

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>

A61K 31/40

A61K 31/445

A61P 1/16



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03825200.7

[43] 公开日 2005 年 11 月 9 日

[11] 公开号 CN 1694696A

[22] 申请日 2003.9.23 [21] 申请号 03825200.7

[30] 优先权

[32] 2002.9.23 [33] US [31] 60/412,560

[86] 国际申请 PCT/IB2003/006471 2003.9.23

[87] 国际公布 WO2004/047719 英 2004.6.10

[85] 进入国家阶段日期 2005.5.17

[71] 申请人 牛津大学校委会

地址 英国牛津

[72] 发明人 尼科尔·齐特兹曼 雷蒙德·德韦克

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

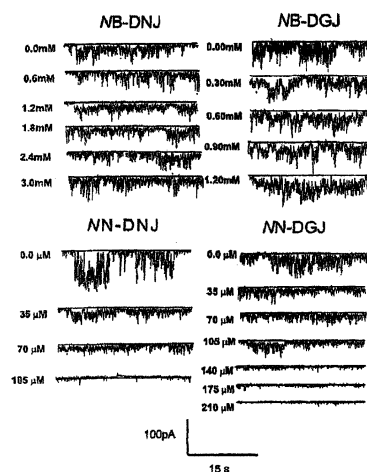
代理人 刘 玥

权利要求书 11 页 说明书 30 页 附图 8 页

[54] 发明名称 亚氨基糖衍生物在抑制离子通道活性中的应用

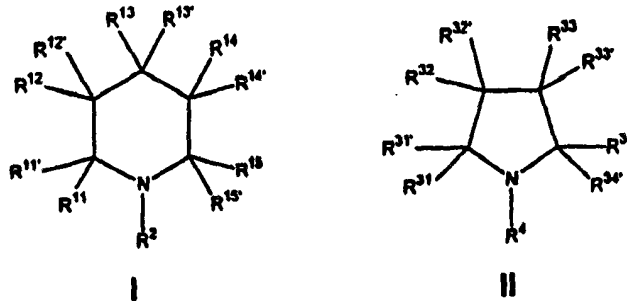
[57] 摘要

公开了通过给予有效抑制丙型肝炎病毒(HCV) p7 蛋白活性的亚氨基糖衍生化合物而治疗 HCV 感染的方法和试剂盒,以及用于筛选抑制 p7 蛋白或其变体活性的化合物的方法。所公开的 N-取代亚氨基化合物及其药用组合物抑制 HCV p7 透化膜的能力。特别有效的化合物是衍生自 N-烷基化哌啶的亚氨基糖。也公开了用于筛选潜在 HCV 抗病毒药的方法。



ISSN 1008-4274

1. 一种治疗丙型肝炎病毒(HCV)感染的方法, 所述方法包括: 给予有需要的患者选自式 I 化合物或式 II 化合物、其相关异构体、药  
5 上可接受的盐和溶剂合物的化合物:



- 其中每个取代基  $R^{11}$ 、 $R^{11'}$ 、 $R^{12}$ 、 $R^{12'}$ 、 $R^{13}$ 、 $R^{13'}$ 、 $R^{14}$ 、 $R^{14'}$ 、 $R^{15}$ 、 $R^{15'}$ 、 $R^{31}$ 、 $R^{31'}$ 、 $R^{32}$ 、 $R^{32'}$ 、 $R^{33}$ 、 $R^{33'}$ 、 $R^{34}$  和  $R^{34'}$  各自独立选自 -H; -OH; -F; -Cl; -Br; -I; -NH<sub>2</sub>; 烷基氨基和二烷基氨基; 直链或支链 C<sub>1-6</sub> 烷基, C<sub>2-6</sub> 烯基和炔基; 芳烷基; 直链或支链 C<sub>1-6</sub> 烷氧基; 芳氧基; 芳烷  
10 氧基; -(亚烷基)氧基(烷基); -CN; -NO<sub>2</sub>; -COOH, -COO(烷基); -COO(芳基); -C(O)NH(C<sub>1-6</sub> 烷基); -C(O)NH(芳基); 磺酰基; (C<sub>1-6</sub> 烷基)磺酰基; 芳基磺酰基; 氨基磺酰基, (C<sub>1-6</sub> 烷基)氨基磺酰基; (C<sub>1-6</sub> 烷基)硫基; (C<sub>1-6</sub> 烷基)磺酰胺基; 芳基磺酰胺基; -NHNH<sub>2</sub>; -NHOH; 芳基; 和杂芳基,  
15 其中每个取代基可以相同或不同;

- 其中每个烷基、烯基、炔基、芳基和杂芳基部分可任选被一个或多个独立选自以下的基团取代: -OH; -F; -Cl; -Br; -I; -NH<sub>2</sub>; 烷基氨基和二烷基氨基; 直链或支链 C<sub>1-6</sub> 烷基, C<sub>2-6</sub> 烯基和炔基; 芳烷基; 直链或支链 C<sub>1-6</sub> 烷氧基; 芳氧基; 芳烷氧基; -(亚烷基)氧基(烷基); -  
20 CN, -NO<sub>2</sub>, -COOH, -COO(烷基); -COO(芳基); -C(O)NH(C<sub>1-6</sub> 烷基); -C(O)NH(芳基); 磺酰基; (C<sub>1-6</sub> 烷基)磺酰基; 芳基磺酰基; 氨基磺酰基, (C<sub>1-6</sub> 烷基)氨基磺酰基; (C<sub>1-6</sub> 烷基)硫基; (C<sub>1-6</sub> 烷基)磺酰胺基; 芳基磺酰胺基; -NHNH<sub>2</sub>; 和 -NHOH; 且

$R^2$  和  $R^4$  为各自独立选自以下的取代基: 直链 C<sub>7-18</sub> 烷基、取代的

C<sub>1-18</sub>烷基、支链 C<sub>3-18</sub>烷基、C<sub>2-18</sub>烯基和炔基和芳烷基；

其中每个直链 C<sub>7-18</sub>烷基、支链 C<sub>3-18</sub>烷基、C<sub>2-18</sub>烯基和炔基和芳烷基可任选被取代，且每个取代的 C<sub>1-18</sub>烷基被一个或多个独立选自以下的基团取代：-OH；-F；-Cl；-Br；-I；-NH<sub>2</sub>；烷基氨基和二烷基氨基；直链或支链 C<sub>1-6</sub>烷基，C<sub>2-6</sub>烯基和炔基；芳烷基；直链或支链 C<sub>1-6</sub>烷氧基，芳氧基；芳烷氧基；-CN，-NO<sub>2</sub>，-COOH，-COO(烷基)；-COO(芳基)；-C(O)NH(C<sub>1-6</sub>烷基)；-C(O)NH(芳基)；磺酰基；(C<sub>1-6</sub>烷基)磺酰基；芳基磺酰基；氨基磺酰基，(C<sub>1-6</sub>烷基)氨基磺酰基；(C<sub>1-6</sub>烷基)硫基；(C<sub>1-6</sub>烷基)磺酰胺基；芳基磺酰胺基；-NHNH<sub>2</sub>；和-NHOH。

5 2. 权利要求 1 的方法，所述方法还包括使 HCV p7 蛋白和含有 p7 蛋白的膜组分中的一个或它们两个与所述化合物接触。

3. 权利要求 1 的方法，其中所述化合物是式 I 化合物。

4. 权利要求 3 的方法，其中 R<sup>11</sup>、R<sup>11'</sup>、R<sup>12</sup>、R<sup>12'</sup>、R<sup>13</sup>、R<sup>13'</sup>、R<sup>14</sup>、R<sup>14'</sup>、R<sup>15</sup> 和 R<sup>15'</sup> 中的至少一个为-CH<sub>2</sub>OH。

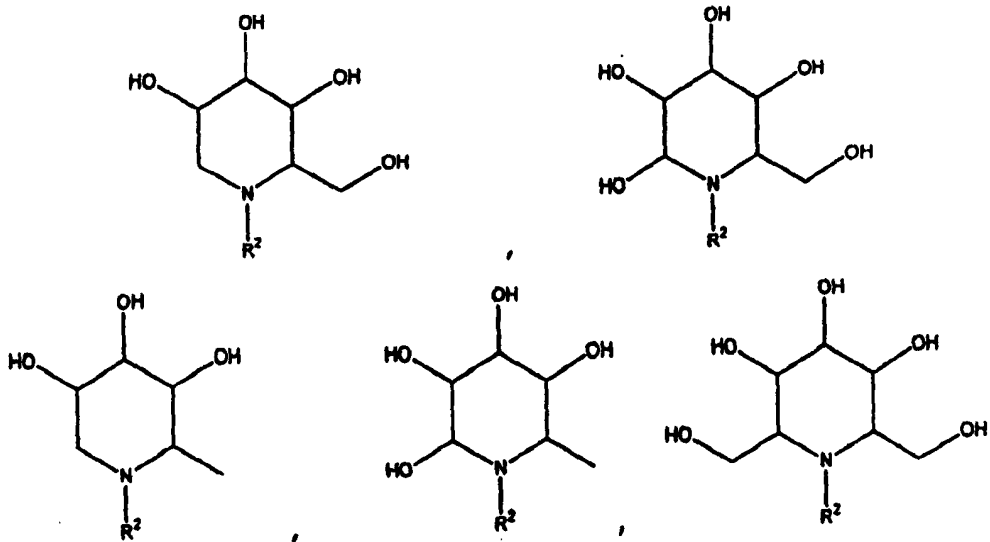
15 5. 权利要求 3 的方法，其中 R<sup>11</sup>、R<sup>11'</sup>、R<sup>12</sup>、R<sup>12'</sup>、R<sup>13</sup>、R<sup>13'</sup>、R<sup>14</sup>、R<sup>14'</sup>、R<sup>15</sup> 和 R<sup>15'</sup> 中的至少一个为-OH。

6. 权利要求 3 的方法，其中 R<sup>2</sup> 为直链 C<sub>7-18</sub>烷基、支链 C<sub>3-18</sub>烷基或取代的 C<sub>1-18</sub>烷基。

20 7. 权利要求 6 的方法，其中 R<sup>2</sup> 为直链 C<sub>7-11</sub>烷基、支链 C<sub>7-11</sub>烷基或取代的 C<sub>7-11</sub>烷基。

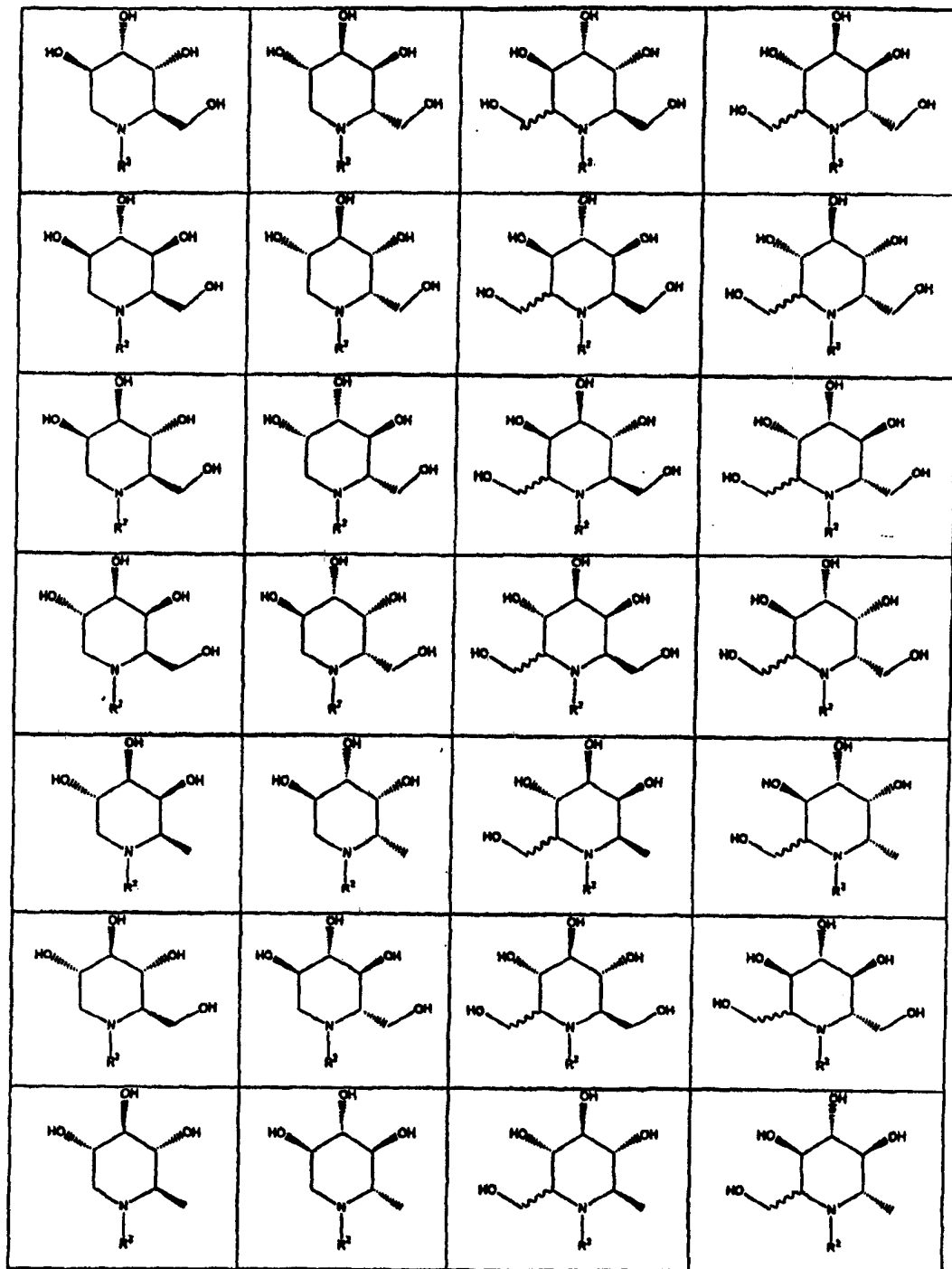
8. 权利要求 3 的方法，其中 R<sup>11</sup>、R<sup>11'</sup>、R<sup>12</sup>、R<sup>12'</sup>、R<sup>13</sup>、R<sup>13'</sup>、R<sup>14</sup>、R<sup>14'</sup>、R<sup>15</sup> 和 R<sup>15'</sup> 中的至少两个选自-CH<sub>3</sub>、-CH<sub>2</sub>OH 和-OH。

9. 权利要求 8 的方法，其中所述化合物是选自以下的化合物：

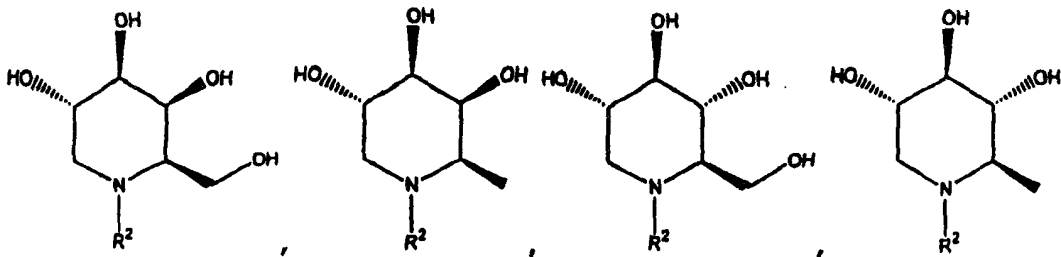


相关异构体及其混合物。

10. 权利要求 9 的方法，其中所述化合物是选自下表给出的化合物：



11. 权利要求 1 的方法，其中所述化合物是选自以下的化合物及其混合物：



12. 权利要求 11 的方法，其中  $R^2$  为直链  $C_{7-18}$  烷基、支链  $C_{3-18}$  烷基或取代的  $C_{1-18}$  烷基。
- 5      13. 权利要求 11 的方法，其中  $R^2$  为直链  $C_{7-11}$  烷基、支链  $C_{7-11}$  烷基或取代的  $C_{7-11}$  烷基。
14. 权利要求 11 的方法，其中  $R^2$  为直链  $C_{7-18}$  烷基。
15. 权利要求 14 的方法，其中  $R^2$  为直链  $C_{7-11}$  烷基。
16. 权利要求 15 的方法，其中  $R^2$  为正壬基。
- 10      17. 权利要求 11 的方法，其中  $R^2$  为被  $C_{1-6}$  烷氧基取代的直链或支链  $C_{1-18}$  烷基。
18. 权利要求 17 的方法，其中  $R^2$  为 7-氧杂壬基。
19. 权利要求 17 的方法，其中  $R^2$  为 10-十一烷基。
20. 权利要求 1 的方法，其中所述化合物是 *N*-壬基-DNJ。
- 15      21. 权利要求 1 的方法，其中所述化合物是 *N*-壬基-DGJ。
22. 权利要求 1 的方法，其中所述化合物是 *N*-7-氧杂壬基-6-脱氧-DGJ。
23. 权利要求 1 的方法，其中所述化合物是 *N*-10-氧杂十一烷基-甲基-DGJ。
- 20      24. 权利要求 1 的方法，其中所述化合物是式 II 化合物。
25. 权利要求 24 的方法，其中  $R^{31}$ 、 $R^{31'}$ 、 $R^{32}$ 、 $R^{32'}$ 、 $R^{33}$ 、 $R^{33'}$ 、 $R^{34}$  和  $R^{34'}$  中的至少一个为  $-CH_2OH$ 。
26. 权利要求 24 的方法，其中  $R^{31}$ 、 $R^{31'}$ 、 $R^{32}$ 、 $R^{32'}$ 、 $R^{33}$ 、 $R^{33'}$ 、 $R^{34}$  和  $R^{34'}$  中的至少一个为  $-OH$ 。
- 25      27. 权利要求 24 的方法，其中  $R^{31}$ 、 $R^{31'}$ 、 $R^{32}$ 、 $R^{32'}$ 、 $R^{33}$ 、 $R^{33'}$ 、

$R^{34}$  和  $R^{34}$  中的至少两个选自  $-CH_3$ 、 $-CH_2OH$  和  $-OH$ 。

28. 权利要求 27 的方法，其中  $R^4$  为直链  $C_{7-18}$  烷基、支链  $C_{3-18}$  烷基或取代的  $C_{1-18}$  烷基。

29. 权利要求 27 的方法，其中  $R^4$  为直链  $C_{7-11}$  烷基、支链  $C_{7-11}$  烷基或取代的  $C_{7-11}$  烷基。

30. 权利要求 27 的方法，其中  $R^4$  为被  $C_{1-6}$  烷氧基取代的直链或支链  $C_{1-18}$  烷基。

31. 权利要求 27 的方法，其中  $R^4$  为正壬基。

32. 权利要求 27 的方法，其中  $R^4$  为 7-氧杂壬基。

33. 权利要求 27 的方法，其中  $R^4$  为 10-氧杂十一烷基。

34. 权利要求 2 的方法，其中含有 p7 蛋白的膜相对于不含 p7 蛋白的膜来说具有增加的通透性，并且所述化合物降低增加的通透性。

35. 权利要求 34 的方法，其中所述化合物抑制通道的形成。

36. 权利要求 34 的方法，其中所述化合物是通道阻断剂。

37. 权利要求 1 的方法，其中所述患者是人。

38. 一种用于筛选潜在 HCV 抗病毒药的方法，所述方法包括：

将 p7 蛋白和变体中的至少一个掺入到膜中，以产生含有 p7 的膜，其中所述含有 p7 的膜相对于不含 p7 的膜来说具有增加的通透性；

使含有 p7 的膜的一种或多种组分与试验化合物接触；

将其中一种或多种组分已经接触试验化合物的含有 p7 的膜的通透性与其中没有组分接触试验化合物的含有 p7 的膜的通透性进行比较。

39. 权利要求 38 的方法，其中所述 p7 蛋白选自 HCV 分化体 1 的成员。

40. 权利要求 38 的方法，其中所述 p7 蛋白包含氨基酸序列  
**ALENLVILNAASLAGTHGLVSFLVFFCFAWYLKGRWVPGAVYALYGMWPLLLLLLA  
LPQRAYA (SEQ ID NO.: 1)**。

41. 权利要求 38 的方法，其中所述 p7 变体包含至少一个跨膜结

构域。

42. 权利要求 41 的方法，其中所述 p7 变体包含至少一个从所选 p7 蛋白的大约位置 10 到大约位置 32 的氨基酸序列，以及从大约位置 36 到大约位置 58 的氨基酸序列。

5 43. 权利要求 41 的方法，其中所述跨膜结构域中大于约 70% 的氨基酸是以下成员：F、I、W、Y、L、V、M、P、C 和 A。

44. 权利要求 38 的方法，其中所述 p7 变体包含生物素酰化 p7 蛋白。

45. 权利要求 38 的方法，其中使所述 p7 蛋白与试验化合物接触。

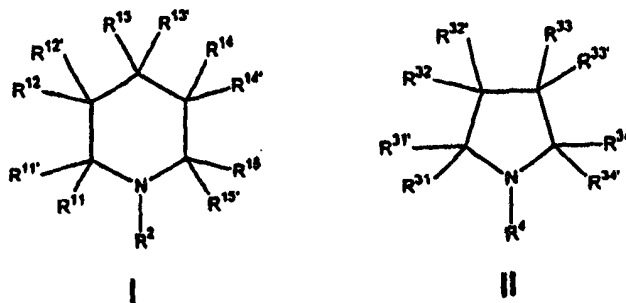
10 46. 权利要求 38 的方法，其中通过记录跨膜电流来比较通透性。

47. 权利要求 38 的方法，其中所述膜包括黑脂膜。

48. 权利要求 38 的方法，其中所述试验化合物抑制通道的形成。

49. 权利要求 38 的方法，其中所述试验化合物是通道阻断剂。

15 50. 权利要求 38 的方法，其中所述试验化合物选自式 I 化合物或式 II 化合物、其相关异构体、药学上可接受的盐和溶剂合物：



20 其中每个取代基  $R^{11}$ 、 $R^{11'}$ 、 $R^{12}$ 、 $R^{12'}$ 、 $R^{13}$ 、 $R^{13'}$ 、 $R^{14}$ 、 $R^{14'}$ 、 $R^{15}$ 、 $R^{15'}$ 、 $R^{31}$ 、 $R^{31'}$ 、 $R^{32}$ 、 $R^{32'}$ 、 $R^{33}$ 、 $R^{33'}$ 、 $R^{34}$  和  $R^{34'}$  各自独立选自 -H；-OH；-F；-Cl；-Br；-I；-NH<sub>2</sub>；烷基氨基和二烷基氨基；直链或支链 C<sub>1-6</sub> 烷基，C<sub>2-6</sub> 烯基和炔基；芳烷基；直链或支链 C<sub>1-6</sub> 烷氧基；芳氧基；芳烷氧基；-(亚烷基)氧基(烷基)；-CN；-NO<sub>2</sub>；-COOH；-COO(烷基)；-COO(芳基)；-C(O)NH(C<sub>1-6</sub> 烷基)；-C(O)NH(芳基)；磺酰基；(C<sub>1-6</sub> 烷基)磺酰基；芳基磺酰基；氨基磺酰基，(C<sub>1-6</sub> 烷基)氨基磺酰基；(C<sub>1-6</sub> 烷基)硫基；(C<sub>1-6</sub> 烷基)磺酰胺基；芳基磺酰胺基；-NHNH<sub>2</sub>；-NHOH；芳基；和杂芳基；



其中每个取代基可以相同或不同；

其中每个烷基、烯基、炔基、芳基和杂芳基部分可任选被一个或多个独立选自以下的基团取代：-OH；-F；-Cl；-Br；-I；-NH<sub>2</sub>；烷基氨基和二烷基氨基；直链或支链 C<sub>1-6</sub> 烷基，C<sub>2-6</sub> 烯基和炔基；芳烷基；  
 5 直链或支链 C<sub>1-6</sub> 烷氧基；芳氧基；芳烷氧基；-(亚烷基)氧基(烷基)；-CN，-NO<sub>2</sub>，-COOH，-COO(烷基)；-COO(芳基)；-C(O)NH(C<sub>1-6</sub> 烷基)；-C(O)NH(芳基)；磺酰基；(C<sub>1-6</sub> 烷基)磺酰基；芳基磺酰基；氨磺酰基，(C<sub>1-6</sub> 烷基)氨磺酰基；(C<sub>1-6</sub> 烷基)硫基；(C<sub>1-6</sub> 烷基)磺酰胺基；芳基磺酰胺基；-NHNH<sub>2</sub>；和-NHOH；且

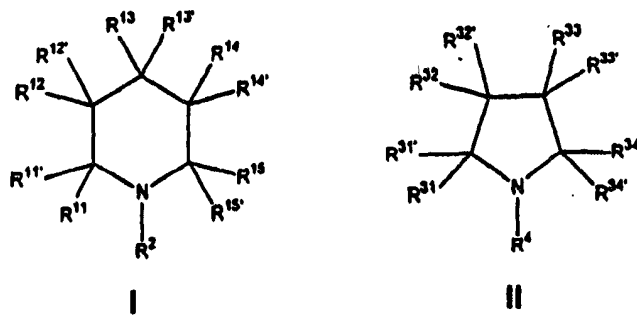
10 R<sup>2</sup> 和 R<sup>4</sup> 为各自独立选自以下的取代基：直链 C<sub>7-18</sub> 烷基、取代的 C<sub>1-18</sub> 烷基、支链 C<sub>3-18</sub> 烷基、C<sub>2-18</sub> 烯基和炔基和芳烷基；

其中每个直链 C<sub>7-18</sub> 烷基、支链 C<sub>3-18</sub> 烷基、C<sub>2-18</sub> 烯基和炔基和芳烷基可任选被取代，且每个取代的 C<sub>1-18</sub> 烷基被一个或多个独立选自以下的基团取代：-OH；-F；-Cl；-Br；-I；-NH<sub>2</sub>；烷基氨基和二烷基氨基；直链或支链 C<sub>1-6</sub> 烷基，C<sub>2-6</sub> 烯基和炔基；芳烷基；直链或支链 C<sub>1-6</sub> 烷氧基，芳氧基；芳烷氧基；-CN，-NO<sub>2</sub>，-COOH，-COO(烷基)；-COO(芳基)；-C(O)NH(C<sub>1-6</sub> 烷基)；-C(O)NH(芳基)；磺酰基；(C<sub>1-6</sub> 烷基)磺酰基；芳基磺酰基；氨磺酰基，(C<sub>1-6</sub> 烷基)氨磺酰基；(C<sub>1-6</sub> 烷基)硫基；(C<sub>1-6</sub> 烷基)磺酰胺基；芳基磺酰胺基；-NHNH<sub>2</sub>；和-NHOH。  
 15

20 51. 权利要求 38 的方法，其中所述试验化合物是金刚烷胺或其衍生物。

52. 一种用于治疗丙型肝炎病毒(HCV)感染的试剂盒，所述试剂盒包括：

(A) 式 I 化合物或式 II 化合物、其相关异构体、药学上可接受的  
 25 盐或溶剂合物：



其中每个取代基  $R^{11}$ 、 $R^{11'}$ 、 $R^{12}$ 、 $R^{12'}$ 、 $R^{13}$ 、 $R^{13'}$ 、 $R^{14}$ 、 $R^{14'}$ 、 $R^{15}$ 、 $R^{15'}$ 、 $R^{31}$ 、 $R^{31'}$ 、 $R^{32}$ 、 $R^{32'}$ 、 $R^{33}$ 、 $R^{33'}$ 、 $R^{34}$  和  $R^{34'}$  各自独立选自 -H; -OH; -F; -Cl; -Br; -I; -NH<sub>2</sub>; 烷基氨基和二烷基氨基; 直链或支链 C<sub>1-6</sub> 烷基, C<sub>2-6</sub> 烯基和炔基; 芳烷基; 直链或支链 C<sub>1-6</sub> 烷氧基; 芳氧基; 芳烷氧基; -(亚烷基)氧基(烷基); -CN; -NO<sub>2</sub>; -COOH, -COO(烷基); -COO(芳基); -C(O)NH(C<sub>1-6</sub> 烷基); -C(O)NH(芳基); 磺酰基; (C<sub>1-6</sub> 烷基)磺酰基; 芳基磺酰基; 氨基磺酰基, (C<sub>1-6</sub> 烷基)氨基磺酰基; (C<sub>1-6</sub> 烷基)硫基; (C<sub>1-6</sub> 烷基)磺酰胺基; 芳基磺酰胺基; -NHNH<sub>2</sub>; -NHOH; 芳基; 和杂芳基, 其中每个取代基可以相同或不同;

其中每个烷基、烯基、炔基、芳基和杂芳基部分可任选被一个或多个独立选自以下的基团取代: -OH; -F; -Cl; -Br; -I; -NH<sub>2</sub>; 烷基氨基和二烷基氨基; 直链或支链 C<sub>1-6</sub> 烷基, C<sub>2-6</sub> 烯基和炔基; 芳烷基; 直链或支链 C<sub>1-6</sub> 烷氧基, 芳氧基; 芳烷氧基; -(亚烷基)氧基(烷基); -CN, -NO<sub>2</sub>, -COOH, -COO(烷基); -COO(芳基); -C(O)NH(C<sub>1-6</sub> 烷基); -C(O)NH(芳基); 磺酰基; (C<sub>1-6</sub> 烷基)磺酰基; 芳基磺酰基; 氨基磺酰基, (C<sub>1-6</sub> 烷基)氨基磺酰基; (C<sub>1-6</sub> 烷基)硫基; (C<sub>1-6</sub> 烷基)磺酰胺基; 芳基磺酰胺基; -NHNH<sub>2</sub>; 和 -NHOH; 且

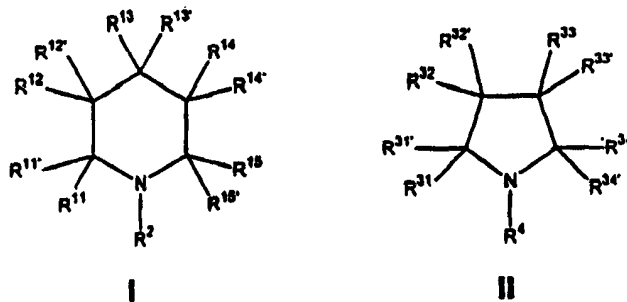
$R^2$  和  $R^4$  为各自独立选自以下的取代基: 直链 C<sub>7-18</sub> 烷基、取代的 C<sub>1-18</sub> 烷基、支链 C<sub>3-18</sub> 烷基、C<sub>2-18</sub> 烯基和炔基和芳烷基;

其中每个直链 C<sub>7-18</sub> 烷基、支链 C<sub>3-18</sub> 烷基、C<sub>2-18</sub> 烯基和炔基和芳烷基可任选被取代, 且每个取代的 C<sub>1-18</sub> 烷基被一个或多个独立选自以下的基团取代: -OH; -F; -Cl; -Br; -I; -NH<sub>2</sub>; 烷基氨基和二烷基氨基; 直链或支链 C<sub>1-6</sub> 烷基, C<sub>2-6</sub> 烯基和炔基; 芳烷基; 直链或支链 C<sub>1-</sub>

6 烷氧基, 芳氧基; 芳烷氧基; -CN, -NO<sub>2</sub>, -COOH, -COO(烷基); -COO(芳基); -C(O)NH(C<sub>1-6</sub>烷基); -C(O)NH(芳基); 磺酰基; (C<sub>1-6</sub>烷基)磺酰基; 芳基磺酰基; 氨磺酰基, (C<sub>1-6</sub>烷基)氨磺酰基; (C<sub>1-6</sub>烷基)硫基; (C<sub>1-6</sub>烷基)磺酰胺基; 芳基磺酰胺基; -NHNH<sub>2</sub>; 和-NHOH; 和

5 (B) 用于治疗 HCV 感染的说明书。

53. 一种式 I 化合物或式 II 化合物、其相关异构体、药学上可接受的盐或溶剂合物的组合物:



其中每个取代基 R<sup>11</sup>、R<sup>11'</sup>、R<sup>12</sup>、R<sup>12'</sup>、R<sup>13</sup>、R<sup>13'</sup>、R<sup>14</sup>、R<sup>14'</sup>、R<sup>15</sup>、  
 10 R<sup>15'</sup>、R<sup>31</sup>、R<sup>31'</sup>、R<sup>32</sup>、R<sup>32'</sup>、R<sup>33</sup>、R<sup>33'</sup>、R<sup>34</sup>和 R<sup>34'</sup>各自独立选自-H; -OH;  
 -F; -Cl; -Br; -I; -NH<sub>2</sub>; 烷基氨基和二烷基氨基; 直链或支链 C<sub>1-6</sub>烷基,  
 C<sub>2-6</sub>烯基和炔基; 芳烷基; 直链或支链 C<sub>1-6</sub>烷氧基; 芳氧基; 芳烷  
 氧基; -(亚烷基)氧基(烷基); -CN; -NO<sub>2</sub>; -COOH, -COO(烷基); -COO(芳  
 15 基); -C(O)NH(C<sub>1-6</sub>烷基); -C(O)NH(芳基); 磺酰基; (C<sub>1-6</sub>烷基)磺酰基;  
 芳基磺酰基; 氨磺酰基, (C<sub>1-6</sub>烷基)氨磺酰基; (C<sub>1-6</sub>烷基)硫基; (C<sub>1-6</sub>  
 烷基)磺酰胺基; 芳基磺酰胺基; -NHNH<sub>2</sub>; -NHOH; 芳基; 和杂芳基,  
 其中每个取代基可以相同或不同;

其中每个烷基、烯基、炔基、芳基和杂芳基部分可任选被一个或  
 多个独立选自以下的基团取代: -OH; -F; -Cl; -Br; -I; -NH<sub>2</sub>; 烷基  
 20 氨基和二烷基氨基; 直链或支链 C<sub>1-6</sub>烷基, C<sub>2-6</sub>烯基和炔基; 芳烷基;  
 直链或支链 C<sub>1-6</sub>烷氧基; 芳氧基; 芳烷氧基; -(亚烷基)氧基(烷基); -  
 CN, -NO<sub>2</sub>, -COOH, -COO(烷基); -COO(芳基); -C(O)NH(C<sub>1-6</sub>烷基);  
 -C(O)NH(芳基); 磺酰基; (C<sub>1-6</sub>烷基)磺酰基; 芳基磺酰基; 氨磺酰基,  
 (C<sub>1-6</sub>烷基)氨磺酰基; (C<sub>1-6</sub>烷基)硫基; (C<sub>1-6</sub>烷基)磺酰胺基; 芳基磺酰

---

胺基;  $-\text{NHNH}_2$ ; 和  $-\text{NHOH}$ ; 且  
 $\text{R}^2$  和  $\text{R}^4$  为 10-氧杂十一烷基。

## 亚氨基糖衍生物在抑制离子通道活性中的应用

### 5 相关申请的交叉引用

本申请要求于 2002 年 9 月 23 日申请的美国临时申请顺序号 60/412,560 的优先权, 所述临时申请通过引用全部结合到本文中。

### 背景

10 丙型肝炎病毒(HCV)是具有晚期肝硬化和肝细胞癌的显著危险的慢性肝炎的主要原因(参见 Di Bisceglie, A. M., (1997) *Hepatology* 26 (3 增刊 1): 345-385)。HCV 属于黄病毒科(*Flaviviridae*), 该科由三个属组成: 黄病毒(*flavivirus*)、瘟病毒(*pestivirus*)和嗜肝病毒(*hepacivirus*)。当缺乏合适的小动物模型和可靠的体外感染性测定用于 HCV 时, 先用一种相关的瘟病毒即牛病毒性腹泻病毒(BVDV), 初步测试潜在的  
15 抗病毒药物。已经采用 BVDV 体外感染性测定证明, 含有葡萄糖类似物 1,5-二脱氧-1,5-亚氨基-D-葡萄糖醇(也称为脱氧野尻霉素(*deoxynojirimycin*)或“DNJ”)或者半乳糖类似物 1,5-二脱氧-1,5-亚氨基-D-半乳糖醇(也称为脱氧半乳糖野尻霉素(*deoxygalactonojirimycin*)或“DGJ”)的烷基化亚氨基糖衍生物是有效的抗病毒抑制剂(参见  
20 *Durantel, D.*等, (2001) *J. Virol.* 75(19): 8987-98)。

DNJ 衍生物至少是部分抗病毒抑制剂, 因为它们抑制 ER  $\alpha$ -葡萄糖苷酶 I 和 II。这些酶去除形成 N 聚糖前体部分的三个葡萄糖残基, 所述前体被整个地转移给 ER 中的新生糖蛋白。ER  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制  
25 阻止含 N 联寡糖的单葡萄糖基化糖蛋白的形成, 并且阻止含 N 联寡糖的单葡萄糖基化糖蛋白随后与驻留在 ER 中的陪伴分子钙联接蛋白和钙网蛋白的相互作用(参见 *Bergeron, J. J.*等, (1994) *Trends Biochem. Sci.* 19(3): 第 124-8 页; *Peterson, JR.*等, (1995) *Mol. Biol. Cell*

6(9): 1173-84)。对于包括 BVDV 包膜糖蛋白和 HCV 包膜糖蛋白在内的许多宿主编码的和病毒编码的糖蛋白的适当折叠来说, 钙联接蛋白相互作用是至关重要的(参见 Branza-Nichita, N.等, (2001) *J Virol.* 75(8): 3527-36; Choukhi, A.等, (1998) *J. Virol.*, 1998 72(5): 3851-8)。

5 BVDV 包膜糖蛋白的错折叠会降低病毒粒子从感染细胞中的分泌。

先前实验已经显示, 长链烷基衍生物 N-壬基-DNJ (MN-DNJ)的抗病毒效果比短链烷基衍生物 N-丁基-DNJ (NB-DNJ)更显著, 尽管后者在细胞中达到更有效的 ER  $\alpha$ -葡糖苷酶抑制(参见 Durantel, D.等, (2001) *J. Virol.* 75(19): 8987-98)。另外, 不被识别 ER  $\alpha$ -葡糖苷酶的长链烷基 DGJ-衍生物和不抑制 ER  $\alpha$ -葡糖苷酶的长链烷基 DGJ-衍生物也显示出有效的抗病毒活性。因此, ER  $\alpha$ -葡糖苷酶抑制与观察到的抗病毒效果没有直接关系, 排除了它作为单独的抗病毒机制。

其它的作用机制显然与烷基侧链长度有关, 因为短链 N-丁基-DGJ (NB-DGJ)没有显示出抗病毒活性, 而长链烷基衍生物 MN-DGJ 却是有效的抑制剂。然而, 这与烷基化亚氨基糖衍生物的两亲性去垢剂样效应并无关系, 因为在体外 BVDV 感染性测定中, 结构类似的去垢剂 n-辛基葡萄糖苷(n-OG)和 n-壬基葡萄糖苷都不是抗病毒剂(参见 Durantel, D.等, (2001) *J. Virol.* 75(19): 8987-98)。药物处理影响病毒膜糖蛋白的二聚作用并且改变了 BVDV 病毒粒子分泌的膜糖蛋白组成, 但并不影响病毒 RNA 复制, 也不影响病毒蛋白质合成。

因其 ER  $\alpha$ -葡糖苷酶抑制活性, 无论是长链还是短链烷基 DNJ-衍生物都对登革病毒(DENV)和日本脑炎病毒(JEV)等黄病毒具有抗病毒性(参见 Courageot, M. P.等, (2000) *J Virol.* 74(1): 564-72; Wu, S. F.等, (2002) *J. Virol.*, 76(8): 3596-604)。相比之下, DGJ-衍生物没有显示出针对黄病毒的抗病毒活性, 但长链烷基 DGJ-衍生物却是有效的瘟病毒抑制剂。与更密切相关的瘟病毒和嗜肝病毒不同, 黄病毒不含 p7 或类似的小跨膜蛋白。同样, DNJ-衍生物和 DGJ-衍生物可通过抑制 p7 或类似蛋白, 抑制病毒复制。

HCV 正链 RNA 基因组编码一种约 3000 个氨基酸残基的多蛋白前体。该多蛋白通过病毒蛋白酶和细胞蛋白酶进行共翻译和翻译后加工，以产生成熟的结构蛋白和非结构蛋白 C、E1、E2、p7、NS2、NS3、NS4A、NS4B、NS5A 和 NS5B (有关综述参见 Reed, K. E. 和 C. M. Rice, (2000) *Curr. Top. Microbiol Immunol* 242: 第 55-84 页)，以及来自多蛋白 N-端区的核糖体移码的潜在的 F 蛋白(参见 Xu, Z.等, (2001) *EMBO J.* 20(14): 第 3840-8 页)。尽管在翻译过程中或紧接着在翻译后，有效完成了多蛋白前体的大多数切割，但是在 E2/p7 和 p7/NS2 位点的切割却是延迟的，导致产生 E2-p7-NS2 前体。此外，在 E2 和 p7 间的加工是不完全的，导致 E2-p7 以及 E2 和 p7 的产生(参见 Lin, C.等, (1994) *J. Virol.* 68(8): 第 5063-73 页; Mizushima, H.等, (1994) *J. Virol.* 68(10): 第 6215-22 页)。

因为没有可用的 HCV 复制的细胞培养模型，所以，有关 HCV 复制的信息都是通过使用 BVDV 细胞培养模型而来。同样，有关 p7 的大多数功能性数据是从 BVDV p7 (一种与 HCV p7 非常类似的 70 个氨基酸的蛋白)的研究中获得。通过将突变引入到感染性 BVDV 的 cDNA 克隆，已经得到有关 BVDV p7 的功能性数据。完整 p7 基因的一个符合读框的缺失并不影响 BVDV RNA 复制，但却导致产生非感染性病毒粒子。然而，可通过补充 p7，产生感染性病毒粒子(参见 Harada, T., N. Tautz 和 H. J. Thiel, (2000) *J. Virol.* 74(20): 9498-506)，这表明瘟病毒 p7 对感染性子代病毒的产生是必要的。

HCV p7 蛋白是 63 个氨基酸的肽，其已显示出是两次跨膜的多境起源的膜蛋白，并且其 N-端和 C-端朝向胞外环境(参见 Carrere-Kremer, S.等, (2002) *J. Virol.* 76(8): 3720-30)。同样，p7 蛋白已显示出包括两个跨膜结构域。其 N-端跨膜结构域包括从大约位置 10 到大约位置 32 的氨基酸，而其 C-端跨膜结构域包括从大约位置 36 到大约位置 58 的氨基酸。尽管在所有 HCV 病毒株中这两个跨膜结构域的氨基酸有所不同，但对于已报道的病毒株来说，跨膜结构域的大部





-Cl; -Br; -I; -NH<sub>2</sub>; 烷基氨基和二烷基氨基; 直链或支链 C<sub>1-6</sub> 烷基, C<sub>2-6</sub> 烯基和炔基; 芳烷基; 直链或支链 C<sub>1-6</sub> 烷氧基; 芳氧基; 芳烷氧基; -(亚烷基)氧基(烷基); -CN; -NO<sub>2</sub>; -COOH; -COO(烷基); -COO(芳基); -C(O)NH(C<sub>1-6</sub> 烷基); -C(O)NH(芳基); 磺酰基; (C<sub>1-6</sub> 烷基)磺酰基; 芳基磺酰基; 氨基磺酰基, (C<sub>1-6</sub> 烷基)氨基磺酰基; (C<sub>1-6</sub> 烷基)硫基; (C<sub>1-6</sub> 烷基)磺酰胺基; 芳基磺酰胺基; -NHNH<sub>2</sub>; -NHOH; 芳基; 和杂芳基, 其中每个取代基可以相同或不同。

R<sup>2</sup> 和 R<sup>4</sup> 为各自独立选自以下的取代基: 直链 C<sub>7-18</sub> 烷基、取代的 C<sub>1-18</sub> 烷基、支链 C<sub>3-18</sub> 烷基、C<sub>2-18</sub> 烯基和炔基和芳烷基。每个直链 C<sub>7-18</sub> 烷基、支链 C<sub>3-18</sub> 烷基、C<sub>2-18</sub> 烯基和炔基和芳烷基可任选被取代, 且取代的 C<sub>1-18</sub> 烷基被一个或多个独立选自以下的取代基取代: -OH; -F; -Cl; -Br; -I; -NH<sub>2</sub>; 烷基氨基和二烷基氨基; 直链或支链 C<sub>1-6</sub> 烷基, C<sub>2-6</sub> 烯基和炔基; 芳烷基; 直链或支链 C<sub>1-6</sub> 烷氧基, 芳氧基; 芳烷氧基; -CN; -NO<sub>2</sub>; -COOH; -COO(烷基); -COO(芳基); -C(O)NH(C<sub>1-6</sub> 烷基); -C(O)NH(芳基); 磺酰基; (C<sub>1-6</sub> 烷基)磺酰基; 芳基磺酰基; 氨基磺酰基, (C<sub>1-6</sub> 烷基)氨基磺酰基; (C<sub>1-6</sub> 烷基)硫基; (C<sub>1-6</sub> 烷基)磺酰胺基; 芳基磺酰胺基; -NHNH<sub>2</sub>; 和-NHOH, 其中所选的取代基可以相同或不同。特别合适的取代基包括壬基、7-氧杂壬基和 10-氧杂十一烷基, 而特别需要的化合物包括 N-壬基脱氧野尻霉素(MN-DNJ)、N-壬基脱氧半乳糖野尻霉素(MN-DGJ)、N-7-氧杂壬基-6-甲基脱氧半乳糖野尻霉素(即 N-7-氧杂壬基-6-脱氧-DGJ、N-7-氧杂壬基-1,6-二脱氧半乳糖野尻霉素或 N-7-氧杂壬基-甲基-DGJ)和 N-10-氧杂十一烷基-1,6-二脱氧半乳糖野尻霉素(即 N-10-氧杂十一烷基-6-甲基脱氧半乳糖野尻霉素、N-10-氧杂十一烷基-甲基-DGJ、N-10-氧杂十一烷基-6-脱氧-DGJ、(2R,3S,4R,5S)-1-(9-甲氧基壬基)-2-甲基-3,4,5-吡啶三醇、(2R,3R)-2,3-二羟基丁二酸酯(1:1)或 SP240)。

可将一种或多种所述化合物包装成用于治疗 HCV 感染的试剂盒。该试剂盒可包括治疗 HCV 感染的说明书以及给予所述化合物的

用具。

另一个实施方案涉及用于筛选能抑制 HCV p7 活性的化合物的方法。具体地讲,可根据化合物是否抑制 p7 或 p7 变体透化膜的能力进行筛选。在这样的方法中,需要使用人工膜系统或细菌系统。

5

#### 附图简述

图 1A 显示大肠杆菌(*E. coli*) Rosetta gami(DE3)pLacI 细胞的生长曲线。在指定时间内(诱导后的小时)监测非转化细胞(A)、pTriEx1.1 转化的细胞(B)和 pTiEx1.1 p7 转化的细胞(C)的光密度( $OD_{600nm}$ )。显示了未诱导细胞( $\circ$ )和加入 1 mM IPTG 诱导的细胞( $\square$ )的生长曲线。图 1B 显示,在指定时间内由非转化大肠杆菌 Rosetta gami(DE3)pLacI 细胞(A)、pTriEx1.1 转化的细胞(B)和 pTiEx1.1 p7 转化的细胞(C)释放的 [ $^3H$ ]-尿苷。显示了未诱导细胞( $\circ$ )和加入 1 mM IPTG 诱导的细胞( $\square$ )的生长曲线。

10

图 2 显示合成 HCV p7 的 Tris-tricine 凝胶电泳分析。凝胶经银染色(左图)或转移到膜上,随后用链霉抗生物素探测(右图)。

15

图 3A 显示将合成 HCV p7 重组到 BLM 中的通道记录。直线表示闭合状态。图 3B 显示,数据收集约 30 分钟后记录的电流曲线。图 3C 显示,如图 3A 所示,在 + 100 mV 膜电位记录到的电流曲线柱状图。

图 4 显示短链(NB-DNJ, NB-DGJ)和长链(MN-DNJ, MN-DGJ)烷基亚氨基糖衍生物对 BLM 中 p7 通道信号的影响。钳制电位稳定维持在 + 100 mV,加入亚氨基糖衍生物直至指定的终浓度。

20

图 5 显示 N7-氧杂壬基-6-脱氧-DGJ (或者称为 N7-氧杂壬基-甲基-DGJ)对 BLM 中 p7 通道信号的影响。钳制电位稳定维持在 + 100 mV,加入 N7-氧杂壬基-6-脱氧-DGJ 直至指定的终浓度。

图 6 显示归一化总电流曲线和标准偏差对药物浓度绘制的曲线示意图。对于 MN-DNJ (方形)和 MN-DGJ (菱形),数据代表 4 秒钟的

3 个代表性的曲线片段的平均值,而对于 N7-氧杂壬基-6-脱氧-DGJ (三角), 数据代表 30 秒钟的 3 个代表性的曲线片段的平均值。按照公式“总电流” =  $1/(1 + ([药物]/K_{app}))$ , 由数据 S 拟合推导出近似结合常数 ( $K_{app}$ ) 为: 对于 MN-DNJ,  $K_{app} = 45.2 (\pm 10.7) \mu\text{M}$ ; 对于 MN-DGJ,  $K_{app} = 110.4 (\pm 19.9) \mu\text{M}$ ; 对于 N7-氧杂壬基-6-脱氧-DGJ,  $K_{app} = 114.2 (\pm 18.3) \mu\text{M}$ 。

图 7 显示 SP240 (即 N-10-氧杂十一烷基-1,6-二脱氧半乳糖野尻霉素)对 BLM 中 p7 通道信号的影响。

10

## 定 义

除非另有说明,本文所用的术语“烷基”是指含有一个或多个碳原子的直链和支链烷基,包括例如甲基、乙基、丁基和壬基。

本文所用的术语“芳基”是指苯环等单环芳基,或者茚满基、萘基或芴基等苯并稠合芳基。

15

本文所用的术语“杂芳基”是指含有一个或多个杂原子的芳族化合物。实例包括吡啶基、咪唑基和噻吩基或含有一个或多个杂原子的苯并稠合芳族化合物,例如吲哚基或喹啉基。

本文所用的术语“杂原子”是指 N、O、S 等非碳原子。

20

本文所用的术语“环烷基”是指含有 3、4、5、6、7 或 8 个碳的碳环,包括例如环丙基和环己基。

除非另有说明,本文所用的术语“烷氧基”是指含有一个或多个碳原子的直链或支链烷氧基,包括例如甲氧基和乙氧基。

本文所用的术语“烯基”是指含有一个或多个双键的直链或支链烷基,例如乙烯基和丙烯基。

25

本文所用的术语“芳烷基”是指被苄基和苯乙基等芳基取代的烷基。

本文所用的术语“炔基”是指含有一个或多个三键的直链或支链烷基,例如乙炔基和丙炔基。

本文所用的术语“芳氧基”是指-OH 基团中的氢原子被芳基取代而产生的取代基，包括例如苯氧基。

本文所用的术语“芳烷氧基”是指被芳基取代的烷氧基，例如 2-苯基乙氧基。

5 本文所用的术语“烷基氨基”是指被一个烷基取代的氨基，例如甲氨基(-NHCH<sub>3</sub>)和乙氨基(-NHCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)。

本文所用的术语“二烷基氨基”是指被两个烷基取代的氨基，例如二甲氨基(-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)和二乙氨基(-N(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)。

10 本文所用的术语“DNG”是指 1,5-二脱氧-1,5-亚氨基-D-葡萄糖醇或“脱氧野尻霉素”。

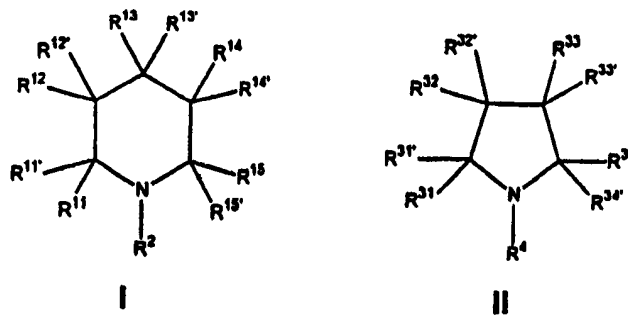
本文所用的术语“DGJ”是指 1,5-二脱氧-1,5-亚氨基-D-半乳糖醇或“脱氧半乳糖野尻霉素”。

本文所用的术语“BLM”是指“黑脂膜”。

15

### 优选实施方案的详述

在所公开的方法中使用的化合物，作为 HCV p7 的抑制剂是有效的。在最广泛的方面，所述化合物由下式 I 或 II 表示：



20 在一方面，所述方法设计给予式 I 化合物。每个 R<sup>11</sup>、R<sup>11'</sup>、R<sup>12</sup>、R<sup>12'</sup>、R<sup>13</sup>、R<sup>13'</sup>、R<sup>14</sup>、R<sup>14'</sup>、R<sup>15</sup> 和 R<sup>15'</sup>各自独立选自-H；-OH；-F；-Cl；-Br；-I；-NH<sub>2</sub>；烷基氨基和二烷基氨基；直链或支链 C<sub>1-6</sub> 烷基，C<sub>2-6</sub> 烯基和炔基；芳烷基；直链或支链 C<sub>1-6</sub> 烷氧基；芳氧基；芳烷氧基；-(亚烷基)氧基(烷基)；-CN；-NO<sub>2</sub>；-COOH；-COO(烷基)；-COO(芳基)；-C(O)NH(C<sub>1-6</sub> 烷基)；-C(O)NH(芳基)；磺酰基；(C<sub>1-6</sub> 烷基)磺酰

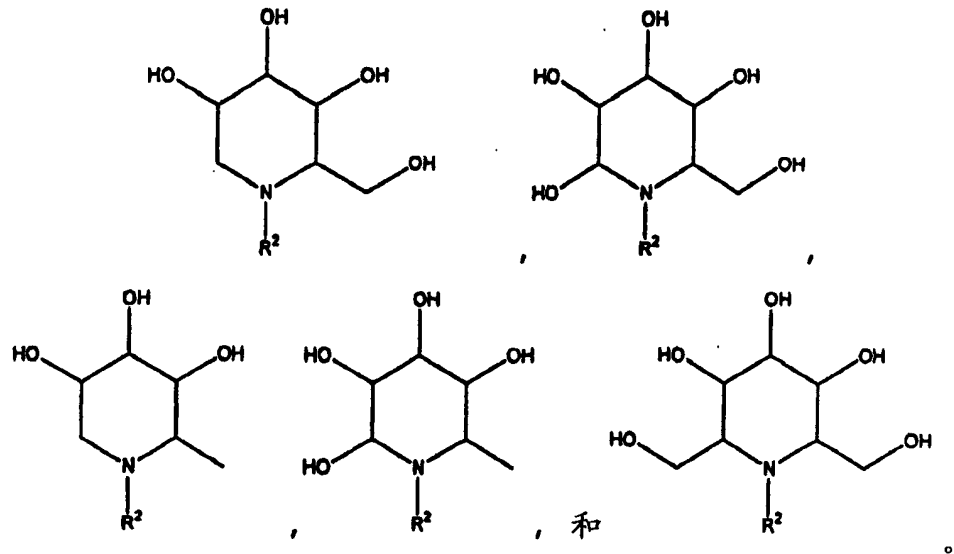
基; 芳基磺酰基; 氨磺酰基, (C<sub>1-6</sub>烷基)氨磺酰基; (C<sub>1-6</sub>烷基)硫基; (C<sub>1-6</sub>烷基)磺酰胺基; 芳基磺酰胺基; -NHNH<sub>2</sub>; -NHOH; 芳基; 和杂芳基。每个取代基可以相同或不同。

5 在一个优选的实施方案中, R<sup>11</sup>、R<sup>11'</sup>、R<sup>12</sup>、R<sup>12'</sup>、R<sup>13</sup>、R<sup>13'</sup>、R<sup>14</sup>、R<sup>14'</sup>、R<sup>15</sup>和R<sup>15'</sup>中的至少一个为羟甲基(-CH<sub>2</sub>OH)。或者, R<sup>11</sup>、R<sup>11'</sup>、R<sup>12</sup>、R<sup>12'</sup>、R<sup>13</sup>、R<sup>13'</sup>、R<sup>14</sup>、R<sup>14'</sup>、R<sup>15</sup>和R<sup>15'</sup>中的至少一个为羟基(-OH)。最优的实施方案设计 R<sup>11</sup>、R<sup>11'</sup>、R<sup>12</sup>、R<sup>12'</sup>、R<sup>13</sup>、R<sup>13'</sup>、R<sup>14</sup>、R<sup>14'</sup>、R<sup>15</sup>和R<sup>15'</sup>中的至少两个选自-CH<sub>3</sub>、-CH<sub>2</sub>OH和-OH。

10 R<sup>2</sup>为选自以下的取代基: 直链 C<sub>7-18</sub>烷基、取代的 C<sub>1-18</sub>烷基、支链 C<sub>3-18</sub>烷基、C<sub>2-18</sub>烯基和炔基和芳烷基。每个直链 C<sub>7-18</sub>烷基、支链 C<sub>3-18</sub>烷基、C<sub>2-18</sub>烯基和炔基和芳烷基可任选被取代, 且所述取代的 C<sub>1-18</sub>烷基被一个或多个独立选自以下的基团取代: -OH; -F; -Cl; -Br; -I; -NH<sub>2</sub>; 烷基氨基和二烷基氨基; 直链或支链 C<sub>1-6</sub>烷基、C<sub>2-6</sub>烯基和炔基; 芳烷基; 直链或支链 C<sub>1-6</sub>烷氧基, 芳氧基; 芳烷氧基; -CN; -NO<sub>2</sub>;  
15 -COOH; -COO(烷基); -COO(芳基); -C(O)NH(C<sub>1-6</sub>烷基); -C(O)NH(芳基); 磺酰基; (C<sub>1-6</sub>烷基)磺酰基; 芳基磺酰基; 氨磺酰基, (C<sub>1-6</sub>烷基)氨磺酰基; (C<sub>1-6</sub>烷基)硫基; (C<sub>1-6</sub>烷基)磺酰胺基; 芳基磺酰胺基; -NHNH<sub>2</sub>; 和-NHOH。

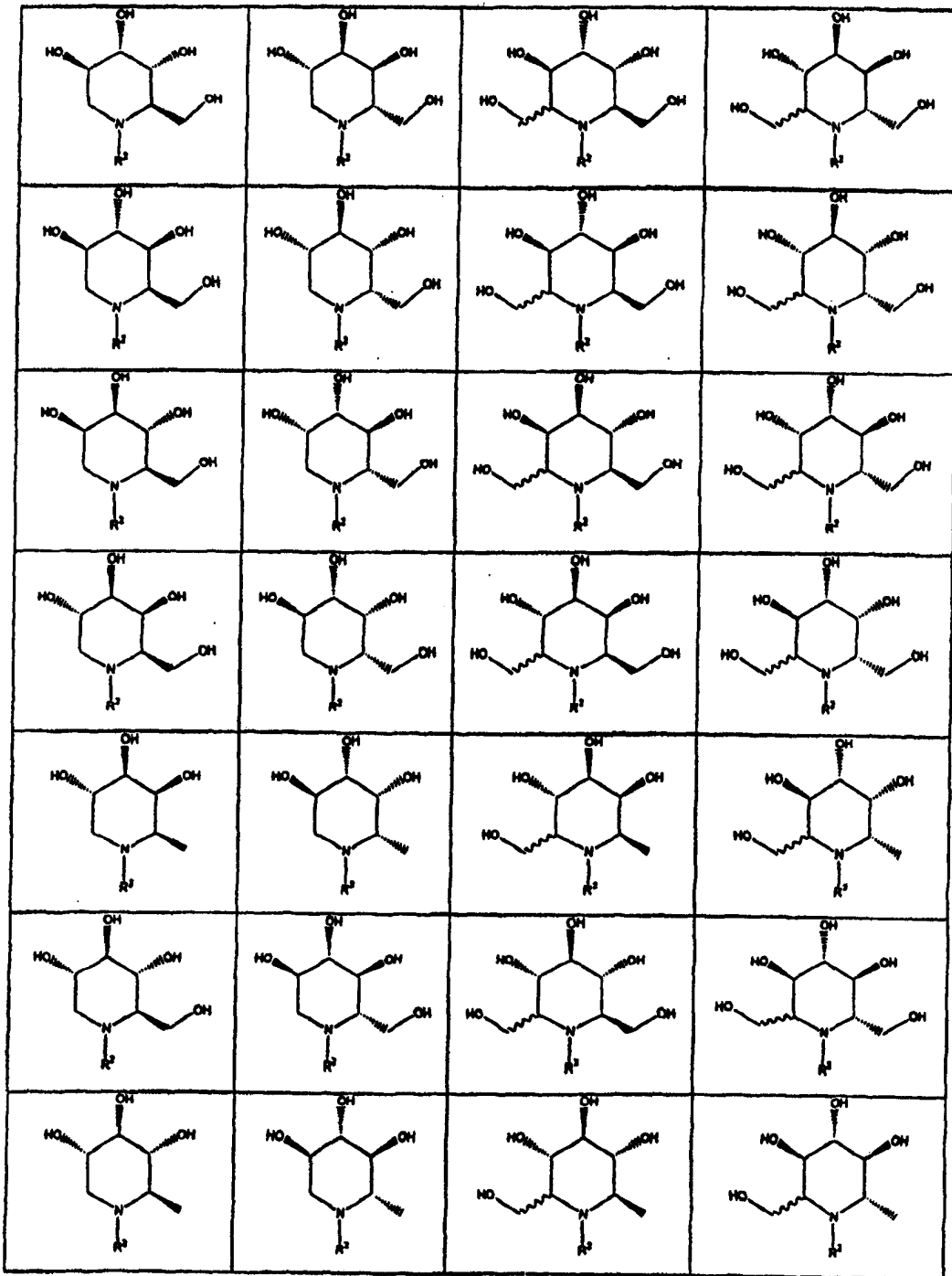
20 优选 R<sup>2</sup>为直链 C<sub>7-18</sub>烷基、支链 C<sub>3-18</sub>烷基或取代的 C<sub>1-18</sub>烷基。更优选 R<sup>2</sup>为直链 C<sub>7-11</sub>烷基、支链 C<sub>7-11</sub>烷基、取代的 C<sub>7-11</sub>烷基或被 C<sub>1-6</sub>烷氧基取代的直链或支链 C<sub>1-18</sub>烷基。R<sup>2</sup>的直链 C<sub>7-11</sub>烷基取代基的实例包括庚基、辛基和壬基。R<sup>2</sup>的取代烷基的实例为 7-氧杂壬基(-CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)。最优 R<sup>2</sup>为正壬基、7-氧杂壬基或 10-氧杂十一烷基。

25 在式 I 的某些实施方案中, 所述化合物可以由下式之一来表示:

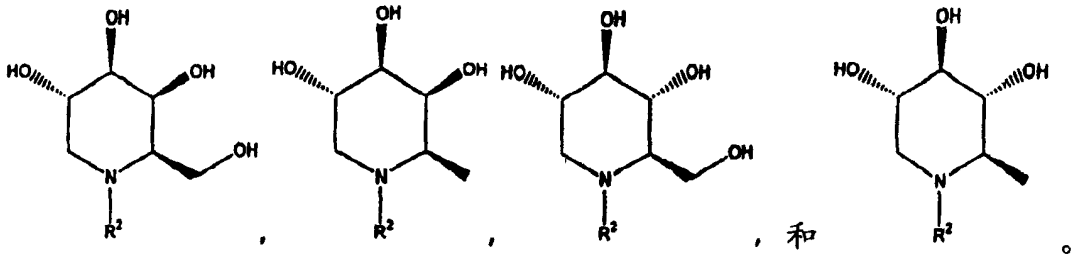


上式中每个环碳原子的立体化学可以与其它环碳原子的立体化学各不相同。更优选所述化合物具有一个下表 1 给出的结构式：

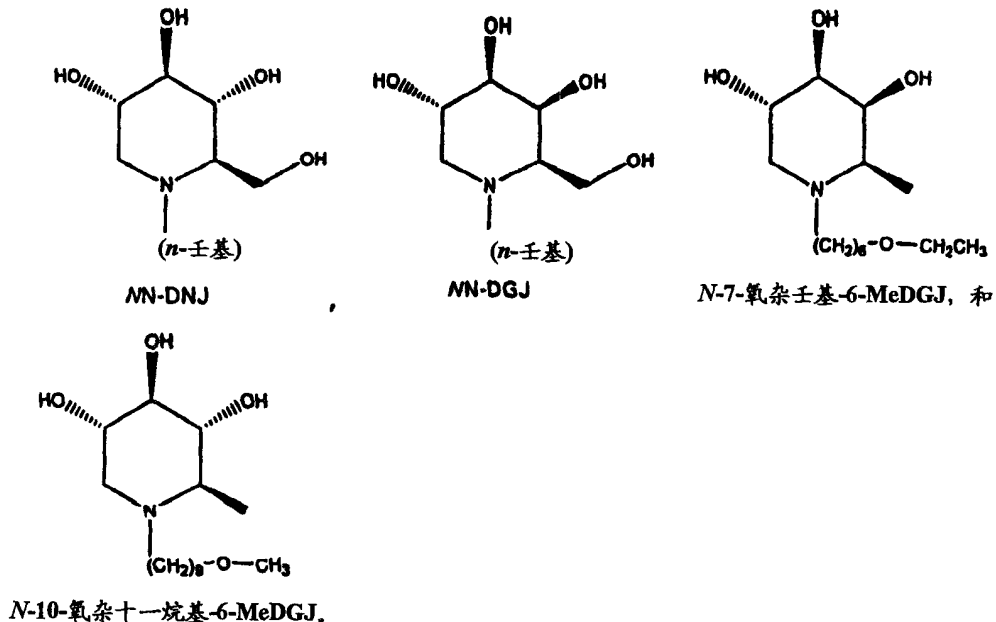
表 1



更优选所述化合物具有一个以下结构式:



再更优选 R<sup>2</sup> 为壬基、7-氧杂壬基或 10-氧杂十一烷基, 最优的化合物包括 N-壬基脱氧野尻霉素(MN-DNJ)、N-壬基脱氧半乳糖野尻霉素(MN-DGJ)、N-7-氧杂壬基-6-甲基脱氧半乳糖野尻霉素(即 N-7-氧杂壬基-6-脱氧-DGJ、N-7-氧杂壬基-1,6,-二脱氧半乳糖野尻霉素或 N-7-氧杂壬基-甲基-DGJ)和 N-10-氧杂十一烷基-1,6-二脱氧半乳糖野尻霉素(即 N-10-氧杂十一烷基-6-甲基脱氧半乳糖野尻霉素、N-10-氧杂十一烷基-甲基-DGJ、N-10-氧杂十一烷基-6-脱氧-DGJ、(2R,3S,4R,5S)-1-(9-甲氧基壬基)-2-甲基-3,4,5-哌啶三醇、(2R,3R)-2,3-二羟基丁二酸酯(1:1)或 SP240)和它们的异构体, 例如:



所公开方法的另一方面设计给予式 II 化合物。每个 R<sup>31</sup>、R<sup>31'</sup>、R<sup>32</sup>、R<sup>32'</sup>、R<sup>33</sup>、R<sup>33'</sup>、R<sup>34</sup> 和 R<sup>34'</sup>各自独立选自-H; -OH; -F; -Cl; -Br; -I; -NH<sub>2</sub>; 烷基氨基和二烷基氨基; 直链或支链 C<sub>1-6</sub> 烷基, C<sub>2-6</sub> 烯基



和炔基；芳烷基；直链或支链  $C_{1-6}$  烷氧基；芳氧基；芳烷氧基；-(亚烷基)氧基(烷基)；-CN；-NO<sub>2</sub>；-COOH；-COO(烷基)；-COO(芳基)；-C(O)NH( $C_{1-6}$  烷基)；-C(O)NH(芳基)；磺酰基；( $C_{1-6}$  烷基)磺酰基；芳基磺酰基；氨磺酰基，( $C_{1-6}$  烷基)氨磺酰基；( $C_{1-6}$  烷基)硫基；( $C_{1-6}$  烷基)磺酰胺基；芳基磺酰胺基；-NHNH<sub>2</sub>；-NHOH；芳基；和杂芳基。  
5 每个取代基可以相同或不同。

在一个优选的实施方案中， $R^{31}$ 、 $R^{31'}$ 、 $R^{32}$ 、 $R^{32'}$ 、 $R^{33}$ 、 $R^{33'}$ 、 $R^{34}$  和  $R^{34'}$  中的至少一个为羟甲基(-CH<sub>2</sub>OH)。或者， $R^{11}$ 、 $R^{11'}$ 、 $R^{12}$ 、 $R^{12'}$ 、 $R^{13}$ 、 $R^{13'}$ 、 $R^{14}$ 、 $R^{14'}$ 、 $R^{15}$  和  $R^{15'}$  中的至少一个为羟基(-OH)。最优选的  
10 实施方案设计  $R^{11}$ 、 $R^{11'}$ 、 $R^{12}$ 、 $R^{12'}$ 、 $R^{13}$ 、 $R^{13'}$ 、 $R^{14}$ 、 $R^{14'}$ 、 $R^{15}$  和  $R^{15'}$  中的至少两个选自-CH<sub>3</sub>、-CH<sub>2</sub>OH 和-OH。

在式 II 中， $R^4$  为选自以下的取代基：直链  $C_{7-18}$  烷基、取代的  $C_{1-18}$  烷基、支链  $C_{3-18}$  烷基、 $C_{2-18}$  烯基和炔基和芳烷基。每个直链  $C_{7-18}$  烷基、支链  $C_{3-18}$  烷基、 $C_{2-18}$  烯基和炔基和芳烷基可任选被取代，且每个  
15 取代的  $C_{1-18}$  烷基被一个或多个独立选自以下的基团取代：-OH；-F；-Cl；-Br；-I；-NH<sub>2</sub>；烷基氨基和二烷基氨基；直链或支链  $C_{1-6}$  烷基， $C_{2-6}$  烯基和炔基；芳烷基；直链或支链  $C_{1-6}$  烷氧基，芳氧基；芳烷氧基；-CN；-NO<sub>2</sub>；-COOH；-COO(烷基)；-COO(芳基)；-C(O)NH( $C_{1-6}$  烷基)；-C(O)NH(芳基)；磺酰基；( $C_{1-6}$  烷基)磺酰基；芳基磺酰基；  
20 氨磺酰基，( $C_{1-6}$  烷基)氨磺酰基；( $C_{1-6}$  烷基)硫基；( $C_{1-6}$  烷基)磺酰胺基；芳基磺酰胺基；-NHNH<sub>2</sub>；和-NHOH。

优选  $R^4$  为直链  $C_{7-18}$  烷基、支链  $C_{3-18}$  烷基或取代的  $C_{1-18}$  烷基。更优选  $R^4$  为直链  $C_{7-11}$  烷基、支链  $C_{7-11}$  烷基、取代的  $C_{7-11}$  烷基或被  $C_{1-6}$  烷氧基取代的直链或支链  $C_{1-18}$  烷基。 $R^4$  的直链  $C_{7-11}$  烷基取代基的实例包括庚基、辛基和壬基。 $R^4$  的取代烷基的实例为 7-氧杂壬基(-CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)。最优选  $R^4$  为 *n*-壬基、7-氧杂壬基或 10-十一  
25 烷基。

在一个实施方案中，公开了用于治疗 HCV 感染的方法，所述方

法包括使 HCV p7 蛋白或者包含 p7 蛋白的膜组分与一种或多种抑制 p7 蛋白活性的化合物接触。本发明人已表明 p7 蛋白增加膜的通透性，类似于膜通道蛋白的功能。另外，本发明人已表明特定化合物能抑制 p7 透化膜的能力。然而，所公开的方法设计本文公开的化合物也可抑制 p7 蛋白的其它活性。

5

所选化合物可通过与 p7 蛋白的相互作用，抑制该蛋白的一种或多种活性。在这种情况下，如具体结合测定所示，需要选择与 p7 蛋白结合且其表观结合常数不大于约  $K_{app} = 130 \mu\text{M}$  (即  $K_{app} = 114.2 (\pm 18.3) \mu\text{M}$ ) 的化合物。或者，如具体通透性测定所示，可能需要选择能阻断 p7 蛋白透化膜的能力的化合物，当所述化合物浓度不大于约 180  $\mu\text{M}$  时。

10

当所选化合物抑制 p7 透化膜的能力时，所述化合物可阻止 p7 形成通道，或者在通道形成后所述化合物可阻断该通道(即作为通道阻断剂)。或者，所述化合物可通过与一种或多种膜组分(例如磷脂)相互作用而改变膜流动性或局部特性，抑制 p7 蛋白。因此，所述化合物可抑制 p7 形成功能性膜通道的能力。

15

在又一个实施方案中，提供用于筛选有效抑制 HCV p7 活性的潜在抗病毒药的方法。通常，所述方法包括将 p7 或 p7 变体掺入到膜系统中并观察通透性增加，例如通过采用标准方法记录跨膜电流。然后将试验化合物加入到膜系统中，以测定所述化合物是否抑制 p7 透化膜的能力。理想的化合物在不超过约 180  $\mu\text{M}$  的浓度下可完全阻断 p7 透化膜的能力。

20

黑脂膜(“BLM”)可用于所述方法，但也可采用其它膜系统。黑脂膜是本领域众所周知的，BLM 通常用于研究膜通透性，例如在由通道形成蛋白介导时(参见 Duff, K. C.和 R. H. Ashley, (1992) *Virology* 190(1): 第 485-9 页)。

25

当选定用于观察 p7 活性的合适膜系统后，可以将 p7 掺入到所述膜中，以形成含 p7 的膜。可从其中 p7 蛋白显示出增加选定膜通

透性的任何 HCV 病毒株中选取 p7 蛋白。例如, 可选定来自 HCV-H 病毒株的 p7 蛋白 (即 ALENLVILNAASLAGTHGLVSFLVFFCFAWYLKGRWVPGAVYAL YGMWPLLLLLLALPQRAYA (SEQ ID NO.: 1)), 或者可选定来自另一病毒株的 p7 蛋白。可能需要使用 p7 共有序列, 所述共有序列是通过比较已报道的 p7 蛋白的氨基酸序列而获得, 或者可能需要选择来自特定 HCV 分化体(例如分化体 1)的 p7 蛋白。

在筛选方法的另一个实施方案中, 可能需要使用所选 p7 蛋白的变体, 如果所述变体是功能性的话(例如当采用本领域已知方法测定时, 所述变体显示出透化所选的膜)。可能的变体包括融合、缺失和/或突变或取代。例如, 可能需要产生生物素酰化 p7 蛋白, 用于所述方法。在另一个实例中, 可能需要至少使用显示出透化所选膜的 p7 或 p7 衍生物的部分(例如选定的 p7 蛋白或变体可证明在 BLM 中电导水平不小于约 60 pS (即  $86 \pm 22$  pS))。也可能需要在选定的 p7 氨基酸序列中产生突变。当产生突变时, 可能需要根据 HCV 病毒株之间的比较, 保持给定位置上氨基酸的一定特性。例如, 对来自不同 HCV 株 p7 序列的比较已显示出某些氨基酸位置的特性可以是“疏水性”、“中性”或“亲水性”(参见 Carrere-Kremer, S.等, (2002) *J. Virol.* 76(8): 3720-30)。“疏水性氨基酸”可属于 F、I、W、Y、L、V、M、P、C 和 A。

选定的 p7 蛋白或变体可以人工合成, 或者在细菌细胞或真核细胞等合适的生物系统中表达。当所述蛋白掺入到选定的膜系统中后, 可以通过测定所述蛋白是否证明活性(例如引起通透性增加或细胞活力下降), 来测定膜通透性。可以使试验化合物与所述蛋白和/或含 p7 的膜组分接触, 以测定所述化合物是否抑制所述蛋白的活性。在所述方法中, 可以在 p7 掺入到膜之前和/或之后, 使试验化合物与 p7 和/或含 p7 的膜组分接触。

在一个实施方案中, 可能需要使用亚氨基糖衍生物作为筛选方

法中的试验化合物。具体地讲,可能需要使用本文所述的 DGJ 烷基化衍生物或 DNJ 烷基化衍生物作为试验化合物。特别需要烷基化亚氨基糖 N-壬基脱氧野尻霉素(MN-DNJ)、N-壬基脱氧半乳糖野尻霉素(MN-DGJ)、N-7-氧杂壬基-6-甲基脱氧半乳糖野尻霉素(即 N-7-氧杂壬基-6-脱氧-DGJ、N-7-氧杂壬基-1,6-二脱氧半乳糖野尻霉素或 N-7-氧杂壬基-甲基-DGJ)和 N-10-氧杂十一烷基-1,6-二脱氧半乳糖野尻霉素(即 N-10-氧杂十一烷基-6-甲基脱氧半乳糖野尻霉素、N-10-氧杂十一烷基-甲基-DGJ、N-10-氧杂十一烷基-6-脱氧-DGJ、(2R,3S,4R,5S)-1-(9-甲氧基壬基)-2-甲基-3,4,5-吡啶三醇、(2R,3R)-2,3-二羟基丁二酸酯(1:1)或 SP240)的衍生物和/或它们的异构体。

在另一个实施方案中,可能需要使用已显示出与 p7 或其它膜组分相互作用的、作为所述方法中的试验化合物的化合物或其衍生物(例如已显示出在体外与 p7 相互作用的化合物)。在又一个实施方案中,可能需要使用已显示出破坏由 p7 或其它蛋白形成的通道的化合物,和/或已知是由 p7 或其它蛋白形成的通道的阻断剂的化合物,或其衍生物,作为所述方法中的试验化合物。例如,已知金刚烷胺是甲型流感病毒 M2 通道的通道阻断剂(参见 Hay, A.J.等, (1985) *EMBO J.* 4(11): 第 3021-4 页; Duff, K.C.和 R.H. Ashley, (1992) *Virology* 190(1): 第 485-9 页; Sunstrom, N.A.等, (1996) *J. Membr. Biol.* 150(2): 第 127-32 页; Fischer, W.B.等, (2001) *Eur. Biophys. J.* 30(6): 第 416-20 页)。近来,其他人已表明, p7 形成离子通道,该通道被金刚烷胺阻断(参见 Griffin 等, *FEBS Letters*, 2003, Jan. 20; 535(1-3): 34-8)。因此,可能需要使用金刚烷胺或其衍生物作为所述方法中的试验化合物。

在一个实施方案中,当细菌细胞膜通透性增加可导致细胞生长被抑制时,诱导型细菌系统可用于观察通透性。例如,在合适的细菌系统中,可以从诱导型启动子表达 p7 或其变体,以确定所述细胞是否表现出细胞生长的抑制。或者,在诱导 p7 表达之前,可以通过用 [<sup>3</sup>H]-尿苷等放射性分子标记细胞,来证实通透性的增加。在诱导 p7

表达之后，可以通过测定释放到培养基中的 $[^3\text{H}]$ -尿苷，来评价通透性。可以将试验化合物给予所述细菌，以测定所述化合物是否抑制细胞生长和/或所述化合物是否抑制 $[^3\text{H}]$ -尿苷释放到培养基中。

#### 5 化合物的制备

可以用市售的亚氨基化合物作为原料，制备用于本文所述方法的化合物。市售来源包括 Sigma, St. Louis, MO; Cambridge Research Biochemicals, Norwich, Cheshire, United Kingdom; 和 Toronto Research Chemicals, Ontario, Canada.

10 或者，可以通过本领域技术人员已知的合成方法合成本发明的化合物。例如，各种脱氧野尻霉素(DNJ)衍生物的合成描述于美国专利第 5,622,972; 5,200,523; 5,043,273; 4,944,572; 4,246,345; 4,266,025; 4,405,714; 和 4,806,650 号，以及美国申请顺序号 10/031,145。本文所述其它亚氨基糖化合物是已知的，并且可以通过以下美国专利给  
15 出的方法来制备：第 4,861,892; 4,894,388; 4,910,310; 4,996,329; 5,011,929; 5,013,842; 5,017,704; 5,580,884; 5,286,877; 5,100,797; 和 6,291,657 号。

#### 药用组合物

20 当需要以药用组合物或药物形式给予所述化合物时，本文公开的化合物可以配制成供各种给药方式用。技术和制剂通常可在以下文献中找到：REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES (第 18 版), Mack Publishing Co. (1990)。

25 所述药物可以适合于通过任何合适途径给药，例如通过口服(包括口腔含化或舌下)、直肠、鼻腔、局部(包括口腔含化、舌下或经皮)或胃肠外(包括皮下、肌内、静脉内或皮内)途径，虽然优选口服给药。所述组合物可以通过药学领域已知的任何方法来制备，例如通过  
在无茵条件下将活性成分与载体混合在一起。

对于本领域普通技术人员来说，药学上可接受的盐通常是众所周知的，可以包括但不限于以下实例：乙酸盐、苯磺酸盐 (benzenesulfonate)、苯磺酸盐(besylate)、苯甲酸盐、碳酸氢盐、酒石酸氢盐、溴化物、依地酸钙、樟磺酸盐、碳酸盐、柠檬酸盐、依地酸盐、乙二磺酸盐、依托酸盐、乙磺酸盐、富马酸盐、葡庚糖酸盐、葡糖酸盐、谷氨酸盐、乙醇酰氨基苯肿酸盐、己基间苯二酚酸盐、海巴明、氢溴酸盐、盐酸盐、羧萘酸盐、碘化物、依西酸盐、乳酸盐、乳二糖酸盐、苹果酸盐、马来酸盐、扁桃酸盐、甲磺酸盐、粘酸盐、萘磺酸盐、硝酸盐、双羧萘酸盐(恩波酸盐)、泛酸盐、磷酸盐/磷酸氢盐、聚半乳糖醛酸盐、水杨酸盐、硬脂酸盐、碱式乙酸盐、琥珀酸盐、硫酸盐、单宁酸盐、酒石酸盐或茶氯酸盐。其它药学上可接受的盐可以在例如以下文献中找到：REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES (第 18 版)，参见上文。

优选的药学上可接受的盐包括例如乙酸盐、苯甲酸盐、溴化物、碳酸盐、柠檬酸盐、葡糖酸盐、氢溴酸盐、盐酸盐、马来酸盐、甲磺酸盐、萘磺酸盐、双羧萘酸盐(恩波酸盐)、磷酸盐、水杨酸盐、琥珀酸盐、硫酸盐或酒石酸盐。

对于注射来说，所述化合物和药物可以配制在水溶液中，最好是在 Hank 氏溶液、Ringer 氏溶液等生理上相容的缓冲液中，或者在生理盐水缓冲液中。对于所述经粘膜给药，在制剂中使用适合于待穿透屏障的渗透剂。所述渗透剂是本领域众所周知的。

采用药学上可接受的载体，将本文公开的化合物配制成用于所述方法实践的适合于系统给药的制剂，这包括在所述方法的范围之内。适当选用载体和合适的生产管理，本方法的组合物、特别是配制成溶液剂的本方法组合物可以通过胃肠外给药，例如通过静脉内注射。采用本领域众所周知的药学上可接受的载体，可以容易地将所述化合物配制成适合于口服给药的制剂。所述载体使所述方法的化合物能够配制成片剂、丸剂、胶囊剂、液体制剂、凝胶剂、糖浆

剂、膏剂、混悬剂等，用于口服给予待治疗的患者。

适用于本方法的药用组合物包括如下组合物：其中含有达到其预定目的有效量的活性成分。本领域技术人员能够适当地确定有效量，尤其是根据本文所提供的详细的公开内容。

- 5 除了活性成分之外，这些药用组合物可含有合适的药学上可接受的载体，所述载体包括便于将所述活性化合物加工成药学上可使用的制剂的赋形剂和辅料。配制成用于口服给药的制剂可以呈片剂、锭剂、胶囊剂或溶液剂的形式。

- 10 本文所述的药物以及用于本文所提供的方法中的药物可包括一种或多种以下成分：防腐剂、增溶剂、稳定剂、润湿剂、乳化剂、甜味剂、着色剂、香味剂、盐、缓冲剂、包衣剂或抗氧化剂。它们也可含有除所述化合物和/或本文所述药物之外的治疗活性药物。通过将活性化合物与固体赋形剂混合，任选研磨所得混合物，并且如果需要，在加入合适的辅料后，加工颗粒状混合物，以得到片心或锭心，可以获得供口服用的药物制剂。具体地讲，合适的赋形剂是填充剂，例如糖，包括乳糖、蔗糖、甘露醇或山梨醇；纤维素制剂，例如玉米淀粉、小麦淀粉、大米淀粉、马铃薯淀粉、明胶、西黄蓍胶、甲基纤维素、羟丙基甲基-纤维素、羧甲基-纤维素钠(CMC)和/或聚
- 15 聚乙烯吡咯烷酮(PVP：聚维酮碘)。如果需要，可以加入崩解剂，例如交联聚乙烯吡咯烷酮、琼脂或海藻酸或其盐，例如海藻酸钠。

- 20 可用于口服的药物制剂包括由明胶制成的锁口型(push-fit)胶囊以及由明胶和增塑剂(例如甘油或山梨醇)制成的密封软胶囊。锁口型胶囊可含有活性成分以及乳糖等填充剂、淀粉等粘合剂和/或滑石粉或硬脂酸镁等润滑剂，任选稳定剂。在软胶囊剂中，活性化合物可以
- 25 溶于或悬浮于合适的液体例如脂肪油、液状石蜡或液体聚乙二醇(PEG)中。另外，可以加入稳定剂。

### 给药途径

下面将会更详细考虑不同的给药途径:

a. 口服给药

5 适合于口服给药的药物可以是胶囊剂或片剂; 散剂或颗粒剂; 溶液剂、糖浆剂或混悬剂(在水或非水液体中); 食用泡沫剂(foams)或泡沫剂(whips); 或乳剂。

片剂或硬明胶胶囊剂可以包含乳糖、玉米淀粉或其衍生物、硬脂酸或其盐。

软明胶胶囊剂可以包含植物油、蜡、油脂、半固体或液体多元醇等。

10 溶液剂和糖浆剂可包含水、多元醇和糖。对于制备混悬剂来说, 可以使用油(例如植物油), 以提供水包油或油包水混悬剂。

b. 经皮给药

15 适于经皮给药的药物可以是设计在一段较长时间内与受体皮肤保持密切接触的透气型贴剂(discrete patch)。例如, 可通过离子导入法, 给予贴剂中的活性成分(离子导入法描述于 *Pharmaceutical Research*, 3(6): 318 (1986))。

c. 局部给药

20 适于局部给药的药物可以是软膏剂、乳膏剂、混悬洗剂、散剂、溶液剂、糊剂、凝胶剂、喷雾剂、气雾剂或油剂。

对于眼部感染或口腔和皮肤等其它外部组织感染来说, 最好使用局部软膏剂或乳膏剂。当配制软膏剂时, 可以将活性成分与石蜡或水混溶性软膏基质混合。或者, 可以将活性成分与水包油基质或油包水基质一起配制成乳膏剂。

25 适于眼部局部给药的药物包括滴眼剂。此时, 活性成分可溶解或悬浮在合适载体例如水性溶剂中。

适于口腔局部给药的药物包括糖锭剂、软锭剂和漱口剂。



#### d. 直肠给药

适于直肠给药的药物可以是栓剂或灌肠剂。

#### e. 鼻腔给药

- 5 使用固体载体的适于鼻腔给药的药物包括粗粉(例如粒径范围在20-500 微米)。这可以以吸入的方式给药, 即从靠近鼻子的盛有粉剂的容器中通过鼻腔快速吸入。

使用液体载体的适于鼻腔给药的组合物包括鼻腔喷雾剂或滴鼻剂。这些可包含活性成分的水性或油性溶液剂。

- 10 适于通过吸入给药的药物包括微粒粉剂或雾剂, 它们可由不同种类的仪器产生, 例如加压的气溶胶、喷雾器或吹药器。可以制造这些仪器, 以便提供预先确定的活性成分的剂量。

#### f. 胃肠外给药

- 15 适于胃肠外给药的药物包括水性和非水性无菌注射溶液剂或混悬剂。它们可含有抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂和赋予组合物与预定受体的血液基本等渗的溶质。所述组合物中可以存在的其它成分包括例如水、乙醇、多元醇、甘油和植物油。适于胃肠外给药的组合物可以呈单剂量或多剂量容器形式, 例如密封的安瓿和小瓶, 并且
- 20 可以在冷冻-干燥(冻干)条件下贮存, 只需在临用前加入无菌液体载体例如无菌注射用水即可。可从无菌粉针剂、颗粒剂和片剂制备临用注射溶液剂。

#### g. 剂量

- 25 可通过常规试验, 容易地确定剂量, 并且在主治医生或临床医生的监控下进行。确定合适剂量的指导原则是给予合适而有效且无毒或可接受毒性的材料剂量(参见例如 Fingl 等, (1975) *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 第1章, 第1页)。对于MN-DNJ或类似化合物, 预计成人日剂量可以在 0.1 mg-5 g 活性药物的范围

内,可以在 3 mg-2400 mg 范围内,最好在 5 mg-800 mg 范围内,更优选在 15 mg-400 mg,最优选 15 mg-100 mg。每天可以给予单次日剂量,或者每天给予 2 次、3 次或更多次剂量。

5 以下实施例仅仅用来说明上述方法;它们并不是用来以任何方式限制本发明范围的。

### 实施例 1. 诱导 p7 在细菌中表达

下面一组实验证明,可诱导 p7 在细菌中表达。本实验可用于确定 p7 或 p7 变体是否能透化膜。实验也显示出 p7 的表达导致细胞生长的停止,此外, p7 的表达导致放射性标记尿苷的释放。

#### 实施例 1.1. 材料与方法

p7 表达质粒的构建。采用标准克隆方法,通过 DNA 操作构建重组质粒。通过聚合酶链式反应(PCR),使用作为模板的编码质粒 pTM1/CE1E2p7 的 HCV 1a 株的 cDNA (AF009606) (由 J. Dubuisson 友好提供),扩增 HCV p7 的编码区。使用以下 2 个寡核苷酸引物进行 PCR 反应: 引物 1, AAGCGCCCATGGCTTTGGAGAACCTCGTAATAC (SEQ ID NO.: 2) 和 引物 2, ATTGAATTCTTAGTGATGGTGATGGTGATGGTGATGGTGATGCCC GCTGAGGCAAC (SEQ ID NO.: 3)。引物 1 和引物 2 分别编码 p7 的 5'端区和 3'端区。为了在 5'端产生 NcoI 限制位点,在 3'端产生 EcoRI 限制位点,将下划线序列引入引物中。纯化所得 PCR 产物,用 NcoI 和 EcoRI 限制酶(Roche)消化,并与事先已用 NcoI 和 EcoRI 消化的 pTriEx1.1 表达载体(Novagen)连接。连接混合物用于转化感受态大肠杆菌 R. gami (DE3)pLacI 细胞(CN Biosciences)。含有重组质粒的细菌克隆在含有 50 µg/ml 羧苄西林(Sigma)的培养基中扩增。分离质粒 DNA,进行限制性分析,并且使用用于 T7 启动子的引物和引物 2 进行测序,以便排除在 PCR 反应中引入突变的可能性。所分离的含 p7

质粒命名为 pTriEx1.1p7。

5 诱导 p7 在细菌中表达。在 37°C，在 50 µg/ml 羧苄西林存在下，将含有 pTriEx1.1 或 pTriEx1.1 p7 质粒的大肠杆菌 R. gami (DE3)pLacI 细胞的单菌落在 LB 培养基中振荡培养，直到它们的 OD<sub>600nm</sub> 达到 0.5 为止。将 3 ml 这样的起始培养物加入到含有 50 µg/ml 羧苄西林和 0.4% 葡萄糖的 100 ml LB 培养基中，并将细胞在同样条件下培养。当细胞的 OD<sub>600nm</sub> 达到 0.5-0.7 时，通过加入 1 mM 异丙基硫代吡喃半乳糖苷 (IPTG) (Roche) 诱导 p7 表达，并通过监测 OD<sub>600n</sub> 跟踪它们的进一步生长。未转化细菌(没有 pTriEx1.1 质粒)在没有羧苄西林时生长。

10 细菌细胞释放 [<sup>3</sup>H]-尿苷。如上所述培养细菌，但是这次是在 2 µCi/ml [<sup>3</sup>H]-尿苷(Amersham, UK)存在下培养，直到它们的 OD<sub>600nm</sub> 达到 0.5 为止。然后沉淀细胞，用 PBS 洗涤 3 次并重悬浮在 25 ml 生长培养基中。15 分钟后，通过加入 1 mM IPTG 诱导 p7 表达。诱导后，在不同时间取出 0.5 ml 试样，将细胞通过离心沉淀，上清液与 3.5 ml  
15 Ultima Gold 闪烁混合剂(Packard, UK)混合，使用 Beckman LS 3801 闪烁计数器，通过闪烁计数测定释放到培养基中的放射性。

### 实施例 1.1. 结果

20 诱导 p7 在细菌中表达。为了评价 HCV p7 对膜通透性的影响，使用受严格控制的 T7 lac 启动子调节的 IPTG 诱导型系统，让 p7 在大肠杆菌 Rosetta gami (DE3)pLacI 细胞中表达(参见 Dubendorff, J. W. 和 F. W. Studier, (1991) *J. Mol. Biol.* 219(1): 第 45-59 页)。Rosetta gami (DE3)pLacI 细胞携带处于 lacUV5 启动子控制之下的染色体拷贝 T7 RNA 聚合酶，并且从 pLacI 质粒提供足够的 lac 阻抑物，以保证在未  
25 诱导状态下的严格性表达(参见 Studier, F. W.和 B. A. Moffatt, (1986) *J. Mol. Biol.* 189(1): 第 113-30 页)。用 IPTG 诱导后，通过监测不同时间的细胞密度，跟踪 p7 表达对宿主细胞的影响。IPTG 的加入对非转化细胞(图 A, 上图)和 pTriEx1.1 转化的细胞(图 B, 上图)没有影响，

然而 p7 的表达导致细胞群体生长的停止(图 1C, 上图), 很可能是因为在 大肠杆菌细胞膜上形成孔。

5 为了分析化合物从表达 HCV p7 的细菌内流出, 给重组克隆加载放射性标记的尿苷, 并在诱导后测定不同时间点的放射性的释放(图 1, 下图)。在非转化细胞或携带亲代质粒的克隆中没有观察到显著流出<sup>[3H]</sup>-尿苷(图 1A 和图 B, 下图)。在诱导 p7 合成 2 小时后, 表达 p7 的细胞开始向培养基中释放<sup>[3H]</sup>-尿苷。在 4 小时的监测周期中, <sup>[3H]</sup>-尿苷的释放增加(图 1C), 表明 p7 诱导外细胞膜的通透性。

## 10 实施例 2. 合成的 p7 掺入到 BLM 中

下面一组实验证明, 根据通道记录测定, 合成的 p7 可增加 BLM 的通透性。实验也显示出长链烷基氨基糖衍生物抑制 p7 活性。

### 实施例 2.1. 材料与amp;方法.

15 肽的合成和产物质量控制。由英国的 Albachem 合成 N-端加有生物素-标记的 50 mg 相当于 p7 (HCV H 株)的肽(生物素-ALENLVILNAASLAGTHGLVSFLVFFCFAWYLKGRWVPGAVYAL YGMWPLLLLLLALPQRAYA (SEQ ID NO.: 4))。使用基体辅助激光解吸电离质谱(MALDI-MS)分析 p7 肽: 将 p7 蛋白溶于 40%乙腈中, 20 得到含有 1 mg/ml 肽的溶液。将 1 μl 该溶液试样与 1 μl 含有 16 mM 辛基-葡糖苷溶液的饱和α-氰基-4-羟基肉桂酸的 95:5 乙腈/水(v/v)溶液混合。将该混合物试样(1 μl)置于质谱仪靶中并让其风干。用胰蛋白酶自溶物对测得的质量进行外标。用 TofSpec 2E 质谱仪(Micromass, Wythenshawe, Manchester, UK), 在反射模式下操作, 记录质谱。源 25 电压、提取电压和聚焦电压分别为 20000V、19950V 和 16000V。所有数据都运用 Mass Lynx 版本 3.2 软件进行分析。按照 MALDI 质谱分析, 观察到对应于全长 p7 肽的峰, 即在 m/z 7247.8。

为了测定全长肽的纯度, 使用以下方法的修改版本, 将所述肽

再进行 Tris-Tricine 凝胶电泳: Schagger 和 von Jagow, (1987) *Anal. Biochem.*, 166(2): 第 368-79 页。简而言之, 将溶于 40%乙腈/水(500  $\mu\text{g/ml}$ )的 p7 (5  $\mu\text{g}$ )在 Tricine 样品缓冲液中加样到凝胶(8 x 10  $\text{cm}^2$ )上, 所述凝胶由分离胶(20.18% T, 0.83% C)、间隔胶(11.44% T, 0.34% C)和浓缩胶(10.9% T, 0.32% C)组成, 其中 T 是单体(丙烯酰胺和双丙烯酰胺)浓度的总百分数, 而 C 是相对于 T 来说的交联剂浓度的百分数。在 30V 恒压下进行凝胶电泳, 直到样品完全进入浓缩胶后, 将电压升至 110V。

通过银染色和蛋白质印迹分析凝胶。对于银染色, 将凝胶在 50% 10 甲醇中洗涤 10 分钟, 然后在 5%甲醇中洗涤 10 分钟。然后将凝胶在 40  $\mu\text{M}$  DTT 溶液中孵育 10 分钟, 然后用水冲洗并在 0.1%  $\text{AgNO}_3$  水溶液中孵育 10 分钟。随后用水洗涤 3 次, 共 10 秒钟, 然后加入显影液(7.5 g  $\text{NaCO}_3$ , 125  $\mu\text{l}$  甲醛的 250 ml 水)。通过加入固体一水柠檬酸, 终止显影过程。将凝胶用水冲洗并浸泡在 35%乙醇/2%甘油中, 15 然后干燥。

对于蛋白质印迹分析, 用半干电印迹仪(2 小时, 40 mA) (Merck), 将凝胶上的蛋白在转移缓冲液(24 mM Tris 碱, 192 mM 甘氨酸, 20%甲醇)中转移到 Immobilon P 膜(Amersham, UK)上。将该膜在含有 3%牛奶的 PBS-0.1% Tween 中封闭过夜, 然后在室温下与辣根过氧化物酶 20 偶联的链霉抗生物素(1  $\mu\text{g/ml}$  的 PBS-0.1% Tween, 1%牛奶)一起孵育 3 小时。然后在 PBS-0.1% Tween、1%牛奶中洗涤 2 次, 然后按照制造商的说明书, 用 ECL 检测系统(Amersham, UK)进行显影。

银染色凝胶和蛋白质印迹两者都显示出预期分子量的一种主要种类(图 2), 表明至少部分加样的蛋白含有全长生物素酰化 p7 蛋白。 25 然而, 因为以前曾观察到有和没有尿素的凝胶之间分辨率的差异, 所以在没有尿素情况下重新分析化学合成的 p7。虽然链霉抗生物素探测的蛋白质印迹显示全长生物素酰化 p7 的存在, 但是在银染色凝胶上观察到约为一半表观分子量的额外的宽条带, 所述条带占总 p7

的 50%-60%。该宽条带相当于通过质谱观察到的来自较小的非生物素酰化 p7 的种类，其质量理论上相当于含有 N-端跨膜结构域的 p7 片段。因为已证明难以从 p7 的截短形式分离出全长 p7，所以随后将其混合物用于在黑脂膜中进行通道记录。

- 5            黑脂膜(BLM)中的通道记录。制备 BLM 以研究膜动力学，是本领域众所周知的。在聚四氟乙烯薄膜(厚度约 25  $\mu\text{m}$ , Yellow Springs Instruments, Ohio, USA)中，形成的 BLM 跨越椭圆形小孔，其长轴直径约为 100  $\mu\text{m}$  (参见 Montal, M.和 P. Mueller, (1972) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69(12): 第 3561-6 页)。将 40  $\mu\text{l}$  脂质混合物(1-棕榈酰-2-油酰-*sn*-甘油-3-磷酸乙醇胺(POPE):1-棕榈酰-2-油酰-*sn*-甘油-3-磷酸胆碱(POPC) (4:1 (w/w))溶于戊烷(5mg/ml)中，并铺在水性面下相的上面(0.5 M KCl, 5 mM HEPES, 1 mM  $\text{CaCl}_2$ , pH 7.4)。这使得约 0.2 mg 脂质沉积在聚四氟乙烯薄膜的每一面上。让溶剂蒸发 10 分钟后，通过提高聚四氟乙烯膜孔上方小室的缓冲液水平，形成 BLM。形成稳定的 BLM
- 10 后，从 200 倍过量贮液，将 HCV p7 蛋白(溶于乙醇)加入到接地的水性面下相(双层每边小室中的体积: 2 ml)，反面小室达到终浓度约为 50  $\mu\text{M}$ 。时间延迟约 10 分钟后，出现记录。用 Axopatch 1 D 放大器，在 5 kHz 频率下记录电流。数据用 50 Hz 的截止频率进行过滤，然后用软件 Origin 5.0 进行分析。或在正面或在反面加入药物(来自 NN-DNJ (Synergy Pharmaceuticals)、NN-DGJ (Toronto Research Chemicals)和 N7-氧杂壬基-6-脱氧-DGJ (United Therapeutics Inc.)的 10 mM 贮液，以及来自 NB-DNJ (Sigma)和 NB-DGJ 的 100 mM 贮液)。通过向测试室中序贯加入等体积，来增加药物浓度。加入药物约 1 分钟后，在+ 100 mV 记录数据达约 3 分钟。
- 15
- 20

25

## 实施例 2.2. 结果

将 p7 掺入到 BLM 中。根据记录跨 BLM 通道信号的测定，将 p7 加入到缓冲液小室增加 BLM 通透性。在-100 mV，通道电导水平上

升至 2 nS (图 3A)。在 +50 mV 所测最小平均电导水平约为  $86 \pm 22$  pS (表 1)。

表 1

使用的电压 (mV)	电导 (pS)
+100	289 ( $\pm 19$ ), 383 ( $\pm 57$ ), 434 ( $\pm 14$ ), 523 ( $\pm 14$ ), 629 ( $\pm 52$ ), 721 ( $\pm 26$ ), 1025 ( $\pm 34$ )*, 1192 ( $\pm 27$ )
+50	86 (+/- 22), 292**, 462 ( $\pm 26$ ), 614 ( $\pm 18$ ), 894 ( $\pm 38$ )
-50	1090**
-100	709 (47)*, 1228 ( $\pm 38$ ), 1720**, 2000**

5

表 1: p7 的电导水平。数据来自图 3A 的记录, 表示为平均值  $\pm$  平均值的标准误, 如括号内所示。根据 1 秒时间段的记录来计算平均值。

\*来自 1 秒时间段的平均值和标准差

10

\*\*从目测曲线确定数值

15

特定电导水平的寿命范围从几百毫秒到几分钟。稳定的长期持续的电导状态以约 100 pS (和 100 pS 的倍数) 的间隔变化, 表明形成相对稳定的通道, 其电导约为 100 pS。记录的波动可显示亚电导状态的存在。图 3B 中显示了在 +100 mV 进行记录的柱状图的实例。延长对同一样品的测量, 导致增加的噪声水平, 这最终排除了对特定电导水平的设定(图 3C)。在一些实验中, 将 p7 插入到 BLM 中, 产生脉冲样活性(例如图 4, 左上图)。

对含有生物素-p7 蛋白的膜进行链霉抗生物素金染色, 随后通过透射电镜术检测该复合物, 表明生物素-p7 蛋白象通道(数据未显示), 正如对生物合成-合成 HCV p7 所报道的一样(参见 Griffin 等, *FEBS Letters*, 2003 年 1 月 20 日; 535(1-3): 34-8)。(另见 Pavlovic 等, *PNAS* 2003 年 5 月 13 日; 100(10): 6104-8)。

无论是包括跨膜结构域 I ("TMD I") (例如 ALENLVILNAASLAGTHGLVSFLVFFCFAWYLK (SEQ ID NO.: 5)) 的肽还是包括跨膜结构域 II ("TMD II") (例如 GRWVPGAVYALYGMWPLLLLLLALPQRAYA (SEQ ID NO.: 6)) 的肽加入到 BLM 中, 都不能独自形成通道, 对其测定表明, 缺乏通道信号(数据未显示)。甚至将这两个结构域加入到 BLM 中, 也不形成通道(数据未显示)。

将药物浓度逐渐增加的亚氨基糖衍生物加入到膜一侧的缓冲液中, 测定它们对 p7 诱导的通道活性的效应。对于短链烷基衍生物 NB-DGJ 和 NB-DNJ, p7 通道活性保持不变(图 4, 上图)。同样, 高达 3.0 mM 的 N-辛基葡萄糖苷对通道活性也没有影响(数据未显示)。然而, 加入更多的长链烷基衍生物 NN-DGJ、NN-DNJ 和 N7-氧杂壬基-6-脱氧-DGJ, 导致对 p7 通道信号的剂量依赖性抑制(图 4, 下图和图 5)。从所得归一化总电流曲线的曲线示意图和它们各自的 S 拟合(图 6), 推导出近似结合常数为: 对于 NN-DGJ,  $K_{app} = 110.4 (\pm 19.9) \mu\text{M}$ , 对于 NN-DNJ,  $K_{app} = 45.2 (\pm 10.7) \mu\text{M}$ , 对于 N7-氧杂壬基-6-脱氧-DGJ,  $K_{app} = 114.2 (\pm 18.3) \mu\text{M}$ 。对于 NN-DGJ, 在约 140  $\mu\text{M}$  观察到通道活性被完全阻断, 而对于 NN-DNJ 在 105  $\mu\text{M}$ 、对于 N7-氧杂壬基-6-脱氧-DGJ 在 180  $\mu\text{M}$  观察到通道活性被完全阻断。在增加任何药物浓度时, 没有观察到漏电流。

同样, 加入更多的长链烷基衍生物 SP240 (即 N-10-氧杂十一烷基-1,6-二脱氧半乳糖野尻霉素), 导致对 p7 通道信号的剂量依赖性抑制(图 7)。对于 SP240, 在约 100  $\mu\text{M}$  观察到通道活性被完全阻断。



本说明书引用的所有专利和其它参考文献都预示着本发明所属领域技术人员的技术水平，并且通过引用包括任何表格和附图在内的全部内容结合到本文中，其程度与每篇参考文献各自通过引用全部结合到本文中一样。

5           本领域技术人员将容易理解，可以适当地修改本发明以获得结果和所提到的优势以及固有的优势。作为代表性的优选实施方案的本文所述方法、变化和化合物/组合物都是示例性的，并不是为了限制本发明的范围。对于本领域技术人员来说，那些改变和其它用途全都包括在本发明中。

10           对本领域技术人员显而易见的是，可以在不偏离本发明的范围和精神的情况下，对在此公开的本发明进行不同的取代和修改。例如，可以利用各种不同的结合对，以及各种不同的治疗药和诊断药。因此，所述额外的实施方案都包括在本发明的范围之内。

15           在缺乏本文未具体公开的任何要素和限制的情况下，可以适宜地实施本文说明性地描述的本发明。因此，例如，在各种情况下，术语“包括”、“基本由...组成”和“由...组成”中的任一个都可以用其它两个术语来替换。所用的术语和短语可用作描述性而不是限制性的术语和短语，而且不会在使用所述术语和短语时排除任何等同的所示、所述的特征或其部分，但是人们知道，在本发明范围内  
20           可以进行不同的修改。因此，人们应理解，尽管已经通过优选实施方案具体公开了本发明，但是本领域技术人员也可采用本文公开构思的任选特征、修改和变化，并且所述修改和变化被认为是在本发明的范围之内。

25           另外，当按照马库什化合物或其它分类的替代化合物描述本发明的特征或方面时，本领域技术人员将会知道，也因此按照马库什化合物或其它化合物的任何各个成员或成员亚类来描述本发明。

          另外，除非有相反的说明，当实施方案中提供各种数值时，采用任何 2 个不同数值作为范围的端点来描述额外的实施方案。其范

围也包括在本发明的范围之内。

图 1

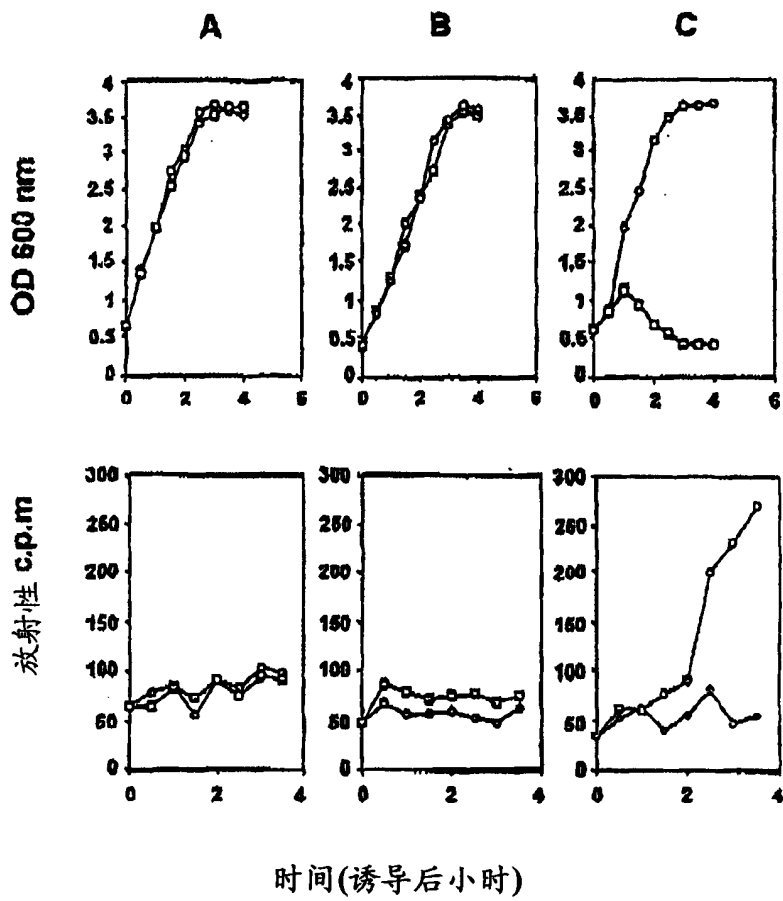


图 2

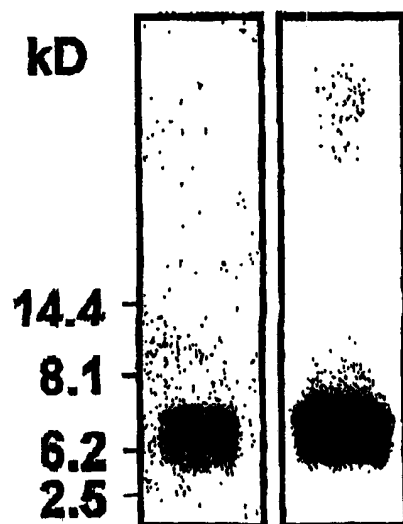


图 3

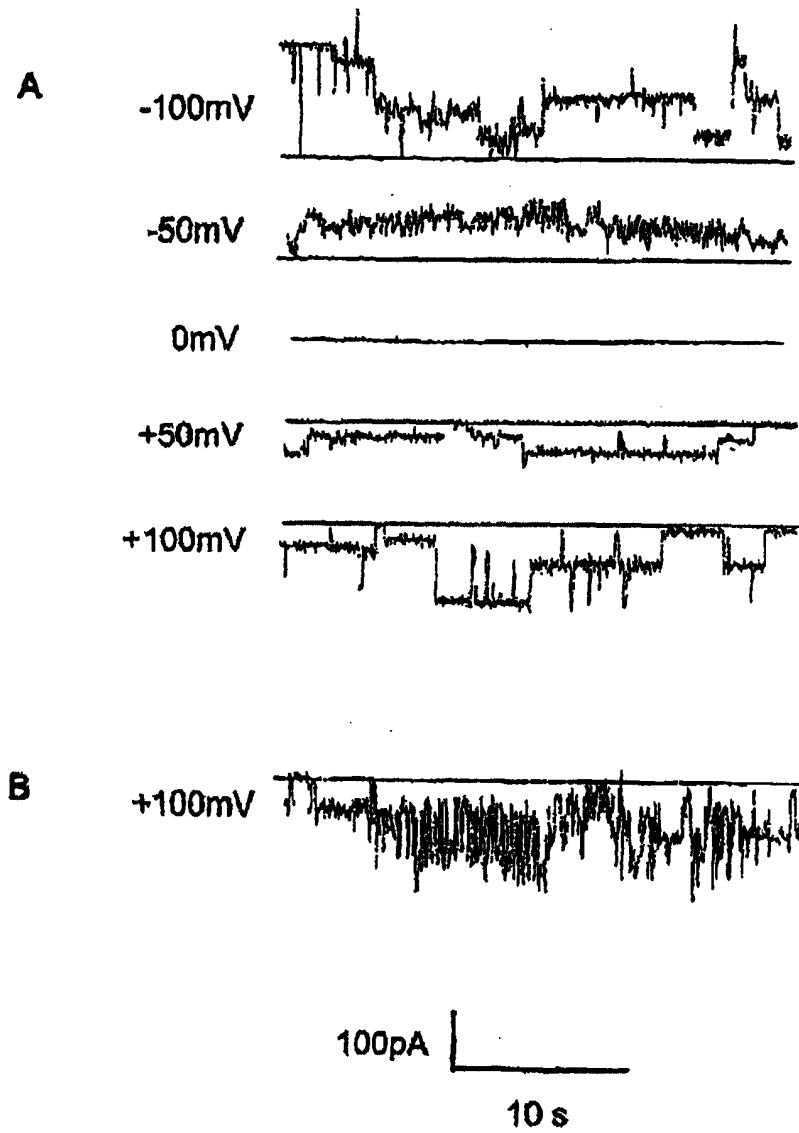


图 3

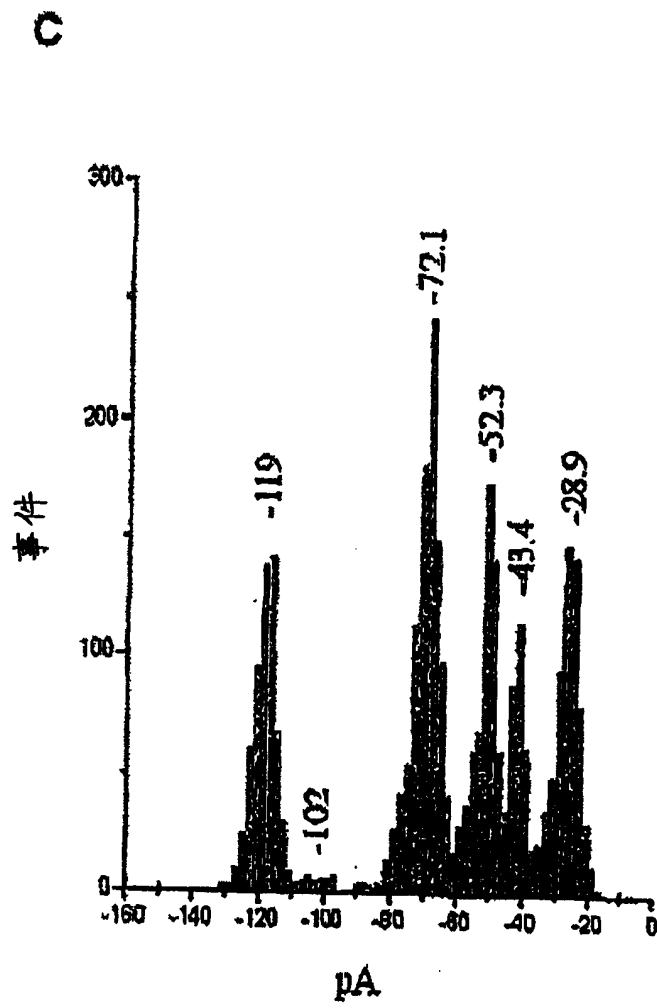


图 4

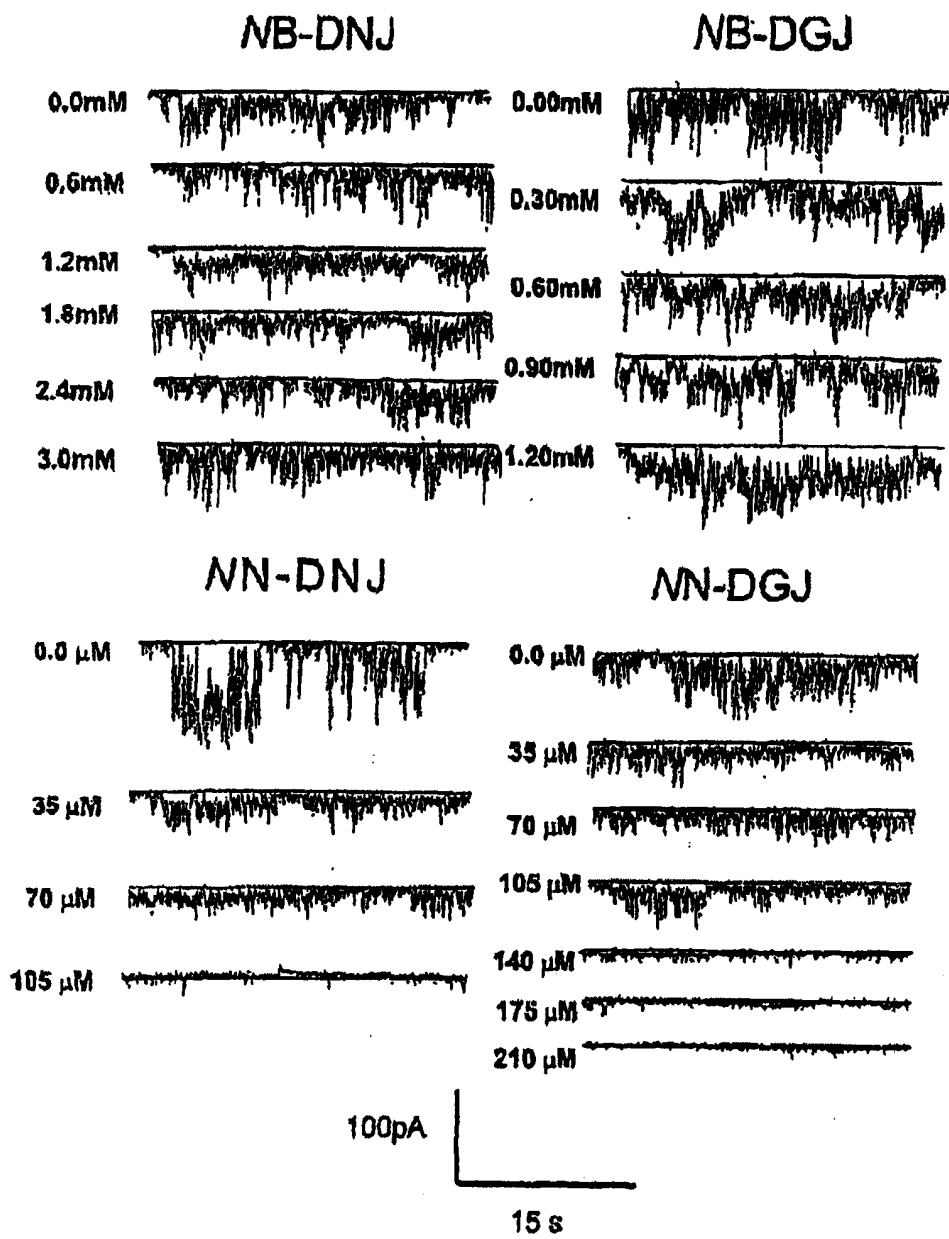


图 5

N7-氧杂壬基-6-脱氧-DGJ

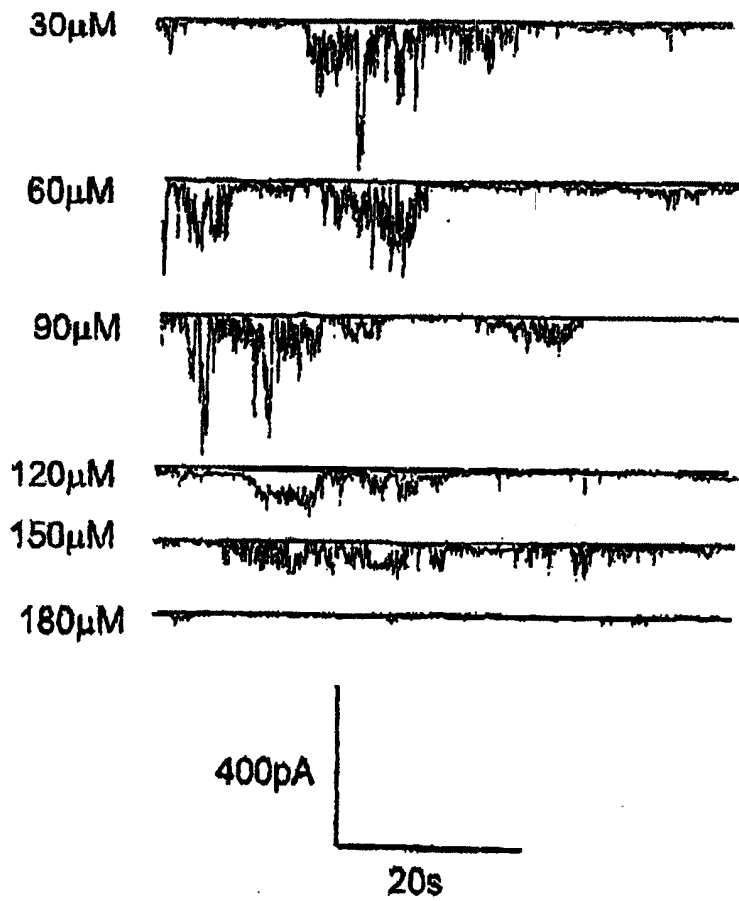




图 6

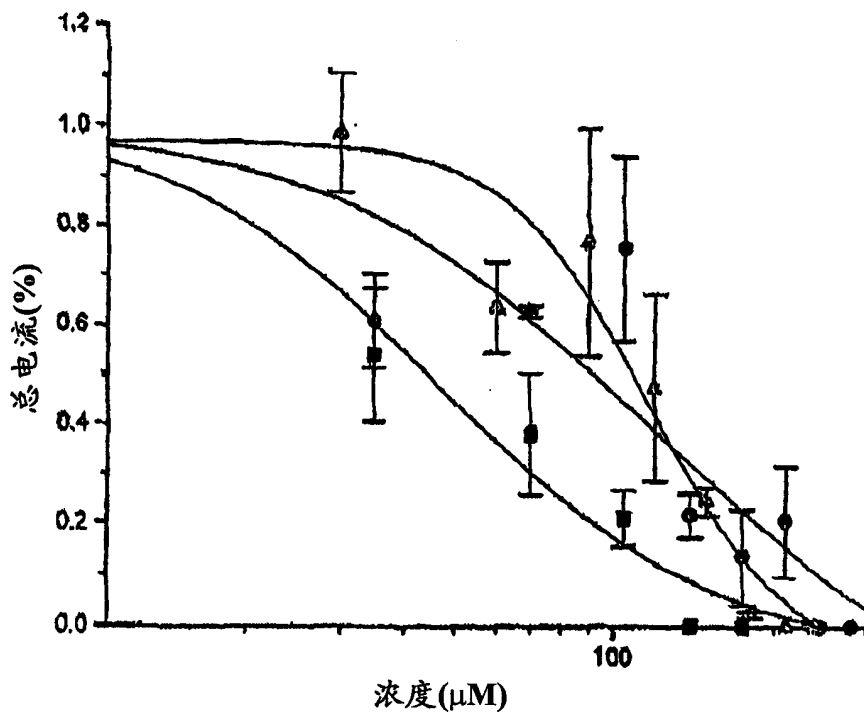


图 7

