



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116283978 A

(43) 申请公布日 2023.06.23

(21) 申请号 202310558025.2

(22) 申请日 2023.05.18

(71) 申请人 广州市朝利良生物科技有限公司  
地址 510663 广东省广州市高新技术产业  
开发区科学城揽月路3号广州国际企  
业孵化器F区F712、F713、F718、F719

(72) 发明人 李长志 钱朝南 陈金东 周红娟

(74) 专利代理机构 广州科沃园专利代理有限公  
司 44416

专利代理师 刘敏仪

(51) Int. Cl.

C07D 471/04 (2006.01)

A61K 31/4375 (2006.01)

A61P 31/14 (2006.01)

权利要求书2页 说明书9页 附图9页

(54) 发明名称

一类抗冠状病毒的化合物及其制备方法和应用

(57) 摘要

本发明涉及一类抗冠状病毒的化合物及其制备方法和应用,该化合物通过有机合成方法制备得到,纯度可达95%以上,收率为27.7%。本发明提供的一类新型的抗冠状病毒的化合物对阻断S蛋白与ACE2结合有显著的效果,其阻断S蛋白与ACE2结合的 $EC_{50}$ 为63.73  $\mu$ M,在浓度为6.25  $\mu$ M可显著阻断新冠假病毒对细胞的感染,远低于其 $CC_{50}$  443.33  $\mu$ M,该化合物对2019-nCoV、HCoV-229E、HCoV-OC43、SARS-CoV和MERS-CoV中的至少一种的冠状病毒有显著的抑制效果,尤其适用于阻断S蛋白与ACE2结合的冠状病毒。



1. 一类抗冠状病毒的化合物,其特征在于,所述化合物的结构如通式(I)所示;

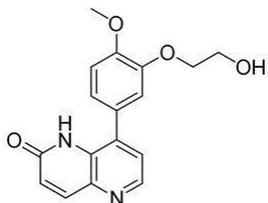


(I)

式中R1为单取代或多取代,R<sub>1</sub>选自C<sub>1~12</sub>直链烷基、C<sub>1~12</sub>支链烷基、烷氧基和羟基烷氧基中的一种或多种。

2. 根据权利要求1所述的一类抗冠状病毒的化合物,其特征在于,所述化合物包括其几何异构体或其药学上可接受的盐和/或其溶剂化物和/或其水合物。

3. 根据权利要求1所述的一类抗冠状病毒的化合物,其特征在于,所述化合物为式(II);



(II)。

4. 一种制备权利要求3所述抗冠状病毒的化合物的方法,其特征在于,包括以下步骤:

#### S1、合成中间体1

称取5-溴-2-甲氧基苯酚、四丁基氟化铵、碳酸乙烯酯进行加热反应,降温至室温,加入二氯甲烷稀释,然后加入饱和氯化钠洗涤,分液、萃取,并用无水硫酸钠干燥有机相,过滤后将有机相浓缩至干得粗品,向粗品中加入乙酸乙酯和石油醚,过滤得到合成中间体1;

#### S2、合成中间体2

称取步骤S1获得的合成中间体1、频哪醇、碳酸钾、DPPF二氯化钯于二氧六环中,氮气鼓泡,在氮气保护氛围下进行加热反应,反应完成之后,降温至室温,加入乙酸乙酯和水,萃取、分液,有机层经无水硫酸钠干燥后,过滤、浓缩至干得粗品,粗品柱析层分离纯化,得到合成中间体2;

#### S3、合成中间体3

将8-溴-2-甲氧基-1,5-萘啶溶于二氧六环中,低温下滴入氢溴酸和水的混合物,回流反应,反应完成之后,依次用二氯甲烷提取、乙酸乙酯萃取提取、分液,水相用饱和碳酸钠中和,二氯甲烷提取液与乙酸乙酯提取液合并,然后用无水硫酸钠干燥,过滤,浓缩得到合成中间体3;

#### S4、合成终产物

称取合成中间体2、合成中间体3、碳酸钾、DPPF二氯化钯于二氧六环中,氮气鼓泡后,氮气保护氛围下进行反应,反应完成之后,降温至室温,加入乙酸乙酯和水,萃取、分液,有机层经无水硫酸钠干燥,浓缩至干,得粗品,粗品柱析层分离纯化,水相进行浓缩得粗品,粗品柱析层分离纯化,合并纯化后的产品为合成终产物,抗冠状病毒的化合物(II)。

5. 一种抗冠状病毒的制剂,其特征在于,所述制剂包含权利要求1~3任一项所述的化合物。

6. 根据权利要求5所述的抗冠状病毒的制剂,其特征在于,所述制剂的剂型包括混悬剂、颗粒剂、胶囊剂、散剂、片剂、乳剂、溶液剂、滴丸剂、注射剂、气雾剂或滴剂。

7. 根据权利要求1~3任一项所述的抗冠状病毒的化合物在制备抗冠状病毒的药物中的应用。

8. 根据权利要求7所述的应用,其特征在于,所述冠状病毒选自2019-nCoV、HCoV-229E、HCoV-OC43、SARS-CoV和MERS-CoV中的至少一种。

9. 根据权利要求7所述的应用,其特征在于,所述药物为抑制发热、咳嗽和咽痛的单纯性感染、肺炎、急性呼吸道感染、严重急性呼吸道感染、低氧性呼吸衰竭、急性呼吸窘迫综合征、脓毒症和脓毒性休克。

10. 根据权利要求7所述的应用,其特征在于,所述药物的给药途径为口服、注射或呼吸道吸入。

## 一类抗冠状病毒的化合物及其制备方法和应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于药物合成技术领域,具体涉及一类抗冠状病毒的化合物及其制备方法和应用。

### 背景技术

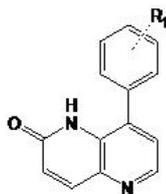
[0002] 冠状病毒属于套式病毒目、冠状病毒科、冠状病毒属,是一类具有囊膜、基因组为线性单股正链的RNA病毒,某些冠状病毒会感染人类并引起疾病,比如中东呼吸综合征(MERS)、严重急性呼吸综合征(SARS)和新型冠状病毒(SARS-CoV-2)引起的肺炎,其症状可从普通感冒到重症肺部感染,历史上已知的能够感染人的冠状病毒有七种,其中HCoV-229E、HCoV-OC43、HCoV-NL63、HCoV-HKU1四种只造成轻度或中度的感冒症状。

[0003] COVID-19是由严重急性呼吸综合征冠状病毒新型冠状病毒(世界卫生组织定名为SARS-CoV-2)为冠状病毒疫情的病原体,SARS-CoV-2引起的肺炎主要以发热、乏力和干咳为主要表现,少数患者伴有鼻塞、流涕、腹泻等症状,新型冠状病毒SARS-CoV-2具有一定突变性、潜在宿主多、潜伏期长等特点,另外很多特性尚待阐明,因此,目前迫切需要尽快找到更多安全有效的抗新型冠状病毒的候选药物。

### 发明内容

[0004] 针对上述现有的技术问题,本发明提供了一类抗冠状病毒的化合物及其制备方法和应用,该类化合物通过有机合成得到一类对冠状病毒有抑制作用的化合物,尤其对阻断S蛋白与ACE2结合有显著的效果。

[0005] 第一方面,本发明提供了一类抗冠状病毒的化合物,所述化合物的结构如通式(I)所示;

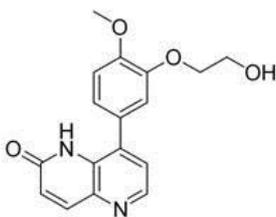


(I)

式中R<sub>1</sub>为单取代或多取代,其选自C<sub>1~12</sub>直链烷基、C<sub>1~12</sub>支链烷基、烷氧基和羟基烷氧基中的一种或多种。

[0006] 进一步地,所述化合物包括通式(I)的几何异构体或其药学上可接受的盐和/或其溶剂化物和/或其水合物。

[0007] 优选地,所述化合物为式(II);



(II)。

[0008] 第二方面,本发明提供了一种抗冠状病毒的化合物的制备方法,包括以下步骤:

#### S1、合成中间体1

称取5-溴-2-甲氧基苯酚、四丁基氟化铵、碳酸乙烯酯进行加热反应,降温至室温,加入二氯甲烷稀释,然后加入饱和氯化钠洗涤,分液、萃取,并用无水硫酸钠干燥有机相,过滤后将有机相浓缩至干得粗品,向粗品中加入乙酸乙酯和石油醚,过滤得到合成中间体1;

#### S2、合成中间体2

称取步骤S1获得的合成中间体1、频哪醇、碳酸钾、DPPF二氯化钯于二氧六环中,氮气鼓泡,在氮气保护氛围下进行加热反应,反应完成之后,降温至室温,加入乙酸乙酯和水,萃取、分液,有机层经无水硫酸钠干燥后,过滤、浓缩至干得粗品,粗品柱析层分离纯化,得到合成中间体2;

#### S3、合成中间体3

将8-溴-2-甲氧基-1,5-萘啶溶于二氧六环中,低温下滴入氢溴酸和水的混合物,回流反应,反应完成之后,依次用二氯甲烷提取、乙酸乙酯萃取提取、分液,水相用饱和碳酸钠中和,二氯甲烷提取液与乙酸乙酯提取液合并,然后用无水硫酸钠干燥,过滤,浓缩得到合成中间体3;

#### S4、合成终产物

称取合成中间体2、合成中间体3、碳酸钾、DPPF二氯化钯于二氧六环中,氮气鼓泡后,氮气保护氛围下进行反应,反应完成之后,降温至室温,加入乙酸乙酯和水,萃取、分液,有机层经无水硫酸钠干燥,浓缩至干,得粗品,粗品柱析层分离纯化,水相进行浓缩得粗品,粗品柱析层分离纯化,合并纯化后的产品为合成终产物,抗冠状病毒的化合物(II)。

[0009] 进一步地,所述步骤S1中5-溴-2-甲氧基苯酚、四丁基氟化铵、碳酸乙烯酯的投料摩尔比为1:(0.01~0.1):1。

[0010] 进一步地,所述步S1中加热温度为80~150℃。

[0011] 进一步地,所述步骤S2中的合成中间体1、频哪醇、碳酸钾、DPPF二氯化钯投料摩尔比为(1~5):(1~10):(1~10):0.1。

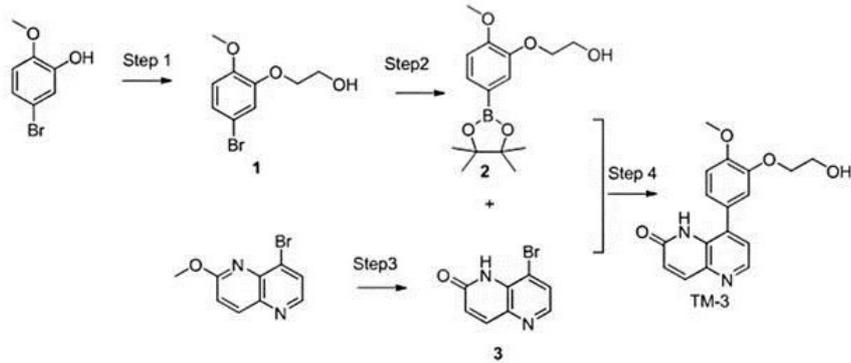
[0012] 进一步地,所述步骤S2中加热温度为60~90℃。

[0013] 进一步地,所述步骤S3中8-溴-2-甲氧基-1,5-萘啶和二氧六环的质量体积比为(100~200)mg:(0.5~2)ml。

[0014] 进一步地,所述步骤S3中低温为-10~5℃。

[0015] 进一步地,所述步骤S4中合成中间体2、合成中间体3、碳酸钾、DPPF二氯化钯投料摩尔比为(1~5):(1~5):(1~10):0.1。

[0016] 所述抗冠状病毒的化合物的合成路线为:



第三方面,本发明提供了一种抗冠状病毒的制剂,所述制剂包含结构如下所示的化合物:



式中R选自 $C_{1\sim10}$ 直链烷基、 $C_{1\sim12}$ 支链烷基、 $C_{5,6}$ 环烷基、1-萘基、苯基、取代苯基、联苯或苄基。

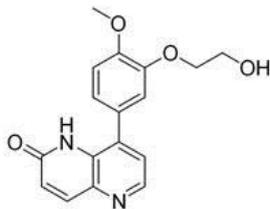
[0017] 进一步优选地,所述抗冠状病毒的制剂中包含结构式如式(I)所示的化合物;



(I)

式中 $R_1$ 为单取代或多取代, $R_1$ 选自 $C_{1\sim12}$ 直链烷基、 $C_{1\sim12}$ 支链烷基、烷氧基和羟基烷氧基中的一种或多种。

[0018] 进一步优选地,所述抗冠状病毒的制剂中包含结构为式(II)的化合物;



(II)。

[0019] 进一步地,所述制剂的剂型包括混悬剂、颗粒剂、胶囊剂、散剂、片剂、乳剂、溶液剂、滴丸剂、注射剂、气雾剂或滴剂。

[0020] 第四方面,本发明提供了所述抗冠状病毒的化合物在制备抗冠状病毒的药物中的应用。

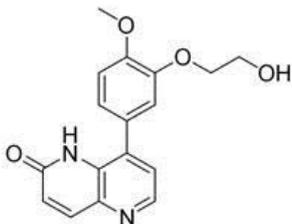
[0021] 进一步地,所述药物中包含结构如通式(I)所示的化合物;



(I)

式中 $R_1$ 为单取代或多取代, $R_1$ 选自 $C_{1\sim 12}$ 直链烷基、 $C_{1\sim 12}$ 支链烷基、烷氧基和羟基烷氧基中的一种或多种。

[0022] 进一步优选地,所述药物中包含结构为式(II)的化合物;



(II)。

[0023] 进一步地,所述冠状病毒选自2019-nCoV、HCoV-229E、HCoV-OC43、SARS-CoV和MERS-CoV中的至少一种。

[0024] 进一步地,所述药物包括但不限于对发热、咳嗽和咽痛的单纯性感染、肺炎、急性呼吸道感染、严重急性呼吸道感染(SARI)、低氧性呼吸衰竭或急性呼吸窘迫综合征、脓毒症和脓毒性休克的抑制。

[0025] 进一步地,所述药物的给药途径为口服、注射或呼吸道吸入。

[0026] 与现有技术相比,本发明的有益效果如下:

(1) 本发明制备了一类新型的抗冠状病毒的化合物,通过开发出新的合成路线得到,该化合物的纯度可达95%以上,收率为27.7%。

[0027] (2) 本发明制备的一类新型的抗冠状病毒的化合物对阻断S蛋白与ACE2结合有显著的效果,其阻断S蛋白与ACE2结合的 $EC_{50}$ 为63.73 $\mu$ M,相比单宁酸、9-甲氧基铁尿米酮的效果显著提高。

[0028] (3) 本发明的一类新型的抗冠状病毒的化合物在浓度为6.25  $\mu$ M 就可以显著阻断新冠假病毒对细胞的感染,远低于其 $CC_{50}$ 的443.33 $\mu$ M;

(4) 本发明提供的一类新型的抗冠状病毒的化合物对2019-nCoV、HCoV-229E、HCoV-OC43、SARS-CoV和MERS-CoV中的至少一种的冠状病毒有显著的抑制效果。

## 附图说明

[0029] 图1为本发明抗冠状病毒的化合物的结构通式,式中 $R_1$ 选自 $C_{1\sim 12}$ 直链烷基、 $C_{1\sim 12}$ 支链烷基、烷氧基、羟基烷氧基。

[0030] 图2为本发明抗冠状病毒的化合物的一种具体结构式。

[0031] 图3为本发明实施例1制备的合成中间体1的 $^1H$  NMR核磁图谱。

[0032] 图4为本发明实施例1制备的合成中间体2的 $^1H$  NMR核磁图谱。

[0033] 图5为本发明实施例1制备的合成中间体3的 $^1H$  NMR核磁图谱。

[0034] 图6为本发明实施例1制备的合成终产物的 $^1H$  NMR核磁图谱。

[0035] 图7为本发明实施例1制备的合成终产物的液质LC-MS图谱。

[0036] 图8为本发明合成终产物TS-984-4和TS-984体外阻断S蛋白与ACE2结合的对比实验效果。

[0037] 图9为体外MTT测定本发明合成终产物TS-984-4对H299 ACE2细胞生长的影响。

[0038] 图10为体外MTT测定本发明合成终产物TS-984-4对293TACE2细胞生长的影响。

[0039] 图11为本发明合成终产物TS-984-4阻断SARS-COV-2假病毒进入H299ACE2细胞的水平验证结果。

[0040] 图12为本发明合成终产物TS-984-4阻断SARS-COV-2假病毒进入293T ACE2细胞的水平验证结果。

## 具体实施方式

[0041] 本发明下列实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件,或按照制造厂商所建议的条件。实施例中用到的各种常用化学试剂,均为市售产品。

[0042] 除非另有定义,本发明所使用的所有的技术和科学术语与属于本发明的技术领域的人员通常理解的含义相同。本发明的说明书中所使用的术语只是为了描述具体的实施例的目的,不用于限制本发明。

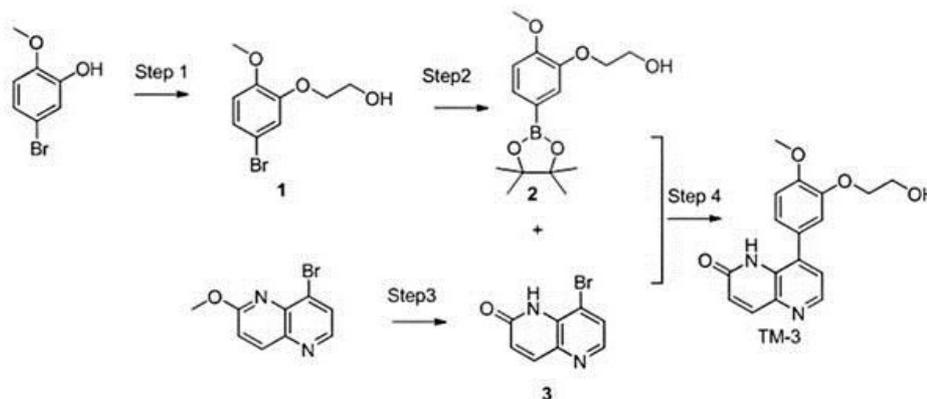
[0043] 本发明的术语“包括”和“具有”以及它们任何变形,意图在于覆盖不排他的包含。例如包含了一系列步骤的过程、方法、装置、产品或设备没有限定于已列出的步骤或模块,而是可选地还包括没有列出的步骤,或可选地还包括对于这些过程、方法、产品或设备固有的其它步骤。

[0044] 为使本发明的目的、技术方案和优点更加清楚明了,下面结合具体实施方式,对本发明进一步详细说明。应该理解,这些描述只是示例性的,而非非要限制本发明的范围。此外,在以下说明中,省略了对公知结构和技术的描述,以避免不必要地混淆本发明的概念。

[0045] 以下实施例对本发明做进一步的描述,但该实施例并非用于限制本发明的保护范围。

[0046] 实施例1抗冠状病毒的化合物的制备

抗冠状病毒的化合物合成反应路线如下:



具体制备步骤为:

S1、合成中间体1

称取5-溴-2-甲氧基苯酚(10 mmol)、四丁基氟化铵(63mg,0.241mmol)、碳酸乙烯

酯(10 mmol)在150℃下反应16h,降温至室温,加入二氯甲烷稀释,然后加入饱和氯化钠洗涤,分液、萃取,并用无水硫酸钠干燥有机相,过滤后将有机相浓缩至干得粗品,向粗品中加入乙酸乙酯和石油醚,过滤得到1.96g合成中间体1,核磁图谱见附图3;

#### S2、合成中间体2

称取步骤S1获得的合成中间体1(900 mg, 3.6452mmol)、频哪醇(1.2 g, 10.155mmol)、碳酸钾(1.4 g, 10.130mmol)、DPPF二氯化钯(263mg, 0.3624mmol)于二氧六环(10ml)中,氮气鼓泡,在氮气保护氛围下,80℃反应16 h,反应完成之后,降温至室温,加入乙酸乙酯和水,萃取、分液,有机层经无水硫酸钠干燥后,过滤、浓缩至干得粗品,粗品柱析层分离纯化(填料采用200-300目硅胶,用石油醚:乙酸乙酯=2:1(v/v)进行洗脱),得到560 mg合成中间体2,核磁图谱见附图4;

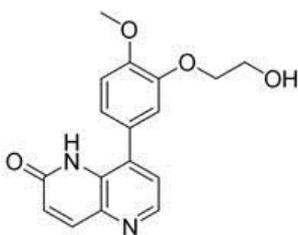
#### S3、合成中间体3

将8-溴-2-甲氧基-1,5-萘啶(740mg)溶于二氧六环(5ml)中,0℃下滴入5ml氢溴酸和水的混合物(3ml HBr和2ml H<sub>2</sub>O),回流反应1.5 h,反应完成之后,依次用二氯甲烷提取、乙酸乙酯萃取提取、分液,水相用饱和碳酸钠中和,慢加,二氯甲烷提取液与乙酸乙酯提取液合并,然后用无水硫酸钠干燥,过滤,浓缩得到560 mg合成中间体3,核磁图谱见附图5;

#### S4、合成终产物

称取合成中间体2(600 mg, 2.028mmol)、合成中间体3(0.9 g, 4.002mmol)、碳酸钾(1 g, 7.235mmol)、DPPF二氯化钯(146mg, 0.201mmol)于二氧六环(10ml)中,氮气鼓泡后,氮气保护氛围下,在80℃反应16 h,反应完成之后,降温至室温,加入乙酸乙酯和水,萃取、分液,有机层经无水硫酸钠干燥,浓缩至干,得粗品,粗品柱析层分离纯化(填料采用200-300目硅胶,用石油醚:乙酸乙酯=2:1(v/v)进行洗脱),水相进行浓缩得粗品,粗品柱析层分离纯化(填料采用200-300目硅胶,用石油醚:乙酸乙酯=2:1(v/v)进行洗脱),合并纯化后的产品为合成终产物,即得到220mg抗冠状病毒的化合物(II),命名为8-(3-(2-羟基乙氧基)-4-甲氧基苯基)-1,5-萘啶-2(1H)-酮,其核磁图谱见附图6,质谱图见附图7。

[0047]



(II)

合成化合物1的核磁鉴定结果如图3所示,<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.07 (dd, *J*= 8.5, 2.3 Hz, 1H), 7.03 (d, *J*= 2.3 Hz, 1H), 6.75 (d, *J*= 8.5 Hz, 1H), 4.15 - 4.01 (m, 2H), 3.94 (q, *J*= 5.3 Hz, 2H), 2.64 (t, *J*= 5.7 Hz, 1H)。

[0048] 合成化合物2的核磁鉴定结果如图4所示,<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.07 (d, *J*= 8.6 Hz, 1H), 7.04 (s, 1H), 6.75 (d, *J*= 8.6 Hz, 2H), 4.10 (t, *J*= 4.5 Hz, 4H), 3.93 (s, 3H), 3.84 (s, 6H), 1.24 (s, 20H)。

[0049] 合成化合物3的核磁鉴定结果如图5所示,<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 8.35 (d, *J*= 5.0 Hz, 1H), 7.98 (d, *J*= 9.7 Hz, 1H), 7.91 (d, *J*= 5.0 Hz, 1H), 6.88 (d, *J*= 9.2 Hz, 1H)。

[0050] 合成终产物(8-(3-(2-羟基乙氧基)-4-甲氧基苯基)-1,5-萘啶-2(1H)-酮)的核磁鉴定结果如图6所示, $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, Methanol- $d_4$ )  $\delta$  8.55 (d,  $J= 4.7$  Hz, 0H), 8.09 (d,  $J= 9.8$  Hz, 0H), 7.49 (d,  $J= 4.8$  Hz, 0H), 7.16 (dd,  $J= 15.7, 7.9$  Hz, 1H), 6.89 (d,  $J= 9.8$  Hz, 0H), 4.17 - 4.11 (m, 1H), 3.95 (s, 1H), 3.90 (t,  $J= 4.7$  Hz, 1H)。

[0051] 合成终产物(8-(3-(2-羟基乙氧基)-4-甲氧基苯基)-1,5-萘啶-2(1H)-酮)的液质高分辨分析结果如图7所示,保留时间为3.5min,LC-MS (ESI)  $m/z = 313.1202[M + 1]^+$ 。

[0052] 合成终产物(8-(3-(2-羟基乙氧基)-4-甲氧基苯基)-1,5-萘啶-2(1H)-酮)的高效液相色谱分析结果如图8所示,检测波长为210nm,具体出峰信息见表1;

表1:

| 峰# | 保留时间  | 面积       | 高度      | 面积%     | 高度%     |
|----|-------|----------|---------|---------|---------|
| 1  | 3.802 | 108311   | 10390   | 0.384   | 0.321   |
| 2  | 4.175 | 26765799 | 3081587 | 95.010  | 95.126  |
| 3  | 4.558 | 332501   | 46445   | 1.180   | 1.434   |
| 4  | 4.933 | 267815   | 36723   | 0.951   | 1.134   |
| 5  | 6.903 | 697054   | 64345   | 2.474   | 1.986   |
| 总计 |       | 28171481 | 3239491 | 100.000 | 100.000 |

#### 实施例2TS-984-4阻断S蛋白与ACE2结合的体外水平测试

实验原理:采用均相时间荧光分辨方法在体外筛选和验证能够阻断S蛋白与ACE2结合的化合物,其方法原理为将带有荧光基团标记的抗体分别于ACE2和S蛋白结合,当340 nm激发光照射时,会产生620 nm的第一发射光,如果ACE2与S蛋白结合,两个荧光基团空间距离较近,还会产生665 nm的发射光,当有小分子化合物能够阻断ACE2和S蛋白结合时,只有620 nm一种激发光,通过荧光检测即可筛选出有效的阻断ACE2和S蛋白结合的小分子化合物。

[0053] 由于SARS-CoV-2病毒感染人类主要是通过Spike protein的S1亚基RBD区域与ACE2受体结合,因此,选择了Fc标记的ACE-2和His标记的S-RBD,并分别用检测试剂anti-human IgG-XL665和anti-6his-tbgold进行标记,构建ACE2和S-RBD结合复合体模型。

[0054] 实验药物:合成终产物,8-(3-(2-羟基乙氧基)-4-甲氧基苯基)-1,5-萘啶-2(1H)-酮(记为TS-984-4);

实验方法:在384孔板中加入2 $\mu\text{L}$ 配置好的不同浓度的化合物,待测化合物组加入化合物为TS-984-4、化合物为TS-984组(9-甲氧基铁屎米酮)、阳性对照组加入的化合物为单宁酸(Tannic),阴性对照组加入的化合物为含BSA(0.1%)的PBS缓冲液;另外,四组均加入稀释S-RBD-His蛋白(购自novoprotein),ACE2-Fc蛋白(购自novoprotein)到相应浓度,加入响应体积溶液后37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育1 h后;加入相应体积的标签抗体Anti 6His-Tbcrptate Gold与Anti HumanIgG-d2(购自CISBIO),配制体系按表2所示,避光反应30 min后进行检测;

表2:

| 组分                                 | 阴性对照组           | 阳性对照组           | 待测化合物组          | TS-984 组        |
|------------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| S-RBD-His (0.88 $\mu\text{g/mL}$ ) | 5 $\mu\text{L}$ | 5 $\mu\text{L}$ | 5 $\mu\text{L}$ | 5 $\mu\text{L}$ |
| ACE2-Fc (1.15 $\mu\text{g/mL}$ )   | 5 $\mu\text{L}$ | 5 $\mu\text{L}$ | 5 $\mu\text{L}$ | 5 $\mu\text{L}$ |
| 含 BSA (0.1%) 的 PBS 缓冲液             | 2 $\mu\text{L}$ | —               | —               | —               |
| 单宁酸 (Tannic)                       | —               | 2 $\mu\text{L}$ | —               | —               |
| TS-984-4                           | —               | —               | 2 $\mu\text{L}$ | —               |
| TS-984                             | —               | —               | —               | 2 $\mu\text{L}$ |
| Anti<br>6His-TcryptateGold         | 5 $\mu\text{L}$ | 5 $\mu\text{L}$ | 5 $\mu\text{L}$ | 5 $\mu\text{L}$ |
| Anti HumanIgG-d2                   | 5 $\mu\text{L}$ | 5 $\mu\text{L}$ | 5 $\mu\text{L}$ | 5 $\mu\text{L}$ |

将TS-984-4按照以上方法学进行验证,设置化合物梯度浓度分别为:400  $\mu\text{M}$ ,200  $\mu\text{M}$ ,100  $\mu\text{M}$ ,50  $\mu\text{M}$ ,25  $\mu\text{M}$ ,12.5  $\mu\text{M}$ ,6.25  $\mu\text{M}$ ,3.125  $\mu\text{M}$ ,1.563  $\mu\text{M}$ ,0.7815  $\mu\text{M}$ ,0.3908  $\mu\text{M}$ ,0  $\mu\text{M}$ 。

[0055] 按上述实验方法得到的结果见附图8,由图可知,待测化合物组TS-984-4的 $\text{EC}_{50}$ 为63.73 $\mu\text{M}$ ,已知化合物组TS-984的 $\text{EC}_{50}$ 为269.5 $\mu\text{M}$ ,由附图8可见,新合成化合物TS-984-4在体外生化水平对S蛋白和ACE2的阻断能力较TS-984 强。

[0056] 实施例3MTT测定化合物对细胞生长的影响

(1)实验对象:293T ACE2过表达细胞株、H299 ACE2过表达细胞株。

[0057] (2)实验药物:TS-984-4、化合物溶剂DMSO。

[0058] (3)实验方法:第一天下午铺板:收集对数期细胞,调整细胞悬液浓度,每孔加入90  $\mu\text{L}$ ,293T ACE2和H299 ACE2分别铺 $5 \times 10^3$ 和 $1 \times 10^4$ 个细胞每孔;第二天早上加药:每孔加入10  $\mu\text{L}$ 浓度梯度的药物,每个药物浓度设置3个复孔,置于5%  $\text{CO}_2$ ,37 $^\circ\text{C}$ 培养箱孵育;加药24h后收板:先倒置显微镜下肉眼观察,接着每孔加入20  $\mu\text{L}$ 的MTT溶液(5  $\text{mg/mL}$ ,即0.5%MTT),孵育4 h后终止反应,小心吸去孔内培养液,每孔加入100 $\mu\text{L}$ 二甲基亚砷,置摇床上低速振荡10 min,使结晶物充分溶解;OD值检测:在酶标仪波长490 nm处检测各孔的吸光值,计算细胞相对存活率或药物抑制率。

[0059] 本实验设不含细胞的培养基作为空白对照组,每孔加入和化合物相同稀释比的DMSO溶液作为阴性对照组,以及含化合物TS-984-4的实验组。

[0060] (4)计算:相对存活率=(化合物实验组 OD值-空白对照组OD值)/(阴性对照组 OD值-空白对照组 OD值) $\times 100\%$ 。

[0061] 按上述实验方法和计算方法获得的结果见附图9和图10,由图可知,TS-984-4对H1299 ACE2 细胞株的 $\text{CC}_{50}$ 为443.33 $\mu\text{M}$ ,对293T ACE2 细胞株的 $\text{CC}_{50}$ 为246.9 $\mu\text{M}$ 。

[0062] 实施例4TS984-4阻断SARS-COV-2假病毒进入细胞的试验

(1)实验对象:293T ACE2过表达细胞株、H299 ACE2过表达细胞株。

[0063] (2)实验材料:SARS-CoV-2-S(D614G)蛋白假慢病毒( $>10^7$  TU/mL,5 $\times 200$   $\mu\text{L}$ ,HBSS缓冲液,病毒内包裹绿色荧光蛋白GFP及荧光素酶Luciferase的RNA序列),Polybrene(5  $\text{mg/mL}$ ,200  $\mu\text{L}$ ),以上两种材料均购于博奥龙生物。

[0064] (3)实验药物:TS-984-4

(4)实验方法:

a. SARS-COV-2假病毒转导前1天(第0天),将细胞接种到新的无菌黑色不透明96孔板中,293T ACE2和H299 ACE2过表达细胞每孔分别接种10000和6000个细胞,100  $\mu\text{L}$ 完全培养基(DMEM+10% FBS)每孔,次日感染时细胞密度40%左右为佳,放置于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 的二氧化碳培养箱中培养过夜;

b. SARS-COV-2假病毒转导当天(第1天),首先在冰上融解冻结的病毒液,轻柔吹打几下,混匀融解后的病毒颗粒,再取200 $\mu\text{l}$ 的病毒液加至1800 $\mu\text{l}$ 含有7.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的Polybrene的新鲜的完培中,使病毒液的体积比为10%,轻柔混匀,然后均分成以下10组(对照组除外);

c. 实验共设置对照组(Control),病毒组(Pseudovirus),病毒组(Pseudovirus+0.5%DMSO),实验1组【病毒+药物TS-984-4(工作浓度设置依次为100  $\mu\text{M}$ 、50  $\mu\text{M}$ 、25  $\mu\text{M}$ 、12.5  $\mu\text{M}$ 、6.25  $\mu\text{M}$ 、3.125  $\mu\text{M}$ 、1.563  $\mu\text{M}$ 、0.7815  $\mu\text{M}$ ),对半稀释法配制】,每组配制略大于3个复孔的量,配好后冰上孵育30 min,然后吸出原有培养基,向细胞中加入完全培养基,得到上述含病毒颗粒的完全培养基(最终使得对照组每孔加入60  $\mu\text{L}$ 新鲜的培养基,各病毒组和实验组分别加入将上述含病毒颗粒的培养基60  $\mu\text{L}$ ),最后轻柔地摇动培养板以使病毒液能覆盖每一处细胞,然后放置于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 的二氧化碳培养箱中培养过夜;

d. SARS-COV-2假病毒转导第2天,病毒转染24 h后换液,换成含1%双抗的完全培养基,每孔100  $\mu\text{L}$ 。

[0065] e. ARS-COV-2假病毒转导第4天,即病毒转染72h后吸掉培养基,每孔加入30  $\mu\text{L}$ 裂解液,震荡10 min,然后避光加入20  $\mu\text{L}$ 荧光素酶反应底物,再酶标仪检测荧光素酶活性,最后计算感染效率和药物抑制率。

[0066] 根据上述实验方法得到的结果见图11和图12,其中TS-984-4 在6.25  $\mu\text{M}$  就可以显著阻断新冠假病毒对细胞的感染,远低于其CC50443.33  $\mu\text{M}$ 。

[0067] 需要说明的是,本说明书中描述的具体特征、结构、材料或者特点可以进行任意的组合,为使描述简洁,未对上述实施例中的各个技术特征所有可能的组合都进行描述,在不相互矛盾的情况下,本领域的技术人员可以将本说明书中描述的不同实施例以及不同实施例的特征进行结合和组合。

[0068] 以上所述实施例仅表达了本发明的几种实施方式,其描述较为具体和详细,但并不能因此而理解为对发明专利范围的限制。应当指出的是,对于本领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明构思的前提下,还可以做出若干变形和改进,这些都属于本发明的保护范围。因此,本发明的保护范围应以所附权利要求为准。

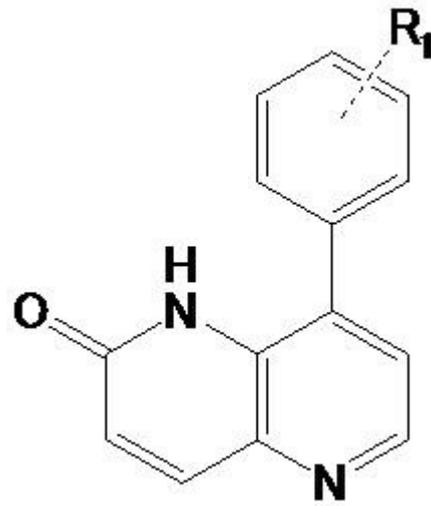


图1

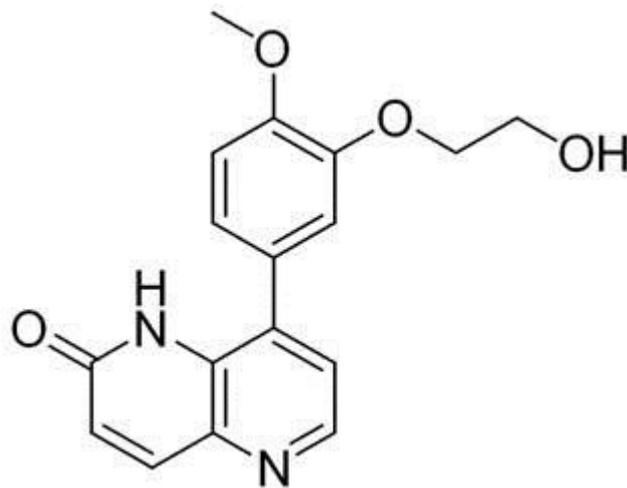


图2



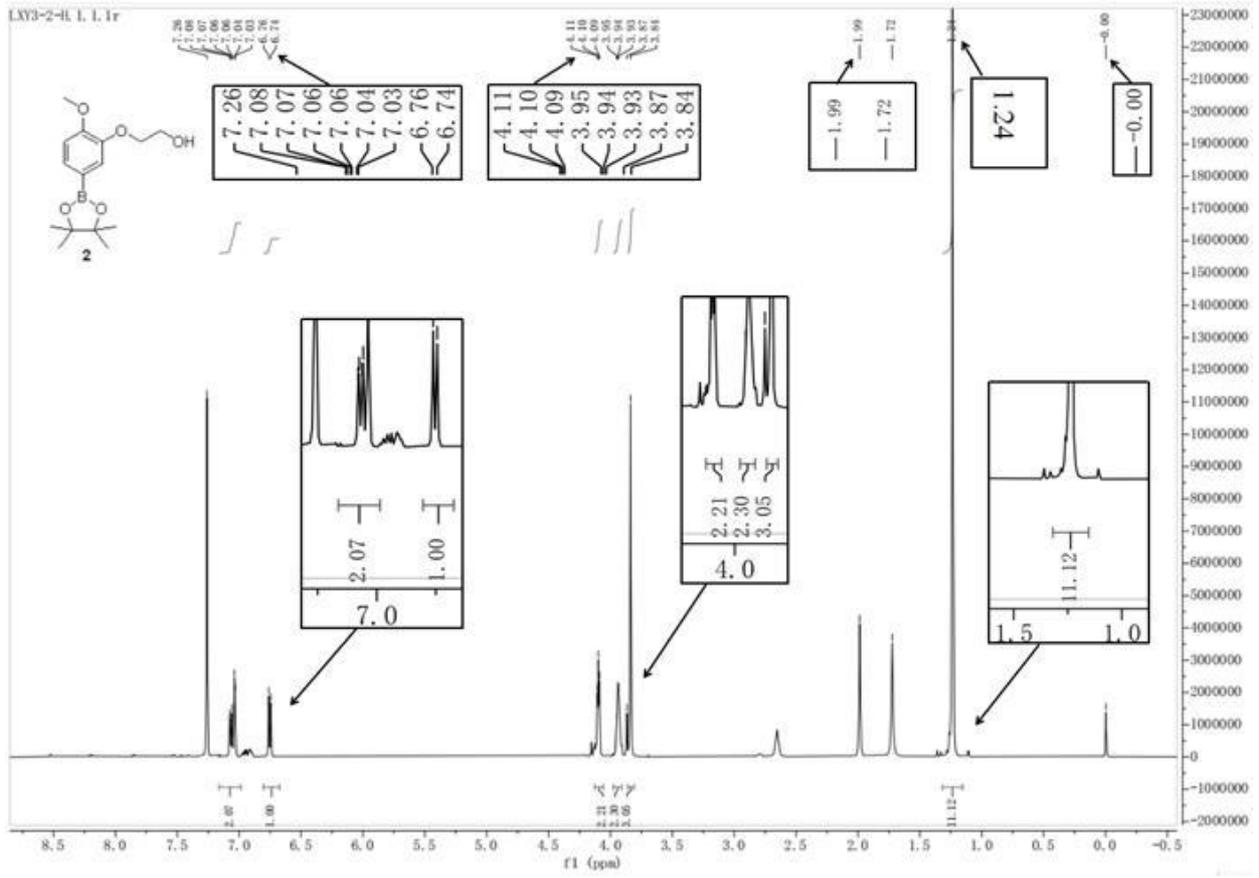


图4

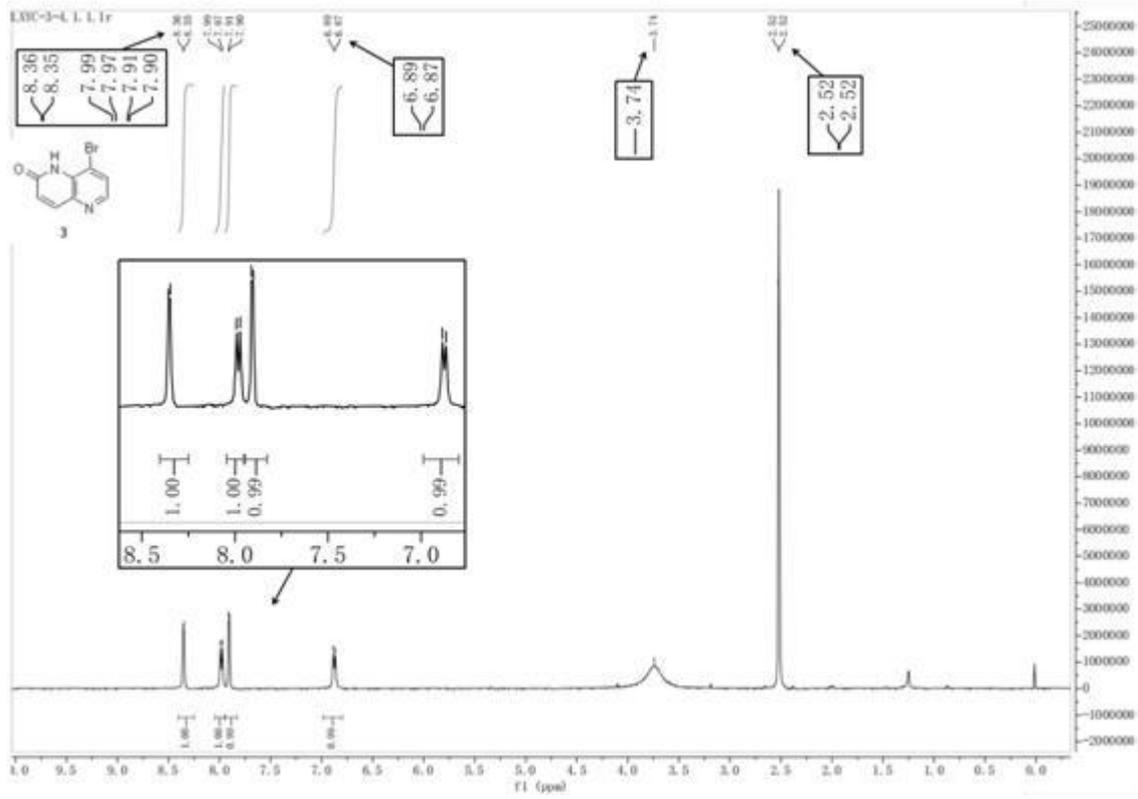


图5



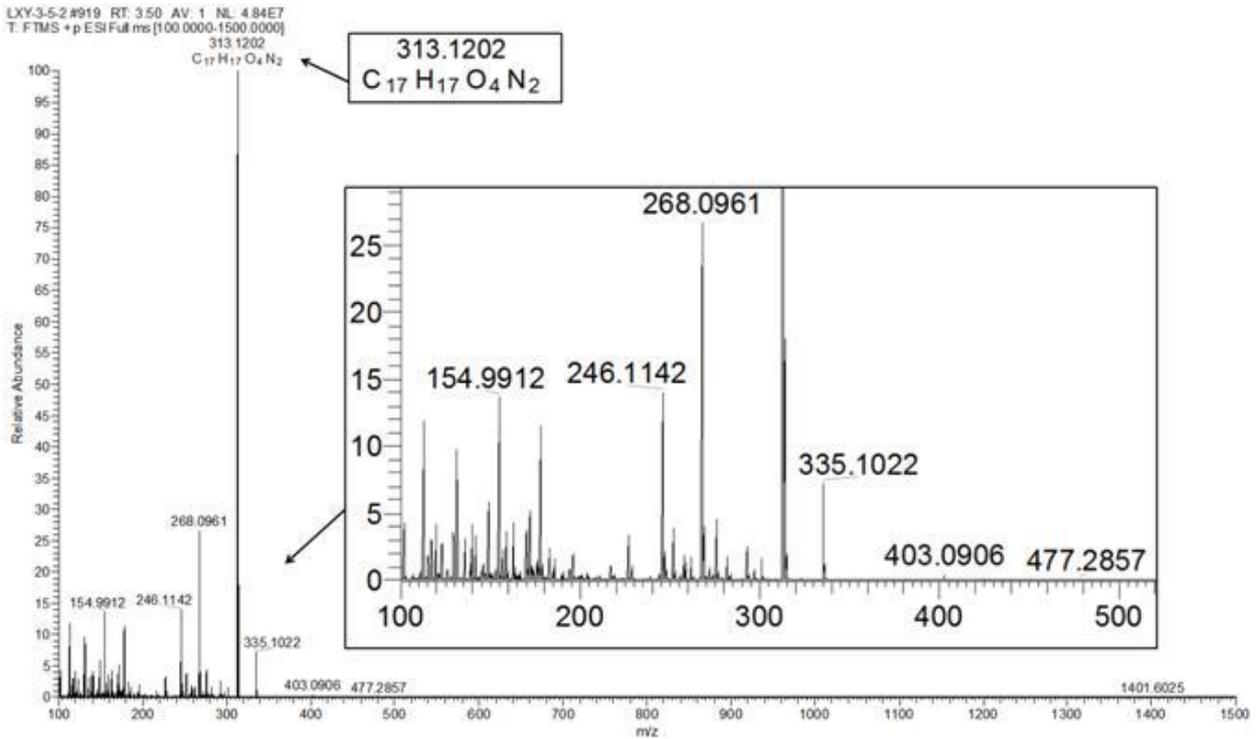


图7

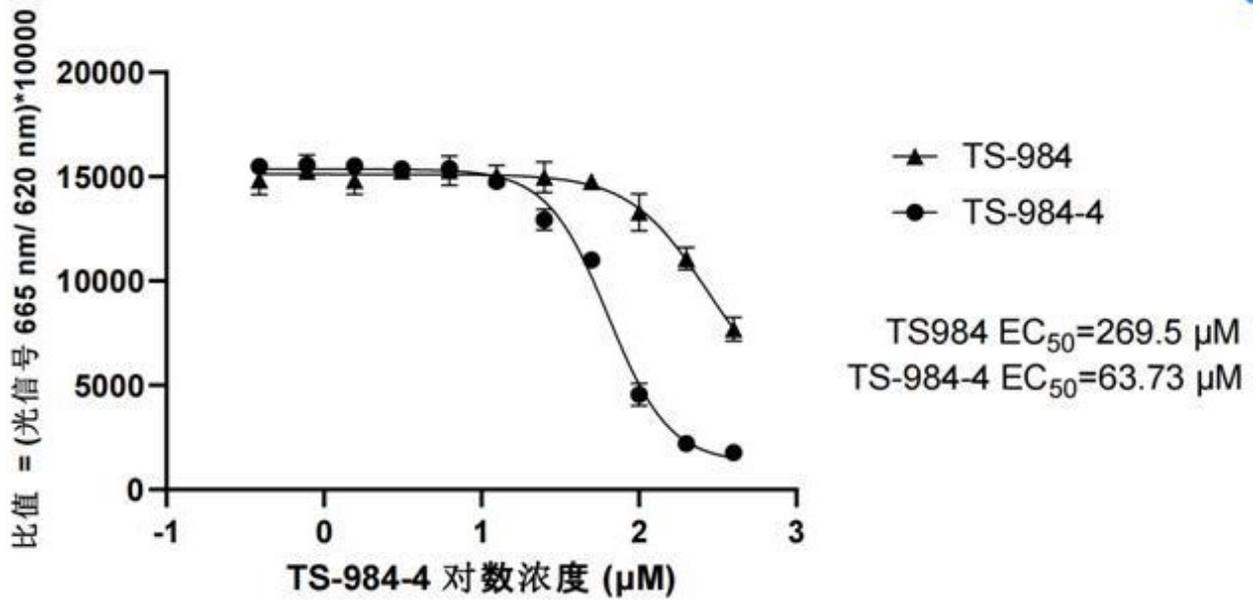


图8

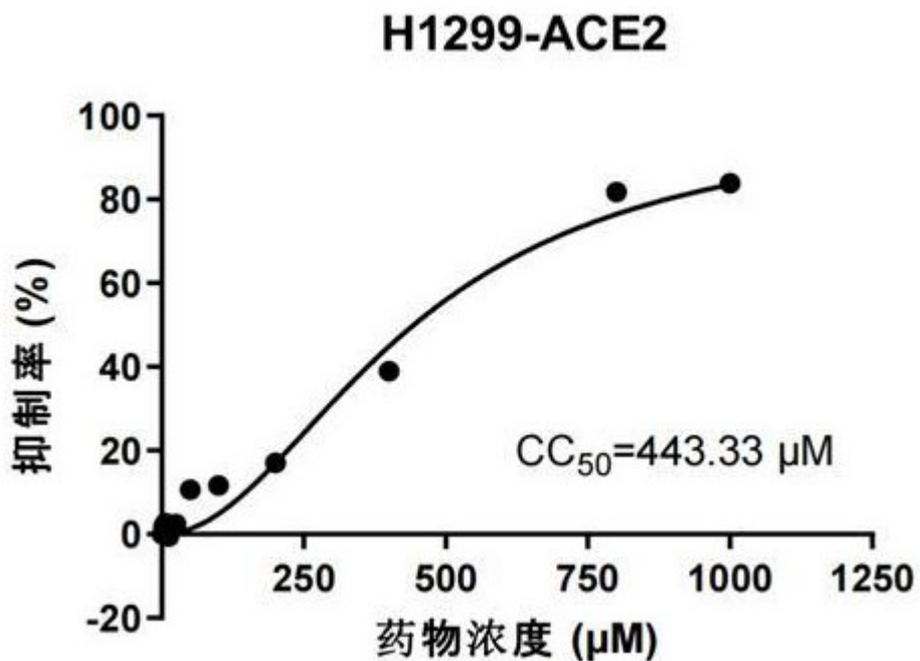


图9

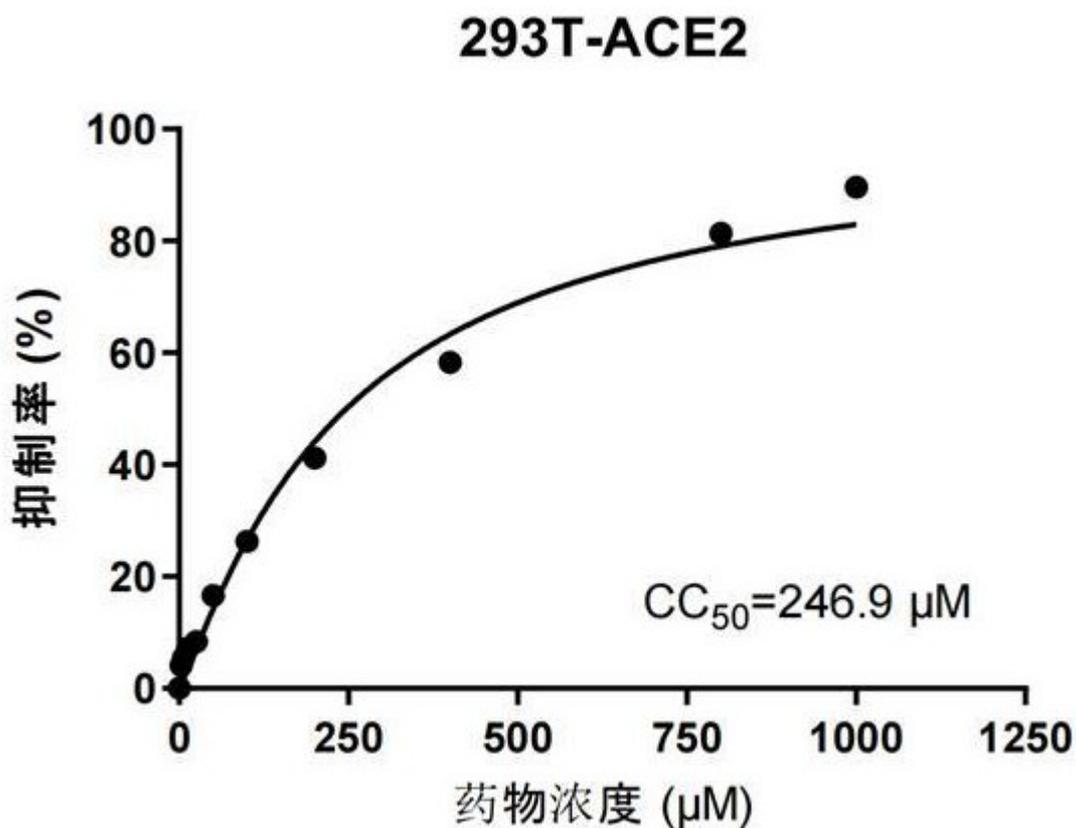


图10

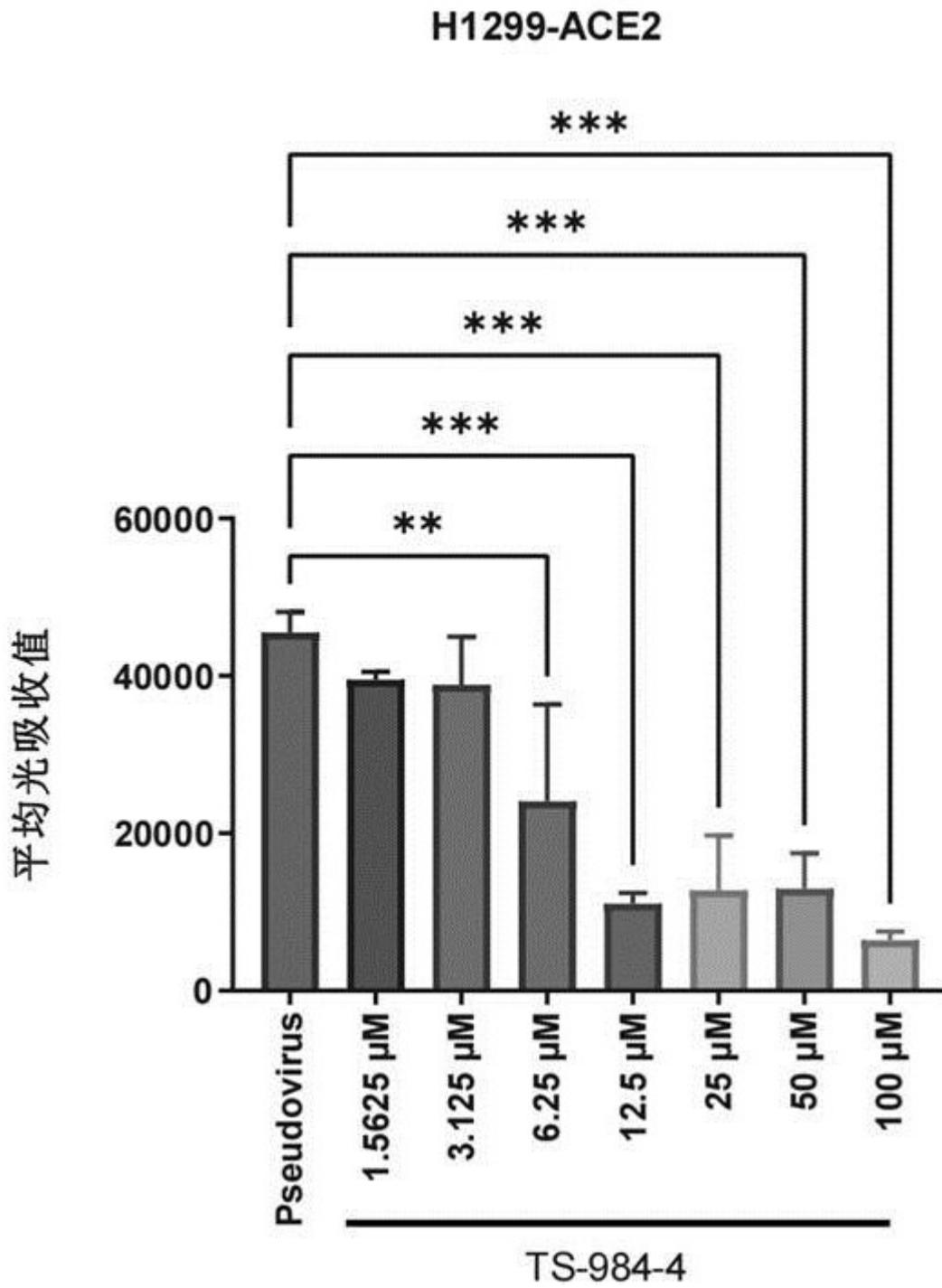


图11

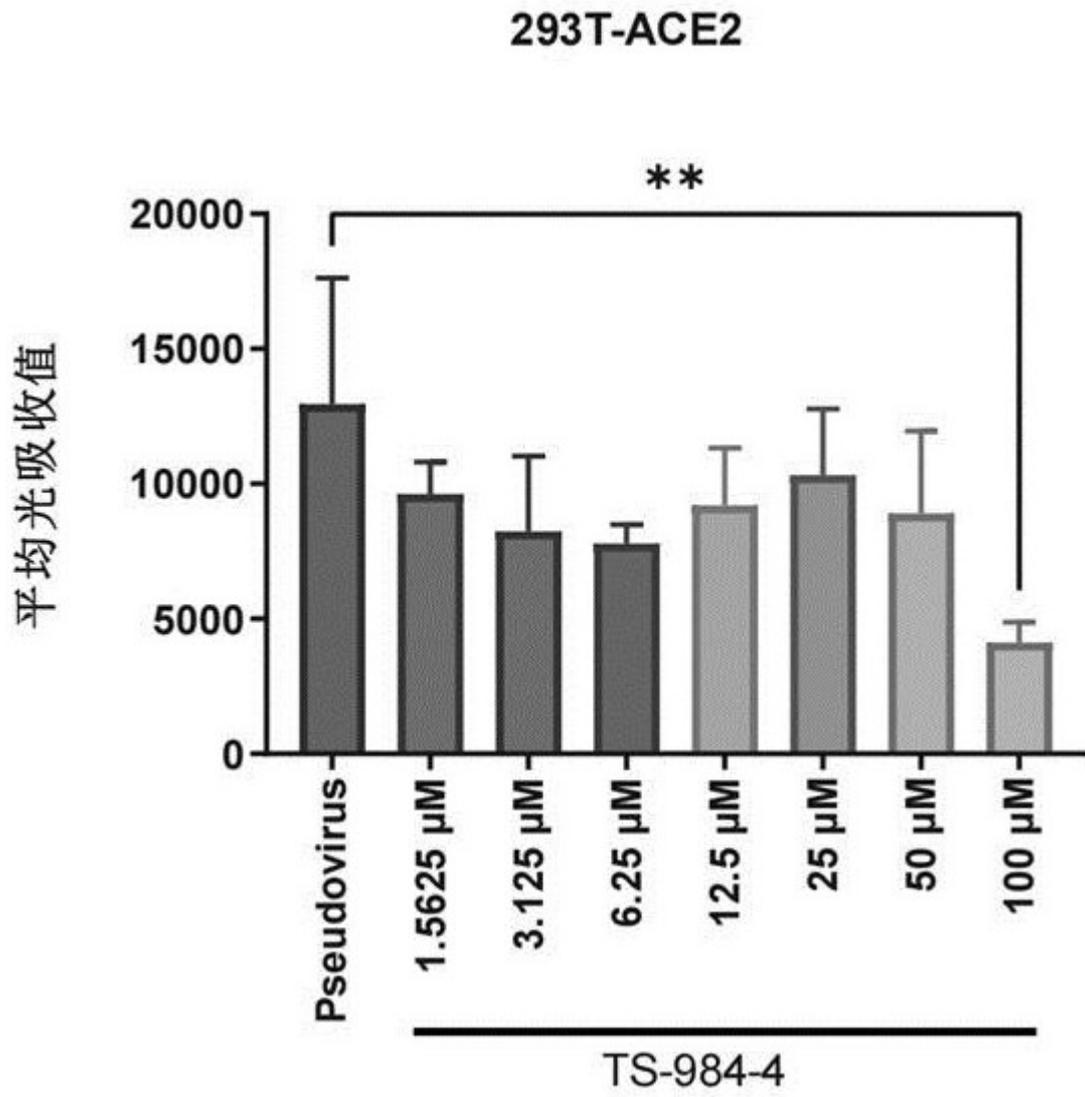


图12