



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103562199 B

(45) 授权公告日 2016. 03. 30

(21) 申请号 201280025776. 8

A61K 31/4725(2006. 01)

(22) 申请日 2012. 05. 23

A61P 31/14(2006. 01)

(30) 优先权数据

61/490665 2011. 05. 27 US

(56) 对比文件

WO 2009129109 A1, 2009. 10. 22,

WO 2011038283 A1, 2011. 03. 31,

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2013. 11. 27

审查员 王大为

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2012/039090 2012. 05. 23

(87) PCT国际申请的公布数据

W02012/166459 EN 2012. 12. 06

(73) 专利权人 百时美施贵宝公司

地址 美国新泽西州

(72) 发明人 孙力强 P. M. 斯科拉

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

代理人 徐晶 万雪松

(51) Int. Cl.

C07D 401/12(2006. 01)

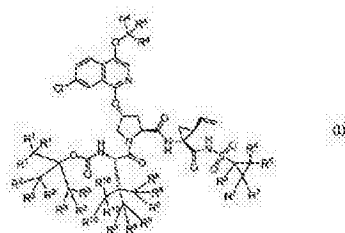
权利要求书5页 说明书25页

(54) 发明名称

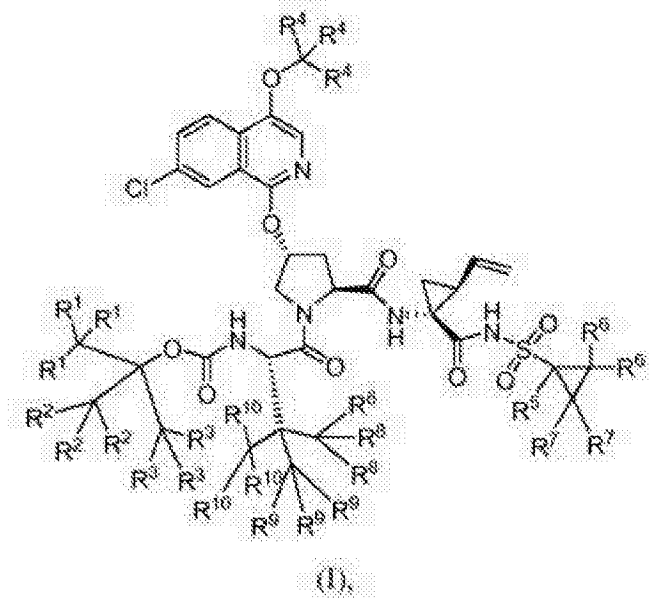
作为丙型肝炎病毒抑制剂的掺入氘的三肽

(57) 摘要

本文公开了具有通式(I)的丙型肝炎病毒抑制剂,也公开了包含所述化合物的组合物和应用所述化合物抑制HCV的方法。



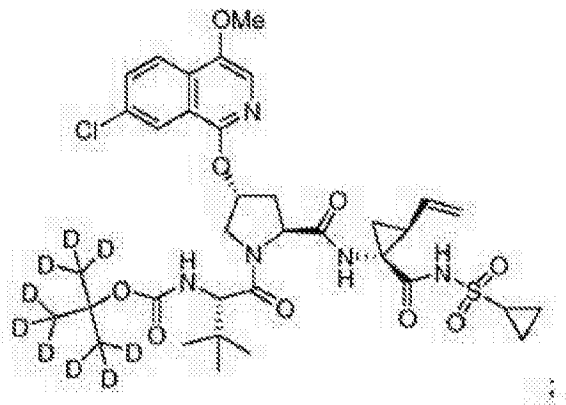
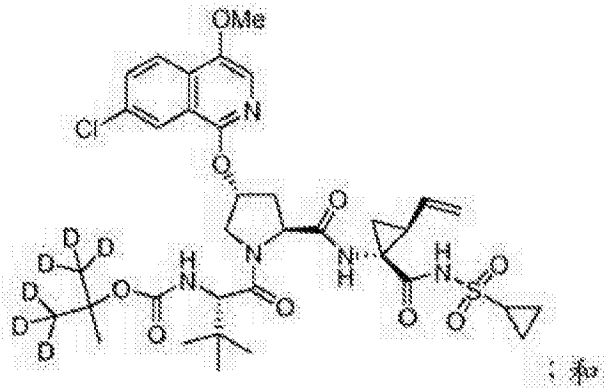
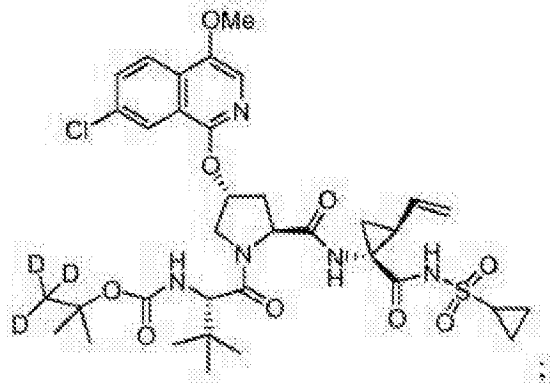
1. 一种式 (I) 化合物



或其药学上可接受的盐,其中

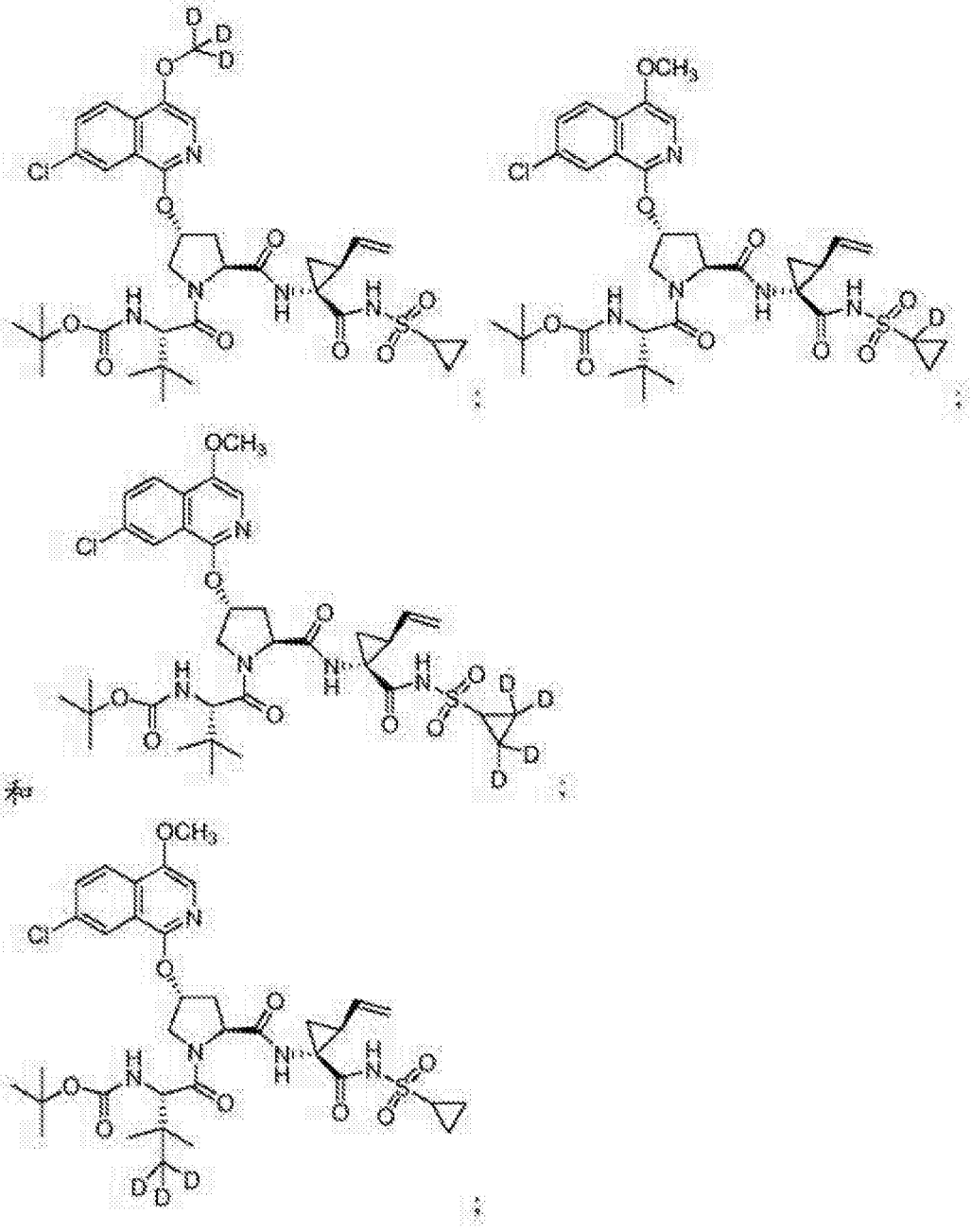
R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 和 R^{10} 独立选自氢和氘;前提是至少一个不是氢。

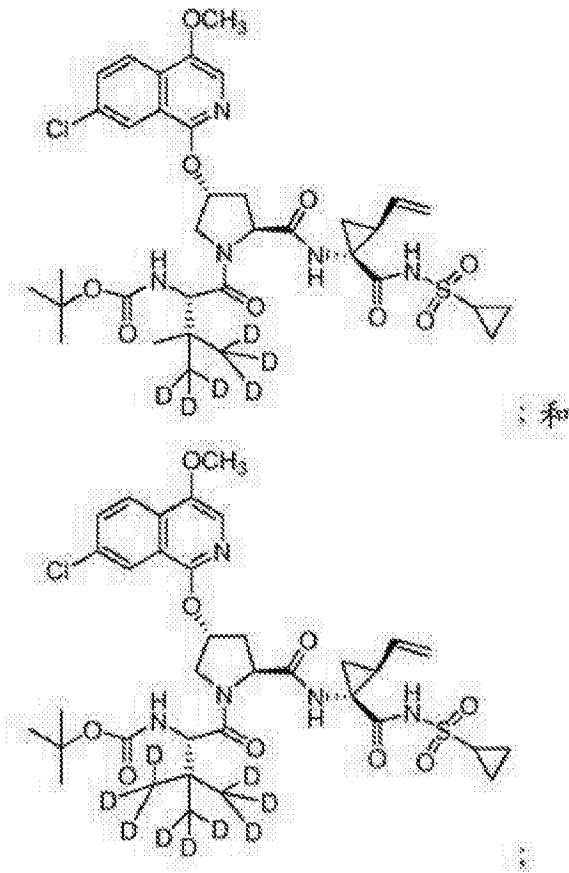
2. 权利要求 1 的化合物,其中各个 R^1 是氘。
3. 权利要求 2 的化合物,其中各个 R^2 是氘。
4. 权利要求 3 的化合物,其中各个 R^3 是氘。
5. 权利要求 1 的化合物,其中各个 R^4 是氘。
6. 权利要求 1 的化合物,其中 R^5 是氘。
7. 权利要求 1 的化合物,其中各个 R^6 是氘。
8. 权利要求 7 的化合物,其中各个 R^7 是氘。
9. 权利要求 1 的化合物,其中各个 R^8 是氘。
10. 权利要求 9 的化合物,其中各个 R^9 是氘。
11. 权利要求 10 的化合物,其中各个 R^{10} 是氘。
12. 一种化合物,其选自



或其药学上可接受的盐。

13. 一种化合物,其选自





或其药学上可接受的盐。

14. 一种组合物,其包含权利要求 1 的化合物,或其药学上可接受的盐和药学上可接受的载体。

15. 权利要求 14 的组合物,其还包含至少一个另外的、具有抗 -HCV 活性的化合物。

16. 权利要求 15 的组合物,其中至少一种另外的化合物是干扰素或利巴韦林。

17. 权利要求 16 的组合物,其中的干扰素选自干扰素 α 2B、聚乙二醇化的干扰素 α 、复合干扰素、干扰素 α 2A 和类淋巴母细胞干扰素 τ 。

18. 权利要求 15 的组合物,其中至少一种另外的化合物选自白介素 2、白介素 6、白介素 12、增强 1 型辅助 T 细胞反应的发展的化合物、干扰 RNA、反义 RNA、咪喹莫特、利巴韦林、肌苷 -5' - 单磷酸脱氢酶抑制剂、金刚烷胺和金刚乙胺。

19. 权利要求 15 的组合物,其中至少一种另外的化合物有效抑制选自以下的靶标的功能: HCV 金属蛋白酶、HCV 丝氨酸蛋白酶、HCV 聚合酶、HCV 解旋酶、HCV NS4B 蛋白、HCV 进入、HCV 装配、HCV 脱出、HCV NS5A 蛋白和治疗 HCV 感染的 IMPDH。

20. 权利要求 1 的化合物或其药学上可接受的盐在制备用于治疗患者的 HCV 感染的药物中的用途。

21. 权利要求 20 的用途,所述药物还包括在给予权利要求 1 的化合物或其药学上可接受的盐之前、之后或同时给予的至少一种另外的、具有抗 -HCV 活性的化合物。

22. 权利要求 21 的用途,其中至少一种另外的化合物是干扰素或利巴韦林。

23. 权利要求 22 的用途,其中干扰素选自干扰素 α 2B、聚乙二醇化的干扰素 α 、复合干扰素、干扰素 α 2A 和类淋巴母细胞干扰素 τ 。

24. 权利要求 21 的用途, 其中至少一种另外的化合物选自白介素 2、白介素 6、白介素 12、增强 1 型辅助 T 细胞反应的发展的化合物、干扰 RNA、反义 RNA、咪喹莫特、利巴韦林、肌苷 -5' - 单磷酸脱氢酶抑制剂、金刚烷胺和金刚乙胺。

25. 权利要求 21 的用途, 其中至少一种另外的化合物有效抑制选自以下的靶标的功能: HCV 金属蛋白酶、HCV 丝氨酸蛋白酶、HCV 聚合酶、HCV 解旋酶、HCV NS4B 蛋白、HCV 进入、HCV 装配、HCV 脱出、HCV NS5A 蛋白和治疗 HCV 感染的 IMPDH。

作为丙型肝炎病毒抑制剂的掺入氘的三肽

[0001] 相关申请的交互参考

[0002] 本申请要求 2011 年 5 月 27 日提交的美国临时申请序号 61/490,665 的权益。

[0003] 本公开涉及氘化的 *N*-(叔-丁氧基羰基)-3-甲基-L-缬氨酸-(4*R*)-*N*-(1*R*,2*S*)-1{[(环丙基磺酰基)氨基]羰基}-2-乙烯基环丙基)-4-[(4-甲氧基-7-氯代异喹啉-1-基)氧基]-L-脯氨酸酰胺化合物、它们的药用组合物,其制备过程和使用方法。所述化合物拥有抑制 NS3 蛋白酶(在此也被称为“丝氨酸蛋白酶”)的能力并被用于丙型肝炎病毒的治疗。

[0004] HCV 是一个主要的人类病原体,感染估计全球 1.7 亿人-大约为由人类免疫缺陷病毒 1 型感染的数量的 5 倍。这些 HCV 感染的个体的相当大的一部分,发展为严重的进行性肝病,包括肝硬化和肝细胞癌。

[0005] 目前,最有效的 HCV 疗法采用 α -干扰素和利巴韦林的联合,在 40% 的患者中导致持续的功效。最近的临床结果证明,聚乙二醇化的 α -干扰素优于作为单一疗法的未改性的 α -干扰素。然而,即使采用包括聚乙二醇化的 α -干扰素和利巴韦林组合的实验治疗方案,相当大的一部分患者的病毒荷载没有持续减少。因此,对开发治疗 HCV 感染的有效的疗法存在明确的和未得到满足的需求。

[0006] HCV 是一种正链 RNA 病毒。基于推导的氨基酸序列和 5' 非翻译区中的广泛相似性的比较,HCV 已被分类为黄病毒科 (Flaviviridae family) 中的一个单独的属。黄病毒科家族的所有成员具有包囊的病毒粒子 (virions),其包含一个通过单一的、不间断的、开放阅读框的翻译编码所有已知病毒特异性蛋白的正链 RNA 基因组。

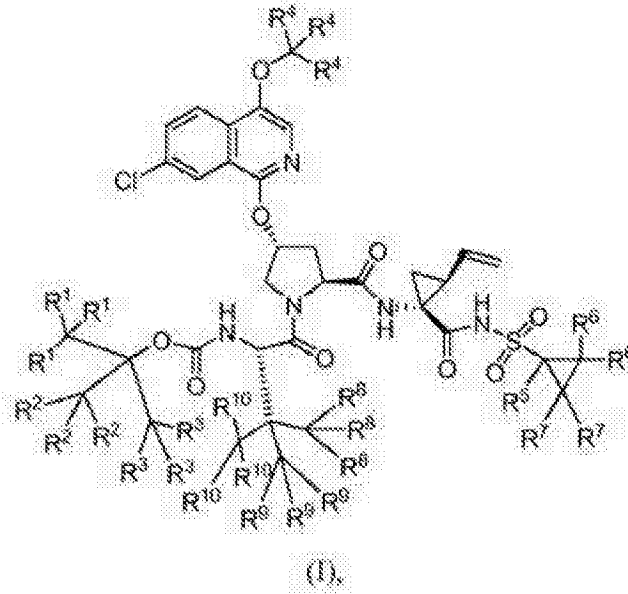
[0007] 在贯穿 HCV 基因组的核苷酸和编码的氨基酸序列内发现相当大的异质性。已经对 6 个主要的基因型进行了特征鉴定,并且已经描述了超过 50 种亚型。尽管已有基因型对发病机理和治疗的可能影响的大量研究,但是 HCV 的主要基因型在世界各地的分布不同,且 HCV 的遗传异质性的临床意义仍然是难以捉摸的。

[0008] 单链 HCV RNA 基因组大约有 9500 个核苷酸的长度,并有一个单一的开放阅读框 (ORF),编码约 3000 个氨基酸的单一的大多蛋白。在感染的细胞中,这种多蛋白在多个位点上被细胞和病毒蛋白酶裂解,产生结构和非结构 (NS) 蛋白。在 HCV 的情况下,成熟的非结构蛋白 (NS2、NS3、NS4A、NS4B、NS5A 和 NS5B) 的生成是通过两个病毒蛋白酶进行的。第一个裂解在 NS2-NS3 结点,第二个是丝氨酸蛋白酶,其包含在 NS3 的 N-末端区内,并介导所有随后的 NS3 下游的裂解,两者均为顺式 (cis),在 NS3-NS4A 裂解位点,和对于剩下的 NS4A-NS4B、NS4B、NS5A、NS5A-NS5B 位点,为反式。NS4A 蛋白似乎发挥多重功能,用作 NS3 蛋白酶的辅因子,并可能协助 NS3 和其他病毒复制酶组分的膜定位。NS3 蛋白与 NS4A 的复合物的形成,对于有效的多蛋白加工、提高所有位点的蛋白水解裂解是必不可少的。NS3 蛋白也展现核苷三磷酸酶和 RNA 解旋酶的活性。NS5B 是一种依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶,其参与 HCV 的复制。

[0009] 本公开提供肽化合物,其可抑制 NS3 蛋白酶,如与 NS4A 蛋白酶联合发挥的功能。

[0010] 在第一方面,本公开提供式 (I) 化合物

[0011]



[0012] 或其药学上可接受的盐,其中

[0013] R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 和 R^{10} 独立选自氢和氘;前提是至少一个不是氢。

[0014] 在第一方面的第一个实施方案中,本公开提供式 (I) 化合物或其药学上可接受的盐,其中各个 R^1 是氘。在第一方面的第二个实施方案中,各个 R^2 是氘。在第一方面的第三个实施方案中,各个 R^3 是氘。

[0015] 在第一方面的第四个实施方案中,本公开提供式 (I) 化合物或其药学上可接受的盐,其中各个 R^4 是氘。

[0016] 在第一方面的第五个实施方案中,本公开提供式 (I) 化合物或其药学上可接受的盐,其中 R^5 是氘。

[0017] 在第一方面的第六个实施方案中,本公开提供式 (I) 化合物或其药学上可接受的盐,其中各个 R^6 是氘。在第七个实施方案中,各个 R^7 是氘。

[0018] 在第一方面的第八个实施方案中,本公开提供式 (I) 化合物或其药学上可接受的盐,其中各个 R^8 是氘。在第九个实施方案中,各个 R^9 是氘。在第十个实施方案中,各个 R^{10} 是氘。

[0019] 在第二方面,本公开提供包含式 (I) 化合物或其药学上可接受的盐和药学上可接受的载体的组合物。在第二方面的第一个实施方案中,组合物还包含至少一种具有抗-HCV活性的另外的化合物。在第二方面的第二个实施方案中,至少一种另外的化合物是干扰素或利巴韦林。在第二方面的第三个实施方案中,干扰素选自干扰素 α 2B、聚乙二醇化的干扰素 α 、复合干扰素、干扰素 α 2A 和类淋巴母细胞 (lymphoblastoid) 干扰素 τ 。

[0020] 在第二方面的第四个实施方案中,本公开提供包含式 (I) 化合物或其药学上可接受的盐、药学上可接受的载体和至少一种具有抗-HCV活性的另外的化合物的组合物,其中至少一种另外的化合物选自白介素 2、白介素 6、白介素 12、增强 1 型辅助 T 细胞反应的发展的化合物、干扰 RNA、反义 RNA、咪喹莫特、利巴韦林、肌苷-5'-单磷酸脱氢酶抑制剂、金刚烷胺和金刚乙胺。

[0021] 在第二方面的第五个实施方案中,本公开提供包含式 (I) 化合物或其药学上可接

受的盐、药学上可接受的载体和至少一种具有抗-HCV活性的另外的化合物的组合物,其中至少一种另外的化合物有效抑制选自以下的靶标的功能:HCV金属蛋白酶、HCV丝氨酸蛋白酶、HCV聚合酶、HCV解旋酶、HCV NS4B蛋白、HCV进入、HCV装配、HCV脱出(HCV egress)、HCV NS5A蛋白和治疗HCV感染的IMPDH。

[0022] 在第三方面,本公开提供包含式(I)化合物或其药学上可接受的盐、具有抗-HCV活性的一个、两个、三个、四个或五个另外的化合物和药学上可接受的载体的组合物。在第三方面的第一个实施方案中,组合物包含具有抗-HCV活性的三个或四个另外的化合物。在第三方面的第二个实施方案中,组合物包含具有抗-HCV活性的一个或两个另外的化合物。

[0023] 在第四方面,本公开提供在患者中治疗HCV感染的方法,该方法包括给予患者有效治疗量的式(I)化合物或其药学上可接受的盐。在第四方面的第一个实施方案中,该方法还包括在给予式(I)化合物或其药学上可接受的盐之前、之后或同时,给予至少一种具有抗-HCV活性的另外的化合物。在第四方面的第二个实施方案中,至少一种另外的化合物是干扰素或利巴韦林。在第四方面的第三个实施方案中,干扰素选自干扰素 α 2B、聚乙二醇化的干扰素 α 、复合干扰素、干扰素 α 2A和类淋巴母细胞干扰素 τ (tau)。

[0024] 在第四方面的第四个实施方案中,本公开提供在患者中治疗HCV感染的方法,该方法包括在给予式(I)化合物或其药学上可接受的盐之前、之后或同时,给予患者有效治疗量的式(I)化合物或其药学上可接受的盐和至少一种具有抗-HCV活性的另外的化合物,其中至少一种另外的化合物选自白介素2、白介素6、白介素12、增强1型辅助T细胞反应的发展的化合物、干扰RNA、反义RNA、咪喹莫特、利巴韦林、肌苷-5'-单磷酸脱氢酶抑制剂、金刚烷胺和金刚乙胺。

[0025] 在第四方面的第五个实施方案中,本公开提供在患者中治疗HCV感染的方法,该方法包括在给予式(I)化合物或其药学上可接受的盐之前、之后或同时,给予患者有效治疗量的式(I)化合物或其药学上可接受的盐和至少一种具有抗-HCV活性的另外的化合物,其中至少一种另外的化合物有效抑制选自以下的靶标的功能:HCV金属蛋白酶、HCV丝氨酸蛋白酶、HCV聚合酶、HCV解旋酶、HCV NS4B蛋白、HCV进入、HCV装配、HCV脱出、HCV NS5A蛋白和治疗HCV感染的IMPDH。

[0026] 在第五方面,本公开提供在患者中治疗HCV感染的方法,该方法包括在给予式(I)化合物或其药学上可接受的盐之前、之后或同时,给予患者有效治疗量的式(I)或其药学上可接受的盐和一个、两个、三个、四个或五个具有抗-HCV活性的另外的化合物。在第五方面的第一个实施方案中,该方法包括给予三个或四个另外的具有抗-HCV活性的化合物。在第五方面的第二个实施方案中,该方法包括给予一个或两个另外的具有抗-HCV活性的化合物。

[0027] 本公开的其他方面可包括本文公开的实施方案的适当的组合。

[0028] 可在本文提供的描述中发现另外的其他方面和实施方案。

[0029] 应该理解的是,本公开囊括的化合物是那些适宜稳定用作药物的化合物。

[0030] 本文的意图是,在一个分子中的特定位置的任何取代基或变量的定义,独立于在该分子中其它位置的该取代基或变量的定义。例如,三个 R^1 基团中的每一个可以相同或不同。

[0031] 在本说明书中引用的所有专利,专利申请和参考文献通过全文参考结合于本文。

在不一致的情况下,以本发明,包括定义为准。

[0032] 本文所用的单数形式“一”、“一个”和“该”包括复数范围,除非文中另有明确说明。

[0033] 应该理解的是,掺入式或流程的氘,可通过使用符号“D”、“d”或“²H”指明。

[0034] 本公开的化合物可作为药学上可接受的盐存在。本文所用的术语“药学上可接受的盐”表示本公开的化合物的盐或两性离子形式,它们是水溶性或油溶性的,或是可分散的,它们在合理的医学判断范围内,适用于与患者组织接触而无过度毒性、刺激性、变态反应或者其它问题或并发症,此与合理的利益/风险比相称,并有效用于其既定用途。可在化合物最终的分离和纯化期间制备其盐,或者可单独使合适的氮原子与合适的酸反应来制备化合物的盐。代表性的酸加成盐包括乙酸盐、己二酸盐、海藻酸盐、柠檬酸盐、天冬氨酸盐、苯甲酸盐、苯磺酸盐、硫酸氢盐、丁酸盐、樟脑酸盐、樟脑磺酸盐;二葡萄糖酸盐、甘油磷酸盐、半硫酸盐(hemisulfate)、庚酸盐、己酸盐、甲酸盐、富马酸盐、盐酸盐、氢溴酸盐、氢碘酸盐、2-羟基乙磺酸盐、乳酸盐、马来酸盐、均三甲基苯磺酸盐(mesitylenesulfonate)、甲磺酸盐、亚萘基磺酸盐、烟酸盐、2-萘磺酸盐、草酸盐、扑姆酸盐(palmoate)、果胶酸盐(pectinate)、过硫酸盐、3-苯基丙酸盐、苦味酸盐、新戊酸盐、丙酸盐、琥珀酸盐、酒石酸盐、三氯乙酸盐、三氟乙酸盐、磷酸盐、谷氨酸盐、碳酸氢盐、对甲苯磺酸盐和十一烷酸盐。可用于形成药学上可接受的加成盐的酸的实例包括无机酸及有机酸,无机酸有例如盐酸、氢溴酸、硫酸和磷酸,有机酸有例如草酸、马来酸、琥珀酸和柠檬酸。

[0035] 可以在化合物最终的分离和纯化期间通过使羧基与合适的碱(例如金属阳离子的氢氧化物、碳酸盐或碳酸氢盐)反应或者与氨或有机伯胺、仲胺或叔胺反应来制备碱加成盐。药学上可接受的盐的阳离子包括锂、钠、钾、钙、镁和铝,以及无毒的季铵阳离子例如铵、四甲基铵、四乙基铵、甲胺、二甲胺、三甲胺、三乙胺、二乙胺、乙胺、三丁胺、吡啶、N,N-二甲基苯胺、N-甲基哌啶、N-甲基吗啉、二环己胺、普鲁卡因、二苄胺、N,N-二苄基苯乙胺和N,N'-二苄基乙二胺。用于形成碱加成盐的其它代表性的有机胺包括乙二胺、乙醇胺、二乙醇胺、哌啶和哌嗪。

[0036] 如在本文使用的,术语“抗-HCV活性”是指化合物有效治疗HCV病毒。

[0037] 术语“本公开的化合物”和等同表述意指包括式(I)化合物和药学上可接受的对映体、非对映体及其盐。同样,提及中间体时意指包括本文允许的中间体的盐。

[0038] 术语“患者”包括人和其他哺乳动物两者。

[0039] 术语“药用组合物”意指包含与至少一种另外的药用载体组合的本公开化合物的组合物,所述药用载体,即佐剂、赋形剂或媒介物,为例如稀释剂、防腐剂、填充剂、流动调节剂、崩解剂、润湿剂、乳化剂、助悬剂、增甜剂、矫味剂、香味剂、抗菌剂、抗真菌剂、润滑剂和分散剂,取决于给药模式和剂型的性质。例如,可使用在Remington's 药物科学(Remington's Pharmaceutical Sciences),第18^版,Mack Publishing Company, Easton, PA (1999)中列出的成分。

[0040] 本文所用的词组“药学上可接受的”是指这样的化合物、原料、组合物和/或剂型,它们在合理医学判断的范围内,适用于与患者组织接触而无过度毒性、刺激性、变态反应或其它问题和并发症,此与合理的利益/风险比相称。

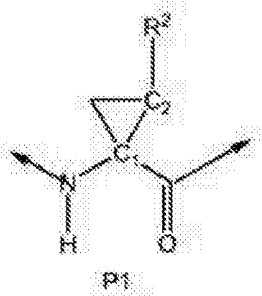
[0041] 术语“有效治疗量”意指足以显示出有意义的患者益处(例如持续减少病毒负荷)的各活性组分的总量。当用于单独的活性成分单独给药时,该术语仅指该成分。当组合应

用时,该术语则是指不论依次或同时联合给药时,都引起治疗效果的活性成分的合并量。

[0042] 术语“治疗(动词)”和“治疗(名词)”指的是:(i)在可易患疾病、障碍和/或病症但尚未被确诊患有疾病、障碍和/或病症的患者中防止疾病、障碍或病症的发生;(ii)抑制疾病、障碍或病症,即阻止其发展;和(iii)缓解疾病、障碍或病症,即使疾病、障碍和/或病症消退。

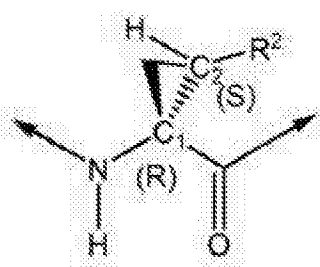
[0043] 在用于命名本公开的化合物时,如在本文使用的标记P1'、P1、P2、P2*、P3和P4,在图中标注(map)结合相对于天然肽裂解底物的结合的蛋白酶抑制剂的氨基酸残基相关的位置。裂解发生在P1和P1'之间的天然底物中,此处非引物位置指定从肽天然裂解位点的C-末端起始向N-末端延伸的氨基酸;反之,引物位置从裂解位点标记的N-末端起始和向C-末端延伸。例如,P1'指的是远离裂解位点的C-末端右手端的第一个位置(即N-末端第一个位置);反之,P1从C-末端裂解位点的左手侧开始编号,P2:自C-末端起始的第二个位置,等)。(参见Berger A. & Schechter I., Transactions of the Royal Society London series (1970), B257, 249-264]。

[0044] 本公开的化合物中存在不对称中心。例如,化合物可包括下式的P1环丙基部分
[0045]

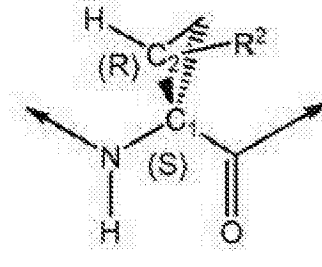


[0046] 其中C₁和C₂各代表在环丙基环的位置1和2的不对称碳原子。

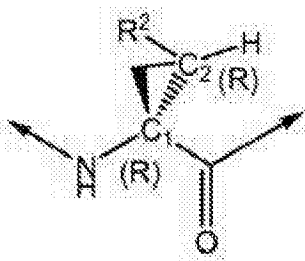
[0047]



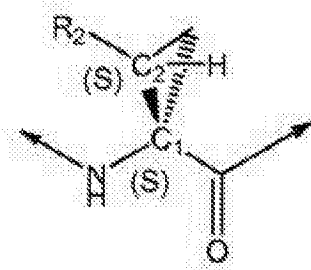
(1R, 2S)

 R^2 对羰基为顺式

(1S, 2R)

 R^2 对羰基为顺式

(1R, 2R)

 R^2 对酰胺为顺式

(1S, 2S)

 R^2 对酰胺为顺式

[0048] 应该理解的是,本公开囊括具有抑制 HCV 蛋白酶能力的所有立体化学形式或其混合物。

[0049] 本公开的某些化合物还可以不同的稳定构象形式存在,这类构象形式是可分离的。由于不对称单键周围阻碍旋转(例如因空间位阻或环张力)所致的扭转不对称性,可以使不同的构象异构体分离开来。本公开包括这些化合物的每一种构象异构体及其混合物。

[0050] 本公开的某些化合物可以两性离子的形式存在,且本公开包括这些化合物的各自的两性离子的形式和它们的混合物。

[0051] 当可用于治疗时,治疗有效量的式(I)化合物及其药学上可接受的盐可作为未加工的化学药品给予,还可作为药物组合物的活性成分提供。因此,本公开还提供药物组合物,该药物组合物包括治疗有效量的式(I)化合物或其药学上可接受的盐及一种或多种(优选1-3种)药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。式(I)化合物及其药学上可接受的盐如上描述。载体、稀释剂或赋形剂在与制剂中的其他成分相容的意义上说必须是可接受的,而无害于其接受者。依据本公开的另一面,也提供制备药物制剂的方法,其包括将式(I)化合物或其药学上可接受的盐与一或多种药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂混合。

[0052] 药物制剂可呈单位剂型,每个单位剂量含有预定量的活性成分。本公开的化合物的剂量水平介于约0.01-约150毫克/千克(“mg/kg”)体重/天之间,优选介于约0.05-约100 mg/kg 体重/天之间,常常以单一疗法用于预防或治疗HCV介导的疾病。本公开的药物组合物通常将按每天约1次至约5次或者作为连续输注给予。这类给药法可用作长期或短期疗法。可与载体材料混合以制备单一剂型的活性成分的量将根据待治疗的疾病、病情的严重程度、给药时间、给药途径、所用化合物的排泄速率、疗程和患者年龄、性别、体重和身

体状况而改变。优选的单位剂型制剂是含有本文上述活性成分的日剂量或分剂量或其适宜分数的单位剂型制剂。一般来说,用明显低于化合物最佳剂量的小剂量开始治疗。此后,以较小的增量来加大剂量直到在这类情况下达到最佳效果。一般而言,最理想地给予化合物的浓度水平是通常可在抗病毒方面提供有效结果而又不致于引起任何有害或有毒的副作用。

[0053] 当本公开的组合物包含本公开的化合物和一或多种另外的治疗剂和 / 或预防剂的组合时,化合物和另外的药剂两者均可以小于或等于在单一治疗方案中正常给予的剂量的剂量存在。可将本公开的组合物与一或多种例如,以单片和 / 或双 / 多层片剂的形式另外的治疗剂和 / 或预防剂共同配制,或可与治疗剂和 / 或预防剂分开给予。

[0054] 药物制剂可适合于通过任何合适的途径给药,例如通过口服(包括口颊或舌下含服)、直肠、鼻、局部(包括口颊、舌下或经皮)、阴道或胃肠外(包括皮下、皮内、肌内、关节内、滑膜内、胸骨内、鞘内、病灶内(intralesional)、静脉内或者真皮内注射或输注)途径。这类制剂可按药剂学领域的任何已知方法制备,例如通过将活性成分与载体或赋形剂混合。

[0055] 适合于口服给药的药物制剂可按独立的单位提供,例如胶囊剂或片剂;散剂或颗粒剂;水性或非水性液体中的溶液剂或混悬剂;可食用泡沫制剂或起泡制剂(whips);或水包油乳液剂或油包水乳液剂。

[0056] 举例来说,对于以片剂或胶囊剂形式的口服给药,活性药物组分可与药学上可接受的口服无毒惰性载体(例如乙醇、甘油、水等)相混合。通过将化合物粉碎成合适的微细尺寸,并与被同样粉碎的药用载体(例如淀粉或甘露醇等可食用的碳水化合物)混匀来制备散剂。还可存在矫味剂、防腐剂、分散剂和着色剂。

[0057] 通过制备如上所述的粉状混合物,并装填到成形的明胶壳内,来制备胶囊剂。在装填操作之前,可将助流剂和润滑剂(例如胶态二氧化硅、滑石粉、硬脂酸镁、硬脂酸钙或固态聚乙二醇)加到粉状混合物中。还可加入崩解剂或增溶剂(例如琼脂、碳酸钙或碳酸钠)以改善胶囊剂摄入后的药物利用度。

[0058] 此外,需要或必需时,也可将合适的粘合剂、润滑剂、崩解剂和着色剂掺到混合物中。合适的粘合剂包括淀粉、明胶、天然糖(例如葡萄糖或 β -乳糖)、玉米甜味剂、天然和合成树胶(例如阿拉伯树胶、西黄蓍胶或藻酸钠)、羧甲基纤维素、聚乙二醇等。用于这些剂型的润滑剂包括油酸钠、氯化钠等。崩解剂包括但不限于淀粉、甲基纤维素、琼脂、皂土、黄原胶等。例如,通过制成粉状混合物,制粒或预压片(slugging),添加润滑剂和崩解剂,压制成片,从而制成片剂。将适当粉碎的化合物与如上所述的稀释剂或基料,并任选与粘合剂(例如羧甲基纤维素、藻酸盐、明胶或聚乙烯吡咯烷酮)、溶液阻滞剂(例如石蜡)、吸收加速剂(例如季盐)和 / 或吸收剂(例如皂土、高岭土或磷酸二钙)混合,来制备粉状混合物。可用粘合剂(例如糖浆、淀粉浆、阿拉伯胶浆(acacia mucilage)或者纤维素材料或聚合材料溶液)润湿后加压过筛,将粉状混合物制粒。制粒的一个替代方法是,可将粉状混合物通过压片机,结果是将成形不佳的团块再击碎制成颗粒。可通过添加硬脂酸、硬脂酸盐、滑石粉或矿物油使颗粒润滑以防止粘到片剂成形冲模上。然后将经润滑的混合物压制成片剂。本公开的化合物还可与自由流动的惰性载体混合,无需通过制粒或预压片步骤便可直接压制成片剂。可提供透明或不透明的由虫胶密封衣、糖衣或聚合材料衣和蜡质抛光衣(polish

coating of wax) 组成的保护性包衣材料。可将染料加到这些包衣材料中以区别不同的单位剂量。

[0059] 口服液体例如溶液剂、糖浆剂和酞剂可以剂量单位形式制备,从以使定量含有预定量的化合物。糖浆剂可通过将化合物溶于适当调味的含水溶液中来制备,而酞剂可通过使用无毒溶媒制备。还可加入增溶剂和乳化剂(例如乙氧基化异硬脂醇和聚氧乙烯山梨醇醚)、防腐剂、矫味添加剂(例如薄荷油或天然甜味剂或糖精或其它人造甜味剂)等。

[0060] 如果适当的话,可将用于口服给药的剂量单位制剂微胶囊化。也可将制剂制成延时或持续释放,例如通过将微粒材料包衣或包埋在聚合物、蜡等中。

[0061] 式(I)化合物及其药学上可接受的盐还可以脂质体递药系统给予,例如小单层脂质体、大单层脂质体和多层脂质体。脂质体可由多种磷脂(例如胆固醇、十八烷基胺或磷脂酰胆碱)构成。

[0062] 式(I)化合物及其药学上可接受的盐也可通过使用单克隆抗体作为单独的载体(化合物分子与之偶联)递药。化合物也可与作为可靶向药物载体的可溶性聚合物偶联。这类聚合物可包括聚乙烯吡咯烷酮、吡喃共聚物、聚羟丙基甲基丙烯酸酰胺苯酚、聚羟乙基天冬酰胺苯酚或被棕榈酰残基取代的聚氧化乙烯聚赖氨酸。此外,化合物可与一类生物可降解的聚合物偶联,用于达到药物的控释,这类聚合物为例如聚乳酸、聚 ϵ -己内酯(polepsilon caprolactone)、聚羟基丁酸、聚原酸酯、聚缩醛、聚二氢吡喃、聚氰基丙烯酸酯和水凝胶的交联共聚物或两亲性嵌段共聚物。

[0063] 适于经皮给药的药物制剂可作为离散的贴剂(discrete patches)存在,以在长时间内保持与接受者表皮密切接触。例如,活性成分可由贴剂通过离子电渗疗法传递,一般如在 *Pharm Res.*, 3(6), 318, (1986) 中所述。

[0064] 适合于局部给药的药物制剂可制成软膏剂、乳膏剂、混悬剂、洗剂、散剂、溶液剂、糊剂、凝胶剂、喷雾剂、气雾剂或油剂。

[0065] 为治疗眼部或其它外部组织,例如口腔和皮肤,制剂优选作为局部软膏剂或霜剂使用。当制备软膏剂时,可使用所述活性成分与或者石蜡或者水-可溶混的软膏基质。或者,可将活性成分用水包油霜剂基质或油包水基质制成霜剂。

[0066] 适用于局部给予眼睛的药物制剂包括滴眼液,其中活性组分溶解或悬浮于适当的载体,特别是水性溶剂中。

[0067] 适用于口腔内局部给药的药物制剂包括锭剂(pastille)、软锭剂和口腔洗剂。

[0068] 适合于直肠给药的药物制剂可作为栓剂或作为灌肠剂提供。

[0069] 适应鼻部给药的药物制剂,其中载体为固体,包括用鼻吸入方式给药的粗粉,即通过从接近鼻子的粉剂容器中通过鼻通道快速吸入。适合于作为鼻腔喷雾剂或滴鼻剂给药的合适制剂(其中载体为液体)包括活性成分的水性溶液剂或油性溶液剂。

[0070] 适合于通过吸入给药的药物制剂包括微细粒子粉剂(dusts)或细雾剂(mists),其可用不同类型计量的剂量压缩气溶胶、雾化吸入器或吹入器制备。

[0071] 适合于阴道给药的药物制剂可以阴道栓、阴道塞、乳膏剂、凝胶剂、糊剂、泡沫剂或喷雾剂提供。

[0072] 适于胃肠外给药的药物制剂包括水性和非水性无菌注射溶液剂及水性和非水性无菌混悬剂,水性和非水性无菌注射溶液剂可含有抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂,并使制剂与

待接受者血液等渗的溶质；水性和非水性无菌混悬剂可包括悬浮剂和增稠剂。制剂可以单位剂量或多剂量容器提供，例如密封的安瓿和小瓶，并可保存在冷冻-干燥（冻干）条件下，只需在临用前即刻加入无菌液体载体例如注射用水。临用时配制的注射溶液剂和混悬剂可由无菌粉针剂、颗粒剂和片剂制备。

[0073] 应该理解，除了以上特别提到的成分以外，制剂还可包括与上述制剂类型有关的本领域常用的其它成分，例如适合于口服给药的这类制剂可包括矫味剂

[0074] 下表 1 中列出了一些可与本公开的化合物一起给药的示例性化合物的实例。在联合疗法中，本公开的化合物可与其它抗 HCV 活性化合物共同或分开给药，或者将化合物掺到组合物中。

[0075] 表 1

[0076]

商品名	生理类别	抑制剂或靶的类型	来源公司
NIM811		蛋白酶抑制剂	Novartis
日达仙(Zadaxin)		免疫调节剂	SciClone
Sovus		亚甲基蓝	Bioenvision
Actilon (CPG10101)		TLR9 激动剂	Coley
巴他布尔 (Batabulin) (T67)	抗癌药	β -微管蛋白抑制剂	Tularik Inc., South San Francisco, CA
ISIS 14803	抗病毒药	反义	ISIS Pharmaceuticals Inc, Carlsbad, CA/Elan Pharmaceuticals Inc., New York, NY
Summetrel	抗病毒药	抗病毒	Endo Pharmaceuticals Holdings Inc., Chadds Ford, PA
GS-9132 (ACH-806)	抗病毒药	HCV 抑制剂	Achillion/Gilead
吡啶并嘧啶化合 物和盐(得自 WO-2005/047288 05/26/2005)	抗病毒药	HCV 抑制剂	Arrow Therapeutics Ltd.
Levovirin	抗病毒药	IMPDPH 抑制剂	Ribapharm Inc., Costa Mesa, CA
美泊地布 (Merimepodib) (VX-497)	抗病毒药	IMPDPH 抑制剂	Vertex Pharmaceuticals Inc., Cambridge, MA

[0077]

商品名	生理类别	抑制剂或靶的类型	来源公司
XTL-6865 (XTL-002)	抗病毒药	单克隆抗体	XTL Biopharmaceutica Is Ltd., Rehovot, Israel
替拉瑞韦 (Telaprevir) (VX-950, LY-570310)	抗病毒药	NS3 丝氨酸蛋白酶 抑制剂	Vertex Pharmaceuticals Inc., Cambridge, MA/Eli Lilly and Co. Inc., Indianapolis, IN
HCV-796	抗病毒药	NS5B 复制酶抑制 剂	Wyeth/Viropharma
NM-283	抗病毒药	NS5B 复制酶抑制 剂	Idenix/Novartis
GL-59728	抗病毒药	NS5B 复制酶抑制 剂	Gene Labs/Novartis
GL-60667	抗病毒药	NS5B 复制酶抑制 剂	Gene Labs/Novartis
2'C MeA	抗病毒药	NS5B 复制酶抑制 剂	Gilead
PSI 6130	抗病毒药	NS5B 复制酶抑制 剂	Roche
R1626	抗病毒药	NS5B 复制酶抑制 剂	Roche
2'C 甲基腺苷	抗病毒药	NS5B 复制酶抑制 剂	Merck
JTK-003	抗病毒药	RdRp 抑制剂	Japan Tobacco Inc., Tokyo, Japan
Levovirin	抗病毒药	利巴韦林	ICN Pharmaceuticals, Costa Mesa, CA
利巴韦林	抗病毒药	利巴韦林	Schering-Plough Corporation, Kenilworth, NJ
Viramidine	抗病毒药	利巴韦林前药	Ribapharm Inc., Costa Mesa, CA
Heptazyme	抗病毒药	核酶	Ribozyme Pharmaceuticals Inc., Boulder, CO
BILN-2061	抗病毒药	丝氨酸蛋白酶抑制 剂	Boehringer Ingelheim Pharma KG, Ingelheim, Germany

[0078]

商品名	生理类别	抑制剂或靶的类型	来源公司
SCH 503034	抗病毒药	丝氨酸蛋白酶抑制剂	Schering Plough
Zadazim	免疫调节剂	免疫调节剂	SciClone Pharmaceuticals Inc., San Mateo, CA
Ceplene	免疫调节剂	免疫调节剂	Maxim Pharmaceuticals Inc., San Diego, CA
CellCept	免疫抑制剂	HCV IgG 免疫抑制 剂	F. Hoffmann-La Roche Ltd, Basel, Switzerland
Civacir	免疫抑制剂	HCV IgG 免疫抑制 剂	Nabi Biopharmaceutica Is Inc., Boca Raton, FL
Albuferon - α	干扰素	白蛋白 IFN- α 2b	Human Genome Sciences Inc., Rockville, MD
干扰素 A (Infergen A)	干扰素	IFN alfacon-1	InterMune Pharmaceuticals Inc., Brisbane, CA
Omega IFN	干扰素	IFN- ω	Intarcia Therapeutics
IFN- β 和 EMZ701	干扰素	IFN- β 和 EMZ701	Transition Therapeutics Inc., Ontario, Canada
利比(Rebif)	干扰素	IFN- β 1a	Serono, Geneva, Switzerland
罗惹德(Roferon A)	干扰素	IFN- α 2a	F. Hoffmann-La Roche Ltd, Basel, Switzerland
甘乐能(Intron A)	干扰素	IFN- α 2b	Schering-Plough Corporation, Kenilworth, NJ
甘乐能和日达仙	干扰素	IFN- α 2b/ α 1-胸腺素	RegeneRx Biopharma, Inc., Bethesda, MD/ SciClone Pharmaceuticals Inc, San Mateo, CA

[0079]

商品名	生理类别	抑制剂或靶的类型	来源公司
Rebetron	干扰素	IFN- α 2b/利巴韦林	Schering-Plough Corporation, Kenilworth, NJ
Actimmune	干扰素	INF- γ	InterMune Inc., Brisbane, CA
干扰素- β	干扰素	干扰素- β -1a	Serono
Multiferon	干扰素	长效 IFN	Viragen/Valentis
惠福仁 (Welliferon)	干扰素	类淋巴母细胞 IFN- α n1	GlaxoSmithKline plc, Uxbridge, UK
Omniferon	干扰素	天然 IFN- α	Viragen Inc., Plantation, FL
派罗欣(Pegasys)	干扰素	聚乙二醇化 IFN- α 2a	F. Hoffmann-La Roche Ltd, Basel, Switzerland
派罗欣和 Ceplene	干扰素	聚乙二醇化 IFN- α 2a/ 免疫调节剂	Maxim Pharmaceuticals Inc., San Diego, CA
派罗欣和利巴韦林	干扰素	聚乙二醇化 IFN- α 2a/利巴韦林	F. Hoffmann-La Roche Ltd, Basel, Switzerland
PEG-Intron	干扰素	聚乙二醇化 IFN- α 2b	Schering-Plough Corporation, Kenilworth, NJ
PEG-Intron/利巴韦林	干扰素	聚乙二醇化 IFN- α 2b/利巴韦林	Schering-Plough Corporation, Kenilworth, NJ
IP-501	保肝药	抗纤维变性	Indevus Pharmaceuticals Inc., Lexington, MA
IDN-6556	保肝药	半胱天冬酶抑制剂	Idun Pharmaceuticals Inc., San Diego, CA
ITMN-191 (R-7227)	抗病毒药	丝氨酸蛋白酶抑制剂	InterMune Pharmaceuticals Inc., Brisbane, CA
GL-59728	抗病毒药	NS5B 复制酶抑制剂	Genelabs
ANA-971	抗病毒药	TLR-7 激动剂	Anadys
MK 78009	抗病毒	丝氨酸蛋白酶抑制剂	Merck

[0080]

商品名	生理类别	抑制剂或靶的类型	来源公司
TMC-435350	抗病毒	丝氨酸蛋白酶抑制剂	Tibotec

[0081] 本公开的化合物还可用作实验室试剂。化合物可在为设计病毒复制实验、验证动物实验系统和结构生物学研究提供研究工具方面发挥作用,以进一步加深对 HCV 疾病机制的认识。此外,本公开的化合物可用于通过例如竞争性抑制来建立或确定其它抗病毒化合物的结合位点。

[0082] 本公开的化合物还可用来处理或防止病毒污染材料,从而降低接触这类材料的实验室人员或医务人员或患者感染病毒的风险,所述材料为例如血液、组织、手术器械和衣物、实验室仪器和衣物及采血或输血设备和材料。

[0083] 当通过合成方法制备,或者通过代谢过程(包括发生在人或动物身体内(体内)的那些过程)或者体外发生过程产生时,本公开意欲包括具有式(I)的化合物。

[0084] 现结合某些实施方案本描述本公开,但并不意欲使这些实施方案限定其范围。相反地,本公开将涵盖可包括在权利要求范围内的所有替换、修饰和等价物。因此,包括在特定实施方案中的下列实施例将举例说明本公开的实施例,应清楚的是这些实施例目的是用于示例性说明某些实施方案,并给出用以提供所认为是最有用的和易于理解其方法和概念性方面的说明。

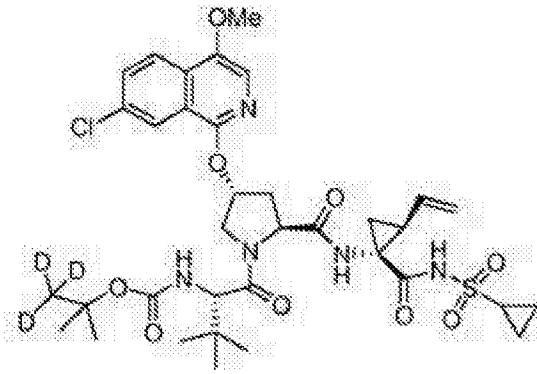
[0085] 用于本申请的缩写,包括特别在下列示例性流程和实施例中的缩写为本领域技术人员所熟知。所使用的一些缩写如下:Et₃N 为三乙胺;DPPA 为二苯基磷酰叠氮化物;h 或 hr 或 hrs 为小时;EtOAc 为乙酸乙酯;Ph 为苯基;min 或 mins 为分钟;RT 或 Rt 或 rt 为室温或保留时间(将由上下文决定);DMSO 为二甲亚砜;THF 为四氢呋喃;n-BuLi 为正-丁基锂;i-Pr 为异丙基;i-PrO 为异丙氧基;MeOH 为甲醇;TMS 为三甲基甲硅烷基,t-Bu 为叔-丁基;t-BuO 为叔-丁氧基;Ts 或 p-Ts 为对-甲苯磺酰基;iPr₂EtN 或 DIPEA 为二异丙基乙基胺;HATU 为 O-(7-氮杂苯并三唑-1-基)-N,N',N'-四甲基脒鎓六氟磷酸盐;Et 为乙基;和 Et₂O 为乙醚。

[0086] 用于合成本公开化合物的起始原料为本领域技术人员已知的,并且可易于制备或可经商购获得。

[0087] 提供下面提出的下列方法,用于说明的目的,并且不打算限制权利要求书的范围。应该认识到,制备这样的化合物,其中采用常规的保护性基团保护官能团,然后除去保护基团,以提供本公开的化合物,可能是必要的。涉及依据本公开使用保护基团的细节为本领域技术人员已知的。

[0088] 实施例 1001:化合物 1001 的制备

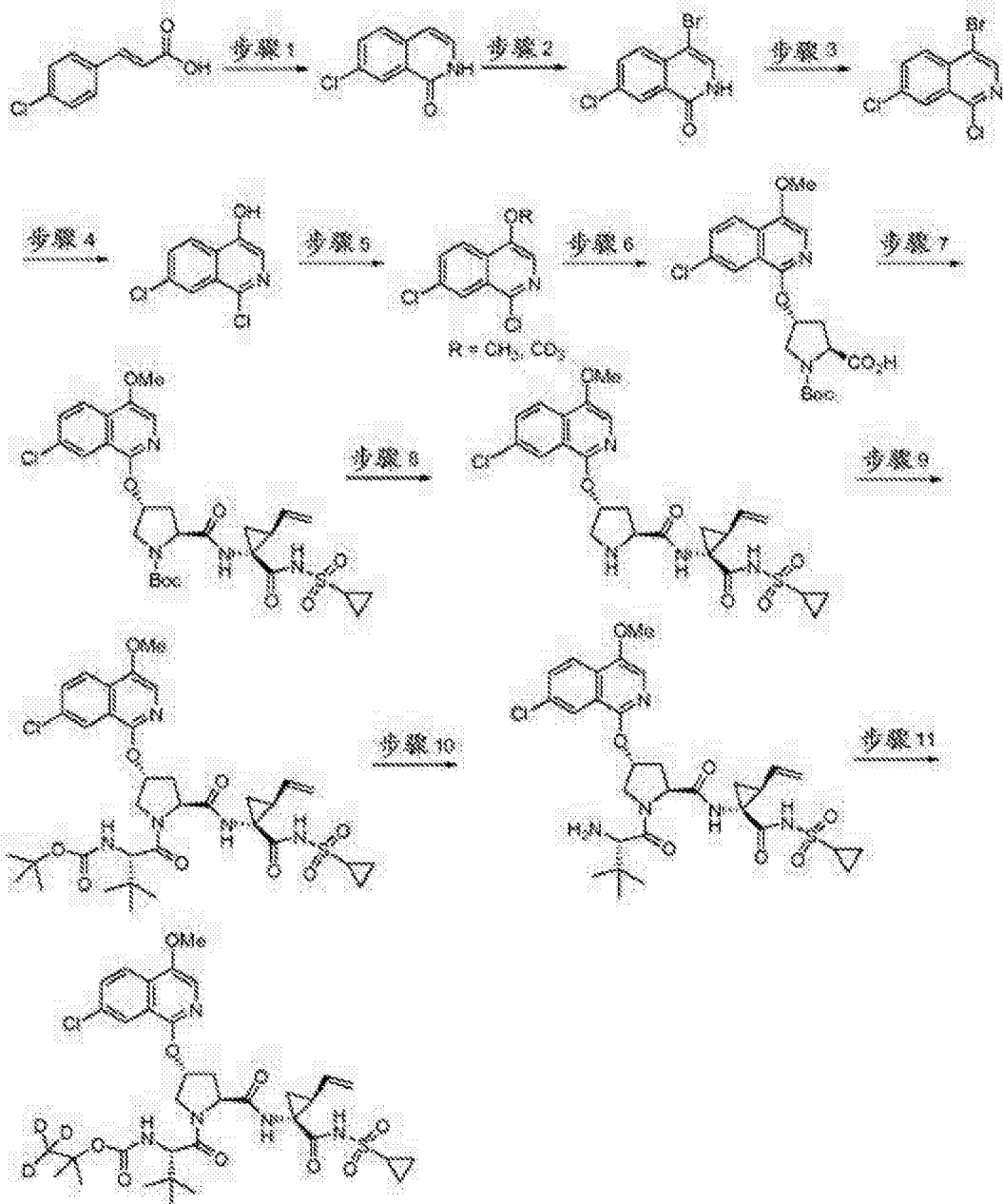
[0089]



[0090] 化合物 1001

[0091] 方案 1

[0092]



[0093] 步骤 1

[0094] 向 (*E*)-3-(4-氯苯基)丙烯酸 (18.3 g, 0.1 mol) 和 Et₃N (20.2 g, 0.2 mol) 于苯 (100 mL) 的溶液中逐滴加入 DPPA (27.5 g, 0.1 mol)。搅拌 2 h 后, 浓缩溶液和经色谱法纯化 (Biotage, 流动相 20/80 EtOAc/ 己烷), 得到 16 g 的固体样中间体叠氮化物。将该中间体溶解于 100 mL 的 Ph₂CH₂ 和经 30 min 时间使得到的混合物缓慢加热至 90°C。将反应混合物加热至回流和保持在该温度 3 h。在冷却至 RT 后, 沉淀的固体通过过滤收集并用甲苯洗涤, 提供 9.5 g 的 7-氯代异喹啉-1(2H)-酮 (53%)。

[0095]

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD)

δ ppm 6.66 (d, *J*=7.05 Hz, 1 H), 7.18 (d, *J*=7.05 Hz, 1 H), 7.66 (s, 1 H) 7.67 (d, *J*=2.01 Hz, 1 H), 8.24 (d, *J*=2.27 Hz, 1 H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-D₆) δ ppm 104.05, 125.62, 127.21, 128.54, 129.52, 130.77, 132.43, 136.55, 160.72; LC/MS, MS *m/z* (M+H)⁺ 180.

[0096] 步骤 2

[0097] 将实施例 1001 的步骤 1 的产物 7-氯代异喹啉-1(2H)-酮 (36.33 g, 203 mmol) 和 N-溴代琥珀酰亚胺 (39.74 g, 223.3 mmol) 于无水 CH₃CN (500 mL) 中的浆液, 经大约 2 h 的时间缓慢加热至温和回流并保持此温和回流 1.5 h。经 LC/MS 监测反应, 当完成时, 经 3 h 的时间使浆液缓慢冷却至室温。经过滤收集沉淀的固体, 并用 CH₃CN (100 mL x 3) 洗涤, 提供 47 g (90%) 的 4-溴-7-氯代异喹啉-1(2H)-酮。该物质无需进一步纯化而用于下一步骤。

[0098]

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ ppm 7.46(s, 1H), 7.81 (dd, *J*=8.40, 2.00

Hz, 1 H), 7.88 (d, *J*=8.8 Hz, 1 H), 8.27(d, *J*=2.00 Hz, 1 H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-D₆) δ ppm 96.68, 126.34, 127.58, 127.71, 130.73, 132.20, 133.47, 134.46, 159.88; LC/MS, MS *m/z* (M+H)⁺ 258.

[0099] 步骤 3

[0100] 将实施例 1001 的步骤 2 的产物 4-溴-7-氯代异喹啉-1(2H)-酮 (47 g, 182 mmol) 于 POCl₃ (200 mL, 2.15 mol) 中的不均匀溶液, 经 1 h 缓慢加热至回流。应当指出, 在该加热过程中, 将反应混合物变成均匀的。反应混合物保持回流 4 h, 然后冷却至室温并在真空中浓缩, 以除去过多的 POCl₃。为了确保完全去除残余的 POCl₃, 将残余物溶解于 CH₂Cl₂, 或备选地, 溶解于甲苯中并真空浓缩。根据需要重复该过程。(注意, POCl₃ 被相应地妥善安置在已贴标签的玻璃瓶中)。将残余物吸收至 600 mL 的 CH₂Cl₂ 中, 冷却至 -35°C, 中和且随后小心用 1N NaOH (400 mL) 碱化, 直至混合物呈弱碱性 (pH = 8)。将有机层分离, 用 H₂O 洗涤, 经 MgSO₄ 干燥并真空浓缩。残余的固体从 EtOAc (大约 50 mL) 中结晶, 得到 32 g 的 4-溴-1, 7-二氯代异喹啉。浓缩得自结晶过程中的母液并经 Biotage (16% EtOAc 在己烷中) 纯化, 提供另外的 4 g 固体样 4-溴-1, 7-二氯代异喹啉。总共得到 36 g (73%) 的 4-溴-1, 7-二氯代异喹啉。

[0101]

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 7.80 (dd, $J=8.81, 2.01$ Hz, 1 H), 8.14 (d, $J=9.06$ Hz, 1 H), 8.34 (d, $J=1.76$ Hz, 1 H), 8.48 (s, 1 H); $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm 118.39, 125.06, 127.59, 128.71, 133.89, 134.14, 134.93, 143.18, 148.98; LC/MS, MS m/z ($M+H$)⁺ 275.

[0102] 步骤 4

[0103] 向实施例 1001 步骤 3 的产物 4-溴-1,7-二氯代异喹啉 (22.16 g, 80 mmol) 于 THF (500 mL) 中的保持在 -78°C 的浆液中, 用 15 min 经套管逐滴加入 1.6 M *n*-BuLi 的己烷 (100 mL, 160 mmol) 的溶液 (内在温度保持 $<-65^\circ\text{C}$)。搅拌该溶液 0.5 h 并用 10 min 经注射器逐滴加入 (*i*-PrO)₃B (37 mL, 160 mmol) (内在温度保持 $<-65^\circ\text{C}$)。搅拌反应混合物 0.5 h 并用 10 min 经漏斗逐滴加入 30% H_2O_2 (80 mL, 776 mmol) (在加液时内在温度升至 -60°C) , 随后加入 1N NaOH 溶液 (80 mL, 80 mmol)。移去冷却浴并使反应混合物温热至室温, 并再搅拌 1 h。在通过 LC/MS 确认反应完成后, 使反应混合物冷却至 -40°C , 经 30 min 逐滴加入 100 g 的 Na_2SO_3 (0.793 摩尔) 于 400 mL H_2O 的溶液 (内在温度保持在 $5-10^\circ\text{C}$ 之间)。于 0°C , 用 6 N HCl (大约 50 mL) 中和得到的浆液, 以提供 pH ~ 6 。用 500 mL 的 EtOAc 稀释混合物, 并倾入一个 2 L 分液漏斗中。在反应容器中向留下的固体加入 500 mL 的 H_2O 和 300 mL 的 EtOAc, 并用 6 N HCl (大约 20 mL) 中和该混合物。在分液漏斗中合并有机层, 用盐水 (300 mL $\times 3$) 和 H_2O (200 mL $\times 3$) 洗涤。有机相经 MgSO_4 干燥, 过滤, 以除去干燥剂, 并浓缩, 得到粗产物, 用 50 mL 的 EtOAc 研磨。经过滤收集得到的固体, 用 EtOAc (3 \times 25 mL) 冲洗并干燥, 以提供 1,7-二氯代异喹啉-4-醇 (2 次运行: 12.0 g, 70% 和 13.8 g, 81%)。合并滤液, 浓缩和经 Biotage (35% EtOAc 在己烷中) 纯化, 得到额外的 2.1 g 的 BMS-796007。得到总共 27.9 g (82%) 的 1,7-二氯代异喹啉-4-醇。

[0104]

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) δ ppm 4.05 (s, 3 H), 7.4 (s, 1 H), 7.76 (dd, $J=8.8, 2$ Hz, 1 H), 8.16 (d, $J=2$ Hz, 1 H), 8.23 (d, $J=8.8$ Hz, 1 H); $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm 123.78, 124.66, 125.62, 127.03, 127.71, 130.72, 133.80, 137.63, 148.88; LC/MS, MS (m/z) ($M+H$)⁺ 213.

[0105] 步骤 5

[0106] 1,7-二氯-4-甲氧基异喹啉的制备:

[0107] 在保持 0°C 下, 向实施例 1001 步骤 4 的产物 1,7-二氯代异喹啉-4-醇 (16 g, 75.5 mmol) 于 MeOH/ CH_3CN (30 mL/300 mL) 的浆液中, 逐滴加入 2 M TMSCHN₂ 的己烷 (60 mL, 120 mmol) 溶液。使反应混合物温热至室温并搅拌 14 h。浓缩溶液, 并用 EtOAc (约 50 mL) 使残余的固体重结晶, 得到 8.1 g 的 1,7-二氯-4-甲氧基异喹啉, 其用 25% EtOAc 的己烷溶液洗涤。浓缩母液和经 Biotage (16% EtOAc 在己烷中) 纯化, 提供额外的 3.2 g 的固体样 1,7-二氯-4-甲氧基异喹啉。总共得到 11.3 g (66%) 的 1,7-二氯-4-甲氧基异喹啉。

[0108]

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 4.05 (s, 3 H), 7.67 (dd, $J=9.06$, 2.01 Hz, 1 H), 7.80 (s, 1 H), 8.16 (d, $J=8.81$ Hz, 1 H), 8.23 (d, $J=2.01$ Hz, 1 H); $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, DMSO-D_6) δ ppm 56.68, 122.70, 123.99, 124.14, 126.67, 127.83, 131.43, 134.10, 139.75, 149.94; LC/MS, MS m/z (M+H)⁺ 228.

[0109] 1, 7-二氯 -4-(*D*₃-甲氧基)异喹啉的制备:

[0110] 将实施例 1001 步骤 4 的 1, 7-二氯代异喹啉 -4-醇 (321 mg, 1.5 mmol)、 ICl_3 (217 mg, 1.500 mmol) 和 K_2CO_3 (622 mg, 4.50 mmol) 于丙酮 (10 mL) 中的混合物回流 20 h。过滤后, 浓缩滤液和经 Biotage, 以 10% 乙酸乙酯的己烷溶液洗提纯化, 得到 250 mg 的需要的固体样产物。LC/MS, MS (m/z) (M+H)⁺ 231.09。

[0111] 步骤 6

[0112] 于 10°C, 在搅拌中, 向实施例 1001 步骤 5 的产物 1, 7-二氯 -4-甲氧基异喹啉 (4.52 g, 20 mmol)、(2*S*, 4*R*)-1-(叔-丁氧基羰基)-4-羟基吡咯烷-2-羧酸 (5.08 g, 22 mmol) 和 *t*-BuOK (6.72 g, 60 mmol) 的混合物中, 加入 DMSO (200 mL)。用超声波处理得到的浆液 30 min, 以提供均匀的溶液, 其在室温下搅拌 3 h。使反应混合物冷却至 0°C 并通过加入 H_2O (50 mL) 猝灭。中和该混合物, 然后通过小心加入 1 N HCl 水溶液酸化至最终 pH 为 5。用 EtOAc (400 mL) 提取该混合物, 并用盐水 (200 mL)、 H_2O (200 mL x 2) 洗涤有机层, 随后经 MgSO_4 干燥并真空浓缩, 提供 8.36 g 的粗固体 (2*S*, 4*R*)-1-(叔-丁氧基羰基)-4-(7-氯-4-甲氧基异喹啉-1-基氧基) 吡咯烷-2-羧酸。该物质无需进一步纯化而用于下一步骤。

[0113]

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) δ ppm 2.34 - 2.47 (m, 1 H), 2.62 - 2.77 (m, 1 H), 3.70 - 3.92 (m, 2 H), 4.42 - 4.59 (m, 1 H), 5.65 (brs, 1 H), 7.54 (s, 1 H), 7.68 (dd, $J=8.81$, 2.01 Hz, 1 H), 8.02 - 8.13 (m, 2 H); $^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, DMSO-D_6) δ ppm 13.90, 14.04, 20.71, 22.02, 27.84, 27.98, 30.91, 35.00, 35.87, 51.84, 52.08, 56.21, 57.49, 57.80, 59.70, 73.32, 73.87, 79.14, 79.19, 119.11, 119.77, 122.38, 123.35, 128.50, 130.95, 132.25, 145.70, 151.94, 153.25, 153.71, 173.51, 173.98; MS (M+H)⁺ 423.

[0114] 步骤 7

[0115] 向实施例 1001 步骤 6 的产物 (2*S*, 4*R*)-1-(叔-丁氧基羰基)-4-(7-氯-4-甲氧基异喹啉-1-基氧基) 吡咯烷-2-羧酸 (8.36 g, 19.8 mmol)、(1*R*, 2*S*)-1-氨基-N-(环丙基磺酰基)-2-乙烯基环丙烷甲酰胺、TsOH 盐 (9.64g, 24 mmol) 和 $i\text{Pr}_2\text{EtN}$ (17.4 mL, 100 mmol) 于 CH_2Cl_2 (200 mL) 的溶液中, 加入 HATU (11.4 g, 31 mmol)。搅拌反应混合物 16 h, 真空浓缩并将残余物溶解于 EtOAc (300 mL) 中, 并用 1 N HCl (50 mL x 3)、水 (30 mL x 2) 和盐水 (50 mL x 2) 序贯洗涤。有机层经 MgSO_4 干燥, 浓缩并用 Biotage (25% 丙酮在己烷中) 纯化, 以提供 11.5 g 的粗产物 (2*S*, 4*R*)-4-(7-氯-4-甲氧基异喹啉-1-基

氧基)-2-((1*R*, 2*S*)-1-(环丙基磺酰基氨基甲酰基)-2-乙烯基环丙基氨基甲酰基)吡咯烷-1-羧酸叔-丁酯。该化合物经从 MeOH (40 mL) 结晶纯化, 得到 11 g (88%) 的结晶固体。

[0116]

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) δ ppm 1.03 - 1.31 (m, 8 H), 1.43 (s, 9H), 1.88 (dd, $J=8.06, 5.54$ Hz, 1 H), 2.17 - 2.36 (m, 2 H), 2.53 (dd, $J=13.72, 6.42$ Hz, 1 H), 2.90 - 3.03 (m, 1 H), 3.72 - 3.93 (m, 2 H), 4.40 (dd, $J=9.69, 6.92$ Hz, 1 H), 5.13 (d, $J=10.32$ Hz, 1 H), 5.31 (d, $J=17.12$ Hz, 1 H), 5.65 - 5.93 (m, 2 H), 7.55 (s, 1 H), 7.70 (dd, $J=8.94, 2.14$ Hz, 1 H), 8.06 (d, $J=2.01$ Hz, 1 H), 8.09 (d, $J=8.81$ Hz, 1 H); $^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm 5.47, 5.57, 5.75, 19.85, 22.38, 27.90, 27.99, 30.65, 30.72, 32.11, 33.81, 35.11, 36.30, 40.86, 41.59, 48.56, 52.39, 52.76, 56.24, 58.76, 59.21, 73.57, 74.06, 79.28, 80.06, 117.80, 119.16, 119.81, 119.88, 122.14, 123.48, 128.52, 131.00, 132.28, 133.38, 145.72, 151.77, 151.86, 154.06, 168.38, 169.13, 172.46, 173.27; MS: (M+H)⁺ 635.

[0117] 步骤 8

[0118] 使实施例 1001 步骤 7 的产物 (2*S*, 4*R*)-4-(7-氯-4-甲氧基异喹啉-1-基氧基)-2-((1*R*, 2*S*)-1-(环丙基磺酰基氨基甲酰基)-2-乙烯基环丙基氨基甲酰基)吡咯烷-1-羧酸叔-丁酯 (6.34 g, 10 mmol) 于含 3 mL 浓 HCl 的 50 mL 的 MeOH 的浆液回流 2 h。冷却溶液至室温并真空浓缩。用无水 Et_2O (50 mL) 处理固体残余物并真空浓缩溶液。重复该过程五次, 以确保完全去除水和溶解的 HCl, 提供 6.07 g 的作为 HCl 盐的 (2*S*, 4*R*)-4-(7-氯-4-甲氧基异喹啉-1-基氧基)-*N*-((1*R*, 2*S*)-1-(环丙基磺酰基氨基甲酰基)-2-乙烯基环丙基)吡咯烷-2-甲酰胺 (100%)。

[0119]

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) δ ppm 0.96 - 1.21 (m, 3 H), 1.22 - 1.30 (m, 1 H), 1.38 (dd, $J=9.57,$

[0120]

5.54 Hz, 1 H), 1.95 (dd, $J=8.06, 5.79$ Hz, 1 H), 2.25 - 2.46 (m, 2 H), 2.83 - 3.08 (m, 2 H), 3.75 - 3.90 (m, 2 H), 4.01 (s, 3 H), 4.70 (dd, $J=10.32, 7.81$ Hz, 1 H), 5.10 - 5.20 (m, 1 H), 5.33 (d, $J=17.12$ Hz, 1 H), 5.58 - 5.76 (m, 1 H), 5.88 (s, 1 H), 7.57 (s, 1 H), 7.74 (dd, $J=8.81, 2.01$ Hz, 1 H), 8.12 (d, $J=9.06$ Hz, 1 H), 8.28 (d, $J=2.01$ Hz, 1 H); $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CD_3OD) δ ppm 6.52, 6.65, 22.60, 31.99, 34.63, 37.04, 43.18, 52.95, 56.85, 60.56, 76.08, 119.06, 119.10, 121.65, 123.93, 124.63, 130.72, 132.37, 133.78, 134.76, 148.49, 153.02, 170.08, 170.67; LC/MS MS m/z (M+H)⁺ 535.

[0121] 步骤 9

[0122] 向保持在 0 °C 下的、实施例 1001 步骤 8 的产物、作为 HCl 盐的

(2S, 4R)-4-(7-氯-4-甲氧基异喹啉-1-基氧基)-N-((1R, 2S)-1-(环丙基磺酰基氨基甲酰基)-2-乙烯基环丙基)吡咯烷-2-甲酰胺 (6.07 g, 10 mmol) 于 100 mL CH_2Cl_2 的溶液中, 加入 8.7 mL 的 iPr_2EtN (50 mmol), 随后加入 Boc-L-叔-亮氨酸 (2.772 g, 12 mmol) 和 HATU (5.7 g, 15 mmol)。使反应混合物温热至 RT 并搅拌 16 h, 之后真空浓缩和将残余物溶解于 EtOAc (300 mL) 中。序费用 1N HCl (50 mL x 3)、 H_2O (30 mL x 2) 和盐水 (50 mL x 2) 洗涤 EtOAc 溶液。有机相经 MgSO_4 干燥并真空浓缩, 在用 Biotage (33% 丙酮在己烷中) 纯化之后得到粗产物, 提供 7 g (94%) 的所需产物。

[0123]

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) δ ppm 1.00-

1.06 (m, 11 H), 1.16 (s, 9 H), 1.14-1.24 (m, 2 H), 1.44 (dd, $J=9.32, 5.29$ Hz, 1 H), 1.88 (dd, $J=8.06, 5.54$ Hz, 1 H), 2.17 - 2.39 (m, 2 H), 2.59 (dd, $J=13.85, 6.80$ Hz, 1 H), 2.87 - 3.02 (m, 1 H), 4.00 (s, 3 H), 4.01 - 4.14 (m, 1 H), 4.17 - 4.24 (m, 1 H), 4.43 (d, $J=12.09$ Hz, 1 H), 4.52 - 4.65 (m, 1 H), 5.12 (d, $J=10.07$ Hz, 1 H), 5.30 (d, $J=16.87$ Hz, 1 H), 5.65 - 5.91 (m, 2 H), 7.56 (s, 1H), 7.68 (d, $J=9.06$ Hz, 1 H), 8.05 (s, 1 H), 8.09 (d, $J=9.06$ Hz, 1 H); MS: $(\text{M}+\text{H})^+$ 748.

[0124] 步骤 10

[0125] 向实施例 1001 步骤 9 的产物 (S)-1-((2S, 4R)-4-(7-氯-4-甲氧基异喹啉-1-基氧基)-2-((1R, 2S)-1-(环丙基磺酰基氨基甲酰基)-2-乙烯基环丙基氨基甲酰基)吡咯烷-1-基)-3, 3-二甲基-1-氧代丁-2-基氨基甲酸叔-丁酯 (2.469 g, 3.3 mmol) 中, 加入 4 M HCl (8.25 mL, 33.0 mmol) 的 1, 4-二氧六环溶液。于 25 ° C 搅拌形成的溶液 3 h。真空浓缩后, 向残余物中加入乙醚 (20mL), 然后再浓缩, 重复该过程 3 次。低真空干燥 (House vacuum drying) 得到 2.36 g (100%) 固体样粗产物, 其无需进一步纯化即用于下一步骤。MS: $(\text{M}+\text{H})^+$ 648.50。

[0126] 步骤 11

[0127] 实施例 1001 步骤 10 的产物 (2S, 4R)-1-((S)-2-氨基-3, 3-二甲基丁酰基)-4-(7-氯-4-甲氧基异喹啉-1-基氧基)-N-((1R, 2S)-1-(环丙基磺酰基氨基甲酰基)-2-乙烯基环丙基)吡咯烷-2-甲酰胺、HCl (30 mg, 0.044 mmol)、反应剂 2 (9.56 mg, 0.048 mmol) 和 N-乙基-N-异丙基丙-2-胺 (0.038 mL, 0.219 mmol) 于 CH_2Cl_2 (体积: 3 mL) 中的溶液搅拌 16 h。浓缩后, 残余物经制备型 HPLC 纯化, 得到 21 mg (64%) 为固体的所需产物化合物 1001。

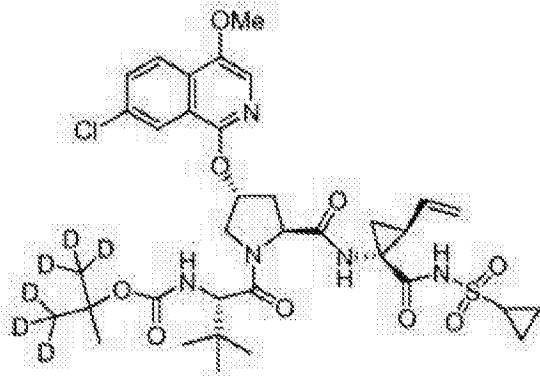
[0128]

¹H NMR (400

MHz, MeOD) δ ppm 0.99 - 1.13 (m, 11 H), 1.17 (s, 6 H), 1.21 - 1.32 (m, 2 H), 1.45 (dd, $J=9.4, 5.4$ Hz, 1 H), 1.89 (dd, $J=8.2, 5.4$ Hz, 1 H), 2.20 - 2.35 (m, 2 H), 2.61 (dd, $J=13.7, 6.9$ Hz, 1 H), 2.91 - 3.01 (m, 1 H), 4.01 (s, 3 H), 4.03 - 4.12 (m, 1 H), 4.18 - 4.23 (m, 1 H), 4.43 (s, 1 H), 4.57 (dd, $J=10.2, 7.2$ Hz, 1 H), 5.14 (dd, $J=10.3, 1.5$ Hz, 1 H), 5.32 (d, $J=17.1$ Hz, 1 H), 5.71 - 5.85 (m, 2 H), 7.58 (s, 1 H), 7.69 (dd, $J=8.5, 1.8$ Hz, 1 H), 8.06 (d, $J=1.8$ Hz, 1 H), 8.10 (d, $J=8.8$ Hz, 1 H); MS: (M+H)⁺ 751.31.

[0129] 实施例 1002: 化合物 1002 的制备

[0130]

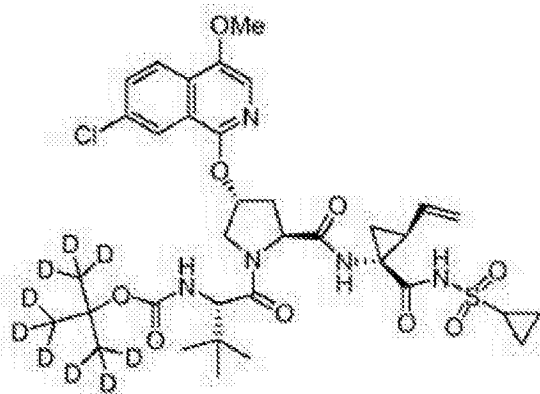


[0131] 化合物 1002

[0132] 通过如制备化合物 1001 描述的类似程序, 制备化合物 1002, MS: (M+H)⁺ 754.35。

[0133] 实施例 1003: 化合物 1003 的制备

[0134]



[0135] 化合物 1003

[0136] 通过如制备化合物 1001 描述的类似程序, 制备化合物 1003, MS: (M+H)⁺ 757.35。

[0137] 生物学研究

[0138] 可采用本领域已知的如下信息, 准备、实施和验证 HCV NS3/4A 蛋白酶复合物酶试验和基于细胞的 HCV 复制子试验:

[0139] 重组 HCV NS3/4A 蛋白酶复合物的生成

[0140] 如下描述生成源于 BMS 株、H77 株或 J4L6S 株的 HCV NS3 蛋白酶复合物。产生这些纯化的重组蛋白质,用于均相试验法 (homogeneous assay) (见下文),以提供本公开的化合物将如何有效地抑制 HCV NS3 蛋白质分解活性的指示。

[0141] 从 Dr. T. Wright, 圣弗朗西斯科医院 (San Francisco Hospital) 获得来自 HCV- 感染患者的血清。从由通过血清 RNA (核糖核酸) 的逆转录-PCR (RT-PCR) 获得的 DNA 片段,和使用基于其它基因型 1a 株之间同源性而选择的引物,构造 HCV 基因组 (BMS 株) 的基因工程的全长 cDNA (互补脱氧核糖核酸) 模板。根据 Simmonds 等人的分类法 (参见 P Simmonds, KA Rose, S Graham, SW Chan, F McOmish, BC Dow, EA Follett, PL Yap 和 H Marsden, *J. Clin. Microbiol.*, 31(6), 1493-1503 (1993)),从测定整个基因组序列,将基因型 1a 归属于 HCV 分离物。据显示非结构区域 NS2-5B 的氨基酸序列与 HCV 基因型 1a (H77) 有 > 97% 的同一性和与基因型 1b (J4L6S) 有 87% 的同一性。自 R. Purcell (NIH) 获得感染克隆系 H77 (1a 基因型) 和 J4L6S (1b 基因型),且序列在 Genbank 中公布 (AAB67036, 参见 Yanagi, M., Purcell, R.H., Emerson, S.U. 和 Bukh, *J. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94 (16), 8738-8743 (1997); AF054247, 参见 Yanagi, M., St Claire, M., Shapiro, M., Emerson, S.U., Purcell, R.H. 和 Bukh, J., *Virology* 244 (1), 161-172. (1998))。

[0142] 将 H77 和 J4L6S 株用于产生重组体 NS3/4A 蛋白酶复合物。如由 P. Gallinari 等 (参见 Gallinari P, Paolini C, Brennan D, Nardi C, Steinkuhler C, De Francesco R. *Biochemistry.* 38(17): 5620-32, (1999)) 描述的,操控编码这些株的重组体 HCV NS3/4A 蛋白酶复合物 (氨基酸 1027-1711) 的 DNA。简言之,在 NS4A 编码区的 3'-端加入三个赖氨酸增溶尾 (solubilizing tail)。将 NS4A-NS4B 裂解位点 (氨基酸 1711) 的 P1 位置中的半胱氨酸换成甘氨酸,以避免赖氨酸尾端 (tag) 的蛋白水解。此外,在氨基酸位置 1454 处通过 PCR 引入半胱氨酸向丝氨酸突变,以防止在 NS3 解旋酶域中自溶裂解。在 pET21b 细菌表达载体 (Novagen) 中克隆变异 DNA 片段,并根据 P. Gallinari 等人描述的、经修改的规程 (参见 Gallinari P, Brennan D, Nardi C, Brunetti M, Tomei L, Steinkuhler C, De Francesco R., *J Virol.* 72(8): 6758-69 (1998)),在大肠杆菌 (*Escherichia. coli*) 株 BL21 (DE3) (Invitrogen) 中表达 NS3/4A 复合物。简言之,在 20°C 下用 0.5 毫摩尔 (mM) 异丙基 β -D-1-硫代半乳糖吡喃糖苷 (thiogalactopyranoside, IPTG) 诱导 NS3/4A 蛋白酶复合物表达 22 小时。典型的发酵 (1 升 (L)) 产生大约 10 克 (g) 湿细胞糊 (wet cell paste)。将所述细胞再悬浮在溶胞缓冲液 (10 mL/g) 中,所述溶胞缓冲液由 25 mM *N*-(2-羟基乙基) 哌嗪-*N*-(2-乙磺酸) (HEPES), pH 7.5、20% 丙三醇、500 mM 氯化钠 (NaCl)、0.5% Triton X-100、1 微克/毫升 ("µg/mL") 溶菌酶、5 mM 氯化镁 (MgCl₂)、1 µg/ml Dnase I、5 mM β -巯基乙醇 (β ME) 组成,无蛋白酶抑制剂-乙二胺四乙酸 (EDTA) (Roche),在 4°C 下匀浆并培养 20 分钟 (min)。该匀浆液经在 4°C 下、235000g 超速离心 1 小时的超声处理和澄清。向上清液中加入咪唑至最终浓度为 15mM,并将 pH 值调节至 8.0。将该粗制蛋白质提取物加载在用缓冲液 B (25 mM HEPES, pH 8.0、20% 丙三醇、500 mM NaCl、0.5% Triton X-100、15 mM 咪唑、5 mM β ME) 预平衡的镍-次氨基三乙酸 (Ni-NTA) 柱上。以 1 mL/min 的流速加载样品。用 15 倍柱体积的缓冲液 C (与缓冲液 B 相同,但含 0.2% Triton X-100) 洗涤该柱。用 5 倍柱体积的缓冲液 D (与缓冲液 C 相同,但含 200 mM 咪唑) 洗脱该蛋白质。

[0143] 汇集含 NS3/4A 蛋白酶复合物的部分,并将其加载在用缓冲液 D (25 mM HEPES, pH 7.5、20% 丙三醇、300 mM NaCl、0.2% Triton X-100、10 mM β ME) 预平衡的脱盐柱 Superdex-S200 上。以 1 mL/min 的流速加载样品。汇集含 NS3/4A 蛋白酶复合物的部分并浓缩至大约 0.5 mg/ml。通过 SDS-PAGE 和质谱分析判断,衍生自 BMS、H77 和 J4L6S 株的 NS3/4A 蛋白酶复合物的纯度大于 90%。将该酶储存在 -80°C 下,在冰上解冻并在使用之前在试验缓冲液中稀释。

[0144] *FRET* 肽检验法以监测 HCV NS3/4A 蛋白水解活性

[0145] 这种体外检验法的目的是检测本公开的化合物对如上所述的衍生自 BMS 株、H77 株或 J4L6S 株的 HCV NS3 蛋白酶复合物的抑制。该检验法提供本公开的化合物将如何有效地抑制 HCV NS3 蛋白水解活性的指示。

[0146] 为了监测 HCV NS3/4A 蛋白酶活性,使用 NS3/4A 肽底物。该底物是 Taliani 等人在 *Anal. Biochem.* 240(2): 60-67(1996) 中描述的 RET S1 (共振能量转移缩酚肽底物 (Resonance Energy Transfer Depsipeptide Substrate); AnaSpec, Inc. cat # 22991) (FRET 肽)。该肽的序列大致基于 HCV NS3 蛋白酶的 NS4A/NS4B 自然裂解位点,只是在该裂解位点处存在酯键而非酰胺键。该肽也在肽的一个末端附近含有荧光供体 EDANS,而在另一末端附近含有受体 DABCYL。通过供体与受体之间的分子间共振能量转移 (RET) 猝灭肽的荧光,但随着 NS3 蛋白酶裂解该肽,从 RET 猝灭中释放出产物且供体的荧光变得明显。

[0147] 在存在或不存在本公开的化合物的情况下,用三种重组体 NS3/4A 蛋白酶复合物之一培养肽底物。通过使用 Cytofluor Series 4000 实时监测荧光反应产物的形成,测定化合物的抑制效应。

[0148] 试剂如下:HEPES 和丙三醇 (Ultrapure) 自 GIBCO-BRL 获得。二甲亚砜 (DMSO) 自 Sigma 获得。 β -巯基乙醇自 Bio Rad 获得。

[0149] 试验缓冲液:50 mM HEPES, pH 7.5;0.15 M NaCl;0.1% Triton;15% 丙三醇;10 mM β ME。底物:2 μ M 最终浓度(来自储存在 -20°C 下的在 DMSO 中的 2mM 储备溶液)。HCV NS3/4A 蛋白酶 1a (1b) 类型,2-3 nM 最终浓度(来自在 25 mM HEPES 中的 5 μ M 储备溶液, pH 7.5, 20% 丙三醇, 300 mM NaCl, 0.2% Triton-X100, 10 mM β ME)。对于效价强度接近检验限 (assay limit) 的化合物,通过向试验缓冲液中添加 50 μ g/ml 胎牛血清白蛋白 (Sigma) 并将最终蛋白酶浓度降至 300 pM 来使该检验更加敏感。

[0150] 在来自 Falcon 的 96 孔聚苯乙烯黑板中进行检验。各孔含有在试验缓冲液中的 25 μ l NS3/4A 蛋白酶复合物、50 μ l 在 10% DMSO/试验缓冲液中的本公开的化合物和 25 μ l 在试验缓冲液中的底物。也在相同的检验板上制备对照物(无化合物)。将该酶复合物与化合物或对照溶液混合 1 min,然后通过添加底物来引发酶促反应。立即使用 Cytofluor Series 4000 (Perspective Biosystems) 读取检验板。将该仪器设定为发射波长 340 nm 和激发波长 490 nm,在 25°C 下读取数据。反应通常进行大约 15 min。

[0151] 用下列公式计算抑制百分比:

$$[0152] \quad 100 - [(\delta F_{\text{inh}} / \delta F_{\text{con}}) \times 100]$$

[0153] 其中 δF 是该曲线的线性范围内的荧光变化。对抑制-浓度数据应用非线性曲线拟合,并使用公式 $y = A + (B - A) / (1 + ((C/x)^D))$,用 Excel XLfit 软件计算 50% 有效浓度 (IC_{50})。

[0154] 据发现,本公开化合物,其被测试对多于一种类型的 NS3/4A 复合物的抑制,具有类似抑制性质,尽管所述化合物一律表现出对 1b 株比对 1a 株更高的效价强度。

[0155] *特异性检验*

[0156] 进行特异性检验以证明与其它丝氨酸或半胱氨酸蛋白酶相比,本公开的化合物在抑制 HCV NS3/4A 蛋白酶复合物方面具有体外选择性。

[0157] 测定本公开的化合物对抗各种丝氨酸蛋白酶的特异性:人中性粒细胞弹性蛋白酶(HNE)、猪胰弹性蛋白酶(PPE)和人胰糜蛋白酶和一种半胱氨酸蛋白酶:人肝组织蛋白酶B。在所有情况下,如上所述使用如之前(PCT 专利申请号 WO 00/09543)描述的、对丝氨酸蛋白酶检验经过一些修改的 96 孔板格式规程(其使用对各酶有特异性的荧光氨基-甲基-香豆素(AMC)底物)。所有酶均购自 Sigma、EMDbiosciences,而底物来自 Bachem、Sigma 和 EMDbiosciences。

[0158] 化合物浓度随其效价强度不同从 100 到 0.4 μM 不等。通过将底物添加到在室温下预培养 10 min 的酶-抑制剂中,并水解至在 cytofluor 上检测到 15% 转化,各自引发酶检验。

[0159] 各检验的最终条件如下:

[0160] 50 mM 三(羟甲基)氨基甲烷盐酸盐(Tris-HCl) pH 8.0、0.5 M 硫酸钠(Na_2SO_4)、50 mM NaCl、0.1 mM EDTA、3% DMSO、含 5 μM LIVY-AMC 的 0.01% 吐温-20,和 1 nM 糜蛋白酶;

[0161] 50 M Tris-HCl, pH 8.0、50 mM NaCl、0.1 mM EDTA、3% DMSO、0.02% 吐温-20、5 μM succ-AAPV-AMC 和 20 nM HNE 或 8 nM PPE;

[0162] 100 mM NaOAc(乙酸钠) pH 5.5、3% DMSO、1 mM TCEP(三(2-羧乙基)膦盐酸盐)、5 nM 组织蛋白酶 B(在使用之前在含 20 mM TCEP 的缓冲液中激活的酶储备溶液)和在 H_2O 中稀释的 2 μM Z-FR-AMC。

[0163] 使用下式计算抑制百分比:

[0164] $[1 - ((\text{UV}_{\text{inh}} - \text{UV}_{\text{空白}}) / (\text{UV}_{\text{ctl}} - \text{UV}_{\text{空白}}))] \times 100$

[0165] 将非线性曲线拟合应用于抑制-浓度数据,并使用 Excel XLfit 软件计算 50% 有效浓度(IC_{50})。

[0166] *HCV 复制子的生成*

[0167] 如由 Lohmann V, Korner F, Koch J, Herian U, Theilmann L, Bartenschlager R., Science 285(5424):110-3 (1999) 描述的,建立 HCV 复制子全细胞系统。该系统使发明人能够评测 HCV 蛋白酶化合物对 HCV RNA 复制的影响。简言之,使用 Lohmann 论文中所述的 HCV 株 1b 序列(索取号:AJ238799),由 Operon Technologies, Inc. (Alameda, CA) 合成了 HCV cDNA,然后使用标准分子生物技术在质粒 pGem9zf(+) (Promega, Madison, WI) 中组装全长复制子。该复制子由下列构成:(i) 融合到壳体蛋白的前 12 个氨基酸上的 HCV 5' UTR, (ii) 新霉素磷酸转移酶基因(neo), (iii) 来自脑心肌炎病毒(EMCV)的 IRES,和 (iv) HCV NS3 至 NS5B 基因和 HCV 3' UTR。用 ScaI 使质粒 DNAs 线性化,并在体外使用 T7 MegaScript 转录试剂盒(Ambion, Austin, TX) 根据制造商的指示,合成 RNA 转录物。将 cDNA 的体外转录物转染到人肝细胞瘤细胞系 HUH-7 中。在可选择的标记物新霉素(G418)的存在下,实现在组成上表达 HCV 复制子的细胞的选择。随时间的推移针对正链和负链 RNA 产生和蛋白质产生,表征所得到的细胞系。

[0168] HCV复制子 FRET检验法

[0169] 开发 HCV 复制子 FRET 检验法,以监测本公开中所述的化合物对 HCV 病毒复制的抑制效应。在含有 10% 胎牛血清 (FCS) (Sigma) 和 1 mg/ml G418 (Gibco-BRL) 的 Dulbecco's 改良 Eagle 培养基 (Dulbecco's Modified Eagle Media, DMEM) (Gibco-BRL) 中使在组成上表达 HCV 复制子的 HUH-7 细胞生长。在前夜 (night before) 将细胞接种 (1.5×10^4 个细胞 / 孔) 在 96 孔组织培养无菌板中。在稀释板的含 4% FCS、1: 100 青霉素 / 链霉素 (Gibco-BRL)、1: 100 L- 谷氨酰胺和 5% DMSO 的 DMEM 中,制备化合物和无化合物的对照物 (在该检验中最终浓度 0.5% DMSO)。向细胞中加入化合物 /DMSO 混合物,并在 37°C 下培养 4 天。4 天后,首先针对 CC_{50} 读数使用阿尔玛蓝 (Alamar Blue) (Trek Diagnostic Systems) 评估细胞的细胞毒性。通过将 1/10 体积的阿尔玛蓝添加到培养细胞的培养基中,测定化合物的毒性 (CC_{50})。4 小时后,在 530 nm 激发波长和 580 nm 发射波长下使用 Cytofluor Series 4000 (Perspective Biosystems) 读取来自各孔的荧光信号。然后用磷酸盐缓冲液 (PBS) ($150 \mu\text{l}$ 3 次) 充分漂洗各板。用 $25 \mu\text{l}$ 含 HCV 蛋白酶底物的溶胞检验试剂 (5X 细胞荧光素酶细胞培养溶胞试剂 (Promega #E153A),用蒸馏水稀释至 1X,添加 NaCl 至 150 mM 最终浓度, FRET 肽底物 (如上文对酶检验法所述) 由在 100% DMSO 中的 2 mM 储备溶液稀释至 $10 \mu\text{M}$ 最终浓度) 溶解细胞。然后将该板放入已设定至 340 nm 激发波长 /490 nm 发射波长的 Cytofluor 4000 仪器中,自动模式运行 21 个周期,并以动态模式读取该板。如对 IC_{50} 测定所述进行 EC_{50} 测定。

[0170] HCV复制子荧光素酶报告基因检验法

[0171] 作为第二个检验法,在复制子荧光素酶报告基因检验法 (luciferase reporter assay) 中,验证来自复制子 FRET 检验法的 EC_{50} 测定结果。Krieger 等人 (Krieger N, Lohmann V 和 Bartenschlager R, *J. Virol.* 75(10): 4614-4624 (2001)) 最先描述了复制子荧光素酶报告基因检验法的应用。通过插入编码 Renilla 荧光素酶基因的人源化形式的 cDNA 和直接融合到荧光素酶基因的 3' - 端上的连接子序列,修饰对发明人的 FRET 检验法所述的复制子构造。使用位于刚好在新霉素标记基因上游的核中的 AscI 限制位点,将这种插入物引入复制子构造中。在位置 1179 (丝氨酸至异亮氨酸) 处也引入了适应性突变 (Blight KJ, Kolykhalov, AA, Rice, CM, *Science* 290(5498): 1972-1974)。如上所述产生在组成上表达这种 HCV 复制子构件的稳定细胞系。如对 HCV 复制子 FRET 检验法所述,加上下列的修改,设置荧光素酶报告基因检验法。在 37°C / 5% CO_2 培养器中 4 天后,使用 Promega Dual-Glo 荧光素酶检验系统分析细胞的 Renilla 荧光素酶活性。从含细胞的各孔中取出培养基 ($100 \mu\text{l}$)。向其余 $50 \mu\text{l}$ 培养基中,加入 $50 \mu\text{l}$ Dual-Glo 荧光素酶试剂,并将板在室温下摇动 10 min 至 2 h。然后向各孔中加入 Dual-Glo Stop & Glo 试剂 ($50 \mu\text{l}$),并将板在室温下再摇动 10 min 至 2 h。在 Packard TopCount NXT 上使用荧光程序读板。

[0172] 使用下式计算抑制百分比:

[0173]

$$\% \text{控制} = \frac{\text{实验孔中(+化合物)平均荧光素酶信号}}{\text{DMSO 对照孔中(-化合物)平均荧光素酶信号}}$$

[0174] 使用 XLFit 绘制和分析数值,以获得 EC_{50} 值。

[0175] 对于本领域技术人员显而易见的是,本公开并不限于前述说明性实施例,而且可以体现在其它具体形式中而又不偏离其实质特性。因此,预期各实施例在所有方面都被视作说明性的且非限制性的,应参照所附权利要求书,而不是前述实施例,因此,在所附权利要求书等同内容的含义和范围内的所有变化都意欲包括在本文中。