(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103130710 B
(45)授权公告日 2015.12.16

(21)申请号 201110384897.9
(22)申请日 2011.11.29
(73)专利权人 南开大学
地址 300071 天津市南开区卫津路 94 号
专利权人 清华大学
天津国际生物医药联合研究院
(72)发明人 尹正 尚鲁庆 赵向帅 娄智勇
王亚鑫 徐梦莹 王朋 崔璨璨
陈成 赵强 周红刚 杨诚
饶子和
(74)专利代理机构 北京润平知识产权代理有限公司 11283
代理人 王崇
(51)Int.Cl.
C07D 211/76(2006.01)
C07D 401/12(2006.01)
A61K 31/45(2006.01)
A61K 31/454(2006.01)
A61P 31/12(2006.01)
A61P 31/16(2006.01)
A61P 9/00(2006.01)

(56)对比文件
CN 1372566 A ,2002.10.02, 说明书第 58 页实施例 25、第 1 页第 1-3 段、权利要求 1、31.

审查员 李冰

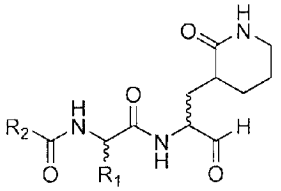
权利要求书2页 说明书16页

(54)发明名称

抗肠病毒 71(EV71) 己内酰胺醛类化合物及其制备方法和用途

(57)摘要

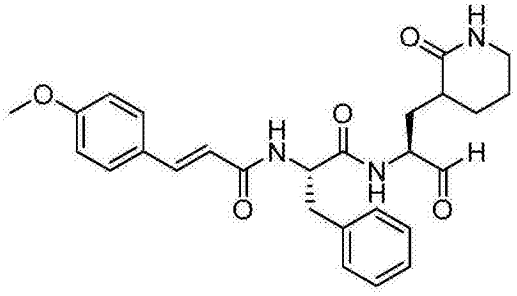
一种己内酰胺醛类肠病毒 71(Ev71)3C 蛋白酶抑制剂,其结构通式为化合 A 所示,结构中的各变量在说明书中定义,这些化合物有效地抑制或阻断了肠病毒 71 的复制。本发明涉及含有式 (A) 结构的化合物、其各种光学异构体、药物活性的代谢物、可药用盐、溶剂化物以及前药在制备治疗手足口病毒感染疾病抗病毒药物的发现和应用。本发明还涉及制备式 (A) 结构化合物的中间体和合成方法。



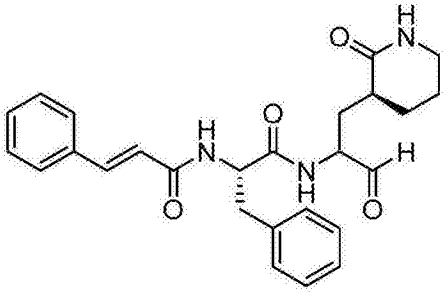
(A)

CN 103130710 B

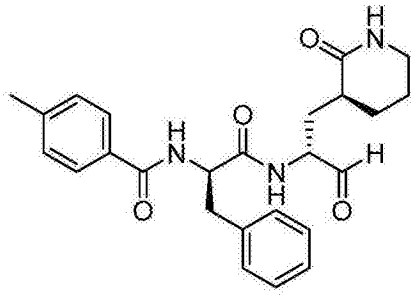
1.一种 2- 哌啶酮基醛类肠病毒 71(EV71)3C 蛋白酶抑制剂,具有如下所示结构的化合物或其光学异构体、可药用盐 :



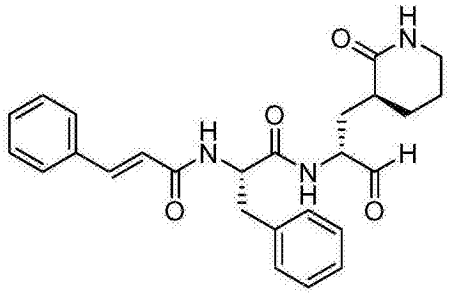
I ,



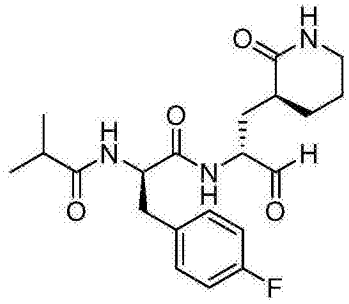
II ,



VI ,



VIII ,



XIV 。

2.权利要求 1 所述抑制剂在制备治疗肠病毒感染疾病药物中的应用,其中,所述肠病毒包括 :柯萨奇病毒 A、柯萨奇病毒 B、肠病毒 71(EV71)。

3.权利要求 1 所述抑制剂在制备治疗冠状病毒感染疾病的药物中的应用,其中,所述冠状病毒包括 :SARS 病毒。

4.权利要求 1 所述抑制剂在制备治疗半胱氨酸蛋白酶诱发疾病的药物中的应用,其中,所述半胱氨酸蛋白酶诱发疾病包括 :手足口病、小儿麻痹症、普通感冒、心肌炎、脑膜炎、甲肝。

5.一种药物组合物,该药物组合物包括有效量的权利要求 1 所述的抑制剂和其在药学上可接受的载体介质或助剂。

6.根据权利要求 5 的药物组合物,该药物组合物还包括 EV71 抗病毒剂,所述 EV71 抗病毒剂是选自 3D 蛋白酶抑制剂和 VP1 蛋白抑制剂的抗病毒制剂。

7.权利要求 5 所述药物组合物在制备治疗肠病毒 71(EV71) 感染疾病的药物中的应用。

8.权利要求 6 所述药物组合物在制备治疗肠病毒 71(EV71) 感染疾病的抗病毒药物中的应用。

9. 权利要求 5 所述药物组合物在制备供治疗哺乳动物的 EV71 病毒感染的药品中的应用。

抗肠病毒 71(EV71) 己内酰胺醛类化合物及其制备方法和用途

技术领域

[0001] 本发明是关于治疗肠病毒 71(EV71) 感染的式 (A) 化合物、药物组合物，以及这类化合物的合成方法、制剂方法和用于这些合成中的化合物。具体地，本发明提供一类己内酰胺醛类化合物，含有这类化合物的药物组合物及这类化合物治疗 EV71 感染的方法。

[0002] 发明背景

[0003] 手足口病 (Hand-Foot-Mouth discasc，HFMD) 又名发疹性水疱口腔炎，是由肠道病毒引起的常见传染病，世界大部分国家和地区均有此病流行的报导。该疾病主要通过粪口途径和呼吸道进行传播，传染性强、极易导致流行或暴发。手足口病以婴幼儿发病为主，大多数患者症状轻微，临床表现以发热和手、足、口腔等部位的皮疹为主要临床特征，更为严重的是，病毒还可以侵犯患者呼吸系统、中枢神经系统等引起脑炎、肺水肿、弛缓性麻痹、心肌炎等症状，病情进展快，容易发生死亡。东南亚和中国一直以来都是人手足口病的高发地区，特别是近些年来，随着人员流动、病毒变异等多种因素的共同影响，该疾病在我国山东、河南、台湾等省份发生了大爆发，造成了上千例的婴幼儿死亡病例，给患儿家庭带来了巨大的经济和精神损害。

[0004] 引发手足口病的肠道病毒有 20 多种，肠道病毒 71 型以及柯萨奇病毒 A 组的 16、4、5、9、10 型，B 组的 2、5 型均为手足口病较常见的病毒，其中最常见的是肠道病毒 71 型 (EV71) 和柯萨奇病毒 A16 型 (CoxA16)。病毒学和流行病学的研究证实，人肠道病毒 71 型 (Enterovirus 71，EV71) 是近年来爆发的人手足口病的主要病原体，同时还能引起无菌性脑膜炎 (ascptic meningitis)、脑干脑炎 (brain stem encephalitis) 和脊髓灰质炎样的麻痹 (polionyehtis hke paralysis) 等多种与神经系统相关的疾病。EV71 近年来已经引起多次流行，研究发现 EV71 的基因型在流行中不断变化，某些位点的基因突变引起 EV71 的致病性的改变，因此 EV71 的防治面临着相当大的压力。目前尚未阐明 EV71 病毒形成病毒持久性及引起手足口病的具体机制，临床上仍缺乏特异、有效的治疗药物，只能采取中药或其他抗病毒药进行治疗，研究表明，相当多的参与者对该治疗没有产生有利的效果，临床上不断出现死亡病例。因此，需要发展具有高效的特异性的用于手足口病的抗 EV71 病毒制剂。

[0005] EV71 是 1969 年 Schmit 等人首次从患有中枢神经系统疾病的婴儿粪便标本中分离得到，属于小 RNA 病毒科肠病毒属，病毒颗粒为典型的正二上面体结构。其基因约由 7408 个核苷酸组成，属单股正链 RNA 病毒，仅含有一个开放读码框 (open-reading frame，ORF)，编码 2194 个氨基酸构成的多聚蛋白 (polyprotein)，在基因组两侧分别为 746bp 的 5’非编码区 (UTR) 和 83bp 的 3’非编码区。EV71 基因组编码的多聚蛋白 (polyprotein) 约含 2193 个氨基酸。在受感染的细胞内，该多聚蛋白被水解成为 P1、P2、P3 三个前体蛋白。经过细胞和病毒的蛋白酶进一步的剪切，P1 前体蛋白可以进一步成熟为 VP1、VP2、VP3 和 VP4 四个病毒结构蛋白，负责病毒颗粒的装配和稳定；P2 前体蛋白则进一步成熟为非结构蛋白 (non-structural protcm，nsp)2A(特异性蛋白酶)、2B 和 2C；P3 前体蛋白则用以形成非结构蛋白 3A、3B(VPg，5’末端结合蛋白)、3C(特异性蛋白酶) 和 3D(RNA-depcndcnt RNA

polymcrase，RdRp)。

[0006] 在七个非结构蛋白中，3C 蛋白酶被认为主要行使特异性蛋白酶的功能，属于半胱氨酸蛋白酶，其活性中心是 Cys147，His40，Glu71 组成的催化三联体，负责特异性地将病毒所编码的各个蛋白质从多聚上切割下来，形成具有独立功能的蛋白质，因而一旦这个蛋白的功能丧失，则病毒进一步的转录和复制将无法正常继续进行。因此可被特异性识别的选择性小分子抑制 3C 蛋白酶的作用是治疗 EV71 病毒感染的有效手段，3C 蛋白酶成为治疗手足口病的重要药物靶点。

[0007] 本发明基于 EV713C 蛋白酶的晶体结构特征，通过结合活性区域的结合位点，设计一系列含己内酰胺醛结构的 3C 蛋白酶抑制剂。

[0008] 本发明的第一个优点是其提供的己内酰胺醛类抑制剂，可有效抑制 EV713C 蛋白酶。

[0009] 本发明的第二个优点是提供的己内酰胺醛类抑制剂，可有效抑制 SARS 病毒主蛋白 Nsp5 蛋白酶。

[0010] 此外，本发明的第三个优点是可以用于制备治疗半胱氨酸蛋白酶诱发疾病药物，如手足口病、普通感冒、小儿麻痹症等。

[0011] 通过生物活性实验发现化合物 I，II，XIV 等多个化合物对细胞培养中的 EV71 病毒显示了非常好的抑制活性，在活体内具有良好的药物动力学性质。

[0012] 本发明的目标是发现一类抗肠病毒 71 特别有效的小分子化合物，并提供用于所述蛋白酶抑制剂化合物合成的中间体和这些合成的合成方法。

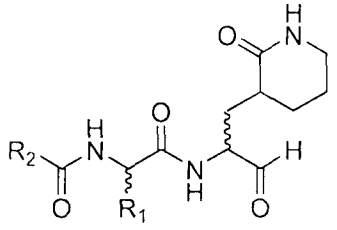
发明内容：

[0013] 本发明针对 EV71 病毒 3C 蛋白酶抑制剂的现有技术的不足，提供一种含式 (A) 类 EV71 病毒 3C 蛋白酶抑制剂，本发明另一个目的是要提供所描述蛋白酶抑制剂化合物中间体的合成和用于这些合成的合成方法。

[0014] 本发明涉及式 (A) 的己内酰胺醛类化合物和 / 或药学上可接受的盐和 / 或水合物制备治疗肠病毒 71(EV71) 感染疾病药物的应用。这些化合物作为其药学上可接受的盐和 / 或水合物，或者作为药物组合物成分（无论其是否与其他治疗手足口病的抗病毒剂，抗感染药，免疫调节剂或抗生素同时给药）而用于抑制 EV71 病毒的 3C 蛋白酶，或者预防 / 治疗一项或多项 EV71 病毒感染症状。

[0015] 更具体的说，本发明涉及式 (A) 化合物和 / 或药学上可接受的盐和 / 或水合物制备治疗肠病毒 71(EV71) 感染疾病药物的应用：

[0016]



(A)

[0017] 其中

[0018] R_1表示 -H，C1-12 烷基，C2-12 烯基，C2-12 炔基，C3-8 环烷基，芳基，杂芳基，芳基 C1-8 烷基，杂芳基 C1-9 烷基，芳基 C2-6 烯基，杂芳基 C2-6 烯基，芳基 C2-6 炔基，杂芳基 C2-6 炔其，-O- 烷基，-O- 环烷基，-O- 杂烷基，-O- 杂环烷基，-O- 杂环基，-O- 链烯基，-O- 环烯基，-O- 杂烯基，-O- 杂环烯基，-O- 链炔基，-O- 环炔基，-O- 杂炔基，-O- 环杂炔基，-O- 芳基，-O- 芳烷基，-O- 杂芳基，-O- 杂芳烷基，-S- 烷基，-S- 环烷基，-S- 杂烷基，-S- 杂环烷基，-S- 杂环基，-S- 链烯基，-S- 环烯基，-S- 杂烯基，-S- 杂环烯基，-S- 链炔基，-S- 环炔基，-S- 杂炔基，-S- 环杂炔基，-S- 芳基，-S- 芳烷基，-S- 杂芳基，-S- 杂芳烷基，-N- 烷基，-N- 环烷基，-N- 杂烷基，-N- 杂环烷基，-N- 杂环基，-N- 链烯基，-N- 环烯基，-N- 杂烯基，-N- 杂环烯基，-N- 链炔基，-N- 环炔基，-N- 杂炔基，-N- 环杂炔基，-N- 芳基，-N- 芳烷基，-N- 杂芳基，-N- 杂芳烷基 ；或任选可被 1 到 4 个取代基所取代，所述 1 到 4 个取代基选自卤素，-OH，-SH，$-NO_2$，-CN，卤 C1-8 烷基，C1-8 烷氧基，C1-6 烷基羰基，C1-6 烷硫基，C1-8 烷氧羰基，$-CF_3$；

[0019] R_2表示烷基，环烷基，杂烷基，杂环烷基，杂环基，链烯基，环烯基，杂烯基，杂环烯基，链炔基，环炔基，杂炔基，环杂炔基，芳基，杂芳基，芳基 C1-8 烷基，杂芳基 C1-9 烷基，芳基 C2-6 烯基，杂芳基 C2-6 烯基，芳基 C2-6 炔基，杂芳基 C2-6 炔基。以上所述芳基是苯基或萘基，杂芳基是通过环碳原子或氮原子连接的具有 1，2 或 3 个选自 N，O，S 的杂原子的五元或六元芳环，且杂环基是通过环碳原子或氮原子连接的具有 1，2，3 或 4 个选自 N，O，S 的杂原子的饱和或不饱和的非芳香性环，其中芳基，杂芳基，杂环基，环烷基，烷基，环烷氧基，烷氧基任选可被 1 到 4 个取代基所取代，所述 1 到 4 个取代基选自卤素，-OH，-SH，$-NO_2$，-CN，苯基，卤 C1-8 烷基，C1-8 烷氧基，C1-6 烷基羰基，C1-6 烷硫基，C1-8 烷氧羰基，$-CF_3$。以上所述环烷基，环烷氧基，芳基，杂芳在或杂环基上的两个相邻取代基任选地一起成 0-3 个含有 O，N，S 的杂原子的 3-6 元环。

[0020] 以上所述芳基是苯基或萘基，杂芳基是通过环碳原子或氮原子连接的具有 1，2 或 3 个选自 N，O，S 的杂原子的五元或六元芳环，且杂环基是通过环碳原子或氮原子连接的具有 1，2，3 或 4 个选自 N，O，S 的杂原子的饱和或不饱和的非芳香性环，其中芳基，杂芳基，杂环基，环烷基，烷基，环烷氧基，烷氧基任选可被 1 到 4 个取代基所取代，所述 1 到 4 个取代基选自卤素，-OH，-SH，$-NO_2$，-CN，卤 C1-8 烷基，C1-8 烷氧基，C1-6 烷基羰基，C1-6 烷硫基，C1-8 烷氧羰基，三氟甲基。以上所述环烷基，环烷氧基，芳基，杂芳基或杂环基上的两相相邻取代基任选地一起形成 0-3 个含有 O，N，S 的杂原子的三 - 六元环。

[0021] 本发明范围内包括的药物组合物，包含抗 EV71 病毒有效量的式 (A) 化合物或其治疗上可接受的盐，并混有在药学上可接受的药物载体或助剂。

[0022] 本发明的一重要方面，涉及在哺乳动物中，通过对该哺乳动物给予有效抗 EV71 病毒的含量的式 A 化合物，或其在治疗上可接受的盐或酯，或上述组合物，以治疗肠病毒 71(EV71) 感染疾病药物的方法。

[0023] 本发明的另一个重要方面，涉及通过使病毒暴露在仰制 EV71 病毒的式 (A) 化合物，或其在治疗上可接受的盐或酯，如上述的组合物之下，寻找治疗手足口病的有效药物。

[0024] 其他的方面涉及的药物组合物，可另外包括其他抗 EV71 制剂，还可包括 EV71 病毒的其他靶标的抑制剂，如 3D 蛋白酶抑制剂和 VP1 蛋白抑制剂。

[0025] 优选实施方案的详述

[0026] 定义：

[0027] 当用于本文中，除非另行提及，均适用下列的定义：

[0028] 在述及各实例时，(R) 或 (S) 用于指明不对称中心的绝对构型，这指明是用于整个化合物的说明而不是单独取代基的说明。

[0029] 本文所使用的“P1，P2，P3”标识，意指从肽类似物的 C- 端开始，并朝向 N- 端延伸的氨基酸的残基的位置，即 P1 代表从 C 端开始的第一个位置，P2 为从 C 端开始的第二个位置（参见 BergerA.&Schechtcr I，Transactions of the RoyalSociety London serics B257，249-264(1970)）。

[0030] 本文所用的“卤素”一词是指卤素取代基，即选自碘，溴，氯或氟。

[0031] 本文所用的“C1-6 烷基”一词，不论单独使用或与另一取代基组合使用时，是指非环形的直链或支链烷基取代基，它包含 1 到 6 个碳原子，包括例如甲基、乙基、丙基、丁基、己基、1- 甲基乙基，1，1- 二甲基乙基，1- 甲基丙基及 2- 甲基丙基。

[0032] 本文所用的“C3-8 环烷基”一词，不管单独使用或与另一取代基组合使用时，是指非环形的直链或支链烷基取代基，它包含 3 到 8 个碳原子，包括例如环丙基，环丁基，环戊基，环己基，环庚基及环辛基。

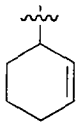
[0033] 本文所用的“C1-8 烷氧基”一词，不论单独使用或与另一取代基组合使用时，是指非环形的直链或支链烷氧基取代基，它包含 1 到 8 个碳原子，包括例如甲氧基、乙氧基、丙氧基、丁氧基、己氧基、1- 甲基乙氧基，2，2- 二甲基丁氧基，1- 甲基己氧基及庚氧基。

[0034] 本文所用的“C1-8 卤烷基”一词，单独使用或与另一取代基组合使用时，是指非环形的、直链或支链烷基取代基，它包含 1 到 8 个碳原子，具有一个或多个选自氟，氯，溴或碘取代的氢。

[0035] 本文所用的“C1-6 硫基”一词，单独使用或与另一取代基组合使用时，是指非环形的、直链或支链烷基取代基，含有硫醇基团，例如硫丙基。

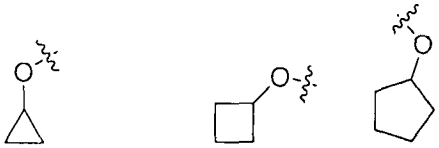
[0036] 本文所用的“不饱和非芳香环”一词，意指不饱和的环烷基，例如取代基环己烯基。

[0037]



[0038] 本文所用的“C3-8 环烷氧基”一词，不论单独使用或与另一取代基组合使用时，意指取代基包含 3 到 8 个碳原子的 -O-$C_{3\ 8}$环烷基，包括例如 -O- 环丙基，-O- 环丁基，-O- 环戊基等。

[0039]



[0040] 本文所用的“C1-6 烷基羰基”一词，单独使用或与另一取代基组合使用时，是指通过羰基连接的 C1-6 烷基，即 -C(O)-$C_{1\ 6}$烷基。

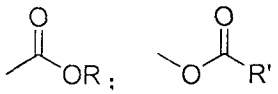
[0041] 本文所用的“芳基”一词，意指含有 6 个碳原子的芳香族单环系统，或含有 10 个原子的芳香族双环系统，例如苯基和萘基 - 环系统。

[0042] 本文所用的“杂芳基”一词，单独使用或与另一取代基组合使用时，意指通过环碳原子或氮原子连接的具有 1，2 或 3 个选自 N，O，S 的杂原子的五元，六元或七元不饱和的杂环，移除氢而衍生的单价取代基。适当的杂环实例如：噻吩，呋喃，吡咯，咪唑，吡唑，噻唑，噁唑，异噁唑，1，2，3- 三唑，1，2- 噻二唑，吡啶，吡嗪，嘧啶，1，2，4- 三嗪，苯并噁唑，苯并噻唑，喹啉。

[0043] 本文所用的“低碳烷基，低碳烯基，低碳炔基”一词，单独使用或与另一取代基组合使用时，是指包含 1 到 6 个碳原子的非环形的、直链或支链烷基，烯基或炔基取代基。

[0044] 本文所用的“药学可接受的酯”一词，单独使用或与另一取代基组合使用时，意指化合物式 (I) 的酯，其中该分子的任何羧基官能基或羟基官能基，优选的是羧基或羟基终端，被烷氧羰基官能团或酯键置换：

[0045]



[0046] 其中 R，R’ 部分是选自低碳烷基（如甲基、乙基、丙基、丁基、己基）；烷氧烷基（如甲氧乙基）；烷氧酰基（如乙酰氧基甲基）；芳烷基（如苄基）；芳氧烷基（如苯氧乙基）；芳基（如苯基）。可视需要被卤素，C1-4 烷基或 C1-4 烷氧基取代。其他适当的前药酯，将其列入本文中以作参考。这类在药学上可接受的酯，通常在哺乳动物体内，被水解转化为化合物式 (A) 的酸形式。

[0047] 关于上述的酯类，除非另行指定，任何存在的烷基部分均有利地含有 1 至 6 个碳原子。任何存在于该酯类中的芳基部分，均有利地包括苯基基团。

[0048] 本文中“药物上可接受的盐”一词是指式 (A) 化合物的盐，其在正常医学治疗中，适用于人及动物的组织接触而无毒性，无刺激性，无过敏反应等。一般是水溶性或油溶性，或是易分散的，并在其使用上是有效的。此词包括药物上可接受的酸加成盐和药物上可接受的碱加成盐。

[0049] “药物上可接受的酸加成盐”一词是指保持生物活性及游离态碱的性质，并且是非生物上或其他方面不需要的，其与无机酸如硫酸，硝酸，磷酸，盐酸，氢溴酸，氨基磺酸等，及有机酸如醋酸，三氟醋酸，三氯醋酸，肉桂酸，柠檬酸，马来酸，己二酸，藻酸，抗坏血酸，天冬氨酸，苯甲酸，苯横酸，乙醇酸，苹果酸，乳酸，丙二酸，草酸，烟酸，丁二酸，水杨酸，硬脂酸，酒石酸，对地氨基苯磺酸，三甲基苯磺酸，对甲基苯磺酸，扁桃酸，果胶酯酸，苦味酸，丙酸等所形成的盐。

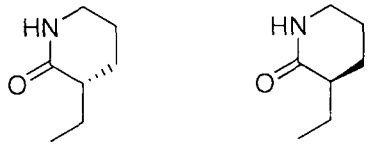
[0050] “药物上可接受的碱加成盐”一词是指保持生物活性及游离态酸的性质，并且是非生物上或其他方面不需要的，其是与无机碱如氨或铵或金属性离子如，钠，镁，铜，锌，钙，钾，铝等的氢氧化物或碳酸盐所形成的盐，特别优选的是铵，钾，钠，钙，镁盐。由药物上可接受的有机的非毒性的碱衍生的盐包括伯胺，仲胺及叔胺，季铵化合物，经取代的胺，包括天然的经取代和胺，环胺以及碱离子交换树脂，如甲基胺，二甲基胺，三甲基胺，乙基胺，二乙基胺，三乙基胺，三丙基胺，异丙基胺，三丁基胺，乙醇胺，二乙醇胺，二环已基胺，赖氨酸，精氨酸，组氨酸，咖啡因，胆碱，甜菜碱，亚乙基二胺，葡糖胺，甲基葡糖胺，可可碱，哌嗪，哌啶，嘌呤，四甲基铵化合物，四乙基铵化合物，吡啶，N，N 二甲基苯胺，N- 甲基哌啶，N- 甲基吗啉，N，N- 二苄基苯乙胺等所形成的盐。特别优选的有机非毒碱是异丙基胺，二乙基胺，乙醇胺，

三甲基胺，二环己基胺，胆碱，咖啡因。

[0051] 优选的方案

[0052] 本发明的优选方案包括式 (A) 化合物，其中己内酰胺部分选自两个不同的异构体，具有 (i) 和 (ii) 表示的构型：

[0053]



i ii

[0054] 其中优选的是以结构 (ii) 表示的 R 构型的己内酰胺。

[0055] R_1：本发明的优选方案包括式 (A) 化合物，其中 R_1 优选的是 C3-8 环烷基，芳基 C1-6 烷基，杂芳基 C1-9 烷基，芳基 C2-6 烯基，杂芳基 C2-6 烯基，芳基 C2-6 炔基，杂芳基 C2-6 炔基，或选择性地被 1 到 4 个取代基所取代，所述 1 到 4 个取代基优先选自卤素，-OH，-SH，$-NO_2$，-CN，卤 C1-8 烷基，C1-8 烷氧基。

[0056] 最优选的 R_1 为被卤素取代的苯乙基。

[0057] R_2：本发明的优选方案包括式 (A) 化合物，其中 R_2 优选的是芳基 C2-6 烯基，杂芳基 C2-6 烯基，芳基 C1-6 烷基，杂芳基 C1-9 烷基，C3-8 环烷基，芳基 C2-6 炔基，杂芳基 C2-6 炔基，或选择性地被 1 到 4 个取代基所取代，所述 1 到 4 个取代基先选自卤素，-OH，-SH，C1-8 烷氧基。

[0058] 最优选的 R_2 为芳基 C2-6 烯基，杂芳基 C2-6 烯基。

[0059] 本发明的己内酰胺类化合物可以游离形式或以盐形式存在。本领域技术人员已知许多化合物类型的药学上可接受的盐及其制备方法。药学上可接受的盐包括常规的无毒性的盐，包括这样的化合物碱与无机或有机酸形成的季铵盐。

[0060] 本发明的化合物可形成水合物或溶剂合物。本领域技术人员已知将化合物与水一起冻干时所形成的水合物或在溶液中与合适的有机溶剂浓缩时形成溶剂合物的方法。

[0061] 本发明包含含有治疗量本发明化合物的药物，和一种或多种药学上可接受载体和 / 或赋形剂的药物组合物。载体包括如盐水，缓冲盐水，葡萄糖，水，甘油，乙醇和它们的结合物。载体或赋形剂还可以包括本领域已知的时间延迟材料，如单硬脂酸甘油酯或二硬脂酸甘油酯，还可包括蜡，乙基纤维素，羟丙基甲基纤维素，异丁烯酸甲酯等等。如果需要，该组合物还可以包含较小量的润湿剂或乳化剂，或 pH 缓冲剂。该组合物可以是液体，悬浮液，乳剂，片剂，丸剂，胶囊，持续释放制剂或粉末。该组合物可以用传统的黏合剂和载体如三酸甘油酯配制成栓剂。口服制剂可以包括标准载体如药物品级的甘露糖醇，乳糖，淀粉，硬脂酸镁，糖精钠，纤维素和碳酸镁等等。视需要制剂而定，配制可以设计混合，制粒和压缩或溶解成分。在另一个途径中，该组合物可以配制成纳米颗粒。

[0062] 本发明的药物组合物可以以各式各样的药物形式给药。使用的药物载体可以为固体或者液体。

[0063] 如果使用固体载体，制剂可以为片剂，被放入硬胶囊中的粉末或小药丸形式或锭剂或糖锭形式。固体载体的量在很大程度上变化，但是优选从约 25mg 到约 10g。典型的固体载体包括乳糖，石膏粉，蔗糖，滑石，凝胶，琼脂，果胶，阿拉伯胶，硬脂酸镁，硬脂酸等等。

固体载体可以包括一种或多种可能同时作增香剂，润滑剂，增溶剂，悬浮剂，填料，助流剂，压缩助剂，粘合剂或片剂－崩解剂的物质；它还可以是包封材料。在粉末中，载体为精细粉碎的固体，它与精细粉碎的活性成分的混合。在片剂中活性成分与具有必要的压缩性质的载体以合适的比例混合，以需要的形状和大小压缩。粉末和片剂优选包含至多99％活性成分。

[0064] 如果使用液体载体，制剂可以为糖浆，乳剂，软胶囊，在安瓿或小瓶或非水的液体悬浮液中的无菌注射溶液或悬浮液。典型的液体载体包括糖浆，花生油，橄榄油，水，等等。液体载体用于制备溶液，悬浮液，乳剂，糖浆，酊剂和密封的组合物。活性成分可以溶解或悬浮于药学上可接受的液体载体如水，有机溶剂，二者的混合物或药学上可接受的油类或脂肪。液体载体可以包含其他合适的药物添加剂如增溶剂，乳化剂，缓冲剂，防腐剂，增甜剂，增香剂，悬浮剂，增稠剂，颜料，粘度调节剂，稳定形成渗透压－调节剂。用于口服和肠胃外给药的液体载体的合适的例子包括水（部分地包含如同上述的添加剂，例如纤维素衍生物，优选羧甲基纤维素钠盐溶液），醇（包括一元醇和多元醇，例如乙二醇）和它们的衍生物，和油类（例如分馏椰子油和花生油）。用于肠胃外给药的载体还可以为油脂如油酸乙酯和异丙基肉豆蔻酸盐。无菌的液体载体用于肠胃外给药的无菌的液态组合物。用于加压组合物的液体载体可以为卤代烃或其他药学上可接受的推进剂。无菌溶液或悬浮溶液液体药物组合物可以用来，例如，静脉内，肌内，腹膜内或皮下注射。可根本领域的已知技术，使用适当的分散剂或湿润剂（如吐温80）和悬浮剂来调配该悬浮液。注射时可单次推入或逐渐注入30分钟的经脉内灌注。该化合物还可以以液体或者固体组合物的形式口服给药。本文中所用的肠胃外词，包括皮下、皮内、肌肉内、静脉内、关节内、滑膜内、胸骨内、鞘内和病灶内注射或输液技术。

[0065] 为了获得稳定的水溶性的剂型，可以将化合物或其药学上可接受的盐溶于有机或无机酸的水溶液，0.3M琥珀酸或柠檬酸溶液。选择性地，酸性的衍生物可以溶于合适的碱性溶液。如果得不到可溶形式，可将化合物溶于合适的共溶剂或它们的结合。这样的合适的其溶剂的例子包括，但是不局限于，浓度范围从0-60％总体积的乙醇，丙二醇，聚乙二醇300，聚山梨酸酯80，甘油，聚氧乙烯脂肪酸酯，脂肪醇或甘油羟脂肪酸酯等等。

[0066] 本发明的药物组合物可口服、非经肠胃或通过植入的储存器给药，口服给药或通过注射给药时优选的。各种释放系统是已知的并且可以用于化合物或其他各种制剂的给药，这些制剂包括片剂，胶囊，可注射的溶液，脂质体中的胶囊，微粒，微胶囊，等等。引入的方法包括但是不局限于皮肤的，皮内，肌内，腹膜内的，静脉内的，皮下的，鼻腔内的，肺的，硬膜外的，眼睛的和（通常优选的）口服途径。化合物可以通过任何方便的或者其它适当的途径给药，例如通过注入或快速浓注，通过上皮的或粘膜线路（例如，口腔粘膜，直肠和肠粘膜，等等）吸收或通过负载药物的支架以及可以于其他生物活性剂一起给药。可以全身或局部给药。用于鼻，支气管或肺疾病的治疗或预防时，优选的给药途径为口服，鼻给药或支气管烟雾剂或喷雾器。

[0067] 可供上文提及的调配物和组合物使用的其他适当的赋形剂或载体，可在标准药理学教科书中找到，例如在“Remington’s Pharmaccutical Sciences”，第19版中。为了预防和治疗EV71病毒引起的手足口病，在单一治疗中，在本文中所描述的3C蛋白酶抑制剂化合物，在约0.01到约100mg/kg体重每天之间的剂量范围是有用的，优选的是0.5到75mg/

kg 体重每天之间。通常，本发明的药物组合物将每天给药约 1 到 5 次，或另外一连续的输液。这类药物可用作慢性或急性的治疗。可与载体物质混合，产生单一剂量形式的活性成分的含量，可根据待处理的宿主和给药的特定模式而改变。代表性的制剂将含有约 5％到约 95％活性成分（重量 / 重量）。优选的是，这类制剂含有约 20％到约 80％的活性化合物。

[0068] 熟悉本领域这将理解可能需要比上文提及的更高或更低的剂量。对特定患者的特定剂量和处理方式应该按照各种因素而定，包括所使用的特定化合物的活性，患者的年龄、体重、性别、一般的健康状态、饮食、给药的时间、代谢率、药物的组合，以及感染的严重性和过程、患者对感染的倾向，还有处理医师的判断。一般而言，以实质上低于该化合物的最佳剂量的小剂量开始治疗。随后通过少量的增加而增加剂量，直到在该情况下达到最佳的效果为止。一般而言，要求以通常是以产生有效的抗病毒结果，但不引起任何有害或不利的副作用的浓度含量来投予该化合物。

[0069] 当本发明的组合物包括式 (A) 化合物与一种或多种另外的治疗或预防剂组合时，该化合物与另外的制剂的存在量应该以约 10 到 100％之间的剂量含量提供，更优选的是约 10 至 80％的剂量，通常以单次治疗法给予。

[0070] 当这些化合物或其在药学上可接受的盐类与在药学上可接受的载体一起调配时，将所得的组合物在活体内给予哺乳动物，如人类，以便治疗或预防 EV71 病毒感染。也可使用本发明化合物与下列制剂混合，来完成这类治疗，包括但不局限于 ：免疫调节剂，如 α，β，δ - 干扰素 ；其他的抗病毒制剂，如阿昔洛韦，更昔洛韦 ；其他的 EV713C 蛋白酶抑制剂 ；对在 EV71 生命循环中其他靶标的抑制剂，如 3D 蛋白酶，VP1 蛋白 ；或其组合物。可将另外的制剂与本发明化合物混合，以产生单一的剂量形式。另外，也可将这类另外的制剂可分别投予哺乳动物，成为多个剂量形式的一部分。因此，本发明其他的具体方案提供一种在哺乳动物中，通过给予式 (M) 化合物，其中取代基如同上文定义，来抑制 EV71 病毒的方法。

[0071] 在优选的具体方案中，这些方法在哺乳动物中有用于降低 EV71 复制能力。如果药物组合物仅包括作为活性成分的本发明化合物，这类方法可另外包括对该哺乳动物给予选自免疫调节剂，抗病毒剂，其他 EV71 病毒 3C 蛋白酶抑制剂，或对在 EV71 生命循环中的其他靶标，如 3D 蛋白酶抑制剂和 VP1 蛋白抑制剂。可在给予本发明组合物之前、同时或之后，将这类另外的制剂给予哺乳动物。

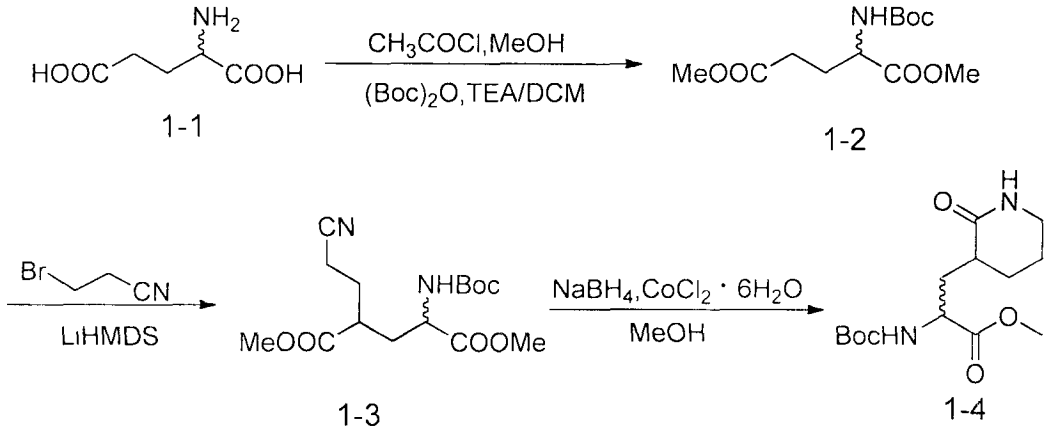
[0072] 工艺流程

[0073] 本发明式 (A) 化合物可以用本发明方法有效地制备，包括采用下述一般合成方法。这些合成方法中的 R_1，R_2 定义如上。

[0074] 工艺流程 I ：

[0075] 中间体 1-4 经流程 I 的路线合成得到，在该流程中，以谷氨酸 1-1 为原料，首先将羧基进行甲酯化保护，随后将其氨基进行官能团保护得到其中间体 1-2，然后用用 LiHMDS（或其他强碱性试剂）将化合物 1-2 脱质子化，引入氰乙基基团得到中间体 1-3。然后将中间体 1-3 的氰基还原，进而发生分子内酰胺化反应，分子内成环得到关键中间体 1-4。

[0076]



1-1 1-2 1-3 1-4

[0077] 步骤 I-1 化合物 N-Boc- 谷氨酸二甲酯 (1-2) 的制备

[0078] 在 0℃条件下，将乙酰氯 (5.0mL) 缓慢滴加入甲醇 (100.0mL) 中，搅拌 5 分钟，然后加入谷氨酸 (10.0g，67.9mmol)，继续搅拌并加热至回流，保持回流温度反应 2 小时。停止反应，减压蒸馏除去溶剂。将得到的油状物溶于 THF 中，在 0℃条件下滴加 TFA(28.54mL，203.7mmol)，保持 0℃搅拌 5 分钟，继续滴加容于 THF(30.0mL) 中的二碳酸二叔丁酯 (17.78g，81.5mmol)，搅拌至室温反应 2.5 小时。反应结束后，减压除去溶剂，残留物用水 (200.0mL) 溶解后，加柠檬酸溶液酸化至 PH ＝ 4，加 DCM(2×100.0mL) 萃取，合并有机相，有机相用饱和食盐水洗涤后有机相用无水硫酸钠干燥，然后浓缩，得到的粗产物经快速色谱柱 (PE ： EA ＝ 5 ： 1) 纯化，得到目标化合物 (1-2)(17.8g，产率 95.2％)。步骤 1-2 化合物 2- 叔丁氧羰基氨基 -4- 氰乙基 - 戊二酸二甲酯 (1-3) 的制备

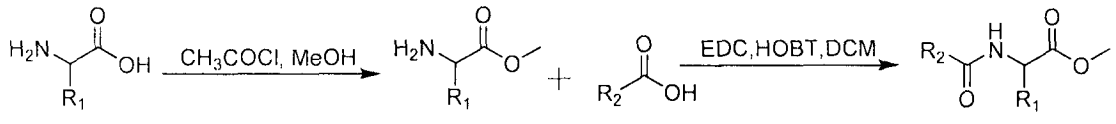
[0079] 将双 (三甲基硅基) 氨基锂 (78.5mL1.0M 的 THF 溶液，78.5mmol) 加到 -78℃的 N-Boc- 谷氨酸二甲酯 (1-2)(10.0g，36.4mmol) 的无水 THF(200.0mL) 溶液中，并将所得溶液在此温度搅拌 30 分钟。然后缓慢滴加溴丙腈 (3.4mL)，将反应混合物在 -78℃下继续搅拌 2 小时。待反应结束后，加入冰醋酸 (5.0mL) 淬灭反应，搅拌至室温。减压除去溶剂，残留物用水 (100.0mL) 溶解后，以 DCM 萃取 (100.0mL×3)，合并有机相，用饱和食盐水洗涤，并将有机相用无水硫酸钠干燥，然后浓缩，得到的粗物经快速色谱柱 (E ： EA ＝ 2 ： 1) 纯化，得到目标化合物 (1-3)(7.1g，产率 59.5％)。

[0080] 步骤 1-3 化合物 2- 叔丁氧羰基氨基 -3-(2- 羰基 -3- 哌啶烷)- 丙酸甲酯 (1-4) 的制备

[0081] 在 2- 叔丁氧羰基氨基 -4- 氰乙基 - 戊二酸二甲酯 (1-4)(5.0g，15.9mmol) 的甲醇 (80.0mL) 溶液中加入氯化钴水合物 (4.0g，15.9mmol)，然后在 0℃条件下向所得到的粉红色溶液中分次加入硼氢化钠 (6.0g，159.5mmol)，室温搅拌 18 小时。TLC 监测反应，待反应完毕后，加入饱和氯化铵水溶液 (30.0mL) 淬灭反应，搅拌 10 分钟。抽滤除去固体杂质，减压除去易挥发溶剂，残留液体用 DCM(100.0mL×3) 萃取后，加水 (2×50.0mL) 洗涤有机相。合并的有机相用饱和氯化钠水溶液洗涤，无水硫酸钠干燥，过滤蒸除溶剂，得到的粗产物经快速色谱柱 (EA) 纯化，最终得到关键中间体 (1-4)(2.9g，产率 60.7％)。

[0082] 流程 II

[0083]



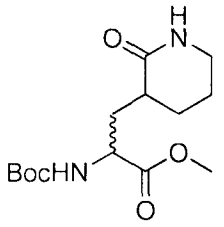
2-1 2-2 2-3 2-4

[0084] 结构单元 2-4 通过流程 II 合成得到，其中 R_1，R_2表示的其团上文已经描述。以化合物 2-1 为原料，首先进行羧基甲酯化保护得到化合物 2-2，再与不同的有机酸 2-3 进行缩合得到中间体 2-4。

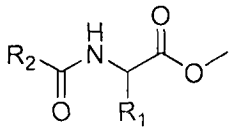
[0085] 流程 III

[0086] 本发明中的式 (A) 化合物是由化合物 1-4 脱去氨基保护基和化合物 2-4 脱去羰基保护基进行缩合，再进一步进行衍生化得到化合物 3-1。

[0087]

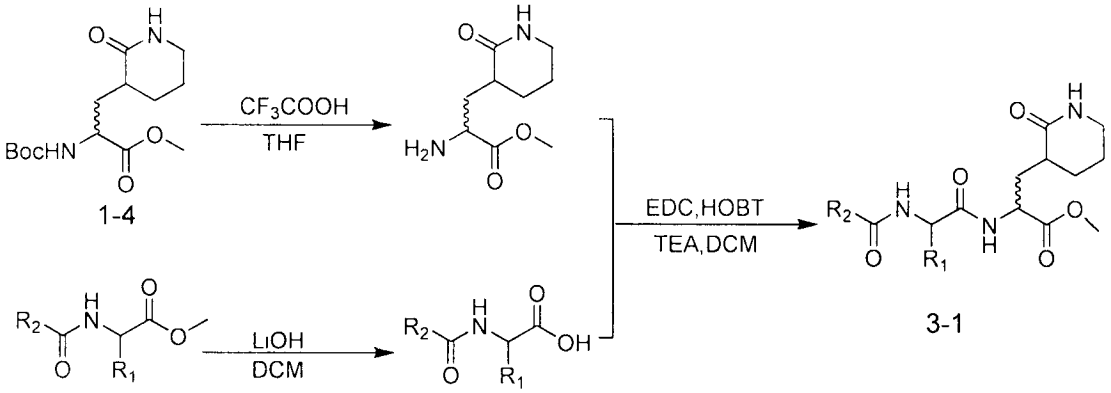


1-4



2-4

[0088]

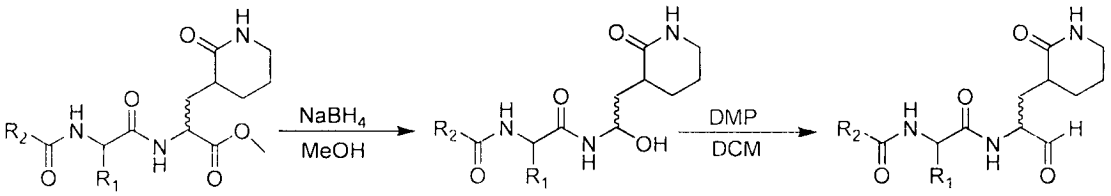


1-4 3-1 2-4

[0089] 流程 IV

[0090] 本流程是进行化合物 3-1 的结构衍生化，已得到己酰胺醛式 (A) 化合物。其中，本发明的式 (A) 化合物可以经下列合成路线由化合物 3-1 衍生化得到。

[0091]



3-1 4-1 4-2

[0092] 步骤 IV-1 化合物 2-[2-R_2- 氨基 -1- 羰基 -3-R_1] 丙氨基 -3-(2- 羰基 -3- 哌啶烷)- 丙醇 (4-1) 的制备

[0093] 向 2-[2-R_1- 氨基 -1- 羰基 -3-R_3] 丙氨基 -3-(2- 羰基 -3- 哌啶烷)- 丙酸甲酯 (1.0equiv.) 的甲醇溶液 (10.0mL) 中分次加入硼氢化钠 (10.0equiv.)，室温搅拌 2 小时。

加入饱和氯化铵水溶液 (5.0mL) 淬灭反应，减压除去甲醇。用 DCM(3×50.0ml) 萃取，合并的有机相用饱和氯化钠溶液洗涤，无水硫酸钠干燥，然后浓缩，得到的粗产物经快速色谱柱 (DCM ： MeOH ＝ 50 ： 1) 纯化，得到目标化合物 (4-1)(产率 87.8%)。

[0094] 步骤 IV-2 化合物 2-[2-R_2- 氨基 -1- 羰基 -3-R_1] 丙氨基 -3-(2- 羰基 -3- 哌啶烷)- 丙醛 (4-2) 的制备

[0095] 向 2-[2-R_4- 氨基 -1- 羰基 -3-R_3] 丙氨基 -3-(2- 羰基 -3- 哌啶烷)- 丙醇 (1.0equiv.) 的无水 DCM(10.0mL) 溶液中加入 DMP(1.0equiv.)，搅拌 2 小时。加入饱和碳酸氢钠 (2.0mL) 淬灭反应，同时加入硫代硫酸钠 (2.0equiv)，搅拌至有机相澄清。用 DCM(3×50.0mL) 萃取，合并的有机相用无水硫酸钠干燥，然后浓缩，得到的粗产物经快速色谱柱 (DCM ： MeOH ＝ 30 ： 1) 纯化，得到目标化合物 4-2(产率 81.3%)。

[0096] 实例

[0097] 通过下列不受限制的实例，更详细地说明本发明，但本发明不局限于以下实例。下列实例中以摄氏度数提供温度。除非另行陈述，溶液百分比表示重量对体积的关系，且溶液比例表示体积对体积的关系。实例中化合物的结构用以下一种或多钟方法确定 ：核磁共振谱仪，高分辨质谱分析，薄层色谱。如果给出的表示化合物的结构式与其化学命名不符，以结构式为准。

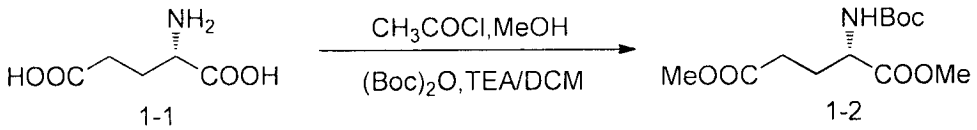
[0098] 核磁共振谱 (^{1}H NMR 和 ^{13}C NMR) 是用 Bruker400 谱仪在 400MHz 场强下测定的。化学位移用相对于内标四甲基甲硅烷标准下移多少百万分之一 (ppm，δ) 表示。^{1}H-NMR 中峰的多重性表示如下 ：s ＝单峰 ；d ＝双重峰 ；t ＝三重峰 ；m ＝多重峰。偶合常数用赫兹表示。溶剂峰参考内部的氘代试剂。所用的商品化试剂都是分别从它们各自的供应商那里得到，若有需处理的条件，文中另有说明。四氢呋喃 (THF) 是在使用前经钠 - 二苯甲酮体系蒸馏而得 ；二氯甲烷 (DCM) 是在使用前从氢化钙蒸馏而得。

[0099] 本文用到下列缩写 ：Me ：甲基 ；MeOH ：甲醇 ；Boc ：叔 - 丁氧羰基 ；TEA ：三乙胺 ；EtOAc ：乙酸乙酯 ；DMP ：Dess-martin 试剂 ；PE ：石油醚 ；Et_2O ：乙醚 ；TFA ：三氟乙酸 ；EDC ：1-(3- 二甲氨基丙基)-3- 乙基碳化二亚胺盐酸盐) ；HOBt ：1- 羟基苯并三氮唑水合物。另外，“L”代表天然存在的氨基酸。FBS ：胎牛血清 ；PBS 溶液 ：磷酸缓冲液 ：PBST ：磷酸缓冲液加上 Tween-20 ；ESMS ：电喷雾质谱分析 ；MS ：质谱分析 ；HPLC ：高效液相色谱法。

[0100] 本发明实施方案的实例如下所述 ：

[0101] 实施例 1 N-Boc-L-(+)- 谷氨酸二甲酯 (1-2) 的制备

[0102]



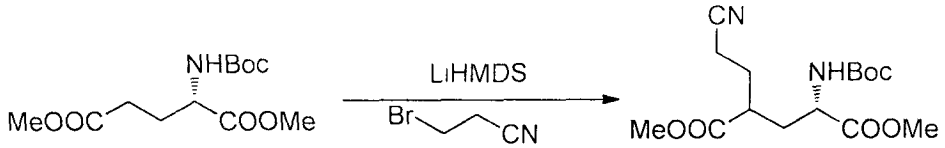
1-1 1-2

[0103] 在 0℃条件下，将乙酰氯 (5mL) 缓慢滴加入甲醇 (100mL) 中，搅拌 5 分钟，然后加入谷氨酸 (10g，67.9mmol)，继续搅拌并加热至回流，保持回流温度反应 2 小时。停止反应，减压除去溶剂，用乙醚重结晶。将得到的油状物溶于 THF(150mL) 中，在 0℃条件下滴加 TEA(28.5mL，203.7mmol)，保持 0℃搅拌 5 分钟，继续滴加溶于 THF(30mL) 中的二碳酸二叔丁酯 (17.8g，81.5mmol)，搅拌至室温反应 2.5 小时。反应结束后，减压蒸除溶剂，残留物中加入水 (200mL)，用 DCM(2×200mL) 从水相中萃取，合并的有机相用无水硫酸钠干燥，

然后浓缩，得到的粗产物经快速色谱柱（PE ： EA ＝ 5 ： 1）纯化，得到N-Boc-L-(+)-谷氨酸二甲酯（17.7g，产率95.2％）为无色油状液体，TLC ： R_f＝ 0.5(PE ： EA ＝ 5 ： 1)；^{1}H-NMR(400MHz，$CDCl_3$)：δ 5.36(m，1H)，4.32(m，1H)，3.75(s，3H)，3.68(s，3H)，2.43(m，2H)，2.19(m，1H)，1.96(m，1H)，1.440(s，9H)；^{13}C-NMR(100MHz，$CDCl_3$)：δ 173.0，172.6，155.3，79.7，52.7，52.2，51.6，30.0，28.1(3)，27.5。

[0104] 实施例 2 2-叔丁氧羰基氨基-4-氰乙基-戊二酸二甲酯（1-3）的制备

[0105]

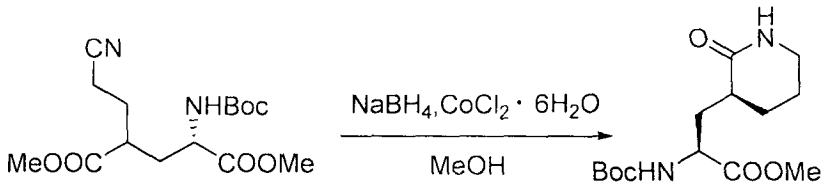


1-2 1-3

[0106] 在-78℃的条件下，将双（三甲基硅基）氨基锂（78.5mL1.0)M的THF溶液，78.5mmol）缓慢滴加到N-Boc-L-(+)-谷氨酸二甲酯（1-2)(10g，36.4mmol）的无水THF(200mL）溶液中，并将所得溶液在此温度下搅拌30分钟。然后保持温度不变，缓慢滴加溴丙腈（3.4mL)，将反应混合物在-78℃的条件下继续搅拌2小时。待反应完毕后，加入冰醋酸（5mL）淬灭反应，搅拌至室温。先减压旋除溶剂，然后加入水（200mL)，用DCM(2×200mL）萃取水相，合并的有机相用无水硫酸钠干燥，然后浓缩，得到的粗产物经快速色谱柱（PE ： EA ＝ 2 ： 1）纯化，得到2-叔丁氧羰基氨基-4-氰乙基-戊二酸二甲酯（7.1g，产率59.5％）为淡黄色油状液体，TLC ： R_f＝ 0.4(PE ： EA ＝ 2 ： 1)；^{1}H-NMR(400MHz，$CDCl_3$)：δ 5.07(d，J ＝ 8.8Hz，1H)，4.36(dd，J ＝ 12.4Hz，1H)，3.75(s，3H)，3.72(s，3H)，2.63(m，1H)，2.39(m，2H)，1.96-2.06(m，4H)，1.45(s，9H)；^{13}C-NMR(100MHz，$CDCl_3$)：δ 174.38，172.34，155.37，118.67，80.33，52.56，52.17，51.56，40.78，34.46，28.26，27.32，15.15。

[0107] 实施例 3 2-叔丁氧羰基氨基-3-(2-羰基-3-哌啶烷)-丙酸甲酯（1-4）的制备

[0108]

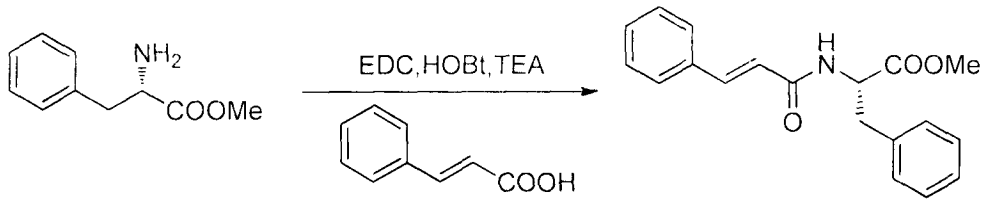


1-3 1-4

[0109] 向2-叔丁氧羰基氨基-4-氰乙基-戊二酸二甲酯（1-4)(5g，15.9mmol）的甲醇（80mL）溶液中加入氯化钴水合物（4g，14.6mmol)，然后在0C条件下向所得到的粉红色混合物中分多次缓慢加入硼氢化钠（6g，157.9mmol)，室温搅拌18小时。加入饱和氯化铵水溶液（30mL）淬灭反应，搅拌10分钟。抽滤除去固体杂质，减压蒸除易挥发溶剂。用DCM(3×100mL）从水相中萃取，合并的有机相用无水硫酸钠干燥，然后浓缩，得到的粗产物经快速色谱柱（EA）纯化，得到2-叔丁氧羰基氨基-3-(2-羰基-3-哌啶烷)-丙酸甲酯（2.9g，产率60.7％）为白色泡沫状固体，TLC ： R_f＝ 0.4(EA)；^{1}H-NMR(400MHz，$CDCl_3$) ： δ 6.007(s，1H)，5.60(d，J ＝ 8.4Hz，1H)，4.32(m，1H)，3.73(s，3H)，3.2(t，J ＝ 3.2Hz，2H)，2.32(m，1H)，1.60-1.90(m，4H)，1.44(s，9H)；^{13}C-NMR(100MHz，$CDCl_3$.)：δ 174.54，173.21，155.92，79.74，52.26，51.75，42.29，38.03，34.25，28.29，26.57，21.57。

[0110] 实施例 4 肉桂羰基苯丙氨酸甲酯 (2-4) 的制备

[0111]

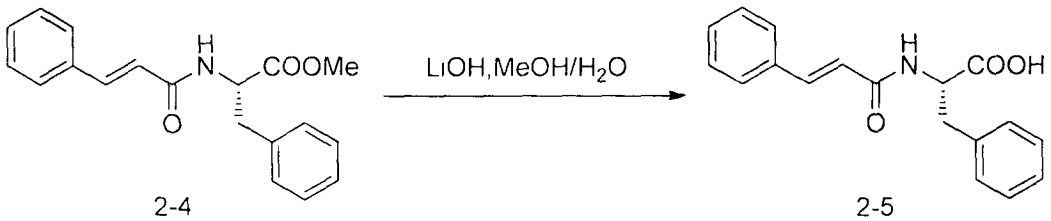


2-2 2-3 2-4

[0112] 在 0℃条件下向苯丙氨酸甲酯 (10g,55.8mmol) 的 DCM(100mL) 溶液中,依次加入肉桂酸 (9.9g,67.0mmol),EDC(16.1g,83.8mmol),HOBt(11.3g,83.8mmol),然后滴加 TEA(35.2mL,251.4mmol),搅拌至室温 2 小时。减压蒸除溶剂,加入水 (200mL),用 DCM(2×200mL) 从水相中萃取,合并的有机相用无水硫酸钠干燥,然后浓缩,得到的粗产物经快速色谱柱 (PE ∶ EA2 ∶ 1) 纯化,得到肉桂羰基氨基 - 苯丙氨酸甲酯 (13.8g,产率 80.2 %) 为白色固体,TLC ∶ R_f = 0.5(PE ∶ EA 2 ∶ 1) ∶^{1}HNMR(400MHz, $CDCl_3$) δ 7.64-7.60(d,1H , J = 16Hz),7.47-7.11(m,10H),6.42-6.38(d,1H, J = 16Hz),5.06-5.02(m,1H),3.74(s,3H),3.26-3.14(m,2H) ∶^{13}C-NMR(100MHz, $CDCl_3$) ∶δ 172.2,165.4,141.8,135.9,134.6,129.8,129.3(2),128.8(2),128.6(2),127.9(2),127.2,120.0,53.4,52.4,37.9。

[0113] 实施例 5 肉桂羰基苯丙氨酸 (2-5) 的制备

[0114]



2-4 2-5

[0115] 向肉桂羰基氨基 - 苯丙氨酸甲酯 (2-4)(10g,32.3mmol) 的甲醇与水 (100mL ∶ 200mL) 溶液中加入氢氧化锂 (2.0g,48.5mmol),室温搅拌 1.5 小时。减压蒸除溶剂,加入 1N 盐酸将 pH 调至 3。用乙酸乙酯 (3×100mL) 萃取,合并有机相,用无水硫酸钠干燥,然后浓缩,得到肉桂羰基氨基 - 苯丙氨酸 (8.6g,产率 90.6 %) 为白色固体,TLC ∶R_f = 0.1(PE ∶ EA = 2 ∶ 1) ∶^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) ∶δ 7.65-7.61(d,1H, J = 16Hz),7.35-7.18(m,10H),6.39-6.35(d,1H, J = 16Hz),5.02-5.00(m,1H),3.30-3.20(m,2H) ∶^{13}C-NMR(100MHz, $CDCl_3$) ∶δ 166.4,142.6,135.7,134.4,130.1,129.4(2),128.9(2),128.6(2),128.8(2),128.0,127.3,119.4,53.7,53.7,37.2。

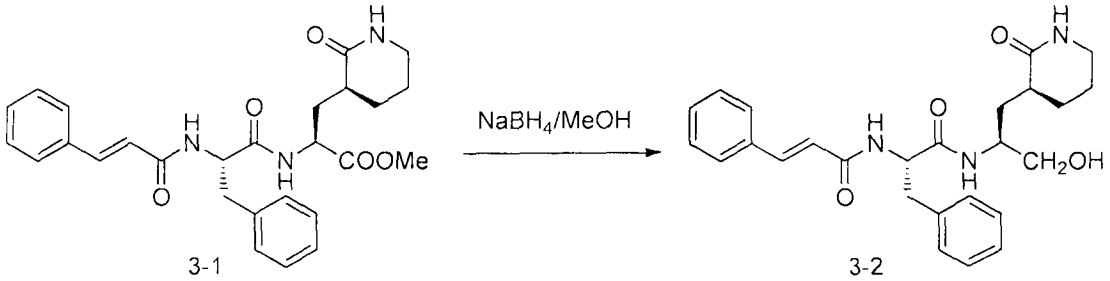
[0116] 实施列 6 2-[2-(肉桂羰基)- 氨基 -1- 羰基 -3- 苯基] 丙氨基 -3-(2- 羰基 -3- 哌啶烷)- 丙酸甲酯 (3-1) 的制备

[0117] 在 0℃条件下向 2- 叔丁氧羰基氨基 -3-(2- 羰基 -3- 哌啶烷)- 丙酸甲酯 (5g,16.6mmol) 的无水 DCM(80mL) 中滴加 TFA(13mL),冰浴搅拌 1.5 小时。减压蒸除溶剂,用三乙胺调 pH 至中性。然后溶于 DCM(100mL) 中,在 0℃条件下依次加入肉桂羰基氨基 - 苯丙氨酸 (5.8g,19.9mmol),EDC(4.7g,24.9mmol),HOBt (3.4g,24.9mmol),然后滴加 TEA(10.5mL,74.7mmol),搅拌至室温 2 小时。用水 (3×50mL) 洗涤,有机相用无水硫酸钠干燥,然后浓缩,得到的粗产物经快速色谱柱 (DCM ∶ MeOH = 20 ∶ 1) 纯化,得到 2-[2-(肉桂羰基)- 氨

基-1-羰基-3-苯基]丙氨基-3-(2-羰基-3-哌啶)-丙酸甲酯(6.9g,87.8%)为白色泡沫状固体,TLC:R_f0.5(DCM ∶ MeOH = 20.1);^{1}H-NMR(400MHz,$CDCl_3$):δ 7.49(d,J = 16Hz,1H),7.21-7.35(10H),6.46(d, J = 16Hz,1H),4.87(q, J = 3.2Hz, J = 4Hz,1H),3.73(s,3H),3.42(m,1H),3.09-3.25(m,4H),2.41(m,1H),223(m,1H),1.30-1.80(6H);^{13}C-NMR(100MHz,$CDCl_3$):δ 172.05,165.26,141.89,135.83,134.63,129.89,128.85,128.63,127.92,127.19,119.96,53.31,52.42,37.91。

[0118] 实施例7 1-氰基-2-[2-(肉桂羰基)-氨基-1-羰基-3-苯基]丙氨基-3-(2-羰基-3-哌啶烷)-丙醇(3-2)的制备

[0119]

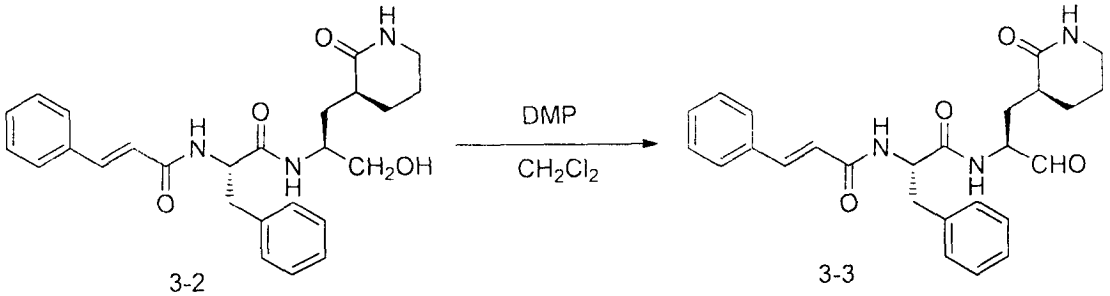


3-1 3-2

[0120] 向2[2-(肉桂羰基)-氨基-1-羰基-3-苯基]丙氨基-3-(2-羰基-3-哌啶烷)-丙酸甲酯(3-1)(1g,2.2mmol)的甲醇溶液(10mL)中分多次加入硼氢化钠(0.8g,21.6mmol),室温搅拌2小时。加入饱和氯化铵水溶液(5mL)淬灭反应,减压蒸除易挥发溶剂,用DCM(3×50mL)萃取,合并的有机相用无水硫酸钠干燥,然后浓缩,得到的粗产物经快速色谱柱(DCM ∶ McOH = 20 ∶ 1)纯化,得到2-[2-(肉桂羰基)-氨基-1-羰基-3-苯基]丙氨基-3-(2-羰基-3-哌啶烷)-丙醇(0.8g,产率80.9%)为白色泡沫状固本,TLC:R_f= 0.4(DCM ∶ McOH 20 ∶ 1);^{1}H-NMR(400MHz,$CDCl_3$):δ 7.49(d, J = 16Hz,1H),7.21-7.35(10H),6.46(d, J = 16Hz,1H),4.87(q, J = 3.2Hz, J = 4Hz,1H).3.71(m,2H),3.42(m,1H),3.09-3.25(m,4H),2.41(m,1H),2.23(m,1H).1.30-1.80(6H);^{13}C-NMR(100MHz,$CDCl_3$):δ 179.89,171.21,166.12,141.64,136.76,134.62,129.87,129.37,128.82,128.50,127.94,126.86,120.28,66.2,54.89,54.81,41.08,39.11,38.96,29.42,28.10,26.72。

[0121] 实施列8 2-[2-(肉桂羰基)-氨基-1-羰基-3-苯基]丙氨基-3-(2-羰基-3-哌啶烷)-丙醛(3-3)的制备

[0122]



3-2 3-3

[0123] 向2-[2-(肉桂羰基)-氨基-1-羰基-3-苯基]丙氨基-3-(2-羰基-3-哌啶烷)-丙醇(3-2)(1g,2.3mmol)的无水DCM(10mL)溶液中加入DMP(1.5g,3.4mmol),搅拌2小时。加入饱和碳酸氢钠(2.0mL)淬灭反应,同时加入硫代硫酸钠(1.1g,6.9mmol),搅拌至

有机相澄清。加入DCM(3×50mL)萃取,合并的有机相用无水硫酸钠干燥,然后浓缩,得到的粗产物经快速色谱柱(DCM ： MeOH = 30 ： 1)纯化,得到2-[2-(肉桂羰基)-氨基-1-羰基-3-苯基]丙氨基-3-(2-羰基-3-哌啶烷)-丙醛(0.83g,产率80.7%)为白色泡沫状固体看,TLC:$R_1$0.5(DCM ： MeOH = 20 ： 1);^{1}H-NMR(400MHz,$CDCl_3$):δ9.40(s,1H),8.41(d,J = 6.4Hz),7.58(d,J = 16Hz,1H),7.23(10H),6.49(d,J = 16Hz,1H),5.08(m,1H),4.32(m,4H),1.47-2.27(7H);^{13}C-NMR(100MHz, $CDCl_3$):δ200.20,175.09,172.29,165.80,141.51,136.46,134.72,129.79,129.49,128.81,128.53,127.91,126.97,120.38,57.09,54.38,42.19,38.82,37.18,30.74,27.06,21.1。

[0124] 实施例9 EV713C 蛋白酶抑制剂体外酶活筛选

[0125] 利用荧光共振能量转移(fluorescence resonance energy transfer,FRET)技术测定针对3C蛋白酶的抑制剂的酶活,根据3C蛋白酶识别位点设计底物:Dabcyl-RTATVQGPSLDFE-Edans,抑制剂最终浓度分别为:1mM,500μM,250μM,125μM,62.5μM,31.25μM,15.625μM,7.8125μM,3.9μM,1.95μM,976nM,488nM,244nM,122nM,61nM,30.5nM,15.3nM,3.8nM,1.9nM,0.95nM,同时设阴性对照。利用96孔板测定酶活,100μl反应体系包括:20mM MES pH6.5,10ug/ml BSA,10μMEV713C蛋白,150μM荧光底物和不同浓度的抑制剂,37℃反应,通过酶标仪检测荧光强度,所得数据利用软件GraphPad Prism 5处理得到抑制剂的IC_{50}。观察结果表明,化合物II,VI的IC_{50}为5-50nM。

[0126] 实施例10 SARS 主蛋白酶Nsp5抑制剂体外酶活筛选

[0127] 利用荧光共振前量转移(fluoresccncc resonance energy transfer,FRET)技术测定针对SARS Nsp5蛋白酶的抑制剂的酶活,根据Nsp5蛋白酶识别位点设计底物:MCA-AVLQSGFR-L-Dnp,抑制剂最终浓度分别为1mM,500μM,250μM, +125μM,62.5μM,31.25μM,15.625μM,7.8125μM,3.9μM,1.95μM,976nM,488nM,244nM,122nM,61nM,30.5nM,15.3 nM,3.8nM,1.9nM,0.95nM,同时设阴性对照。利用96孔板测定酶活,100μl反应体系包括:50mMTris-HCl pH7.3,1mMEDTA,0.5μM SARS nsp5蛋白,16μM荧光底物和不同浓度的抑制剂,37℃反应,通过酶标仪检测荧光强度,所得数据利用软件GraphPad Prism 5处理得到抑制剂的IC_{50}。观察结果表明,化合物I,VIII的IC_{50}为0.1-5μM。

[0128] 实施例11 细胞病变效应筛选Cytopathic effect(CPE)assay:

[0129] CPE实验中所用细胞系为RD(human cmbryonic rhabdomyosarcoma)细胞,病毒为EV71的标准病毒株(滴度为100$TCID_{50}$)。在96孔板中每孔加100μl RD细胞(浓度为3×10^{4}个/孔),让细胞贴壁1d后,加入50μl/孔稀释好的抑制剂,抑制剂终浓度分别为:100μM,10μM,5μM,2.5μM,1.25μM,625nM,312nM,156nM,78nM,39nM,19.5nM,9.75nM,3.9nM。每个浓度4个孔,重复三次,2h后加入50μl/孔EV71病毒,2-3d后观察致细胞病变效应(cytopathic effect,CPE)。观察结果表明50%的细胞存活时化合I的抑制浓度为0.625μM-1.25μM。

[0130] 实施例12 病毒复制抑制能力筛选Cell-based immunodetcction(CID)assay:

[0131] 在CID实验中RD(human embryonic rhabdomyosarcoma)细胞经胰酶消化后用含10% FBS相1% PS的DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium)培养基稀释至3×10^{4}个/ml,在96孔板中加入100μl/孔RD细胞,37℃,5% CO_2培养过夜,第二天加入50μl/孔稀释好的抑制剂,终浓度分别为:25μM,10μM,5μM,2.5μM,1.5μM,1.3μM,1.1μM,

0.9μM,0.7μM,0.5μM,0.166μM,0.05μM。2h 后加入 50μl/孔 EV71 病毒(滴度为 100TCID$_{50}$),37℃,5% CO_2培养,30h 后用 PBS 洗两次,50μl/孔无水甲醇固定细胞 10min,然后用 PBS 洗两次后加入 100μl/孔 PBS+0.5% Tween20+10% FBS 37℃封闭 1h,加入 100μl/孔(1 ∶ 500)稀释的一抗 37℃作用 3h,用 0.5% PBST 清洗板子 3 次,加入 100μl/孔(1 ∶ 2500)稀释的二抗 anti-mouse immunoglobulin G,37℃作用 1h,用 0.5% PBST 清洗板子 3 次,加入 100μl/孔 OPD 底物室温显色 5min,用 50μl/孔 1M H_2SO_4终止反应,在 ELISA 测定仪上(490nM)读出每孔的荧光值。以上实验抑制剂每个浓度 4 个孔,重复 3 次。用 GraphPad Prism 5 计算出 EC_{50}值。化合物 XIV 的 EC_{50}值小于 1μM。