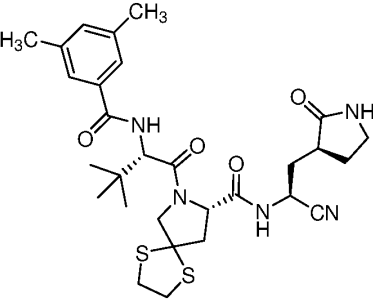
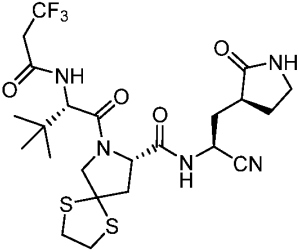
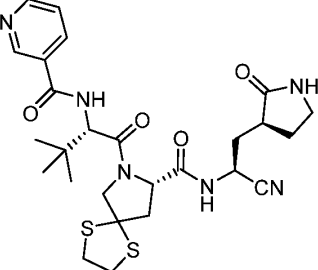
利用荧光共振能量转移方法评价测定化合物对 SARS-CoV-2 3CL^{pro} 酶活的抑制活性。整个酶促反应体系的体积为 120 μ L, 蛋白酶的终浓度为 30 nM, 底物终浓度为 20 μ M。反应体系的缓冲液包括 50mM Tris pH7.3、1mM EDTA。在 96 孔板中加入 SARS-CoV-2 3CL^{pro} 蛋白酶和不同浓度的化合物, 30 $^{\circ}$ C 孵育 10 min, 加入底物并迅速放入酶标仪中读数。激发光和发射光分别为 320 nm 和 405 nm。测试时间为 3.5 min, 每隔 35 s 读一次荧光值。最终结果取前 2 min 的读值拟合出反应速率, 并与对照组 (DMSO) 比较, 计算抑制率。利用软件 GraphPad Prism 8 拟合得到 IC₅₀ 值以及抑制率曲线。

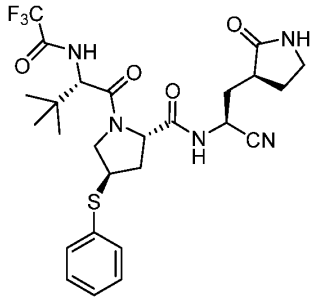
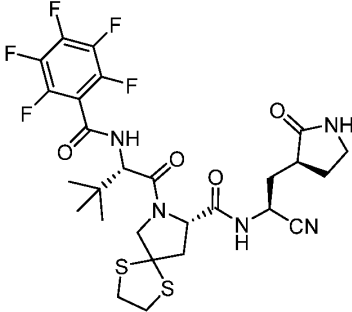
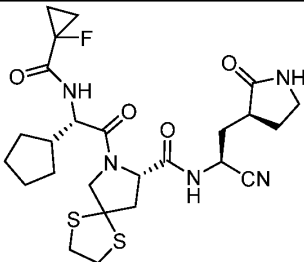
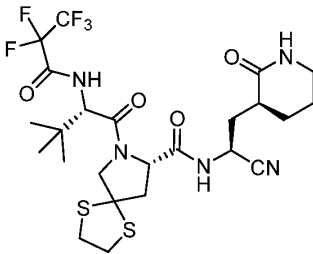
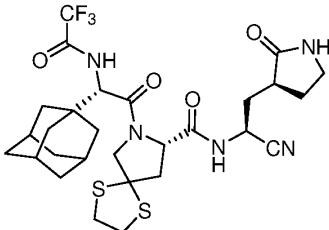
实验结果如表 1 所示。结果表明, 本发明化合物对 SARS-CoV-2 3CL^{pro} 具有强效抑制作用。IC₅₀ 值的范围: A 表示 <0.1 μ M, B 表示 0.1-1 μ M, C 表示 1-10 μ M。

表 1: 化合物 1-23 对 SARS-CoV-2 3CL^{pro} 的抑制作用

化合物编号	化合物结构式	IC ₅₀ (μ M)
1		A

2		A
3		A
4		A
5		A
6		B
7		A

8		C
9		C
10		C
11		B
12		C

19		C
20		B
21		A
22		A
23		A

实施例 24-2: 化合物 2 对于 SARS-CoV-2 奥密克戎株突变型 3CL 蛋白酶抑制活性测试

实验原理: 应用酶与底物反应产生荧光共振能量转移 (FRET) 的方法, 研究了本发明化合物对奥密克戎株突变型 3CL 蛋白酶 (P132H) 活性的抑制效果。

实验材料如下表所示:

试剂材料	品牌	货号
3CL 蛋白酶-P132H 突变型	上海磐超	/
Dabcyl-KTSAVLQSGFRKME-Edans (冠状病毒主蛋白酶荧光底物)	碧云天	P9733
DTT (二硫苏糖醇)	Invitrogen	P2325
BSA (牛血清白蛋白)	Sigma	V900933
EDTA (乙二胺四乙酸)	Invitrogen	AM9260G
Tris-HCl (三羟甲基氨基甲烷)	生工生物	B548127

实验仪器及设备:

仪器名称	品牌	型号
Echo 纳升级声波移液系统	Labcyte	Echo 650
Flexstation 3 酶标仪	MolecMar Devices	FLEX3
离心机	Eppendorf	5810

实验步骤:

配制反应缓冲液, 含有 20 mM Tris-HCl、1 mM EDTA、0.01%BSA、1 mM DTT 和 100 mM NaCl。用 Echo 移液系统将待测化合物在二甲基亚砜(DMSO)中稀释到不同浓度, 转移至 384 孔板中。用反应缓冲液稀释突变型 3CL 蛋白酶, 并且以 10 μ L/孔的量加入 384 孔板中, 1000 rpm 离心 1 min, 随后室温孵育 30 分钟。然后加入 10 μ L/孔的底物, 1000 rpm 离心 30 s 启动酶反应。反应体系中, 酶的终浓度为 50 nM, 底物终浓度为 20 μ M, 化合物的浓度范围为 10000 nM 至 0.51 nM。随即在 Flexstation 3 酶标仪上选取 Kinetic Reduction Vmax 模式, 每隔 75 秒连续读取 490 nm 波长的荧光值, 共 35 次, 获得反应速率值 (V), 计算抑制率, 并使用 XLfit 软件进行四参数拟合获取半数抑制浓度 (IC₅₀)。抑制率计算方法如下:

$$\text{抑制率} = (V_{\max} - V_{\text{compound}}) / (V_{\max} - V_{\min}) * 100\%$$

其中, $V_{\max}$ 为仅含有酶和底物的孔的反应速率值, $V_{\min}$ 为仅含有底物的孔的反应速率值, V_{Compound} 为含有待测化合物、酶和底物的孔的反应速率值。

实验结果: 对于 SARS-CoV-2 奥密克戎株中具有 P132H 突变的 3CL 蛋白酶, 化合物 2 依旧保持了显著的抑制活性 (三次独立测试 IC₅₀ 为 0.022 $\pm$ 0.00090 μ M)。

表 2: 化合物 2 对 SARS-CoV-2 奥密克戎株 3CL 蛋白酶活性的抑制效果

3CL 蛋白酶	化合物 2 IC ₅₀ (μ M) (n=3*)
SARS-CoV-2 (奥密克戎株)	0.022 $\pm$ 0.00090

*指三次独立重复实验。

实施例 24-3: 化合物 2 对于不同来源的冠状病毒 3CL 蛋白酶抑制活性测试

实验目的: 研究化合物 2 对于来源于其它六种能够感染人类的冠状病毒的 3CL 蛋白酶活性的抑制效果, 这六种病毒分别是: SARS-CoV、MERS-CoV、OC43-CoV、H229E-CoV、NL63-CoV 和 HKU1-CoV。

实验材料:

3CL 蛋白酶: 根据冠状病毒基因组序列自制重组全长冠状病毒 3CL 蛋白酶, 所用 SARS-CoV、MERS-CoV、H229E-CoV、HKU1-CoV、NL63-CoV 和 OC43-CoV 基因组 GenBank 号分别为 AAP13442.1、MT387202.1、AF304460.1、AY597011.2、AY567487.2 和 AY903459.1, 六种冠状病毒 3CL 蛋白酶蛋白表达所需 DNA 序列购自南京金斯瑞生物科技有限公司。

3CL 蛋白酶底物购自南京金斯瑞生物科技有限公司。
 糜蛋白酶底物购自吉尔生化有限公司。
 其他试剂如下表所示：

试剂材料	品牌	货号
牛胰腺来源的糜蛋白酶	Sigma	C4129
Tris	Sigma	BCBX3837
EDTA	Sigma	0001434776

实验步骤：

配制反应缓冲液(含有 50 mM Tris 和 1 mM EDTA)。待测化合物用 DMSO 溶解成 100 mM 母液，进一步用反应缓冲液进行 2 倍梯度稀释，共 11 个浓度。在 96 孔板中加入 3CL 蛋白酶和不同浓度的化合物，室温孵育 10 分钟，加入底物并迅速放入酶标仪中读数。整个酶促反应体系的体积为 120 μ L，SARS-CoV、MERS-CoV、H229E-CoV、HKU1-CoV、NL63-CoV 和 OC43-CoV 蛋白酶的终浓度分别为 30 nM、80 nM、30 nM、20 nM、30 nM 和 10 nM，底物终浓度为 10 μ M。读数时激发光和发射光波长分别为 340 nm 和 490 nm。测试时间为 10 分钟，每隔 1 分钟读一次荧光值，最终结果取前 5 分钟的读值拟合得到反应速率，计算抑制率，计算公式为：抑制率 = 1-（测试组反应速率/对照组反应速率）。

实验结果：结果如表 3 所示，对来源于其他六种冠状病毒的 3CL 蛋白酶，化合物 2 展现出较好的抑制效果，提示化合物 2 可能具有广谱的抗冠状病毒活性。

表 3：化合物 2 对来源于其他冠状病毒 3CL 蛋白酶的抑制作用

3CL 蛋白酶来源	化合物 2 IC ₅₀ (μ M)
HKU1-CoV	0.0049
OC43-CoV	0.010
SARS-CoV-1	0.024
MERS-CoV	0.060
H229E-CoV	0.13
NL63-CoV	0.85

实施例 25-1: 化合物 2 对 SARS-CoV-2 WIV04 、B.1.351 株细胞水平抑制作用

试验使用 Vero E6 细胞，在 48 孔板中加入 Vero E6 细胞(50000 个细胞/孔)，加入 100 μ L/孔含梯度浓度化合物的培养基，一小时后加入 SARS-CoV-2，感染复数 (MOI) 为 0.01。共孵育 1 小时后，吸走上清，清洗并重新加入 200 μ L/孔含梯度浓度化合物的培养基，37℃ 培养 24 小时。24 小时后，收集细胞上清，提取上清病毒 RNA 并利用实时荧光定量 PCR 的方法检测上清病毒拷贝数，根据病毒拷贝数算出化合物抑制率，利用 prism 6.0 计算化合物的 EC₅₀。

试验结果显示，化合物 2 抑制 SARS-CoV-2 WIV04 株的半数有效浓度 EC₅₀ 为 0.57 +/- 0.04 μ M，抑制 SARS-CoV-2 B.1.351 株的 EC₅₀ 为 0.73 +/- 0.06 μ M，EC₅₀ 曲线如图 1 和 2 所示。

实施例 25-2: 化合物 2 对 SARS-CoV-2 Vero E6 原始株(WIV04)、德尔塔株 (B.1.617.2)、奥密克戎株(B.1.1.529) 细胞水平抑制作用

实验目的：本试验在 Vero E6 细胞中通过实时荧光定量 PCR 法检测培养上清中病毒拷贝数的方法研究了化合物 2 对 SARS-CoV-2 原始株(WIV04 株)、德尔塔株 (B.1.617.2) 和奥密克戎株 (B.1.1.529) 在细胞中复制的抑制作用。由于 Vero E6 细胞高表达外排转运

蛋白 P-gp，所以添加 0.5 μM P-gp 抑制剂 CP-100356 与化合物共孵育。

实验材料：

Vero E6 购自 ATCC (货号 CRL-1586)，SARS-CoV-2 原始株 (SARS-CoV-2-WIV04 株)、Delta 株 (B.1.617.2)、Omicron 株 (B.1.1.529) 病毒来源于中国科学院武汉病毒研究所微生物菌(毒)种保藏中心。

其他试剂如下表所示：

试剂名称	品牌	货号
TaKaRa MiniBEST Viral RNA/DNA Extraction Kit Ver.5.0	Takara	9766
TaKaRa PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser	Takara	RR047A
TaKaRa SYBR® Premix Ex Taq™ II	Takara	RR820A
Fetal Bovine Serum (胎牛血清)	Gibco	R2768
DMEM 培养基	Gibco	C11995500BT
CCK8	Beyotime	C0039
磷酸氯喹	SIGMA	C6628-50G
胰酶	BIOSHARP	BL512A

实验仪器：

生物安全柜 (AC2-3S1, ESCO, 新加坡)

二氧化碳培养箱 (Thermo Scientific HERAccl 150i, Thermo Scientific, 美国)

纯水仪 (渗源 SYS 超纯水机, 成都)

StepOne Plus Real-time PCR system (4376600, ABI, 美国)

TC20™ 自动细胞计数器 (1450102, BIO-RAD, 美国)

T100™ Thermal Cycler (1861096, BIO-RAD, 美国)

离心机 (Micro21/21R 赛默飞, Thermo Scientific, 美国)

实验步骤：

使用胰酶消化 Vero E6 细胞并置于培养基 (90%DMEM, 10%胎牛血清) 中，种入 48 孔板，每孔 50000 个细胞，培养过夜。将待测化合物溶解于 DMSO 配制成 40 mM 母液，进一步用含 0.5 μM Pgp 抑制剂的培养基进行梯度稀释，获得试验所需浓度，实验中待测化合物的最终浓度范围为 1 μM 至 0.004 μM 。移除细胞上清，每孔加入稀释好的化合物 (含 Pgp 抑制剂 0.5 μM)，孵育 1 小时，在生物安全 3 级 (BSL-3) 实验室里加入 SARS-CoV-2 不同株系，感染复数 (MOI) 为 0.01 或 0.001，孵育 1 小时后，移除上清，PBS 洗，加入稀释好的化合物 (含 Pgp 抑制剂 0.5 μM) 200 μL /孔，感染后 24 或者 72 小时收集上清。提取上清病毒 RNA 并利用实时荧光定量 PCR 的方法检测上清病毒拷贝数，根据病毒拷贝数算出化合物抑制率，利用 GraphPad Prism 8 计算化合物的 IC_{50} 。

细胞毒性试验中，将 Vero E6 细胞消化并置于培养基 (90% DMEM, 10%胎牛血清) 中，种入 96 孔板，每孔 20000 个细胞，培养过夜。将待测化合物溶解于 DMSO 配制成 40 mM 母液，进一步用培养基或含 0.5 μM Pgp 抑制剂的培养基进行梯度稀释，获得试验所需浓度，实验中待测化合物的最终浓度范围为 500 μM 至 1.95 μM 。移除 96 孔板中的细胞上清，加入 100 μL /孔待测化合物 (单药或含 Pgp 抑制剂 0.5 μM) 的培养基，孵育 24 小时后，用 CCK8 检测试剂盒检测细胞活力，计算抑制率和半数细胞毒性浓度 (CC_{50})。

试验结果：如表 4 所示，与 P-gp 抑制剂 CP-100356 联合后，化合物 2 可剂量依赖的抑制德尔塔株在 Vero E6 细胞中的复制， IC_{50} 为 0.040 μM 。在原始株中化合物 2 联合 P-gp 抑制剂也发挥了较强抑制作用， IC_{50} 为 0.027 μM 。此外，化合物 2 联合 P-gp 抑制剂可显著抑制奥密克戎株在 Vero E6 细胞中的复制， IC_{50} 为 0.12 μM 。化合物 2 单药以及联合 P-gp

抑制剂均对 Vero E6 细胞增殖无明显细胞毒性, $CC_{50} > 500 \mu M$ 。

表 4：化合物 2 联合 P-gp 抑制剂在 Vero E6 细胞中对 SARS-CoV-2 复制的抑制作用

实验	化合物 2 + 0.5 μM CP-100356	
	IC ₅₀ (μM)	选择指数 SI SI=(CC ₅₀ /IC ₅₀)
Vero E6 原始株 (WIV04)	0.027 (均值, n=2)	>18519
Vero E6 德尔塔株 (B.1.617.2)	0.040 (均值, n=2)	>12500
Vero E6 奥密克戎株 (B.1.1.529)	0.12	>4167
Vero E6 单药 CC ₅₀	>500 μM	
Vero E6 联合 P-gp 抑制剂 CC ₅₀	>500 μM	

实施例 26: 化合物 2 在 hACE2-K18 转基因小鼠上对 SARS-CoV-2 德尔塔株的体内抗病毒作用

实验目的: 本研究评价了化合物 2 在稳定表达人血管紧张素转换酶 2 (ACE2) 的 K18 转基因小鼠(K18-hACE2)中对 SARS-CoV-2 德尔塔株的抗病毒活性。

实验材料:

7-8 周龄的 K18-hACE2 转基因小鼠购自江苏集萃药康生物科技有限公司。
SARS-CoV-2 Delta 株病毒来源于中国科学院武汉病毒研究所微生物菌(毒)种保藏中心。
利托那韦购自上海迪赛诺化学制药有限公司。

Vero E6 细胞购自 ATCC (货号 CRL-1586)。

其他试剂如下表所示:

试剂名称	品牌	货号
Qiagen 74106 RNeasy Mini Kit	Qiagen	74106
TaKaRa PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser	Takara	RR047A
TaKaRa SYBR® Premix Ex Taq™ II	Takara	RR820A
Fetal Bovine Serum	Gibco	10099-141C
DMEM 培养基	Gibco	C11995500BT
组织固定液	BOSTER	AR1068
Aquacide II (甲基纤维素钠)	Millipore	17851
DMEM 培养基 (粉末, 高糖)	Gibco	12100046
结晶紫	国药集团	71012314

实验仪器:

生物安全柜 (AC2-3S1, ESCO, 新加坡)

二氧化碳培养箱 (Thermo Scientific HERAcell 150i, Thermo Scientific, 美国)

纯水仪 (渗源 SYS 超纯水机, 成都)

StepOne Plus Real-time PCR system (4376600, ABI, 美国)

TC20™ 自动细胞计数器 (1450102, BIO-RAD, 美国)

T100™ Thermal Cycler (1861096, BIO-RAD, 美国)

离心机 (Micro21/21R 赛默飞, Thermo Scientific, 美国)

组织研磨仪 (JXFSTPRP-CL, 上海净信, 中国)

实验步骤: K18-hACE2 转基因小鼠通过滴鼻方式感染 SARS-CoV-2 德尔塔株, 该天为第 0 天。感染 2 小时后采用灌胃方式分别给予溶媒、50 mg/kg 或 200 mg/kg 化合物 2 (联合 50 mg/kg 的细胞色素 P450 抑制剂利托那韦), BID 给药 2 天 (其中第 0 天给药 1 次, 第 1 天给药 2 次, 第 2 天给药 1 次) 或 4 天 (其中第 0 天给药一次, 第 1、2、3 天分别给药 2 次)。记录小鼠体重变化, 终点时收集肺组织和脑组织。其中, 左肺甲醛固定, 后经包埋、切片和 H&E 染色用于组织病理学检查。右肺和脑组织各分为两份, 一份研磨后取匀浆液提取 RNA 并进行反转录, 通过实时荧光定量 PCR 检测病毒拷贝数。另一份研磨后取匀浆液通过蚀斑实验检测病毒滴度。蚀斑实验方法如下: Vero E6 细胞种于 24 孔板中, 每孔 12000 个细胞, 培养过夜。将组织匀浆液原液在 DMEM 培养基中进行 10 倍梯度稀释备用。去除细胞上清, 加入稀释好的组织匀浆液并孵育 1 小时, 随后去除上清, 加入含 1% 甲基纤维素钠和 2% FBS 的培养基, 培养 4 天。随后去除培养基, 使用多聚甲醛固定后, 用 1% (w/v) 结晶紫染色, 统计每个孔中的空斑数量。

试验结果: 如表 5 所示, 在感染 2 天后, 与模型组(病毒平均拷贝数为 $9.19 \pm 0.30 \log_{10}$ copies/g)相比, 在联合利托那韦的情况下, 化合物 2 50 mg/kg 和 200 mg/kg 均显著减少了肺部的病毒载量, 平均拷贝数分别为 $7.66 \pm 0.27 \log_{10}$ copies/g 和 $6.79 \pm 0.30 \log_{10}$ copies/g, 其中 200 mg/kg 剂量下病毒拷贝数下降程度达到 $2.4 \log_{10}$ copies/g。在感染 4 天后, 观察到化合物 2 对病毒拷贝数的持续抑制作用。在病毒滴度方面, 如图 3 所示, 观察到化合物 2 显著的抑制作用, 在感染 2 天后, 200 mg/kg 剂量下完全抑制了病毒复制, 未测到滴度, 50 mg/kg 下与模型组相比, 病毒滴度下降幅度超过 $3 \log_{10}$ PFU/g, 在感染 4 天后, 化合物 2 展现了对病毒滴度的持续抑制效果。体重方面如图 4 所示, 在感染 4 天后, 模型组小鼠体重减轻了约 10%, 而化合物 2 给药组的体重未明显降低, 表明持续给药下化合物 2 未出现明显毒性。我们进一步检测了小鼠脑内的病毒载量, 在感染 2 天后, 各组未出现明显感染。在感染 4 天后, 与模型组相比, 化合物 2 在 50 mg/kg 和 200 mg/kg 剂量下均能显著降低小鼠的脑部的病毒拷贝数, 尤其在 200 mg/kg 剂量下脑部的病毒拷贝数与未感染的正常组相当。我们进一步检测了感染 4 天后脑部的病毒滴度, 结果如图 5 所示, 与模型组相比, 化合物 2 在两个剂量下均未测到病毒滴度, 显示了化合物 2 强大的抑制作用。此外, 肺部的组织病理学分析表明, 与模型组相比, 化合物 2 200 mg/kg 剂量下显著改善了肺部损伤, 包括降低肺泡萎缩或扩张的程度以及肺泡膜增厚的程度。

表 5 感染 2 天和 4 天后小鼠肺部和脑部的病毒载量 (平均值 $\pm$ SD)

组别	肺组织 (log10 copies/g)		脑组织 (log10 copies/mg)	
	第 2 天	第 4 天	第 2 天	第 4 天
模型组	9.19 ± 0.30	9.35 ± 0.30	1.34 ± 0.78	7.17 ± 0.27
化合物 2-200 mg/kg +利托那韦-50 mg/kg	6.79 ± 0.30	7.48 ± 0.63	1.04 ± 0.24	0.99 ± 0.42
化合物 2-50 mg/kg +利托那韦-50 mg/kg	7.66 ± 0.27	7.88 ± 0.74	0.77 ± 0.20	2.88 ± 1.26
正常组	5.76 ± 0.32	6.27 ± 0.18	1.08 ± 0.06	1.08 ± 0.06

实施例 27: 化合物 2 对激酶的选择性

实验目的: 在 KinaseProfile 实验平台上检测了化合物 2 对 413 种激酶的抑制活性, 研究化合物 2 对激酶的选择性。

实验材料:

Full Human Panel [10 uM ATP] KinaseProfiler 为 Eurofins 公司提供的测试产品, 货号: 50-005KP10, 此产品包含 413 个激酶。

实验步骤:

采用 Eurofins 标准 KinaseProfiler 分析方法, 并遵循相关标准操作程序, 对所选的一种激酶进行化合物测试。蛋白质激酶采用放射法检测, 而脂质激酶采用 HTRF 法检测。实验中 ATP 浓度为 10 μ M。每个激酶的详细信息可在 Eurofins 网站上获得, 网址如下: <https://www.eurofinsdiscovery.com/catalogmanagement/viewItem/Full-Human-Panel-10-uM-ATP-KinaseProfiler/50-005KP10>。

实验结果: 对于 413 种激酶, 化合物 2 在 10 μ M 浓度下抑制率均小于 30%, 无明显抑制作用, 提示化合物 2 具有优秀的选择性。

实施例 28: 化合物 2 对安全性靶点的选择性

实验目的: 在 SafetyScan 实验平台上检测了化合物 2 对 47 个安全性相关靶点的影响。

实验材料:

Safety47 Panel Dose Response SAFETYscan 为 Eurofins 公司提供的测试产品, 货号: 87-1003DR。此产品包含 47 个安全性靶点相关的 78 个测试。

实验步骤:

对 47 个安全型靶点相关的 78 个测试, 采用的实验方法包括: cAMP 实验、钙流实验、激素核受体实验、激酶结合实验、酶活性实验、神经递质转运体实验、离子通道实验以及转运体实验。每个实验的具体方法可在 eurofins 网站获得, 网址如下: <https://www.eurofinsdiscovery.com/catalogmanagement/viewItem/Safety47-Panel-Dose-Response-SAFETYscan-DiscoverX/87-1003DR>。

实验结果: 对于 47 个安全性相关靶点, 化合物 2 在 100 μ M 浓度下均无明显抑制或激活作用 (EC_{50} 均大于 100 μ M), 提示化合物 2 具有优秀的选择性。

实施例 29: 化合物 2 的人血浆蛋白结合试验**实验材料**

人血浆购买自 BioIVT 公司, EDTA K2 抗凝, -80°C 储存。96 孔平衡透析板购买自 HTDialysis LLC 公司。平衡透析膜购买自 Gales Ferry 公司。

实验步骤

用超纯水配制浓度为 14.2 g/L 磷酸氢二钠和 8.77 g/L 氯化钠的碱性溶液, 该碱性溶液可以在 4°C 条件下保存 7 天。用超纯水配制浓度为 12.0 g/L 磷酸二氢钠和 8.77 g/L 氯化钠的酸性溶液, 该酸性溶液可以在 4°C 条件下保存 7 天。用酸性溶液滴定碱性溶液至 pH 值为 7.4, 该缓冲液可以在 4°C 保存 7 天。实验当天测试缓冲液 pH 值, 如果超出 7.4 $\pm$ 0.1 范围, 则调节其 pH 值。

将透析膜浸泡在超纯水中 60 分钟以便将膜分离成两片, 然后用 20%乙醇浸泡 20 分钟, 最后用透析所用缓冲液浸泡 20 分钟。

将冷冻的血浆迅速在室温下解冻。

将血浆在 4°C、3,220 g 离心力下离心 10 分钟去除凝块, 并将上清收集到新的离心管中。测定和记录血浆的 pH 值。

配制 10 mM 待测物的 DMSO 储备液。用 98 μ L DMSO 稀释 2 μ L 储备液 (10 mM) 得到工作液 (200 μ M)。取 3 μ L 工作液, 加入 597 μ L 人血浆, 终浓度为 1 μ M (0.5% DMSO)。充分涡匀。

在透析膜的一侧加入 120 μ L 加药血浆样品, 另一侧加入等体积的透析液 (磷酸盐缓冲液)。实验为双平行。封上透析板, 放入孵育装置, 在 37°C, 5% CO₂, 大约 100 rpm 转速下孵育 6 小时。孵育结束后, 揭掉封膜, 在每个孔的缓冲液和血浆侧吸取 50 μ L 到新板子的不同孔中。

在磷酸盐缓冲液样品中加入 50 μ L 空白血浆, 在血浆样品中加入等体积的空白磷酸盐缓冲液。加 300 μ L 室温淬灭剂 (含内标乙腈 (IS, 500 nM 拉贝洛尔, 100 nM 阿普唑仑和 2 μ M 酮洛芬)) 沉淀蛋白。涡旋 5 分钟。在 4°C 下, 3220 g 离心 30 分钟。转移 100 μ L 上清液到新板子。根据待测物的液质响应信号和峰形, 用 100 μ L 或 200 μ L 水对上清液进行稀释。混匀, 利用液质进行样品分析。

通过 Microsoft Excel 进行所有的计算。确定待测物在缓冲液侧和血浆侧的峰面积。计算待测物 and 对照药的血浆蛋白结合率公式如下：游离率=（样品峰面积与内标峰面积比值缓冲液侧/样品峰面积与内标峰面积比值血浆侧）* 100%，结合率= 1-游离率，回收率=（样品峰面积与内标峰面积比值缓冲液侧+样品峰面积与内标峰面积比值血浆侧）/（样品峰面积与内标峰面积比值初始血浆样品）* 100%。样品峰面积与内标峰面积比值缓冲液侧代表化合物的游离浓度，样品峰面积与内标峰面积比值血浆侧代表化合物的游离浓度和结合浓度之和，样品峰面积与内标峰面积比值初始血浆样品代表样品开始孵育时化合物的总浓度。

试验结果：

见表 6。1 μM 的化合物 2 在 37℃ 条件下孵育 6 小时，平均游离率为 46.63%，结合率为 53.37%，回收率为 88.02%。

表 6 化合物 2 的人血浆蛋白结合试验结果

化合物	游离率（F%）			结合率（%）	回收率（%）
	重复 1	重复 2	平均值		
化合物 2	48.71	44.55	46.63	53.37	88.02

实施例 30：化合物 2 单次灌胃的组织分布试验

实验材料：

Balb/c 小鼠（购自上海旻澈生物科技有限公司）共 60 只，雌雄各半，体重为 18-25g。

实验步骤：

Balb/c 小鼠单次灌胃给予化合物 2，给药剂量为 100 mg/kg，给药体积为 10 mL/kg。

给药前和给药后 5 min、0.25、1.0、2.0、3.0、5.0、7.0 和 10 h（每个时间点 6 只小鼠、雌雄各半）；在以上设定时间点经眼球后静脉丛取血 0.2 ml，置 EDTA-K2 试管中，11000 rpm 离心 5 min，分离血浆，于 -70℃ 冰箱中冷冻；在 0.25、1.0、3.0 和 7.0h 时间点全血采集后立即解剖采集肺组织，组织用冷生理盐水冲净表面残留血液及内容物，吸干后贴好标签，-70℃ 保存待测。LC/MS-MS 法测定血浆和肺组织中化合物 2 的含量，计算肺血比。

试验结果：

Balb/c 小鼠单次灌胃给予化合物 2 后，肺组织暴露量和血浆暴露量的比值为 0.62，化合物 2 在肺组织暴露量高。

实施例 31：化合物 2 灌胃给药对食蟹猴心血管系统影响的安全药理试验

在食蟹猴 2 周重复给药毒性研究中，伴随考察了化合物 2 对心血管系统的影响。

实验材料：

食蟹猴 32 只，雌雄各半，给药时年龄 2.5-5 岁。

动物来源：云南英茂生物科技有限公司；广西雄森灵长类实验动物养殖开发有限公司；中科灵瑞（湛江）生物技术有限公司。

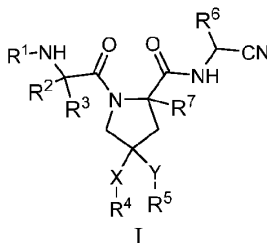
使用智能无创血压计 BP-98E 测量所有清醒动物的收缩压（SBP）、舒张压（DBP）和平均动脉压（MBP），采用 Provantis/v10.2.3.1 电子数据采集系统（PV-02）。

实验步骤：32 只食蟹猴（第 1 组和第 4 组 5 只动物/性别/组，第 2 组和第 3 组 3 只动物/性别/组，共 4 组）随机分组，通过鼻饲给药给予化合物 2（40、160 和 600 mg/kg/天）或对照制剂（98.9%溶媒制剂+ 1.1% MTBE，0 mg/kg/天），每天给药两次，共给药 14 天，给药结束后恢复 14 天。所有动物均被纳入本研究，以评估给药对 ECG 参数（包括心率、PR 间期、QRS 持续时间、QT 间期和 QTcF）及对给药前阶段、给药期和恢复期的血压的影响。

试验结果：在本试验条件下，食蟹猴鼻饲灌胃给予化合物 2（40、160 和 600 mg/kg/day）14 天，每天 2 次，未见供试品相关的心血管系统改变；未见供试品相关的心律失常；整个试验过程中未见供试品相关的 ECG 参数或血压的改变。

权利要求

1. 一种通式 I 所示的氰基化合物, 或其外消旋体、对映异构体、非对映异构体或药学上可接受的盐:



其中,

R¹ 选自 -COR⁸ 和 -SO₂R⁹;

R² 与 R³ 各自独立地选自 H、D、C₁~C₁₀ 烷基、金刚烷基和 C₃~C₇ 环烷基, 或者, R² 与 R³ 和与之相连的碳原子形成 3~8 元碳环;

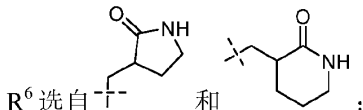
X 选自 O、S、S(=O)₂ 和 S=O;

Y 不存在或选自 O、S、S(=O)₂ 和 S=O;

R⁴ 选自 H、C₁~C₁₀ 烷基、C₃~C₈ 环烷基、C₆~C₂₀ 芳基、C₁~C₁₀ 烷基取代的 C₆~C₂₀ 芳基、C₁~C₁₀ 烷氧基取代的 C₆~C₂₀ 芳基和卤代 C₆~C₂₀ 芳基;

R⁵ 选自 H、C₁~C₁₀ 烷基和 C₃~C₇ 环烷基;

或者, R⁴ 与 R⁵ 彼此相连共同形成 C₂~C₆ 亚烷基, 从而连接 X 和 Y;



R⁶ 选自 和 ;

R⁷ 选自 H 和 D;

R⁸ 选自 H、C₁~C₁₀ 烷基、C₁~C₁₀ 烷氧基、C₃~C₇ 环烷基、卤代 C₁~C₁₀ 烷基、卤代 C₃~C₇ 环烷基、-NR¹³R¹⁴、C₆~C₂₀ 芳基、卤代 C₆~C₂₀ 芳基、C₁~C₁₀ 烷基取代的 C₆~C₂₀ 芳基、卤代 C₁~C₁₀ 烷基取代的 C₆~C₂₀ 芳基、5~20 元杂芳基和卤代 5~20 元杂芳基;

R⁹ 选自 C₁~C₁₀ 烷基、C₃~C₇ 环烷基、卤代 C₁~C₁₀ 烷基、卤代 C₃~C₇ 环烷基、-NR¹⁵R¹⁶、C₆~C₂₀ 芳基、卤代 C₆~C₂₀ 芳基、C₁~C₁₀ 烷基取代的 C₆~C₂₀ 芳基、卤代 C₁~C₁₀ 烷基取代的 C₆~C₂₀ 芳基、5~20 元杂芳基和卤代 5~20 元杂芳基;

R¹³ 和 R¹⁴ 各自独立地选自 H 和 C₁~C₁₀ 烷基;

R¹⁵ 和 R¹⁶ 各自独立地选自 H 和 C₁~C₁₀ 烷基。

2. 根据权利要求 1 所述的氰基化合物, 或其外消旋体、对映异构体、非对映异构体或药学上可接受的盐, 其中,

R² 与 R³ 各自独立地选自 H、D、C₁~C₆ 烷基、金刚烷基和 C₃~C₇ 环烷基, 或者, R² 与 R³ 和与之相连的碳原子形成 3~8 元碳环; 或者

R² 与 R³ 各自独立地选自 H、异丙基、叔丁基、环戊基和金刚烷基, 或者, R² 与 R³ 和与之相连的碳原子形成环丙基和环戊基; 或者

R² 与 R³ 中的一个选自 H, 另一个选自异丙基、叔丁基、环戊基和金刚烷基, 或者, R² 与 R³ 和与之相连的碳原子形成环丙基和环戊基。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的氰基化合物, 或其外消旋体、对映异构体、非对映异构体或药学上可接受的盐, 其中,

R⁴ 选自 H、C₁~C₆ 烷基、C₃~C₈ 环烷基、C₆~C₁₀ 芳基、C₁~C₆ 烷基取代的 C₆~C₁₀ 芳基、C₁~C₆ 烷氧基取代的 C₆~C₁₀ 芳基和卤代 C₆~C₁₀ 芳基;

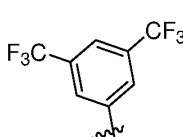
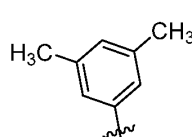
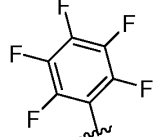
R⁵ 选自 H、C₁~C₆ 烷基和 C₃~C₇ 环烷基;

或者, R⁴ 与 R⁵ 彼此相连共同形成 C₂~C₆ 亚烷基, 从而连接 X 和 Y; 或者, R⁴ 与 R⁵ 彼此相连共同形成 CH₂CH₂ 和 CH₂CH₂CH₂, 从而连接 X 和 Y。

4. 根据权利要求 1-3 任一项所述的氰基化合物, 或其外消旋体、对映异构体、非对映异构体或药学上可接受的盐, 其中,

R^8 选自 H、 $C_1\sim C_6$ 烷基、 $C_1\sim C_6$ 烷氧基、 $C_3\sim C_7$ 环烷基、卤代 $C_1\sim C_6$ 烷基、卤代 $C_3\sim C_7$ 环烷基、 $-NR^{13}R^{14}$ 、 $C_6\sim C_{10}$ 芳基、卤代 $C_6\sim C_{10}$ 芳基、 $C_1\sim C_6$ 烷基取代的 $C_6\sim C_{10}$ 芳基、卤代 $C_1\sim C_6$ 烷基取代的 $C_6\sim C_{10}$ 芳基、5~10 元杂芳基和卤代 5~10 元杂芳基, R^{13} 和 R^{14} 各自独立地选自 H 和 $C_1\sim C_6$ 烷基; 或者

R^8 选自 $C_1\sim C_6$ 烷基、卤代 $C_1\sim C_6$ 烷基、 $C_1\sim C_6$ 烷氧基、 $-NR^{13}R^{14}$ 、 $C_3\sim C_7$ 环烷基、卤代 $C_3\sim C_7$ 环烷基、苯基、卤代苯基、 $C_1\sim C_6$ 烷基取代的苯基、卤代 $C_1\sim C_6$ 烷基取代的苯基和 5~6 元杂芳基, R^{13} 和 R^{14} 各自独立地选自 H 和 $C_1\sim C_6$ 烷基; 或者

R^8 选自 CH_3 、 CF_3 、 CH_2CF_3 、 CF_2CF_3 、甲氧基、、、环丙基、、苯基、、、 和吡啶-3-基;

R^9 选自 $C_1\sim C_6$ 烷基、 $C_3\sim C_7$ 环烷基、卤代 $C_1\sim C_6$ 烷基、卤代 $C_3\sim C_7$ 环烷基、 $-NR^{15}R^{16}$ 、 $C_6\sim C_{10}$ 芳基、卤代 $C_6\sim C_{10}$ 芳基、 $C_1\sim C_6$ 烷基取代的 $C_6\sim C_{10}$ 芳基、卤代 $C_1\sim C_6$ 烷基取代的 $C_6\sim C_{10}$ 芳基、5~10 元杂芳基和卤代 5~10 元杂芳基, R^{15} 和 R^{16} 各自独立地选自 H 和 $C_1\sim C_6$ 烷基; 或者

R^9 选自 $C_1\sim C_6$ 烷基、 $C_3\sim C_7$ 环烷基、苯基、 $C_1\sim C_6$ 烷基取代的苯基和卤代 $C_1\sim C_6$ 烷基取代的苯基; 或者

R^9 选自 CH_3 、环丙基、苯基、对甲基苯基和对三氟甲基苯基。

5. 根据权利要求 1-4 任一项所述的氰基化合物, 或其外消旋体、对映异构体、非对映异构体或药学上可接受的盐, 其中,

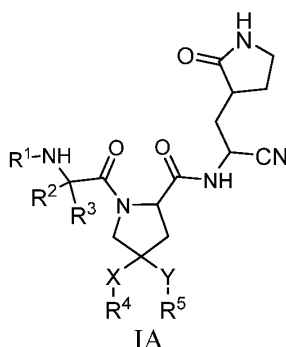
X 选自 O、S、 $S(=O)_2$ 和 $S=O$; Y 不存在或选自 O、S 和 $S=O$; R^4 选自 $C_1\sim C_6$ 烷基和 $C_6\sim C_{10}$ 芳基, R^5 选自 H; 或者, R^4 与 R^5 彼此相连共同形成 $C_2\sim C_6$ 亚烷基, 从而连接 X 和 Y; 或者

X、Y 各自独立地选自 O、S 和 $S=O$, R^4 与 R^5 彼此相连共同形成 CH_2CH_2 和 $CH_2CH_2CH_2$, 从而连接 X 和 Y; 或者

X、Y 各自独立地选自 O 和 S, R^4 与 R^5 彼此相连共同形成 CH_2CH_2 , 从而连接 X 和 Y。

6. 根据权利要求 1-5 任一项所述的氰基化合物, 或其外消旋体、对映异构体、非对映异构体或药学上可接受的盐, 其中,

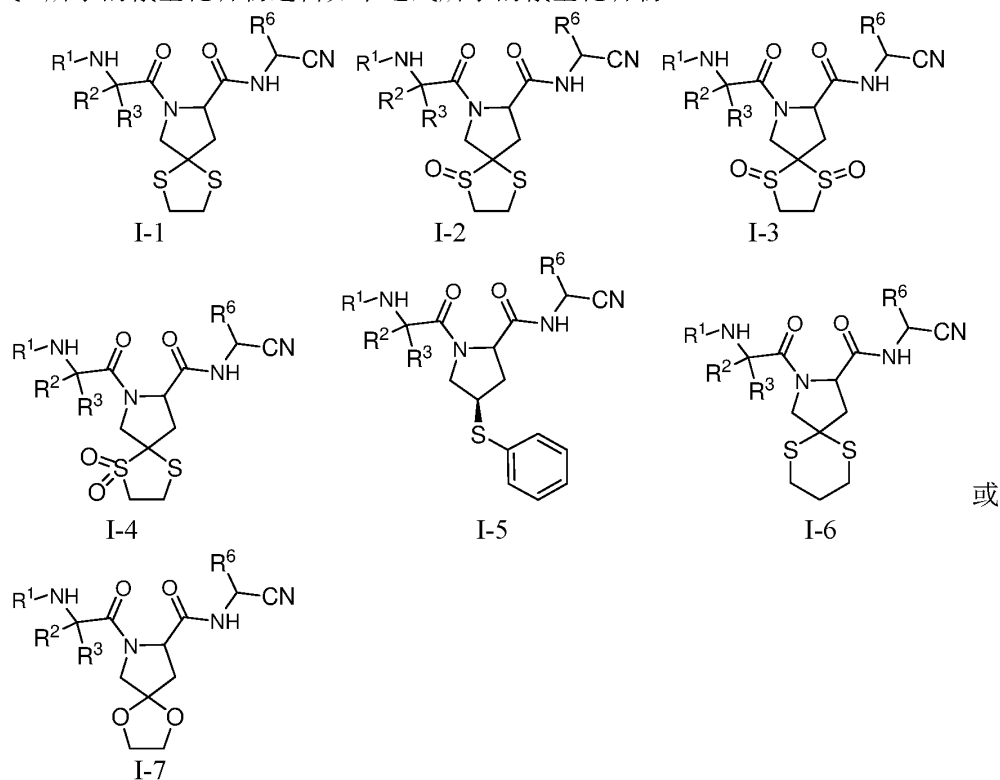
通式 I 所示的氰基化合物选自通式 IA 所示的氰基化合物:



其中, R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、X 和 Y 的定义如权利要求 1-5 任一项所述。

7. 根据权利要求 1-5 任一项所述的氰基化合物, 或其外消旋体、对映异构体、非对映异构体或药学上可接受的盐, 其中,

通式 I 所示的氰基化合物选自如下通式所示的氰基化合物：

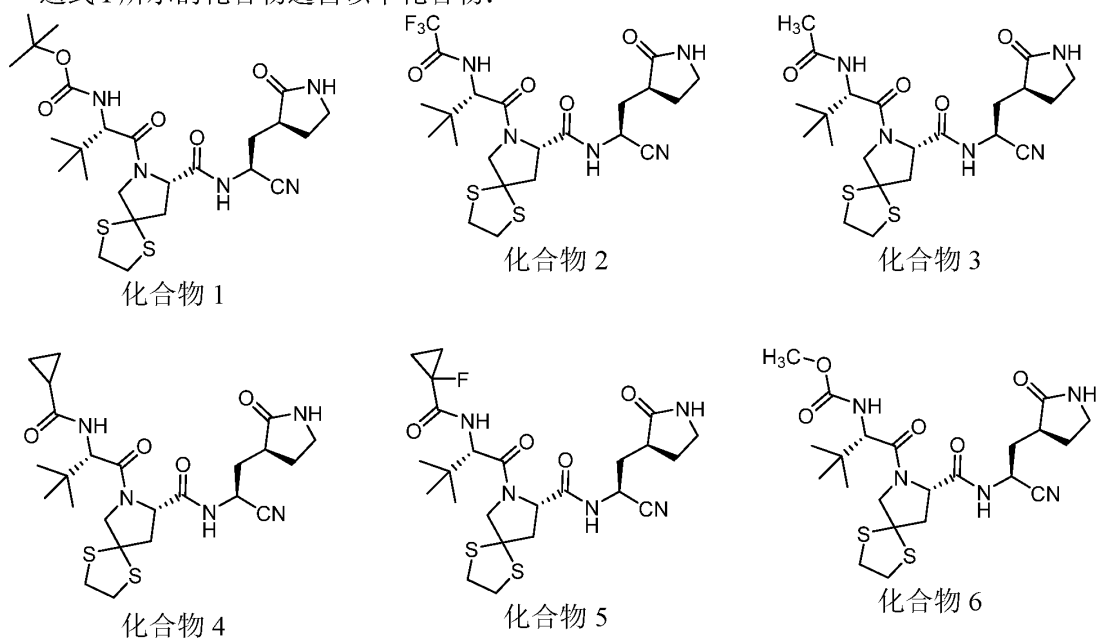


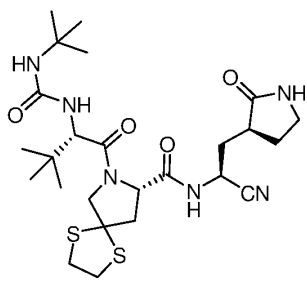
或

其中， R^1 、 R^2 、 R^3 和 R^6 的定义如权利要求 1-5 任一项所述。

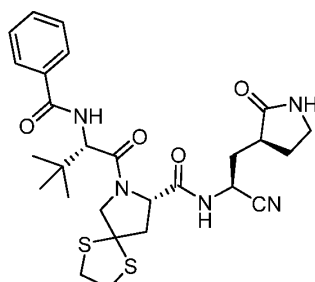
8. 根据权利要求 1 所述的氰基化合物，或其外消旋体、对映异构体、非对映异构体或药学上可接受的盐，其中，

通式 I 所示的化合物选自以下化合物：

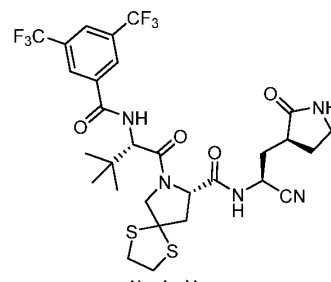




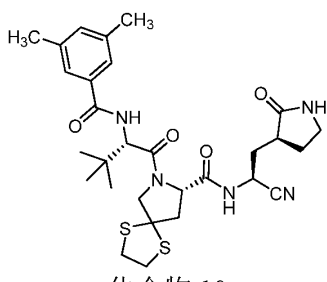
化合物 7



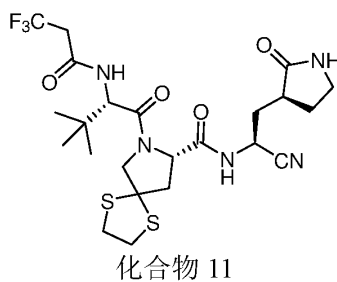
化合物 8



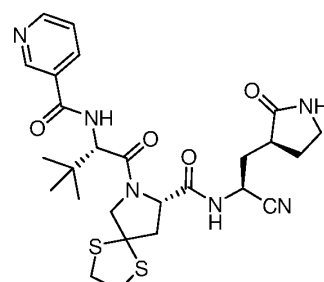
化合物 9



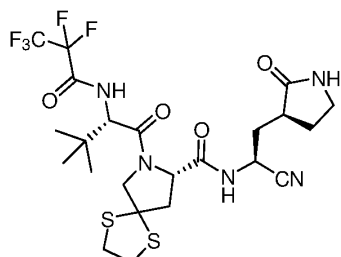
化合物 10



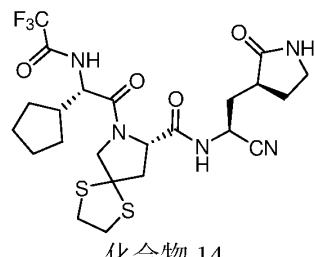
化合物 11



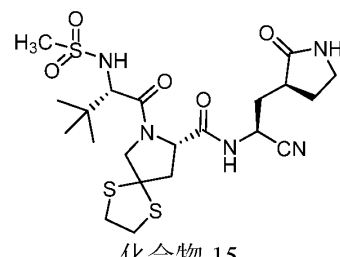
化合物 12



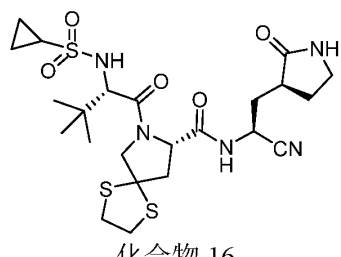
化合物 13



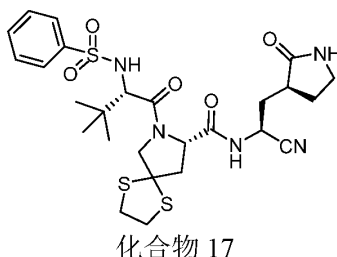
化合物 14



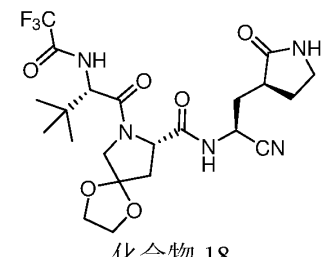
化合物 15



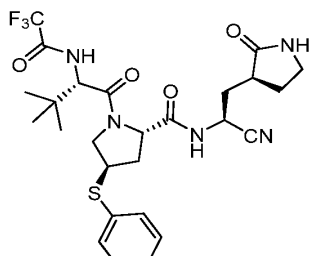
化合物 16



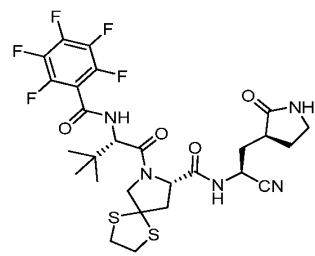
化合物 17



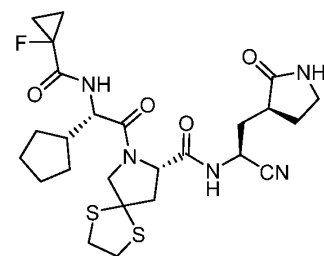
化合物 18



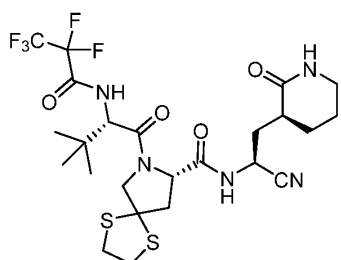
化合物 19



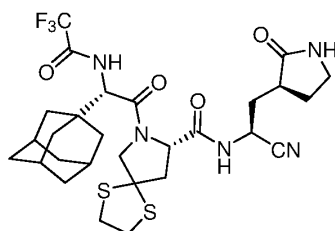
化合物 20



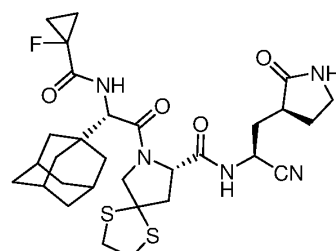
化合物 21



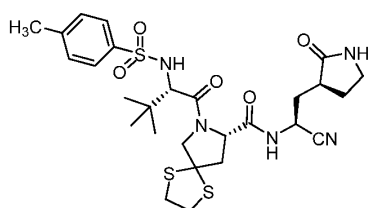
化合物 22



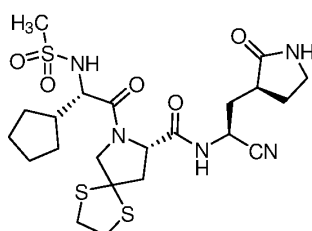
化合物 23



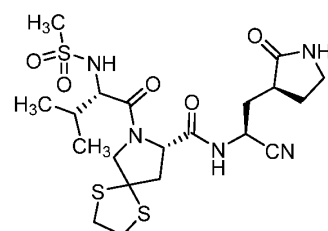
化合物 24



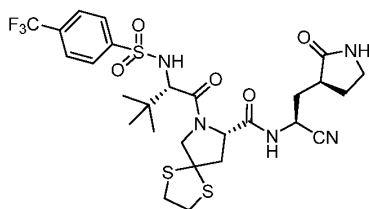
化合物 25



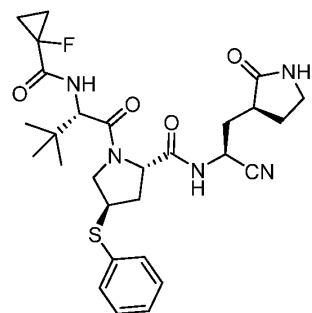
化合物 26



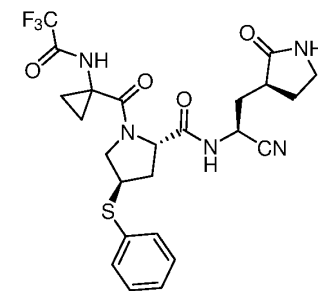
化合物 27



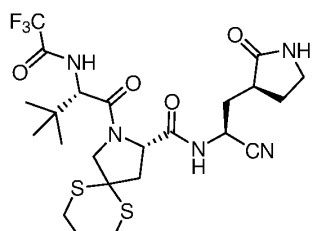
化合物 28



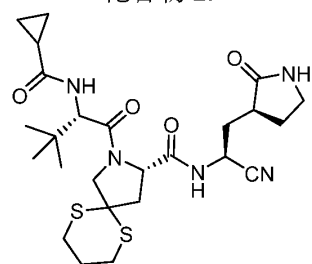
化合物 29



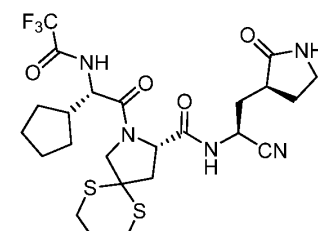
化合物 30



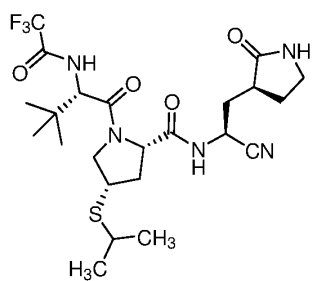
化合物 31



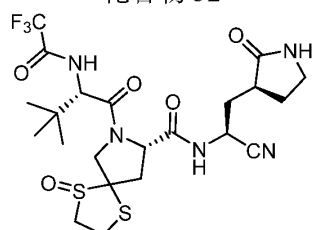
化合物 32



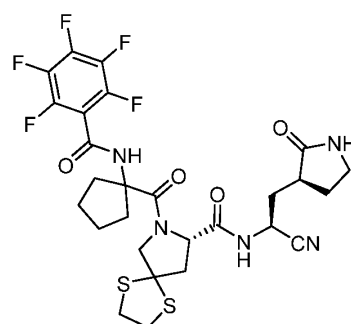
化合物 33



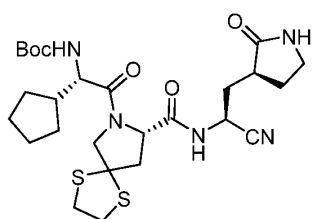
化合物 34



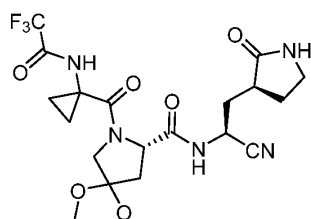
化合物 35



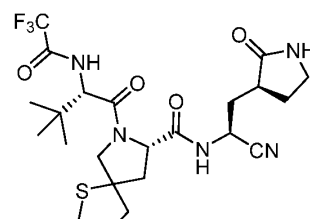
化合物 36



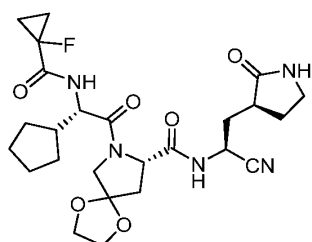
化合物 37



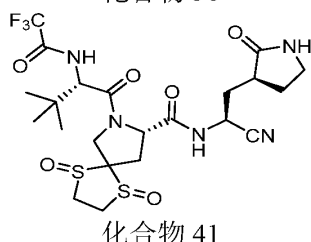
化合物 38



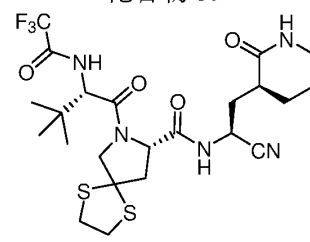
化合物 39



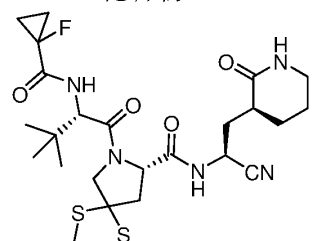
化合物 40



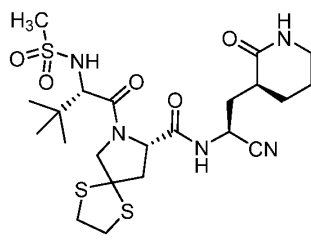
化合物 41



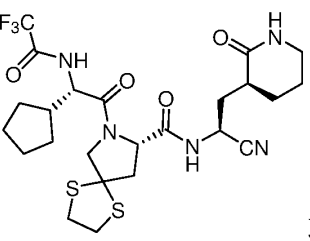
化合物 42



化合物 43

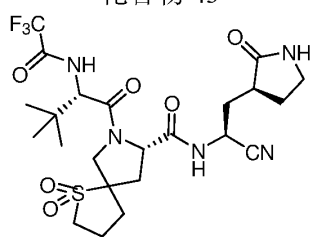


化合物 44



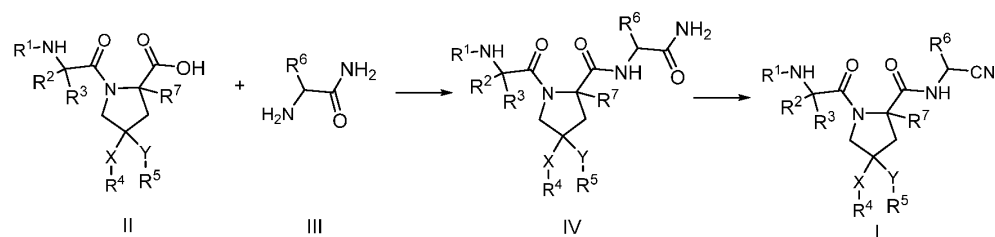
化合物 45

或



化合物 46

9. 一种制备通式 I 所示化合物的方法，所述方法为以下方法之一：
方法 i:



ia) 由式 II 所示化合物与式 III 所示化合物通过缩合反应得到式 IV 所示化合物；

优选地，所述步骤 ia) 为：式 II 所示化合物在 -20℃~50℃ 温度下，在溶剂中，通过缩合剂和碱的作用与式 III 所示化合物反应 0.1-12h，从而得到式 IV 所示化合物，

任选地，所述溶剂为以下的一种或几种混合，四氢呋喃、二氯甲烷、N,N-二甲基甲酰胺、N,N-二甲基乙酰胺、乙酸乙酯、1,4-二氧六环；

任选地,所述缩合剂为以下的一种或几种混合,2-(7-氮杂苯并三氮唑)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸、1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐、1-羟基苯并三唑、2-羟基吡啶-N-氧化物、1-丙基磷酸酐、1H-苯并三唑-1-基氧三吡咯烷基六氟磷酸盐、N,N'-羰基二咪唑、O-苯并三氮唑-四甲基脲六氟磷酸盐;

任选地,所述碱为 N,N-二异丙基乙胺、三乙胺、N-甲基吗啉;

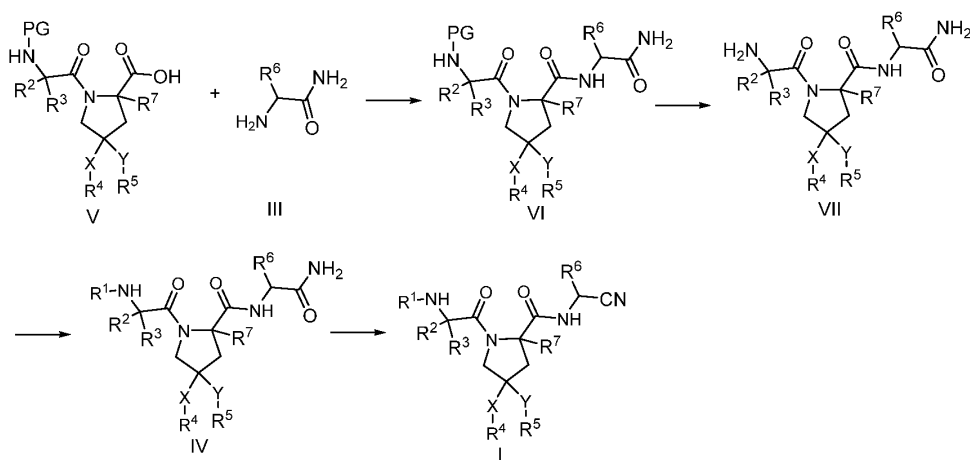
ib) 式 IV 所示化合物通过脱水得到通式 I 所示化合物;

优选地,所述步骤 ib) 为: 式 IV 所示化合物在 -20℃~50℃ 温度下, 在无水溶剂中, 与脱水剂反应 1-24h 得到通式 I 所示化合物;

任选地,所述无水溶剂为以下的一种或几种混合,四氢呋喃、二氯甲烷、甲苯、1,4-二氧六环和吡啶;

任选地,所述脱水剂为三氟醋酸酐或 N-(三乙基铵磺酰)氨基甲酸甲酯; 或者

方法 ii:



ii a) 由式 V 所示化合物与式 III 所示化合物缩合得到式 VI 所示化合物, 其中式 V 所示化合物中的 PG 为氨基的保护基团;

优选地,所述步骤 ii a) 为: 式 V 所示化合物在 -20℃~50℃ 温度下, 在溶剂中, 通过缩合剂和碱的作用与式 III 所示化合物反应 0.1-12h, 从而得到式 VI 所示化合物;

任选地,所述溶剂为以下的一种或几种混合,四氢呋喃、二氯甲烷、N,N-二甲基甲酰胺、N,N-二甲基乙酰胺、乙酸乙酯和 1,4-二氧六环;

任选地,所述缩合剂为以下的一种或几种混合,2-(7-氮杂苯并三氮唑)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸、1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐、1-羟基苯并三唑、2-羟基吡啶-N-氧化物、1-丙基磷酸酐、1H-苯并三唑-1-基氧三吡咯烷基六氟磷酸盐、N,N'-羰基二咪唑和 O-苯并三氮唑-四甲基脲六氟磷酸盐;

任选地,所述碱为 N,N-二异丙基乙胺、三乙胺和 N-甲基吗啉;

任选地,所述氨基的保护基团 PG 为叔丁氧羰基、苄基和对甲氧基苄基;

ii b) 式 VI 所示化合物脱保护得到式 VII 所示化合物;

优选地,所述步骤 ii b) 为: 在 -20℃~50℃ 温度下, 将式 VI 所示化合物与三氟醋酸或氯化氢的有机溶液或 Pd/C/H₂ 反应得到式 VII 所示化合物;

ii c) 式 VII 所示化合物通过氨基酰化、磺酰化或缩合反应得到式 IV 所示化合物;

优选地,所述步骤 ii c) 为:

在 -20℃~50℃ 温度下, 将式 VII 所示化合物与酰氯或酸酐在加入碱的条件下进行氨基酰化反应得到式 IV 所示化合物;

在-20℃~50℃温度下,将式 VII 所示化合物与磺酰氯或磺酸酐在碱的条件下进行磺酰化反应得到式 IV 所示化合物;

在-20℃~50℃温度下,将式 VII 所示化合物与羧基化合物在缩合剂与碱的条件下进行缩合反应得到式 IV 所示化合物;

任选地,所述碱为 N,N-二异丙基乙胺、三乙胺和 N-甲基吗啉;

任选地,所述缩合剂为以下的一种或几种混合,2-(7-氮杂苯并三氮唑)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸、1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐、1-羟基苯并三唑、2-羟基吡啶-N-氧化物、1-丙基磷酸酐、1H-苯并三唑-1-基氧三吡咯烷基六氟磷酸盐、N,N'-羰基二咪唑和 O-苯并三氮唑-四甲基脲六氟磷酸盐;

iid) 式 IV 所示化合物通过脱水得到通式 I 所示化合物;

优选地,所述步骤 iid) 为: 式 IV 所示化合物在-20℃~50℃温度下,在无水溶剂中,与脱水剂反应 1-24h 得到通式 I 所示化合物;

任选地,所述无水溶剂为以下的一种或几种混合,四氢呋喃、二氯甲烷、甲苯、1,4-二氧六环和吡啶;

任选地,所述脱水剂为三氟醋酸酐或 N-(三乙基铵磺酰)氨基甲酸甲酯;

其中, R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^7 、X 和 Y 的定义如权利要求 1-8 任一项中所述。

10. 一种药物组合物,其包含选自如权利要求 1-8 任一项所述的氰基化合物,或其外消旋体、对映异构体、非对映异构体或药学上可接受的盐,以及药学上可接受的辅料;任选地,所述药物组合物还进一步包含利托那韦或其药学上可接受的盐。

11. 一种药物组合,其包含选自如权利要求 1-8 任一项所述的氰基化合物,或其外消旋体、对映异构体、非对映异构体或药学上可接受的盐,以及利托那韦或其药学上可接受的盐。

12. 根据权利要求 1-8 任一项所述的氰基化合物,或其外消旋体、对映异构体、非对映异构体或药学上可接受的盐,或者根据权利要求 10 或 11 所述的药物组合物或药物组合在制备药物中的用途,所述药物选自用于抑制冠状病毒 3CL 蛋白酶活性的药物,用于预防和/或治疗冠状病毒感染的药物,用于抑制小 RNA 病毒的 3CL 蛋白酶活性的药物,和用于预防和/或治疗小 RNA 病毒感染的药物;任选地,所述冠状病毒选自 SARS-CoV、MERS-CoV、H229E-CoV、HKU1-CoV、NL63-CoV、OC43-CoV 和 SARS-CoV-2。