



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1949977 B

(45) 授权公告日 2010.09.29

(21) 申请号 200580014309.5

A61K 31/27(2006.01)

(22) 申请日 2005.05.03

C07C 271/00(2006.01)

C07C 261/00(2006.01)

(30) 优先权数据

60/568,080 2004.05.04 US

审查员 徐利

(85) PCT申请进入国家阶段日

2006.11.03

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2005/015227 2005.05.03

(87) PCT申请的公布数据

W02006/073456 EN 2006.07.13

(73) 专利权人 翁启惠

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 翁启惠 吴宗益 詹家琮

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司

11227

代理人 顾晋伟 刘继富

(51) Int. Cl.

C07C 269/00(2006.01)

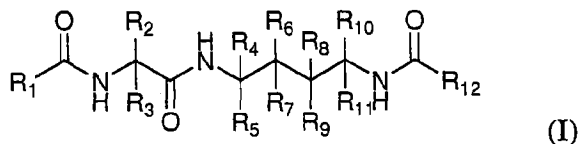
权利要求书 6 页 说明书 15 页

(54) 发明名称

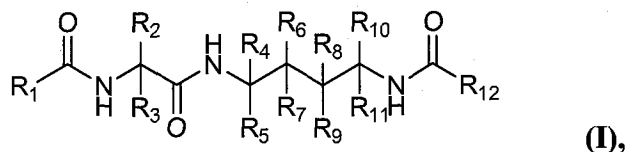
抗冠状病毒化合物

(57) 摘要

一种用于治疗冠状病毒感染的方法。该方法包括对患有这种感染或具有患这种感染风险的对象施用有效量的式 (I) 化合物。在说明书中定义该式中的每个变量。



1. 式 (I) 化合物或其盐在制备用于治疗患有严重急性呼吸综合征病毒感染或具有患严重急性呼吸综合征病毒感染风险的对象中的用途,



其中

R_1 为 H、 C_1-C_{10} 烷基、 C_3-C_{20} 环烷基、 C_3-C_{20} 杂环烷基、杂芳基、芳基或 OR_a ;

R_2 、 R_3 、 R_4 和 R_{10} 分别独立地为 H 或 C_1-C_{10} 烷基 ;

R_5 和 R_{11} 分别独立地为被芳基取代的烷基 ;

R_6 、 R_7 、 R_8 和 R_9 分别独立地为 H、 C_1-C_{10} 烷基或 OR_b ;且

R_{12} 为被 OR_c 、 $NHC(O)R_c$ 或 $NHC(O)OR_c$ 取代的 C_1-C_{10} 烷基 ;

其中 R_a 、 R_b 和 R_c 分别独立地为 H、 C_1-C_{10} 烷基、 C_3-C_{20} 环烷基、 C_3-C_{20} 杂环烷基、杂芳基或芳基。

2. 权利要求 1 的用途, 其中 R_1 为 C_1-C_{10} 烷基、 C_3-C_{20} 杂环烷基、杂芳基、芳基或 OR_a ;且 R_6 、 R_7 、 R_8 和 R_9 分别独立地为 H 或 OR_b 。

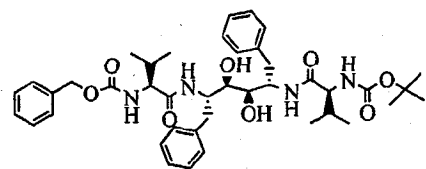
3. 权利要求 2 的用途, 其中 R_5 和 R_{11} 分别为被苯基取代的烷基。

4. 权利要求 3 的用途, 其中 R_2 为异丙基。

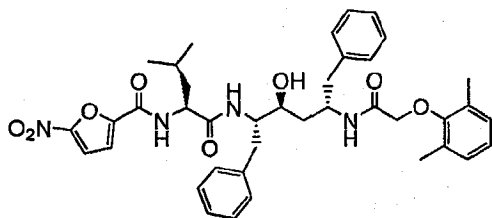
5. 权利要求 4 的用途, 其中 R_6 、 R_7 、 R_8 和 R_9 分别独立地为 H 或 OH。

6. 权利要求 5 的用途, 其中 R_1 为 C_3-C_{20} 杂环烷基, 杂芳基, 芳基, OR_a , 或被 C_3-C_{20} 环烷基、 C_3-C_{20} 杂环烷基、杂芳基、芳基、OR、SR 或 $NHC(O)OR$ 取代的 C_1-C_{10} 烷基 ;R 为 H、 C_1-C_{10} 烷基、 C_3-C_{20} 环烷基、 C_3-C_{20} 杂环烷基、杂芳基或芳基。

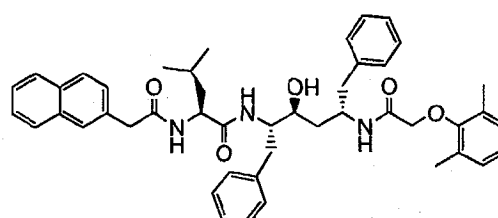
7. 权利要求 6 的用途, 其中所述化合物为化合物 1 和 25-35 之一 ;



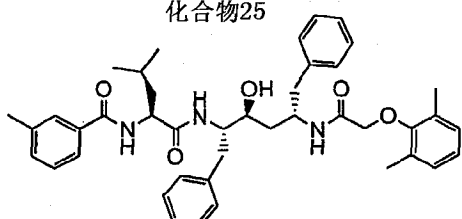
化合物1



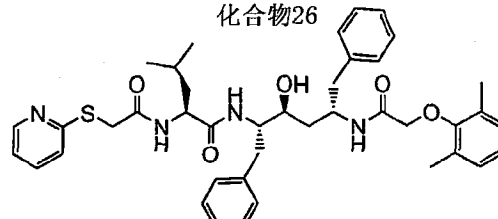
化合物25



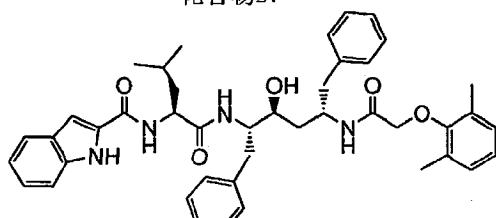
化合物26



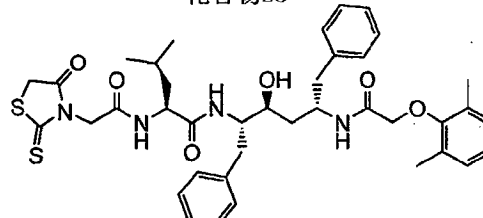
化合物27



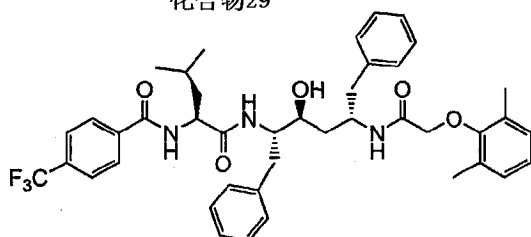
化合物28



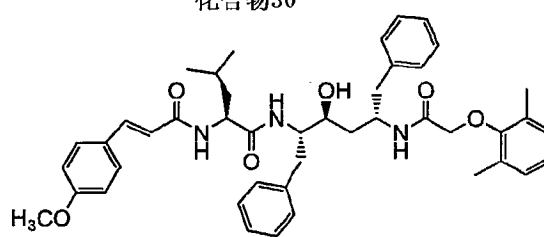
化合物29



化合物30



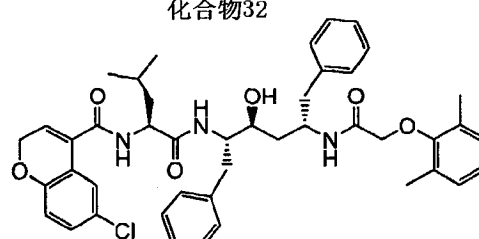
化合物31



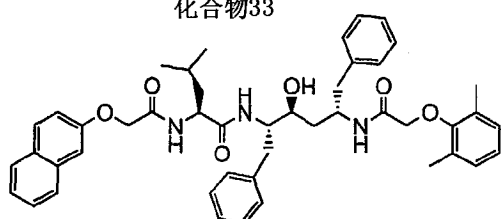
化合物32



化合物33

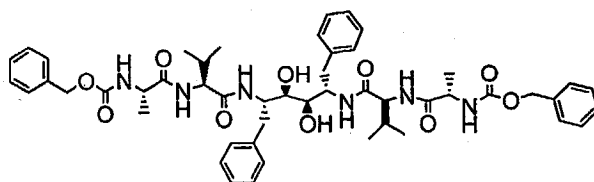


化合物34



化合物35

8. 化合物 2 在制备用于治疗患有严重急性呼吸综合征病毒感染或具有患严重急性呼吸综合征病毒感染风险的对象的药物中的用途,



化合物2

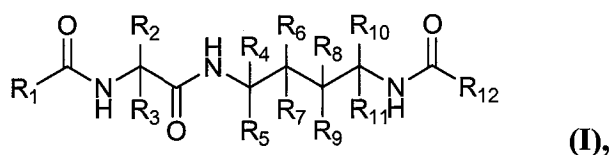
9. 权利要求 1 或 8 的用途, 其中所述对象还患有人免疫缺陷病毒感染或具有患人免疫缺陷病毒感染的风险。

10. 权利要求 1 或 8 的用途, 其中所述对象还患有猫免疫缺陷病毒感染或具有患猫免疫缺陷病毒感染的风险。

11. 一种包装产品, 包含:

容器;

式 (I) 化合物或其盐:



其中

R_1 为 H、 C_1-C_{10} 烷基、 C_3-C_{20} 环烷基、 C_3-C_{20} 杂环烷基、杂芳基、芳基或 OR_a ;

R_2 、 R_3 、 R_4 和 R_{10} 分别独立地为 H 或 C_1-C_{10} 烷基;

R_5 和 R_{11} 分别独立地为被芳基取代的烷基;

R_6 、 R_7 、 R_8 和 R_9 分别独立地为 H、 C_1-C_{10} 烷基或 OR_b ; 且

R_{12} 为被 OR_c 、 $NHC(O)R_c$ 或 $NHC(O)OR_c$ 取代的 C_1-C_{10} 烷基;

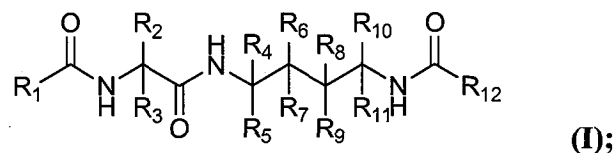
其中 R_a 、 R_b 和 R_c 分别独立地为 H、 C_1-C_{10} 烷基、 C_3-C_{20} 环烷基、 C_3-C_{20} 杂环烷基、杂芳基或芳基; 和

与所述容器在一起并指示施用所述化合物来治疗严重急性呼吸综合征病毒感染的说明。

12. 权利要求 11 的包装产品, 其中所述说明还指示施用所述化合物来治疗人免疫缺陷病毒感染的感染。

13. 权利要求 11 的包装产品, 其中所述说明还指示施用所述化合物来治疗猫免疫缺陷病毒感染的感染。

14. 一种用于体外抑制病毒蛋白酶的方法, 包括使严重急性呼吸综合征病毒蛋白酶与有效量的式 (I) 化合物或其盐接触:



其中

R_1 为 H、 C_1-C_{10} 烷基、 C_3-C_{20} 环烷基、 C_3-C_{20} 杂环烷基、杂芳基、芳基或 OR_a ;

R_2 、 R_3 、 R_4 和 R_{10} 分别独立地为 H 或 C_1-C_{10} 烷基;

R_5 和 R_{11} 分别独立地为被芳基取代的烷基；

R_6 、 R_7 、 R_8 和 R_9 分别独立地为 H、 C_1 - C_{10} 烷基或 OR_b ；且

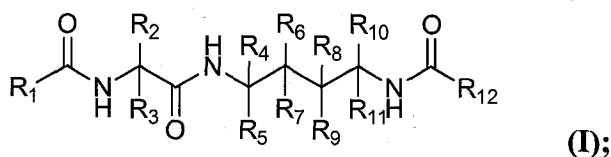
R_{12} 为被 OR_c 、 $NHC(O)R_c$ 或 $NHC(O)OR_c$ 取代的 C_1 - C_{10} 烷基；

其中 R_a 、 R_b 和 R_c 分别独立地为 H、 C_1 - C_{10} 烷基、 C_3 - C_{20} 环烷基、 C_3 - C_{20} 杂环烷基、杂芳基或芳基。

15. 权利要求 14 的方法，还包括使所述化合物与人免疫缺陷病毒蛋白酶接触。

16. 权利要求 14 的方法，还包括使所述化合物与猫免疫缺陷病毒蛋白酶接触。

17. 式 (I) 化合物或其盐在制备用于抑制严重急性呼吸综合征病毒蛋白酶的藥物中的用途，



其中

R_1 为 H、 C_1 - C_{10} 烷基、 C_3 - C_{20} 环烷基、 C_3 - C_{20} 杂环烷基、杂芳基、芳基或 OR_a ；

R_2 、 R_3 、 R_4 和 R_{10} 分别独立地为 H 或 C_1 - C_{10} 烷基；

R_5 和 R_{11} 分别独立地为被芳基取代的烷基；

R_6 、 R_7 、 R_8 和 R_9 分别独立地为 H、 C_1 - C_{10} 烷基或 OR_b ；且

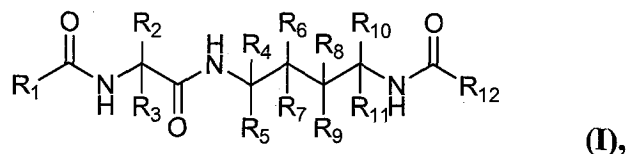
R_{12} 为被 OR_c 、 $NHC(O)R_c$ 或 $NHC(O)OR_c$ 取代的 C_1 - C_{10} 烷基；

其中 R_a 、 R_b 和 R_c 分别独立地为 H、 C_1 - C_{10} 烷基、 C_3 - C_{20} 环烷基、 C_3 - C_{20} 杂环烷基、杂芳基或芳基。

18. 权利要求 17 的用途，其中所述药物还用于抑制人免疫缺陷病毒蛋白酶。

19. 权利要求 17 的用途，其中所述药物还用于抑制猫免疫缺陷病毒蛋白酶。

20. 一种式 (I) 化合物或其盐：



其中

R_1 为 H、 C_3 - C_{20} 环烷基、 C_3 - C_{20} 杂环烷基、杂芳基、芳基、 OR_a ，或被 C_3 - C_{20} 环烷基、 C_3 - C_{20} 杂环烷基、杂芳基、芳基、 OR_a 或 SR_a 取代的 C_1 - C_{10} 烷基；

R_2 、 R_3 、 R_4 和 R_{10} 分别独立地为 H 或 C_1 - C_{10} 烷基；

R_5 和 R_{11} 分别独立地为被芳基取代的烷基；

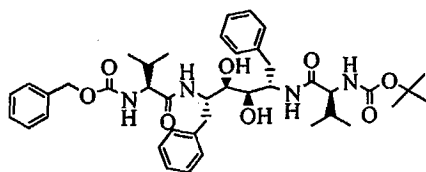
R_6 、 R_7 、 R_8 和 R_9 分别独立地为 H、 C_1 - C_{10} 烷基或 OR_b ；且

R_{12} 为被 OR_c 、 $NHC(O)R_c$ 或 $NHC(O)OR_c$ 取代的 C_1 - C_{10} 烷基；

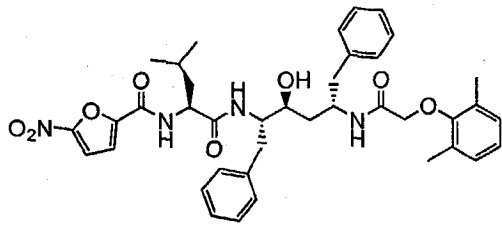
其中 R_a 、 R_b 和 R_c 分别独立地为 H、 C_1 - C_{10} 烷基、 C_3 - C_{20} 环烷基、 C_3 - C_{20} 杂环烷基、杂芳基或芳基。

21. 权利要求 20 的化合物，其中 R_1 为 C_3 - C_{20} 杂环烷基、杂芳基、芳基、 OR_a 或被 C_3 - C_{20} 杂环烷基、芳基、 OR_a 或 SR_a 取代的 C_1 - C_{10} 烷基；且 R_6 、 R_7 、 R_8 和 R_9 分别独立地为 H 或 OR_b 。

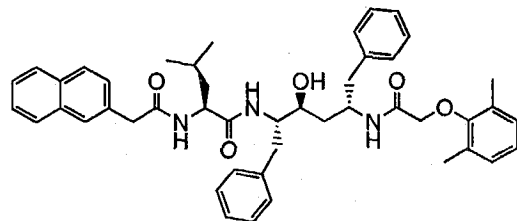
22. 权利要求 21 的化合物, 其中 R_5 和 R_{11} 分别为被苯基取代的烷基。
23. 权利要求 22 的化合物, 其中 R_2 为异丙基。
24. 权利要求 23 的化合物, 其中 R_6 、 R_7 、 R_8 和 R_9 分别独立地为 H 或 OH。
25. 权利要求 24 的化合物, 其中所述化合物为化合物 1 和 25-35 之一:



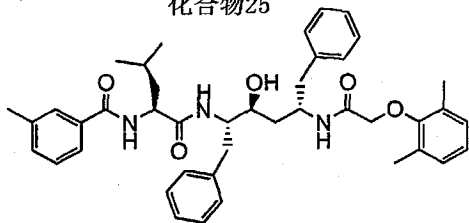
化合物1



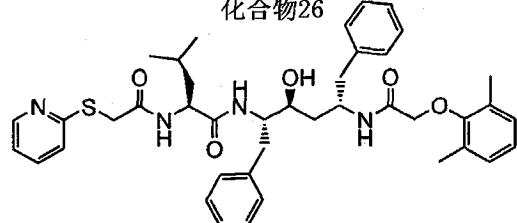
化合物25



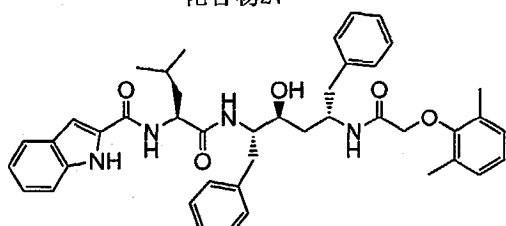
化合物26



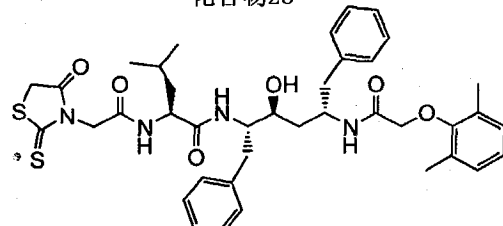
化合物27



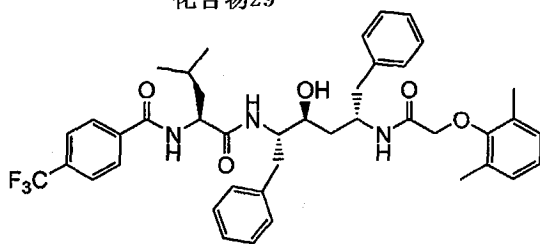
化合物28



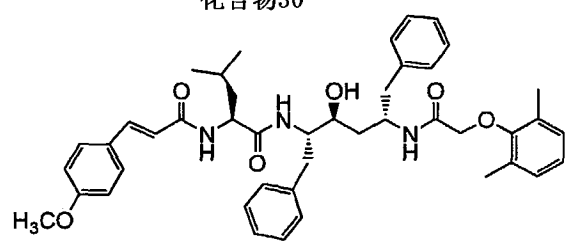
化合物29



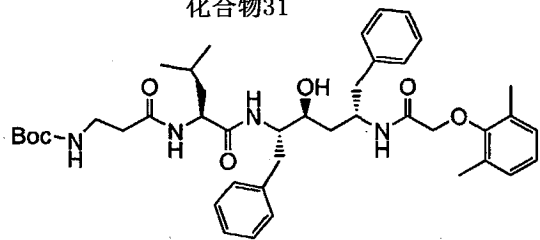
化合物30



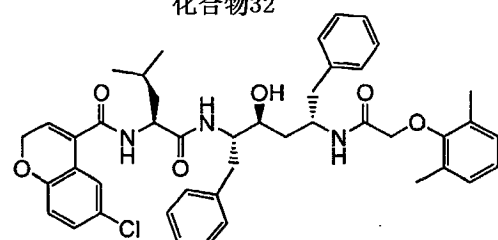
化合物31



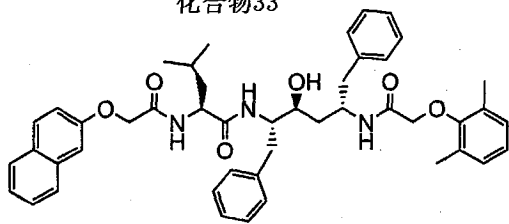
化合物32



化合物33



化合物34



化合物35

抗冠状病毒化合物

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 依据 35 U. S. C. § 119, 本申请要求 2004 年 5 月 4 日提交的美国临时申请序列号 60/568, 080 的优先权, 其内容在此引入作为参考。

背景技术

[0003] 冠状病毒是人类许多普通感冒的原因。最近, 人类被新的冠状病毒感染, 导致急性呼吸道疾病, 即严重急性呼吸综合征的世界性爆发。参见, 例如 Ksiazek 等人, *N. Engl. J. Med.*, 2004, 348 :1953-1966。在 2002 年 11 月在中国广东确认了第一例严重急性呼吸综合征病例。该疾病稍后散布至 25 个以上的国家。在 2003 年 7 月 31 日前, 全世界报告了大约 8, 100 个严重急性呼吸综合征病例, 和大约 800 个与严重急性呼吸综合征有关的死亡病例。

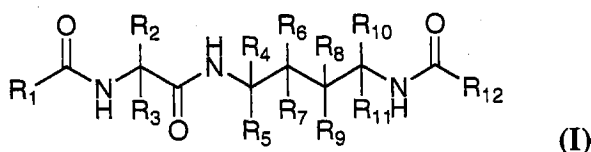
[0004] 为了用来治疗严重急性呼吸综合征, 已经研究了各种药物。它们包括利巴韦林 (ribavirin)、皮质类固醇、快利佳 (Kaletra)、甘草甜素 (glycyrrhizin) 和某些人干扰素。参见, 例如 Peris 等人, *Lancet*, 2003, 361 :1319 ;Cinatl 等人, *Lancet*, 2003, 361 :2045 ;和 Cinatl 等人, *Lancet*, 2003, 362 :293。然而, 这些药物需要高剂量才能发挥效力。因此, 现在需要确认可更有效地治疗严重急性呼吸综合征的化合物。

[0005] 发明概述

[0006] 本发明基于意外地发现某些化合物可有效治疗冠状病毒 (例如严重急性呼吸综合征病毒) 感染。

[0007] 在一个方面, 本发明的特征为一种用于治疗病毒感染的方法。该方法包括对患有冠状病毒 (例如严重急性呼吸综合征病毒) 感染, 或具有患冠状病毒感染风险的对象 (例如哺乳动物) 施用有效量的式 (I) 化合物或其盐:

[0008]



[0009] 在该式中, R_1 为 H、 C_1-C_{10} 烷基、 C_3-C_{20} 环烷基、 C_3-C_{20} 杂环烷基、杂芳基、芳基或 OR_a ; R_2 、 R_3 、 R_4 和 R_{10} 分别独立地为 H、 C_1-C_{10} 烷基、 C_3-C_{20} 环烷基、 C_3-C_{20} 杂环烷基、杂芳基或芳基; R_5 和 R_{11} 分别独立地为被芳基取代的烷基; R_6 、 R_7 、 R_8 和 R_9 分别独立地为 H、 C_1-C_{10} 烷基、 C_3-C_{20} 环烷基、 C_3-C_{20} 杂环烷基、杂芳基、芳基或 OR_b ; 且 R_{12} 为被 OR_c 、 $NHC(O)R_c$ 或 $NHC(O)OR_c$ 取代的 C_1-C_{10} 烷基; 其中 R_a 、 R_b 和 R_c 分别独立地为 H、 C_1-C_{10} 烷基、 C_3-C_{20} 环烷基、 C_3-C_{20} 杂环烷基、杂芳基或芳基。

[0010] 注意到可将式 (I) 化合物施用于同时被冠状病毒 (例如严重急性呼吸综合征病毒) 和人或猫免疫缺陷病毒两者感染, 或有同时被两者感染的风险的对象。参见, 例如美国专利 6, 803, 466 和 Lee 等人, *J. Am. Chem. Soc.*, 1999, 121 :1145-1155。

[0011] 关于上述式 (I) 化合物的亚组是其中 R_1 为 C_1-C_{10} 烷基、 C_3-C_{20} 杂环烷基、杂芳基、芳基或 OR_a ; R_2 、 R_3 、 R_4 和 R_{10} 分别独立地为 H 或 C_1-C_{10} 烷基; R_6 、 R_7 、 R_8 和 R_9 分别独立地为 H 或 OR_b 的化合物。在这些化合物中, R_1 可以是被 C_3-C_{20} 环烷基、 C_3-C_{20} 杂环烷基、杂芳基、芳基、OR、SR 或 $NHC(O)OR$ 取代的 C_1-C_{10} 烷基; R 为 H、 C_1-C_{10} 烷基、 C_3-C_{20} 环烷基、 C_3-C_{20} 杂环烷基、杂芳基或芳基; R_2 可以是异丙基; R_5 和 R_{11} 可以是被苯基取代的烷基; 且 R_6 、 R_7 、 R_8 和 R_9 分别独立地为 H 或 OH。

[0012] 术语“烷基”意指饱和或不饱和的、线型或支化的烃部分, 如 $-CH_3$ 、 $-CH_2-CH=CH_2$ 或支化的 $-C_3H_7$ 。术语“环烷基”意指饱和或不饱和的、非芳香族环状烃部分, 如环己基或环己烯-3-基。术语“杂环烷基”意指饱和或不饱和的、非-芳香族环状部分, 其具有至少一个环杂原子(例如 N、O 或 S), 如 4-四氢吡喃基或 4-吡喃基。术语“芳基”意指具有一或多个芳香族环的烃部分。芳基部分的实例包括苯基(Ph)、亚苯基、萘基、亚萘基、茈基、蒽基和菲基。术语“杂芳基”意指具有一或多个芳香族环的部分, 其含有至少一个杂原子(例如 N、O 或 S)。杂芳基部分的实例包括呋喃基、亚呋喃基、茚基、吡咯基、噁吩基、唑基、咪唑基、噻唑基、吡啶基、嘧啶基、喹啉基、喹啉基、异喹啉基和吲哚基。

[0013] 除非另有定义, 在本文中提及的烷基、环烷基、杂环烷基、芳基和杂芳基包括取代和未取代的部分。在环烷基、杂环烷基、芳基和杂芳基上可能的取代基包括但不限于 C_1-C_{10} 烷基、 C_2-C_{10} 烯基、 C_2-C_{10} 炔基、 C_3-C_8 环烷基、 C_5-C_8 环烯基、 C_1-C_{10} 烷氧基、芳基、芳氧基、杂芳基、杂芳氧基、氨基、 C_1-C_{10} 烷基氨基、 C_1-C_{20} 二烷基氨基、芳基氨基、二芳基氨基、羟基、卤素、硫代、 C_1-C_{10} 烷基硫基、芳基硫基、 C_1-C_{10} 烷基磺酰基、芳基磺酰基、酰基氨基、氨基酰基、氨基硫代酰基、脞基、胍基、脲基、氰基、硝基、酰基、硫代酰基、酰氧基、羧基和羧酸酯。在烷基上可能的取代基包括除 C_1-C_{10} 烷基、 C_2-C_{10} 烯基和 C_2-C_{10} 炔基之外的所有上文提及的取代基。环烷基、杂环烷基、芳基和杂芳基也可与彼此稠合。

[0014] 术语“治疗”一词在本文中提及, 意指对对象施用一或多种在本文中描述的药物化合物, 该对象已经被冠状病毒感染、并可能还被人或猫免疫缺陷病毒感染、有这类感染的症状、或朝向这类感染的倾向, 以赋予治疗效果, 例如治愈、缓解、改变、影响、改善或预防病毒感染、其症状或朝向它的倾向。这类对象可由健康护理专家以任何适当的诊断方法的结果为基础来确认。“有效量”意指对被治疗的对象赋予治疗效果, 或对病毒蛋白酶赋予抑制效果所需的化合物的用量。

[0015] 在另一方面, 本发明的特征在于一种包装产品, 其包括容器、式 (I) 化合物, 以及与容器置于一起并指示施用该化合物来治疗冠状病毒(如严重急性呼吸综合征病毒)感染的说明。该说明亦可指示施用该化合物来治疗人或猫免疫缺陷病毒的感染。

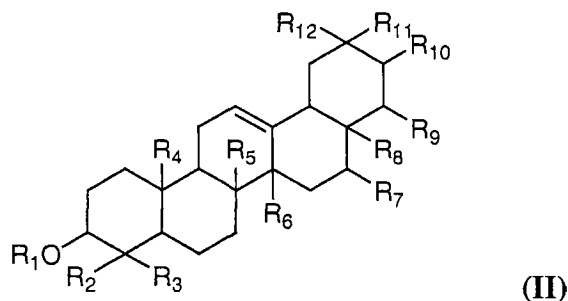
[0016] 在另一方面, 本发明的特征在于一种用于抑制病毒蛋白酶的方法。该方法包括使冠状病毒蛋白酶(如严重急性呼吸综合征病毒蛋白酶)与有效量的式 (I) 化合物接触。该方法可进一步包括使该化合物与人或猫免疫缺陷病毒蛋白酶接触。参见, 例如美国专利 6, 803, 466 和 Lee 等人, J. Am. Chem. Soc., 1999, 121:1145-1155。

[0017] 在另一方面, 本发明的特征在于式 (I) 化合物或其盐。关于该式化合物, 对每个变量的指定与上述的基团相同, 除了 R_1 为 H、 C_3-C_{20} 环烷基、 C_x-C_{20} 杂环烷基、杂芳基、芳基、 OR_a , 或被 C_3-C_{20} 环烷基、 C_3-C_{20} 杂环烷基、杂芳基、芳基、 OR_a 或 SR_a 取代的 C_1-C_{10} 烷基。刚才描述的化合物的亚组是其中 R_1 为 C_3-C_{20} 杂环烷基、杂芳基、芳基、 OR_a , 或被 C_3-C_{20} 杂环烷基、

芳基、OR_a 或 SR_a 取代的 C₁-C₁₀ 烷基；R₂、R₃、R₄ 和 R₁₀ 分别独立地为 H 或 C₁-C₁₀ 烷基；且 R₆、R₇、R₈ 和 R₉ 分别独立地为 H 或 OR_b 的化合物。

[0018] 在另一方面，本发明的特征在于一种用于治疗冠状病毒感染的方法，包括向需要所述治疗的对象施用有效量的式 (II) 化合物或其盐：

[0019]

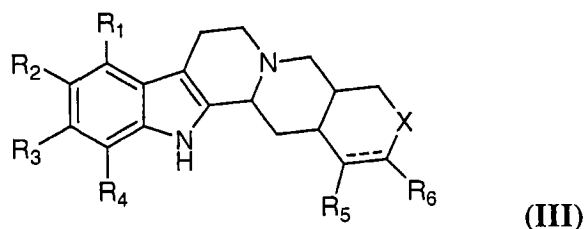


[0020] 该式中，R₁ 为 C₃-C₂₀ 环烷基或 C₃-C₂₀ 杂环烷基；R₂、R₃、R₄、R₅、R₆、R₁₁ 和 R₁₂ 分别独立地为 H、C₁-C₁₀ 烷基或 OR_a；R₇ 和 R₁₀ 分别为 H；或 R₇ 和 R₁₀ 一起为 -O-；R₈ 为 C₁-C₁₀ 烷基或 COOR_b；且 R₉ 为 H、OR_c 或 OC(O)R_c；其中 R_a、R_b 和 R_c 分别独立地为 H、C₁-C₁₀ 烷基、C₃-C₂₀ 环烷基、C₃-C₂₀ 杂环烷基、杂芳基或芳基。

[0021] 关于上述式 (II) 化合物的亚组是其中 R₁ 为被 C₁-C₁₀ 烷基、C₃-C₂₀ 杂环烷基、OR 或 COOR 取代的四氢吡喃基；R 为 H、C₁-C₁₀ 烷基、C₃-C₂₀ 环烷基、C₃-C₂₀ 杂环烷基、杂芳基或芳基；R₂、R₃、R₄、R₅、R₆、R₁₁ 和 R₁₂ 分别独立地为 H、OH 或任选被 OH 取代的 CH₃；或 R₈ 为 CH₃ 或 COOH 的化合物。

[0022] 在另一方面，本发明的特征在于一种用于治疗冠状病毒感染的方法，包括向需要所述治疗的对象施用有效量的式 (III) 化合物或其盐：

[0023]



[0024] 该式中，----为单键或双键；X 为 -O- 或 -C(R_aR_b)-；R₁、R₂、R₃、R₄、R₅ 和 R₆ 分别独立地为 H、C₁-C₁₀ 烷基、C₃-C₂₀ 环烷基、C₃-C₂₀ 杂环烷基、杂芳基、芳基、OR_c 或 COOR_c；其中 R_a、R_b 和 R_c 分别独立地为 H、C₁-C₁₀ 烷基、C₃-C₂₀ 环烷基、C₃-C₂₀ 杂环烷基、杂芳基、芳基或 OC(O)R；R 为 H、C₁-C₁₀ 烷基、C₃-C₂₀ 环烷基、C₃-C₂₀ 杂环烷基、杂芳基或芳基。

[0025] 关于上述式 (III) 化合物的亚组是其中----为单键的化合物。在这些化合物中，X 可以是 -C(R_aR_b)-；R₁、R₂、R₃、R₄、R₅ 和 R₆ 分别独立地为 H、OH、OCH₃ 或 COOCH₃；且 R_a 和 R_b 分别可以是 H 或 OC(O)R。上述化合物的其它亚组是其中----为双键的化合物。在这些化合物中，X 为 -O- 且 R₁、R₂、R₃、R₄、R₅ 和 R₆ 分别可以是 H 或 COOCH₃。

[0026] 在另一方面，本发明的特征在于一种用于治疗冠状病毒（例如严重急性呼吸综合征病毒）感染的方法，包括向需要所述治疗的对象施用有效量的化合物 3、4、6-12、14、15 或 17（结构如下文所示）或其盐。

[0027] 此外，本发明还包括一种药用组合物，其含有有效量的至少一种上述化合物，以及

在药学上可接受的载体。

[0028] 可用于实施本发明的化合物,若合适的话,包括该化合物本身,以及其盐类、前药和溶剂化物。例如,可在阴离子和上述化合物上的带正电基团(例如氨基)之间形成盐。适当的阴离子包括氯化物、溴化物、碘化物、硫酸盐、硝酸盐、磷酸盐、柠檬酸盐、甲烷磺酸盐、三氟乙酸盐、乙酸盐、苹果酸盐、甲苯磺酸盐、酒石酸盐、反丁烯二酸盐、谷氨酸盐、葡萄糖醛酸盐、乳酸盐、戊二酸盐和顺丁烯二酸盐。同样地,亦可在阳离子和上述化合物上的带负电基团(例如羧酸根)之间形成盐。适当的阳离子包括钠离子、钾离子、镁离子、钙离子,以及铵阳离子,如四甲基铵离子。上述化合物还包括含有季氮原子的那些盐类。前药的例子包括酯类和其它在药学上可接受的衍生物,当将其施用于对象时,能够提供上述的活性化合物。溶剂化物意指上述活性化合物与药学上可接受的溶剂之间形成的复合物。药学上可接受的溶剂的例子包括水、乙醇、异丙醇、乙酸乙酯、乙酸和乙醇胺。

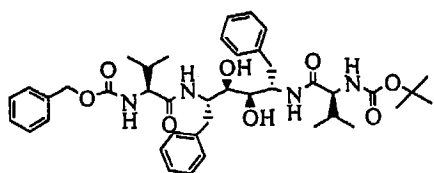
[0029] 含有一或多种上述化合物,以用来治疗冠状病毒感染的组合物,以及这类组合物在制造用于刚提及的治疗的药物中的用途,也在本发明的范围内。

[0030] 在下文的说明中将描述本发明的一或多个具体实施例的细节。从该说明以及权利要求书中,本发明的其它特征、目标和优点将是显而易见的。

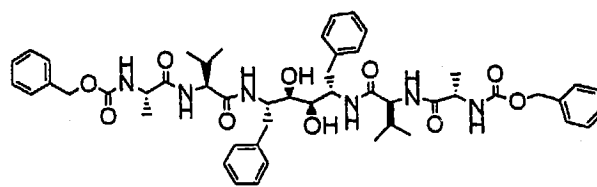
[0031] 发明详述

[0032] 本发明涉及治疗冠状病毒,如严重急性呼吸综合征病毒的感染。下文示出 35 种可用来实施本发明的代表性化合物(即化合物 1-35):

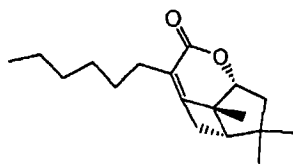
[0033]



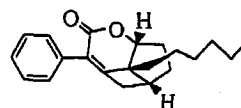
化合物1



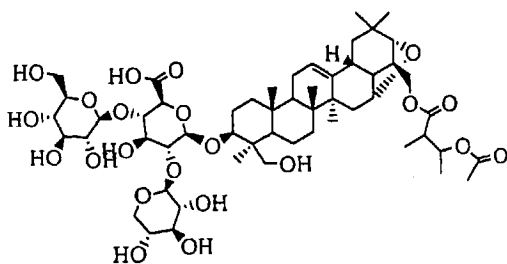
化合物2



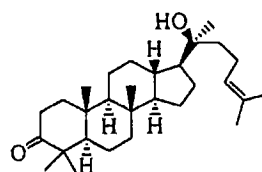
化合物3



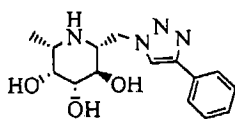
化合物4



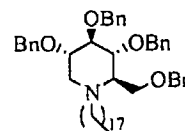
化合物5



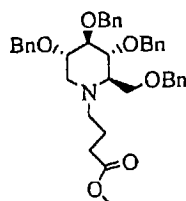
化合物6



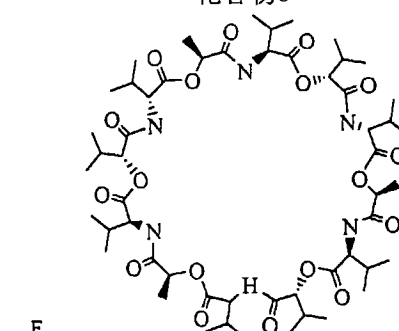
化合物7



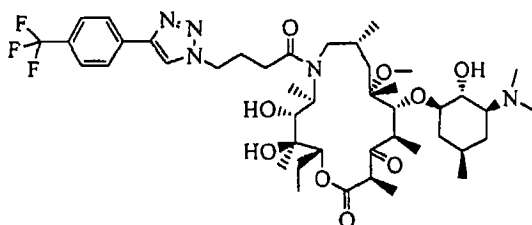
化合物8



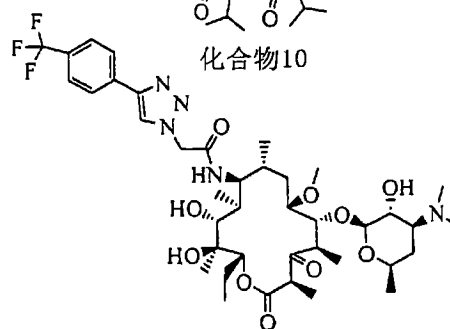
化合物9



化合物10

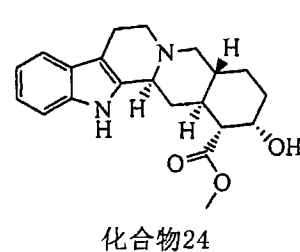
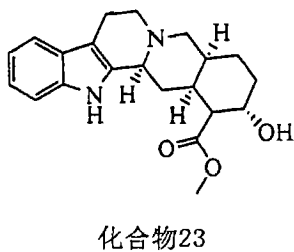
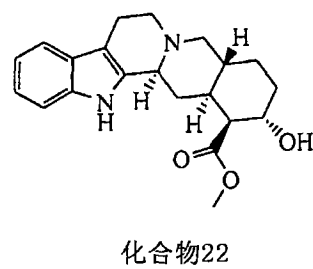
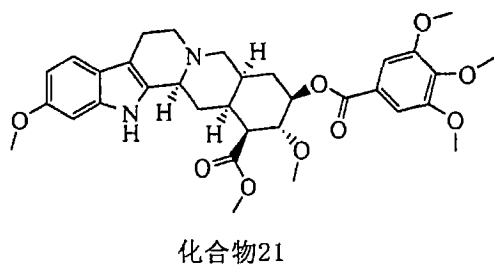
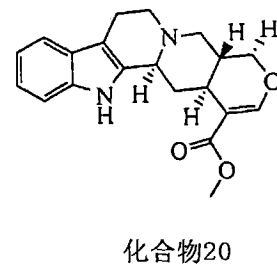
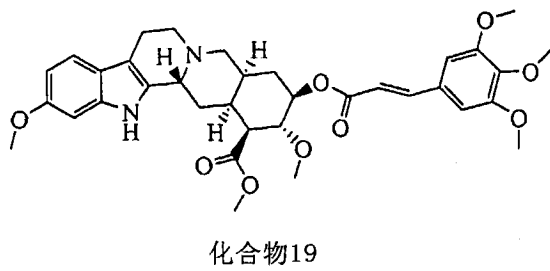
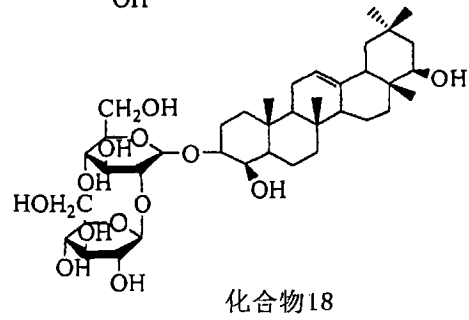
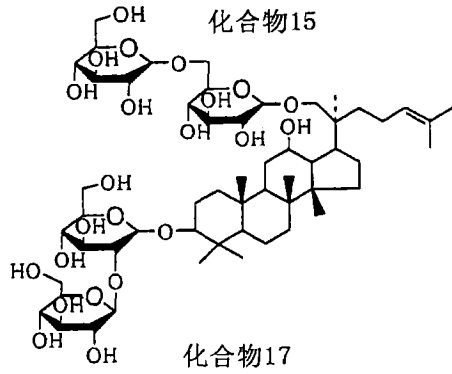
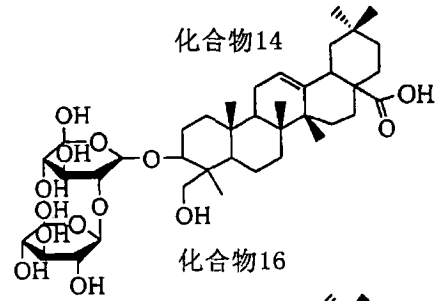
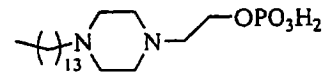
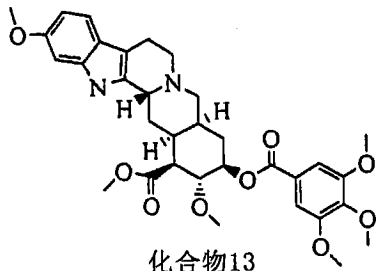


化合物11

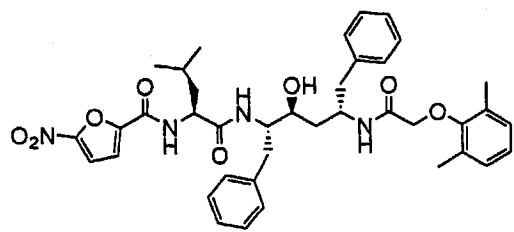


化合物12

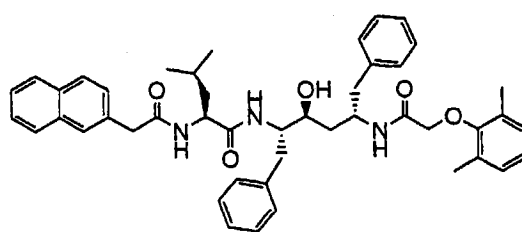
[0034]



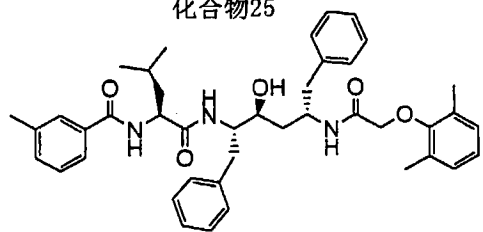
[0035]



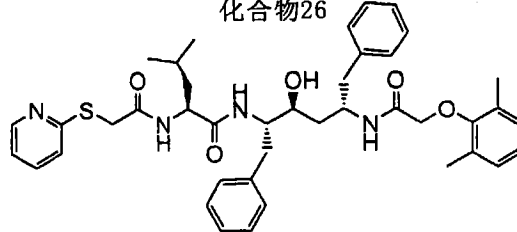
化合物25



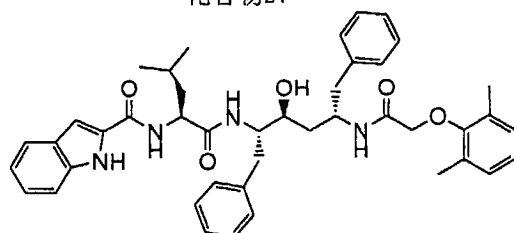
化合物26



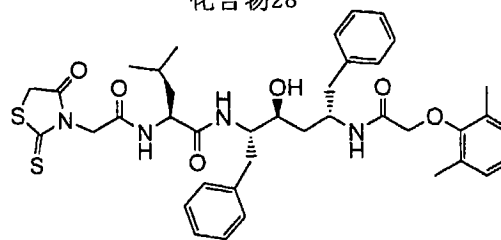
化合物27



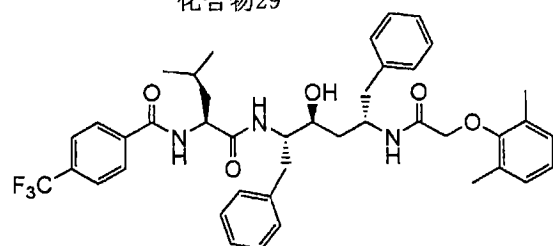
化合物28



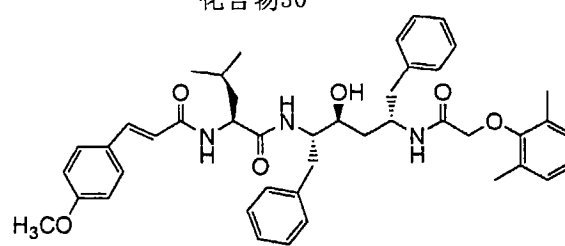
化合物29



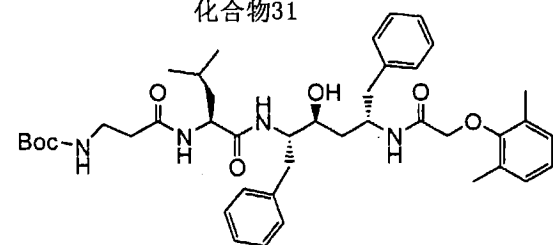
化合物30



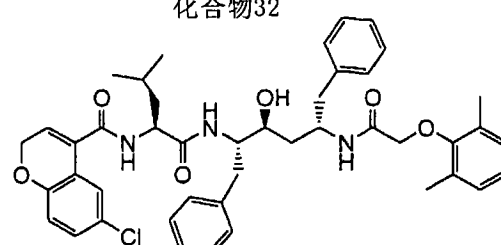
化合物31



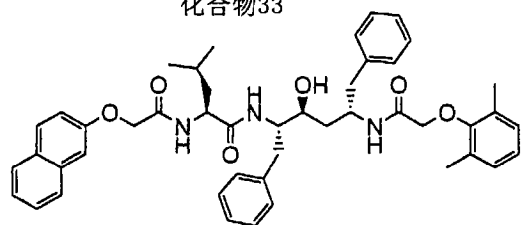
化合物32



化合物33



化合物34



化合物35

[0036] 上述的一些化合物可获自商业来源,如 Sigma-Aldrich, St. Louis, MO。它们全都可借着已知的方法来制备。参见,例如 Lee 等人, J. Am. Chem. Soc., 1999, 121:1145-1155 及其中提及的参考文献。例如,可经由一系列此项技艺中已熟知的肽偶联反应,来制备上文所示的化合物 25。在下文实例 3 中描述一种这类反应。在下文实例 1、2 和 4-13 中提供了制备化合物 1、2 和 26-35 的细节。化合物 3-24 是市售的。可借着诸如柱层析法、高

压液相层析法或重结晶作用之类的方法,纯化合成的化合物。其它用来实施本发明的类似化合物,可使用其它适当的起始物质,经由上述的合成路径和此项技艺中已知的其它方法来制备。上述的方法亦可包括额外的步骤,在本文特别描述的步骤之前或之后,添加或移除适当的保护基,以最终允许合成上述的化合物。此外,亦可以不同顺序进行各种合成步骤,得到想要的化合物。在合成适用的化合物时,合成化学转化和保护基方法学(保护和脱保护)为此项技艺中已知的,并包括例如在 R. Larock, *Comprehensive Organic Transformations*, VCH Publishers (1989); T. W. Greene 和 P. G. M. Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 第 2 版, John Wiley and Sons (1991); L. Fieser 和 M. Fieser, *Fieser and Fieser's Reagents for Organic Synthesis*, John Wiley and Sons (1994); 以及 L. Paquette 编辑, *Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis*, John Wiley and Sons (1995) 及其后续的版本中描述的那些。

[0037] 在本文中提及的化合物可含有非芳香族双键和一或多个不对称的中心。因此,可出现消旋体和消旋混合物、单一对映体、个别的非对映异构体、非对映异构的混合物,及顺-或反-异构形式。本发明亦包括所有的这些类异构形式。

[0038] 本发明亦涵盖将有效量的一或多个上述的药物化合物施用于患有冠状病毒感染、并任选地亦有人类或猫免疫缺陷病毒感染的对象的方法。可借着下述的方法,或借着在此项技艺中已知的方法,如在美国专利第 6,803,466 号和 Lee 等人, *J. Am. Chem. Soc.*, 1999, 121:1145-1155 中描述者,筛选对这些感染具抑制活性的药物化合物。

[0039] 此外,本发明亦涵盖使有效量的一或多个上述的药物化合物与冠状病毒蛋白酶,并任选地与人类或猫免疫缺陷病毒蛋白酶或两者都接触的方法。可借着下述的方法,或借着在此项技艺中已知的方法,如在美国专利第 6,803,466 号和 Lee 等人, *J. Am. Chem. Soc.*, 1999, 121:1145-1155 中描述者,筛选对一或多个这些蛋白酶具抑制活性的化合物。

[0040] 含有有效量的至少一个上述化合物和在药学上可接受的载体的医药组合物,亦在本发明的范围内。施用这类医药组合物的方案为已熟知的,且若需要可迅速地重建。据熟谙此艺者所能了解,有效剂量将视冠状病毒感染的类型或程度;对象的尺寸、体重、年龄和性别;投药的路径;赋形剂的使用;以及可能与其共同使用的其它治疗处理而改变。

[0041] 实施本发明的方法,可为非经肠、口服、经鼻、经直肠、局部或颊内的方式,施用具有一或多个上文提及的化合物的组合物。当在本文中使用时,"非经肠"一词意指皮下、皮内、静脉内、肌肉内、关节内、动脉内、滑膜内、胸骨内、鞘内、病灶内或颅内注射,以及任何适当的灌流技术。

[0042] 无菌注射用的组合物可以是在无毒性非经肠可接受的稀释剂或溶剂中的溶液或悬浮液,如在 1,3-丁二醇中的溶液。在可接受的载体和溶剂中,可使用的有甘露糖醇、水、林格氏液和等渗的氯化钠溶液。此外,经常使用固定油作为溶剂或悬浮介质(例如合成的单-或二甘油酯)。脂肪酸,如油酸及其甘油酯衍生物可用在注射用的制备物中,像是天然在药学上可接受的油类,如橄榄油或蓖麻油,尤其是以其聚氧乙基化者。这些油溶液或悬浮液亦可含有长链醇稀释剂或分散剂,或羧甲基纤维素或类似的分散剂。为了调配,亦可使用其它常用的表面活性剂,如吐温或山梨糖醇酯类,或其它类似经常用来制造在药学上可接受的固体、液体或其它剂量形式的乳化剂或生物利用性促进剂。

[0043] 口服投药的组合物可以是任何口服可接受的剂量形式,包括胶囊、锭剂、乳剂和水

性悬浮液、分散液和溶液。在锭剂的情况下,常用的载体包括乳糖和玉米淀粉。通常亦可加入润滑剂,如硬脂酸镁。至于以胶囊形式的口服投药时,有用的稀释剂包括乳糖和干燥的玉米淀粉。当口服施用水性悬浮液或乳剂时,可将活性成分悬浮或溶解于油性相中,与乳化或悬浮剂混合。若需要,可加入某些增甜剂、调味剂或着色剂。

[0044] 可根据药物制剂领域中已熟知的技术,制备鼻喷雾或吸入组合物。例如,可将这类组合物制备成在生理盐水中的溶液,使用苯甲醇或其它适当的防腐剂,增强生物利用性的吸收促进剂,碳氟化合物,及/或此项技艺中已知的其它促溶或分散剂。亦可以直肠投药用的栓剂,施用具有一或多个上述活性化合物的组合物。

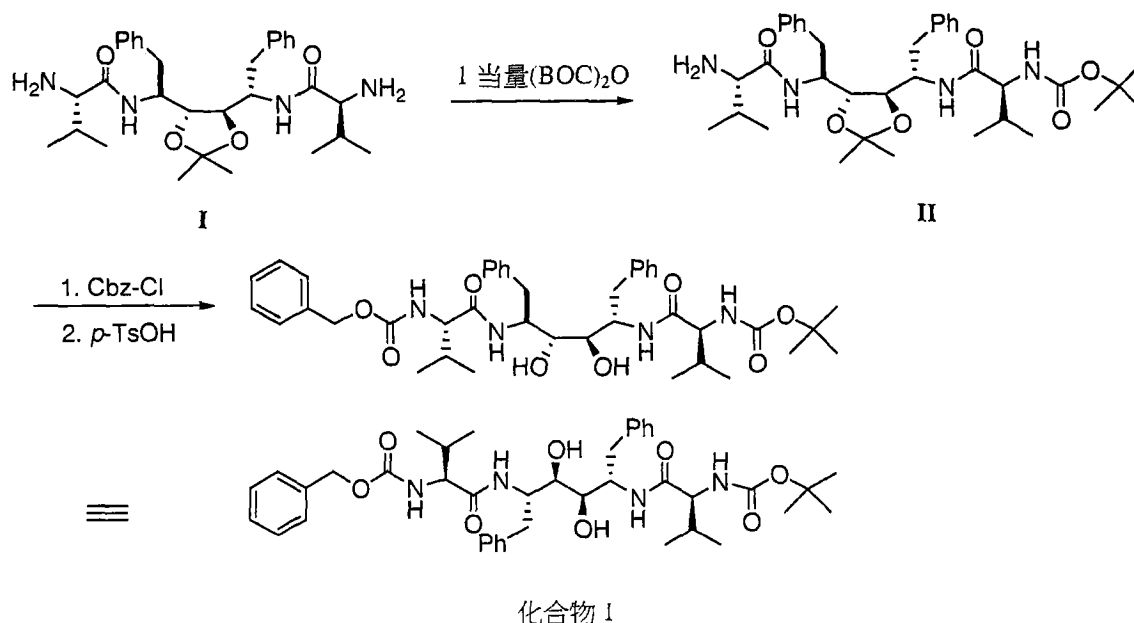
[0045] 药学上可接受的载体照例可与一或多个上述活性化合物一起使用。在医药组合物中的载体必须是“可接受的”,就这种意义来说,其与组合物的活性成分是可兼容的(且优选地,能够使该活性成分稳定),且对待治疗的对象无害。可使用一或多个促溶剂作为药学赋形剂,来递送上文提及的化合物。其它载体的例子包括胶体二氧化硅、硬脂酸镁、纤维素、十二烷基硫酸钠和 D&C 黄色 10 号。

[0046] 经体外分析,可初步筛选上述的化合物对抗严重急性呼吸综合征病毒复制的能力(参见下文实例 14 和 15)。对熟谙此艺者而言,其它方法亦将是显而易见的。参见例如美国专利第 6,803,466 号和 Lee 等人, J. Am. Chem. Soc., 1999, 121:1145-1155。这些化合物可借着体内分析作进一步的筛选。

[0047] 可将下文特定的实例解释为仅作为说明之用,并非企图以任何方式限制所公开内容的其余部分。不必进一步的详述,相信本领域技术人员可以本文中的说明为基础,使用本发明至其最充分的程度。所有在本文中提及的出版物均全部以引用的方式并入本文中。

[0048] 实例 1: 化合物 1 的制备

[0049]



[0050] 可根据在 Lee 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 1998, 95, 939-944 中描述的方法,制备化合物 I。

[0051] 将化合物 I (0.6 克, 1.11 毫摩尔) 溶解于三乙胺和甲醇的溶液 (10% TEA 在 MeOH 中, 5.5 毫升) 中。然后将在甲醇 (5 毫升) 中含有二碳酸二叔丁酯 (0.24 克, 1.11 毫摩尔)

的溶液逐滴加至以上的混合物中,并剧烈搅拌。在室温下搅拌该混合物过夜。在真空中移除甲醇和 TEA,产生油状的残余物。将残余物溶解于二氯甲烷(30 毫升)中,并以 10%碳酸钠水溶液漂洗(2×50 毫升)。分离有机层,用无水 Na₂SO₄脱水,过滤并在真空中浓缩。借着快速柱层析法纯化如此获得的油状残余物,得到白色固体状的化合物 II(0.55 克,78%)。

[0052] 在二异丙基乙胺(0.2 毫升,1.56 毫摩尔)的存在下,将化合物 II(0.5 克,0.78 毫摩尔)溶解于无水二氯甲烷(10 毫升)中。在将该溶液冷却至 0℃之后,慢慢地逐滴加入氯甲酸苄酯(0.16 克,0.94 毫摩尔)。在 20 分钟后,完成该反应(用 TLC 监测)。然后将该溶液加至饱和的碳酸氢钠溶液(20 毫升)中,并用二氯甲烷萃取该混合物(3×20 毫升)。混合有机层,用无水 MgSO₄脱水,并浓缩得到粗制的油。将该粗制的油用在脱保护反应上,而不需纯化。将催化用量 p-TsOH 加至在 MeOH(5 毫升)中的上文粗制油的溶液中。将该反应混合物加热至 60℃ 24 小时,然后以 EtOAc(20 毫升)稀释。以饱和的 NaHCO₃水溶液(5 毫升)、饱和的 NaCl 水溶液(5 毫升)洗涤有机溶液,用无水 MgSO₄脱水,过滤并在真空中浓缩。然后借着快速柱层析法纯化如此获得的油状残余物,得到白色固体状的化合物 1(0.6 克,75%)。

[0053] ¹H NMR(400MHz, DMSO-d₆):0.71(6H, m),0.73(6H, m),1.5(9Hs),2.17(1H, se, J = 6.7),2.8-2.9(3H, m),3.34(1H, m),4.03(2H, dd, J = 8.8,6.4),4.10(1H, qu, J = 7.0),4.27(1H, s),4.0-4.20(1H, m),4.23-4.32(1H, m),6.92-6.96(1H, br),7.05-7.34(12H, m)。

[0054] ¹³C NMR(100MHz, DMSO-d₆, 80℃):17.7,19.6,19.7,28.7,30.4,30.5,30.7,38.3,45.4,47.8,53.0,60.9,65.9,67.1,72.8,126.9,127.6,128.0,128.8,128.9,129.0,129.7,138.3,172.0,172.5。

[0055] MS(ESI) (M+H)⁺:733。

[0056] 实例 2:化合物 2 的制备

[0057] 可根据在 Lee 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 1998, 95, 939-944 中描述的方法,制备化合物 2。

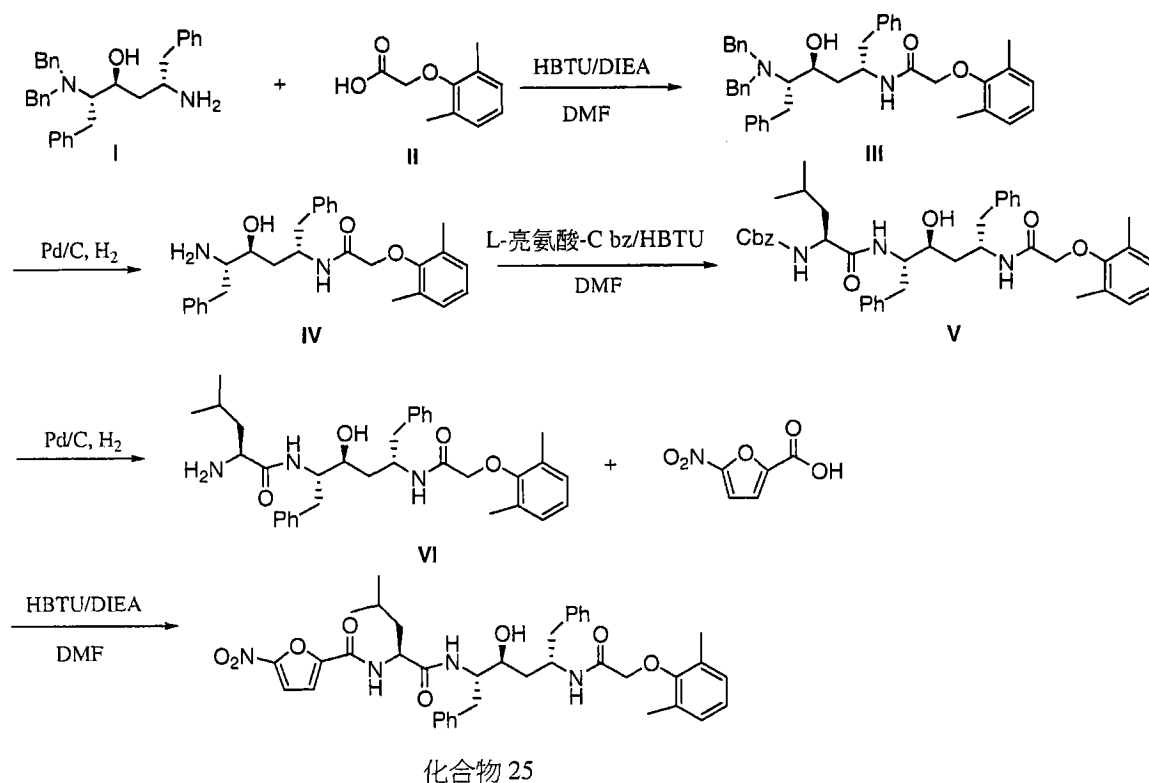
[0058] ¹H NMR(400MHz, DMSO-d₆, 80℃):0.70(3H, d, J = 2.4),0.72(3H, d, J = 2.4),1.21(3H, d, J = 7.0),1.87(1H, se, J = 6.7),2.69-2.79(2H, m),3.32(1H, s),4.03(1H, dd, J = 8.8,6.4),4.10(1H, qu, J = 7.0),4.27(1H, s),4.34-4.40(1H, m),5.04(2H, s),6.92-6.96(1H, br),7.05-7.34(12H, m)。

[0059] ¹³C NMR(100MHz, DMSO-d₆, 80℃):17.3,17.6,18.7,29.7,38.0,49.9,50.4,57.8,65.1,72.5,125.1,127.0,127.2,127.3,127.8,128.6,136.6,138.4,155.1,169.8,171.6。

[0060] HRMS(FAB+)(M+Cs⁺):1041.3780。

[0061] 实例 3:制备化合物 25

[0062]



[0063] 可根据在 Stuk 等人, *J. Org. Chem.* 1994, 59 :4040 和 Sham 等人, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2002, 12 :1185-1187 中描述的方法, 分别制备化合物 I 和 II。在 20°C 在 Ar 气氛下, 将 HBTU (肽偶联剂, 0.80 克, 2.1 毫摩尔) 加至在 20 毫升无水 DMF 中的化合物 I (0.93 克, 2.0 毫摩尔) 和化合物 II (0.38 克, 2.1 毫摩尔) 的溶液中, 接着加入 DIEA (0.5 毫升, 4.2 毫摩尔)。在搅拌 30 分钟的后, 借着加入盐水使该反应混合物骤冷, 然后以 EtOAc 萃取。在以 1M HCl、饱和 NaHCO₃ 水溶液和盐水洗涤有机层之后, 将其用无水 MgSO₄ 脱水, 过滤并在真空中浓缩。借着快速层析法纯化如此获得的粗产物, 得到 90% 产量的化合物 III。

[0064] 在 H₂ (1 大气压) 下, 在 20°C 下, 在 10% Pd/C (200 毫克) 的存在下, 搅拌在 EtOAc (40 毫升) 中的化合物 III (0.6 克, 0.98 毫摩尔) 20 小时。通过硅藻土过滤该混合物, 然后在真空中浓缩, 得到无色有黏性油状的化合物 IV, 将其用在偶联反应中, 不需纯化。

[0065] 将 HBTU (0.36 克, 0.96 毫摩尔) 和 DIEA (0.23 毫升, 1.91 毫摩尔) 加至在 DMF (15 毫升) 中的化合物 IV (0.39 克, 0.87 毫摩尔) 和 N-Cbz-L-亮氨酸 (0.25 克, 0.96 毫摩尔) 的溶液中。在 20°C 在 Ar 下, 搅拌该反应混合物 30 分钟。在借着加入盐水 (45 毫升) 使该反应骤冷之后, 以 EtOAc (4×30 毫升) 萃取该混合物。混合有机层, 并连续以 1M HCl (10 毫升)、饱和 NaHCO₃ 水溶液 (10 毫升) 和饱和 NaCl 水溶液 (10 毫升) 洗涤。然后将有机相用无水 MgSO₄ 脱水, 过滤并在真空中浓缩。借着快速层析法纯化如此获得的粗产物, 得到白色固体状的化合物 V (0.53 克, 78% 两个步骤)。

[0066] 在 H₂ (1 大气压) 下, 在 20°C 下, 在 10% Pd/C (200 毫克) 的存在下, 搅拌在 EtOAc (40 毫升) 中的化合物 V (0.5 克, 0.728 毫摩尔) 20 小时。通过硅藻土过滤该混合物, 然后在真空中浓缩。借着快速层析法纯化如此获得的粗产物, 得到白色固体状的化合物 VI (0.37 克, 92%)。

[0067] 将 HBTU (0.15 克, 0.40 毫摩尔) 和 DIEA (0.1 毫升, 0.80 毫摩尔) 加至在 DMF (15 毫升) 中的化合物 VI (0.2 克, 0.36 毫摩尔) 和 5-硝基-咪唑-2-羧酸 (62.8 毫克, 0.40

毫摩尔)的溶液中。在 20°C 在 Ar 下,搅拌 30 分钟的后,借着加入盐水(45 毫升)使该反应骤冷,并以 EtOAc(4×30 毫升)萃取该混合物。混合有机层,并连续以 1M HCl(10 毫升)、饱和 NaHCO₃ 水溶液(10 毫升)和饱和 NaCl 水溶液(10 毫升)洗涤。然后将有机相用无水 MgSO₄ 脱水,过滤并在真空中浓缩。借着快速层析法纯化如此获得的粗产物,得到白色固体状的化合物 25(0.23 克,90%)。

[0068] LC-MS(M+H)⁺:699。

[0069] 实例 4:制备化合物 26

[0070] 以类似在实例 3 中描述的方式,制备化合物 26。

[0071] LC-MS(M+H⁺):747。

[0072] 实例 5:制备化合物 27

[0073] 以类似在实例 3 中描述的方式,制备化合物 27。

[0074] LC-MS(M+H⁺):678。

[0075] 实例 6:制备化合物 28

[0076] 以类似在实例 3 中描述的方式,制备化合物 28。

[0077] LC-MS(M+H⁺):711。

[0078] 实例 7:制备化合物 29

[0079] 以类似在实例 3 中描述的方式,制备化合物 29。

[0080] LC-MS(M+H⁺):703。

[0081] 实例 8:制备化合物 30

[0082] 以类似在实例 3 中描述的方式,制备化合物 30。

[0083] LC-MS(M+H⁺):733。

[0084] 实例 9:制备化合物 31

[0085] 以类似在实例 3 中描述的方式,制备化合物 31。

[0086] LC-MS(M+H⁺):732。

[0087] 实例 10:制备化合物 32

[0088] 以类似在实例 3 中描述的方式,制备化合物 32。

[0089] LC-MS(M+H⁺):720。

[0090] 实例 11:制备化合物 33

[0091] 以类似在实例 3 中描述的方式,制备化合物 33。

[0092] LC-MS(M+H⁺):731。

[0093] 实例 12:制备化合物 34

[0094] 以类似在实例 3 中描述的方式,制备化合物 34。

[0095] LC-MS(M+H⁺):752。

[0096] 实例 13:制备化合物 35

[0097] 以类似在实例 3 中描述的方式,制备化合物 35。

[0098] LC-MS(M+H⁺):744。

[0099] 实例 14:筛选分析

[0100] 一开始借着观察致细胞病变作用(CPE),就其对抗严重急性呼吸综合征病毒的抑制活性来筛选化合物 1-35。分析过程如下:在 96-孔培养板中,将 Vero E6 细胞(2×10⁴/

孔) 培养在补充有 10% 胎牛血清 (FBS) 的 Dulbecco' s 改进的 Eagle' s 培养基 (DMEM) 中。在培养一天之后移出培养基, 此时细胞达到 80-90% 汇合。将含有 10 微升受试化合物的 100 微升带有 2% FBS 的 DMEM 的溶液放在孔中 (为一式三份)。使用在带有 2% FBS 中的 DMEM 中的细胞作为 CPE- 阳性对照组 (亦为一式三份)。然后在 37°C 的 CO₂ 恒温箱中培养所有的细胞 2 小时, 接着以 100 TCID₅₀/ 孔的剂量接种严重急性呼吸综合征病毒 (H. K.)。在感染后 72 小时, 使用倒置显微镜检查细胞的细胞病变形态。

[0101] 借着使用免疫荧光酶连免疫吸附测定 (ELISA)、免疫荧光测定 (IFA)、Western 印迹分析 (WBA)、流动细胞计数分析 (FCA) 和 3CL- 蛋白酶抑制测定, 证实受试化合物的抑制活性。在下文提供这些测定的详细说明:

[0102] 免疫荧光酶连免疫吸附测定

[0103] 在将 VeroE6 细胞与严重急性呼吸综合征病毒和受试化合物一起培养之后, 以磷酸盐缓冲液 (PBS) 漂洗细胞, 在室温下以含有冰甲醇: 丙酮 = 1 : 1 的溶液固定 3 分钟, 并以 PBS 漂洗三次。然后在室温下以 3% 在 PBS 中的脱脂牛奶封闭细胞 30 分钟, 并在 37°C 下与 1 : 2,000 稀释的针对严重急性呼吸综合征病毒的棘蛋白的单克隆抗体 (腹水) 一起培养 1 小时。所有的试样均在室温下以 PBS-T 缓冲溶液漂洗三次, 以 PBS 缓冲溶液漂洗两次, 接着在室温下与 HRP- 标记的山羊抗-小鼠 IgG 一起培养 30 分钟。在培养之间, 以含有 0.05% 吐温 20 的 PBS 漂洗培养板。在每孔中加入含有 0- 苯二胺二盐酸盐、柠檬酸缓冲溶液 (pH5.0) 和过氧化氢的底物溶液。然后盖上培养盘, 并在室温下温和地振荡 10 分钟。在借着加入 3N 硫酸使该反应中止之后, 立刻在 492 纳米米处测量每个培养板的荧光强度。从制剂浓度对 OD₄₉₂ 的线性回归作图, 以外插法推导出每个制剂的 EC₅₀ 值。

[0104] 免疫荧光测定

[0105] 以 PBS 漂洗被感染或对照组细胞, 并重悬至 1×10⁶ 个细胞 / 毫升的终浓度。接着将每种受试化合物浓度或每个对照组的 2×10⁴ 个细胞点在孔中, 制备 IFA 用的玻片。然后将玻片脱水, 以冰甲醇: 丙酮 = 1 : 1 的溶液固定 3 分钟, 漂洗并在进行 IFA 染色之前, 储存在 -20°C 下。将 Daudi 细胞再水化, 然后在室温下以 3% 在 PBS 中的脱脂牛奶封闭 30 分钟。将 VeroE6 细胞再水化、封闭, 并以含有 0.1% 皂角苷和 1% FBS 的 PBS 透化。将所有其它的细胞再水化、封闭, 并以含有 5% FBS、4% 正常山羊血清和 0.5% DMSO 的 PBS 透化 30 分钟。然后在 37°C 下, 在水合室中将细胞与以封闭溶液稀释的一级抗体一起 1 小时。接着以 PBS 漂洗, 在 37°C 下将细胞与 3 克 / 毫升偶联 FITC 的山羊抗-小鼠 IgG+IgM 二级抗体 (Jackson ImmunResearch, West Grove, PA) 一起培养 1 小时。在再度以 PBS 漂洗之后, 以在 PBS 中的 0.1% 依文氏 (Evans) 蓝染料 (Fisher, Fair Lawn, NJ) 将细胞染色 5 分钟。漂洗玻片, 移除任何过量的对比染料, 并使用在 PBS 中的 50% 甘油的溶液, 放上盖玻片。在 Nikon (Nikon, Melville, NY) 荧光显微镜下, 以 400X 倍观察细胞。对于每个受试化合物浓度, 计数 500 个细胞, 并计算抗原阳性细胞的百分比。判定抑制 50% 病毒复制所需的浓度 (EC₅₀)。

[0106] Western 印迹分析

[0107] 以各种浓度的受试化合物处理严重急性呼吸综合征病毒感染的 Vero E6 细胞 24 或 48 小时, 然后在裂解缓冲溶液中裂解 3 分钟。旋转使细胞碎片沉淀, 并收获所有的细胞裂解产物, 用 SDS-APGE 和 Hybond-C Extra 膜 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) 进行电泳和 Western 印迹测定。在室温下以 3% 在 PBS 中的脱脂牛奶封闭所得的膜 30 分钟,

然后在室温下以 1 : 5,000 稀释的抗-棘蛋白单克隆腹水或 1 : 2,000 稀释的小鼠抗肌动蛋白抗体 (Chemicon MAb 1501) 处理 1 小时。使用两批 PBS-T 缓冲溶液漂洗该膜,然后在室温下以 PBS 漂洗 15 分钟一次,并漂洗 5 分钟两次。然后以 1 : 2,000 稀释的 HRP- 标记的山羊抗小鼠 IgG 处理该膜 30 分钟和 1 小时。如上漂洗该膜,并在膜的蛋白质侧加入混合的 ECL 检测试剂。将印迹放在胶片盒中,蛋白质侧向上,观察蛋白质的表达水平。

[0108] 流动细胞计数分析

[0109] 以在 PBS 中 5% FBS 和 4% 山羊血清漂洗和阻断 Vero E6 细胞。以 0.05% 胰蛋白酶-EDTA 介质消化严重急性呼吸综合征病毒感染的细胞。将大约 $1-5 \times 10^5$ 个细胞分布在圆底 ELISA 板的各孔中,或含有细胞培养基各 1.5 毫升的微量管中。离心悬浮液,并以 PBS 漂洗细胞并再悬浮。在每孔或微量管中加入 100 微升 CYTOFIX/CYTOPERM 溶液。固定细胞并在 4°C 下以 2 毫升甲醇透化 20 分钟。然后在 37°C 下以含有 5% FBS、4% 血清和 0.5% DMSO 的 PBS 封闭细胞 30 分钟。在 37°C 下将细胞与 20 毫升以封闭溶液稀释的一级抗体一起培养 1 小时,然后以 4 毫升封闭溶液漂洗两次,并接着以 1000xg 离心 5 分钟使其形成沉淀。在第二次漂洗的后,加入 0.5 毫升 3 克/毫升偶联 FITC 的山羊抗小鼠 IgG+IgM (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA),接着在 37°C 下培养细胞 1 小时。然后以 PBS 漂洗细胞两次,并在重悬之前经离心使其形成沉淀。

[0110] 使用 Becton-Dickenson FACS Calibur 仪器获得流动细胞计数数据,并经 Win-MDI 2.7 数据分析程序 (Scripps Research Institute, La Jolla, CA) 分析。收集所得的点图,移除非特异性和背景染色并设定 M1 条,使得在阴性对照组中低于 1% 的细胞被包括在测定阳性细胞的百分比内。使用以化合物浓度对抗原阳性细胞的百分比为基础所绘的图,以外插法定出每个受试化合物的 EC_{50} 值。

[0111] 3CL-蛋白酶抑制测定

[0112] 通过用聚合酶链式反应,利用正向引物 5' -GGTATTGAGGGTCGCA-GTGTTTTAGG-3' 和反向引物 5' -AGAGGAGAGTTAGAGCCTTATTGG-AAGGTAACACC-3', 从病毒全基因组中,克隆编码严重急性呼吸综合征病毒的主要蛋白酶的基因。将以两个引物作为旁侧的 PCR 产物亚克隆入 pET32Xa/Lic 载体内。在这些引物中包含 Fxa 切割位点 (IEGR) 和与线性载体 pET-32Xa/LIC 的粘性末端互补的序列。然后使用该重组蛋白酶质粒转化大肠杆菌 JM109 感受态细胞,其被接种在含有 100 微克/毫升氨苄青霉素的 Luria-Bertani (LB) 琼脂板上。随后将正确的构建体转化到大肠杆菌 BL21 内,用于表达带 His 标签的蛋白质,然后用 Fxa 蛋白酶消化以除去该标签。用 N-末端测序和质谱分析证实经过纯化的蛋白质的结构。从 280 纳米处的吸光度判定在所有实验中使用的酶浓度。

[0113] 在 25°C 下,在 20mM Bis-Tris (pH7.0) 中进行所有的动力学测量。使用荧光培养板阅读器 (Fluoroskan Ascent from ThermoLabsystems, Sweden), 在 528 纳米处以 355 纳米激发,监视因为切割发荧光底物肽 (Dabcyl-KTSAVLQ-SGFRKME-Edans) 而增强的荧光。

[0114] 使用上述的测定,测试化合物 1-35。令人意外的是,它们全显示出低 EC_{50} 值,即在 0.85 μ M 到 100 μ M 的间。

[0115] 实例 15:细胞毒性测定

[0116] 在 37°C 的增湿 5% CO 恒温箱中,使 Vero E6 细胞生长在 75 立方厘米培养瓶中添加有 L-谷氨酰胺、非必需氨基酸和 10% FBS 的 DMEM 中。然后以 7×10^4 个细胞/毫升将细

胞接种在 96-孔培养板中,并留置过夜。

[0117] 使用 Cell Titer 96 非放射性细胞增殖测定试剂盒 (Promega, Madison, WI), 测定活细胞群。试剂盒测量 Formazan 的量,这是通过经代谢活性细胞的粒线体中存在的脱氢酶对 Owen' s 试剂,3-(4,5-二甲噻唑-2-基)-5-(3-羧甲氧基苯基)-2-(4-硫代-苯基)-2H-四唑内盐 (MTS) 的代谢转化而产生的,并与活细胞的数目成正比。简言之,在与各种浓度的受试化合物一起培养 2 天之后,以在 DMEM 中的 MTS/吩嗪硫酸甲酯 (phenazinemethosulfate) 取代培养基。在 37°C 下培养 2 小时后,利用培养板阅读器在 490 纳米处测量吸光度。以在没有任何受试化合物之下培养的对照组细胞的百分比来表示数据 (如 100%)。

[0118] 测试化合物 1-15 的细胞毒性。令人意外的是,它们在等于对抗严重急性呼吸综合征病毒的 EC_{50} 浓度下,都没有显露出对细胞生长的抑制效果。此外,10 种受试化合物在像对抗严重急性呼吸综合征病毒的 EC_{50} 浓度四倍那么高的浓度下,仍显示对细胞生长没有抑制效果。

[0119] 其它的具体实施方案

[0120] 在本说明书中公开的所有特征,均可以任何组合来组合。在本说明书中公开的每个特征,均可以另一种提供相同、相等或类似目的的特征代替。因此,除非另行明确地陈述,每个公开特征均仅是一系列通用的相等或类似特征的例子。

[0121] 从以上的说明中,本领域技术人员可迅速确定本发明的必要特征,并可进行不违背其精神及范围的对本发明的各种变化和修改,以使其适应各种用途和状况。因此,其它的具体实施例亦在下列权利要求范围之内。