[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 03806463.4

[51] Int. Cl.
C07D 471/14 (2006.01)
A61K 31/55 (2006.01)
A61P 31/18 (2006.01)
C07D 243/00 (2006.01)
C07D 221/00 (2006.01)

[45] 授权公告日 2007 年 5 月 30 日

[11] 授权公告号 CN 1318420C

[22] 申请日 2003.3.24 [21] 申请号 03806463.4

[30] 优先权

[32] 2002. 3.27 [33] US [31] 60/367,971

[86] 国际申请 PCT/CA2003/000418 2003.3.24

[87] 国际公布 WO2003/080612 英 2003.10.2

[85] 进入国家阶段日期 2004.9.20

[73] 专利权人 贝林格尔·英格海姆国际有限公司

地址 德国英格海姆

[72] 发明人 杰弗里·奥米拉 布鲁诺·西莫尼厄 克里斯琴·约基姆 罗伯特·德齐尔 威廉·W·奥吉尔维

[56] 参考文献

WO 03011862A 2003.2.13

WO 0196338A1 2001.12.20

US 5705499A 1998.1.6

WO 02076982A 2002.10.3

EP 0767172A1 1997.4.9

novel nonnucleoside inhibitors of hiv - 1reversetranscriptase. 7. 8 - arylethyldipyridodiazepinones aspotentbroad - spectrum inhibitors of wild - type and mutantenzymes j. m. klumder et al,j. med. chem. ,Vol. 41 No. 16 1998

novel nonnucleoside inhibitors ofhiv - 1reversetranscriptase. 8. 8 - aryloxymethyl - and8 - arylthiomethyldipyridodiazepinones c. l. cywin et al,j. med. chem. ,Vol. 41 No. 16 1998

审查员 孙 燕

[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

代理人 张平元 赵仁临

权利要求书 2 页 说明书 29 页

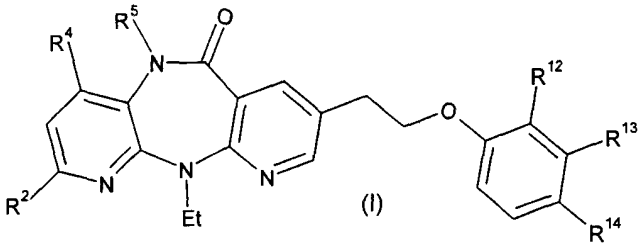
[54] 发明名称

二吡啶并二氮杂䓬酮类反转录酶抑制剂

[57] 摘要

本发明公开了可用作 HIV 反转录酶抑制剂的式 I 化合物或其盐或前药，其中 R^2 为 H、卤素、(C_{1-4})烷基、O(C_{1-4})烷基、HN(C_{1-4}烷基)或 N(C_{1-4}烷基)$_2$；R^4为 H 或 CH_3；R^5为 H 或 CH_3；R^{12}为 H、卤素、(C_{1-4})烷基、CF_3或 NO_2；R^{13}为 H、(C_{1-4})烷基、卤素、OH 或 NH_2，条件是 R^{12}与 R^{13}不都为 H；及 R^{14}为 $COOR^{14a}$，其中 R^{14a}为 H 或(C_{1-6})烷基；或 R^{14}为(C_{2-4})烯基 - $COOR^{14a}$，其中 R^{14a}如文中定义；或 R^{14}为(C_{1-4})烷基 - $COOR^{14a}$，其中 R^{14a}的定义同上。

1. 一种式 I 化合物:



(I)

其中,

R^2 为 H、卤素、(C_{1-4})烷基、$O(C_{1-4})$烷基、$HN(C_{1-4}$烷基)或 $N(C_{1-4}$烷基$)_2$;

R^4 为 H 或 CH_3;

R^5 为 H 或 CH_3,条件是 R^4 及 R^5 不相同;

R^{12} 为 H、卤素、(C_{1-4})烷基、CF_3 或 NO_2;

R^{13} 为 H、(C_{1-4})烷基、卤素、OH 或 NH_2,条件是 R^{12} 与 R^{13} 不同时为 H;及

R^{14} 为 $COOR^{14a}$,其中 R^{14a} 为 H 或(C_{1-6})烷基;或 R^{14} 为(C_{2-4})烯基-$COOR^{14a}$,其中 R^{14a} 定义同上;或 R^{14} 为(C_{1-4})烷基-$COOR^{14a}$,其中 R^{14a} 定义同上,

或其盐。

2. 如权利要求 1 的化合物,其中 R^2 为 H、卤素、(C_{1-4})烷基、$O(C_{1-4})$烷基或 $N(C_{1-4}$烷基$)_2$,且 R^4 与 R^5 不相同。

3. 如权利要求 2 的化合物,其中 R^2 为 H、Cl、F、(C_{1-4})烷基、$O(C_{1-4})$烷基或 $N(C_{1-4}$烷基$)_2$。

4. 如权利要求 3 的化合物,其中 R^2 为 H、Cl、F、CH_3、OMe 或 OEt。

5. 如权利要求 4 的化合物,其中 R^2 为 H。

6. 如权利要求 1 的化合物,其中 R^4 为 H。

7. 如权利要求 1 的化合物,其中 R^5 为 CH_3。

8. 如权利要求 1 的化合物,其中 R^{12} 为卤素、(C_{1-4})烷基、CF_3 或 NO_2。

9. 如权利要求 8 的化合物,其中 R^{12} 为 Br、Cl、CH_3 或 CH_3CH_2。

10. 如权利要求 9 的化合物,其中 R^{12} 为 CH_3 或 CH_3CH_2。

11. 如权利要求 1 的化合物,其中 R^{13} 为 H、CH_3、卤素、OH 或 NH_2。

12. 如权利要求 11 的化合物,其中 R^{13} 为 H、CH_3 或 OH。

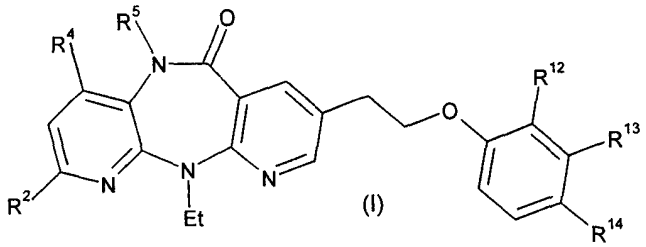
13. 如权利要求 12 的化合物,其中 R^{13} 为 H。

14. 如权利要求 1 的化合物，其中 R^{14} 为 COOH、COOMe、(C_{2-4})烯基-COOH 或(C_{1-4})烷基-COOH。

15. 如权利要求 14 的化合物，其中 R^{14} 为 COOH、CH=CH-COOH、CH_2COOH 或 CH_2CH_2COOH。

16. 如权利要求 15 的化合物，其中 R^{14} 为 COOH。

17. 如权利要求 1 的式 I 化合物:



其中，

R^2 为 H、Cl、F、CH_3、OMe 或 OEt; R^4 为 H; R^5 为 CH_3; R^{12} 为 Br、Cl、CH_3 或 CH_2CH_3; R^{13} 为 H、CH_3 或 OH; 及 R^{14} 为 COOH、CH=CH-COOH、CH_2COOH 或 CH_2CH_2COOH;

或其盐。

18. 如权利要求 17 的化合物，其中 R^2 为 H; R^4 为 H; R^5 为 CH_3; R^{12} 为 CH_3 或 CH_3CH_2; R^{13} 为 H; 且 R^{14} 为 COOH; 或其盐。

19. 一种用于治疗或预防 HIV 感染的药物组合物，其包含权利要求 1 的式 I 化合物或其的可药用盐，以及可药用载体。

20. 权利要求 19 的药物组合物或其可药用盐在制备用于治疗或预防 HIV 感染的药物中的用途。

21. 权利要求 1 的式 I 化合物或其可药用盐在制备用于治疗或预防 HIV 感染的药物中的用途。

22. 权利要求 21 的用途，其中所述的药物与抗反转录病毒药物组合给药。

23. 权利要求 1 的式 I 化合物或其可药用盐在制备用于治疗或预防分娩前从母亲至婴儿的围产期 HIV-1 传染的药物中的用途。

二吡啶并二氮杂萘酮类反转录酶抑制剂

技术领域

本发明涉及新颖化合物及其可药用盐、其在治疗或预防 HIV 感染中的应用(单独使用或与其他治疗药物组合使用)及包含这些化合物的药物组合物。

背景技术

被称为获得性免疫缺陷综合征(AIDS)的疾病是由人类免疫缺陷病毒(HIV)，尤其是被称为 HIV-1 株引起的。为使 HIV 可被宿主细胞复制，病毒基因组的信息必须整合入宿主细胞的 DNA 中。然而，HIV 是一种反转录病毒，意味着遗传信息为 RNA 形式。因此 HIV 复制循环需要将病毒基因组(RNA)转录为 DNA 的步骤，此过程为正常事件链的逆转。已被适当命名为反转录酶(RT)的酶可将病毒 RNA 转录为 DNA。HIV 病毒颗粒包括 RT 拷贝及病毒 RNA。

已知反转录酶具有三种酶功能：其可作为 RNA 依赖性 DNA 聚合酶、核糖核酸酶及 DNA 依赖性 DNA 聚合酶。作为 RNA 依赖性 DNA 聚合酶时，RT 可将病毒 RNA 转录为单链 DNA 拷贝。作为核糖核酸酶时，RT 可破坏初始病毒 RNA，并将刚从初始 RNA 产生的 DNA 游离出来。最后，作为 DNA 依赖性 DNA 聚合酶时，RT 可以第一 DNA 链为模板制造出第二股互补的 DNA 链。该两股将形成双链 DNA，该双链 DNA 通过另一种称作整合酶的酶整合入宿主细胞基因组中。

抑制 HIV-1 反转录酶的酶功能的化合物将抑制受感染细胞中 HIV-1 的复制。这些化合物可用于预防或治疗人类的 HIV-1 感染，这些预防或治疗效果已公知的多种 RT 抑制剂例如 3'-叠氮-3'-脱氧胸苷(AZT)、2',3'-二脱氧肌苷(ddI)、2',3'-二脱氧胞苷(ddC)、d4T、3TC、奈韦拉平、地拉韦啶、依法韦仑及阿巴卡韦所证实，这些抑制剂为迄今被批准用于治疗 AIDS 的主要药物。

正如任一抗病毒的治疗，利用 RT 抑制剂治疗 AIDS 最终导致病毒对所

给药物敏感变低。对这些药物的抗性(敏感性降低)起因于 pol 基因的反转录酶片段中发生突变。几种 HIV 突变株的特征业已被鉴定，且对已知治疗药物的抗性归因于RT基因中的突变。临床中某些最为常见的突变体为：Y181C 突变体，其中密码子 181 上的酪氨酸(Y)突变为半胱氨酸(C)残基；及 K103N，其中 103 位上的赖氨酸(K)由天冬酰胺(N)替代。在利用已知的抗病毒药进行治疗期间，出现频率愈来愈高的其他突变体包括：单突变体 V106A、G190A、Y188C 及 P236L；以及双突变体 K103N/Y181C、K103N/P225H、K103N/V108I 及 K103N/L100I。

持续使用抗病毒化合物来预防 HIV 感染必然将导致更多新 HIV 抗性株的出现。因此，需要对抗各种突变体、具有不同作用模式的新型 RT 抑制剂。

作为 HIV-1 抑制剂的具三环结构的化合物在第 5,366,972 号美国专利中被述及。其他 HIV-1 反转录酶抑制剂在 Hargrave 等人的 J. Med. Chem., 34,2231(1991)中被记载。

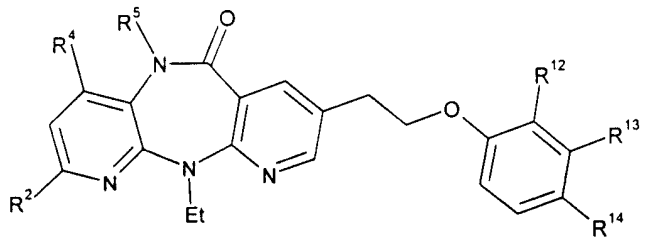
第 5,705,499 号美国专利提出 8-芳烷基-及 8-芳杂烷基-5,11-二氢-6H-二吡啶并[3,2-B:2',3'-E][1,4]二氮杂䓬为 RT 抑制剂。这些例示的化合物显示具有一定程度的对抗野生型 HIV-1 RT 及突变 HIV-1 RT(尤其是 Y181C)的活性，亦可对抗其他单突变体(虽作用较小)，例如 K103N。

WO 01/96338A1 及美国专利 6,420,359 公开了具喹啉及喹啉-N-氧化物取代基的二氮杂䓬结构化合物物为 RT 抑制剂。所例示的化合物具有抗 HIV WT、单突变株及双突变株的活性。

发明概述

本发明提供一种含取代苯甲酸的化合物，其为野生型(WT) HIV-1 RT 及 HIV-1 RT 的双突变株(尤其是双突变株 K103N/Y181C)的有效抑制剂。

本发明的第一方面是提供一种式 I 化合物：



I

其中，

R^2 为 H、卤素、(C_{1-4})烷基、$O(C_{1-4})$烷基、$HN(C_{1-4}$烷基)或 $N(C_{1-4}$烷基$)_2$；

R^4 为 H 或 CH_3；

R^5 为 H 或 CH_3；

R^{12} 为 H、卤素、(C_{1-4})烷基、CF_3 或 NO_2；

R^{13} 为 H、(C_{1-4})烷基、卤素、OH 或 NH_2，条件是 R^{12} 与 R^{13} 不都为 H；以及

R^{14} 为 $COOR^{14a}$，其中 R^{14a} 为 H 或(C_{1-6})烷基；或 R^{14} 为(C_{2-4})烯基-$COOR^{14a}$，其中 R^{14a} 如本文中定义；或 R^{14} 为(C_{1-4})烷基-$COOR^{14a}$，其中 R^{14a} 如本文中定义；

或其盐或前药。

本发明的第二方面是提供一种用于治疗或预防 HIV 感染的药物组合物，其包含如本说明书所述的式 I 化合物，或其可药用盐，及可药用载体。

本发明的第三方面是提供一种治疗或预防 HIV 感染的方法，其包括对患者施用 HIV 抑制量的式 I 化合物或其可药用盐，或药物组合物(二者皆如本说明书的定义)。

本发明的第四方面是提供一种治疗或预防 HIV 感染的方法，其包括将包含这里定义的式 I 化合物的药物组合物与抗反转录病毒药物组合给药。

本发明的第五方面是提供一种预防从母亲至婴儿的围产期 HIV-1 传染的方法，其包括在母亲分娩前施用这里记载的式 I 化合物或药物组合物。

发明详述

定义

除非另有说明，否则适用下列定义：

本文中所用术语“(C_{1-2})烷基”、“(C_{1-4})烷基”及“(C_{1-6})烷基”(无论单独出现或与另一基团组合出现)分别意指最多包含两个、四个或六个碳原子的无环的烷基。这些基团的实例包括甲基、乙基、丙基、丁基、1-甲基乙基、1-甲基丙基、2-甲基丙基及 1,1-二甲基乙基。

本文所用术语“(C_{2-4})烯基”(无论其单独出现或与另一基团组合出现)意指包含两个至四个碳原子的不饱和无环基团。

本文所用术语“卤素”意指卤素原子并包括氟、氯、溴及碘。

本文所用术语“可药用盐”包括衍生自可药用碱且无毒性的盐。适当的碱的实例包括胆碱、乙醇胺及乙二胺。Na^+、K^+及Ca^{++}盐亦被包括在本发明的范围内(另参见 Pharmaceutical salts(药物盐)，Birge, S.M.等人，J.Pharm. Sci.,(1977), 66, 1-19，这里引入作为参考)。

本文所用术语“前药”是指可药用衍生物，由衍生物所得的生物转化产物是式 I 化合物所定义的活性药物。这些衍生物的实例包括(但不限于)酯与酰胺(参见 Goodman 及 Gilman 在 The Pharmacological Basis of Therapeutics，第 9 期，McGraw-Hill, Int. Ed. 1995, “Biotransformation of Drugs(药物的生物转化)”，p11-16，这里引入作为参考)。

优选实施方案的详细说明

优选地，R^2为 H、卤素、(C_{1-4})烷基、$O(C_{1-4})$烷基或 $N(C_{1-4})$烷基$)_2$。更优选地，R^2为 H、Cl、F、(C_{1-4})烷基、$O(C_{1-4})$烷基或 $N(C_{1-4})$烷基$)_2$。更优选地，R^2为 H、Cl、F、CH_3、OMe 或 OEt。最优选地，R^2为 H。

优选地，R^4及R^5不相同。

更优选地，R^4为 H。

更优选地，R^5为 CH_3。

优选地，R^{12}为卤素、(C_{1-4})烷基、CF_3或 NO_2。更优选地，R^{12}为 Br、Cl、CH_3或 CH_3CH_2。最优选地，R^{12}为 CH_3或 CH_3CH_2。

优选地，R^{13}为 H、CH_3、卤素、OH 或 NH_2。更优选地，R^{13}为 H、CH_3或 OH。最优选地，R^{13}为 H。

优选地，R^{14}为 COOH、COOMe、(C_{2-4})烯基 COOH 或(C_{1-4})烷基 COOH。更优选地，R^{14}为 COOH、CH=CH-COOH、CH_2COOH 或 CH_2CH_2COOH。最优选地，R^{14}为 COOH。

式 I 化合物为野生型 HIV 的有效抑制剂并可抑制双突变体酶 K103N/Y181C。

式 I 化合物对 HIV-1 反转录酶具有抑制性活性。当以适当剂型给药时，这些化合物用于治疗 AIDS、ARC 及与 HIV-1 感染相关的其他病症。因此本发明的另一方面是一种治疗 HIV-1 感染的方法，包括对感染 HIV-1 的人施用治疗有效剂量的上述新颖式 I 化合物。无论被称为治疗或预防，该化合物亦可通过对分娩前母亲给药来防止从母亲至婴儿的围产期 HIV-1 传染。

这些式I化合物可通过口服或经肠胃外给药方式一次给药或分次给药。式I化合物的适当口服剂量介于约0.5毫克/天与3克/天之间。对于体重为70公斤的患者而言，式I化合物的口服剂量优选介于约100毫克/天与800毫克/天之间。在肠胃外给药制剂中，适当的剂量单位可包含0.1至250毫克所述化合物，优选为1毫克至200毫克。但是应该理解不同患者的给药剂量不同，任一特定患者的给药剂量取决于临床医师的诊断，该临床医师将依据患者的体重及状况及其对药物的反应确定适当给药剂量。

若本发明的化合物通过口服方式给药，则其可以药物制剂形式作为药物给药，这些药物制剂包含这些化合物以及与其可配伍的药用载体。这些载体物质可为适于口服的惰性有机或无机载体物质。这些载体物质的实例为水、明胶、滑石粉、淀粉、硬脂酸镁、阿拉伯胶、植物油、聚链烷二醇、凡士林等。

这些式I化合物可与本技术领域的普通技术人员熟悉的抗反转录病毒药物组合使用，可供同时、单独或依次给药的组合制剂以用于治疗或预防个体的HIV感染。可与式I化合物用于组合治疗的抗反转录病毒药物的实例包括(但不限于)：核苷/核苷酸反转录酶抑制剂(例如AZT及替诺福韦)、非核苷类反转录酶抑制剂(例如奈韦拉平)、蛋白酶抑制剂(例如Ritanovir))、病毒融合抑制剂(例如T-20)、CCR5拮抗剂(例如SCH-351125)、CXCR4拮抗剂(例如AMD03100)、整合酶抑制剂(例如L-870,810)、TAT抑制剂、其他研制中的药物(例如PRO-542、BMS-806、TMC-114或AI-183)、抗真菌剂或抗细菌剂(例如氟康唑)及免疫调节剂(例如左旋咪唑)。此外，一种式I化合物可与另一种式I化合物组合使用。

这些药物制剂可通过常规方式加以制备，所制成的剂型可为固态剂型，例如片剂、糖衣片、胶囊等；或液态剂型，例如溶液、混悬剂、乳剂等。这些药物制剂可进行常规的制药操作，例如灭菌。此外，这些药物制剂可包含常规佐剂，例如防腐剂、稳定剂、乳化剂、调味剂、润湿剂、缓冲剂、用于改变渗透压的盐等。可应用的固态载体物质包括，例如淀粉、乳糖、甘露醇、甲基纤维素、微晶纤维素、滑石粉、二氧化硅、磷酸氢钙及高分子量聚合物(例如聚乙二醇)。

进行肠胃外应用的时候，化学式I化合物可以水溶液，或在药物可接受油中的非水性溶液、悬浮液或乳液，或混合液体的形式施药，这些液体

可包含抑菌剂、抗氧化剂、防腐剂、缓冲剂或其他使溶液与血液等渗的溶质、增稠剂、助悬剂或其它可药用添加剂。这种类型的添加剂包括，例如酒石酸盐、柠檬酸盐及醋酸盐缓冲液、乙醇、丙二醇、聚乙二醇、螯合物形成剂(例如 EDTA)、抗氧化剂(例如亚硫酸氢钠、偏亚硫酸氢钠及抗坏血酸)、用于调节粘度的高分子量聚合物(例如液态聚氧化乙烯)以及山梨醇酐的聚乙烯衍生物。必要时亦可加入防腐剂，例如苯甲酸、对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯、苯扎氯铵及其他季铵化合物。

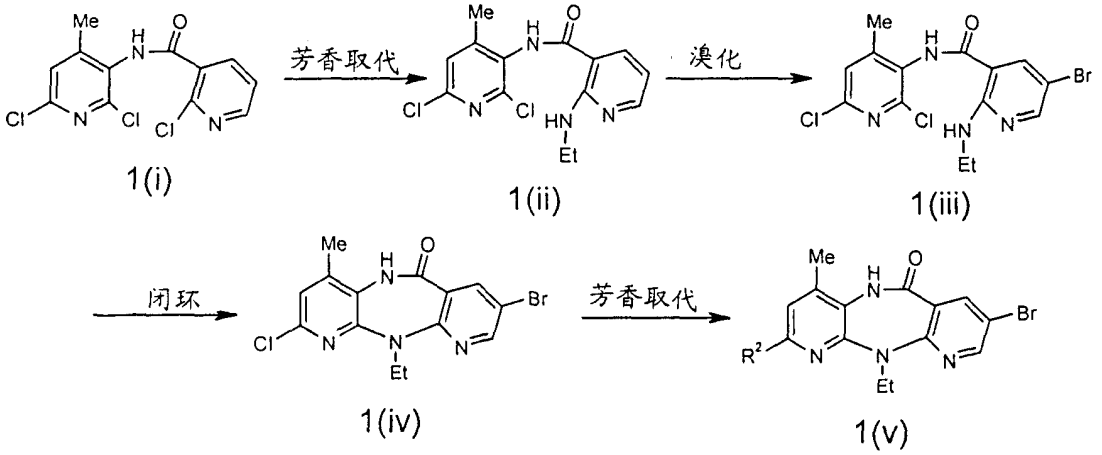
本发明的化合物亦可作为经鼻用药溶液施用，除本发明的这些化合物外，还包含溶于水媒剂中的适当缓冲剂、渗透压调节剂、抗微生物防腐剂、抗氧化剂及增粘剂。用于增加粘度的试剂实例为聚乙烯醇、纤维素衍生物、聚乙烯吡咯烷酮、聚山梨酸酯或甘油。所添加的抗微生物防腐剂可包括苯扎氯铵、硫柳汞、氯丁醇或苯乙醇。

另外，本发明所提供的化合物可以栓剂形式用药。

方法及合成

本发明的化合物可利用有机合成化学工作者所熟知的技术制备。示范性的反应流程如下图 1 至图 4 所示。取代基 R^2、R^4、R^5、R^{12}、R^{13} 及 R^{14} 如本文中定义。

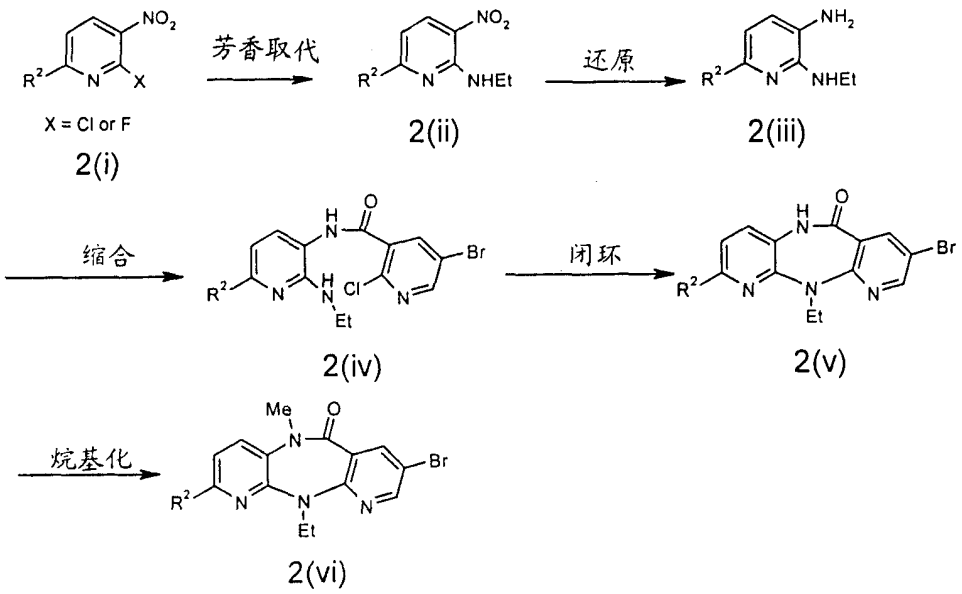
流程 1：中间体(其中 R^4 为甲基)的制备



简言之，用乙胺进行 1(i)的芳环取代(S_NAR)生成中间体 1(ii)。然后，利用溴化剂(例如 NBS 或溴)卤化第 5 位生成 1(iii)。通过由碱参与的 S_nAR 反

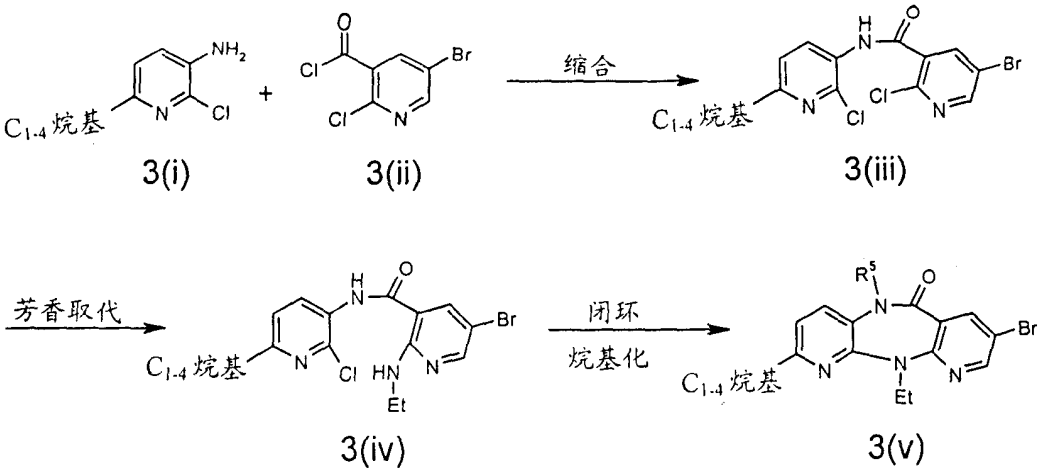
应使 1(iii)闭环，从而生成三环中间体 1(iv)。由 1(iv)中 C-2 氯的芳环取代反应引入 R^2 取代基，从而生成中间体化合物 1(v)。

流程 2：中间体(其中 R^5 为甲基)的制备



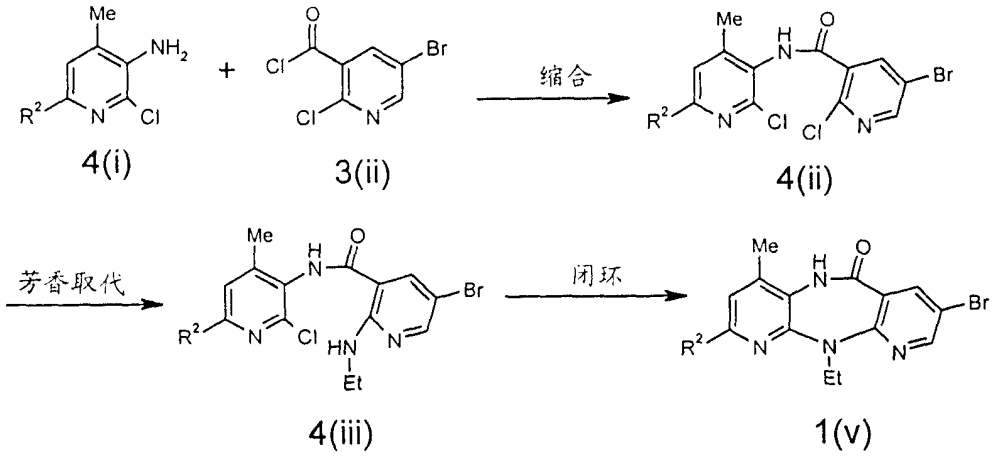
流程 2 的反应顺序与 J.M.Klunder 等人的 J. Med. Chem.1998, 41, 2960-71 及 C.L. Cywin 等人的 J. Med. Chem.1998, 41, 2972-84 中所述的反应顺序类似。简述之，由用乙胺进行 2(i)的芳环取代(S_NAR)生成中间体 2(ii)。硝基的环原反应(例如利用催化加氢反应)生成 2(iii)。碱参与的 2(iii)与，例如 5-溴-2-氯-3-吡啶基羰基氯的缩合反应生成 2(iv)。通过碱参与的 S_nAR 反应使 2(iv)闭环，生成三环中间体 2(v)。2(vi)中的 R^5 甲基可利用本技术领域已知的烷基化反应例如碘甲烷引入。

流程 3：中间体(其中 R^2 为 C_{1-4} 烷基)的制备



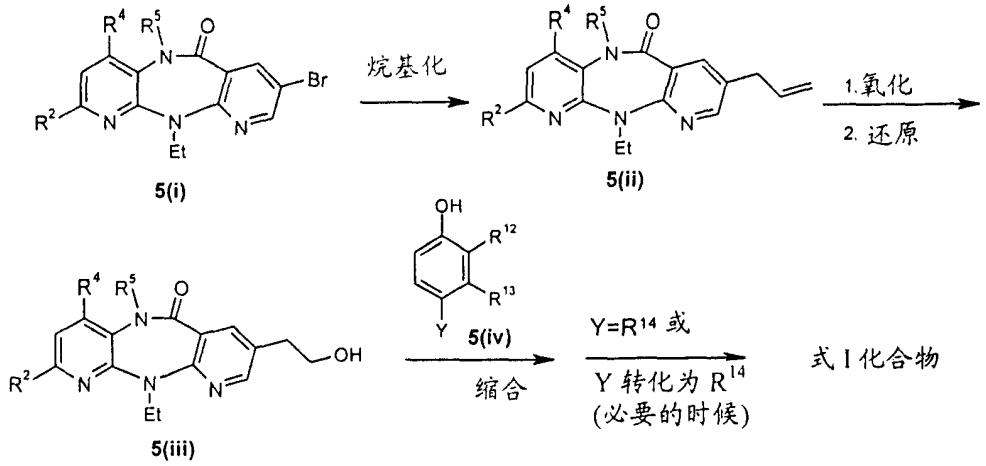
简言之，3(i)与 3(ii)之间碱参与的缩合反应将生成中间体 3(iii)。用乙胺进行的 3(iii)的芳环取代(S_NAR)生成中间体 3(iv)。由碱参与的 S_nAR 反应使 3(iv)闭环，进而形成三环中间体，对该三环中间体进行烷基化生成中间体化合物 3(v)。

流程 4：化合物(其中 R^4 为甲基)的另一种制备方法



简言之，4(i)与 3(ii)之间的碱参与的缩合反应生成中间体 4(ii)。乙胺进行的 4(ii)的芳环取代((S_NAR)生成中间体 4(iii)。碱参与的 S_nAR 反应使 4(iii)闭环，进而形成三环中间体化合物 1(v)。

流程 5：苯甲酸衍生物的引入



简言之，如本文所述合成的溴衍生物 5(i)与烯丙基锡试剂在非质子溶剂(例如 DMF)中且在催化剂存在下发生交联偶合反应，将形成具 C-8 取代基的 5(ii)。氧化双键(例如由臭氧分解生成臭氧化物)，然后进行还原反应，生成含 C-8 羟乙基取代基的 5(iii)。当 Y 为 R^{14} 时(COOH 除外)，通过 Mitsunobu 型反应将萘衍生物 5(iv)、5(v)或 5(vi)与 5(iii)缩合，进而生成式 I 化合物。或者，当 Y 为 R^{14} 基团前体例如 $COOCH_3$ 时，可通过 Mitsunobu 型反应将 5(iv)或 5(v)与 5(iii)缩合，然后，Y 可以化学方式转化成 R^{14} 取代基，例如通过 $COOCH_3$ 的皂化反应生成 COOH，从而得到式 I 化合物。

如前所述，本发明所提供的化合物可抑制 HIV-1 RT 的酶活性。基于下述对这些化合物的检测，可知这些化合物抑制 HIV-1 RT 的 RNA 依赖性 DNA 聚合酶的活性。可知(数据未显示)这些化合物亦抑制 HIV-1 RT 的 DNA 依赖性 DNA 聚合酶的活性。利用下述反转录酶(RT)分析法可检测化合物抑制 HIV-1 RT 的 RNA 依赖性 DNA 聚合酶活性的能力。下述实施例中所述的某些特定化合物按照这种方式进行检测。该检测结果在表 2 中以 IC_{50} 及 EC_{50} 形式列出。

实施例

本发明通过下列非限制性实施例进行详细说明。除非另有说明，所有反应均在氮气或氩气气氛中进行。温度均以摄氏温度表示。除非另有说明，溶液百分比或比率均表示体积-体积关系。

本文中所用缩略语或符号包括:

DEAD: 偶氮二甲酸二乙酯;

DIAD: 偶氮二甲酸二异丙酯;

DIEA: 二异丙基乙胺;

DMAP: 4-(二甲胺基)吡啶;

DMSO: 二甲基亚砜;

DMF: 二甲基甲酰胺;

DCC: 二环己基碳二亚胺;

ES MS: 电喷雾质谱法;

Et: 乙基;

EtOH: 乙醇;

EtOAc: 醋酸乙酯;

Et_2O: 乙醚;

HPLC: 高效液相色谱法;

iPr: 异丙基;

Me: 甲基;

MeOH: 甲醇;

MeCN: 乙腈;

NaHMDS: 六甲基二甲硅基氨基钠;

NBS: N-溴代丁二酰亚胺;

Ph: 苯基;

TBE: 三硼酸盐-EDTA;

TBTU: 2-(1H-苯并三唑-1-基)-N,N,N'N'-四甲基脲 四氟硼酸盐;

TFA: 三氟醋酸;

THF: 四氢呋喃;

PFU: 噬斑形成单位;

DEPC: 焦碳酸二乙酯;

DTT: 二硫苏糖醇;

EDTA: 乙二胺四乙酸盐;

UMP: 尿苷 5'-单磷酸;

UTP: 尿苷 5'-三磷酸;

MES: 2-(n-吗啉代)乙磺酸;

SDS-PAGE: 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳法;

MWCO: 分子量截断;

Bis-Tris Propane: 1,3-双{三(羟甲基)-甲胺基}丙烷;

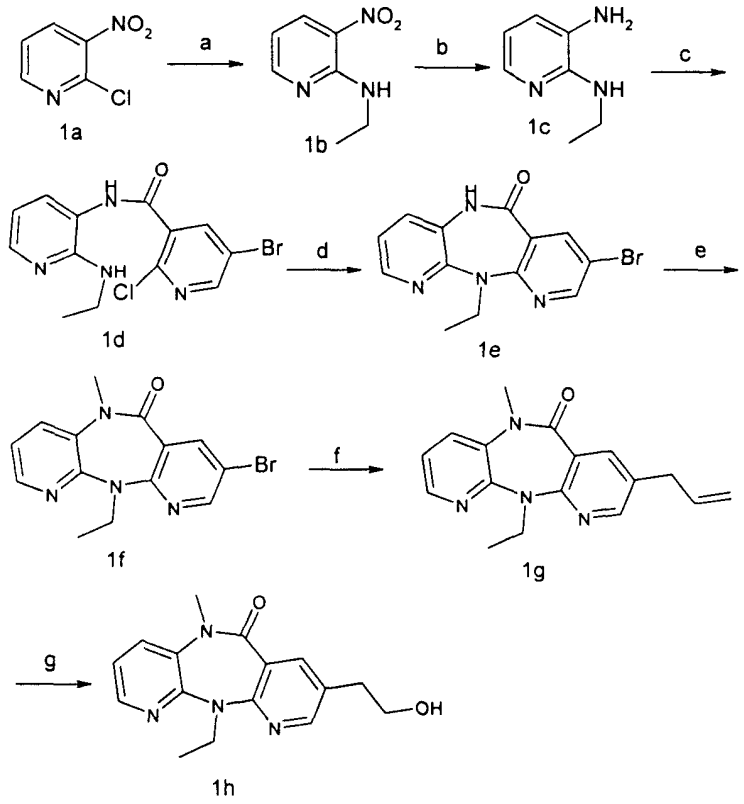
GSH: 还原谷胱甘肽;

OBG: n-正辛基-β-D-葡萄糖苷。

合成方法

下列实例例示说明本发明化合物的制备方法。

实施例 1:



步骤 a:

将 2 M 乙胺的 THF 溶液(365 毫升，731 毫摩尔)加至 2-氯-3-硝基吡啶 1a(51 克，325 毫摩尔)溶于 THF(650 毫升)的溶液中。将反应物在室温下搅拌过夜。将得到的反应混合液倒入水(约 1.5 升)中，滤出生成的固体并在减压下干燥，得到化合物 1b(52 克)。

步骤 b:

在 20％的 $Pd(OH)_2/C$(10.4 克)存在下，将 2-(乙胺基)-3-硝基吡啶 1b(52 克)溶于 MeOH(600 毫升)的溶液在氢气中(1 大气压)及在室温下搅拌过夜。催化剂通过硅藻土过滤去除。将滤液减压浓缩，得到黑色固体的化合物 1c(39 克，步骤 a 与 b 的总收率为 88％)。

步骤 c:

将固体 $NaHCO_3$(56.3 克，669 毫摩尔)加入到冷却的 3-胺基-2-(乙胺基)吡啶 1c(30.6 克，223 毫摩尔)在 MeCN(740 毫升)的溶液中。5 分钟后，加入粗制 5-溴-2-氯-3-吡啶基羰基氯(由 5-溴-2-羟基-3-吡啶基羧酸及 $SOCl_2$ 制得)(1 当量，223 毫摩尔)[如 T.W.Gero 等人在 Synth. Commun. 1989, 19, 553-559 中所述(将其引入作为参考)，但略去水溶液的后处理]。2 小时后，将反应混合液倒入冰/水(1.5 升)中，过滤出所生成的固体，并依次用水及己烷洗涤。在减压下干燥过夜后，得到黑色固体的化合物 1d(54.9 克，收率为 69％)。

步骤 d:

在 50℃下，向 2-氯-N-{2-(乙胺基)-3-吡啶基}-5-溴-3-吡啶基甲酰胺 1d(54.9 克，154.4 毫摩尔)的吡啶(308 毫升)溶液，滴加 1 M NaHMDS 的 THF 溶液(355 毫升，355 毫摩尔)。10 分钟后，将反应溶液冷却至室温，然后倒入冰水中(2 升)。过滤出所生成的固体，并用水然后用己烷洗涤。在减压下干燥过夜后，得到暗绿色固体的化合物 1e(36 克，收率为 75％)。

步骤 e:

将 NaH(3.5 克，138 毫摩尔)加至 8-溴-5,11-二氢-11-乙基-6H-二吡啶并[3,2-b:2',3'-e][1,4]二氮杂䓬-6-酮 1e(36.7 克，115 毫摩尔)的 DMF(380 毫升)溶液中，并将混合液在 50℃加热 30 分钟。将反应混合液冷却至室温并用 MeI(14.3 毫升，230 毫摩尔)处理。1.5 小时后，将此反应混合液倒入冰水中。过滤出所生成的固体，并且水然后用己烷洗涤，经干燥后得到暗灰色固体的化合物 1f(37.9 克，收率为 99％)。

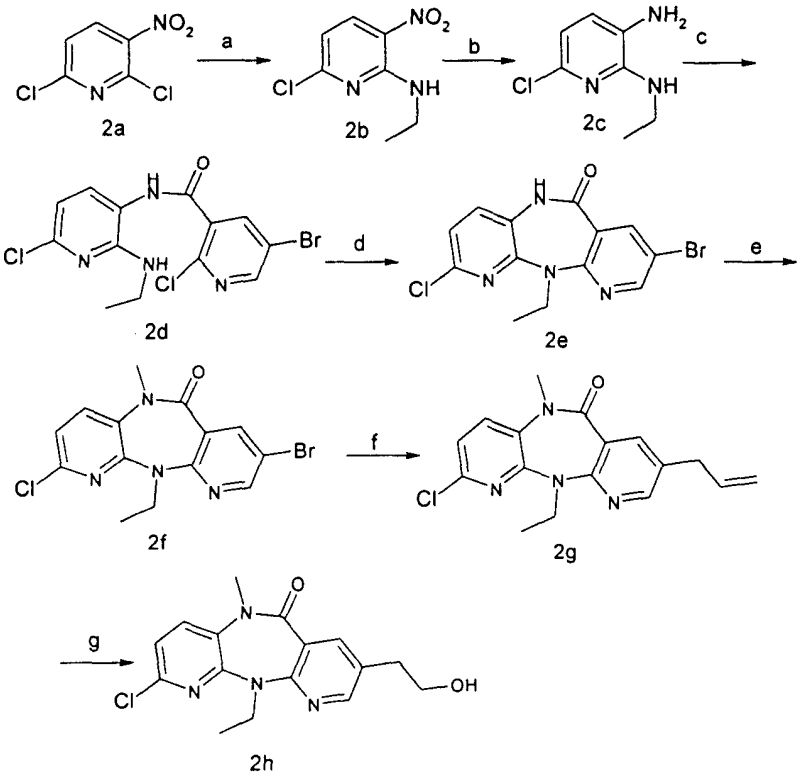
步骤 f:

将烯丙基三丁基锡(30.7 毫升，99.0 毫摩尔)及 $Pd(Ph_3P)4$(5.20 克，4.50 毫摩尔)加至脱气的 8-溴-5,11-二氢-11-乙基-5-甲基-6H-二吡啶并[3,2-b:2',3'-e][1,4]二氮杂䓬-6-酮 1f(30.0 克，90.0 毫摩尔)的 DMF(450 毫升)溶液中(向溶液中通入 30 分钟氮气)。将此混合液在 90℃搅拌 1.5 小时，然后将其冷却至室温并减压浓缩。所得的残余物经快速层析法纯化(己烷与 EtOAc 的比介于 8:2 与 7:3 之间)，得到化合物 1g(22.19 克，收率为 84％)。

步骤 g:

将臭氧化的氧气流鼓泡通入 5,11-二氢-11-乙基-5-甲基-8-(2-丙烯基)-6H-二吡啶并[3,2-b:2',3'-e][1,4]二氮杂䓬-6-酮 1g(22.19 克，75.4 毫摩尔)溶于 CH_2Cl_2(150 毫升)及 MeOH(150 毫升)的冷(-78℃)溶液中，时间为 2.5 小时。然后在此溶液中通入 15 分钟氮气流，随后加入固体 $NaBH_4$(4.99 克，132 毫摩尔)。让此反应混合物温热至室温。1 小时后，加入饱和 NH_4Cl 水溶液(200 毫升)并在室温下将此混合物搅拌 2 小时。在减压下去除有机溶剂。将水(300 毫升)及 $CHCl_3$(300 毫升)加入至残余物中。将各相分离，水层用 $CHCl_3$(3 × 300 毫升)萃取。将合并的有机层干燥($MgSO_4$)、过滤并减压浓缩。通过快速层析法(EtOAc:$CHCl_3$ 为 4:1)将所得的残余物纯化，得到白色固体的化合物 1h(16.1 克，收率为 72％)。

实施例 2:



步骤 a:

用 15 分钟将 $EtNH_2$(49.8 克，1.10 摩尔)溶于甲苯(200 毫升)的冰冷溶液加至 2,6-二氯-3-硝基吡啶 2a(100.0 克，0.52 摩尔)溶于甲苯(225 毫升)的冰冷溶液中。在 0℃下将该混合物搅拌 45 分钟。加入水(500 毫升)及 EtOAc(500 毫升)并将各相分离。依次用水(200 毫升)及盐水(200 毫升)洗涤有机层并将其干燥($MgSO_4$)、过滤并减压浓缩。使所得的残余固体在 MeOH 中重结晶，得到黄色针状的化合物 2b(83.7 克，收率为 80％)。

步骤 b:

化合物 2c 按与实施例 1 的步骤 b 类似的方式制备。

步骤 c:

在室温下，通过套管将 5-溴-2-氯-3-吡啶基羰基氯(30.0 克，97.0 毫摩尔)溶于 MeCN(100 毫升)的溶液加入到 3-胺基-6-氯-2-(乙胺基)吡啶 2c(16.6 克，

97.0 毫摩尔)溶于含固体 $NaHCO_3$(14.2 克，169 毫摩尔)的 MeCN(180 毫升)的溶液中。将此混合液在室温下搅拌 1 小时。加入水(200 毫升)并将该混合物搅拌 10 分钟。过滤所生成的悬浮液。将所得的固体先用水然后用己烷洗涤并在减压下干燥，得到化合物 2d(28.4 克，收率为 75％)。

步骤 d:

将 1 M NaHMDS 的 THF 溶液(167.5 毫升，167.5 毫摩尔)缓慢地加至 5-溴-2-氯-N-{2-(乙胺基)-6-氯-3-吡啶基}-3-吡啶基甲酰胺 2d(28.4 克，72.8 毫摩尔)溶于吡啶(146 毫升)的溶液中，并加热至 50℃。将反应混合液在 50℃搅拌 1.5 小时。然后将该混合液倒入冰水混合液(1 升)中，1 小时后，过滤所生成的悬浮液。用水洗涤所得的固体并在减压下干燥，得到化合物 2e(23.4 克，收率为 91％)。

步骤 e:

在 50℃，用 30 分钟将固体 NaH(60％油分散体，3.46 克，86.1 毫摩尔)加至 8-溴-2-氯-5,11-二氢-11-乙基-6H-二吡啶并[3,2-b:2',3'-e][1,4]二氮杂䓬-6-酮 2e(23.4 克，66.3 毫摩尔)溶于 DMF(220 毫升)的溶液中。将此混合液在 50℃下搅拌 1 小时，然后冷却至室温。将该混合液倒入水(1 升)中并过滤所生成的悬浮液。依次用水及己烷洗涤所得固体并在减压下干燥，得到化合物 2f(23.0 克，收率为 94％)。

步骤 f:

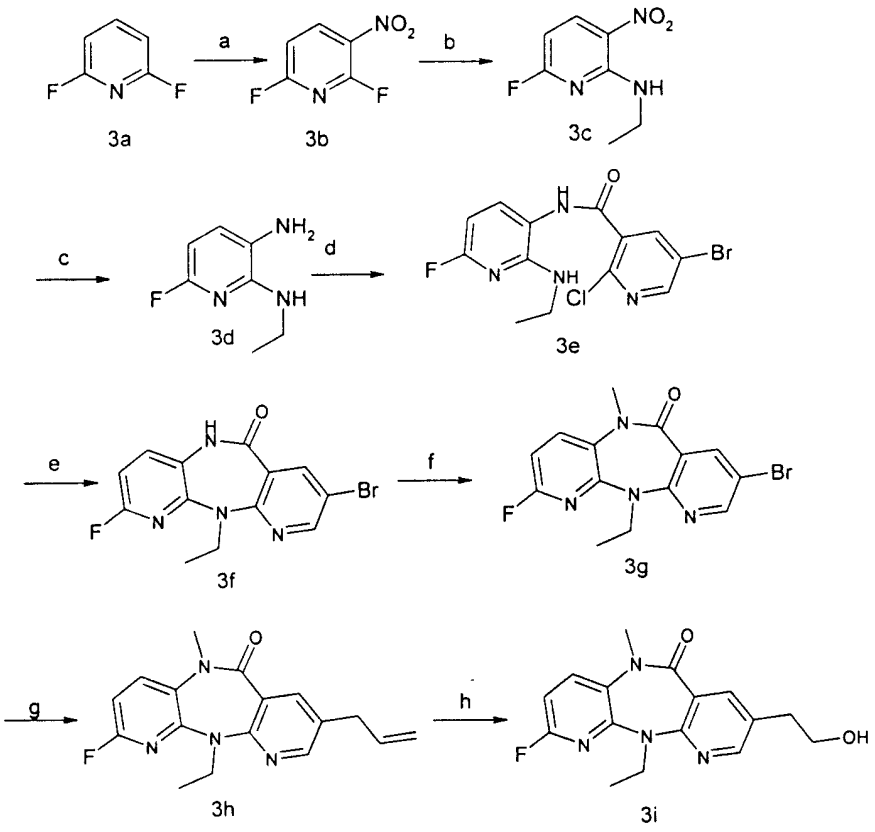
将烯丙基三丁基锡(21.3 毫升，68.7 毫摩尔)及 $Pd(Ph_3P)_4$(3.61 克，3.12 毫摩尔)加至脱气的 8-溴-2-氯-5,11-二氢-11-乙基-5-甲基-6H-二吡啶并[3,2-b:2',3'-e][1,4]二氮杂䓬-6-酮 2f(23.0 克，62.5 毫摩尔)溶于 DMF(312 毫升)的溶液(向溶液中通入 30 分钟氮气)中。将此混合液加热至 90℃并保持 2 小时。将其减压浓缩。通过快速层析法(己烷: EtOAc 为 7:3)纯化所得的残余物，得到化合物 2g(13.4 克，收率为 65％)。

步骤 g:

将臭氧化的氧气通入冷(-78℃)的 2-氯-5,11-二氢-11-乙基-5-甲基-8-(2-

丙烯基)-6H-二吡啶并[3,2-b:2',3'-e][1,4]二氮杂䓬-6-酮 2g(13.4 克，40.7 毫摩尔)溶于 MeOH(102 毫升)及 CH_2Cl_2(102 毫升)溶液中，直至烯完全消失。在该溶液中通入氮气以去除过量臭氧。然后，将固体 $NaBH_4$(2.69 克，71.1 毫摩尔)分成小份加入，并将该溶液缓慢加热至室温。1 小时后，加入饱和 NH_4Cl 水溶液(150 毫升)并将此混合液搅拌 20 分钟。在减压下将其中的有机溶剂去除。将水(100 毫升)加至此水溶液中。用 $CHCl_3$(3 × 200 毫升)萃取此溶液。将合并的有机层干燥($MgSO_4$)、过滤并减压浓缩。通过快速层析法(EtOAc:$CHCl_3$ 为 4:1)将所得残余物纯化，得到化合物 2h(10.4 克，收率为 77 %)。

实施例 3:



步骤 a:

将 2,6-二氟吡啶 3a(200 克，1.74 摩尔)滴加至在冰浴中(其内部温度保持在 5-10℃)的浓硫酸(600 毫升)与发烟硝酸(90 %，400 毫升)的混合液中。将所得的混合液在室温下搅拌过夜。将混合液缓慢倒入 3 公斤冰中并用 Et_2O(2 × 2 升)萃取。将合并的有机层用 1.5N NaOH(2 × 1 升)洗涤，然后用饱和的

$NHCO_3$水溶液(400 毫升)洗涤，或直至使 pH 值介于 8-9 之间为止。将有机层用 $MgSO_4$干燥，然后过滤及减压浓缩，直至恒重(以去除未反应的 2,6-二氟吡啶: 10-12%)为止。得到黄色液体的化合物 3b(207.3 克，收率为 74%)。

步骤 b:

在-40℃下，将乙胺(25.7 克，570 毫摩尔)溶于 THF(250 毫升)的溶液滴加至 2,6-二氟-3-硝基吡啶 3b(45.7 克，285 毫摩尔)溶于 THF(500 毫升)的溶液中。30 分钟后，减压浓缩此反应混合液且使所得的残余物溶解于 EtOAc 中。有机相用盐水洗涤并干燥($MgSO_4$)、过滤及浓缩。所得的黄色固体通过快速层析法(15% EtOAc/己烷)纯化，得到黄色固体状的化合物 3c(43.2 克，收率为 82%)。

步骤 c:

在 20% $Pd(OH)_2/C$(4.35 克)存在下，将 2-乙胺基-6-氟-3-硝基吡啶 3c(43.2 克，230 毫摩尔)溶于 THF(1 升)的溶液在室温下及氢气中(1 大气压)搅拌过夜。催化剂通过硅藻土过滤去除。减压浓缩该滤液，得到黑色固体的化合物 3d(36.3 克，收率为 95%)。

步骤 d:

将固体 $NaHCO_3$(50.4 克，600 毫摩尔)加至 3-胺基-2-乙胺基-6-氟吡啶 3d(31.0 克，200 毫摩尔)溶于 MeCN(160 毫升)的冷溶液(4℃)中。15 分钟后，加入 5-溴-2-氯-3-吡啶羰基氯(1 当量，200 毫摩尔)溶于 MeCN(155 毫升)的溶液。在室温下反应 60 分钟后，将此反应混合液倒入水(1.2 升)中并搅拌 30 分钟。过滤出所生成的固体并在 50℃减压干燥过夜。得到黑色固体的化合物 3e(73.7 克，收率为 99%)。

步骤 e:

在 50℃下，将 1M NaHMDS 的 THF 溶液(520 毫升，520 毫摩尔)滴加至 2-氯-N-{2-(乙胺基)-6-氟-3-吡啶基}-5-溴-3-吡啶甲酰胺 3e(73.5 克，216 毫摩尔)溶于吡啶(435 毫升)的溶液中。10 分钟后，反应溶液冷却至室温，然后将其倒入冰水(2 升)中。将生成的固体过滤并先用水然后用己烷洗涤。在

减压下干燥所得的固体，得到暗绿色固体的化合物 3f(50.6 克，收率为 69％)。

步骤 f:

将 NaH(4.28 克，178 毫摩尔)加至 8-溴-5,11-二氢-11-乙基-2-氟-6H-二吡啶并[3,2-b:2',3'-e][1,4]二氮杂䓬-6-酮 3f(44 克，130.5 毫摩尔)溶于 DMF(520 毫升)的溶液中，并将此混合液 50℃加热 30 分钟。然后将反应混合液冷却至室温并用 MeI(24.4 毫升，522 毫摩尔)处理。1.5 小时后，将此反应混合物倒入冰水中。过滤出所生成的固体，先用水然后用己烷洗涤，并在减压下干燥，得到黑灰色固体的化合物 3g(43.2 克，收率为 94％)。

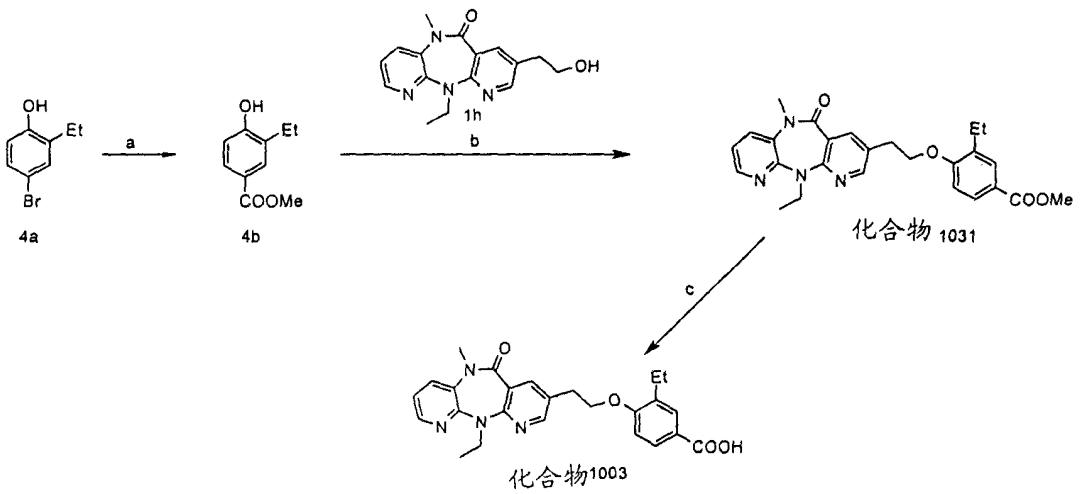
步骤 g:

将烯丙基三丁基锡(32.0 毫升，103.4 毫摩尔)及 $Pd(Ph_3P)_4$(5.43 克，4.70 毫摩尔)加至 8-溴-5,11-二氢-11-乙基-2-氟-5-甲基-6H-二吡啶并[3,2-b:2',3'-e][1,4]二氮杂䓬-6-酮 3g(33.0 克，94.0 毫摩尔)溶于 DMF(470 毫升)且经脱气的溶液(向溶液中通入 45 分钟氮气)中。分别于 1、2、3、4 及 5 小时后进一步加入 $Pd(Ph_3P)_4$(1.09 克，0.94 毫摩尔)，以完成该反应。将此混合液加热至 90℃并保持 6 小时。减压浓缩该混合物。通过快速层析法(己烷:EtOAc 为 8:2 至 7:3)纯化所得残余物，得到化合物 3h(22.4 克，收率为 76％)。

步骤 h:

将臭氧化的氧气气流通入 5,11-二氢-11-乙基-2-氟-5-甲基-8-(2-丙烯基)-6H-二吡啶并[3,2-b:2',3'-e][1,4]二氮杂䓬-6-酮 3h(22.38 克，71.6 毫摩尔)溶于 CH_2Cl_2(100 毫升)及 MeOH(100 毫升)的冷(-78℃)溶液中，时间为 3 小时。然后在此溶液中通入 15 分钟氮气气流，随后加入固体 $NaBH_4$(5.05 克，133 毫摩尔)。将此反应混合物加热至室温。1 小时后，向此反应混合物中进一步加入 $NaBH_4$(1.62 克，43.0 毫摩尔)。再经 1 小时后，在其中加入饱和的 NH_4Cl 水溶液(150 毫升)，并将此混合液在室温下搅拌 30 分钟。在减压下去除有机溶剂。加入水(200 毫升)并用 $CHCl_3$(3 × 300 毫升)萃取此混合液。将合并的有机层干燥($MgSO_4$)、过滤并减压浓缩。通过快速层析法(EtOAc:$CHCl_3$ 为 4:1)纯化所得残余物，得到白色固体的化合物 3I(19.7 克，收率为 72％)。

实施例 4(化合物编号为 1003 及 1031):



步骤 a:

将 1.6M 正丁基锂的己烷溶液(6.22 毫升，9.95 毫摩尔)快速加至 4a(0.87 克，4.33 毫摩尔)溶于 THF(20 毫升)的冷(-78℃)溶液中。将此混合液在-78℃下搅拌 10 分钟，然后温热至 0℃并在此温度下维持 1 小时。将 CO_2 气流通入此反应混合液中 10 分钟，并加入 1.0N HCl 溶液使此溶液呈酸性。用 EtOAc 萃取此溶液。将有机层干燥($MgSO_4$)、过滤并减压浓缩。将所得残余物溶解在 Et_2O(20 毫升)中并用过量 CH_2N_2 溶于 Et_2O 的溶液(约 0.6M, 10 毫升)处理 10 分钟。减压浓缩此混合液并通过快速层析法(己烷: EtOAc 为 4:1 至 7:3)纯化所得残余物，得到 4b(0.13 克，收率为 17%)。

步骤 b:

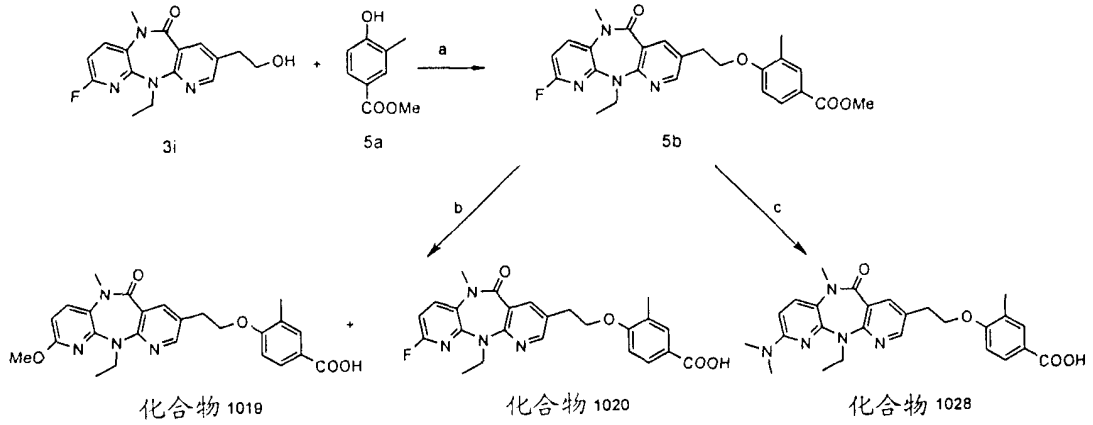
在 25℃下，用 30 分钟将 DIAD(86 微升，0.44 毫摩尔)溶于 THF(2.0 毫升)的溶液加至 1h(100 毫克，0.33 毫摩尔)、4b(60.0 毫克，0.33 毫摩尔)及 PPh_3(114 毫克，0.44 毫摩尔)溶于 THF(10 毫升)的溶液中。将此混合液搅拌 1 小时，然后减压浓缩。通过快速层析法(己烷: EtOAc 为 7:3 至 1:1)纯化所得残余物，得到化合物 1031(128 毫克，收率为 83%)。

步骤 c:

将 1.0N 的氢氧化锂水溶液(1.52 毫升，1.52 毫摩尔)加至化合物 1031(100

毫克，0.22 毫摩尔)溶于 THF(6 毫升)及 MeOH(2 毫升)的溶液中。将此反应混合物在 25℃下搅拌 24 小时，然后加热回流 1 小时。加入 1.0N HCl 水溶液使此溶液呈酸性，然后用 EtOAc 萃取。将有机层用水(2×)及盐水洗涤，然后干燥($MgSO_4$)、过滤并减压浓缩。将残余物用 Et_2O/己烷研磨，得到为白色固体的化合物 1003(80 毫克，收率为 83%)。将化合物 1003(38.0 毫克，0.085 毫摩尔)与 0.02N NaOH 水溶液(4.3 毫升，0.085 毫摩尔)的混合物在 MeCN(3 毫升)中进行超音波处理。将所得溶液冷冻干燥，得到白色固体的相应钠盐(37 毫克，收率为 98%)。

实施例 5(化合物编号为 1019、1020 及 1028):



步骤 a:

在 25℃下，用 2 小时将 DIAD(86 微升，0.44 毫摩尔)溶于 THF(2.0 毫升)的溶液加至 3i(106 毫克，0.34 毫摩尔)、5a(56.0 毫克，0.34 毫摩尔)及 PPh_3(114 毫克，0.44 毫摩尔)溶于 THF(7 毫升)的溶液中。将此混合液搅拌 1 小时，然后减压浓缩。通过快速层析法(己烷：EtOAc 为 7:3 至 1:1)纯化残余物，得到白色固体的 5b(115 毫克，收率为 73%)。

步骤 b:

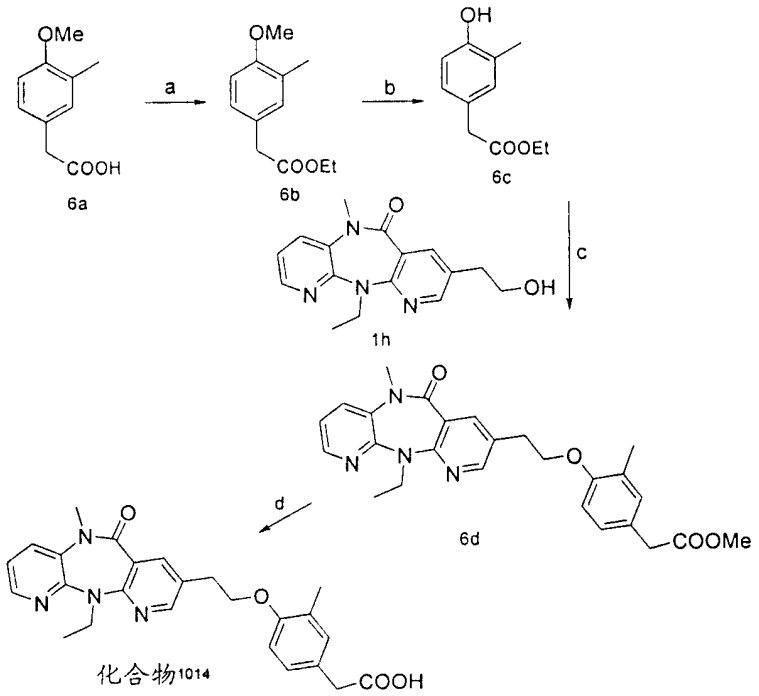
将 1.0 N 氢氧化锂水溶液(1.0 毫升，1.0 毫摩尔)加至 5b(100 毫克，0.21 毫摩尔)在 MeOH(6 毫升)中的溶液中。在 25℃下将此反应混合液搅拌 24 小时，加入 1.0N HCl 水溶液使此溶液呈酸性，然后用 EtOAc 萃取。用水及盐水洗涤有机层，并对其加以干燥($MgSO_4$)、过滤并减压浓缩。所得残余物通

过快速层析法(己烷: EtOAc:AcOH 为 50:50:1)纯化，先得到白色固体的第一化合物 1019(25 毫克，收率为 25%)，然后得到白色固体的化合物 1020(48 毫克，收率为 50%)。其相应的钠盐用 0.02 N NaOH 水溶液处理得到。

步骤 c:

将 1.0M 二甲胺的 THF 溶液(5.0 毫升，5.0 毫摩尔)及 1.0N 氢氧化锂水溶液(1.0 毫升，1.0 毫摩尔)加至 5b(50.0 毫克，0.11 毫摩尔)溶于 i-PrOH(3 毫升)的溶液中。将反应混合液加热回流 48 小时。在此混合液中加入 1.0 N 的 HCl 水溶液(2 毫升)并用 EtOAc 萃取。用水及盐水洗涤有机层，并干燥($MgSO_4$)、过滤并减压浓缩。通过快速层析法(己烷: EtOAc:AcOH 为 50:50:1)纯化所得残余物，得到白色固体的化合物 1028(18 毫克，收率为 35%)。其相应的钠盐用 0.02 N NaOH 处理得到。

实施例 6(化合物编号为 1014):



步骤 a:

向酸 6a(1.00 克，5.55 毫摩尔)溶于 CH_2Cl_2(50 毫升)的溶液中加入草酰氯(0.73 毫升，8.3 毫摩尔)及 DMF(100 微升)。将反应混合液搅拌 90 分钟，

然后加入 EtOH(15 毫升)，并将所得的反应混合液再搅拌 1 小时。减压浓缩反应混合液，用 EtOAc 稀释所得的残余物并依次用水及盐水洗涤，然后干燥($MgSO_4$)、过滤及浓缩，得到酯 6b，其无需进一步纯化即可使用。

步骤 b:

向酯 6b 溶于 CH_2Cl_2 的溶液(50 毫升)中加入 1M BBr_3 的二氯甲烷溶液(7.2 毫升，7.20 毫摩尔)中。在室温下反应 3 小时后，将此反应混合液冷却至 0℃并加入 EtOH(5 毫升)。在室温下将此反应混合液搅拌 30 分钟，然后减压浓缩。用 EtOAc 稀释残余物，并依次用 $NaHCO_3$ 饱和水溶液、水及盐水洗涤，然后干燥($MgSO_4$)、过滤并浓缩至干。通过快速层析法纯化所得残余物(己烷: EtOAc 为 70:30)，生成透明胶状的酚 6c(802 毫克，两步骤的总收率为 74％)。

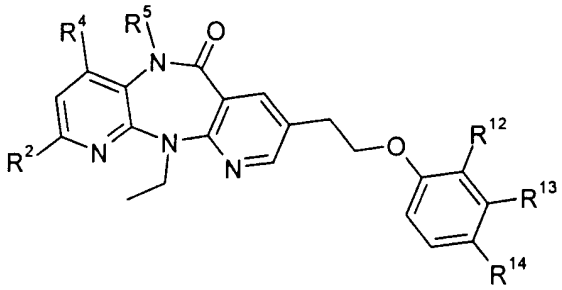
步骤 c:

在室温下，用 2 小时将 DIAD(87 微升，0.44 毫摩尔)溶于 THF(2.0 毫升)的溶液加至 1h(100 毫克，0.33 毫摩尔)、Ph_3P(104 毫克，0.44 毫摩尔)及酚 6c(65 毫克，0.34 毫摩尔)溶于 THF(7.0 毫升)的溶液中。将此混合液搅拌 4 小时，然后减压浓缩。通过快速层析法(己烷: EtOAc 为 30:70 至 50:50)纯化所得残余物，得到白色泡沫的化合物 6d(46 毫克，收率为 29％)。

步骤 d:

向酯 6d(44 毫克，0.09 毫摩尔)溶于 THF(3 毫升)与 MeOH(1 毫升)的混合液的溶液中，加入 1 N 氢氧化锂水溶液(1.0 毫升，1.0 毫摩尔)。在室温下 4 小时后，加入 1 N HCl(2 毫升)。用 EtOAc 萃取此混合液。有机层用水及盐水洗涤，并进行干燥($MgSO_4$)、过滤及浓缩，得到白色固体的化合物 1014(39 毫克，收率为 93％)。其相应的钠盐通过 1 当量的氢氧化钠水溶液处理、并对所得溶液冻干得到蓬松状白色固体而得到。

表 1



化合物编号	R^2	R^4	R^5	R^{12}	R^{13}	R^{14}	MS(ESI) m/z $(MH)^+$
1001	H	H	Me	Me	Me	COOH	447
1002	H	H	Me	Me	H	COOH	433
1003	H	H	Me	Et	H	COOH	447
1004	H	H	Me	Me	OH	COOH	449
1005	H	H	Me	Br	H	COOH	497/499
1006	H	H	Me	Me	H	CHMeCOOH	461
1007	Cl	H	Me	Me	H	CH_2CH_2COOH	495/497
1008	H	H	Me	Me	H	CH_2CH_2COOH	461
1009	Cl	H	Me	Me	H	CH=CHCOOH	493/495
1010	H	H	Me	Me	H	CH=CHCOOH	459
1011	H	H	Me	Cl	H	CH_2COOH	467/469
1012	H	H	Me	Br	H	CH_2COOH	511/513
1013	H	H	Me	Me	Me	CH_2COOH	461
1014	H	H	Me	Me	H	CH_2COOH	447
1015	Cl	H	Me	Me	H	COOH	467/469
1016	Cl	Me	H	Me	H	COOH	467/469
1017	Me	H	Me	Me	H	COOH	447
1018	H	Me	H	Me	H	COOH	433
1019	OMe	H	Me	Me	H	COOH	463
1020	F	H	Me	Me	H	COOH	451
1021	OEt	H	Me	Me	H	COOH	477

1022	H	H	Me	NO_2	H	COOH	464
1023	H	H	Me	Cl	H	COOH	453/455
1024	H	H	Me	Cl	NH_2	COOH	434
1025	H	H	Me	H	F	COOH	437
1026	H	H	Me	H	Cl	COOH	453/455
1027	H	H	Me	CF_3	H	COOH	487
1028	$N(Me)_2$	H	Me	Me	H	COOH	476
1029	H	H	H	Me	H	COOH	419
1030	H	H	Me	Me	H	COOMe	447
1031	H	H	Me	Et	H	COOMe	461
1032	H	H	Me	Cl	H	COOMe	467/469
1033	H	H	Me	CF_3	H	COOMe	501
1034	OEt	H	Me	Me	H	COOMe	491
1035	H	H	Me	H	F	COOMe	451

反转录酶(RT)测定

测定原理

反转录酶(1)为人类免疫缺陷病毒(HIV-1)所编码的众多酶中的一种，该酶之所以如此命名乃因其可自 RNA 模板转录 DNA 拷贝。此活性可在无细胞的酶测定法定量，并基于观测在使用合成模板聚 r(C)及以生物素化寡 d(G)引物下，反转录酶利用 3H-dGTP 底物转录放射性标记的 DNA 链的能力而评定。下述测定法利用野生型酶(其为 HIV-1 感染的患者中所观测到酶的主要形式)，且亦可在类似测定条件下利用突变 RT 酶(例如 Y181C，其通过定点诱变加以制备，其中密码子 181 的酪胺酸残基被半胱胺酸残基替换)。通过此测定法可测定化合物对抑制突变酶的功效。

材料:

a) 酶的制备

HIV-1 IIIB 克隆 BH10 RT 突变体由 Dr. C.-K. Shih(Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals Inc., U.S.A.)以载体 pKK233-2(Pharmacia)的方式提供。简言

之，仅包含由乳糖操纵子/trc 启动子调节的 RT p66 基因的 HIV RT 克隆 pKRT2 从 Dr. W. Summers(耶鲁大学)处获得(2)。各种具体的氨基酸取代通过定点突变引入到野生型 RT 基因中。将 RT 克隆亚克隆至 pKK233-2 细菌表现载体中。所提供的克隆包括野生型、Val106Ala、Tyr181Cys、Tyr188Cys、Tyr188Leu、Gly190Ala 及 Pro236Leu。其他通过对 pKK233-2 RT 克隆体自行进行定点突变而制得，其包括 Lys103Asn、Lys103Asn/Tyr181Cys、Lys103Asn/Leu100Ile、Lys103Asn/Pro225His 及 Lys103Asn/Val108Ile。

b) 酶的纯化

重组反转录酶的纯化通过前述方法的组合实施(3)。在 37℃下，使用取自转化的 JM109 细胞的新鲜平板的单一菌落进行预培养。将该预培养的菌种接种至 2 升的生长培养基中。在 OD_{600} ~ 1.5 下(在 37℃下进行 5-6 小时)，用 IPTG(最终为 1 毫摩尔/升)诱发 RT 基因表达，且使发酵在 37℃下再持续若干小时。经离心后，去除上清液，将细胞沉淀收集起来并在-80℃下存储，以备纯化。将细胞在 4℃下解冻过夜并使之悬浮于裂解缓冲液(MES:50mM, pH6; EDTA:1mM; 10％v/v 甘油; 0.02％w/vOBG; 0.02％w/v 叠氮化钠)中。加入溶菌酶并将此混合液在冰浴中孵育 40 分钟。在溶菌酶存在下用 Dounce 匀浆并用超音波处理后，将细胞离心 30 分钟。收集上清液(S1)并在 4℃储存。将离心后所得沉淀再悬浮于萃取缓冲液(MES:50mM, pH6; KPO_4:50mM, pH6; KCl:100mM; 10％v/v 甘油; 0.02％w/v OBG; 0.02％w/v 叠氮化钠)中并在 4℃搅拌 30 分钟。将此第二混合液离心并收集所得上清液(S2)。重复上述步骤 2 次以上，收集到上清液 S3 与 S4，最后再进行过夜萃取(S5)。将 Polymin P(终浓度为 0.005％)加入合并的上清液中以去除核酸。将该溶液在 4℃搅拌 75 分钟并离心 1 小时。在冰上用 20％w/v 硫酸铵使所述上清液(SS1)沉淀并在 4℃搅拌 1 小时。然后将此混合液离心，另加入 40％w/v 硫酸铵(总浓度为 60％)沉淀生成的上清液(SS2)，搅拌 1 小时并再次离心。第二天进行纯化前，将最终得到的沉淀(P1)在 4℃存放过夜。除非另有规定，所有纯化步骤均在 4℃进行。将沉淀(P1)重新悬浮于含 MES, 50mM, pH6; KPO_4, 10mM, pH6; KCl, 100mM; 10％v/v 甘油; 0.02w/v OBG; 以及 0.02w/v 叠氮化钠的缓冲液中。利用 12-14kD MWCO 透析袋使此悬浮液相对于相同的缓冲液进行过夜透析。将透析液离心并通过 Millex-PF 0.8 微米的过滤设备过滤所得上

清液，将滤出的样品加载至羟基磷灰石柱(30 毫升柱床体积)上并用相同缓冲液洗脱，用 220 毫升含有 10～300mM 线性梯度的 KPO_4 的相同缓冲液将结合的酶洗脱。收集含 p66/p51 杂二聚体的部分(通过 8％的 SDS-PAGE 及蛋白印迹法测定)，进行下一步纯化。含 RT 的部分用含 Bis-Tris 丙烷(50mM, pH7.0)、OBG(0.02％w/v)、甘油(10％v/v)及叠氮化钠(0.02％w/v)的溶液稀释 2 倍，然后将其加载至 Hi-Trap Hepparin Sepharose 柱(5 毫升柱床体积)上并用相同缓冲液洗脱。之后用 75 毫升含呈 0～1 M 线性梯度的硫酸铵的相同缓冲液将结合的 RT 洗脱。依据 SDS-PAGE 及蛋白印迹分析收集含有 RT 的部分。该收集物中的蛋白质浓度以 BSA 为标准品通过 Bradford 方法测定。将最终酶制剂在含 MES(50mM, pH6)、KPO_4(300mM, pH6)、KCl(175mM)、甘油(10％v/v)及叠氮化钠(0.02％w/v)的溶液中透析、然后进行等分并在-80℃冷冻。

测定步骤：

放射性酶测定法修改成适于 96 孔微量滴定板形式并利用链亲和素闪烁邻近小球实施。此测定法将在下文进行简要描述。将 HIV-1 RT 酶解冻并用含 NaCl(60mM)、氯化镁六水合物(2mM)、DTT(6mM)、GSH(2mM)及 Chaps(0.02％w/v)的 Tris/HCl(50mM, pH7.8)适当稀释，得到约 3 nM 的酶。向 30 微升该酶溶液中加入 10 微升抑制剂溶液(50μM 至 2.5 nM 抑制剂溶于上述的相同测定缓冲液中，其中包含 15％v/vDMSO)。在进行下一步骤之前，先在室温下将此微量滴定板预孵育 15 分钟。在此预孵育步骤中，抑制剂的最高浓度与最低浓度分别为 12.5μM 与 0.62 nM，DMSO 的浓度为 3.75％v/v。然后加入 10 微升底物溶液引发酶反应。最终的反应混合液含有 Tris/HCl(50mM, pH7.8)、NaCL(60mM)、硫酸镁六水合物(2mM)、DTT(6mM)、GSH(2mM)、Chaps(0.02％w/v)、DMSO(3％v/v)、Poly rC(179nM)、生物素 dG_{15}(18nM)、dGTP(288nM)、^{3}H-dGTP(71nM)及酶(1-2nM)。

在该培养步骤中，抑制剂的最高浓度及最低浓度分别为 10μM 及 0.5nM。加入底物后，用塑封覆盖微量滴定板并在 37℃下置于干燥培养箱中培养 1 小时。然后加入 75 微升含 5 毫克/毫升的链亲和素邻近小球的 EDTA(0.5 摩尔/升)终止反应。

以中等速度将微量滴定板晃动 2 分钟并在室温下孵育 1 小时。然后加

入 75 微升 7M 的氯化铯溶液，以中等速度将微量滴定板晃动 2 分钟并在室温下进一步孵育 1 小时。然后用塑封覆盖微量滴定板并利用 TopCount-NXT™ 微量板闪烁荧光计数器(Packard)进行计数。对每一孔均计数 60 秒。每排的末端包含一空白孔及一对照孔。

抑制百分率计算方法如下:

$$\%\text{抑制}=(1-[\frac{\text{cpm}\cdot\text{加样孔}-\text{cpm}\cdot\text{空白孔}}{\text{cpm}\cdot\text{对照孔}-\text{cpm}\cdot\text{空白孔}}])*100$$

利用上述测定法检测本发明的化合物对 RT 野生型(WT)及突变酶的抑制作用。测定结果在表 2 中以 IC_{50}(nM)形式列出。

为确认该化合物对 HIV 复制的抑制能力，亦在下述人 T 细胞培养(Syncytia)测定中进行检测。

用于测定细胞培养中的活性的 ELISA 测定法

在 96 孔板测定中，检测了本发明的化合物对细胞培养中 HIV 复制的抑制能力。用完全 RPMI 1640(由 RPMI 1640+10％胎牛血清、10 微克/毫升的庆大霉素及 10μM β-巯基乙醇组成)稀释化合物及细胞生长培养基。将 T 淋巴细胞系 C8166 通过编码野生型及突变反转录酶的病毒以 0.001 的感染率多次感染。然后，在本发明化合物的一系列稀释存在下将细胞培养三天。收集八个相同加样孔中的上清液，并使用市售 HIV-1 p24 抗原测定试剂盒(Bechman-Coulter®)测定细胞外 p24 的浓度。抑制水平(抑制百分率)通过下述公式计算:

$$\%\text{抑制}=(1-[\frac{\text{p24pg/mL}\cdot\text{抑制剂}}{\text{p24pg/mL}\cdot\text{对照}}])*100$$

这些检测结果在表 2 中以 EC_{50}(nM)形式列出。

参考文献(以引用方式并入本文中)

1.Benn, S.等人，Science 230:949, 1985。

2.D'Aquila, R.T.及 Summers, W.C.J.Acq.Imm.Def.Syn.2:579, 1989。

3.a) Warren, T.C.等人，Protein Expression & Purification3:479, 1992; b)Kohlstaedt, L.A.Science 256(5065):1783,1992。

表 2

式 I 化合物对野生型 RT 及 RT 突变株的抑制作用

编号	IC_{50} (WT) (nM)	IC_{50} K103N/Y181C (nM)	EC_{50} (WT) (nM)	EC_{50} K103N/Y181C (nM)
1001	C	A	C	C
1002	C	A	C	C
1003	C	A	C	C
1004	C	A	C	A
1005	C	A	C	C
1006	C	A	NT	NT
1007	C	B	C	B
1008	C	A	C	A
1009	C	C	C	C
1010	C	C	C	C
1011	C	A	NT	NT
1012	C	A	NT	NT
1013	C	A	NT	NT
1014	C	A	C	A
1015	C	B	C	C
1016	C	A	NT	NT
1017	C	A	C	C
1018	C	A	C	C
1019	C	A	C	C
1020	C	A	C	C
1021	C	A	NT	NT
1022	B	A	B	A
1023	B	A	C	A
1024	C	A	NT	NT
1025	B	NT	NT	NT

1026	B	NT	NT	NT
1027	B	A	NT	NT
1028	C	A	NT	NT
1029	C	A	C	NT
1030	C	C	C	C
1031	C	C	NT	NT
1032	C	C	NT	NT
1033	C	A	NT	NT
1034	C	B	NT	NT
1035	C	A	NT	NT

表中符号说明:

IC_{50} 及 EC_{50}: A=>100nM; B=100nm-50nM; C=<50nM; 及 NT=未检测