

# 石蒜碱类衍生物的合成与抗 SARS-CoV-2 的活性和作用机制研究

梅钰恒, 李佳玉, 宋丹青, 彭宗根, 李迎红\*

(中国医学科学院、北京协和医学院医药生物技术研究所, 北京 100050)

**摘要:** 本研究设计合成了 5 种不同结构类型共 18 个石蒜碱衍生物, 在感染 HCoV-OC43 的 H460 细胞模型上考察了其抗病毒活性。构效关系结果表明在石蒜碱的 6N 原子上引入适当的取代基有利于活性的提高。其中, 化合物 **6a** 表现出较好的活性, 半数有效浓度 ( $EC_{50}$ ) 和选择指数 (SI) 值分别为  $2.36 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  和 16.52。表面等离子共振实验显示 **6a** 可能靶向 SARS-CoV-2 的 RNA 依赖的 RNA 聚合酶 (RdRp) 的非结构蛋白 12 (NSP12) 亚基, 解离常数 ( $K_D$ ) 值为  $1.36 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。分子对接结果提示 **6a** 可能作用于 NSP12 的类囊病毒 RdRp 相关核苷酸转移酶 (NiRAN) 催化中心, 与瑞德西韦等拟核苷类药物的作用机制不同。该研究为将石蒜碱类衍生物发展成为一类全新的抗 SARS-CoV-2 小分子抑制剂提供了科学数据。

**关键词:** 石蒜碱类衍生物; 新冠病毒; RNA 依赖的 RNA 聚合酶; 类囊病毒 RdRp 相关核苷酸转移酶结构域; 抗病毒

中图分类号: R914

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870(2024)02-0395-09

## Synthesis and anti-SARS-CoV-2 activity and mechanism research of lycorine derivatives

MEI Yu-heng, LI Jia-yu, SONG Dan-qing, PENG Zong-gen, LI Ying-hong\*

(Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

**Abstract:** We designed and synthesized eighteen lycorine derivatives with five different structural types, and evaluated their antiviral activities on a HCoV-OC43-infected H460 cell model. Structure-activity relationships suggested that the introduction of appropriate substituents on the 6N atom of lycorine was beneficial to activity. Compound **6a** gave a good activity with the half effective concentration ( $EC_{50}$ ) and selectivity index (SI) values of  $2.36 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  and 16.52, respectively. Surface plasmon resonance (SPR) result indicated that **6a** might target the non-structural protein 12 (NSP12) subunit in RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) of SARS-CoV-2 with the dissociation constant ( $K_D$ ) value of  $1.36 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ . Molecular docking indicated that **6a** might act on nidovirus RdRp-associated nucleotidyltransferase (NiRAN) catalytic center of NSP12, distinct from the mechanism of nucleoside-like drugs such as remdesivir. This study provides scientific data for the development of lycorine derivatives into a new class of anti-SARS-CoV-2 small molecule inhibitors.

**Key words:** lycorine derivative; SARS-CoV-2; RNA-dependent RNA polymerase (RdRp); nidovirus RdRp-associated nucleotidyltransferase (NiRAN); antiviral

收稿日期: 2023-09-28; 修回日期: 2023-11-07.

基金项目: 中国医学科学院医学与健康科技创新工程 (2021-I2M-1-048);  
国家自然科学基金资助项目 (82373742).

\*通讯作者 Tel: 86-10-63165284, E-mail: liyinghong@imb.pumc.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2023-1121

新型冠状病毒 (SARS-CoV-2) 是一种  $\beta$  属冠状病毒, 自 2019 年被首次发现以来迅速席卷全球, 对全球卫生体系造成了严重冲击, 给人类社会带来了巨大恐慌和经济负担。截至目前, 由 SARS-CoV-2 引起的新冠病毒肺炎 (COVID-19) 已在全球范围内造成近

700万例的死亡<sup>[1]</sup>。新冠病毒自发现以来持续性变异,尤其是最近出现的新型奥密克戎变异株的传染性和免疫逃逸能力不断增强,由先前感染或接种疫苗建立起的人群免疫屏障变得越发脆弱,临床治疗 COVID-19 手段的有效性也受到了限制<sup>[2-6]</sup>。RNA 依赖的 RNA 聚合酶 (RdRp) 抑制剂瑞德西韦是最早应用于临床的抗 COVID-19 药物。但是,随着瑞德西韦在临床的广泛应用,病毒 RdRp 的催化中心及周围已经进化出 D484Y 和 E802D 等多种突变,导致了瑞德西韦的耐药<sup>[7-11]</sup>。因此,研发全新的 RdRp 小分子抑制剂具有重要的意义,尤其是用于应对新型变异株以及未来随时可能出现的冠状病毒突发事件。

RdRp 是由核心蛋白 NSP12 以及辅助因子 NSP7 和 NSP8 组成的蛋白复合体 (图 1A), 负责 RNA 病毒基因组的复制和转录, 在病毒在宿主细胞中的自我复制过程中发挥着非常重要的作用。NSP12 负责新生 RNA 链的延伸, NSP7 和 NSP8 发挥引物酶和稳定 NSP12 构象的作用<sup>[12]</sup>。NSP12 蛋白结构中最重要功能区域是催化中心 (图 1A), 即瑞德西韦、莫努匹韦和 VV116 等拟核苷类抑制剂药物的主要结合位点。瑞德西韦通过共价方式嵌入至引物 RNA 链中, 引起病毒 RNA 链延伸过程的错配, 继而终止其延伸<sup>[13]</sup>。此外, 类囊病毒 RdRp 相关核苷酸转移酶 (NiRAN) (图 1A) 催化中心也是 NSP12 蛋白的主要组成部分, 主要负责鸟苷酸转移以及核苷单磷酸向病毒辅助因子蛋白 NSP7、NSP8 和 NSP9 的转运, 是鸟苷类似物 AT-527 的最主要作用位点<sup>[14]</sup>。以 NiRAN 结构域为靶点可能成为开发新型抗 SARS-CoV-2 药物的一个新方向<sup>[14]</sup>。

石蒜碱 (1, 图 1B) 是从石蒜科植物分离出的一种吡咯并菲啶类生物碱, 具有广泛的抗病毒活性, 对 SARS-CoV、SARS-CoV-2、单纯疱疹、脊髓灰质炎、寨卡、丙肝、登革热、人 71 型肠道、禽流感 H5N1 等多种病

毒均显示出较好的活性<sup>[15,16]</sup>。但是, 其抗 SARS-CoV-2 的作用机制尚不明确, 构效关系研究尚未见文献报道。

因此, 本研究以石蒜碱为先导化合物, 分别对其 A 环、2 位羟基、3 位氢键、6 位叔胺及 7 位碳进行结构改造, 共设计合成 18 个石蒜碱衍生物。以感染同属于  $\beta$  属冠状病毒 HCoV-OC43 的 H460 细胞为模型评价了其抗 SARS-CoV-2 的活性, 系统总结了其抗 SARS-CoV-2 构效关系, 并对重点化合物开展了初步机制学研究。

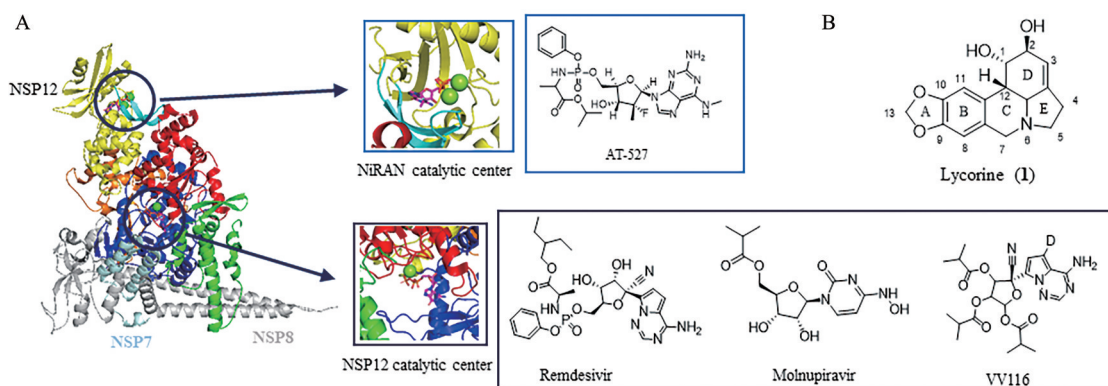
## 结果与讨论

### 1 化合物的合成

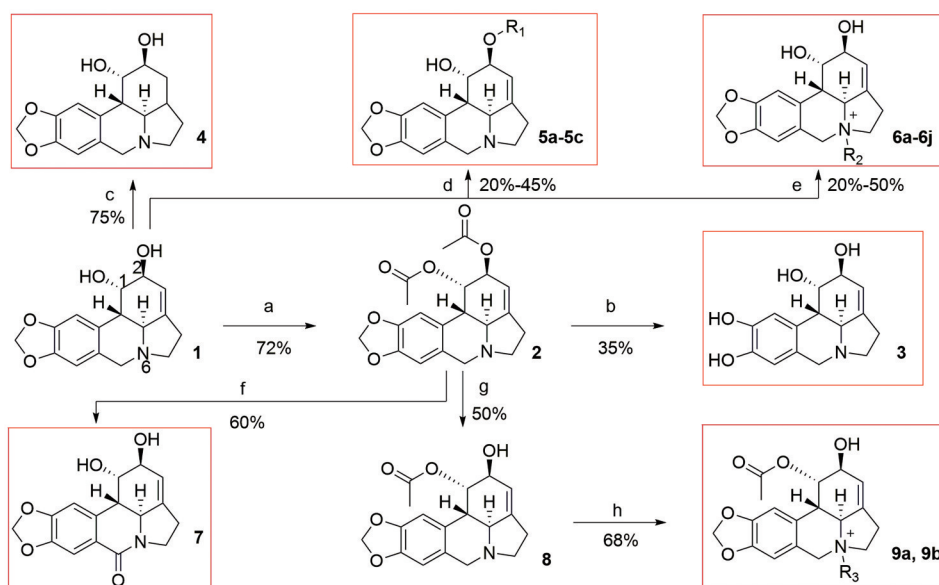
目标化合物的合成如合成路线 1 所示。以氨水处理的游离石蒜碱 (1) 为原料, 按文献报道的方法合成目标化合物 3<sup>[17]</sup>、4<sup>[18]</sup>、6a<sup>[18]</sup>、6b<sup>[18]</sup> 和 7<sup>[19]</sup>。

在强碱 (NaH) 的作用下, 卤代脂肪烃可选择性地与化合物 1 的 2-OH 发生亲核取代生成 5a~5c, 这是因为 2-OH 被强碱拔掉氢原子后会形成氧负离子, 进而通过离域作用与相邻的碳碳双键形成稳定的过渡态, 表现出相较于 1-OH 更高的反应性。在中性条件下, 化合物 1 的 6N 原子更容易被烷基化或苄基化生成相应的 6S 构型的 6N 取代石蒜碱季铵盐化合物 6c~6j。本研究采用高斯计算的方法, 在 B3LYP/6-311G(d,p) 水平, 基于时间依赖性密度泛函理论 (TDDFT) 在 0.35 eV 的半频带宽度下得到代表性化合物 6j 的理论圆二色 (ECD) 光谱, 与实验 ECD 光谱高度相似, 从而确证了该系列化合物 N 原子的绝对构型。

化合物 1 在乙酸酐和吡啶中发生酰化反应生成石蒜碱双酯 2。在酸水解的条件下, 由于 2 位碳原子毗邻的 O 原子与碳碳双键之间的离域作用, 中间体 2 会选择性地脱去 2-乙酰基, 生成中间体 8<sup>[20]</sup>。中间体 8 在乙腈中与卤代烃发生亲核取代反应, 可以较高的产率生成目



**Figure 1** (A) The 3D structures of RdRp and anti-SARS-CoV-2 drugs or drug candidates targeting NiRAN and NSP12 catalytic centers. NSP12 domains are colored as follows: NiRAN, yellow;  $\beta$ -hairpin, cyan; interface, orange; fingers, blue; palm, red; and thumb, green; NSP7 is colored as light cyan and NSP8 is colored as grey. (B) Chemical structure of lycorine (1)



**Scheme 1** Synthetic routes of all the target compounds. Reagents and conditions: (a)  $\text{Ac}_2\text{O}$ , pyridine, 50 °C, 12 h; (b)  $\text{BBr}_3$ , DCM,  $\text{N}_2$ , 0 °C, 1.5 h; MeOH, HCl, 50 °C, 6 h; (c)  $\text{H}_2$ , Pd/C, AcOH, r.t., 24 h; (d)  $\text{R}_1\text{X}$ , NaH, DMF, r.t., 20 h; (e)  $\text{R}_2\text{X}$ , DMF, 60 °C, 10 h; (f)  $\text{PhIO}$ , TBAl, MeCN/ $\text{H}_2\text{O}$  9:1, r.t., 3 h;  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , MeOH/ $\text{H}_2\text{O}$  9:1, 60 °C, 4 h; (g) MeOH, HCl, 55 °C, 1 h; (h)  $\text{R}_3\text{X}$ , MeCN, r.t., 2 h

标化合物1-乙酰-6N取代石蒜碱季铵盐**9a**和**9b**。所有全新目标化合物结构和纯度经 $^1\text{H}$  NMR、 $^{13}\text{C}$  NMR、HR-MS及HPLC分析确证。目标化合物的收率、熔点和比旋光度等理化参数及波谱数据见表1。

**Table 1** The physical properties and spectral data of the target compounds

Compd.	Yield /%	mp/°C	$[\alpha]_D^{25}$ (g·100 mL <sup>-1</sup> , MeOH)	$^1\text{H}$ NMR (600 MHz)	$^{13}\text{C}$ NMR (151 MHz)	HPLC purity	HR-ESI-MS ( <i>m/z</i> )	
							Formula Calcd. Found	
<b>5a</b>	28%	51–53	–10.00 (0.030)	( $\text{CDCl}_3$ ) $\delta$ 6.86 (s, 1H), 6.59 (s, 1H), 5.96–5.88 (m, 2H), 5.56 (s, 1H), 4.58 (s, 1H), 4.11 (d, $J$ = 14.0 Hz, 1H), 3.92–3.88 (m, 1H), 3.67–3.60 (m, 2H), 3.50 (d, $J$ = 14.0 Hz, 1H), 3.33–3.30 (m, 1H), 2.71 (s, 2H), 2.66–2.57 (m, 2H), 2.36 (q, $J$ = 8.7 Hz, 1H), 1.65–1.52 (m, 2H), 1.45–1.32 (m, 2H), 0.93 (t, $J$ = 7.4 Hz, 3H).	( $\text{CDCl}_3$ ) $\delta$ 146.7, 146.3, 143.5, 130.6, 127.7, 116.0, 107.9, 104.6, 101.0, 79.4, 69.9, 69.0, 61.0, 57.1, 53.9, 41.8, 32.2, 28.8, 19.4, 14.0.	96.9%	$[\text{M}+\text{H}]^+$ : $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{O}_4\text{N}$ 344.185 6 344.184 0	
<b>5b</b>	20%	114–116	40.91 (0.022)	( $\text{CDCl}_3$ ) $\delta$ 6.86 (s, 1H), 6.60 (s, 1H), 5.96–5.91 (m, 2H), 5.56 (s, 1H), 4.58 (s, 1H), 4.12 (d, $J$ = 14.1 Hz, 1H), 3.92 (s, 1H), 3.72–3.63 (m, 2H), 3.60–3.47 (m, 4H), 3.35–3.32 (m, 1H), 2.71 (s, 2H), 2.66–2.57 (m, 2H), 1.91–1.84 (m, 2H), 1.78–1.73 (m, 2H).	( $\text{CDCl}_3$ ) $\delta$ 146.7, 146.4, 143.7, 130.6, 127.5, 115.8, 107.9, 104.6, 101.1, 79.4, 70.2, 69.1, 61.0, 57.1, 53.9, 45.0, 41.8, 29.5, 28.8, 27.5.	95.2%	$[\text{M}+\text{H}]^+$ : $\text{C}_{20}\text{H}_{25}\text{O}_4\text{NCl}$ 378.146 7 378.145 2	
<b>5c</b>	45%	64–66	–5.56 (0.018)	( $\text{DMSO}-d_6$ ) $\delta$ 6.87 (s, 1H), 6.66 (s, 1H), 5.94 (d, $J$ = 5.3 Hz, 2H), 5.85–5.79 (m, 1H), 5.42–5.39 (m, 1H), 5.01 (dd, $J$ = 17.2, 1.9 Hz, 1H), 4.95 (dd, $J$ = 17.2, 1.9 Hz, 1H), 4.92–4.75 (m, 1H), 4.41 (s, 1H), 4.00 (d, $J$ = 14.1 Hz, 1H), 3.73–3.70 (m, 1H), 3.62 (dt, $J$ = 9.4, 6.2 Hz, 1H), 3.52 (dt, $J$ = 9.4, 6.2 Hz, 1H), 3.43–3.25 (m, 2H), 3.21–3.14 (m, 1H), 2.59 (d, $J$ = 10.4 Hz, 1H), 2.47–2.39 (m, 1H), 2.36 (d, $J$ = 10.4 Hz, 1H), 2.20 (q, $J$ = 8.6 Hz, 1H), 2.07 (q, $J$ = 7.4 Hz, 2H), 1.64–1.53 (m, 2H).	( $\text{DMSO}-d_6$ ) $\delta$ 146.2, 145.7, 143.6, 138.9, 130.1, 129.6, 116.3, 115.4, 107.5, 105.6, 101.1, 80.3, 68.8, 66.9, 61.1, 57.0, 53.6, 41.3, 30.3, 29.2, 28.6.	98.8%	$[\text{M}]^+$ : $\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{O}_4\text{N}$ 356.185 6 356.184 1	
<b>6c</b>	30%	102–104	64.71 (0.017)	( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) $\delta$ 7.03–6.98 (m, 2H), 5.99 (d, $J$ = 1.2 Hz, 1H), 5.97 (d, $J$ = 1.2 Hz, 1H), 5.74–5.70 (m, 1H), 5.68–5.56 (m, 1H), 5.14 (dt, $J$ = 10.1, 1.4 Hz, 1H), 5.07 (dt, $J$ = 10.1, 1.4 Hz, 1H), 4.77–4.75 (m, 1H), 4.55–4.52 (m, 1H), 4.26–4.15 (m, 3H), 3.92–3.83 (m, 1H), 3.56–3.51 (m, 1H), 3.38–3.33 (m, 1H), 3.08 (d, $J$ = 2.4 Hz, 1H), 3.02–2.97 (m, 2H), 2.85–2.78 (m, 1H), 2.53–2.48 (m, 2H).	( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) $\delta$ 150.8, 148.5, 137.5, 133.1, 131.6, 124.8, 123.5, 119.6, 109.7, 106.7, 103.1, 73.2, 71.6, 69.9, 64.9, 64.1, 62.6, 39.6, 31.0, 29.1.	98.0%	$[\text{M}]^+$ : $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{O}_4\text{N}$ 342.170 0 342.170 0	

Continued

Compd.	Yield /%	mp/°C	$[\alpha]_D^{25}$ (g·100 mL <sup>-1</sup> , MeOH)	<sup>1</sup> H NMR (600 MHz)	<sup>13</sup> C NMR (151 MHz)	HPLC purity	HR-ESI-MS ( <i>m/z</i> )
							Formula Calcd. Found
<b>6d</b>	20%	150–152	65.22 (0.023)	(CD <sub>3</sub> OD) δ 7.00 (s, 1H), 6.98 (s, 1H), 5.99 (d, <i>J</i> = 1.2 Hz, 1H), 5.97 (d, <i>J</i> = 1.2 Hz, 1H), 5.75–5.67 (m, 2H), 5.04–4.87 (m, 2H), 4.73 (d, <i>J</i> = 13.8 Hz, 1H), 4.53–4.51 (m, 1H), 4.24–4.08 (m, 3H), 3.54–3.47 (m, 1H), 3.29 (s, 1H), 3.21–3.10 (m, 1H), 3.01–2.93 (m, 3H), 2.84–2.78 (m, 1H), 2.05–1.93 (m, 2H), 1.86–1.76 (m, 2H).	(CD <sub>3</sub> OD) δ 150.8, 148.4, 137.5, 137.4, 131.6, 124.8, 123.4, 117.0, 109.8, 106.7, 103.1, 73.3, 71.5, 69.9, 65.5, 63.9, 62.4, 39.5, 31.2, 31.0, 23.8.	95.5%	[M] <sup>+</sup> : C <sub>21</sub> H <sub>26</sub> O <sub>4</sub> N 356.185 6 356.184 4
<b>6e</b>	25%	250–252	69.57 (0.023)	(CD <sub>3</sub> OD) δ 6.74–6.70 (m, 2H), 5.71–5.66 (m, 2H), 5.45 (d, <i>J</i> = 3.5 Hz, 1H), 4.50–4.44 (m, 2H), 4.27–4.22 (m, 1H), 3.97–3.84 (m, 3H), 2.97–2.92 (m, 4H), 2.77–2.67 (m, 3H), 2.58–2.51 (m, 1H), 1.68–1.53 (m, 2H), 1.46–1.34 (m, 2H).	(CD <sub>3</sub> OD) δ 150.8, 148.5, 137.5, 131.6, 124.8, 123.4, 109.8, 106.7, 103.1, 73.3, 71.6, 69.9, 65.0, 64.0, 62.4, 44.6, 39.6, 31.0, 30.2, 22.2.	98.0%	[M] <sup>+</sup> : C <sub>20</sub> H <sub>25</sub> O <sub>4</sub> NCl 378.146 7 378.144 9
<b>6f</b>	20%	170–172	7.50 (0.040)	(CD <sub>3</sub> OD) δ 7.00 (s, 1H), 6.99 (s, 1H), 5.97 (d, <i>J</i> = 3.8 Hz, 2H), 5.74–5.70 (m, 2H), 4.91 (dd, <i>J</i> = 16.5, 2.2 Hz, 1H), 4.85 (dd, <i>J</i> = 10.5, 2.1 Hz, 1H), 4.77–4.72 (m, 3H), 4.52 (s, 2H), 4.23–4.12 (m, 3H), 3.53 (td, <i>J</i> = 12.8, 6.6 Hz, 1H), 3.17 (td, <i>J</i> = 12.4, 4.5 Hz, 1H), 3.01–2.94 (m, 3H), 2.83–2.77 (m, 1H), 1.98–1.95 (m, 2H), 1.75–1.65 (m, 2H), 1.26–1.18 (m, 10H).	(CD <sub>3</sub> OD) δ 150.7, 148.4, 140.1, 137.6, 131.6, 124.9, 123.3, 114.7, 109.7, 106.7, 103.1, 73.1, 71.6, 69.9, 66.1, 63.9, 62.4, 39.5, 34.8, 31.0, 30.2, 30.1, 30.0 (2), 27.3, 24.5.	95.2%	[M] <sup>+</sup> : C <sub>26</sub> H <sub>36</sub> O <sub>4</sub> N 426.263 9 426.262 3
<b>6g</b>	20%	213–215	66.67 (0.030)	(CD <sub>3</sub> OD) δ 7.39–7.34 (m, 2H), 7.30 (d, <i>J</i> = 7.9 Hz, 2H), 7.11–6.95 (m, 2H), 6.00 (dd, <i>J</i> = 6.7, 1.3 Hz, 2H), 5.72–5.63 (m, 1H), 4.65–4.48 (m, 2H), 4.27 (d, <i>J</i> = 13.2 Hz, 1H), 4.22–4.09 (m, 5H), 3.42–3.35 (m, 1H), 2.98 (d, <i>J</i> = 11.4 Hz, 1H), 2.74–2.54 (m, 2H), 2.35 (s, 3H).	(CD <sub>3</sub> OD) δ 150.8, 148.5, 142.8, 137.6, 134.1 (2), 131.9, 131.3 (2), 126.4, 124.6, 123.4, 110.2, 106.8, 103.2, 72.6, 71.4, 69.9, 68.3, 62.9, 62.4, 39.5, 30.9, 21.3.	96.2%	[M] <sup>+</sup> : C <sub>24</sub> H <sub>26</sub> O <sub>4</sub> N 392.185 6 392.184 6
<b>6h</b>	50%	214–216	29.03 (0.031)	(CD <sub>3</sub> OD) δ 7.84–7.80 (m, 2H), 7.25–7.21 (m, 2H), 7.01 (s, 1H), 6.95 (s, 1H), 6.01 (d, <i>J</i> = 1.2 Hz, 1H), 5.99 (d, <i>J</i> = 1.2 Hz, 1H), 5.72–5.69 (m, 1H), 4.66–4.59 (m, 1H), 4.55–4.53 (m, 1H), 4.31 (d, <i>J</i> = 13.3 Hz, 1H), 4.25 (d, <i>J</i> = 13.3 Hz, 1H), 4.20–4.14 (m, 4H), 3.47–3.40 (m, 1H), 2.97 (d, <i>J</i> = 11.7 Hz, 1H), 2.76–2.69 (m, 2H).	(CD <sub>3</sub> OD) δ 150.7, 148.4, 139.9 (2), 137.5, 135.8 (2), 131.7, 129.1, 124.5, 123.6, 110.1, 106.8, 103.2, 98.5, 72.8, 71.4, 69.8, 67.9, 63.6, 62.6, 39.4, 30.8.	96.2%	[M] <sup>+</sup> : C <sub>23</sub> H <sub>23</sub> O <sub>4</sub> NI 504.066 6 504.065 0
<b>6i</b>	32%	63–65	8.57 (0.035)	(CD <sub>3</sub> OD) δ 7.47–7.38 (m, 2H), 7.25–7.11 (m, 2H), 6.81 (s, 1H), 6.56 (s, 1H), 5.89–5.79 (m, 2H), 5.56–5.53 (m, 1H), 4.73–4.64 (m, 2H), 4.59–4.56 (m, 1H), 4.06–4.02 (m, 2H), 3.94–3.92 (m, 1H), 3.49–3.43 (m, 1H), 2.93 (s, 1H), 2.83–2.77 (m, 2H), 2.67–2.57 (m, 2H), 2.56–2.50 (m, 1H), 2.36 (q, <i>J</i> = 8.9 Hz, 1H).	(CD <sub>3</sub> OD) δ 148.1, 147.7, 144.7, 139.6, 130.4, 130.3 (2), 129.6, 122.8, 122.0 (2), 121.1, 117.3, 108.2, 106.1, 102.3, 80.9, 71.7, 68.9, 62.4, 57.8, 54.7, 42.2, 29.3.	97.5%	[M] <sup>+</sup> : C <sub>24</sub> H <sub>23</sub> O <sub>5</sub> NF <sub>3</sub> 462.152 3 462.150 3
<b>6j</b>	44%	210–212	46.43 (0.028)	(CD <sub>3</sub> OD) δ 7.68 (d, <i>J</i> = 1.7 Hz, 1H), 7.62 (d, <i>J</i> = 1.7 Hz, 2H), 6.98 (s, 1H), 6.70 (s, 1H), 6.00–5.94 (m, 2H), 5.75–5.71 (m, 1H), 4.69 (d, <i>J</i> = 14.1 Hz, 1H), 4.53–4.51 (m, 1H), 4.44–4.39 (m, 2H), 4.31–4.18 (m, 4H), 3.66–3.53 (m, 1H), 2.94 (d, <i>J</i> = 11.5 Hz, 1H), 2.82–2.78 (m, 2H).	(CD <sub>3</sub> OD) δ 150.6, 148.3, 137.4, 135.8 (3), 135.5, 133.6, 131.5, 124.6, 123.7 (2), 109.6, 106.6, 103.2, 72.4, 71.4, 69.8, 67.7, 65.7, 63.3, 54.2, 30.8.	98.0%	[M] <sup>+</sup> : C <sub>23</sub> H <sub>22</sub> O <sub>4</sub> NBr <sub>2</sub> 533.991 0 533.989 3 ( <sup>79</sup> Br+ <sup>79</sup> Br) 535.987 4 ( <sup>79</sup> Br+ <sup>81</sup> Br) 537.985 2 ( <sup>81</sup> Br+ <sup>81</sup> Br)
<b>9a</b>	24%	194–196	17.39 (0.023)	(CD <sub>3</sub> OD) δ 7.84–7.81 (m, 2H), 7.26–7.20 (m, 2H), 6.93 (s, 1H), 6.63 (s, 1H), 6.00–5.97 (m, 2H), 5.72–5.70 (m, 1H), 4.70–4.66 (m, 1H), 4.46–4.35 (m, 2H), 4.24–4.20 (m, 3H), 3.55–3.45 (m, 2H), 3.26 (s, 1H), 3.24 (s, 1H), 2.94–2.80 (m, 2H), 2.06 (s, 3H).	(CD <sub>3</sub> OD) δ 170.1, 149.4, 147.3, 138.7, 138.4, 136.1, 134.4, 134.2, 128.8, 127.6, 123.1, 122.1, 109.1, 103.9, 101.9, 97.1, 71.0, 70.3, 66.8, 66.7, 62.7, 60.7, 36.8, 29.4, 19.3.	95.1%	[M] <sup>+</sup> : C <sub>25</sub> H <sub>25</sub> O <sub>5</sub> NI 546.077 2 546.074 7
<b>9b</b>	24%	208–210	36.00 (0.025)	(CD <sub>3</sub> OD) δ 7.62 (d, <i>J</i> = 1.8 Hz, 2H), 7.54 (d, <i>J</i> = 1.8 Hz, 1H), 6.53 (s, 1H), 6.52 (s, 1H), 5.95–5.90 (m, 2H), 5.68–5.66 (m, 1H), 4.87 (d, <i>J</i> = 13.9 Hz, 1H), 4.73 (d, <i>J</i> = 13.3 Hz, 1H), 4.61–4.50 (m, 2H), 4.46 (d, <i>J</i> = 11.6 Hz, 1H), 4.23–4.21 (m, 1H), 4.07–3.93 (m, 1H), 3.80–3.73 (m, 1H), 3.60–3.49 (m, 1H), 3.23–3.18 (m, 1H), 3.02–2.95 (m, 1H), 2.93–2.86 (m, 1H), 2.13 (s, 3H).	(CD <sub>3</sub> OD) δ 171.5, 150.5, 148.4, 137.7, 137.2, 135.8 (2), 135.7, 133.7, 129.6, 123.6 (2), 109.8, 108.5, 105.0, 103.3, 71.8, 68.7, 68.3, 63.5, 62.1, 60.8, 53.3, 38.2, 30.9.	97.0%	[M] <sup>+</sup> : C <sub>25</sub> H <sub>24</sub> O <sub>5</sub> NBr <sub>2</sub> 576.001 6 575.999 0 ( <sup>79</sup> Br+ <sup>79</sup> Br) 577.996 6 ( <sup>79</sup> Br+ <sup>81</sup> Br) 579.994 8 ( <sup>81</sup> Br+ <sup>81</sup> Br)

## 2 石蒜碱类衍生物抗 HCoV-OC43 活性构效关系

因为 HCoV-OC43 与 SARS-CoV-2 同属  $\beta$  属冠状病毒, 因此以 HCoV-OC43 感染的 H460 细胞为模型, 以 molnupiravir EIDD-1931 (MPV) 为阳性对照<sup>[21]</sup>, 通过 Cell Counting Kit-8 (CCK-8) 法考察化合物的抗病毒作用。计算了化合物的半数有效浓度 ( $EC_{50}$ ) 以及在未感染病毒的情况下化合物对细胞本身的半数毒性浓度 ( $CC_{50}$ ), 并以  $EC_{50}$  值和 SI ( $CC_{50}/EC_{50}$ ) 值作为判断标准。化合物的  $EC_{50}$  值越低, SI 值越高, 则化合物的抗病毒活性越强。目标化合物的结构与活性结果见表 2。

考察了先导物 **1** 的吡咯并菲啶母核对活性的影响。结果显示, A 环开环的石蒜碱衍生物 **3**、3 位碳碳双键还原的二氢石蒜碱 **4** 以及 7 位选择性氧化的石蒜碱酰胺衍生物 **7** 的活性均大幅降低甚至完全丧失, 提示石蒜碱的吡咯并菲啶母核对于保持其抗病毒活性是必需的。

为了提升石蒜碱类化合物的抗病毒活性, 采用了提高脂溶性的策略。在保留吡咯并菲啶母核的基础上, 在 2 位羟基上引入不同长度的烷基链, 制备了化合


















物 **5a~5c**。抗病毒活性结果显示, 相较先导物 **1**, 上述化合物的抗病毒活性均明显降低甚至消失, 提示 2 位羟基引入烷基可能不利于活性。

尝试从改善水溶性的角度提高化合物的抗病毒活性。在保留吡咯并菲啶母核的基础上, 在 6 位氮原子上引入不同的脂肪链或取代苯基形成水溶性改善的季铵盐类化合物, 得到 6*N*-取代石蒜碱季铵盐 **6a~6j**。其中, 化合物 **6a** (乙基取代) 和 **6f** (癸烯基取代) 的活性最佳,  $EC_{50}$  分别为 2.36 和 3.9  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , SI 值分别为 16.52 和大于 51.28, 与先导物的活性相当, 提示在石蒜碱的 6*N* 原子上引入合适的取代基有利于活性的提高。在此基础上, 进一步在 1-OH 上引入酯基以提高其脂溶性, 得到两个目标化合物 **9a** 和 **9b**, 其抗病毒活性均下降。鉴于化合物 **6a** 的  $EC_{50}$  值最低, 将其作为代表性化合物开展下一步研究。

## 3 化合物 6a 与 NSP12 具有较强的亲和力

石蒜碱通过靶向寨卡病毒的 RdRp 发挥抗病毒作用<sup>[22]</sup>, 推测石蒜碱化合物也可能通过靶向 SARS-CoV-2

**Table 2** The structures and anti-HCoV-OC43 activities of target compounds. a: The concentration of compound that inhibited 50% of the virus level in H460 cells; b: The concentration of 50% cellular toxicity in H460 cells; c: The selectivity index-the ratio of  $CC_{50}$  to  $EC_{50}$ . MPV: Molnupiravir EIDD-1931

Compd.	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	$EC_{50}/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ <sup>a</sup>	$CC_{50}/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ <sup>b</sup>	SI <sup>c</sup>
<b>3</b>	/	/	/	>50.00	>200.00	N/A
<b>4</b>	/	/	/	21.81 ± 2.72	154.66 ± 4.15	7.09
<b>5a</b>	H		/	>50.00	>200.00	N/A
<b>5b</b>	H		/	>50.00	83.43 ± 2.80	<1.67
<b>5c</b>	H		/	>50.00	>200.00	N/A
<b>6a</b>	H	H		2.36 ± 0.24	38.98 ± 1.04	16.52
<b>6b</b>	H	H		35.43 ± 9.92	>200.00	>5.64
<b>6c</b>	H	H		>50.00	>200.00	N/A
<b>6d</b>	H	H		>50.00	>200.00	N/A
<b>6e</b>	H	H		33.79 ± 6.55	>200.00	>5.92
<b>6f</b>	H	H		3.90 ± 3.00	>200.00	>51.28
<b>6g</b>	H	H		>50.00	65.83 ± 1.94	<1.32
<b>6h</b>	H	H		23.10 ± 0.40	>200.00	>8.66
<b>6i</b>	H	H		6.00 ± 0.80	21.50 ± 1.60	3.58
<b>6j</b>	H	H		5.59 ± 0.63	>200.00	>35.78
<b>7</b>	/	/	/	>50.00	>200.00	N/A
<b>9a</b>		H		36.50 ± 0.10	>200.00	>5.48
<b>9b</b>		H		33.90 ± 1.90	>200.00	>5.90
<b>1</b>	/	/	/	0.69 ± 0.06	6.74 ± 0.34	9.77
MPV	/	/	/	0.21 ± 0.01	78.58 ± 26.24	374.19

的 RdRp 抑制病毒的增殖。为此, 利用表面等离子共振 (SPR) 实验, 考察了 **6a** 与 SARS-CoV-2 NSP12 蛋白之间的直接相互作用, 并测定其亲和力 ( $K_D$  值)。如图 2 所示, 化合物 **6a** 能够浓度依赖性地与 NSP12 结合,  $K_D$  值为  $1.36 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 提示二者间存在较强的亲和力。

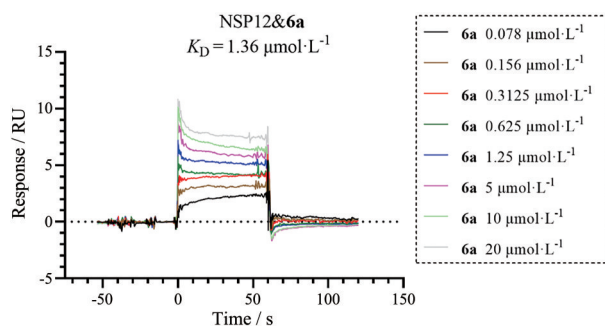


Figure 2 SPR assay obtained on NSP12-coated chip in the presence of different concentrations of **6a**

#### 4 化合物 **6a** 可能靶向 NSP12 的 NiRAN 结构域催化中心

为了预测 **6a** 与 NSP12 (PDB ID: 7ed5) 之间的结合模式, 采用 AutoDock Tools 1.5.6, Discovery Studio 4.5 和 Molegro Virtual Docker (MVD) 6.0 三个软件, 将 **6a** 与 NSP12 的两个活性腔, 即 NiRAN 结构域催化中心和 NSP12 催化中心, 分别进行虚拟对接。三种软件的对接结果趋势一致, **6a** 与 NiRAN 催化中心的结合能量值较低, 提示 **6a** 与 NiRAN 催化中心的结合能力优于 NSP12 催化中心 (表 3)。

Table 3 Docking score values between **6a** and NiRAN or NSP12 catalytic center from different docking software

Item	AutoDock	Discovery Studio	MVD
	Binding energy /kcal·mol <sup>-1</sup>	CDocker interaction energy/kcal·mol <sup>-1</sup>	MolDock score
<b>6a</b> -NiRAN catalytic center	-7.33	-27.65	-98.39
<b>6a</b> -NSP12 catalytic center	-6.02	-21.57	-97.94

进一步采用 PyMOL 对虚拟对接结果进行可视化分析 (图 3)。CDocker 对接结果显示, 化合物 **6a** 与 NiRAN 催化中心的 LYS-50、ASP-208 和 TYR-217 之间均能形成较强的氢键作用 (图 3B), 此外, **6a** 与 CYS-53 之间的  $\pi$  硫共轭相互作用以及与 ASN-209 和 ASP-218 等多个氨基酸残基间的范德华力也可能促进 **6a** 与 NiRAN 结构域之间的稳定结合。相较之下, 化合物 **6a** 仅能与 NSP12 催化中心的 ASP-865 和 GLN-815 两个氨基酸形成氢键作用 (图 3C)。类似地, AutoDock 和 MVD 的对接结果分析也显示, 相较于 NSP12 催化中心, **6a**

与 NiRAN 催化中心能够形成更多的氢键相互作用 (图 3E~H)。

采用 Discovery Studio 4.5 软件, 将非活性化合物 **6g** 与 NiRAN 催化中心也进行了虚拟对接。CDocker 结果显示, 化合物 **6a** 能够与 ASN-52、HIS-75、LYS-50、ASP-208、ASP-218 等氨基酸残基组成的疏水口袋较好地适配 (图 3B), 而 **6g** 无法进入该口袋, 可能是由于 6N 上的苯基取代基体积过大的缘故 (图 3D), 提示在石蒜碱 6N 原子上引入合适体积的基团有利于与 NiRAN 的催化中心的结合, 与本文前述的构效关系结果相一致。

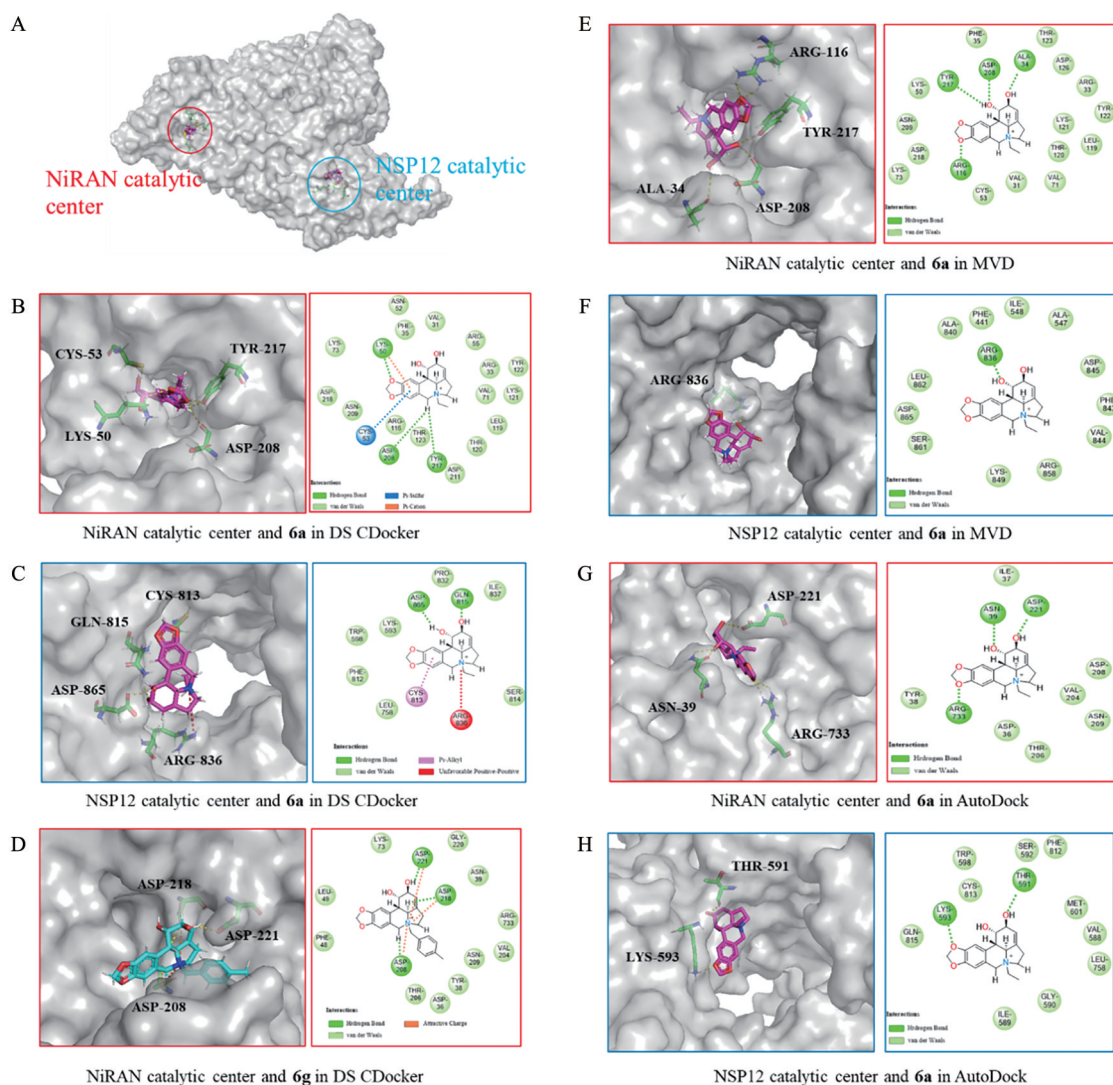
上述结果表明, 不同于瑞德西韦和莫努匹韦等拟核苷类抑制剂, 化合物 **6a** 极有可能通过靶向 SARS-CoV-2 的 NiRAN 结构域催化中心发挥抗病毒作用, 未来可能与瑞德西韦等拟核苷类抑制剂联用发挥协同抗病毒作用, 值得进一步研究。

#### 小结

本文设计合成了 18 个石蒜碱类衍生物, 其中 13 个为全新的石蒜碱衍生物, 并初步总结了其抗 SARS-CoV-2 的构效关系。结果提示: 石蒜碱的吡咯并菲啶母核骨架为活性必需, 在 6N 原子上引入合适的基团对活性有利。其中, 化合物 **6a** 表现出了较好的活性和较低的细胞毒性。进一步研究显示, **6a** 与 SARS-CoV-2 RdRp 的 NSP12 亚基展现出良好的结合亲和力, 且极有可能通过靶向 NSP12 NiRAN 结构域的催化中心抑制病毒的增殖。鉴于化合物 **6a** 的作用靶点与瑞德西韦不同, 因而极有可能与瑞德西韦联用发挥协同抗病毒作用, 从而为开发全新机制的 SARS-CoV-2 小分子抑制剂提供新的思路。

#### 实验部分

熔点用 MP90 熔点仪测定 (Mettler toledo, Columbus, USA), 未经校正; 比旋光度用 Rudolph Autopol IV-T 旋光仪测定 (Rudolph Research Analytical, NJ, USA); <sup>1</sup>H NMR 和 <sup>13</sup>C NMR 用 Bruker Avance III 600 MHz 核磁共振仪 (Varian, San Francisco, USA) 测定, 溶剂为 CDCl<sub>3</sub>、DMSO-*d*<sub>6</sub> 和 CD<sub>3</sub>OD (带 TMS 内标); ESI HR-MS 用 Autospec Ultima-TOF 质谱测定仪 (Micromass UK Ltd., Manchester, UK) 测定; 圆二色光谱用 Chirascan Plus 圆二色谱仪 (Applied Photophysics, Surrey, UK) 测定; Flash 柱分离纯化用 Combiflash Rf 200 快速制备液相 (Teledyne, Nebraska, USA); 紫外检测用 ZF-7A 手提紫外检测灯 (上海宝山顾村电光仪器厂); 薄层色谱 (TLC) 采用 Merck 60 F254 薄层色谱硅胶板 (Merck & Co Inc., Darmstadt, German); 纯度用安捷伦 1200 高效液



**Figure 3** Docking results between NSP12 and representative compounds. (A) Crystal structure of NSP12; (B, E, G) 3D and 2D diagrams of docking results between **6a** and NiRAN catalytic center by DS CDOCKER, MVD or AutoDock; (C, F, H) 3D and 2D diagrams of docking results between **6a** and NSP12 catalytic center by DS CDOCKER, MVD or AutoDock; (D) 3D and 2D diagrams of docking results between **6g** and NiRAN catalytic center by DS CDOCKER. Interaction types are colored as follows: hydrogen bond, green; van der Waals, light green; Pi-sulfur, blue; Pi-cation and attractive charge, orange; Pi-alkyl, pink; Unfavorable positive-positive, red

相色谱仪 (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, USA) 测定。采用 Agilent Eclipse Plus C18 色谱柱 (4.6 mm × 150 mm, 5 μm); 以 0.1% 磷酸 (A)-甲醇 (B) 为流动相。5a~5c 用 55% B 等度洗脱 10 min; 6c~6j, 9a 和 9b 梯度洗脱 (0~7 min, 50%~80% B; 7~11 min, 80% B; 11~13 min, 50% B); 流速为 1.0 mL·min<sup>-1</sup>; 检测波长 289 nm; 柱温 30 °C; 进样量 20 μL。

所用试剂均购自泰坦、毕得和通广等试剂公司的分析纯试剂, 未经纯化直接使用。

## 1 化学合成

### 1.1 目标化合物 5a~5c 的合成

向石蒜碱盐酸盐 (4 mmol) 的 50 mL 蒸馏水溶液中加入 15 mL 饱和氨水,

室温搅拌 4 h, 置于 4 °C 冷却 4 h。抽滤, 用 15 mL 蒸馏水润洗滤渣 3 次, 真空干燥, 得到化合物 **1** 直接用于下一步反应。向 **1** (1 mmol) 的 10 mL DMF 溶液中缓慢加入 NaH (2 mmol), 室温搅拌 20 min, 缓慢滴加溴代脂肪烃, 室温搅拌 20 h。TLC 监测反应完成后, 加入冰水 (20 mL) 淬灭反应, 加入二氯甲烷 (30 mL) 萃取 3 次, 合并有机相, 分别用饱和 NH<sub>4</sub>Cl 溶液 (100 mL), 饱和 NaCl 溶液 (100 mL) 洗涤, 无水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 干燥, 过滤, 减压浓缩后硅胶匀化, 以石油醚和乙酸乙酯为流动相, 经 Flash 快速柱色谱分离, 得到目标化合物 **5a~5c**。

### 1.2 目标化合物 6c~6j 的合成

向 **1** (0.5 mmol) 的 5 mL DMF 溶液中加入卤代烃 (0.7 mmol), 60 °C 搅拌

10 h, TLC 监测反应完成后, 减压浓缩。残余物用蒸馏水 (50 mL) 溶解, 用二氯甲烷 (50 mL) 洗涤两次, 浓缩, 得到目标化合物 **6c**~**6j**。

**1.3 目标化合物 9a 和 9b 的合成** 向 **2**<sup>[20]</sup> (0.5 mmol) 的 15 mL 甲醇溶液中加入浓盐酸 (6 mL), 55 °C 搅拌 1 h。用饱和 NaHCO<sub>3</sub> 溶液将混合体系的 pH 值调至 8, 加入二氯甲烷 (20 mL), 用饱和 NaCl 溶液 (20 mL) 洗涤, 用无水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 干燥, 过滤, 减压浓缩后硅胶匀化, 以乙酸乙酯和甲醇为流动相, 经 Flash 快速柱色谱分离, 得到化合物 **8**。

向 **8** (0.5 mmol) 的 5 mL 乙腈溶液中加入取代苄溴 (0.7 mmol), 室温搅拌 2 h, TLC 监测反应完成后, 减压浓缩, 硅胶匀化, 以二氯甲烷和甲醇为流动相, 经 Flash 快速柱色谱分离, 得到目标化合物 **9a** 和 **9b**。

## 2 化合物抗新冠病毒活性测定

以 HCoV-OC43 感染的 H460 细胞为模型, MPV 作为阳性对照药, 在病毒感染 (MOI = 1.0) H460 细胞 (每孔  $1.5 \times 10^4$  个) 的同时将待测化合物不同浓度稀释液和 DMSO 溶剂对照加入至 96 孔板 (Corning, Inc., Corning, NY) 中, 37 °C 5% CO<sub>2</sub> 培养 72 h。采用 CCK-8 法检测细胞在 450 nm 波长处的吸光度, 通过比较未感染病毒溶剂对照组、感染病毒溶剂对照组和感染病毒待测化合物组细胞的活力, 判断化合物的抗病毒作用。用 Reed-Muench 法计算待测化合物抗病毒的 EC<sub>50</sub> 值。

## 3 化合物细胞毒性测定

将 H460 细胞 (每孔  $1.5 \times 10^4$  个) 接种到 96 孔板上培养过夜, 以 MPV 作为阳性对照药, 将待测化合物不同浓度稀释液和 DMSO 溶剂对照加入至 96 孔板中, 37 °C 5% CO<sub>2</sub> 培养 72 h。采用 CCK-8 法检测细胞在 450 nm 波长处的吸光度, 通过比较 DMSO 溶剂对照组和待测化合物组细胞的活力, 判断化合物的细胞毒性。用 Reed-Muench 法计算待测化合物对细胞的 CC<sub>50</sub> 值。

## 4 表面等离子共振分析 (SPR)

SPR 实验在 BIAcore T200 分子互作分析检测系统 (GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ, USA) 上, 于 25 °C 使用 CM5 芯片进行 (GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ, USA)。以 1×PBS-P+ (GE Healthcare Life Sciences) 为流动相, 在 CM5 芯片上固定商品化的 SARS-CoV-2 NSP12 蛋白 (华美生物), 再在 10 μL·min<sup>-1</sup> 的流速下使不同浓度的 **6a** 和 NSP12 结合 60 s。每次结合完成后, 解离 60 s 使信号回归基线水平。K<sub>D</sub> 值用 BIAcore T200 Evaluation Software v3.0 拟合。

## 5 分子对接

**5.1 AutoDock 对接** 首先使用 Chem3D 软件 MM2

Minimize 功能对 **6a** 的三维结构进行能量最小化处理, 使用 PyMOL 对蛋白大分子进行预处理, 仅保留 SARS-CoV-2 RdRp (PDB ID: 7ed5) 晶体结构中的 NSP12 蛋白。使用 AutoDock Tools 1.5.6 对 **6a** 进行加全氢、检测并选择扭转键处理, 对 NSP12 蛋白进行加全氢处理。在 NSP12 蛋白的 NiRAN 催化中心处设置 122×126×126 的网格盒子, 网格间隔 0.338 ( $x = 122.79$ ,  $y = 142.42$ ,  $z = 89.707$ ), 在 NSP12 催化中心处设置 116×126×100 的网格盒子, 网格间隔 0.299 ( $x = 131.046$ ,  $y = 131.312$ ,  $z = 140.353$ )。选择 Lamarckian 遗传算法, 对两个活性腔分别进行对接。选择结合能最低的构象, 用 PyMOL 2.4.0 进行可视化分析。

**5.2 Molegro Virtual Docker 对接** 按照文献<sup>[23]</sup>报道的方法, 使用 Molegro Virtual Docker 6.0 检测 SARS-CoV-2 RdRp (PDB ID: 7ed5) 晶体结构中的 NSP12 蛋白活性位点, 分别选择 NiRAN 催化中心和 NSP12 催化中心为对接腔, 选择 MolDock SE 算法, 进行对接。选择结合能最低的构象, 用 PyMOL 2.4.0 进行可视化分析。

**5.3 Discovery Studio 对接** 使用 Discovery Studio 4.5 软件, 按照文献<sup>[24]</sup>报道的方法, 以 SARS-CoV-2 RdRp (PDB ID: 7ed5) 晶体结构中的 NSP12 蛋白为大分子模型, 在 PDB 晶体结构中记录的活性位点里选择 NiRAN 催化中心和 NSP12 催化中心为对接腔, 选用 CDocker 进行对接。选择结合能最低的构象, 用 PyMOL 2.4.0 和 Discovery Studio 4.5 进行可视化分析。

**致谢:** 目标化合物的核磁共振氢谱、碳谱由中国医学科学院药物研究所分析测试中心测定, 高分辨质谱由中国医学科学院医药生物技术研究所分析测试中心测定。

**作者贡献:** 梅钰恒负责化学部分、SPR 和分子对接实验及初稿的撰写; 李佳玉负责化合物抗病毒活性和细胞毒性的测定; 宋丹青研究员和彭宗根研究员对实验过程中出现的问题及论文撰写提供了有益的指导; 本文的通讯作者李迎红研究员负责实验设计和把关、稿件修改等工作。

**利益冲突:** 所有作者均声明不存在利益冲突。

## References

- [1] World Health Organization. WHO Coronavirus (COVID-19) [EB/OL]. <https://Covid19.Who.Int/> (accessed on 20 July 2023).
- [2] Lin L, Tang F, Xu R, et al. Progress of the development of anti-COVID-19 drugs [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2023, 58: 39-51.
- [3] Davies NG, Abbott S, Barnard RC, et al. Estimated transmissibility and impact of SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7 in England [J]. Science, 2021, 372: eabg3055.
- [4] Oude Munnink BB, Sikkema RS, Nieuwenhuijse DF, et al.

- Transmission of SARS-CoV-2 on mink farms between humans and mink and back to humans [J]. *Science*, 2021, 371: 172-177.
- [5] Tegally H, Wilkinson E, Lessells RJ, et al. Sixteen novel lineages of SARS-CoV-2 in South Africa [J]. *Nat Med*, 2021, 27: 440-446.
- [6] Plante JA, Liu Y, Liu J, et al. Spike mutation D614G alters SARS-CoV-2 fitness [J]. *Nature*, 2021, 592: 116-121.
- [7] Stevens LJ, Pruijssers AJ, Lee HW, et al. Mutations in the SARS-CoV-2 RNA-dependent RNA polymerase confer resistance to remdesivir by distinct mechanisms [J]. *Sci Transl Med*, 2022, 14: eabo0718.
- [8] Checkmahomed L, Carbonneau J, Du Pont V, et al. *In vitro* selection of remdesivir-resistant SARS-CoV-2 demonstrates high barrier to resistance [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2022, 66: e0019822.
- [9] Torii S, Kim KS, Koseki J, et al. Increased flexibility of the SARS-CoV-2 RNA-binding site causes resistance to remdesivir [J]. *PLoS Pathog*, 2023, 19: e1011231.
- [10] Gandhi S, Klein J, Robertson AJ, et al. *De novo* emergence of a remdesivir resistance mutation during treatment of persistent SARS-CoV-2 infection in an immunocompromised patient: a case report [J]. *Nat Commun*, 2022, 13: 1547.
- [11] Hogan JI, Duerr R, Dimartino D, et al. Remdesivir resistance in transplant recipients with persistent coronavirus disease 2019 [J]. *Clin Infect Dis*, 2023, 76: 342-345.
- [12] Gao Y, Yan L, Huang Y, et al. Structure of the RNA-dependent RNA polymerase from COVID-19 virus [J]. *Science*, 2020, 368: 779-782.
- [13] Yin W, Mao C, Luan X, et al. Structural basis for inhibition of the RNA-dependent RNA polymerase from SARS-CoV-2 by remdesivir [J]. *Science*, 2020, 368: 1499-1504.
- [14] Shannon A, Fattorini V, Sama B, et al. A dual mechanism of action of AT-527 against SARS-CoV-2 polymerase [J]. *Nat Commun*, 2022, 13: 621.
- [15] Lv X, Zhang M, Yu S, et al. Antiviral and virucidal activities of lycorine on duck tembusu virus *in vitro* by blocking viral internalization and entry [J]. *Poult Sci*, 2021, 100: 101404.
- [16] He J, Qi WB, Wang L, et al. Amaryllidaceae alkaloids inhibit nuclear-to-cytoplasmic export of ribonucleoprotein (RNP) complex of highly pathogenic avian influenza virus H5N1 [J]. *Influenza Other Respir Viruses*, 2013, 7: 922-931.
- [17] Wang P, Li LF, Wang QY, et al. Anti-dengue-virus activity and structure-activity relationship studies of lycorine derivatives [J]. *ChemMedChem*, 2014, 9: 1522-1533.
- [18] Liang L, Li J, Shen B, et al. The effect of carbonyl on the isomerization of a galanthan ring system and total synthesis of ( $\pm$ )- $\beta$ -lycorane [J]. *Org Biomol Chem*, 2021, 19: 2767-2772.
- [19] Chen D, Cai J, Cheng J, et al. Design, synthesis and structure-activity relationship optimization of lycorine derivatives for HCV inhibition [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 14972.
- [20] Tasker SZ, Cowfer AE, Hergenrother PJ. Preparation of structurally diverse compounds from the natural product lycorine [J]. *Org Lett*, 2018, 20: 5894-5898.
- [21] Vangeel L, Chiu W, De Jonghe S, et al. Remdesivir, molnupiravir and nirmatrelvir remain active against SARS-CoV-2 Omicron and other variants of concern [J]. *Antiviral Res*, 2022, 198: 105252.
- [22] Chen H, Lao Z, Xu J, et al. Antiviral activity of lycorine against Zika virus *in vivo* and *in vitro* [J]. *Virology*, 2020, 546: 88-97.
- [23] Jain D, Udhwani T, Sharma S, et al. Design of novel JAK3 inhibitors towards rheumatoid arthritis using molecular docking analysis [J]. *Bioinformatics*, 2019, 15: 68-78.
- [24] Wei W, Zeng Q, Wang Y, et al. Discovery and identification of EIF2AK2 as a direct key target of berberine for anti-inflammatory effects [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2023, 13: 2138-2151.