



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103561739 B

(45) 授权公告日 2016. 03. 02

(21) 申请号 201280025427. 6

阿维纳什·帕德克 米林·德什潘德

(22) 申请日 2012. 05. 29

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司

公司 11227

(30) 优先权数据

代理人 郑斌 彭鲲鹏

61/490, 881 2011. 05. 27 US

61/504, 905 2011. 07. 06 US

61/567, 216 2011. 12. 06 US

(51) Int. Cl.

A61K 31/4178(2006. 01)

A61K 31/4164(2006. 01)

A61P 31/12(2006. 01)

A61P 31/00(2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2013. 11. 25

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2012/039835 2012. 05. 29

(56) 对比文件

CN 101506223 A, 2009. 08. 12,

US 5147882 A, 1992. 09. 15,

US 2009082261 A1, 2009. 03. 26,

WO 2010059937 A1, 2010. 05. 27,

WO 2010068760 A2, 2010. 06. 17,

(87) PCT国际申请的公布数据

W02012/166716 EN 2012. 12. 06

(73) 专利权人 艾其林医药公司

地址 美国康涅狄格州

审查员 刘鑫

(72) 发明人 詹森·艾伦·怀尔斯 王秋萍

桥本彰宏 戈德温·佩斯 陈大为

王祥柱 文卡特·加达昌达

权利要求书26页 说明书77页

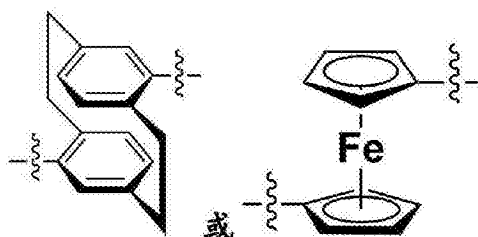
(54) 发明名称

可用于治疗 HCV 感染的经取代的脂肪芬、环芬、异芬、杂芬、杂 - 异芬以及金属茂

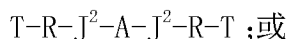
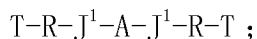
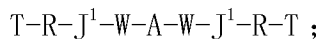
(57) 摘要

本公开内容提供了可用作抗病毒剂的式 (I) D-M-D(式 I) 的经取代的脂肪芬、环芬、异芬、杂芬、杂 - 异芬以及金属茂。在本文公开的某些实施方案中, M 是基团 -P-A-P-, 其中 A 是式 (I)。本文公开的某些经取代的脂肪芬、环芬、异芬、杂芬、杂 - 异芬以及金属茂是强效和 / 或选择性的病毒复制 (特别是丙型肝炎病毒复制) 抑制剂。本公开内容还提供包含一种或更多种经取代的脂肪芬、环芬、异芬、杂芬、杂 - 异芬和金属茂以及可药用载体的药物组合物 / 和组合。本公开内容提供了用于治疗病毒感染 (包括丙型肝炎病毒感染) 的

方法。



1. 下式的化合物或其可药用盐,



T 在每次出现时独立地选择, 并且 T 是 T^1 或 T^2 ;

T^1 是 $-Y-Z$, 其中 Y 与 R 共价相连, 并且 Y 是 $-(C=O)-$; Z 是 5 或 6 元杂环基团, 在每种情况下 T^1 被选自 C_1-C_4 烷基酯和 C_1-C_4 烯基酯的至少一个取代基所取代;

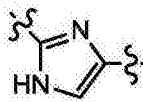
T^2 在每次出现时独立地选自: C_2-C_6 烷酰基、被单 C_1-C_6 烃基氨基甲酸酯或二 C_1-C_6 烃基氨基甲酸酯取代的 C_2-C_6 烷酰基、被脲或单 C_1-C_6 烷基脲或二 C_1-C_6 烷基脲取代的 C_2-C_6 烷酰基以及被单 C_1-C_6 烷基甲酰胺或二 C_1-C_6 烷基甲酰胺取代的 C_2-C_6 烷酰基, 在每种情况下 T^2 任选地被一个或多个独立地选自以下的取代基所取代: 氰基、羟基、卤素、 $(C_1-C_4$ 烷氧基) C_0-C_4 烷基、(单 C_1-C_4 烷基氨基和二 C_1-C_4 烷基氨基) C_0-C_4 烷基、 C_1-C_6 烷基、 $(C_1-C_4$ 硫代烷基) C_0-C_4 烷基、 C_3-C_7 环烷基、苯基、 C_1-C_2 卤代烷基以及 C_1-C_2 卤代烷氧基;

R 在每次出现时独立地选自:

4 至 6 元环, 其含有一个或两个氮原子, 其余环原子为碳, 其中 R 是饱和的或者含有 1 个不饱和键, 并且任选地与亚甲基或亚乙基桥桥联; 和

6 至 10 元稠合或螺双环体系, 其含有一个氮原子, 其余环原子为碳, 所述 6 至 10 元双环是饱和的或者含有 1 个不饱和键;

每个 R 任选地被一个或多个独立地选自以下的取代基所取代: 氰基、羟基、卤素、 C_1-C_2 烷基、 C_1-C_2 烷氧基、 C_1-C_2 卤代烷基以及 C_1-C_2 烷基磺酰基;

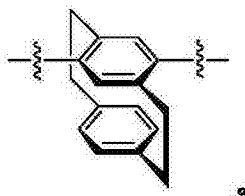
J^1 是苯基或  基团;

J^2 是苯并咪唑基团;

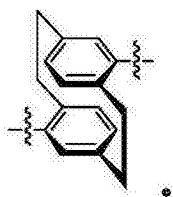
W 在每次出现时独立地选择, 并且 W 是苯基或炔基; 以及

A 是 [2.2]-环芬。

2. 根据权利要求 1 所述的化合物或盐, 其中 A 是



3. 根据权利要求 1 所述的化合物或盐, 其中 A 是



4. 根据权利要求 1 中任一项所述的化合物或盐, 其具有式:

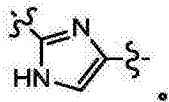
T-R-J¹-W-A-W-J¹-R-T 或

T-R-J²-A-J²-R-T。

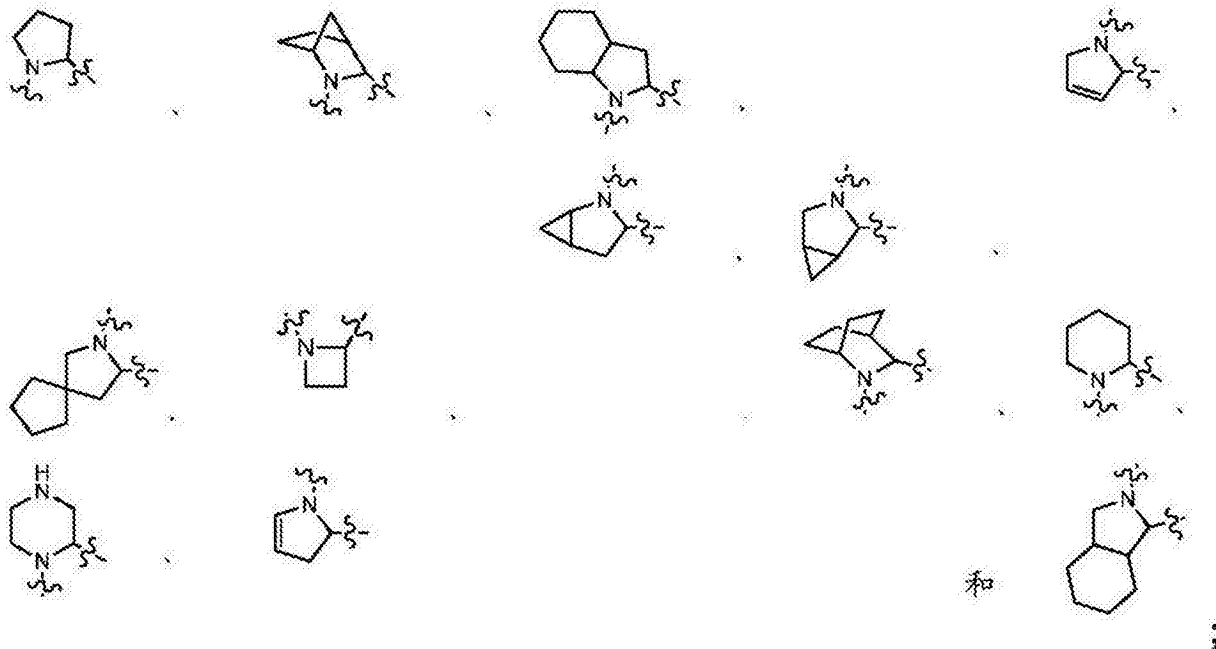
5. 根据权利要求 1 中任一项所述的化合物或盐, 其中:

W 是苯基。

6. 根据权利要求 1 所述的化合物或盐, 其中 J¹是

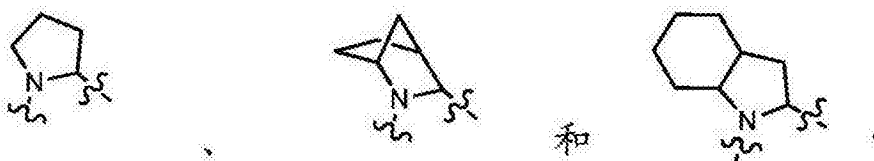


7. 根据权利要求 1 所述的化合物或盐, 其中每个 R 独立地选自:



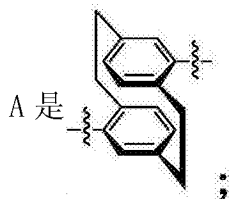
其中的每一个任选地被一个或多个独立地选自卤素、C₁-C₂烷基和 C₁-C₂烷氧基的取代基所取代。

8. 根据权利要求 7 所述的化合物或盐, 其中 R 独立地选自



9. 根据权利要求 1 所述的化合物或盐, 其中 T 独立地选自被单 C₁-C₆烷基氨基甲酸酯或二 C₁-C₆烷基氨基甲酸酯取代的 C₂-C₆烷酰基, 在每种情况下 T 任选地被 (C₁-C₄硫代烷基) C₀-C₄烷基所取代。

10. 根据权利要求 1 所述的化合物或盐, 其具有式 T-R-J²-A-J²-R-T, 其中



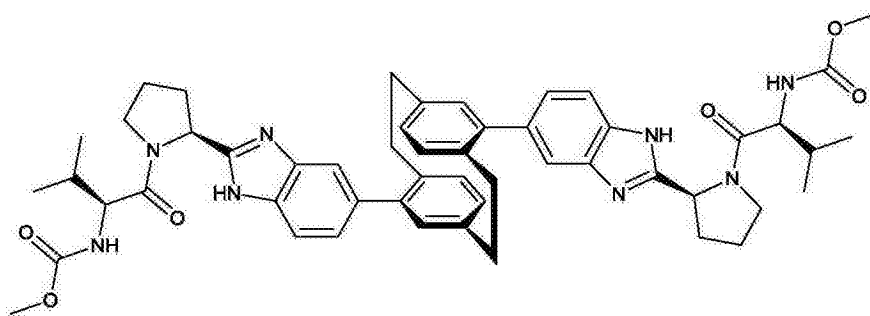
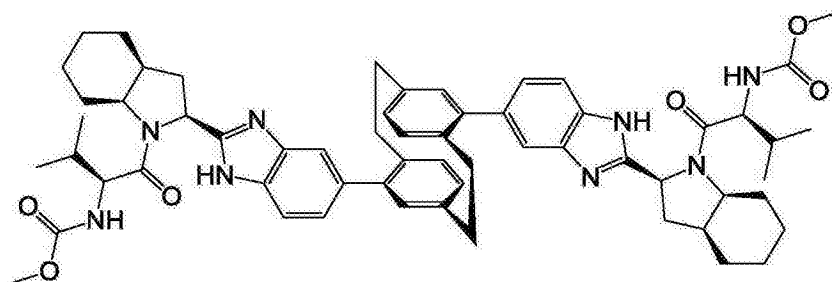
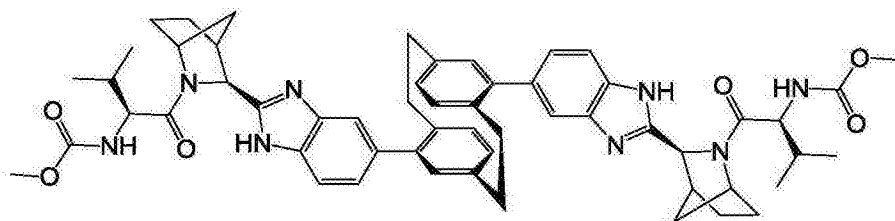
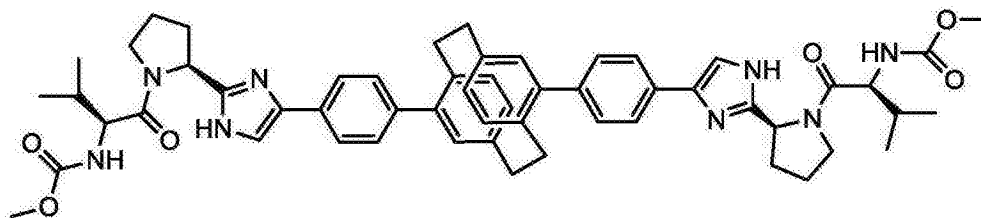
每个 R 是独立地选择的 8 至 10 元双环体系, 其含有一个氮原子, 其余环原子为碳, 所述

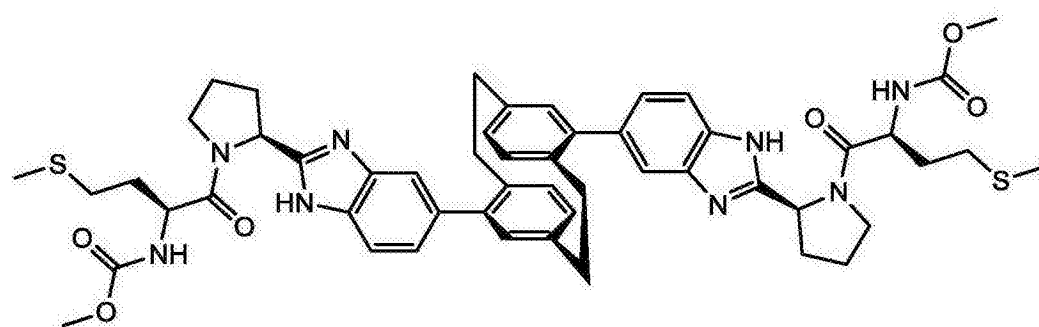
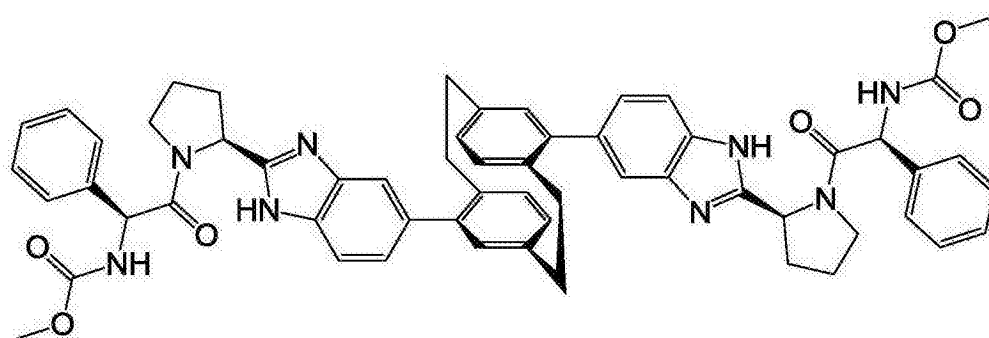
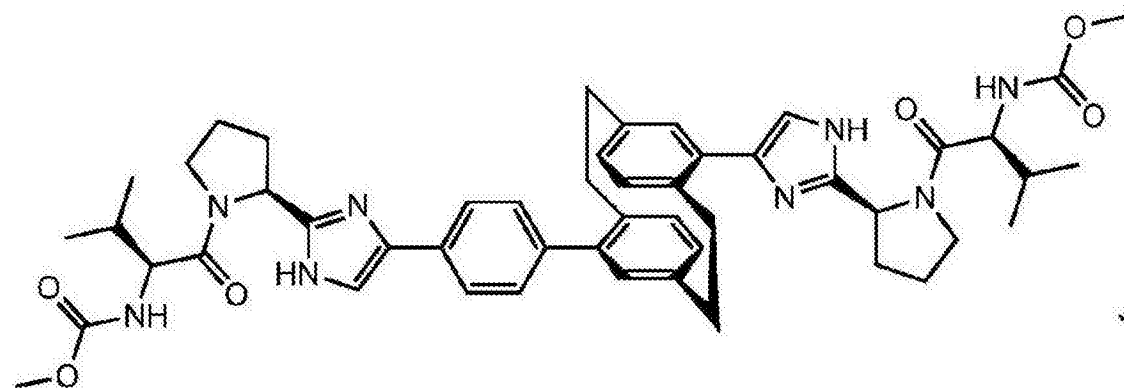
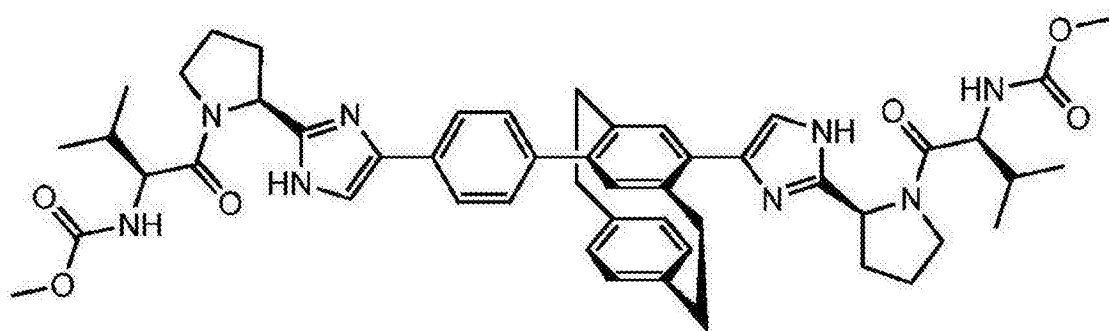
8 至 10 元双环是饱和的或者含有一个不饱和键；

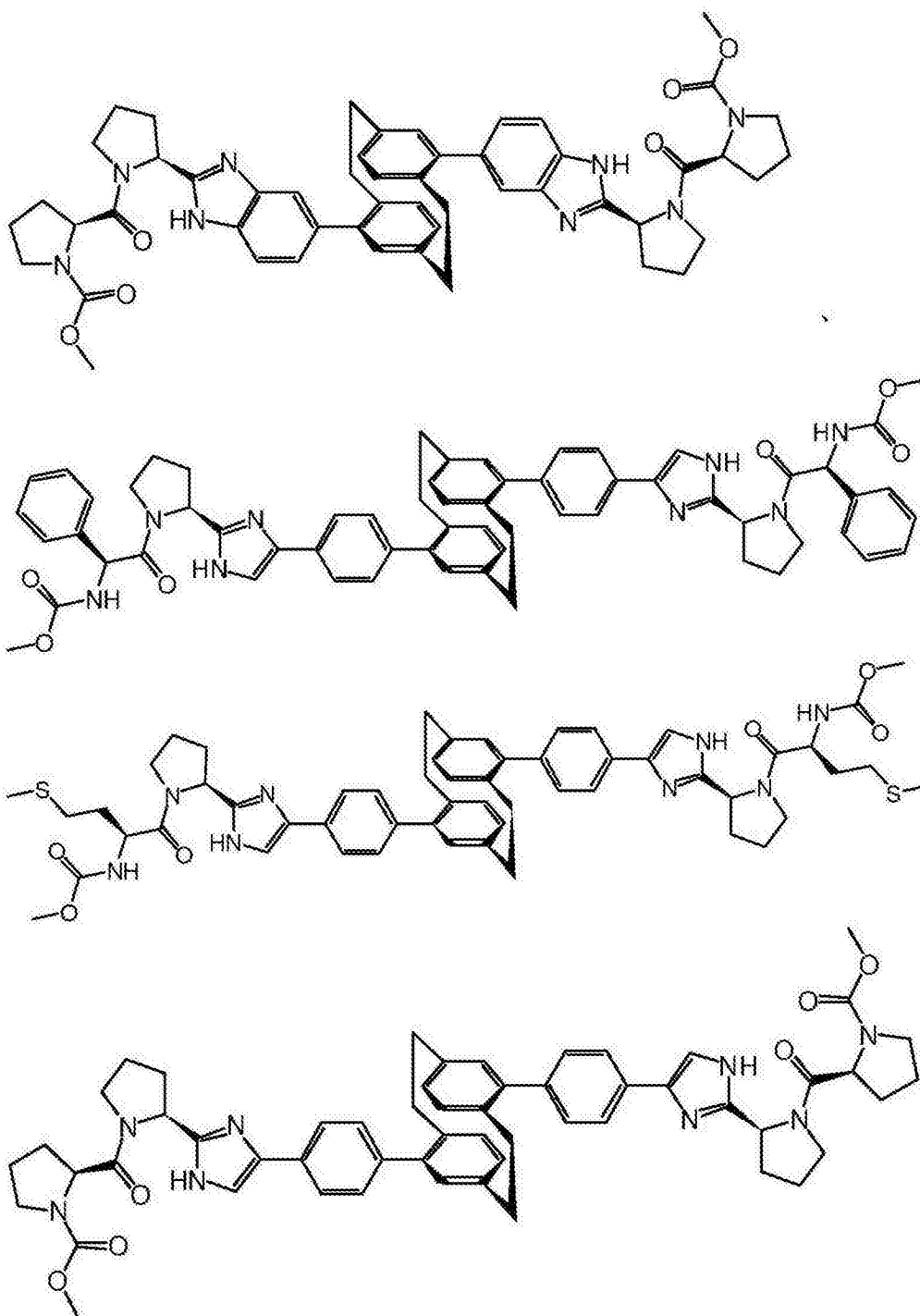
每个 R 任选地被一个或多个独立地选自以下的取代基所取代：氰基、羟基、卤素、 C_1 - C_2 烷基、 C_1 - C_2 烷氧基、 C_1 - C_2 卤代烷基以及 C_1 - C_2 烷基磺酰基；并且

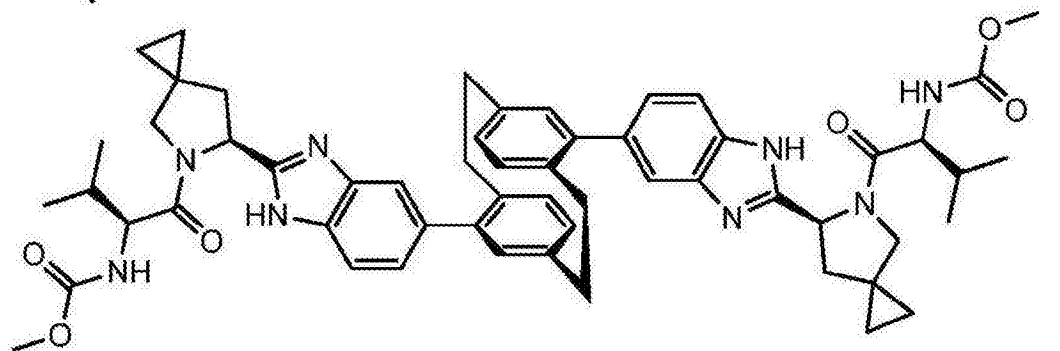
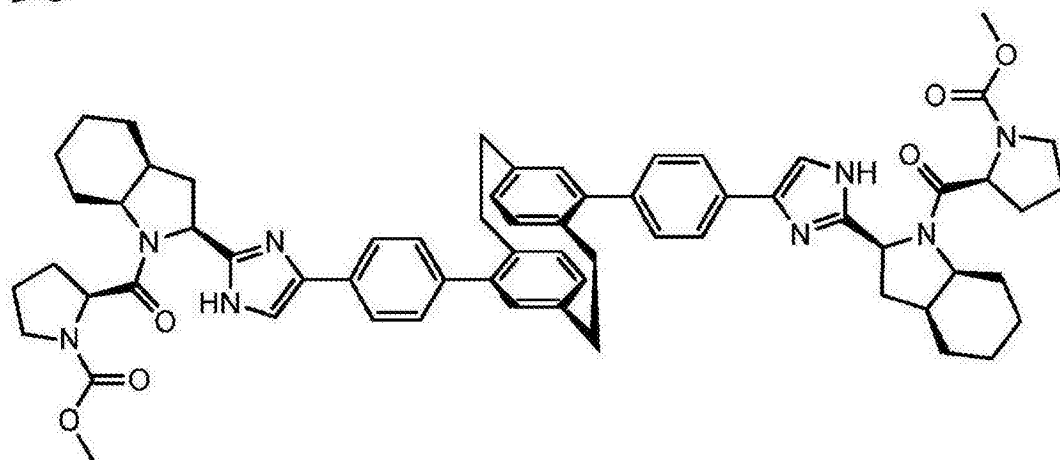
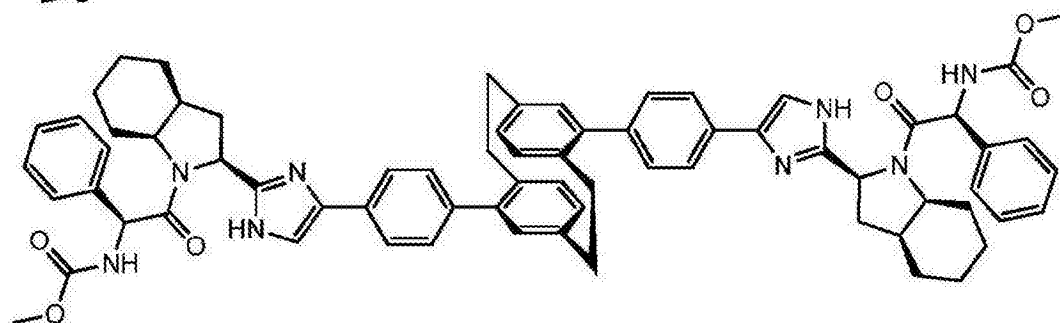
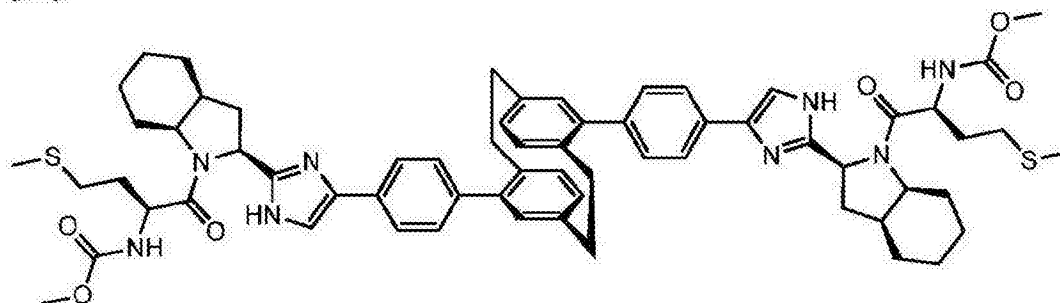
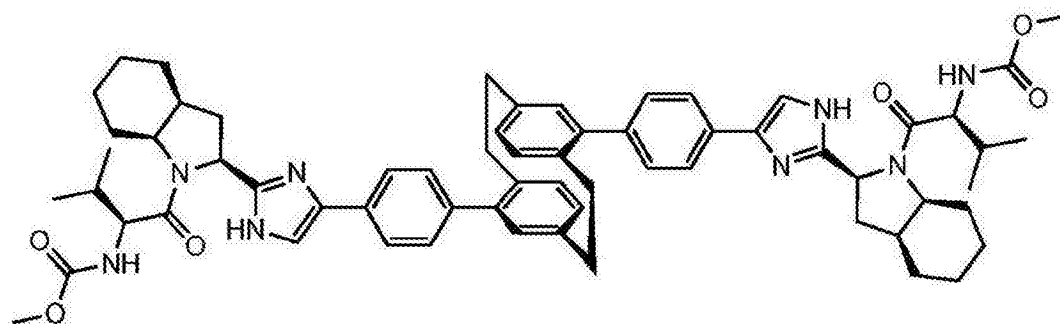
T 是 T^2 。

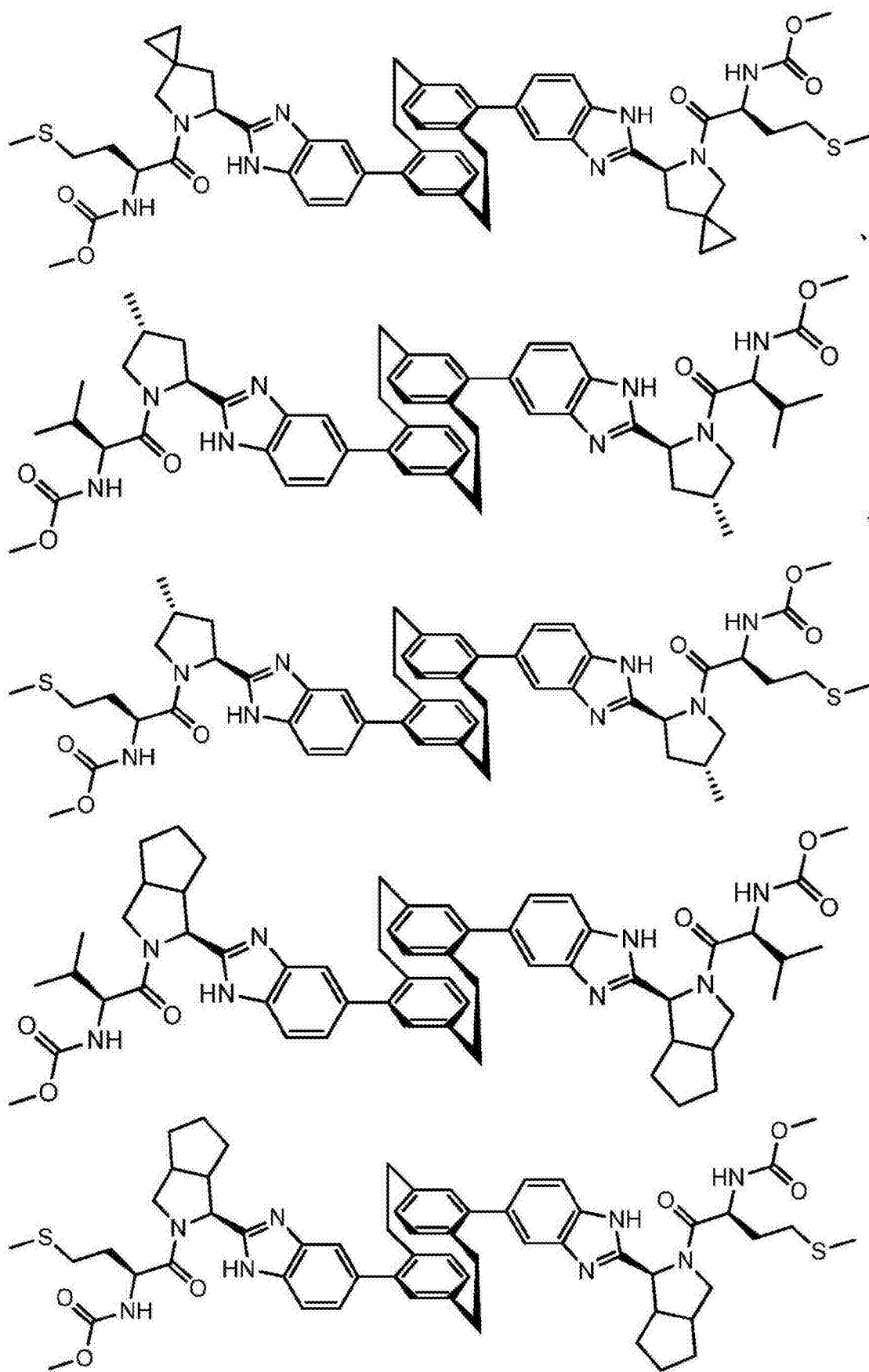
11. 根据权利要求 1 所述的化合物或其药物盐，其中所述化合物是

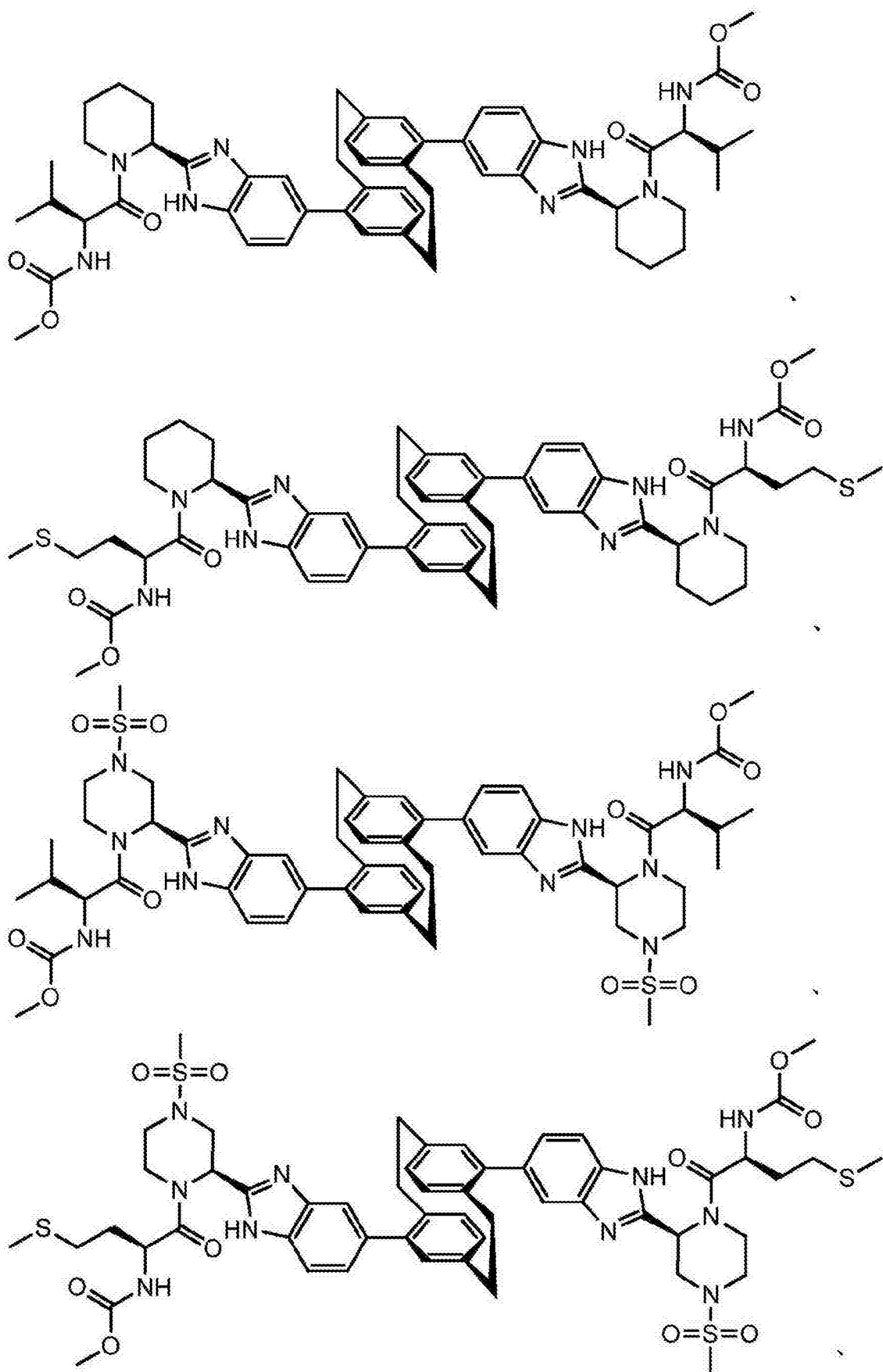


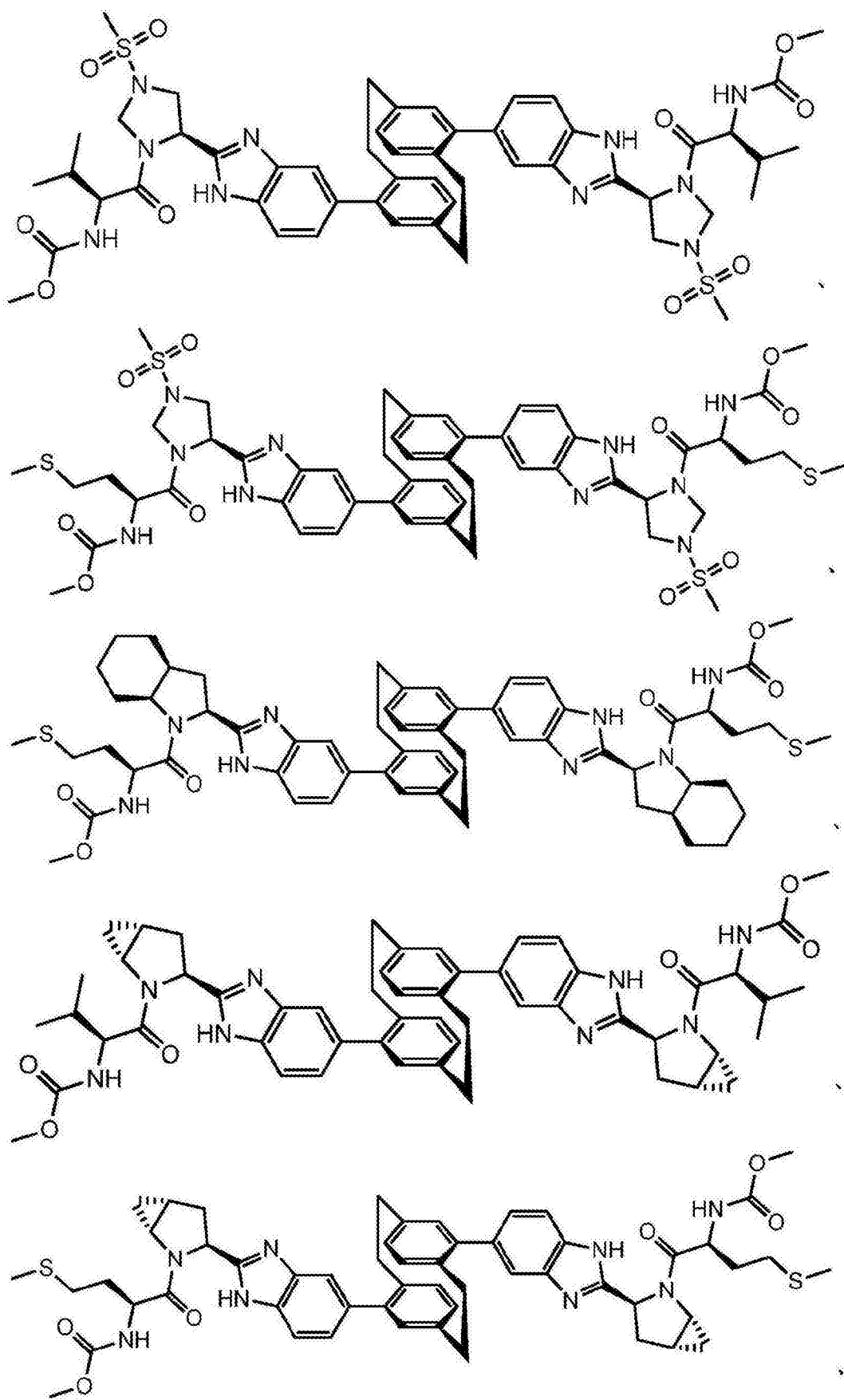


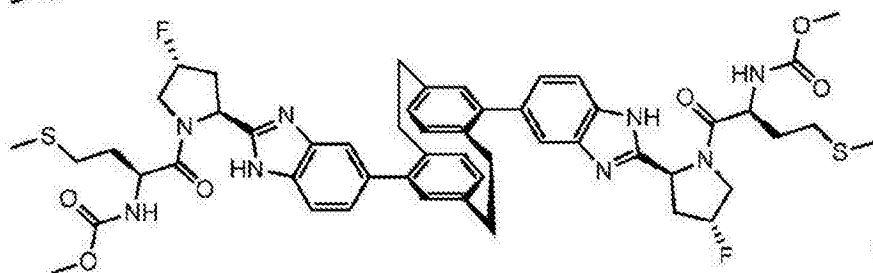
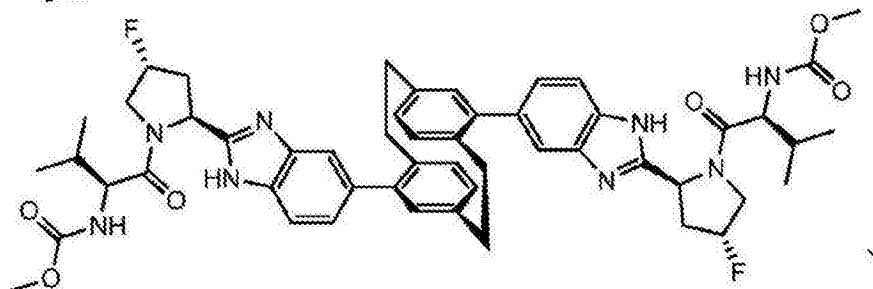
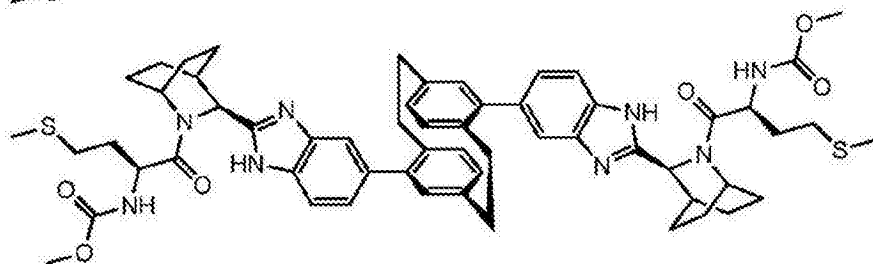
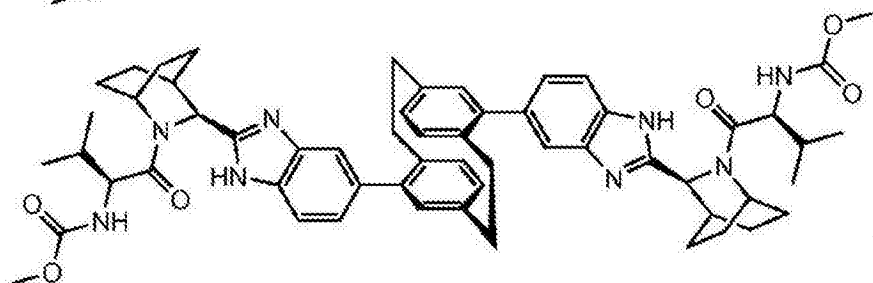
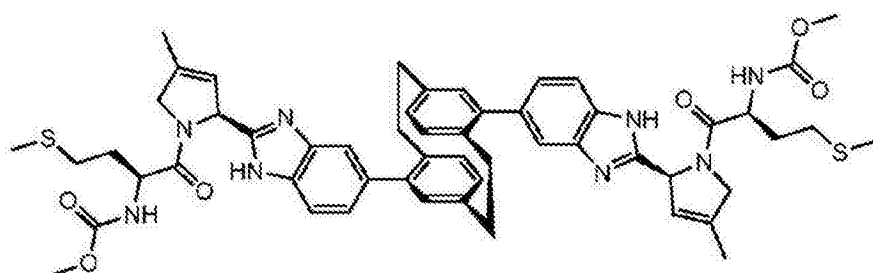
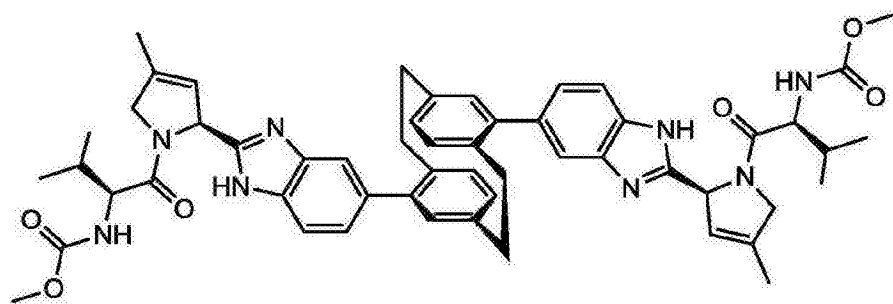


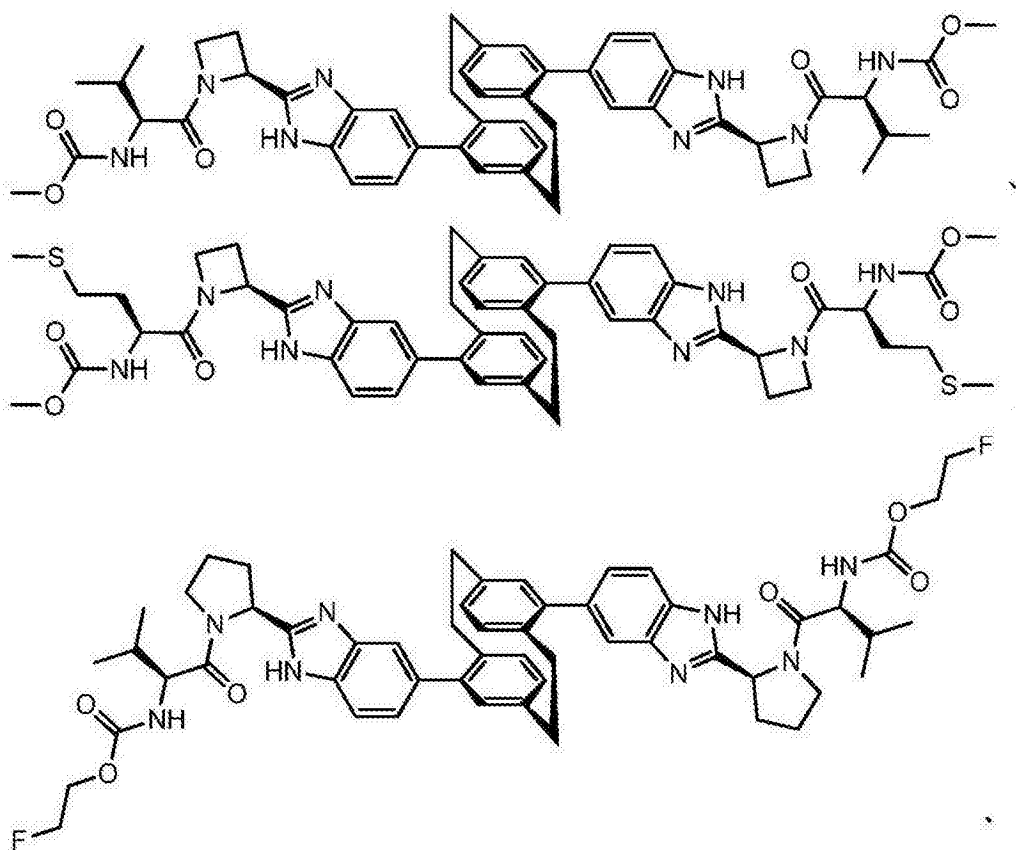


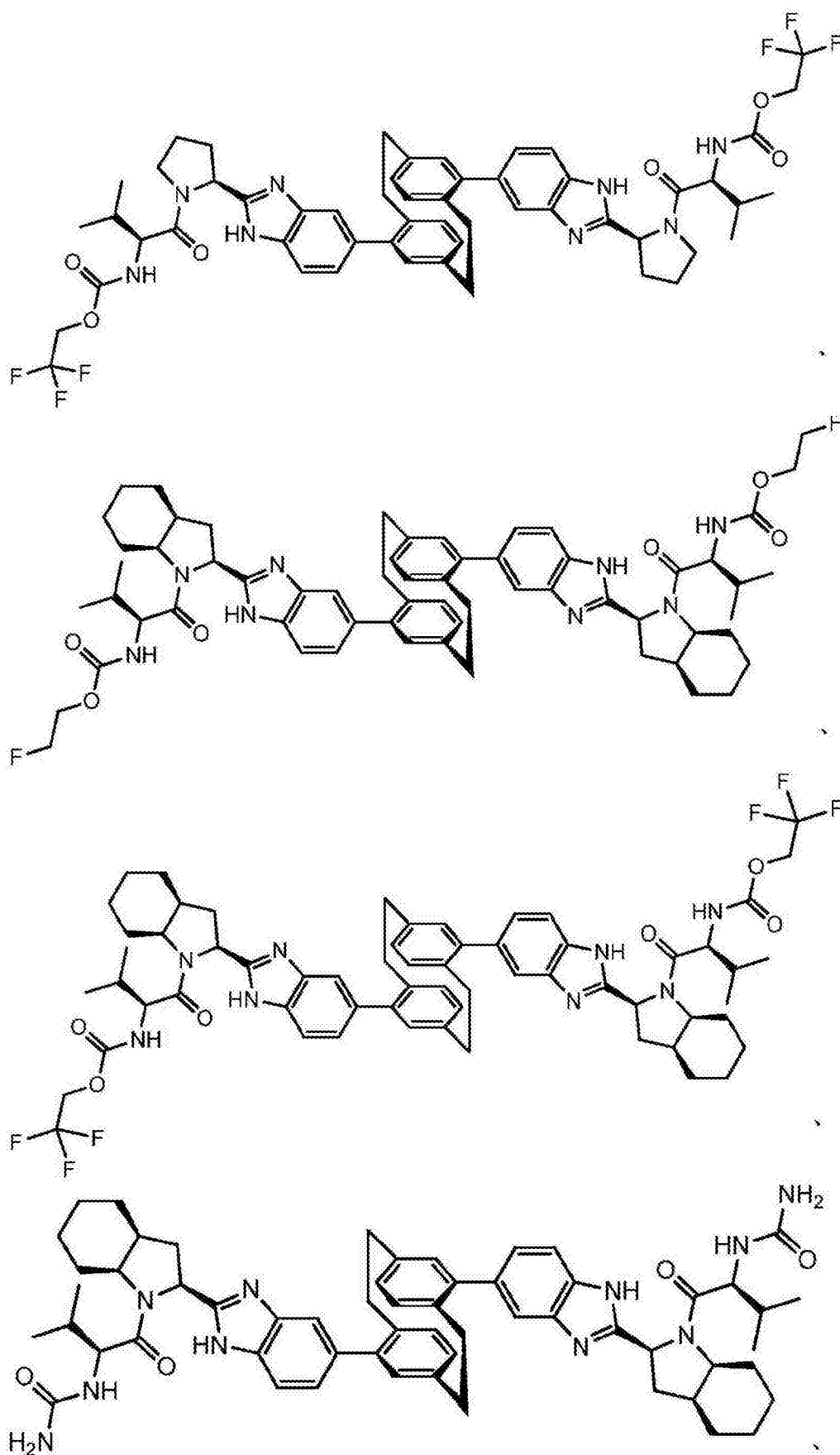


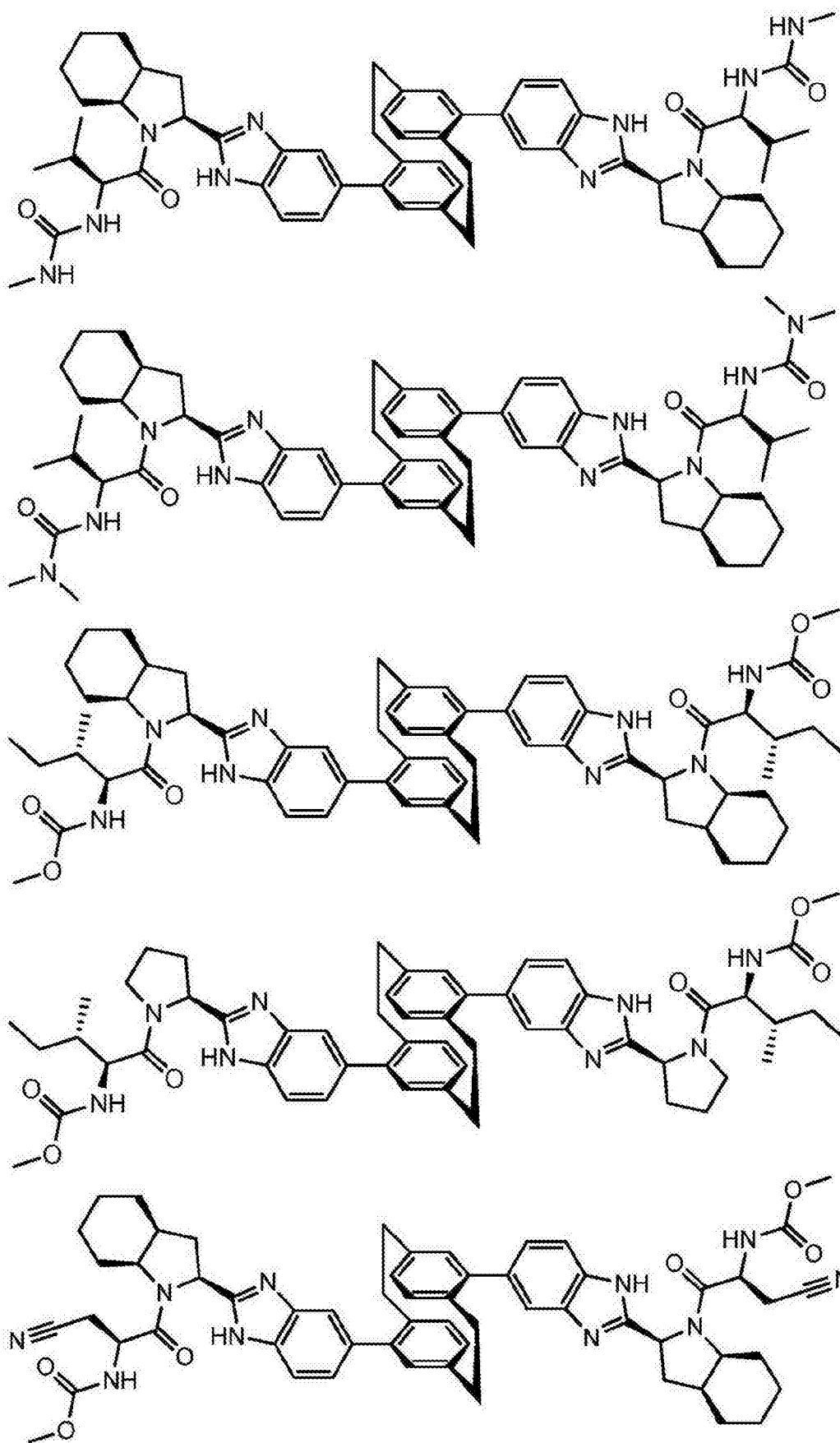


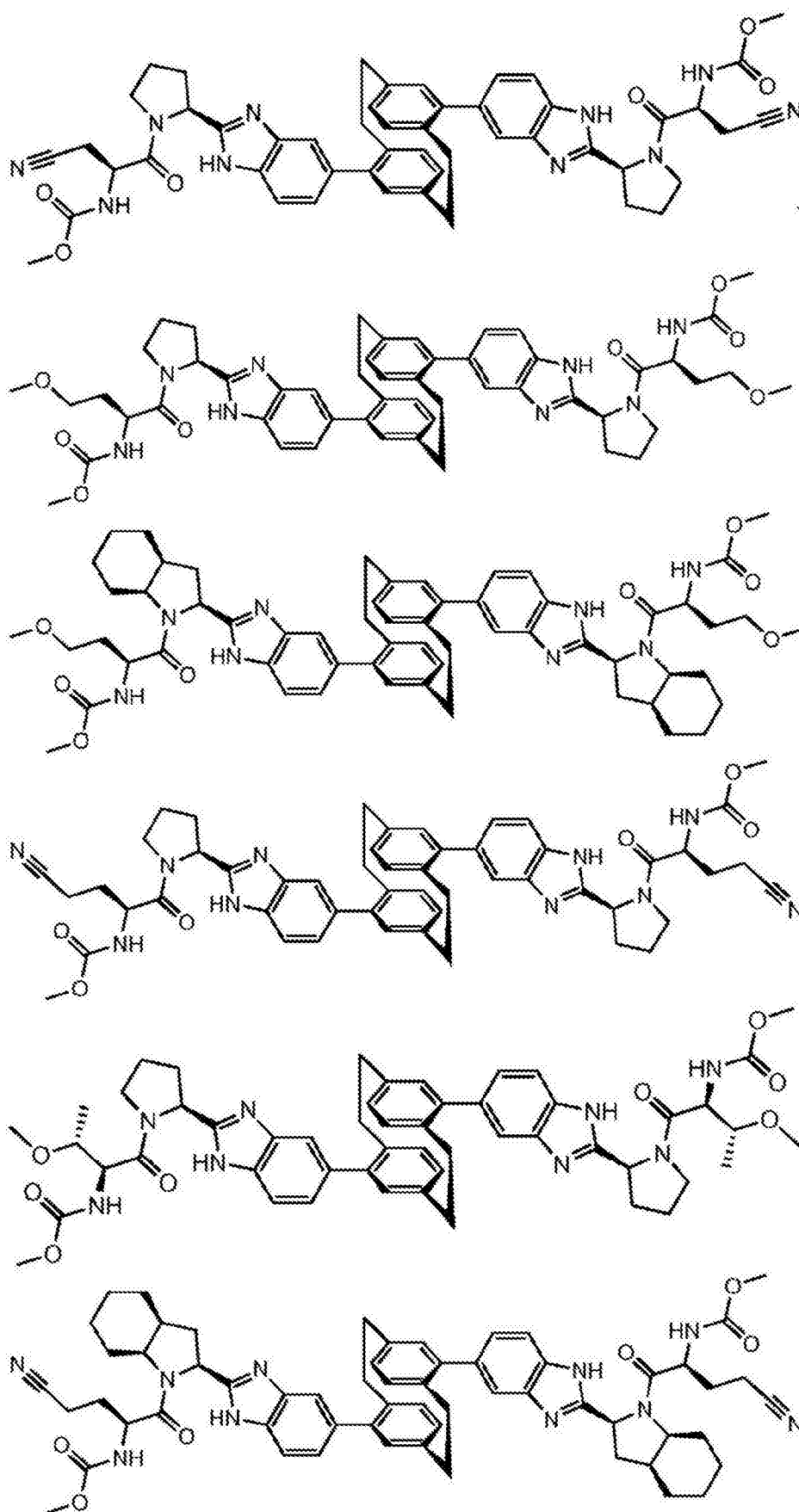


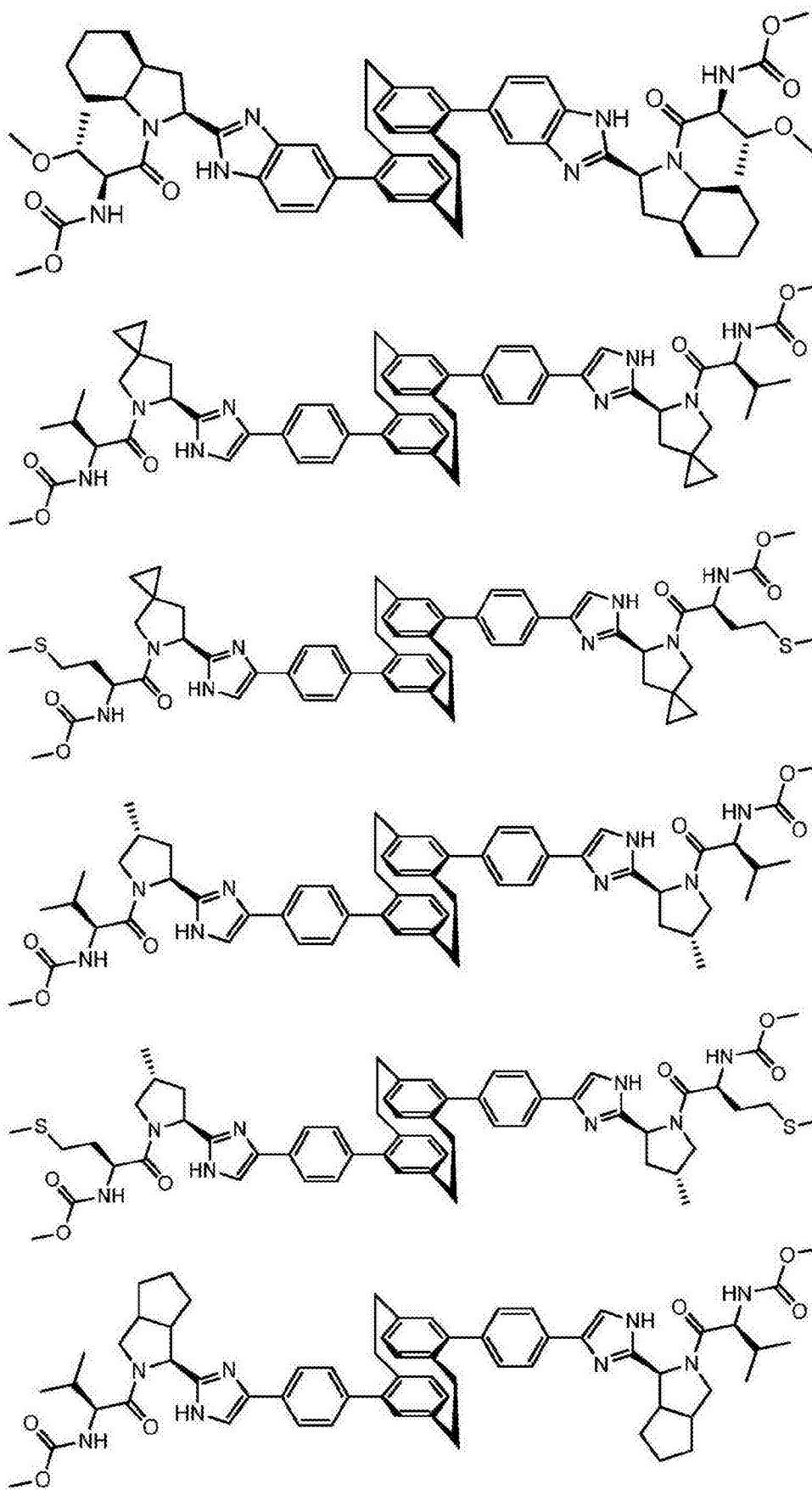


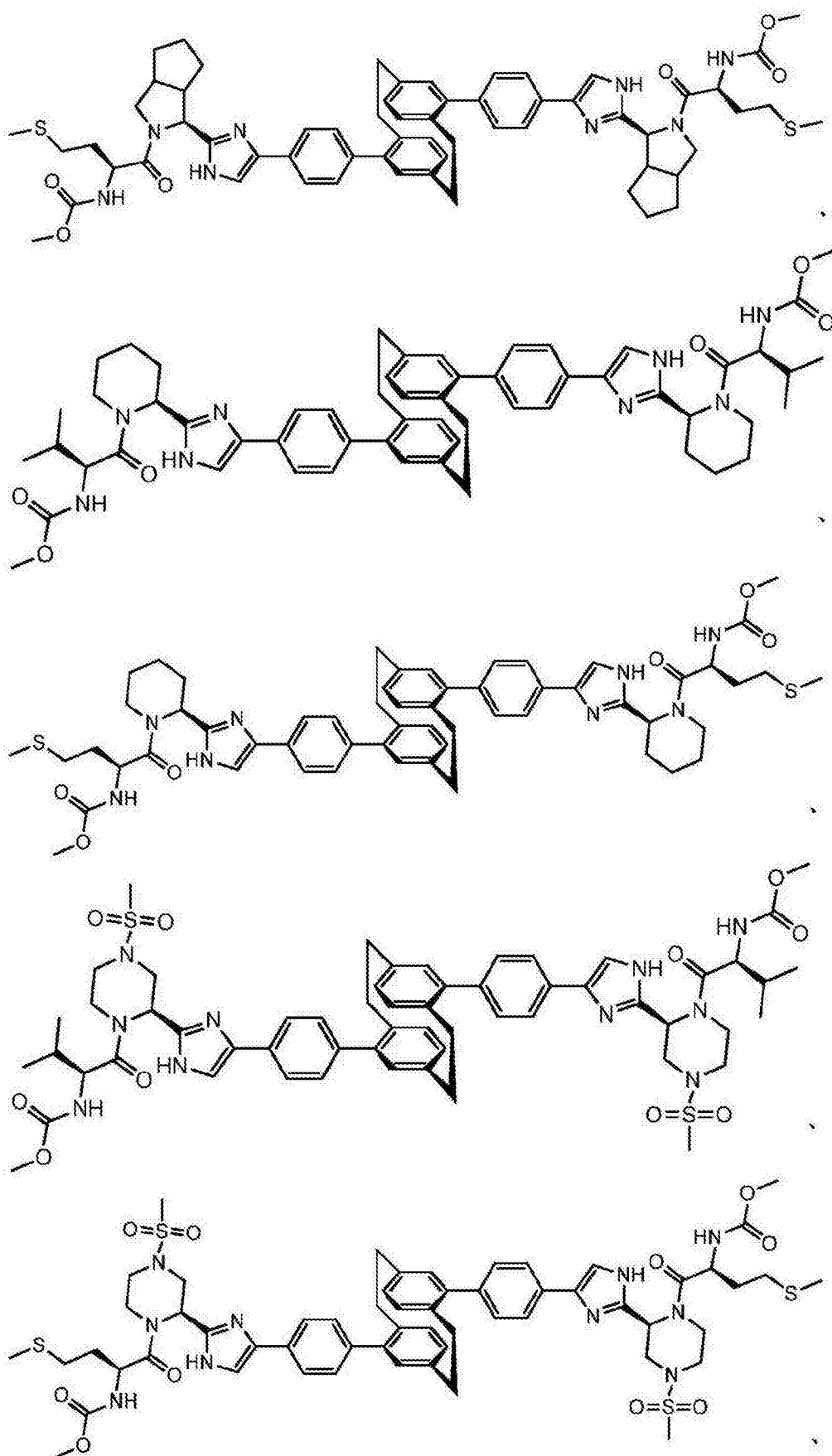


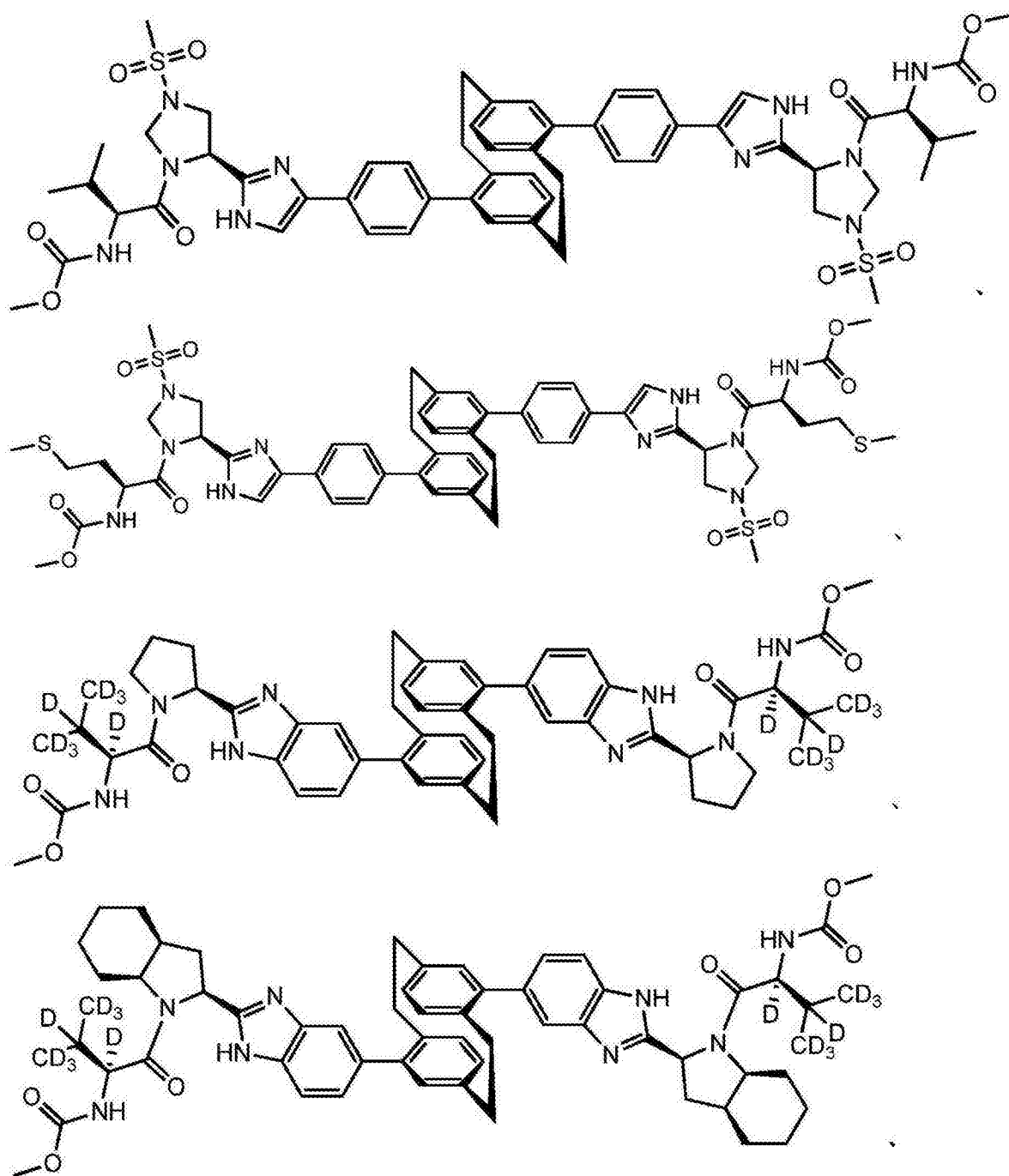


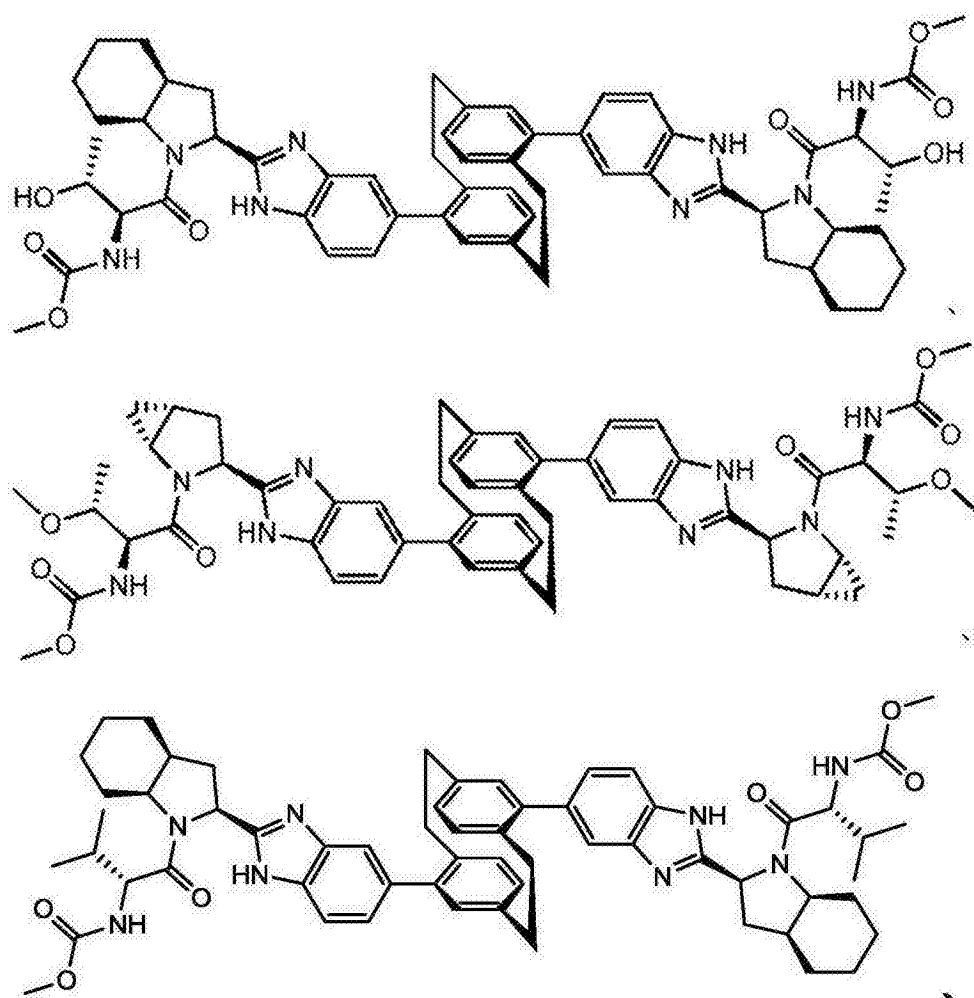


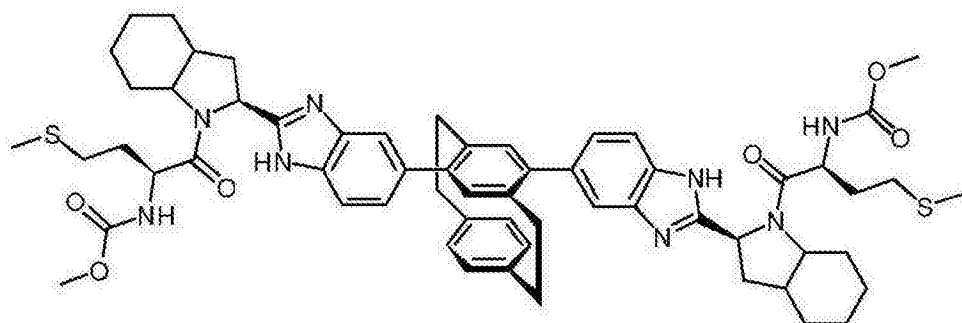
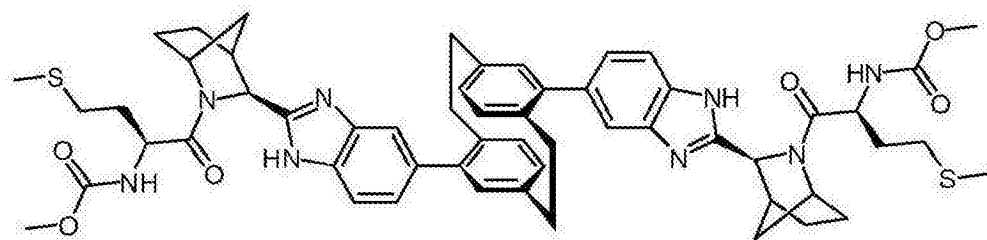
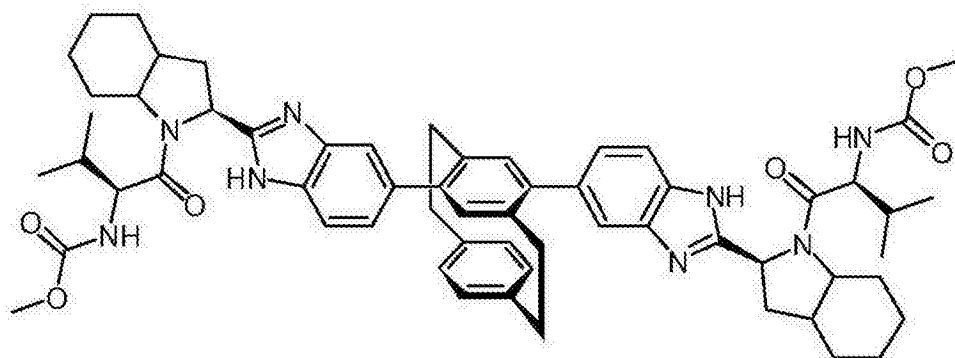
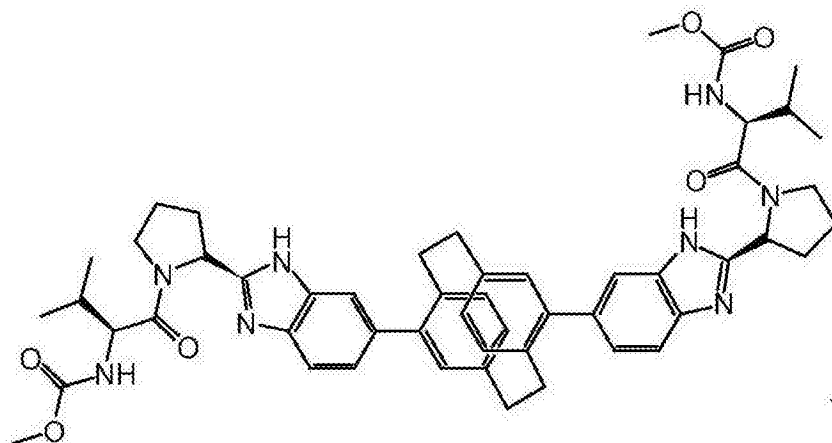
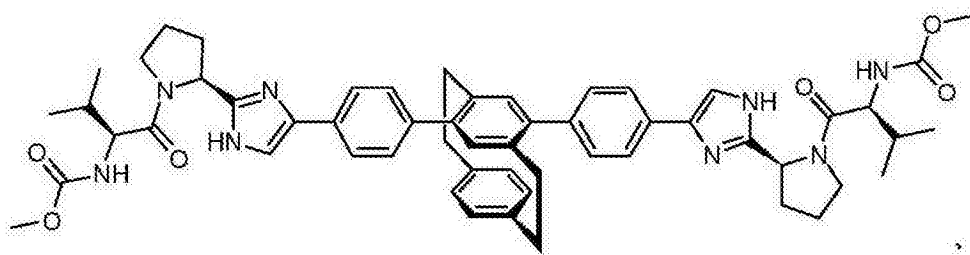


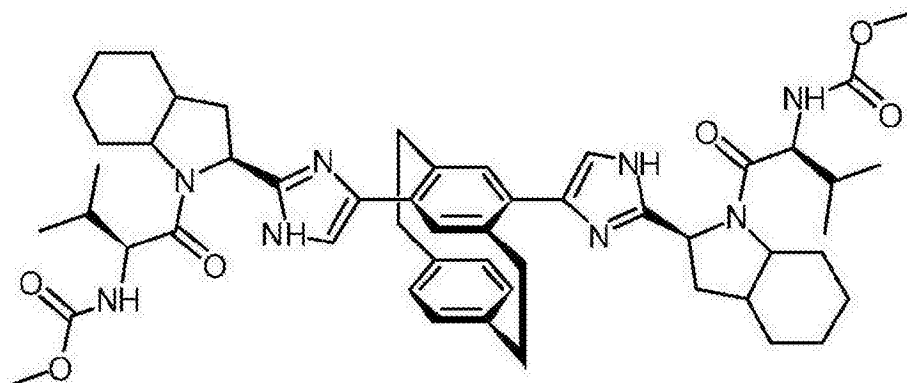
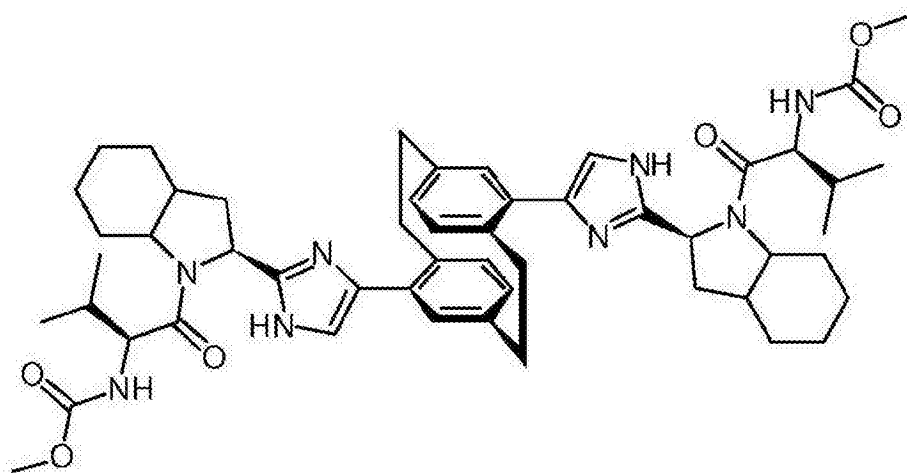
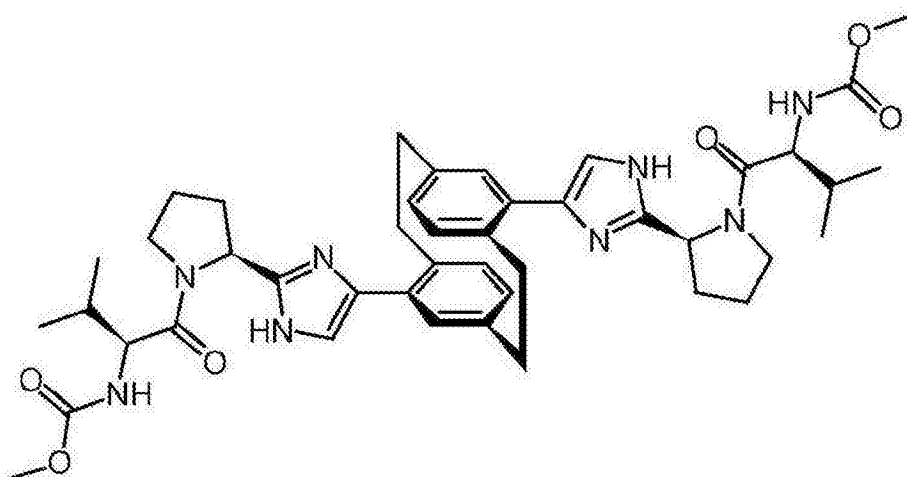
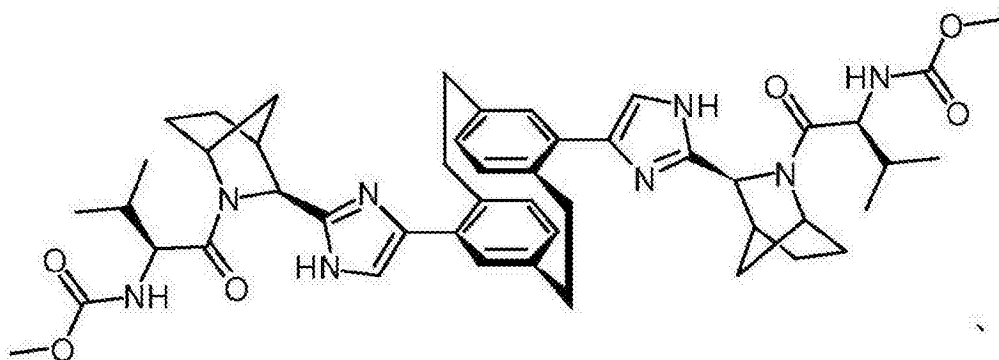


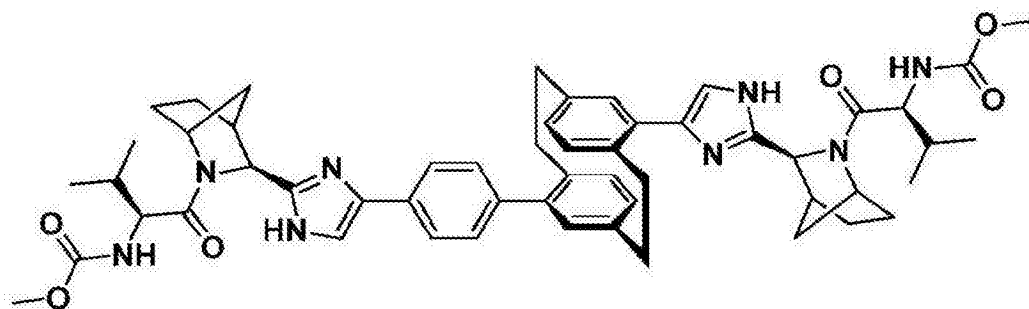
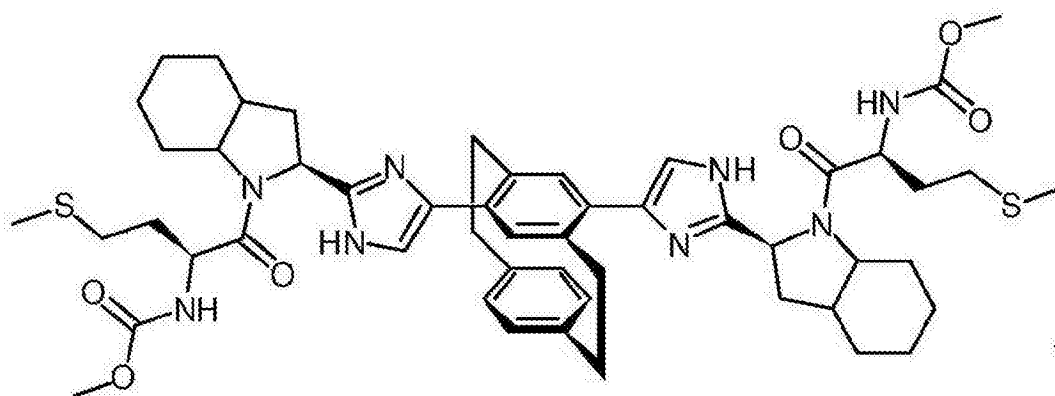
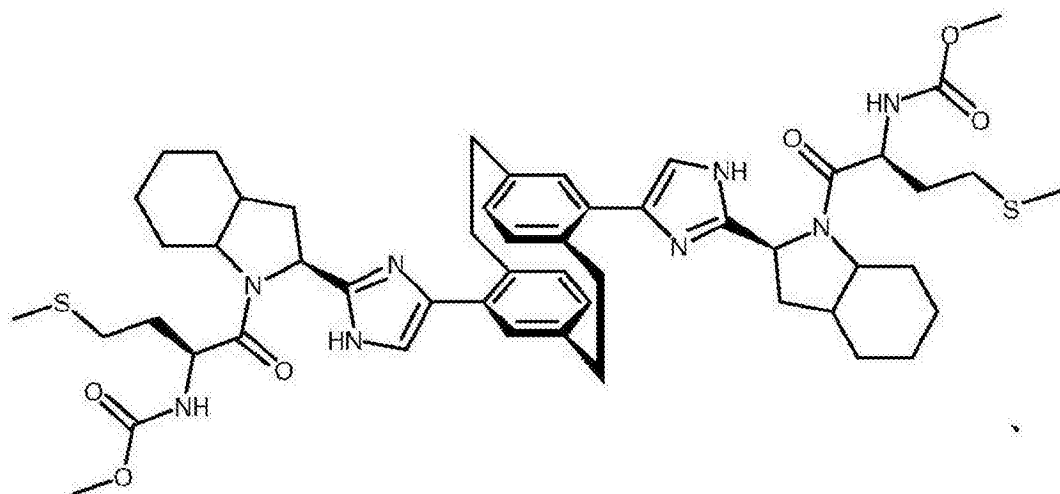
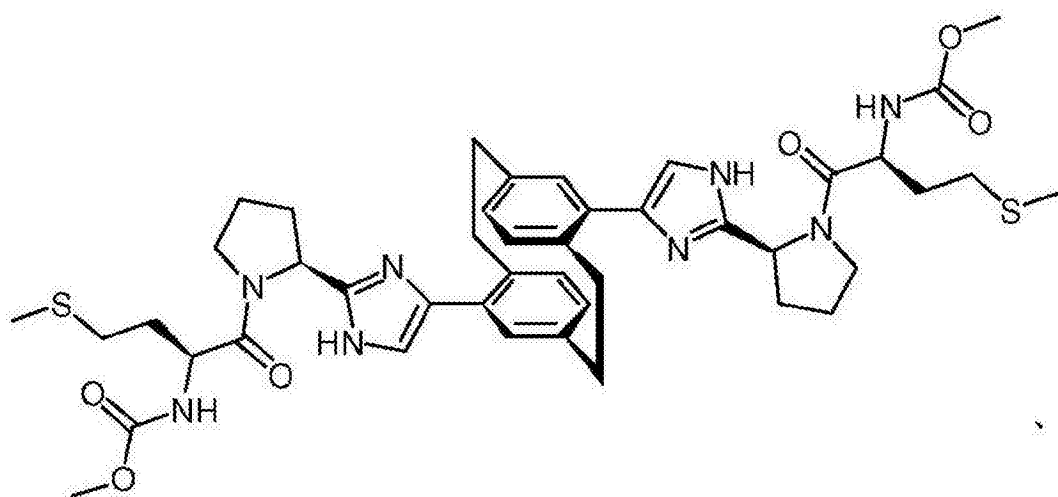


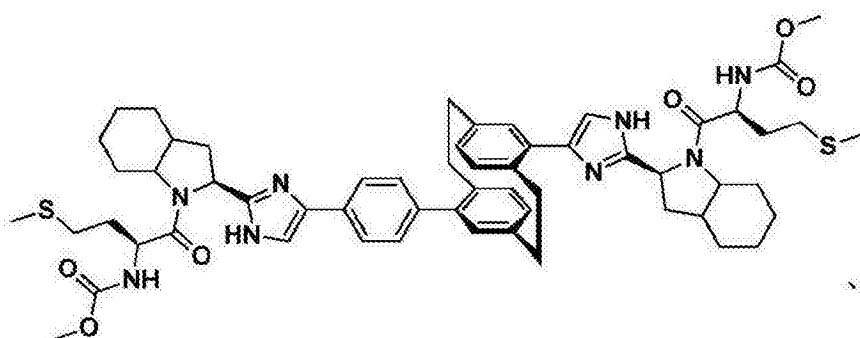
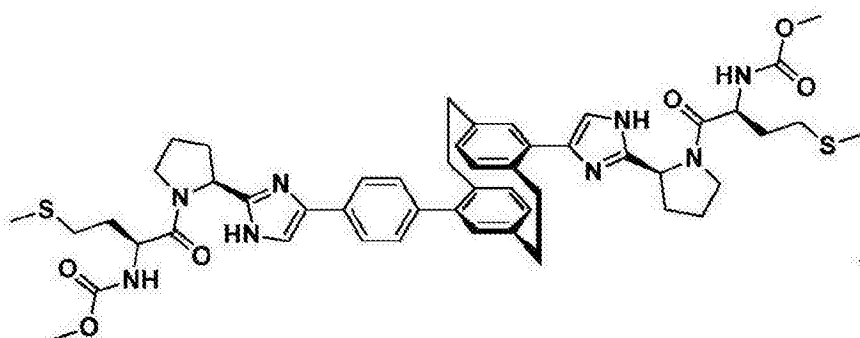
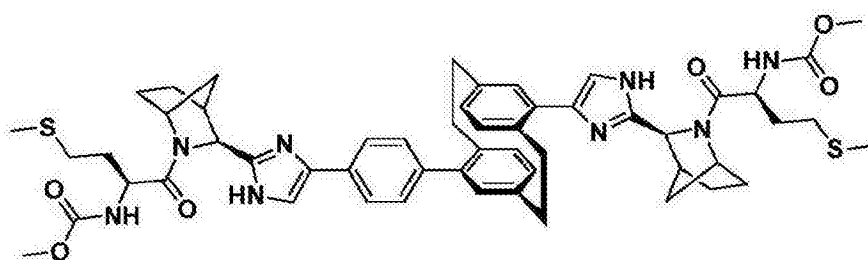
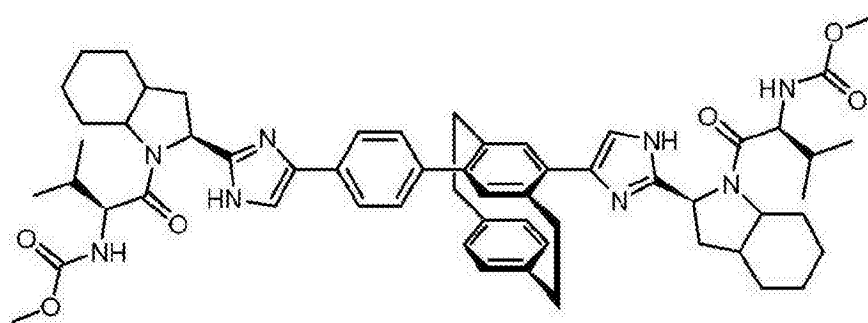
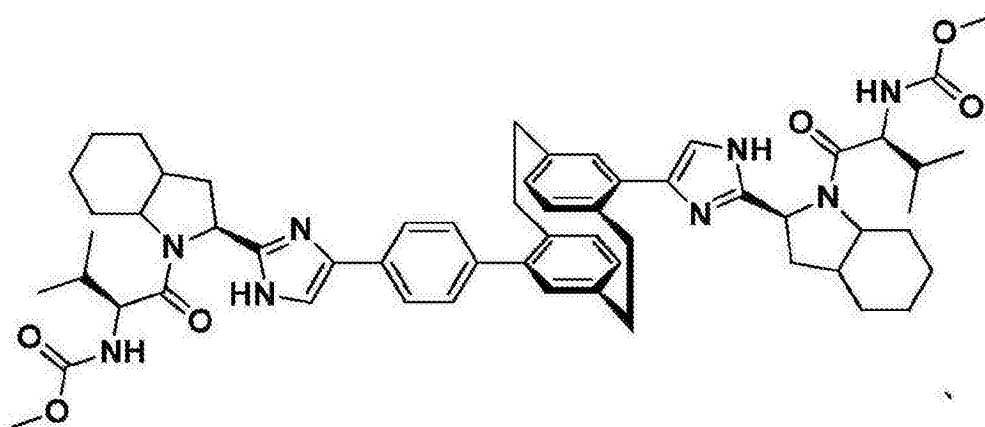


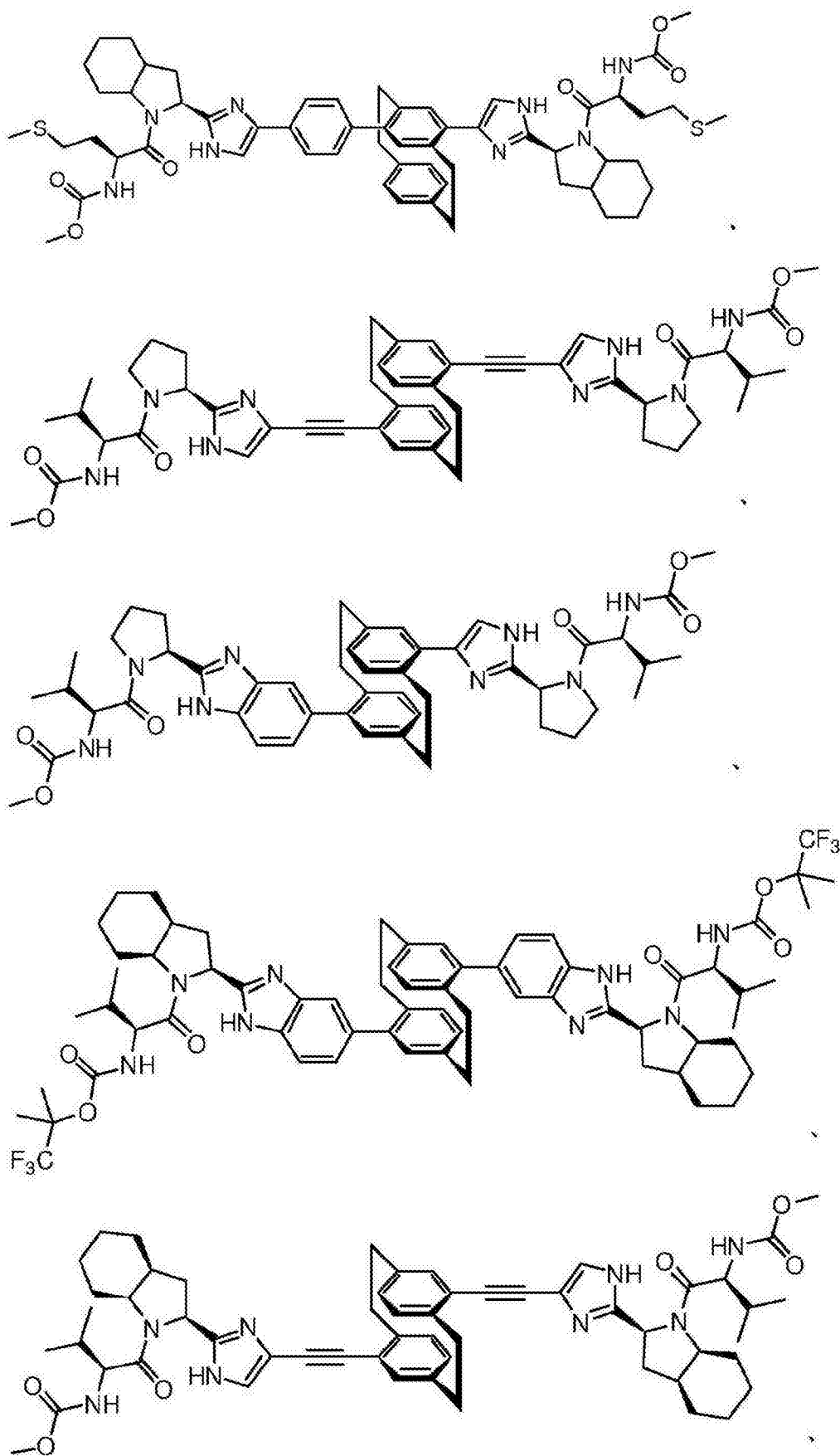


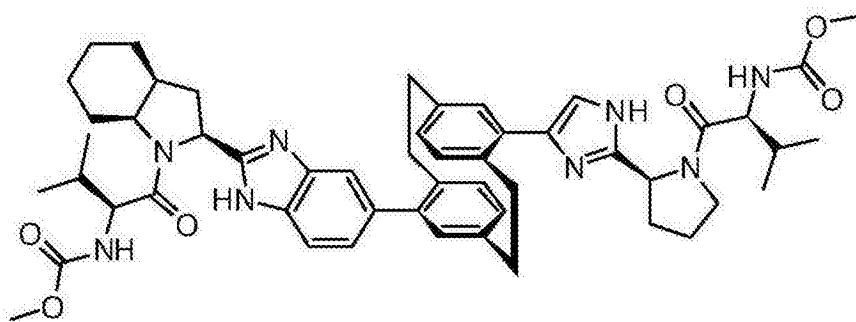




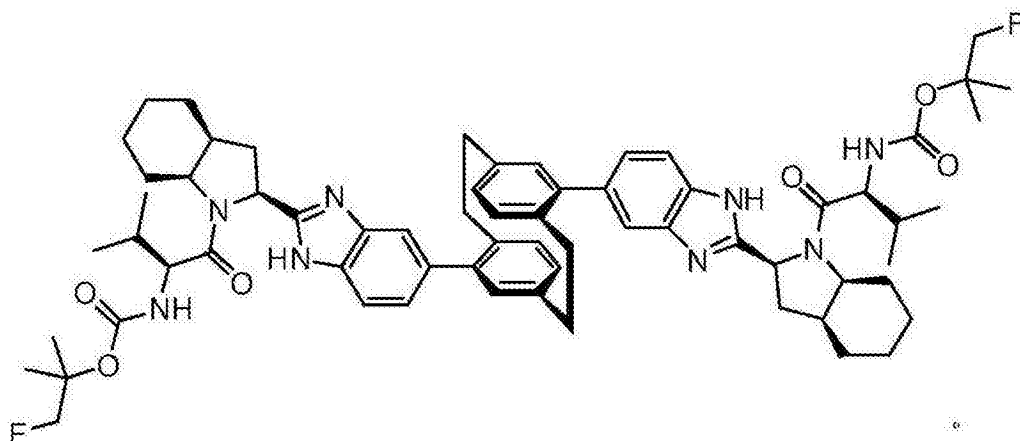








或

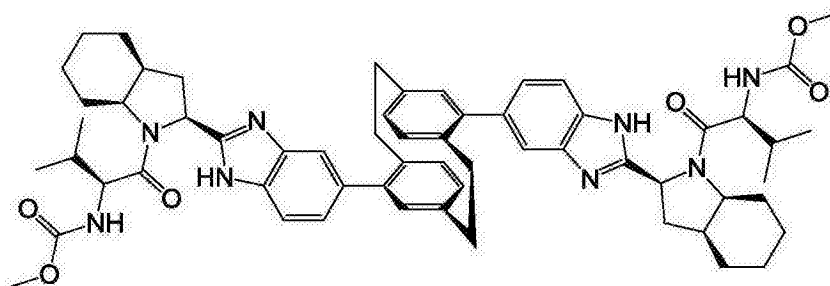


12. 药物组合物,其包含权利要求 11 所述的化合物或盐,以及可药用载体。

13. 根据权利要求 12 所述的药物组合物,其中所述组合物包含治疗有效量的另外的化合物,其中所述另外的化合物是治疗活性剂。

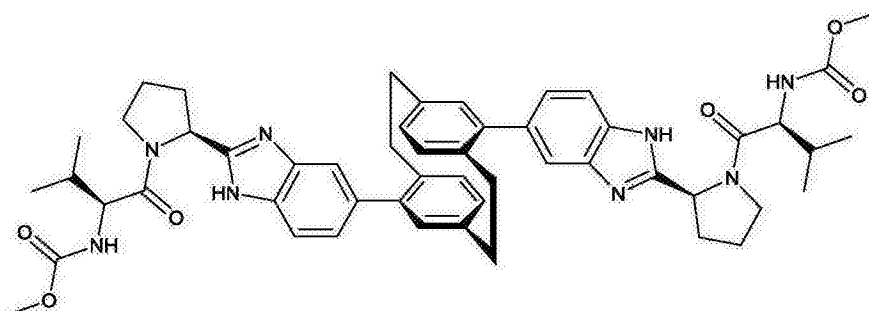
14. 一种或更多种权利要求 1 所述的化合物或其盐在制备用于治疗性地治疗患者的丙型肝炎感染的药物中的应用。

15. 根据权利要求 11 所述的化合物,其为式 :



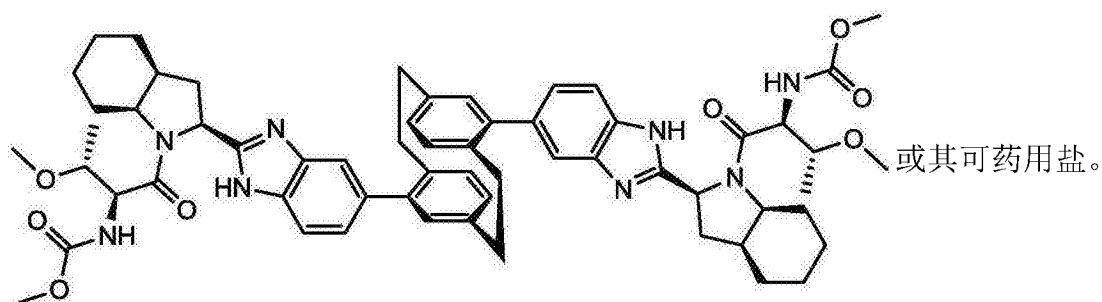
或其可药用盐。

16. 根据权利要求 11 所述的化合物,其为式 :

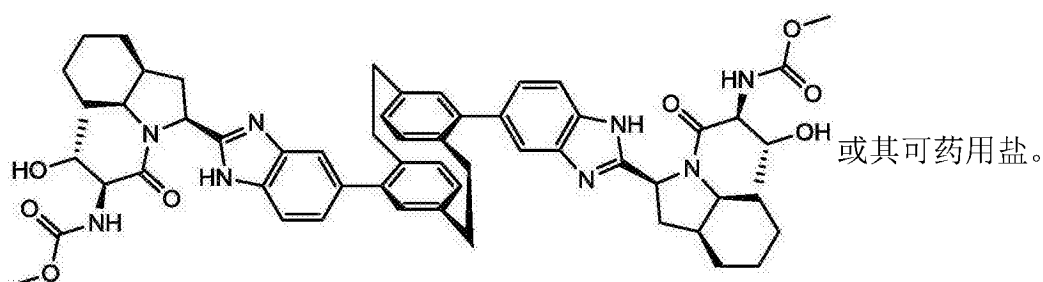


或其可药用盐。

17. 根据权利要求 11 所述的化合物,其为式 :



18. 根据权利要求 11 所述的化合物, 其为式:



19. 药物组合物, 其包含根据权利要求 15 所述的化合物或盐以及可药用载体。

20. 药物组合物, 其包含根据权利要求 16 所述的化合物或盐以及可药用载体。

21. 药物组合物, 其包含根据权利要求 17 所述的化合物或盐以及可药用载体。

22. 药物组合物, 其包含根据权利要求 18 所述的化合物或盐以及可药用载体。

23. 权利要求 15 所述的化合物或其盐在制备用于治疗性地治疗患有丙型肝炎感染之患者的丙型肝炎感染的药物中的应用。

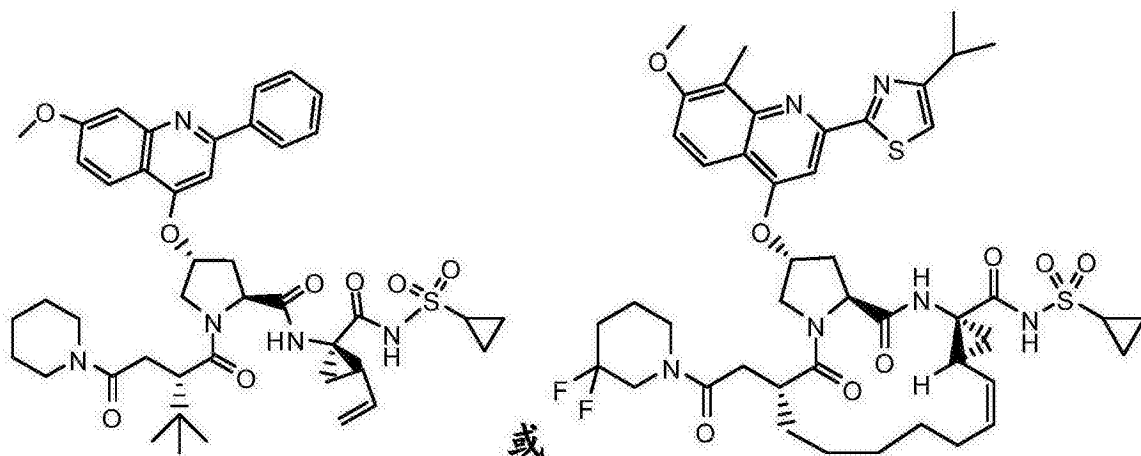
24. 权利要求 16 所述的化合物或其盐在制备用于治疗性地治疗患有丙型肝炎感染之患者的丙型肝炎感染的药物中的应用。

25. 权利要求 17 所述的化合物或其盐在制备用于治疗性地治疗患有丙型肝炎感染之患者的丙型肝炎感染的药物中的应用。

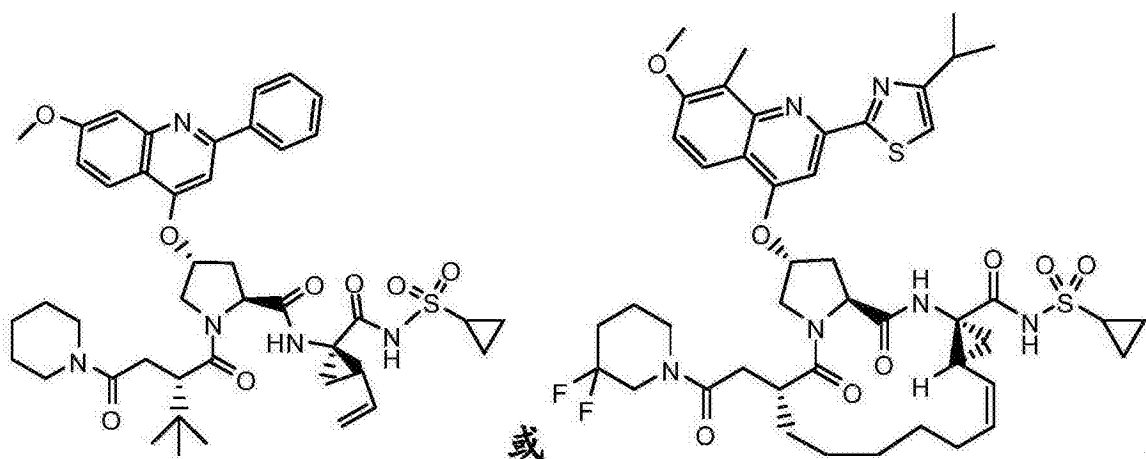
26. 权利要求 18 所述的化合物或其盐在制备用于治疗性地治疗患有丙型肝炎感染之患者的丙型肝炎感染的药物中的应用。

27. 根据权利要求 13 所述的药物组合物, 其中所述治疗活性剂是 NS3a 蛋白酶抑制剂。

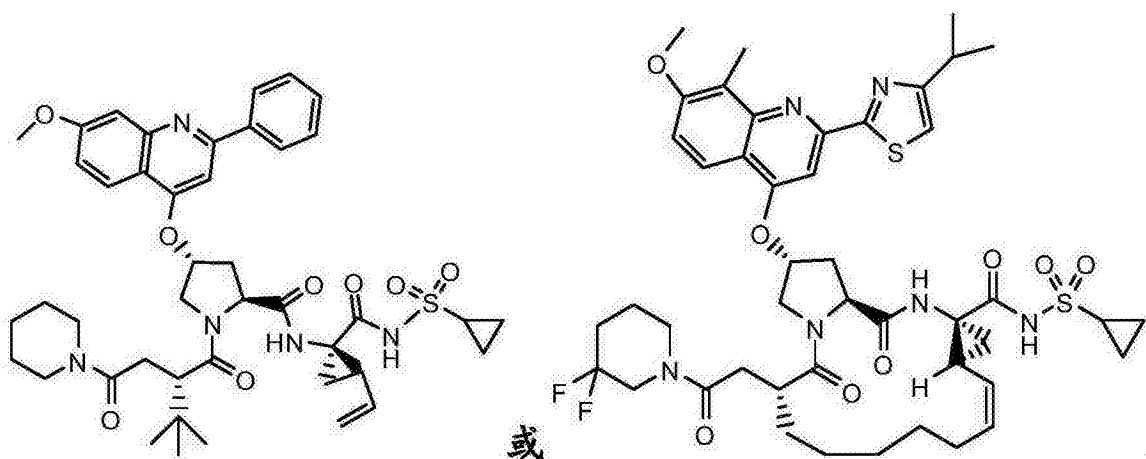
28. 根据权利要求 19 所述的药物组合物, 其包含另外的化合物, 其中所述另外的化合物是下式的治疗活性剂或其盐:



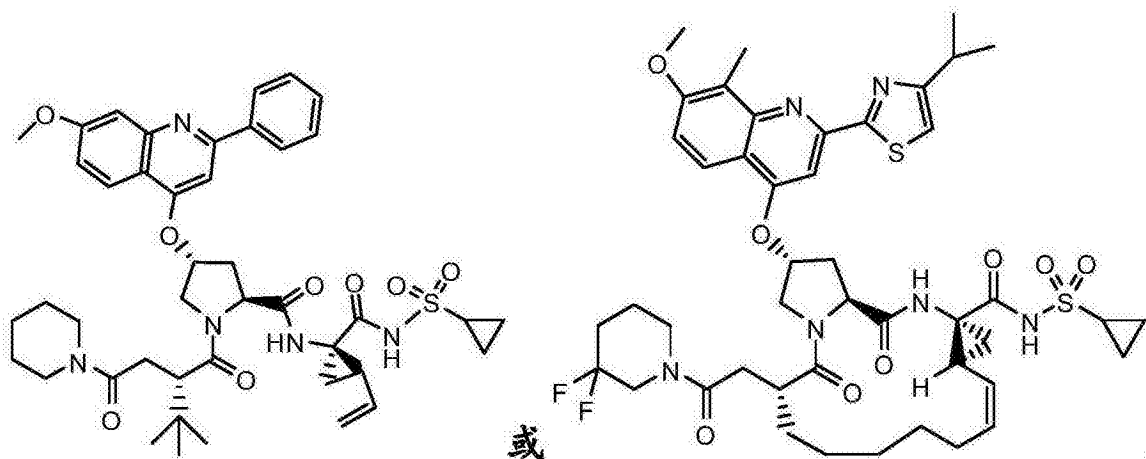
29. 根据权利要求 20 所述的药物组合物, 其包含另外的化合物, 其中所述另外的化合物是下式的治疗活性剂或其盐:



30. 根据权利要求 21 所述的药物组合物, 其包含另外的化合物, 其中所述另外的化合物是下式的治疗活性剂或其盐:



31. 根据权利要求 22 所述的药物组合物, 其包含另外的化合物, 其中所述另外的化合物是下式的治疗活性剂或其盐:



可用于治疗 HCV 感染的经取代的脂肪芬、环芬、异芬、杂芬、 杂 - 异芬以及金属茂

[0001] 优先权信息

[0002] 本申请要求 2011 年 5 月 27 日提交的美国临时申请 No. 61/490,881、2011 年 7 月 6 日提交的美国临时申请 No. 61/504,905 和 2011 年 12 月 6 日提交的美国临时申请 No. 61/567,216 的优先权,其全部通过引用整体并入本文。

技术领域

[0003] 本公开内容提供了可用作抗病毒剂的经取代的脂肪芬 (aliphane)、环芬 (cyclophane)、异芬 (heteraphane)、杂芬 (heterophane)、杂 - 异芬 (hetero-heteraphane) 以及金属茂 (metallocene)。本文公开的某些经取代的脂肪芬、环芬、异芬、杂芬、杂 - 异芬以及金属茂是强效和 / 或选择性的病毒复制 (特别是丙型肝炎病毒复制) 抑制剂。本公开内容还提供了包含一种或更多种经取代的脂肪芬、环芬、异芬、杂芬、杂 - 异芬和金属茂以及可药用载体的药物组合物 / 和组合。本公开内容提供了用于治疗病毒感染 (包括丙型肝炎病毒感染) 的方法。

背景技术

[0004] 据估计,世界人口的 3% 被丙型肝炎病毒感染。在暴露于 HCV 的人中,80% 至 85% 变为慢性感染,至少 30% 发生肝硬化,1% 至 4% 发生肝细胞癌。丙型肝炎病毒 (HCV) 是美国慢性肝病最重要的病因之一,据报道占急性病毒性肝炎的约 15%,慢性肝炎的 60% 至 70%,硬化、晚期肝病及肝癌多达 50%。慢性 HCV 感染是美国、澳大利亚和大多数欧洲国家中肝移植最常见的原因。在美国,丙型肝炎每年造成估计 10000 至 12000 人死亡。尽管 HCV 感染的急性期通常伴随温和的症状,但是一些证据显示仅有约 15% 至 20% 的感染者会自主清除 HCV。

[0005] HCV 是带包膜的单链 RNA 病毒,其含有约 9.6kb 的正链基因组。HCV 被归类为黄病毒科 (Flaviviridae) 丙型肝炎病毒属 (Hepacivirus genus) 的成员。已表征出至少 4 种 HCV 病毒株,即 GT-1 至 GT-4。

[0006] HCV 生活史 (life cycle) 包括:进入宿主细胞;翻译 HCV 基因组、多蛋白加工和复制酶复合物的组装;RNA 复制以及病毒体组装和释放。HCV RNA 基因组的翻译产生超过 3000 个氨基酸长的多蛋白,其通过至少两个细胞蛋白酶和两个病毒蛋白酶来加工。HCV 多蛋白是:NH₂-C-E1-E2-p7-NS2-NS3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B-COOH。

[0007] 已有报道,细胞信号肽酶和信号肽酶负责从非结构蛋白 (NS2-NS3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B) 切割所述多蛋白的 N 端三分之一 (C-E1-E2-p7)。NS2-NS3 蛋白酶介导在 NS2-NS3 位点处的第一顺式切割 (cis-cleavage)。然后 NS3-NS4A 蛋白酶介导在 NS3-NS4A 连接处的第二顺式切割。然后 NS3-NS4A 复合物在三个下游位点处切割以分离余下的非结构蛋白质。所述多蛋白的精确加工被认为对于形成活性 HCV 复制酶复合物是至关重要的。

[0008] 一旦所述多蛋白被切割,至少包含 NS3-NS5B 非结构蛋白质的复制酶复合物就进行组装。所述复制酶复合物在细胞质中并与膜相关联。所述复制酶复合物的主要酶活性包括在 NS3 的丝氨酸蛋白酶活性和 NTP 酶解旋酶活性以及 NS5B 的 RNA 依赖性 RNA 聚合酶活性。在 RNA 复制过程中,产生基因组 RNA 的互补负链拷贝。所述负链拷贝被用作模板以合成另外的正链基因组 RNA,该正链基因组 RNA 可参与翻译、复制、包装或其任何组合以产生子代病毒。功能性复制酶复合物的组装已被描述为 HCV 复制机制的组成部分。2005 年 4 月 11 日提交的美国临时申请 No. 60/669,872 “Pharmaceutical Compositions and Methods of Inhibiting HCV Replication”因其公开内容涉及所述复制酶复合物的组装而通过引用整体并入本文。

[0009] 目前对丙型肝炎感染的治疗通常包括与利巴韦林相组合施用干扰素,例如 PEG 化干扰素 (IFN)。如持续病毒学应答 (sustained virologic response, SVR) 所测定的目前疗法的成功取决于患者所感染的 HCV 病毒株以及患者对治疗方案的遵守。只有 50% 的感染 HCV GT-1 株的患者表现出持续的病毒学应答。直接作用的抗病毒剂 (例如 ACH-1625、特拉匹韦 (telaprevir)、BMS-790052 和 BMS-650032) 正处于治疗慢性 HCV 的临床开发阶段。由于缺少治疗某些 HCV 株的有效疗法以及由于 HCV 的高突变率,需要新的疗法。本公开内容满足了此需要并且提供了另外的优点,所述优点在本文中进行了描述。

[0010] 发明概述

[0011] 本公开内容提供了式 I 的经取代的脂肪芬、环芬、异芬、杂芬、杂 - 异芬以及金属茂。本公开内容提供的式 I 化合物具有抗病毒活性。

[0012] 本公开内容提供了作为强效和 / 或选择性的丙型肝炎病毒复制抑制剂的式 I 化合物。不受任何特定理论约束,认为本发明化合物是强效和选择性的 HCV NS5a 抑制剂。本公开内容还提供了包含一种或更多种式 I 化合物、或这些化合物的盐、以及一种或更多种可药用载体的药物组合物。本公开内容还提供了包含一种或更多种式 I 化合物、或这些化合物的盐、至少一种另外的活性剂、以及一种或更多种可药用载体的药物组合物。

[0013] 本发明还公开了通过向患有某些病毒感染 (特别是 HCV 感染) 的患者提供有效减轻所述病毒感染之体征或症状之量的式 I 化合物或者提供式 I 化合物与一种或更多种其他治疗活性剂的组合来治疗这些患者的方法。治疗方法包括提供作为单一活性剂的式 I 化合物。

[0014] 在第一方面中,本公开内容包括式 I 化合物或其可药用盐:

[0015] D-M-D (式 I)。

[0016] 在式 I 中,变量 D 和 M 具有下述定义。

[0017] D 是 T-R-,其中 M 与 R 共价相连。

[0018] M 是 -P-A-P-。

[0019] P 是 -J-W-,其中 J 与 R 共价相连,W 与 A 共价相连,或者

[0020] P 是 -J-,其中 J 与 R 和 A 共价相连。

[0021] J 在每次出现时独立地选择,并且 J 是 J^i ,其中 i 是 1 至 2 的整数。

[0022] T 在每次出现时独立地选择,并且 T 是 T^k ,其中 k 是 1 至 2 的整数; T^1 是 -Y-Z,其中 Y 与 R 共价相连,Y 是键、任选地被氧取代的 C_1 - C_4 亚烷基;Z 是 5 或 6 元杂环基团,在每种情况下 $T^1(i)$ 被选自 $-(C=O)OH$ 、 $-(C=O)NH_2$ 、 $-(C=O)H$ 、 $-C_1$ - C_4 烷氧基、 C_2 - C_4 烷酰基、

C₁-C₄烷基酯、C₁-C₄烯基酯、单 C₁-C₄烷基甲酰胺或二 C₁-C₄烷基甲酰胺的至少一个取代基所取代；以及 (ii) 任选地被一个或更多个独立地选自以下的取代基所取代：卤素、羟基、C₁-C₂烷基以及 C₁-C₂烷氧基；T²在每次出现时独立地选自：C₂-C₆烷酰基、C₁-C₆烷基酯、C₁-C₆烯基酯、C₁-C₆烷基磺酰胺、C₁-C₆烷基磺酰基、被单 C₁-C₆烷基氨基甲酸酯或二 C₁-C₆烷基氨基甲酸酯取代的 C₂-C₆烷酰基、被脲或者单 C₁-C₆烷基脲或二 C₁-C₆烷基脲取代的 C₂-C₆烷酰基以及被单 C₁-C₆烷基甲酰胺或二 C₁-C₆烷基甲酰胺取代的 C₂-C₆烷酰基，在每种情况下 T 任选地被一个或更多个独立地选自以下的取代基所取代：氨基、氰基、羟基、卤素、(C₁-C₄烷氧基) C₀-C₄烷基、(单 C₁-C₄烷基氨基和二 C₁-C₄烷基氨基) C₀-C₄烷基、C₁-C₆烷基、(C₁-C₄硫代烷基) C₀-C₄烷基、C₃-C₇环烷基、苯基、C₁-C₄卤代烷基以及 C₁-C₄卤代烷氧基；

[0023] R 在每次出现时独立地选自：

[0024] (a) 4 至 6 元环，其含有一个或两个氮原子，其余环原子为碳，其中 R 是饱和的或者含有 1 个不饱和键并且任选地与亚甲基或亚乙基桥桥联，与苯基或 5 至 6 元杂芳基环稠合；和

[0025] (b) 6 至 10 元稠合或螺双环体系，其含有一个或两个氮原子，其余环原子为碳，其中 6 至 10 元双环是饱和的或者含有 1 个不饱和键；每个 R 任选地被一个或更多个独立地选自以下的取代基所取代：氰基、羟基、卤素、C₁-C₂烷基、C₁-C₂烷氧基、C₁-C₂卤代烷基、C₁-C₂卤代烷基、C₁-C₂卤代亚烷基以及 C₁-C₂烷基磺酰基。

[0026] J¹是苯基或含有 1 至 3 个独立地选自 N、O 和 S 的杂原子的 5 至 6 元杂芳基，其中每个 J¹任选地被一个或更多个独立地选自以下的取代基所取代：氨基、氰基、羟基、卤素、C₁-C₄烷基、C₁-C₄烷氧基、单 C₁-C₄烷基氨基和二 C₁-C₄烷基氨基、C₁-C₂卤代烷基以及 C₁-C₂卤代烷氧基。

[0027] J²是 8 至 10 元杂芳基，其含有 1 至 4 个独立地选自 N、O 和 S 的杂原子，其中 J²任选地被一个或更多个独立地选自以下的取代基所取代：氨基、氰基、羟基、卤素、C₁-C₄烷基、C₁-C₄烷氧基、单 C₁-C₄烷基氨基和二 C₁-C₄烷基氨基、C₁-C₂卤代烷基以及 C₁-C₂卤代烷氧基。

[0028] W 在每次出现时独立地选择，并且是苯基、吡啶基或炔基，其任选地被一个或更多个独立地选自以下的取代基所取代：氨基、氰基、羟基、卤素、C₁-C₄烷基、C₁-C₄烷氧基、单 C₁-C₄烷基氨基和二 C₁-C₄烷基氨基、C₁-C₂卤代烷基以及 C₁-C₂卤代烷氧基。

[0029] A 是 [j. k]-环芬、[j. k]-异芬、[j. k]-杂芬、[j. k]-异-杂芬或 [j. k]-脂肪芬；其中 j 是 1 至 4 的整数，k 是整数 0 至 4，j 与 k 之差不大于 2，并且每个 j 和 k 接头任选地含有选自 N、O 和 S 的杂原子，并且任选地被 1 个氧代基团和一个或更多个独立地选自卤素、羟基、氨基、C₁-C₂烷基和 C₁-C₂烷氧基的取代基所取代；或者

[0030] A 是 [j. k. j'. k']-环芬，其中 j、j'、k 和 k' 是 1 至 4 的整数，j 与 k 或 k' 之差不大于 2，j' 与 k 或 k' 之差不大于 2，并且每个 j、j'、k 和 k' 接头任选地含有选自 N、O 和 S 的杂原子，并且任选地被 1 个氧代基团和一个或更多个独立地选自卤素、羟基、氨基、C₁-C₂烷基和 C₁-C₂烷氧基的取代基所取代；

[0031] 或者

[0032] A 是式  基团, 其中 Q 是中性金属或阳离子金属, 在每

种情况下 A 任选地被一个或多个独立地选自卤素、 C_1-C_2 烷基和 C_1-C_2 烷氧基的取代基所取代。在某些实施方案中, Q 选自 Fe、Co、Cr、Ni、V、Li、Rb 以及 K ;或者

[0033] A 是式  基团, 其中 A 任选地被一个或多个独立地选自卤素、 C_1-C_2 烷基和 C_1-C_2 烷氧基的取代基所取代。

[0034] 本公开内容提供了包含式 I 化合物和可药用载体的药物组合物和组合。本公开内容所提供的组合物和组合可以包含作为唯一活性剂的式 I 化合物或者可以包含一种或更多种另外的活性剂。在某些实施方案中, 所述另外的活性剂是 NS3a 蛋白酶抑制剂。本公开内容还包括治疗患者丙型肝炎感染的方法, 其包括向患者提供治疗有效量的一种或更多种式 I 化合物。式 I 化合物可以作为唯一活性剂提供或者可以与一种或更多种另外的活性剂 (例如 NS3a 蛋白酶抑制剂) 一起提供。

[0035] 本文公开的某些式 I 化合物在下文的 HCV 复制测定 (例如实施例 9 所示的 HCV 复制子测定) 中表现出良好的活性。优选的式 I 化合物在 HCV 复制子复制测定中表现出约 10 微摩尔或更低的 EC_{50} , 或者更优选约 1 微摩尔或更低的 EC_{50} , 或者更优选约 100 纳摩尔或更低的 EC_{50} 。

[0036] 发明详述

[0037] 化学描述和术语

[0038] 在详细阐述本发明之前, 提供本公开内容中将要用到的某些术语的定义可能是有帮助的。使用标准命名法来描述化合物。除非另有限定, 否则本文所用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域之技术人员通常所理解的相同的含义。除非在上下文中被明确排除, 否则每个化合物名称包括所述化合物的游离酸或游离碱形式以及所述化合物的所有可药用盐。

[0039] 术语“式 I 化合物”涵盖满足式 I 的所有化合物, 包括任何对映体、外消旋体和立体异构体, 以及这些化合物的所有可药用盐。短语“式 I 化合物”包括式 I 的所有亚组, 并且还包式 I 化合物的可药用盐, 除非在该短语所用的上下文中被明确排除。

[0040] “式 II”涵盖满足式 II 的所有化合物, 包括这些化合物的任何对映体、外消旋体和立体异构体, 以及所有可药用盐。短语“式 II 化合物”包括式 II 的所有亚组, 并且还包式 II 化合物的可药用盐, 除非在该短语所用的上下文中被明确排除。

[0041] 不定冠词不表示对量的限制, 而是表示存在至少一个所指的项目。术语“或”意指“和 / 或”。开放式过渡短语“包含”涵盖中间过渡短语“基本由... 组成”和封闭式短语“由... 组成”。引用这三个过渡短语之一或者替代过渡短语 (例如“含有”或“包括”) 的权利要求可以与任何其他过渡短语一同书写, 除非在上下文或本领域中被明确排除。除非文中另有指明, 否则数值范围的记载仅旨在作为单独指明落入该范围的每个单个值的简略方法, 并且每个单个值也并入本说明书中, 就如同在本文中分别单独引用每个单个值一样。所有范围的端点均包含在所述范围内并且可独立地组合。除非文中另有指明或者与上下文

明显矛盾,否则本文中所述的全部方法都可以以合适的顺序实施。除非另外要求,否则任何以及所有实例或者示例性语言(例如“例如”)的使用仅旨在更好地举例说明本发明,而不对本发明的范围加以限制。说明书中的语言都不应解释为表明任何未要求保护的要素是实施如本文所用的本发明所必需的。除非另有限定,否则本文所用技术和科学术语具有与本发明所属领域技术人员通常所理解的相同的含义。

[0042] “活性剂”意指当单独或与另外的化合物、要素或混合物相组合施用给患者时,直接或间接地赋予所述患者生理效应的化合物(包括本文所公开的化合物)、要素或混合物。所述间接生理效应可以通过代谢物或其他间接机制而发生。

[0043] 不在两个字母或符号之间的短线(“-”)用于表示取代基的连接点。例如, $-(C=O)NH_2$ 通过酮基($C=O$)的碳相连接。

[0044] 本文中使用的“脂肪芬”是由一个或两个环烷基环构成的基团,其中至少一个脂肪族桥在单个环烷基环之两个非相邻位置之间或者在两个环烷基环之间。所述脂肪族桥含有1至4个碳原子。脂肪族桥任选地被氧代基团取代。

[0045] “烷酰基”是由酮基($-(C=O)-$)桥与其所取代的基团共价相连的如本文所定义的烷基。烷酰基具有具体数目的碳原子,其中酮基中的碳被包括在计数的碳原子内。例如, C_2 烷酰基是具有式 $CH_3(C=O)-$ 的乙酰基。

[0046] “烷基”是支链或直链的饱和脂肪烃基,其具有具体数目的碳原子,一般为1至约12个碳原子。本文所用的术语 C_1-C_6 烷基指具有1、2、3、4、5或6个碳原子的烷基。其他实施方案包括具有1至8个碳原子、1至4个碳原子或者1或2个碳原子的烷基,例如 C_1-C_8 烷基、 C_1-C_4 烷基和 C_1-C_2 烷基。当本文中 C_0-C_n 烷基与另一个基团(例如,(C_1-C_4 烷氧基) C_0-C_4 烷基)联合使用时,所指基团(在此情形下为烷氧基)是通过共价单键(C_0 烷基)直接相连,或者通过具有具体数目碳原子(在此情形下是1、2、3或4个碳原子)的烷基链相连。烷基的实例包括但不限于甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、3-甲基丁基、叔丁基、正戊基和仲戊基。

[0047] “炔基”是具有一个或更多个碳-碳三键的直链或支链脂肪族烃基,所述三键可以存在于链上的任何稳定点,所述炔基具有具体数目的碳原子。炔基的实例包括但不限于乙炔基和丙炔基。

[0048] “烷氧基”是通过氧桥($-O-$)与其所取代的基团共价连接的具有具体数目碳原子的如上文所定义的烷基。烷氧基的实例包括但不限于甲氧基、乙氧基、正丙氧基、异丙氧基、正丁氧基、2-丁氧基、叔丁氧基、正戊氧基、2-戊氧基、3-戊氧基、异戊氧基、新戊氧基、正己氧基、2-己氧基、3-己氧基和3-甲基戊氧基。

[0049] 术语“烷基酯”指通过酯键与其所取代的基团共价连接的如本文所定义的烷基。所述酯键可在任何位置上,例如式 $-O(C=O)$ 烷基基团或式 $-(C=O)O$ 烷基基团。

[0050] “烷基磺酰基”是式 $-SO_2$ 烷基基团,其中所述烷基具有本文所给出的定义。

[0051] “环烷基”是具有具体数目碳原子的饱和环烃基。单环环烷基通常具有3至约8个碳环原子,或3至7个(3、4、5、6或7)碳环原子。环烷基取代基可以是经取代之氮或碳原子的侧链(pendant),或者可具有两个取代基的经取代之碳原子可具有作为螺环基团(spiro group)相连接环烷基。环烷基的实例包括环丙基、环丁基、环戊基和环己基。

[0052] 本文中使用的“环芬”是由一个或两个芳香环(通常为苯环)构成的基团,其中至

少一个脂肪族桥在单个芳香环之两个非相邻位置之间或者在两个芳香环之间。脂肪族桥在间位或对位或间位、对位（一个芳香环的间位和另一个芳香环的对位），并且含有 1 至 4 个碳原子。所述脂肪族桥任选地被氧代基团取代。

[0053] “卤代烷基”指被一个或多个卤素原子（多至最大可允许数目的卤素原子）取代的具有具体数目碳原子的支链和直链烷基。卤代烷基的实例包括但不限于三氟甲基、二氟甲基、2-氟乙基以及五氟乙基。

[0054] “卤代烷氧基”指通过氧桥（醇基的氧）连接的本文所定义的卤代烷基。

[0055] “卤代”或“卤素”指氟、氯、溴和碘中的任一种。

[0056] “杂芳基”指具有具体数目环原子的稳定单环芳香环，其含有 1 至 3 个或在一些实施方案中 1 至 2 个选自 N、O 和 S 的杂原子，其余环原子为碳；或者指含有至少一个 5 至 7 元芳香环的稳定双环或三环体系，其含有 1 至 3 个或在一些实施方案中 1 至 2 个选自 N、O 和 S 的杂原子，其余环原子为碳。单环杂芳基通常具有 5 至 7 个环原子。在一些实施方案中，双环杂芳基是 9 至 10 元杂芳基，即含有 9 或 10 个环原子的基团，其中一个 5 至 7 元芳香环稠合至第二芳香环或非芳香环上。当杂芳基中 S 和 O 原子总数超过 1 时，这些杂原子彼此不相邻。优选杂芳基中 S 和 O 原子的总数不超过 2。特别优选地，芳香杂环中 S 和 O 原子的总数不超过 1。杂芳基的实例包括但不限于：噁唑基、吡喃基、吡嗪基、吡唑并嘧啶基、吡唑基、哒嗪基 (pyridizynyl)、吡啶基、嘧啶基、吡咯基、喹啉基、四唑基、噻唑基、噻吩基吡唑基 (thienylpyrazolyl)、噻吩基、三唑基、苯并 [d] 噁唑基、苯并呋喃基、苯并噻唑基、苯并苯硫基、苯并噻二唑基、二氢苯并二氧杂环己炔基 (dihydrobenzodioxynyl)、呋喃基、咪唑基、吡啶基和异噻唑基。“杂芳基氧基”是通过氧桥与其所取代的基团相连的如所述的杂芳基。

[0057] 本文中使用的“异芬”是由一个或两个芳香环（通常为苯环）构成的基团，其中至少一个脂肪族桥在单个芳香环的两个非相邻位置之间或者在两个芳香环之间，所述至少一个脂肪族桥含有杂原子。所述脂肪族桥在间位或对位或间位、对位（在一个芳香环的间位以及在另一个芳香环的对位），并且含有 1 至 4 个原子，其中至少一个是杂原子，而余下的原子为碳原子。所述脂肪族桥任选地被氧代基团取代。

[0058] 本文中使用的“杂芬”是由一个或两个芳香环构成的基团，其中至少一个芳香环是杂芳基，其中至少一个脂肪族桥在单个芳香环之两个非相邻位置之间或者在两个芳香环之间。脂肪族桥在间位或对位或间位、对位（在一个芳香环的间位和另一个芳香环的对位），并且含有 1 至 4 个碳原子。所述脂肪族桥任选地被氧代基团取代。

[0059] 本文中使用的“杂-异芬”是由一个或两个芳香环构成的基团，其中至少一个芳香环是杂芳基，其中至少一个脂肪族桥在单个芳香环之两个非相邻位置之间或者在两个芳香环之间，所述至少一个脂肪族桥包含选自 N、O 或 S 的杂原子，以及一个脂肪族桥在单个芳香环之两个非相邻位置之间或者在两个芳香环之间，所述一个脂肪族桥不包含杂原子。脂肪族桥在间位或对位或间位、对位（在一个芳香环的间位和另一个芳香环的对位），并且含有 1 至 4 个原子，其中至少一个是杂原子，其余原子为碳原子。所述脂肪族桥任选地被氧代基团取代。

[0060] “烃基”是含有指定数目碳原子的饱和的或不饱和的脂肪族基团。“烃基”可以与其

他基团（例如氨基甲酸酯）联合使用，如在“单烃基氨基甲酸酯或二烃基氨基甲酸酯”中。单烃基氨基甲酸酯或二烃基氨基甲酸酯包括式（烷基₁）NH（C=O）O- 和（烷基₁）N（烷基₂）（C=O）O- 基团以及其中烷基之一或二者被含有不饱和碳碳键的烃基所替代的基团。

[0061] “金属茂”是由两个与金属中心相连的 5 或 6 元芳香碳环基团组成的化合物，其中所述金属是中性的或阳离子的。金属茂的实例包括但不限于二茂铁。

[0062] 术语“单烷基氨基和 / 或二烷基氨基”指仲烷基氨基或叔烷基氨基，其中所述烷基独立地选择的具有指定数目碳原子的如本文所定义的烷基。所述烷基氨基的连接点在氮上。单烷基氨基和二烷基氨基的实例包括乙氨基、二甲氨基和甲基 - 丙基 - 氨基。

[0063] “单烷基氨基甲酸酯和 / 或二烷基氨基甲酸酯”包括式（烷基₁）O（C=O）NH- 的单烷基氨基甲酸酯基团或式（烷基₁）O（C=O）N（烷基₂）- 的二烷基甲酰胺基团，其中单烷基甲酰胺或二烷基甲酰胺取代基与其所取代的分子的连接点是在氨基甲酸酯氨基的氮上。术语“单烷基氨基甲酸酯和 / 或二烷基氨基甲酸酯”还包括式（烷基₁）NH（C=O）O- 和（烷基₁）N（烷基₂）（C=O）O- 基团，其中所述氨基甲酸酯与其所取代的基团通过其非酮氧原子共价相连。基团烷基₁和烷基₂为独立地选择的烷基，其具有本公开内容给出的烷基定义并且具有指定数目的碳原子。

[0064] “单烷基甲酰胺和 / 或二烷基甲酰胺”指式（烷基₁）-NH-（C=O）- 的单烷基甲酰胺基团或式（烷基₁）（烷基₂）-N-（C=O）- 的二烷基甲酰胺基团，其中所述单烷基甲酰胺或二烷基甲酰胺取代基与其所取代之分子的连接点在羰基的碳上。术语“单烷基甲酰胺和 / 或二烷基甲酰胺”还包括式（烷基₁）（C=O）NH- 和（烷基₁）（C=O）（烷基₂）N- 基团，其中连接点是氮原子。所述基团烷基₁和烷基₂为独立地选择的具有指定数目碳原子的烷基。同样，“单烷基磺酰胺和 / 或二烷基磺酰胺”是式（烷基₁）-NH-（SO₂）- 的单烷基磺酰胺基团、式（烷基₁）-（SO₂）-NH- 的单烷基磺酰胺基团、式（烷基₁）（烷基₂）-N-（SO₂）- 的二烷基磺酰胺基团以及式（烷基₁）-（SO₂）-（烷基₂）N- 基团中的任一项。

[0065] “硫代烷基”是具有指定数目碳原子的与其所取代的基团通过硫桥（-S-）共价连接的如上文所定义的烷基。

[0066] 本文中使用的术语“取代”意指所指示的原子或基团上的任意一个或更多个氢被选择的指定基团所替代，前提是不超过所指示原子的正常价。当取代基是氧代基团（即，=O）时，则所述原子上的 2 个氢被替代。当氧代基团取代芳香性部分时，相应的部分不饱和的环替代所述芳香环。例如，被氧代基团取代的吡啶基是吡啶酮。取代基和 / 或变量的组合是允许的，只要这样的组合得到稳定的化合物或可用的合成中间体即可。稳定的化合物或稳定的结构意指化合物足够坚固从而能在反应混合物分离中保留下来，并随后被配制成有效的治疗剂。除非另外指明，否则根据核心结构来命名取代基。例如，应当理解，当氨基烷基被列为可能的取代基时，此取代基与核心结构的连接点在烷基部分。

[0067] 可存在于“取代”位置的合适基团包括但不限于例如卤素；氰基；羟基；硝基；叠氮基；烷酰基（如 C₂-C₆烷酰基）；甲酰胺；具有 1 至约 8 个碳原子或 1 至约 6 个碳原子的烷基（包括环烷基）；烯基和炔基（包括具有一个或更多个不饱和键以及 2 至约 8 个或 2 至约 6 个碳原子的基团）；具有一个或更多个氧连接以及 1 至约 8 个或 1 至约 6 个碳原子的烷氧基；芳氧基例如苯氧基；烷基硫基，包括具有一个或更多个硫醚键以及 1 至约 8 个碳原子或 1 至约 6 个碳原子的那些；烷基亚磺酰基，包括具有一个或更多个亚磺酰键以及 1 至约 8 个

碳原子或 1 至约 6 个碳原子的那些；烷基磺酰基，包括具有一个或更多个磺酰键以及 1 至约 8 个碳原子或 1 至约 6 个碳原子的那些；氨基烷基，包括具有一个或更多个 N 原子以及 1 至约 8 个或 1 至约 6 个碳原子的那些；具有 6 个或更多个碳以及一个或更多个环的芳基（例如苯基、联苯基、萘基等，每个环是取代或未取代的芳香环）；具有 1 至 3 个分开的或稠合的环以及 6 至约 18 个环碳原子的芳烷基，苄基是芳烷基的一个实例；具有 1 至 3 个分开的或稠合的环以及 6 至约 18 个环碳原子的芳基烷氧基，苄氧基是芳基烷氧基的一个实例；或者具有 1 至 3 个分开的或稠合的环的饱和、不饱和或芳香性杂环基，其每个环具有 3 至约 8 个成员以及一个或更多个 N、O 或 S 原子，例如香豆素基 (coumarinyl)、喹啉基、异喹啉基、喹唑啉基、吡啶基、吡嗪基、嘧啶基、呋喃基、吡咯基、噻吩基、噻唑基、三嗪基、咪唑基、异咪唑基、咪唑基、吡啶基、苯并呋喃基、苯并噻唑基、四氢呋喃基、四氢吡喃基、哌啶基、吗啉基、哌嗪基和吡咯烷基。这些杂环基团可被进一步取代，例如被羟基、烷基、烷氧基、卤素和氨基取代。

[0068] “剂型”意指活性剂的施用单元。剂型的实例包括片剂、胶囊剂、注射剂、混悬剂、液体剂、乳剂、乳膏、软膏、栓剂、可吸入形式、透皮形式等。

[0069] “药物组合物”是包含至少一种活性剂（例如式 I 化合物或盐）和至少一种另外的物质（例如载体）的组合物。药物组合物任选地包含一种或更多种另外的活性剂。当被指明时，药物组合物符合美国 FDA 对于人用药物或非人用药物的 GMP (good manufacturing practice, 药品生产质量管理规范) 标准。“药物组合”是至少两种活性剂的组合，根据所述活性剂待一起使用以治疗疾病（例如丙型肝炎）的说明书，所述至少两种活性剂可以在单个剂型中组合或者可以在分开的剂型中一起提供。

[0070] “可药用盐”包括所公开化合物的衍生物，其中通过制备母体化合物的无机和有机的无毒的酸加成盐或碱加成盐而对所述母体化合物进行修饰。本发明化合物的盐可通过常规的化学方法由含有碱性部分或酸性部分的母体化合物来合成。一般来说，这些盐可通过使游离酸形式的这些化合物与化学计量之量的合适的碱（例如 Na、Ca、Mg 或 K 的氢氧化物、碳酸盐、碳酸氢盐等）反应或通过使游离碱形式的这些化合物与化学计量之量的合适的酸反应来制备。这些反应通常在水或有机溶剂或二者的混合物中进行。一般来说，当适用时，非水性介质优选例如醚、乙酸乙酯、乙醇、异丙醇或乙腈。本发明化合物的盐还包括所述化合物的溶剂合物和所述化合物之盐的溶剂合物。

[0071] 可药用盐的实例包括但不限于碱性残基（例如胺）的矿物酸盐或有机酸盐；酸性残基（例如羧酸）的碱盐或有机盐等。可药用盐包括例如由无毒的无机酸或有机酸形成的母体化合物的常规无毒盐和季铵盐。例如，常规无毒的酸盐包括衍生自无机酸的那些，所述无机酸例如盐酸、氢溴酸、硫酸、氨基磺酸、磷酸、硝酸等；由例如以下的有机酸制备的盐：乙酸、丙酸、琥珀酸、乙醇酸、硬脂酸、乳酸、苹果酸、酒石酸、柠檬酸、抗坏血酸、双羟萘酸、马来酸、羟基马来酸、苯乙酸、谷氨酸、苯甲酸、水杨酸、甲磺酸、乙磺酸、苯磺酸、磺胺酸、2-乙酰氧基苯甲酸、富马酸、甲基苯磺酸、甲磺酸、乙烷二磺酸、草酸、羟基乙磺酸、 $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_n-\text{COOH}$ （其中 n 为 0 至 4）等。其他合适的盐的列表可见于例如 Remington's Pharmaceutical Sciences, 第 17 版, Mack Publishing Company, Easton, Pa., 第 1418 页 (1985)。

[0072] 用于本发明药物组合物 / 组合的术语“载体”指与活性化合物一起提供的稀释剂、

赋形剂或载剂。

[0073] “可药用赋形剂”意指可用于制备药物组合物 / 组合的赋形剂,其一般安全、无毒并且没有生物学或其他方面的不期望的作用,并且包含对于兽药用途和人药用途而言可接受的赋形剂。本申请中使用的“可药用赋形剂”包括一种和多于一种这样的赋形剂。

[0074] “患者”是需要医学治疗的人或非人动物。医学治疗可包括对现有病症(例如疾病或紊乱)的治疗、预防性或预先的治疗或者诊断性治疗。在一些实施方案中,所述患者是人患者。

[0075] “提供”指给予、施用、销售、分发、转移(盈利或非盈利)、制造、调剂(compounding)或分配。

[0076] “提供式 I 化合物与至少一种另外的活性剂”指式 I 化合物和另外的活性剂在单个剂型中同时提供、在分开的剂型中相继提供、或者在一定时间内相隔一段时间在分开的剂型中提供而施用,在所述一定时间内式 I 化合物和所述至少一种另外的活性剂都在患者血流之中。在某些实施方案中,式 I 化合物和所述另外的活性剂不需要由同一医疗看护人员给患者开处方。在某些实施方案中,所述另外的活性剂或试剂不需要要求开处方。可通过任何适宜途径(例如口服片剂、口服胶囊、口服液体、吸入剂、注射剂、栓剂或局部接触)进行施用式 I 化合物或所述至少一种另外的活性剂。

[0077] 本文中使用的“治疗”包括提供式 I 化合物作为唯一活性剂或者与至少一种另外的活性剂一起使得足以:(a) 预防疾病或疾病症状以免其在可能易于患该疾病但尚未诊断为患此病的患者中发生(例如包括可能与原发性疾病相关或由其导致的疾病,如在慢性 HCV 感染的情形中可导致的肝纤维化);(b) 抑制所述疾病,即阻止其发展;以及(c) 缓解所述疾病,即,使所述疾病消退。“治疗”还指向感染有丙型肝炎或易于感染丙型肝炎的患者提供治疗有效量的式 I 化合物(作为唯一活性剂或者与至少一种另外的活性剂一起)。

[0078] 本发明药物组合物和 / 或组合的“治疗有效量”指当施用给患者时有效提供治疗益处(例如缓解症状)的量,例如有效减少丙型肝炎感染症状的量。例如,感染丙型肝炎病毒的患者可表现出某些肝酶(包括 AST 和 ALT)水平的升高。正常的 AST 水平是每升血清(血液的液体部分)5 至 40 单位,正常的 ALT 水平是每升血清 7 至 56 单位。因此治疗有效量是足以使升高的 AST 和 ALT 水平显著降低的量,或者足以使 AST 和 ALT 水平返回到正常范围的量。治疗有效量还是足以预防患者血液、血清或组织中病毒或病毒抗体的可检测水平显著升高或显著降低的量。确定治疗功效的一种方法包括通过用于确定病毒 RNA 水平的常规方法(例如 Roche TaqMan 测定)来测量 HCV RNA 水平。在某些优选实施方案中,治疗将 HCV RNA 水平降至低于定量极限(30IU/mL,通过 Roche TaqMan(R) 测定测量),或者更优选降至低于检测极限(10IU/mL, Roche TaqMan)。

[0079] 病毒或病毒抗体可检测水平的显著升高或降低是在统计学显著性的标准参数检验(例如 t 检验,其中 $p < 0.05$) 中统计学上显著的任何可检测变化。

[0080] 化学描述

[0081] 式 I 和式 II(如下所示)包括其所有子式。在某些情况下,式 I 或式 II 化合物可含有一个或更多个不对称要素,例如立体中心、立体轴等(例如非对称碳原子),使得所述化合物可以以不同的立体异构形式存在。这些化合物可以是例如外消旋体或光学活性形式。对于具有两个或更多个不对称要素的化合物而言,这些化合物还可以是非对应体的混

合物。对于具有非对称中心的化合物而言,应理解涵盖了所有的光学异构体及其混合物。另外,具有碳-碳双键的化合物可以是 Z 型和 E 型,所述化合物的所有异构体形式均被包括在本发明中。在这些情况下,可以通过非对称合成、由光学纯的前体进行合成或者通过外消旋体的拆分来得到单个的对映体,即光学活性形式。外消旋体的拆分还可以例如通过常规方法来实现,所述常规方法例如在拆分试剂的存在下结晶,或使用例如手性 HPLC 柱来进行色谱方法。

[0082] 当化合物以多种互变异构体形式存在时,本发明不限于具体的互变异构体中的任一种,而是包括所有的互变异构形式。

[0083] 本发明旨在包括本发明化合物中所存在原子的所有同位素。同位素包括原子序数相同但质量数不同的那些原子。一般性举例(而不旨在限制)来说,氢的同位素包括氕和氘,碳的同位素包括 ^{11}C 、 ^{13}C 和 ^{14}C 。

[0084] 本文中使用的包含变量(例如 D、M、A、P、J 和 W)的通式来描述某些化合物。除非另有指明,否则该式中的每个变量均独立于其他变量而定义。因此,如果称某基团被取代,例如被 0 至 2 个 R^* 取代,则此基团可以被多至两个 R^* 基团取代,且 R^* 每次出现时都独立地选自 R^* 的定义。另外,只要取代基和/或变量的组合能得到稳定的化合物,这样的组合就是允许的。

[0085] 除在发明概述部分中讨论的式 I 化合物和盐以外,本公开内容还包括式 I 化合物和盐以及这些化合物的药物组合物/组合,其中所述变量满足任何下述条件。

[0086] (i) D-M-D 是以下的任一项:

[0087] $\text{T-R-J}^1\text{-W-A-W-J}^1\text{-R-T}$;

[0088] $\text{T-R-J}^1\text{-A-J}^1\text{-R-T}$;

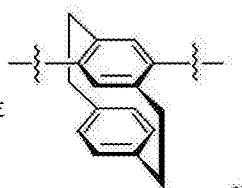
[0089] $\text{T-R-J}^2\text{-A-J}^2\text{-R-T}$;

[0090] $\text{T-R-J}^1\text{-W-A-J}^1\text{-R-T}$;

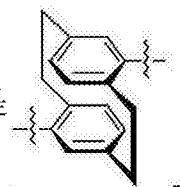
[0091] $\text{T-R-J}^1\text{-W-A-J}^2\text{-R-T}$ 以及

[0092] $\text{T-R-J}^1\text{-A-J}^2\text{-R-T}$ 。

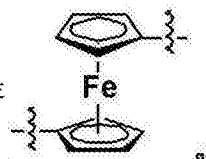
[0093] (ii) A 是

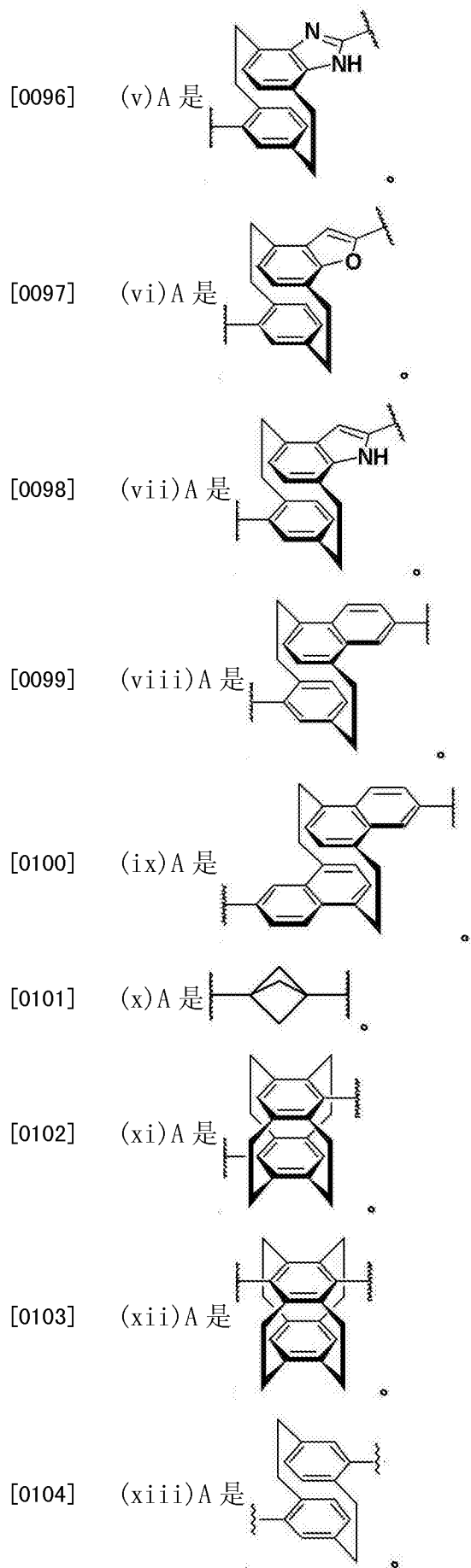


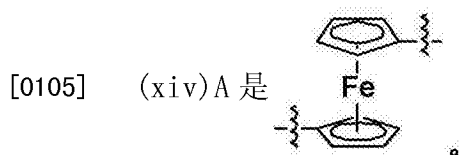
[0094] (iii) A 是



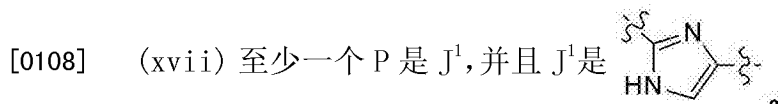
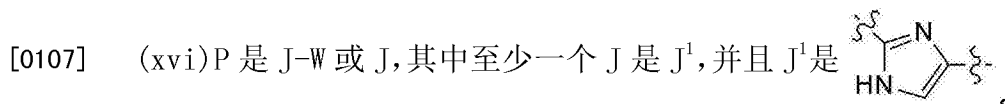
[0095] (iv) A 是







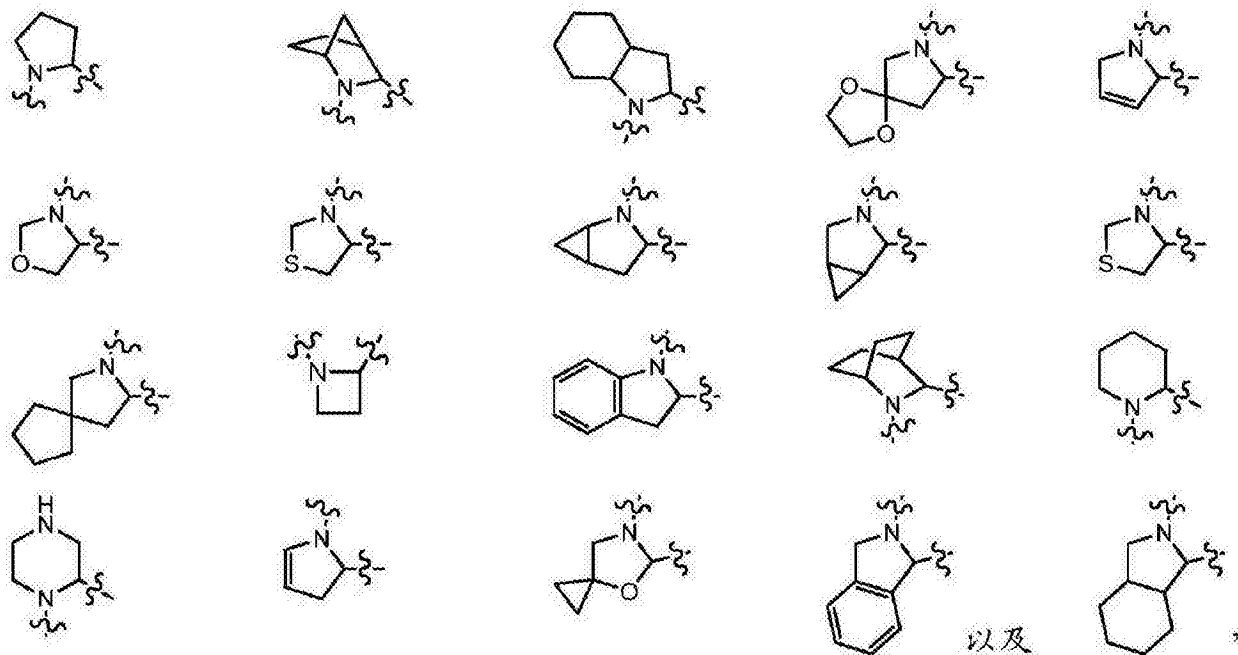
[0106] (xv) 至少一个 P 是 J^1 -W 并且 W 是苯基, 其任选地被一个或更多个独立地选自卤素、 C_1 - C_2 烷基和 C_1 - C_2 烷氧基的取代基所取代。



[0109] (xviii) 至少一个 P 是 J^2 并且 J^2 是苯并咪唑基, 其任选地被一个或更多个独立地选自卤素、 C_1 - C_2 烷基和 C_1 - C_2 烷氧基的取代基所取代。

[0110] (xix) R 独立地选自:

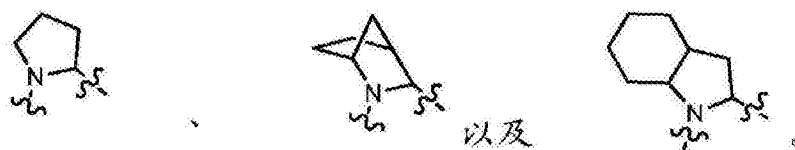
[0111]



[0112] 其中每一个任选地被一个或更多个独立地选自卤素、 C_1 - C_4 烷基和 C_1 - C_4 烷氧基的取代基所取代。

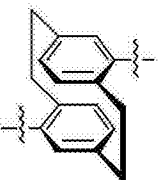
[0113] (xx) R 独立地选自

[0114]



[0115] (xxi) T 是独立地选择的被单 C_1 - C_6 烷基氨基甲酸酯和二 C_1 - C_6 烷基氨基甲酸酯取代的 C_2 - C_6 烷酰基, 其中在每种情况下 T 任选地被 (C_1 - C_4 硫代烷基) C_0 - C_4 烷基取代。

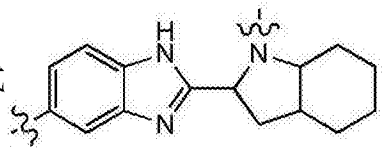
[0116] (xxii) 还包括式 T-R- J^2 -A- J^2 -R-T 的化合物和盐。

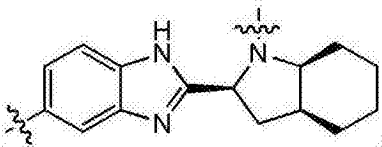
[0117] 在式 T-R-J²-A-J²-R-T 中, A 是式  基团。

[0118] J²是含有 1 或 2 个独立地选自 N、O 和 S 的杂原子的 8 至 10 元杂芳基, 其中 J²任选地被一个或多个独立地选自以下的取代基所取代: 氨基、氰基、羟基、卤素、C₁-C₄烷基、C₁-C₄烷氧基、单 C₁-C₄烷基氨基和二 C₁-C₄烷基氨基、C₁-C₂卤代烷基以及 C₁-C₂卤代烷氧基。

[0119] 每个 R 是独立地选择的 8 至 10 元双环体系, 其含有一个或两个氮原子, 其余环原子为碳, 所述 8 至 10 元双环是饱和的或者含有 1 个不饱和键; 并且 R 任选地被一个或多个独立地选自以下的取代基所取代: 氰基、羟基、卤素、C₁-C₂烷基、C₁-C₂烷氧基、C₁-C₂卤代烷基、C₁-C₂卤代烷基、C₁-C₂卤代亚烷基以及 C₁-C₂烷基磺酰基。

[0120] T²在每次出现时独立地选自: C₂-C₆烷酰基、C₁-C₆烷基酯、C₁-C₆烯基酯、C₁-C₆烷基磺酰胺、C₁-C₆烷基磺酰基、被单 C₁-C₆烃基氨基甲酸酯或二 C₁-C₆烃基氨基甲酸酯取代的 C₂-C₆烷酰基、被脲或单 C₁-C₆烷基脲或二 C₁-C₆烷基脲取代的 C₂-C₆烷酰基、以及被单 C₁-C₆烷基甲酰胺或二 C₁-C₆烷基甲酰胺取代的 C₂-C₆烷酰基, 其中在每种情况下 T²任选地被一个或多个独立地选自以下的取代基所取代: 氨基、氰基、羟基、卤素、(C₁-C₄烷氧基)C₀-C₄烷基、(单 C₁-C₄烷基氨基和二 C₁-C₄烷基氨基)C₀-C₄烷基、C₁-C₆烷基、(C₁-C₄硫代烷基)C₀-C₄烷基、C₃-C₇环烷基、苯基、C₁-C₂卤代烷基以及 C₁-C₂卤代烷氧基。

[0121] 在 xxii 的某些实施方案中, 优选地 -J²-R- 是式  或更特

别地  基团。-J²-R- 可以被一个或多个独立地选自以下的取代

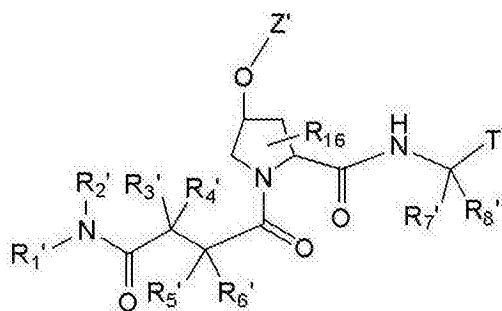
基所取代或未被取代: 氨基、氰基、羟基、卤素、C₁-C₄烷基、C₁-C₄烷氧基、单 C₁-C₄烷基氨基和二 C₁-C₄烷基氨基、C₁-C₂卤代烷基以及 C₁-C₂卤代烷氧基。

[0122] 在 xxii 的某些实施方案中, 还优选 T²是被单 C₁-C₆烃基氨基甲酸酯或二 C₁-C₆烃基氨基甲酸酯取代的 C₂-C₆烷酰基, 其中 T²任选地被一个或多个独立地选自以下的取代基所取代: 氨基、氰基、羟基、卤素、(C₁-C₄烷氧基)C₀-C₄烷基、(单 C₁-C₄烷基氨基和二 C₁-C₄烷基氨基)C₀-C₄烷基、C₁-C₆烷基、(C₁-C₄硫代烷基)C₀-C₄烷基、C₃-C₇环烷基、苯基、C₁-C₂卤代烷基以及 C₁-C₂卤代烷氧基。

[0123] 式 I 化合物的任何前述条件可以一起使用以定义式 I 的子式, 只要得到稳定的化合物即可。所有这样的子式均包括在本公开内容之内。

[0124] 除在发明概述部分讨论的式 I 化合物和盐以外, 本公开内容还包括式 I 和式 II 的组合物和组合, 其中式 II 是:

[0125]



式 II。

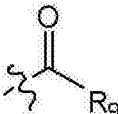
[0126] 在式 II 中, 变量 R_1' 、 R_2' 、 R_3' 、 R_4' 、 R_6' 、 R_7' 、 R_8' 、 R_{16} 和 T' 具有下文所述的定义。

[0127] R_1' 和 R_2' 相连以形成含有 1 或 2 个独立地选自 N、O 和 S 的杂原子的 5 至 7 元杂环烷基环, 该环任选地与苯基或 5 或 6 元杂芳基稠合以形成双环体系, 其中每一个 5 至 7 元杂环烷基环或双环体系任选地被取代。

[0128] 变量 R_3' 至 R_8' 满足下述条件之一。 R_3' 、 R_4' 、 R_5' 和 R_6' 独立地为氢、 C_1 - C_4 烷基或 (C_3 - C_7 环烷基) C_0 - C_4 烷基; 并且 R_7' 和 R_8' 相连以形成任选地被取代的 3 至 7 元环烷基环。

[0129] R_3' 、 R_4' 和 R_6' 独立地为氢、 C_1 - C_4 烷基或 (C_3 - C_7 环烷基) C_0 - C_4 烷基; 并且 R_8' 是氢或 C_1 - C_4 烷基; 并且 R_5' 与 R_7' 通过 C_6 - C_{10} 饱和的或不饱和的烃链相连。

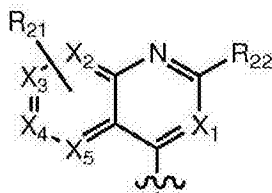
[0130] R_3' 、 R_4' 和 R_6' 独立地为氢、 C_1 - C_4 烷基或 (C_3 - C_7 环烷基) C_0 - C_4 烷基; 并且 R_7' 和 R_8' 相连以形成任选地被取代的 3 至 7 元环烷基环; 并且 R_5' 与由 R_7 和 R_8 通过 C_6 - C_{10} 饱和的、部分不饱和的或不饱和的烃链形成的 3 至 7 元任选地被取代的环烷基环相连。

[0131] T' 是式  基团。

[0132] R_9 是羟基、氨基、 $-COOH$ 、 $-NR_{10}R_{11}$ 、 $-OR_{12}$ 、 $-SR_{12}$ 、 $-NR_{10}(S=O)R_{11}$ 或 $-NR_{10}SO_2R_{11}$ 。 R_{10} 、 R_{11} 和 R_{12} 在每次出现时独立地为氢或 C_1 - C_6 烷基、 C_2 - C_6 烯基、(芳基) C_0 - C_2 烷基、(C_3 - C_7 环烷基) C_0 - C_2 烷基、(杂环烷基) C_0 - C_2 烷基或 (5 至 10 元杂芳基) C_0 - C_2 烷基, 其中每一个任选地被 1 至 3 个独立地选自卤素、羟基、氧代基团、 C_1 - C_2 烷基、 C_1 - C_2 烷氧基、三氟甲基和三氟甲氧基的取代基所取代。

[0133] Z' 是

[0134]



[0135] 其中 X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 和 X_5 独立地为 N 或 CH, 并且 X_1 至 X_5 中为 N 的不超过两个。

[0136] R_{21} 表示 0 至 3 个独立地选自以下的基团: 卤素、羟基、氨基、氰基、 $-CONH_2$ 、 $-COOH$ 、 C_1 - C_4 烷基、 C_2 - C_4 烷酰基、 C_1 - C_4 烷氧基、 C_1 - C_4 烷基硫基、单 C_1 - C_4 烷基氨基和二 C_1 - C_4 烷基氨基、 C_1 - C_2 卤代烷基和 C_1 - C_2 卤代烷氧基。

[0137] R_{22} 是氢、卤素、羟基、氨基、氰基、 $-CONH_2$ 、 $-COOH$ 、 C_1 - C_4 烷基、 C_2 - C_4 烷酰基、 C_1 - C_4 烷氧基、 C_1 - C_4 烷基硫基、单 C_1 - C_4 烷基氨基和二 C_1 - C_4 烷基氨基、 C_1 - C_4 烷基酯、 C_1 - C_2 卤代烷基

以及 C_1-C_2 卤代烷氧基 ; 或者 R_{22} 是 $(C_3-C_7$ 环烷基) C_0-C_2 烷基、(苯基) C_0-C_2 烷基、(苯基) C_0-C_2 烷氧基、(5 或 6 元杂芳基) C_0-C_2 烷基、(5 或 6 元杂芳基) C_0-C_2 烷氧基、萘基、茚满基、(5 或 6 元杂环烷基) C_0-C_2 烷基、或者 9 或 10 元双环杂芳基, 其中每一个被 0、1 或 2 个独立地选自以下的取代基所取代:

[0138] (i) 卤素、羟基、氨基、氰基、硝基、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $CH_3(C=O)NH-$ 、 C_1-C_4 烷基、 C_1-C_4 烷氧基、 C_1-C_4 羟基烷基、单 C_1-C_4 烷基氨基和二 C_1-C_4 烷基氨基、 $-NR_8SO_2R_{11}$ 、 $-C(O)OR_{11}$ 、 $-NR_8COR_{11}$ 、 $-NR_8C(O)OR_{11}$ 、三氟甲基、三氟甲氧基, 以及

[0139] (ii) 苯基和 5 或 6 元杂芳基, 其中每一个被卤素、羟基、 C_1-C_4 烷基以及 C_1-C_2 烷氧基中的 0 或 1 或更多个所取代; 其中 R_8 是氢、 C_1-C_4 烷基或 C_3-C_6 环烷基, R_{11} 如上文所定义。

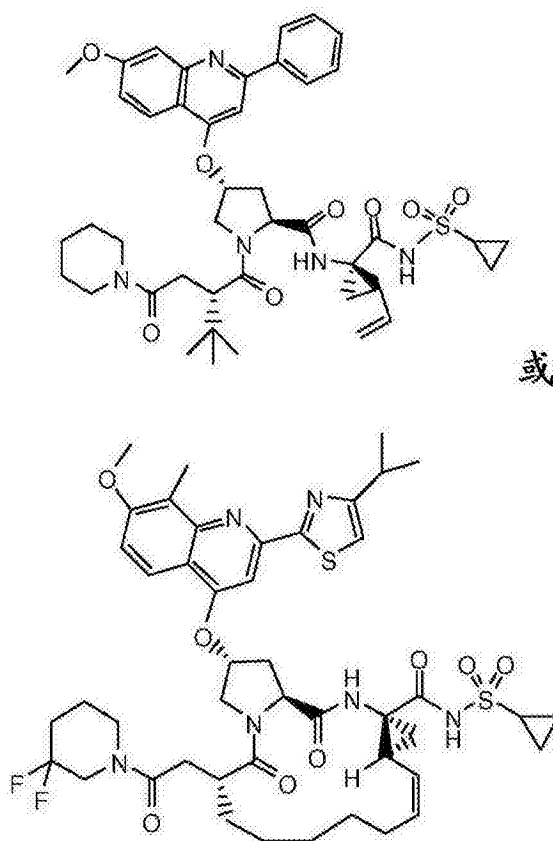
[0140] R_{16} 表示 0 至 4 个独立地选自卤素、 C_1-C_2 烷基和 C_1-C_2 烷氧基的取代基。

[0141] 式 I 化合物的任何前述条件可以一起使用以定义式 I 的子式, 只要得到稳定的化合物即可, 并且所有这些子式都包括在本公开内容之内。

[0142] 本公开内容还包括包含式 I 化合物和式 II 化合物的药物组合物和组合, 以及治疗方法, 该方法包括向感染有丙型肝炎的患者施用这样的组合物 / 组合。

[0143] 例如, 本公开内容包括其中式 II 化合物如下的组合物和组合:

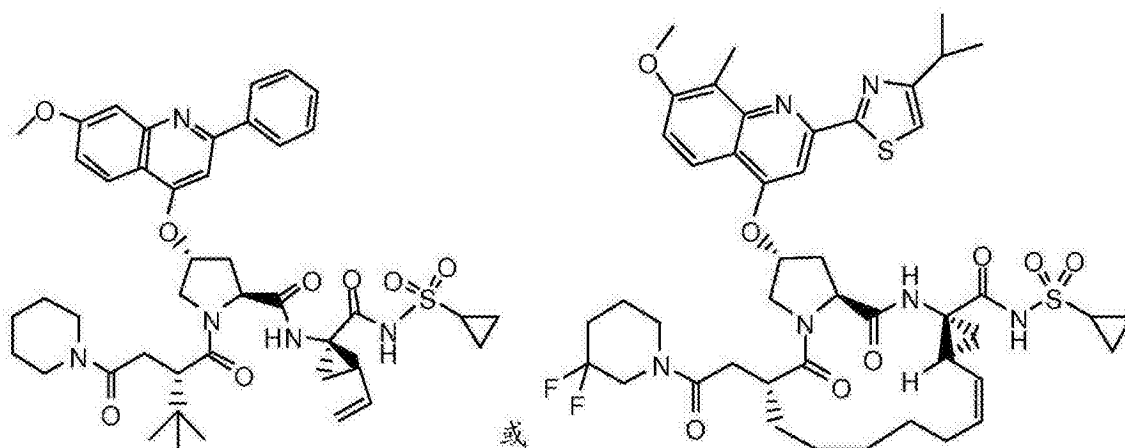
[0144]



[0145] 本公开内容还包括包含式 I 化合物和式 II 化合物的药物组合物和组合, 以及治疗方法, 该方法包括向感染有丙型肝炎的患者施用这样的组合物 / 组合。

[0146] 例如, 本公开内容包括其中式 II 化合物如下的组合物和组合:

[0147]



[0148] 可用于本文所述药物组合物和组合的式 II 的 NS3a 蛋白酶抑制剂在之前已有公开。2011 年 3 月 15 日发布的美国专利 No. 7, 906, 619 因其关于 4- 氨基 -4- 氧代丁酰基肽的教导而通过引用整体并入本文。在实施例部分特别地通过引用并入了 ‘619 专利 (从第 50 栏 (column) 至第 85 栏), 其公开了可与本文所述式 I 化合物用于组合物 / 组合的化合物。

[0149] 2010 年 8 月 26 日公开的美国公开专利申请 No. 2010-0216725 因其关于 4- 氨基 -4- 氧代丁酰基肽的教导而通过引用整体并入本文。在实施例部分特别地通过引用并入了 ‘725 申请 (从第 22 页至第 100 页), 其公开了可与本文所述式 I 化合物用于组合物 / 组合的化合物。

[0150] 2010 年 6 月 17 日公开的美国公开专利申请 No. 2010-0152103 因其关于 4- 氨基 -4- 氧代丁酰基肽环类似物的教导而通过引用整体并入本文。在实施例部分特别地通过引用并入了 ‘103 申请 (从第 19 页至第 60 页), 其公开了可与本文所述式 I 化合物用于组合物 / 组合的化合物。

[0151] 药物制剂

[0152] 本文公开的化合物可作为纯化合物施用, 但是优选作为药物组合物施用。因此, 本公开内容提供了包含式 I 化合物或其可药用盐以及至少一种可药用载体的药物组合物。所述药物组合物 / 组合可包含式 I 化合物或盐作为唯一的活性剂, 但优选地包含至少一种另外的活性剂。在某些实施方案中, 优选所述另外的活性剂是 NS3a 蛋白酶抑制剂, 例如式 II 化合物的盐。在某些实施方案中, 所述药物组合物为在单位剂型中包含以下的剂型: 约 0.1mg 至约 2000mg、约 10mg 至约 1000mg、约 100mg 至约 800mg 或约 200mg 至约 600mg 的式 I 化合物以及任选的约 0.1mg 至约 2000mg、约 10mg 至约 1000mg、约 100mg 至约 800mg 或约 200mg 至约 600mg 的另外的活性剂。所述药物组合物还可包含摩尔比的式 I 化合物与另外的活性剂。例如, 所述药物组合物可包含摩尔比为约 0.5 : 1、约 1 : 1、约 2 : 1、约 3 : 1 或约 1.5 : 1 至约 4 : 1 的式 II NS3a 蛋白酶抑制剂与式 I NS5a 抑制剂。

[0153] 本文公开的化合物可以以含有常规可药用载体的剂量单位制剂通过口服、局部、肠胃外、吸入或喷雾、舌下、经皮、通过口腔施用、经直肠、作为眼用溶液或以其他方式施用。所述药物组合物可配制成任意药学上可用的形式, 例如气雾剂、乳膏剂、凝胶剂、丸剂、胶囊剂、片剂、糖浆剂、经皮贴剂或眼用溶液剂。一些剂型 (例如片剂和胶囊剂) 可被分为含有合适量 (例如达到所期望目的的有效量) 活性成分的合适大小的单位剂量。

[0154] 载体包括赋形剂和稀释剂,并且必须具有足够高的纯度和足够低的毒性,以使得它们适于施用给所治疗的患者。载体可以是惰性的或其本身可具有药学益处。与所述化合物联合使用的载体的量足以提供用于施用每单位剂量化合物的材料的实际量。

[0155] 载体的类别包括但不限于粘合剂、缓冲剂、着色剂、稀释剂、崩解剂、乳化剂、调味剂、助流剂、润滑剂、防腐剂、稳定剂、表面活性剂、压片剂和润湿剂。一些载体可列在一个以上的类别中,例如植物油在一些制剂中可用作润滑剂,在另外一些制剂中则可用作稀释剂。示例性的可药用载体包括糖、淀粉、纤维素、西黄蓍胶粉、麦芽、明胶、滑石和植物油。基本上不干扰本发明化合物活性的任选的活性剂可包含在药物组合物中。

[0156] 所述药物组合物/组合可配制用于口服施用。这些组合物包含 0.1 重量%至 99 重量%(wt%)的式 I 化合物,通常为至少约 5wt%的式 I 化合物。一些实施方案包含约 25wt%至约 50wt%或者约 5wt%至约 75wt%的式 I 化合物。

[0157] 治疗方法

[0158] 本文公开的药物组合物/组合可用于治疗患者的丙型肝炎感染。

[0159] 本公开内容提供了通过向感染有丙型肝炎病毒的患者提供有效量的式 I 化合物或可药用盐来治疗病毒感染(包括丙型肝炎感染)的方法。式 I 化合物或盐可作为唯一活性剂提供或者可以与一种或更多种另外的活性剂一起提供。在某些实施方案中,式 I 化合物或盐与式 II 化合物或盐或者其他 NS3a 蛋白酶抑制剂一起施用。在某些实施方案中,所述药物组合物包含式 I 化合物和 NS5b 抑制剂,以及任选地包含另外的活性剂。

[0160] 本发明药物组合物/组合的有效量可以是足以实现以下的量:(a) 抑制丙型肝炎的进程;(b) 使丙型肝炎感染消退,或(c) 将丙型肝炎感染治愈,从而使得先前受感染患者的血液或血浆中不再能检测到 HCV 病毒或 HCV 抗体。有效抑制丙型肝炎进程或导致丙型肝炎消退的药物组合物/组合的量包括有效停止丙型肝炎症状恶化或减少感染有丙型肝炎病毒之患者所经历症状的量。或者,丙型肝炎发展的中止或消退可以通过此疾病的数种标志物中的任一项来指示。例如,患者血液中丙型肝炎病毒载量增加或减少的缺乏或者循环 HCV 抗体数量增加或减少的缺乏是丙型肝炎感染进程中中止或消退的标志。其他丙型肝炎疾病标志物包括转氨酶水平,特别是肝酶 AST 和 ALT 的水平。正常的 AST 水平是每升血清(血液的液体部分)5 至 40 单位,正常 ALT 水平是每升血清 7 至 56 单位。这些水平通常在 HCV 感染患者中较高。AST 和 ALT 水平返回正常范围通常标志着疾病的消退。

[0161] 可被有效量的本发明药物组合物/组合影响的丙型肝炎症状包括:肝功能降低、疲劳、流感样症状(发热、打冷战、肌痛、关节痛和头痛)、恶心、厌恶某些食物、原因不明的体重减轻、心理疾病(包括抑郁)、腹部压痛和黄疸。

[0162] “肝功能”指肝的正常功能,包括但不限于:合成功能,包括蛋白质例如血清蛋白(例如白蛋白、凝血因子(clotting factor)、碱性磷酸酶、转氨酶(如丙氨酸转氨酶、天冬氨酸转氨酶)、5'-核苷酶、 γ 谷氨酰胺转肽酶等)的合成、胆红素的合成、胆固醇的合成和胆汁酸的合成;肝代谢功能,包括碳水化合物代谢、氨基酸和氮代谢、激素代谢和脂质代谢;对外源性药物的解毒;以及血液动力学功能,包括内脏血液动力学和门脉血液动力学(portal hemodynamic)。

[0163] 有效量的本文所述组合物/组合还会在以浓度施用给患者时提供足够浓度的活性剂。活性剂的足够浓度是预防或对抗感染所必需的患者体内的药剂浓度。该量可以通过

实验来确定,例如通过测定所述药剂的血液浓度,或者在理论上通过计算生物利用度来确定。可以使用用于病毒感染的常规测定(例如基于复制子的测定,其在文献中已有描述)来确定足以体外抑制病毒感染的活性剂的量。

[0164] 本文包括药物组合物/组合以及其中提供式 I 化合物或盐和一种或更多种另外的活性剂的治疗方法。在一些优选实施方案中,式 I 化合物与 NS3a 蛋白酶抑制剂一起提供,根据一起使用式 I 化合物和另外的活性剂的对于患者的说明书以单独的药物组合物或者以分开的剂型提供。式 II 化合物和美国专利 No. 7,906,619、美国专利申请 No. 2010-0216725 以及美国专利申请 No. 2010-0152103 中公开的化合物(其中大多数在式 II 的范围内)是用于与式 I 化合物和盐组合的合适的 NS3a 蛋白酶抑制剂。在某些实施方案中,所述活性剂(或药剂)是 HCV 蛋白酶抑制剂或 HCV 聚合酶抑制剂。例如,所述蛋白酶抑制剂可以是特拉匹韦(telaprevir)(VX-950),所述聚合酶抑制剂可以是瓦洛他滨(valopicitabine)或 NM107(瓦洛他滨在体内转变成的活性剂)。在某些实施方案中,至少一种另外的活性剂是利巴韦林、干扰素或 PEG-干扰素 α 缀合物。在某些实施方案中,所述至少一种另外的活性剂是 ACH-1625 或 ACH-2684。

[0165] 根据本发明的方法,式 I 化合物或可药用盐和至少一种另外的活性剂可以:(1) 在组合制剂中共同配制并且同时施用或递送;(2) 作为分开的制剂交替递送或平行递送;或者(3) 通过本领域已知的任何其他组合疗法方案。当在交替疗法中递送时,本发明的方法可包括依次施用或递送式 I 化合物或盐以及另外的活性剂,例如在分开的溶液剂、乳剂、混悬剂、片剂、丸剂或胶囊剂中,或者通过在分开的注射器中的不同注射剂。一般来说,在交替疗法期间,依次(即,连续)施用有效量的每种活性成分,而在同时治疗中,一起施用有效剂量的两种或更多种活性成分。也可以使用多种次序的间歇式组合疗法。

[0166] 本公开内容提供了治疗方法和包含本文所述式 I 化合物或可药用盐与作为另外的活性剂的下述化合物和物质中的任意一种或组合的药物组合:

[0167] 抗纤维化剂:IP-501(InterMune);

[0168] 胱天蛋白酶(caspase)抑制剂:IDN-6556(Idun Pharmaceuticals)和 GS-9450(Gilead);

[0169] 亲环素(cyclophilin)抑制剂:NIM811(Novartis)、SCY-635(Scynexis)和 DEBIO-025(Debiopharm);

[0170] 细胞色素 P450 单加氧酶抑制剂:利托那韦、酮康唑、醋竹桃霉素(troleandomycin)、4-甲基吡唑、环孢菌素、氯美噻唑、西咪替丁、伊曲康唑、氟康唑、咪康唑、氟伏沙明、氟西汀、奈法唑酮、舍曲林、茚地那韦、蔡非那韦、安普那韦、福沙那韦、沙奎那韦、洛匹那韦、地拉韦啉、红霉素、VX-944 和 VX-497(美泊地布(Merimebodib))。优选的 CYP 抑制剂包括利托那韦、酮康唑、醋竹桃霉素、4-甲基吡唑、环孢菌素和氯美噻唑;

[0171] 糖皮质激素:氢化可的松、可的松、泼尼松、泼尼松龙、甲基泼尼松龙、曲安西龙、帕拉米松、倍他米松和地塞米松;

[0172] HCV 蛋白酶抑制剂:例如 ACH-1625 和 ACH-2684。美国专利号 7,906,619 因其关于抗-HCV 化合物的教导而并入本文。美国专利申请 No. 12/635,270 的第 52 至 167 页和美国专利申请 No. 12/635,049 的第 43 至 92 页因其关于抗-HCV 化合物的教导而通过引用并入本文,ACH1625 和 ACH2684(Achillion)、ABT-450(Abbott)、ACL-181 以及 AVL-192(Avila)、

BI-335 (Boehringer Ingelheim)、BMS-032 (Bristol Meyers Squibb)、boceprevir (Merck)、TMC-435、MK-7152 (Merck)、GS-9256 (Gilead)、GS-9451 (Gilead)、R7227 (Intermune)、VX-500 (Vertex)、VX-950 (特拉匹韦、Vertex)、VX-985 (Vertex)、TMC-435 (Tibotec)、GW-433908 (安普那韦的前药, Glaxo/Vertex)、茚地那韦 (CRXIVAN, Merck)、ITMN-191 (Intermune/Array Biopharma)、BILN2061 (Boehringer-Ingelheim)、TMC435350 (Tibotec/Medivir)、BI201335 (Boehringer Ingelheim)、PHX-1766 (Phenomix)、MK-7009 (Merck)、那拉匹韦 (narlaprevir) (SCH900518, Schering) ;

[0173] 促红细胞生成素:促红细胞生成素-1和促红细胞生成素-2。促红细胞生成素超家族的其他成员例如多种集落刺激因子 (例如, (例如 G-CSF、GM-CSF、M-CSF)、Epo 和 SCF (干细胞因子) ;

[0174] 顺势疗法 (Homeopathic Therapy):乳蓟 (milk thistle)、水飞蓟素 (silymarin)、人参、甘草甜素、甘草根 (licorice root)、五味子 (schisandra)、维生素 C、维生素 E、 β -胡萝卜素和硒 ;

[0175] 免疫调节化合物:沙利度胺 (thalidomide) ;IL-2 ;促红细胞生成素 ;IMPDH 抑制剂,例如美泊地布 (Merimepodib) (Vertex Pharmaceuticals Inc.) ;干扰素,包括天然干扰素 (例如 OMNIFERON, Viragen 和 SUMIFERON, Sumitomo,天然干扰素的混合物)、天然干扰素 α (ALFERON, Hemispherx Biopharma, Inc.)、来自淋巴母细胞 (lymphblastoid cell) 的干扰素 α n1 (WELLFERON, Glaxo Wellcome)、口服 α 干扰素、Peg-干扰素、Peg-干扰素 α 2a (PEGASYS, Roche)、重组干扰素 α 2a (ROFERON, Roche)、吸入干扰素 α 2b (AERX, Aradigm)、Peg-干扰素 α 2b (ALBUFERON, Human Genome Sciences/Novartis ;PEGINTRON, Schering)、重组干扰素 α 2b (INTRON A, Schering)、peg 化干扰素 α 2b (PEG-INTRON, Schering ;VIRAFERONPEG, Schering)、干扰素 β -1a (REBIF, Ares-Serono, Inc. 和 Pfizer)、复合干扰素 α (consensus interferon alpha) (INFERGEN, Intermune)、干扰素 γ -1b (ACTIMMUNE, Intermune, Inc.)、非 peg 化干扰素 α 、 α 干扰素及其类似物、合成胸腺素 α 1 (ZADAXIN, SciClone Pharmaceuticals Inc.)、以及 λ 干扰素 (lambda interferon) (BMS) ;

[0176] 免疫抑制剂:西罗莫司 (RAPAMUNE, Wyeth) ;

[0177] 白细胞介素: (IL-1、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-11、IL-12)、LIF、TGF- β 、TNF- α) 以及其他低分子量因子 (例如, AcSDKP、pEEDCK、胸腺激素和微小细胞因子 (minicytokine)) ;

[0178] 干扰素增强剂:EMZ702 (Transition Therapeutics) ;

[0179] IRES 抑制剂:VGX-410C (VGX Pharma) ;

[0180] 单克隆和多克隆抗体:XTL-6865 (HEPX-C, XTL)、HuMax-HepC (Genmab)、丙型肝炎免疫球蛋白 (人) (CIVACIR, Nabi Biopharmceuticals)、XTL-002 (XTL)、利妥昔单抗 (Rituximab) (RITUXAN, Genentech/IDEC) ;

[0181] 核苷类似物:IDX-184 (Idenix)、PSI-7977 和 PSI-938 (Pharmasset)、INX-189 (Inhibitex)、R7128 (Roche)、R7348 (Roche)、GS-6620 (Gilead)、TMC-649 (Tibotec)、拉米夫定 (EPIVIR, 3TC, GlaxoSmithKline)、MK-0608 (Merck)、扎西他滨 (HIVID, Roche US Pharmaceuticals)、利巴韦林 (包括 COPEGUS (Roche)、REBETOL (Schering)、VILONA (ICN

Pharmaceuticals, 和 VIRAZOLE (ICN Pharmaceuticals)、艾沙托立宾 (isatoribine) (Anadys Pharmaceuticals)、ANA971 (Anadys Pharmaceuticals)、ANA245 (Anadys Pharmaceuticals) 以及 viramidine (ICN) (利巴韦林的脒前药)。还可以使用核苷类似物的组合;

[0182] 非核苷抑制剂: PSI-6130 (Roche/Pharmasset)、ABT-333 和 ABT-072 (Abbott)、地拉韦定 (delaviridine) (RESCRIPTOR, Pfizer)、PF-868554 (Pfizer)、GSK-852 (GlaxoSmith Kline)、IDX-325 (Idenix)、ANA-598 (Anadys)、VX-222 和 VX-759 (Vertex)、MK-3281 (Merck)、BI-127 (Boehringer Ingelheim)、BMS-325 (Bristol Meyers) 以及 HCV-796 (Viropharm);

[0183] NS4a 抑制剂: 例如 ACH-1095。美国专利申请 No. US2007/0004711 因其关于 HCV 抑制剂的教导而通过引用整体并入本文, 并且美国专利申请 No. 12/125, 554 的第 45 至 90 页因其关于 HCV 抑制剂的教导而通过引用并入本文;

[0184] NS4b 抑制剂: 克立咪唑 (Arrow Therapeutics);

[0185] NS5a 抑制剂: A-382 (Arrow Therapeutics)、BMS-790052 (BMS);

[0186] NS5b 抑制剂: INX-181、IDX-375、MK-3281、PSI-7977、PSI-7851、PSI-938、RG-919 0、VX-222 (Vertex) 和 BMS-791325 (Bristol Meyers Squibb);

[0187] P7 蛋白抑制剂: 金刚烷胺 (SYMMETREL, Endo Pharmaceuticals, Inc.);

[0188] 聚合酶抑制剂: 非利布韦 (Filibuvir) (PF-00868554, Pfizer)、NM283 (瓦洛他滨 (valopicitabine)) (Idenix)、JTK003 (AKROS Pharma)、HCV-796 (ViroPharma/Wyeth)、IDX184 (Idenix)、VCH-916 (Vertex)、R7128 (PSI6130, Roche)、R1626 (Roche)、MK-3281 (Merck)、PSI-7851 (Pharmasset)、ANA598 (Anadys)、BI207127 (Boehringer-Ingelheim)、GS9190 (Gilead);

[0189] RNA 干扰: SIRNA-034RNAi (Sirna Therapeutics) 和 ISI14803 (Isis Pharmaceutical/Elan);

[0190] 治疗性疫苗: IC41 (InterCell)、IMN-0101 (Imnogenetics)、GI5005 (GlobeImmune)、Chronvac-C (Tripep/Inovio)、ED-002 (Imnogenetics)、Hepavaxx C (ViRex Medical);

[0191] TNF 激动剂: 阿达木单抗 (HUMIRA, Abbott)、依那西普 (etanercept) (ENBREL, Amgen 和 Wyeth)、英夫利昔 (infliximab) (REMICADE, Centocor, Inc.);

[0192] 微管蛋白抑制剂: 秋水仙素;

[0193] 鞘氨醇-1-磷酸受体调节剂: FTY720 (Novartis);

[0194] TLR 激动剂: ANA-975 (Anadys Pharmaceuticals)、TLR7 激动剂 (Anadys Pharmaceuticals)、CPG10101 (Coley) 以及 TLR9 激动剂包括 CPG7909 (Coley);

[0195] 疫苗: HCV/MF59 (Chiron)、IC41 (InterCell)、E-1 (Innogenetics)。

[0196] 接受丙型肝炎药物治疗的患者通常被给予干扰素和另一种活性剂。因此, 作为实施方案包括了如下的治疗方法和药物组合, 其中本发明化合物与作为所述另外的活性剂的干扰素 (如 peg 化干扰素 α 2a) 一起提供。类似地, 本文提供了其中利巴韦林是另外的活性剂的方法和药物组合。

[0197] 本文包括抑制 HCV 体内复制的方法, 其包括向感染有 HCV 的患者提供式 I 化合物或可药用盐, 所述式 I 化合物或盐的浓度足以抑制 HCV 复制子在体外复制。在这种情况下, 所述浓度包括体内浓度, 例如血液或血浆浓度。可以由复制子复制的测定 (例如本文实施

例 9 中所提供的测定) 来确定足以抑制 HCV 复制子在体外复制的化合物浓度。

[0198] 治疗方法包括向患者提供某些剂量的式 I 化合物或可药用盐。每种活性剂的约 0.1mg 至约 140mg/kg 体重 / 天的剂量水平可用于治疗上述病症 (约 0.5mg 至约 7g/ 患者 / 天)。可与载体材料组合以产生单个单位剂型的活性成分的量将根据受治疗的患者和特定施用方式而改变。在某些实施方案中, 每天向患者提供约 0.1mg 至约 2000mg、约 10mg 至约 1500mg、约 100mg 至约 1000mg、约 200mg 至约 800mg 或约 300mg 至约 600mg 的式 I 化合物和任选的约 0.1mg 至约 2000mg、约 10mg 至约 1500mg、约 100mg 至约 1000mg、约 200mg 至约 800mg、或约 300 至约 600mg 的另外的活性剂化合物 (例如 NS3a 蛋白酶抑制剂, 例如式 II 化合物)。优选每个单位剂型包含总计小于 1200mg 的活性剂。给药频率也可以根据所使用的化合物和所治疗的特定疾病而改变。但是, 就大多数感染性疾病的治疗而言, 优选每天 4 次或更少的给药方案, 并且特别优选每天 1 次或 2 次的给药方案。

[0199] 但是, 应理解, 就任何特定患者而言的特定剂量水平将取决于多种因素, 包括所采用的特定化合物的活性、年龄、体重、一般健康、性别、饮食、施用时间、施用途径和排泄速率、药物组合以及经历治疗的患者特定疾病的严重程度。

[0200] 经包装的制剂

[0201] 本文包括这样的方法, 所述方法包括提供容器中的式 I 化合物或盐和用于使用所述化合物来治疗患有丙型肝炎感染之患者的说明书。

[0202] 本文还包括经包装的药物组合物 / 组合。这样的包装的组合包括容器中的式 I 化合物和用于使用所述组合来治疗或预防患者的病毒感染 (例如丙型肝炎感染) 的说明书。

[0203] 所述经包装的药物组合物 / 组合可以包含一种或更多种另外的活性剂。在某些实施方案中, 所述另外的活性剂是 NS3a 蛋白酶抑制剂, 例如式 II 化合物。

[0204] 所述经包装的药物组合可以包含式 I 化合物或可药用盐和另外的活性剂, 其同时以单个剂型提供、伴随地以分开的剂型提供或者用于间隔一定时间 (在式 I 化合物和另外的活性剂存在于患者血流内的时间内) 分开施用的分开剂型提供。

[0205] 所述经包装的药物组合可以包含在容器中提供的式 I 化合物或可药用盐和在同一或不同容器中提供的另外的活性剂, 以及用于使用所述组合来治疗患者之 HCV 感染的说明书。

实施例

[0206] 缩写

[0207] 下述反应方案和合成实施例使用如下缩写。该列表不旨在为本申请中所使用的缩写的详尽列表, 这是因为所述合成方案和实施例中还可使用另外的标准缩写, 这些标准缩写是有机合成领域技术人员所易于理解的。

[0208]

Ac	乙酰基
ACN	乙腈
aq	水性
BOC	叔丁氧基羰基
DCM	二氯甲烷
DIEA	<i>N,N</i> -二异丙基乙胺
DIPEA	<i>N,N</i> -二异丙基乙胺
DME	1,2-二甲氧基乙烷
DMF	<i>N,N</i> -二甲基甲酰胺

[0209]

dppf	1,1'-双(二苯基膦基)二茂铁
EDCI	<i>N</i> -(3-二甲基氨基丙基)- <i>N'</i> -乙基碳二亚胺盐酸盐
Et	乙基
Et ₂ O	乙醚
FCC	快速柱色谱
HATU	<i>O</i> -(7-氮杂苯并三唑-1-基)- <i>N,N,N',N'</i> -四甲基脲六氟磷酸盐
MTBE	甲基叔丁基醚
PTLC	制备型薄层色谱
rt	室温
TEA	三乙胺
TFA	三氟乙酸
THF	四氢呋喃
TPP	三苯基膦

[0210] 一般考虑

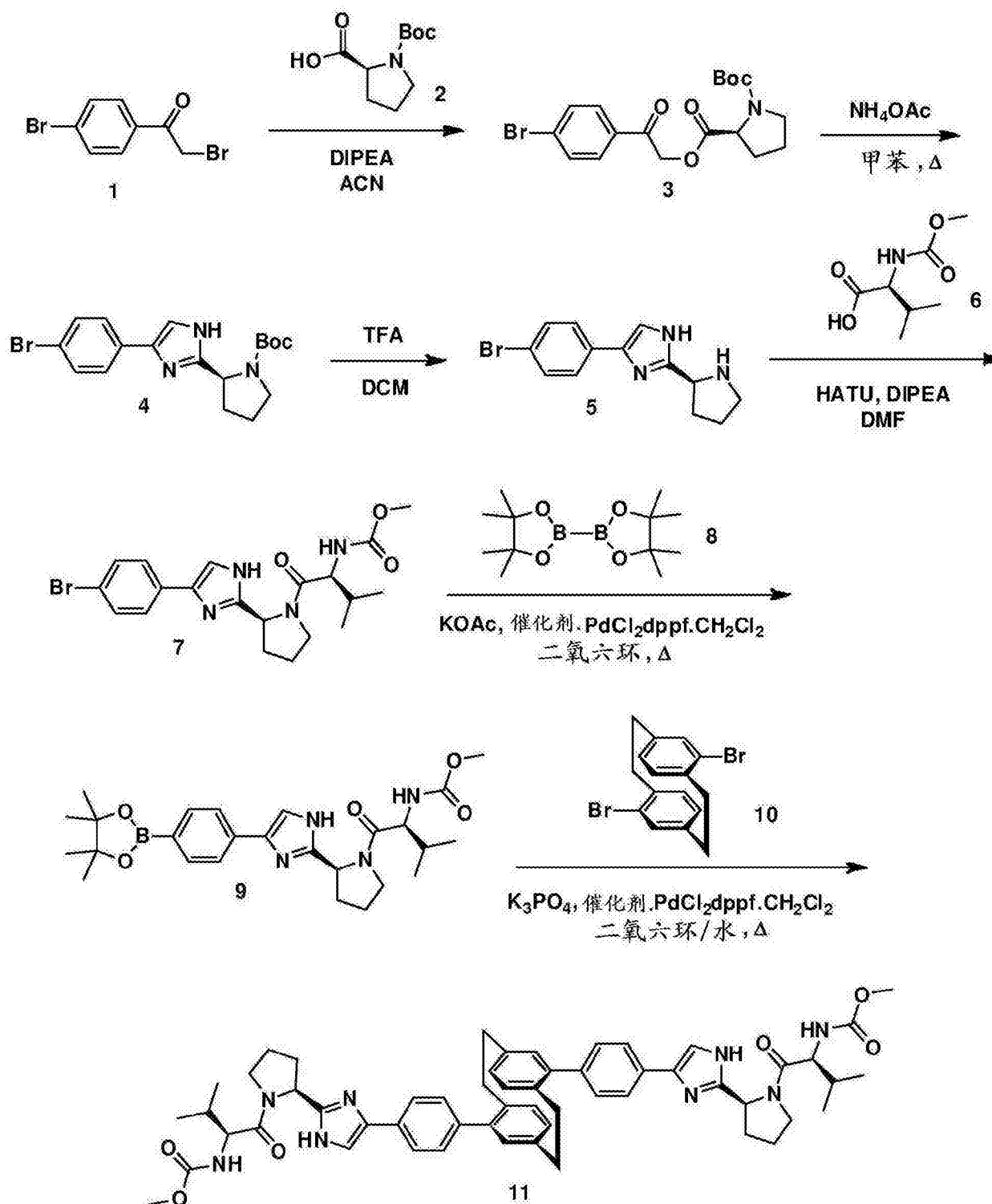
[0211] 所有非水性反应均在干燥氩气氛下使用经烘箱干燥的玻璃器具和无水溶剂进行。使用下述两种 HPLC 方法之一确定反应进程和目标化合物的纯度：(1) Waters AQUITY UPLC BEH C18 1.7 μ m 2.1 $\times$ 50mm 柱，以 90 : 10 水 : 乙腈 (含 0.05% 甲酸) 等度洗脱 0.24 分钟，接着以 1.0ml/ 分钟的流速进行 4.26 分钟的线性梯度洗脱 (从 90 : 10 至 10 : 90)，并进

行 UV(PDA)、ELS 和 MS(APCI 模式中的 SQ) 检测(方法 1);和 (2)Waters AQUITY UPLC BEH C18 1.7 μ m 2.1 $\times$ 50mm 柱,以 95 : 5 水 : 乙腈(含 0.05%甲酸)等度洗脱 0.31 分钟,接着以 0.4mL/ 分钟的流速进行 17.47 分钟的线性梯度洗脱(95 : 5 至 5 : 95),并进行 UV(PDA)、ELS 和 MS(APCI 模式中的 SQ) 检测(方法 2)。

[0212] 通过制备型反相 HPLC 来纯化目标化合物,所述制备型反相 HPLC 使用 YMC Pack Pro C18 5 μ m 150 $\times$ 20mm 柱,以 95 : 5 水 : 乙腈(含 0.1%三氟乙酸)等度洗脱 0.35 分钟,接着以 18.9mL/ 分钟的流速进行 23.3 分钟的线性梯度洗脱(95 : 5 至 5 : 95),并进行基于 UV 和质量的级分收集。

[0213] 一般合成方案

[0214]



[0215] 实施例 1. 化合物 10 的合成

[0216] 如之前所述 (Reich, H. J. ;Cram, D. J. J. Am. Chem. Soc. 1969,91,3527-3533 ; Reich, H. J. ;Cram, D. J. J. Am. Chem. Soc. 1969,91,3534-3543), 通过 [2. 2] 对环芬的溴化制备化合物 10。化合物 1、2、6、8 和 10 可获自商业来源。化合物 3 至 7 以及 9 使用本领域中已知的一般合成方法来制备。

[0217] 实施例 2. 化合物 11 的合成

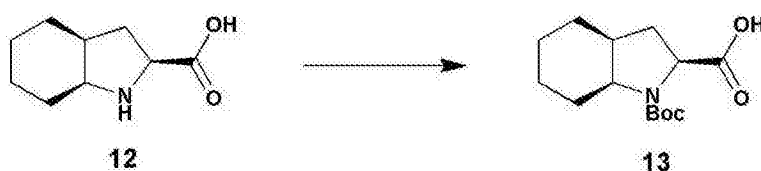
[0218] 将二氧六环 / 水 (5. 5. mL/0. 55mL) 中的 9 (284. 2mg)、10 (52. 3mg)、 K_3PO_4 (248. 1mg)

和 $\text{PdCl}_2\text{dppf} \cdot \text{CH}_2\text{Cl}_2$ (7.4mg) 的去氧 (氩) 混合物在微波中于 80°C 照射 2 小时。在减压下蒸发所得混合物,用 DCM 萃取剩余的固体。通过 PTLC (20cm $\times$ 20cm $\times$ 2000 μm 玻璃板;用 45 : 50 : 5v/v/v DCM : EtOAc : MeOH 洗脱, R_f 0.28) 纯化该粗制材料,以得到 75.3mg 的 11。通过分析型反相 HPLC 确定 11 的纯度,所述分析型反相 HPLC 在 Waters AQUITY UPLC BEH C18 1.7 μm 2.1 $\times$ 50mm 柱上使用水中增加浓度的 ACN (10% 至 90%) (含 0.05% 甲酸) 以 1.0mL/ 分钟的流速进行 3.5 分钟的梯度洗脱,进行 UV (PDA)、ELS 和 MS (APCI 模式中的 SQ) 检测。HPLC : t_R 1.57 分钟 (98% 纯度)。MS m/z 计算值 : $\text{C}_{56}\text{H}_{64}\text{N}_8\text{O}_6$ ($[\text{M}]^+$), 945 ; 实测值 : 946 ($[\text{M}+1]^+$)。

[0219] 实施例 3. ((2S,2' S)-((2S,2' S,3aS,3a' S,7aS,7a' S)-2,2' -(5,5' -(三环 [8.2.2.2^{4,7}] 十六-4,6,10,12,13,15-己烯-5,11-二基)双(1H-苯并[d]咪唑-5,2-二基))双(八氢-1H-吡啶-2,1-二基))双(3-甲基-1-氧代丁烷-2,1-二基))二氨基甲酸二甲酯 (20) 的合成

[0220] 步骤 1

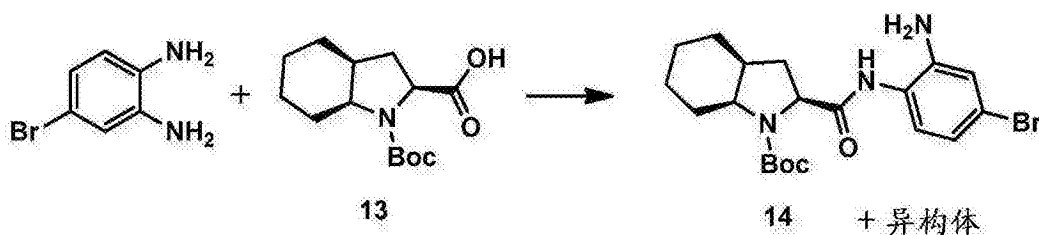
[0221]



[0222] 在 0°C 下,向 (2R,3aS,7aS)-八氢-1H-吡啶-2-羧酸 (250g, 1.0 当量) (12) 的 THF (3L) 和水 (1.5L) 搅拌溶液中逐滴添加冷却的 2.5M NaOH 水溶液 (1L)。在相同的温度下将反应混合物搅拌 15 分钟。然后,逐滴添加二碳酸二叔丁酯 (1.3 当量),将温度保持在 0°C 。将所得反应混合物在室温下搅拌 12 小时。用 MTBE 洗涤反应混合物 (3 次)。用 1M 柠檬酸水溶液酸化水相,并用乙酸乙酯萃取 (3 次)。经硫酸钠干燥合并的有机层,并浓缩至干以得到 (2R,3aS,7aS)-1-(叔丁氧基羰基)八氢-1H-吡啶-2-羧酸 (368g) (13)。

[0223] 步骤 2

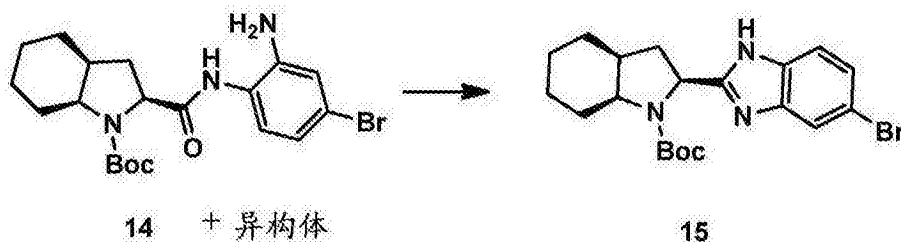
[0224]



[0225] 在 0°C 下,向 4-溴-1,2-二氨基苯 (23.1g, 1.2 当量)、(2R,3aS,7aS)-1-(叔丁氧基羰基)八氢-1H-吡啶-2-羧酸 (26.9g, 1.0 当量) 13 和 EDCI (23.6g, 1.2 当量) 的 ACN (600mL) 搅拌溶液中逐滴添加 DIEA (21.5mL, 1.3 当量)。完成添加之后,将反应混合物再搅拌 1 小时。添加水 (1.2L),将反应混合物搅拌过夜。收集固体粉末 (14),用水洗涤,并干燥用于接下来的步骤而无需进一步纯化 (39.1g)。

[0226] 步骤 3

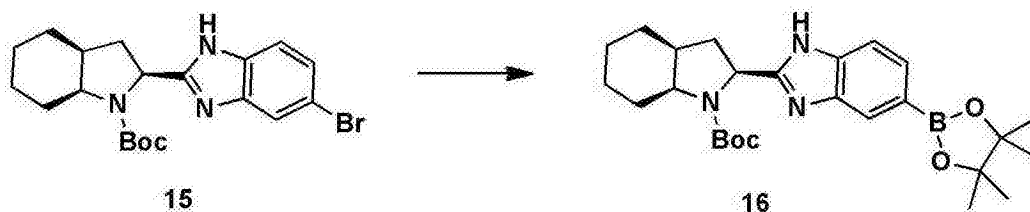
[0227]



[0228] 将 (2S,3aS,7aS)-2-((2-氨基-4-溴苯基)氨基甲酰基)八氢-1H-吡啶-1-羧酸叔丁酯和 (2S,3aS,7aS)-2-((2-氨基-5-溴苯基)氨基甲酰基)八氢-1H-吡啶-1-羧酸叔丁酯 (160g, 0.36mol) 的异构体混合物 (14) 溶解于乙酸 (480mL) 中, 在 65℃ 下搅拌反应混合物直至原料耗尽 (如通过 LC-MS 分析判断的)。将反应冷却至室温, 并在真空下除去溶剂。将剩余的残余物溶解于乙酸乙酯 (500mL) 中, 并小心添加氨水 (100mL)。再添加水 (100mL), 分离有机层并收集。用乙酸乙酯 (2×300mL) 萃取水相。用水 (200mL)、接着用盐水 (200mL) 洗涤合并的有机相, 经 MgSO_4 干燥。浓缩溶液, 并通过硅胶柱色谱 (己烷 / 乙酸乙酯) 纯化剩余的残余物, 以得到 (2S,3aS,7aS)-2-(6-溴-1H-苯并[d]咪唑-2-基)八氢-1H-吡啶-1-羧酸叔丁酯 (15) (140g)。

[0229] 步骤 4

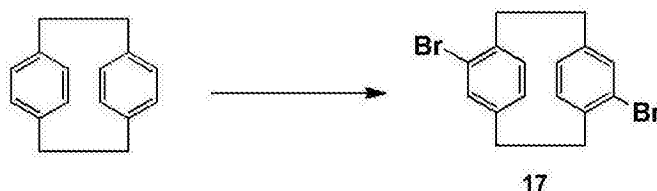
[0230]



[0231] 在氩气氛下, 将无水 1,4-二氧六环 (300mL) 中 (2S,3aS,7aS)-2-(6-溴-1H-苯并[d]咪唑-2-基)八氢-1H-吡啶-1-羧酸叔丁酯 (15) (30g, 1.0 当量)、双(频哪醇基)二硼烷 (27.2g, 1.5 当量)、醋酸钾 (21g, 3.0 当量) 和 Pd(dppf)Cl_2 (5.7g, 0.098 当量) 的混合物在 80℃ 至 90℃ 加热约 4 小时 (直至如通过 LC-MS 判断的反应完成)。用乙酸乙酯 (300mL) 稀释冷却的 (室温) 反应混合物, 与活性炭 (60g) 搅拌 1 小时, 并通过硅藻土垫过滤。在减压下浓缩滤液, 并通过硅胶柱色谱 (己烷 / 乙酸乙酯, 5 : 1 → 1 : 2v/v) 纯化所得棕色泡沫, 以得到作为灰白色固体的 (2S,3aS,7aS)-2-(6-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)八氢-1H-吡啶-1-羧酸叔丁酯 (16)。

[0232] 步骤 5

[0233]



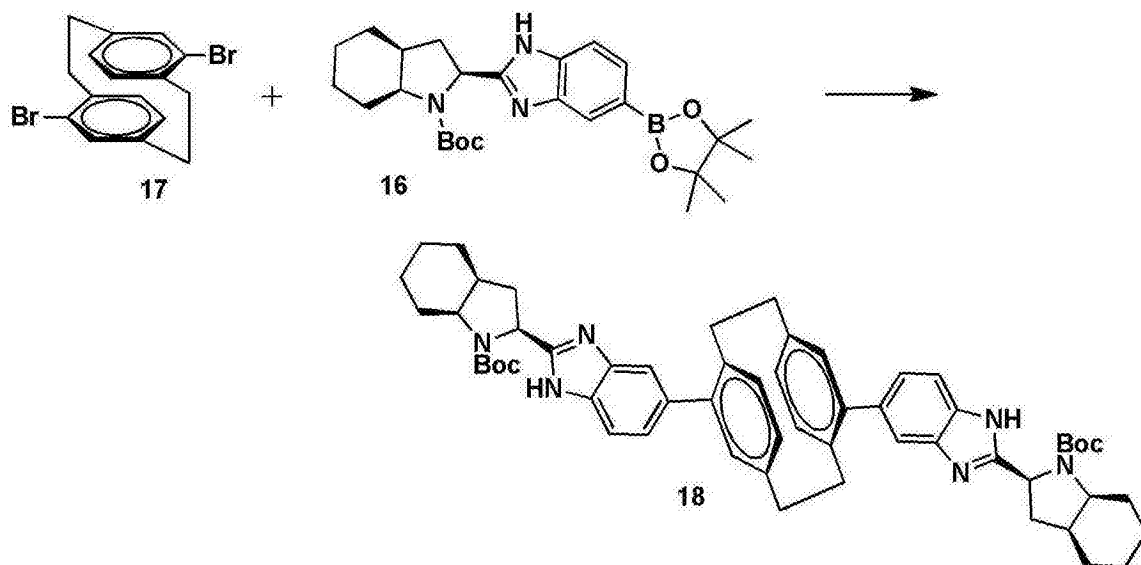
[0234] 将 DCM (1.6L) 中 Br_2 (82.8g) 和铁粉 (4.6g) 的混合物在室温下搅拌 1 小时。向该混合物中添加一部分 [2.2] 对环芬 (200g, 1.0 当量) 的 DCM 浆液。将所得混合物加热至回流, 并向其中经 3 小时的时间缓慢添加 Br_2 (228g) 的 DCM (400mL) 溶液。完成添加之后, 使继续回流 3 小时的反应混合物冷却至室温, 同时搅拌过夜, 然后用 5% w/v $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 水溶液 (2L)

和水 (2L) 洗涤, 经 MgSO_4 干燥, 并蒸发至干。将分离的粗制固体溶解于热的甲苯 (1.2L, 约 100°C) 中, 使其在搅拌中缓慢冷却过夜至室温, 并进一步冷却至 5°C , 保持 3 小时。收集所得固体, 并用冷的甲苯 (约 100mL) 洗涤以提供 4,16-二溴 [2.2] 对环芬 (17) (83g)。

[0235] ^1H NMR (300MHz, CDCl_3 , rt): δ 2.79–3.00 (m, 4H), 3.10–3.21 (m, 2H), 3.44–3.54 (m, 2H), 6.44 (d, $J = 8.0\text{Hz}$, 2H), 6.51 (d, $J = 2.0\text{Hz}$, 2H), 7.14 (dd, $J = 8.0\text{Hz}$, 2.0Hz , 2H)。

[0236] 步骤 6

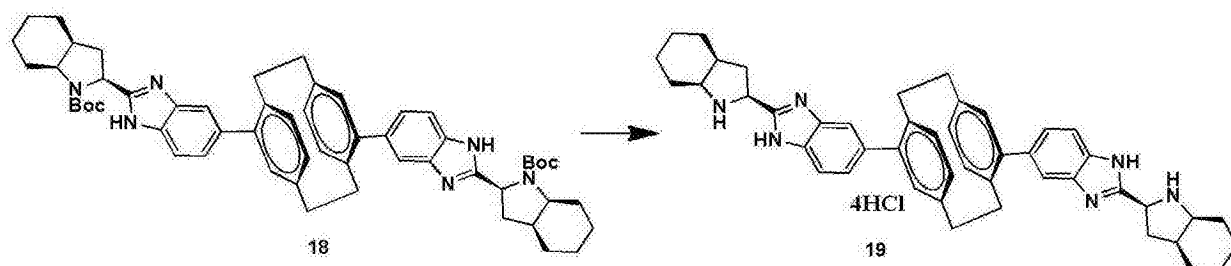
[0237]



[0238] 在氩气氛下, 将 4,16-二溴 [2.2] 对环芬 (17) (20g, 1.0 当量)、(2S,3aS,7aS)-2-(6-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)八氢-1H-吡啶-1-羧酸叔丁酯 (64g, 2.5 当量)、 Cs_2CO_3 (16) (44.5g, 2.5 当量)、 $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (3.16g, 0.05 当量)、DMF (500mL) 和水 (25mL) 的混合物在 130°C 下加热约 2 至 3 小时 (直至如通过 LC-MS 判断的反应完成)。将反应混合物冷却至室温, 并经用硅藻土分层的硅胶垫 (30g) 过滤。用 DMF ($2 \times 50\text{mL}$) 洗涤该垫, 并将合并的滤液添加到搅拌的水 (2.5L) 中, 以得到浅黄色沉淀。通过过滤收集固体, 用水 (1L) 和 ACN (500mL) 洗涤, 并溶解在 DCM (250mL) 与 MeOH (25mL) 的混合物中。向该溶液中添加 ACN (250mL), 以产生良好浆液, 然后在减压下于 30°C 至 35°C 浓缩, 以除去约 150mL 的溶剂。再添加一部分 ACN (500mL), 在减压下于 40°C 至 45°C 除去其他溶剂 (约 100mL)。通过过滤收集固体, 并在真空中干燥以得到作为浅黄色粉末的 (2S,2' S,3aS,3a' S,7aS,7a' S)-2,2'-(5,5'-(三环[8.2.2.2^{4,7}]十六-4,6,10,12,13,15-己烯-5,11-二基)双(1H-苯并[d]咪唑-5,2-二基))双(八氢-1H-吡啶-1-羧酸二叔丁酯 (33.8g)。

[0239] 步骤 7

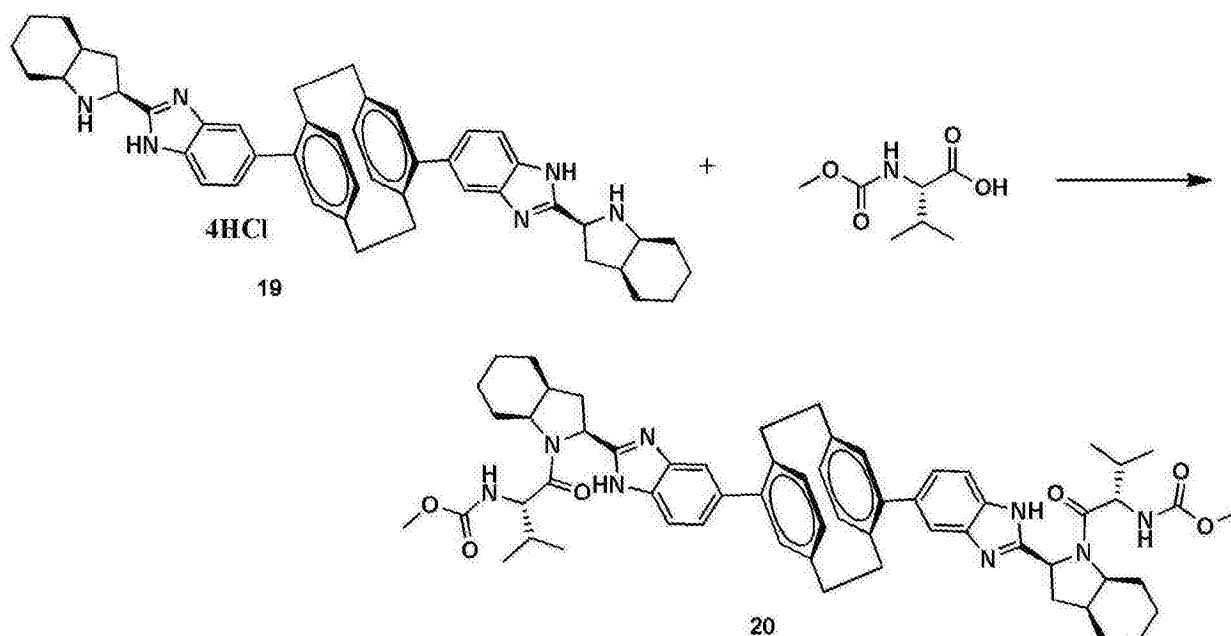
[0240]



[0241] 向 (2S,2' S,3aS,3a' S,7aS,7a' S)-2,2' -(5,5' -(三环 [8.2.2.2^{4,7}] 十六-4,6,10,12,13,15-己烯-5,11-二基)双(1H-苯并[d]咪唑-5,2-二基))双(八氢-1H-吡咯-1-羧酸二叔丁酯 (18) (20.33g, 1.0 当量) 的 DCM/MeOH (4/1v/v, 200mL) 冷却 (0℃) 溶液中添加 4N HCl/二氧六环溶液 (100mL)。将反应混合物在室温下搅拌 30 分钟,并在减压下浓缩以得到浅黄色粉末 (19) (21.7g)。在真空下干燥所得固体,直至通过 ¹H NMR 谱分析检测不到残余 MeOH。该彻底干燥的材料在接下来的步骤中直接使用。

[0242] 步骤 8

[0243]



[0244] 在室温下,向 (S)-2-((甲氧基羰基)氨基)-3-甲基丁酸 (10g, 2.3 当量)、一水合 HOBt (8.8g, 2.3 当量) 和 ACN (50mL) 的混合物中添加 EDCI (11.14g, 2.3 当量)。搅拌 5 分钟之后,将该活化的酸混合物添加到上述盐酸盐 (19) (21.7g) 和 DIEA (32mL, 7.2 当量) 的 DMF (250mL) 溶液中。在室温下搅拌该反应混合物直至如通过 LC-MS 分析判断的反应完成 (约 4 小时),然后在搅拌下倒入水 (1.2L) 中。通过过滤收集沉淀,在 ACN/水 (4 : 1v/v, 500mL) 中搅拌过夜,再次通过过滤收集,并在真空中干燥以得到 ((2S,2' S)-((2S,2' S,3aS,3a' S,7aS,7a' S)-2,2' -(5,5' -(三环 [8.2.2.2^{4,7}] 十六-4,6,10,12,13,15-己烯-5,11-二基)双(1H-苯并[d]咪唑-5,2-二基))双(八氢-1H-吡咯-2,1-二基))双(3-甲基-1-氧代丁烷-2,1-二基))二氨基甲酸二甲酯 (20) (22.62g)。

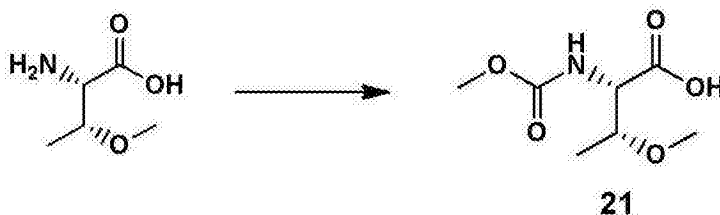
[0245] ¹H NMR (300MHz, DMSO-d₆, 120℃) : δ 0.87 (d, J = 6.5Hz, 6H), 0.92 (d, J = 6.5Hz, 6H), 1.20-1.60 (m, 6H), 1.65-2.10 (m, 12H), 2.31 (m, 2H), 2.38-2.52 (m, 2H), 2.54-2.76 (m,

4H), 2.85 (m, 2H), 3.07 (m, 2H), 3.45 (m, 2H), 3.57 (br s, 6H), 4.07 (t, $J = 8.0\text{Hz}$, 2H), 4.34 (m, 2H), 5.28 (t, $J = 8.5\text{Hz}$, 2H), 6.51 (br, 2H), 6.57 (d, $J = 8.0\text{Hz}$, 2H), 6.73 (s, 2H), 6.76 (d, $J = 8.0\text{Hz}$, 2H), 7.33 (d, $J = 8.5\text{Hz}$, 2H), 7.64 (d, $J = 8.5\text{Hz}$, 2H), 7.72 (s, 2H).

[0246] 实施例 4. ((2S, 2' S, 3R, 3' R)-((2S, 2' S, 3aS, 3a' S, 7aS, 7a' S)-2, 2' -(5, 5' -(三环 [8.2.2.2^{4,7}] 十六-4,6,10,12,13,15-己烯-5,11-二基) 双(1H-苯并[d]咪唑-5,2-二基)) 双(八氢-1H-吡啶-2,1-二基)) 双(3-甲氧基-1-氧代丁烷-2,1-二基)) 二氨基甲酸二甲酯 (22) 的合成

[0247] 步骤 1

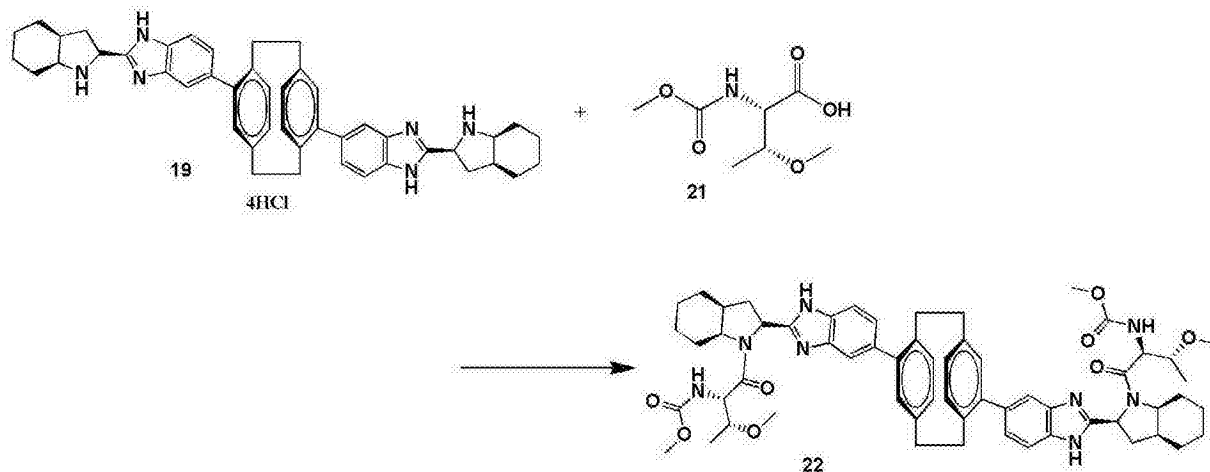
[0248]



[0249] 将 O-甲基-L-苏氨酸 (25g, 0.19mol) 溶解于 1,4-二氧六环 (125mL) 中, 并冷却至 0℃。然后在相同的温度下向反应混合物中添加 2M NaOH (22.5g, 0.56mol, 3 当量) 水溶液之后添加氯甲酸甲酯 (17.4mL, 0.22mol, 1.2 当量)。将反应混合物升温至室温并搅拌 16 小时。用乙酸乙酯 (500mL) 洗涤反应混合物。用 3N HCl (高至 pH2) 酸化水层, 并用乙酸乙酯 (3×250mL) 萃取。经 Na₂SO₄ 干燥合并的有机层, 并浓缩以得到粗产物 (23g)。向粗产物中添加乙酸乙酯 (46mL), 并在 80℃ 加热以得到澄清溶液。然后将该溶液冷却至 0℃。过滤所得固体并干燥以得到期望的纯产物 (21) (18.75g)。

[0250] 步骤 2

[0251]



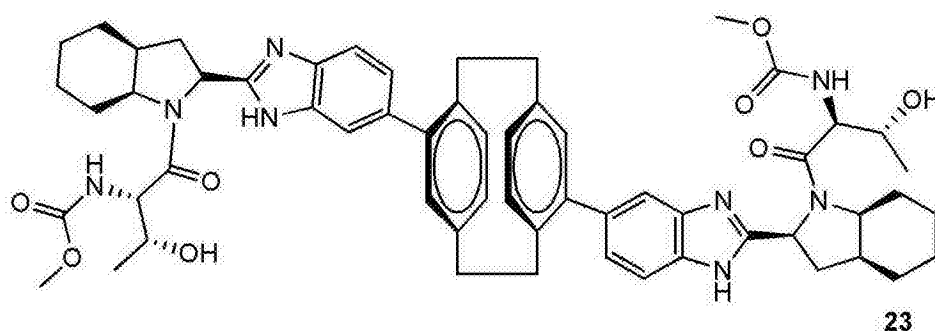
[0252] 在 0℃ 下, 向 DMF (160mL) 中的上述盐酸盐 (32.0g, 0.0384mol)、Moc-O-甲基-L-苏氨酸 (18.3g, 0.0960mol) 和 HATU (36.5g, 0.09604mol) 的混合物中逐滴添加 DIEA (32.8mL, 0.192mol)。将反应混合物升温至室温, 搅拌 16 小时, 并倒入水 (1.6L) 中。通过过滤收集所得固体, 并溶解于 DCM (500mL) 中。将该溶液用水 (100mL)、盐水 (50mL) 洗涤, 经硫酸钠干燥, 并在减压下浓缩。通过硅胶柱色谱纯化残余物, 以得到 ((2S, 2' S, 3R, 3' R)-((2S, 2' S, 3aS, 3a' S, 7aS, 7a' S)-2, 2' -(5, 5' -(三环 [8.2.2.2^{4,7}] 十六-4,6,10,12,13,

15-己烯-5,11-二基)双(1H-苯并[d]咪唑-5,2-二基))双(八氢-1H-吡啶-2,1-二基))双(3-甲氧基-1-氧代丁烷-2,1-二基))二氨基甲酸二甲酯(22)(30g)。

[0253] ^1H NMR(400MHz, DMSO- d_6 , rt): δ 0.91-1.04(m, 6H), 1.21-1.59(m, 6H), 1.64-1.88(m, 6H), 1.90-2.07(m, 4H), 2.23-2.49(m, 6H), 2.62(m, 2H), 2.85(m, 2H), 3.08(m, 2H), 3.19(s, 3H), 3.20(s, 3H), 3.42(m, 2H), 3.57(s, 6H), 4.15(表观 t, $J = 8.0\text{Hz}$, 2H), 4.47(m, 2H), 5.16(表观 t, $J = 8.5\text{Hz}$, 2H), 6.52(表观 t, $J = 8.5\text{Hz}$, 2H), 6.75(s, 2H), 6.82(m, 2H), 7.41(m, 2H), 7.71(表观 t, $J = 6.0\text{Hz}$, 2H), 7.64-7.79(m, 4H)。

[0254] 实施例 5. ((2S, 2' S, 3R, 3' R)-((2S, 2' S, 3aS, 3a' S, 7aS, 7a' S)-2, 2' -(5, 5' -(三环[8.2.2.2 4,7]十六-4,6,10,12,13,15-己烯-5,11-二基)双(1H-苯并[d]咪唑-5,2-二基))双(八氢-1H-吡啶-2,1-二基))双(3-甲氧基-1-氧代丁烷-2,1-二基))二氨基甲酸二甲酯(23)的合成

[0255]



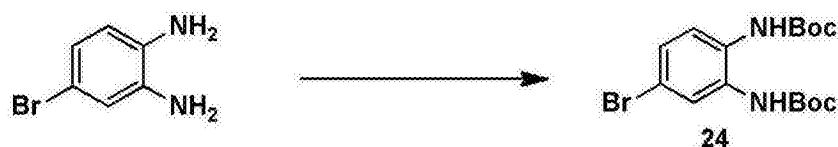
[0256] 按照与上述((2S, 2' S, 3R, 3' R)-((2S, 2' S, 3aS, 3a' S, 7aS, 7a' S)-2, 2' -(5, 5' -(三环[8.2.2.2 4,7]十六-4,6,10,12,13,15-己烯-5,11-二基)双(1H-苯并[d]咪唑-5,2-二基))双(八氢-1H-吡啶-2,1-二基))双(3-甲氧基-1-氧代丁烷-2,1-二基))二氨基甲酸二甲酯的合成相类似的方式制备((2S, 2' S, 3R, 3' R)-((2S, 2' S, 3aS, 3a' S, 7aS, 7a' S)-2, 2' -(5, 5' -(三环[8.2.2.2 4,7]十六-4,6,10,12,13,15-己烯-5,11-二基)双(1H-苯并[d]咪唑-5,2-二基))双(八氢-1H-吡啶-2,1-二基))双(3-羟基-1-氧代丁烷-2,1-二基))二氨基甲酸二甲酯。

[0257] ^1H NMR(400MHz, DMSO- d_6 , rt): ^1H NMR(400MHz, DMSO- d_6 , rt): δ 0.95-1.04(m, 6H), 1.20-1.56(m, 6H), 1.64-1.85(m, 6H), 1.90-2.09(m, 4H), 2.25(m, 2H), 2.32-2.49(m, 4H), 2.63(m, 2H), 2.83(m, 2H), 3.06(m, 2H), 3.39(m, 2H), 3.57(s, 6H), 3.69(m, 2H), 4.06(表观 t, $J = 7.5\text{Hz}$, 2H), 4.46(m, 2H), 4.72(m, 2H), 5.13(m, 2H), 6.44-6.57(m, 2H), 6.68-6.87(m, 4H), 7.23-7.35(m, 4H), 7.53-7.78(m, 4H)。

[0258] 实施例 6 通过四胺合成途径合成化合物 29

[0259] 步骤 1

[0260]

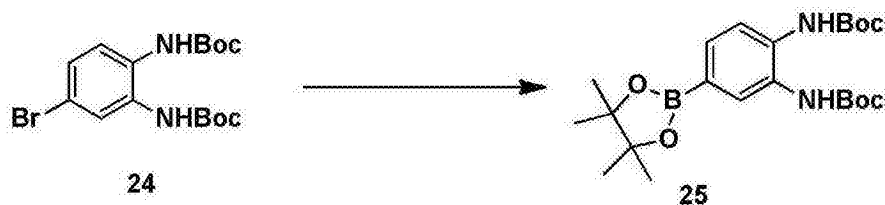


[0261] 将 1,2-二氨基-4-溴苯(10g, 0.053mol)溶解于 DCM(150mL)中,并冷却至 0℃。在相同的温度下逐滴添加 NaOH(50mL, 2.5mol)溶液。15 分钟之后,在相同的温度下,逐滴

添加二碳酸二叔丁酯 (58g, 0.26mol)。然后, 将反应混合物升温至室温, 搅拌 16 小时, 用 DCM(100mL) 稀释, 并用水 (100mL) 洗涤。分离有机层, 经 Na_2SO_4 干燥并浓缩。通过硅胶柱色谱 (石油醚 / 乙酸乙酯, 1 : 1v/v) 纯化该粗制材料, 以得到期望的产物 (18g)。

[0262] 步骤 2

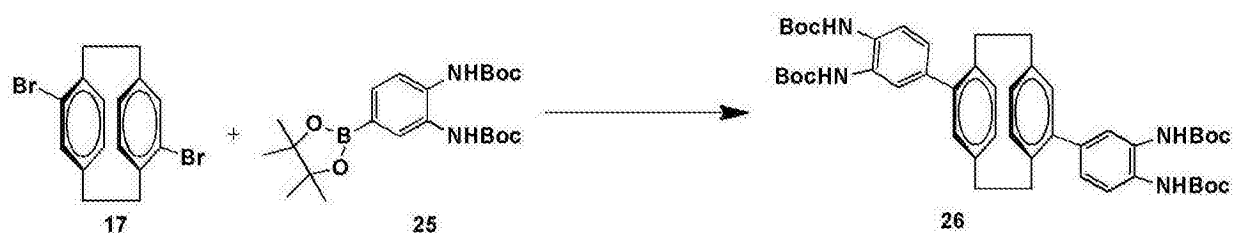
[0263]



[0264] 在氩气氛下, 将 1,4-二氧六环 (360mL) 中的 (4-溴-1,2-亚苯基) 二氨基甲酸二叔丁酯 (24) (18g, 0.046mol)、双(频哪醇基)二硼 (17.7g, 0.070mol)、乙酸钾 (13.66g, 0.14mol) 和 $\text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2$ (3.8g, 0.0046mol) 的混合物在 85℃ 下加热 16 小时。然后用乙酸乙酯 (200mL) 稀释反应混合物, 经硅藻土床过滤。在减压下浓缩滤液, 通过硅胶柱色谱 (石油醚 / 乙酸乙酯, 80 : 20v/v) 纯化剩余的材料, 以得到期望的产物 (25) (16.0g)。

[0265] 步骤 3

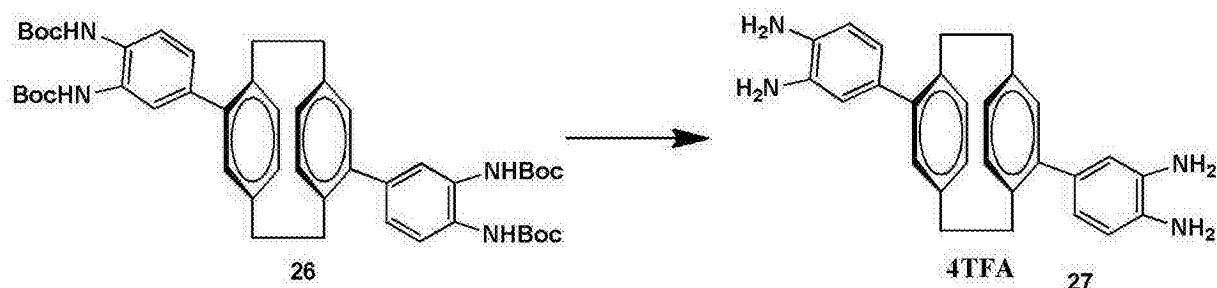
[0266]



[0267] 在氩气氛下, 将 4,16-二溴 [2.2] 对环芬 (17) (6g, 0.014mol)、(4-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)-1,2-亚苯基) 二氨基甲酸二叔丁酯 (17.78g, 0.032mol)、 Cs_2CO_3 水溶液 (15.98g, 0.049mol, 在 66mL 水中) 和 $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (1.33g, 0.0016mol) 的混合物在密封管中于 80℃ 加热 16 小时。将反应混合物倒入水 (250mL) 中, 通过过滤收集所得沉淀, 并用水洗涤。通过柱色谱 (石油醚 / 乙酸乙酯, 6 : 4v/v) 纯化该粗制材料, 以得到期望的产物 (26) (5.0g)。

[0268] 步骤 4

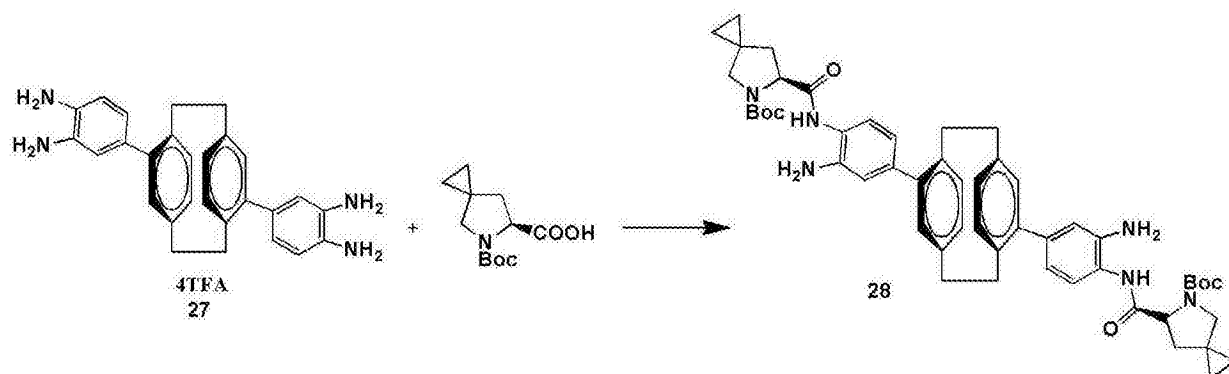
[0269]



[0270] 在 0℃ 至 5℃ 下, 向 TFA(100mL) 中添加上述四 Boc 保护的产物 (26) (10g)。添加完成之后, 将反应混合物升温至室温, 并搅拌 3 小时。然后浓缩反应混合物, 并与 DCM(3×50mL) 共同蒸发。粗制材料 (27) 直接在接下来的步骤中使用。

[0271] 步骤 5

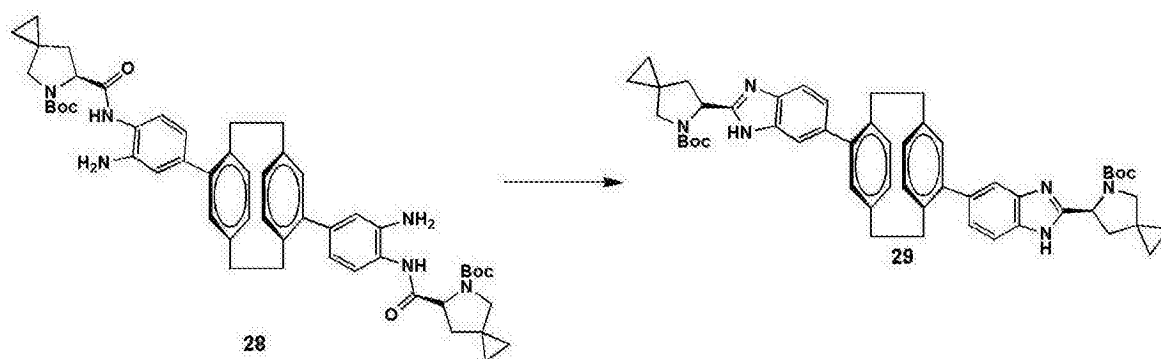
[0272]



[0273] 在 0℃ 下, 向 DMF (5mL) 中的 (S)-5-(叔丁氧基羰基)-5-氮杂螺[2.4]庚烷-6-羧酸 (0.5g, 0.00057mol)、HOBt (0.35g, 0.0026mol)、EDCI (0.5g, 0.0026mol) 和上述 TFA 盐 (27) (0.343g, 0.0014mol) 的冷却 (0℃) 混合物中逐滴添加 DIEA (1mL, 0.0125mol)。添加完成过之后, 将反应混合物升温至室温并搅拌 16 小时。将反应混合物倒入水中, 通过过滤收集沉淀 (28), 并通过硅胶柱色谱纯化以得到期望的产物 (0.32g)。

[0274] 步骤 6

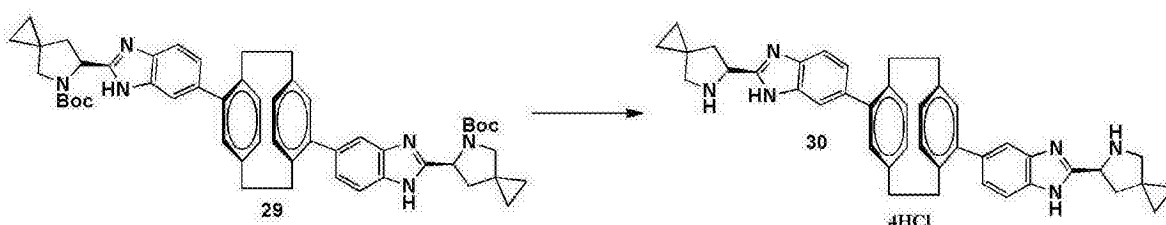
[0275]



[0276] 向上述二酰胺产物 (28) (0.32g, 0.00035mol) 中添加乙酸 (5mL), 并在 45℃ 加热 4 小时。蒸发反应混合物, 并用乙酸乙酯 (95mL) 稀释残余物, 然后用 NaHCO₃ 水溶液 (2×25mL) 和水 (2×30mL) 洗涤。分离有机层, 经 Na₂SO₄ 干燥, 并在减压下蒸发。通过柱色谱纯化粗制材料以得到期望的产物 (29) (0.2g)。

[0277] 步骤 7

[0278]

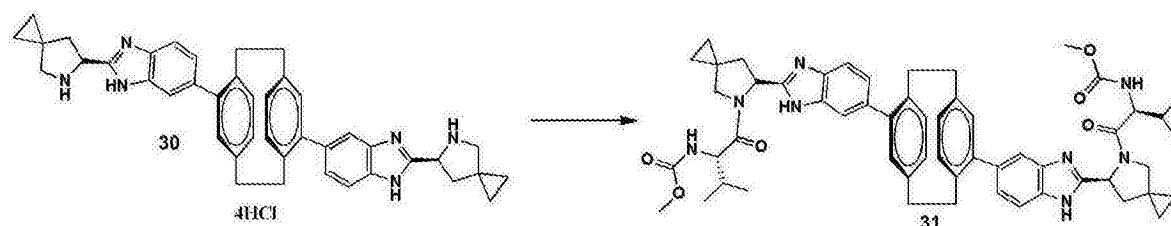


[0279] 将上述 boc 保护的产物 (0.09g) 溶解于 DCM (0.9mL) 中, 并在 0℃ 冷却。然后, 逐滴添加 4N HCl/二氧六环 (0.9mL)。将反应混合物升温至室温, 并搅拌 3 小时。然后, 在真空下除去挥发物, 并与 DCM (3×50mL) 共同蒸发。剩余的粗制材料 (30) 直接在接下来的步

骤中使用而无需进一步纯化。

[0280] 步骤 8

[0281]

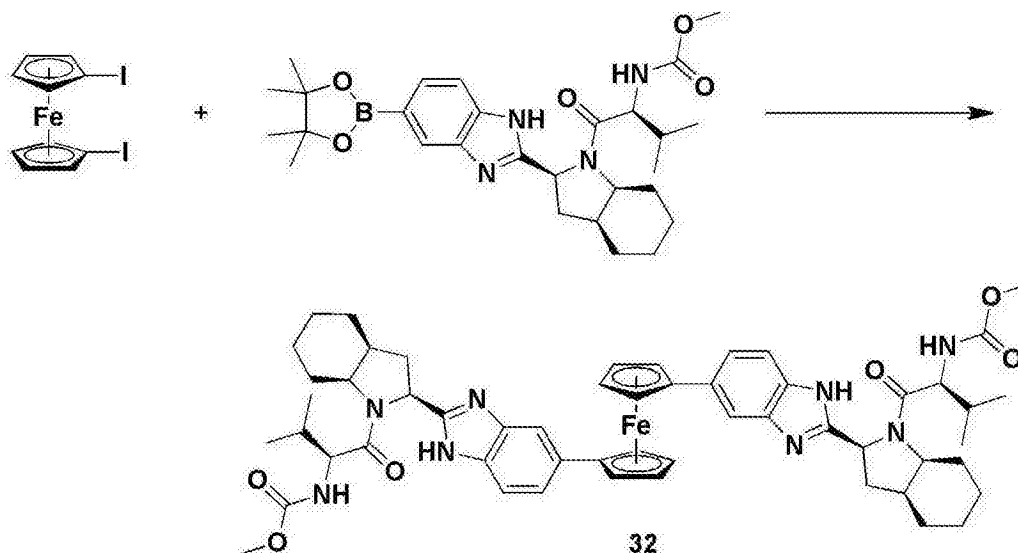


[0282] 将上述盐酸盐 (30) (0.011g, 0.0000141mol, 1.0 当量) 溶解于 DMF (1mL) 中, 并冷却至 0℃。向该冷却溶液中添加 (S)-2-((甲氧基羰基)氨基)-3-甲基丁酸 (0.0062g, 0.000033mol, 2.5 当量)、HOBt (0.0044g, 0.000033mol, 2.5 当量) 和 EDCI (0.0063g, 0.000033mol, 2.5 当量)。然后, 在相同的温度下逐滴添加 DIEA (0.02mL, 0.00013mol, 10 当量)。将反应混合物升温至室温, 并搅拌 16 小时。然后将反应混合物倒入水 (25mL) 中, 通过过滤收集所沉淀的固体, 干燥并通过硅胶柱色谱纯化以得到期望的产物 (31) (3mg)。

[0283] ^1H NMR (400MHz, $\text{DMSO}-d_6$, rt): δ 0.91-1.04 (m, 6H), 1.21-1.59 (m, 6H), 1.64-1.88 (m, 6H), 1.90-2.07 (m, 4H), 2.23-2.49 (m, 6H), 2.62 (m, 2H), 2.85 (m, 2H), 3.08 (m, 2H), 3.19 (s, 3H), 3.20 (s, 3H), 3.42 (m, 2H), 3.57 (s, 6H), 4.15 (表观 t, $J = 8.0\text{Hz}$, 2H), 4.47 (m, 2H), 5.16 (表观 t, $J = 8.5\text{Hz}$, 2H), 6.52 (表观 t, $J = 8.5\text{Hz}$, 2H), 6.75 (s, 2H), 6.82 (m, 2H), 7.41 (m, 2H), 7.71 (表观 t, $J = 6.0\text{Hz}$, 2H), 7.64-7.79 (m, 4H)。

[0284] 实施例 7. 二茂铁 NS5A 抑制剂 (32) 的合成

[0285]



[0286] 通过 Butler, I.R. 等, "A Convenient Preparation of Iodoferrocenes," Polyhedron (1993) 12:129-131 中所述的方法制备二茂铁化合物。在氩气氛下, 向 1,1'-二碘二茂铁 (220mg, 0.5mmol) 的 1,4-二氧六环 (10mL) 搅拌溶液中添加 ((S)-3-甲基-1-氧代-1-((2S, 3aS, 7aS)-2-(5-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)八氢-1H-吡啶-1-基)丁-2-基)氨基甲酸甲酯 (1.1g, 4 当量)、 K_3PO_4 (853mg, 2M 水溶液, 8 当量) 和 PdCl_2dppf (49mg, 12mol%)。将所得混合物在 80℃ 经

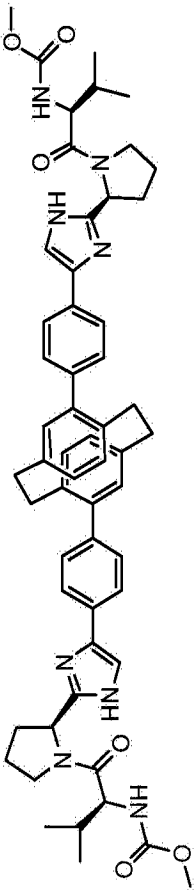
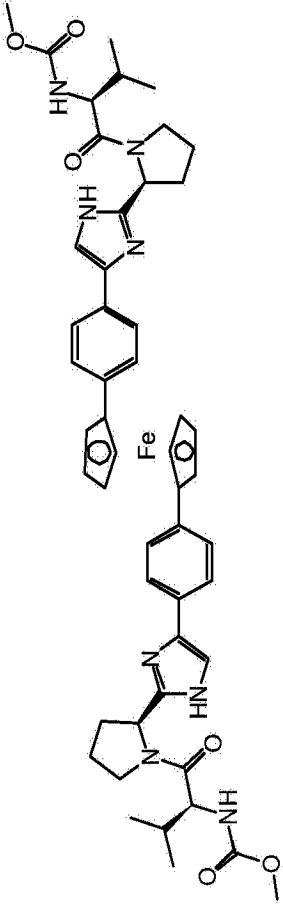
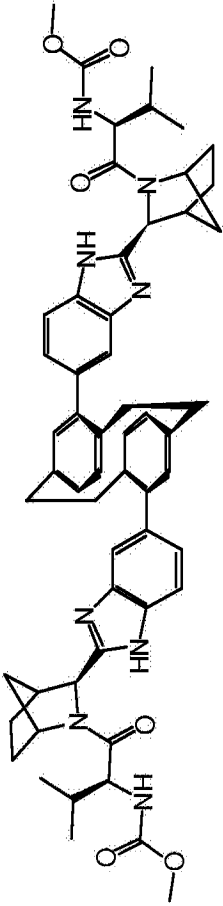
历微波照射 (CEM Discover System) 1 小时。将反应混合物冷却至室温, 过滤并在真空中浓缩。通过制备型 HPLC 纯化剩余的残余物, 以得到作为三氟乙酸盐的期望产物 (43mg)。

[0287] ^1H NMR (400MHz, DMSO-d_6 , 27°C) : δ 0.63 (d, $J = 6.5\text{Hz}$, 6H), 0.78 (d, $J = 6.5\text{Hz}$, 6H), 1.13-1.49 (m, 6H), 1.55-1.87 (m, 10H), 1.95 (m, 2H), 2.26 (m, 2H), 2.35 (m, 2H), 2.42 (m, 2H), 3.48 (s, 6H), 3.83 (t, $J = 8.0\text{Hz}$, 2H), 4.18 (m, 4H), 4.37 (m, 2H), 4.67 (m, 4H), 5.10 (dd, $J = 10.0\text{Hz}$, 7.5Hz , 2H), 7.39 (d, $J = 9.0\text{Hz}$, 2H), 7.42 (d, $J = 9.0\text{Hz}$, 2H), 7.45 (d, $J = 8.0\text{Hz}$, 2H), 7.53 (s, 2H).

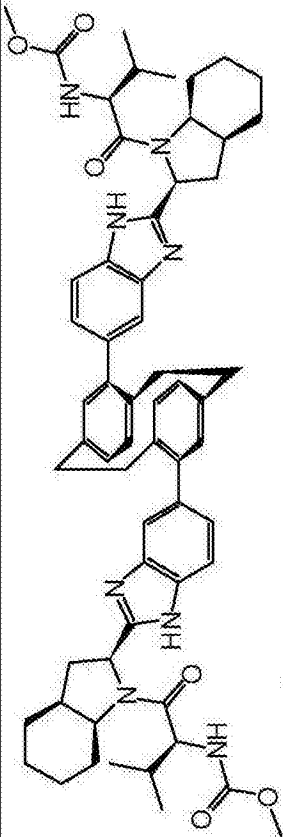
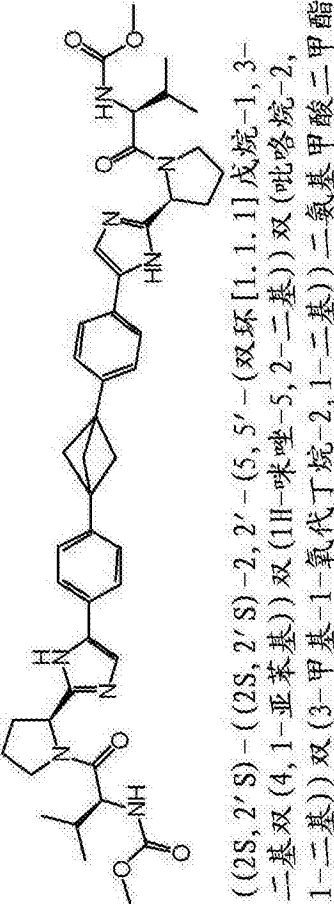
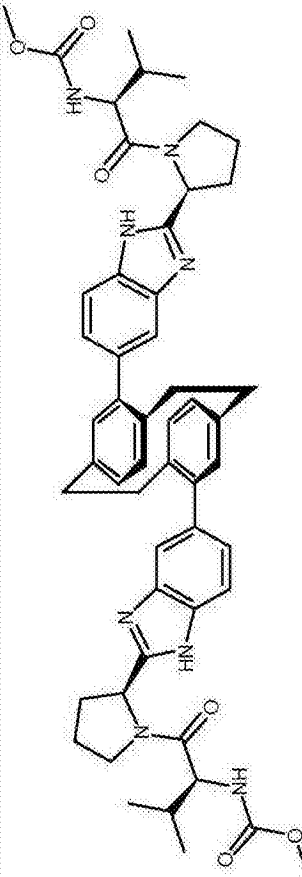
[0288] 实施例 8. 式 I 的另一些化合物

[0289] 通过实施例 1 至 6 中所给出的方法制备下述化合物。

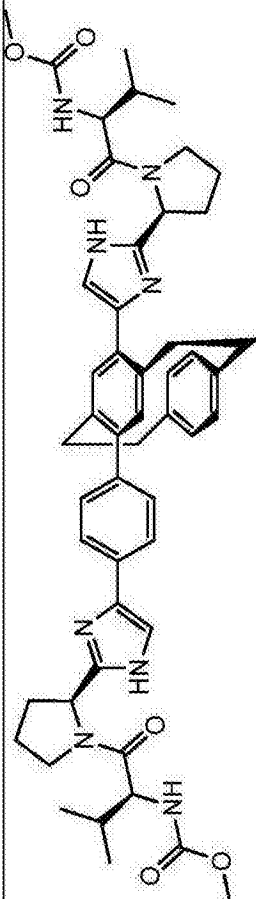
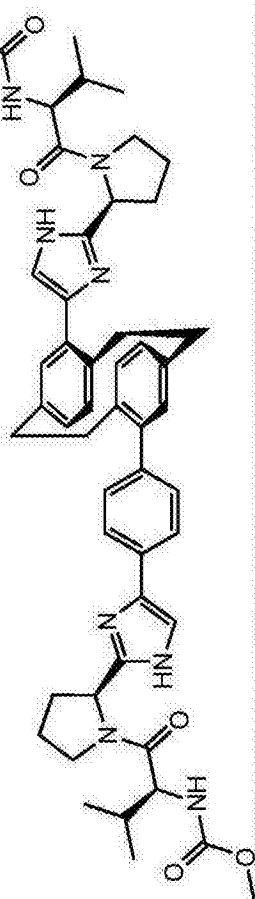
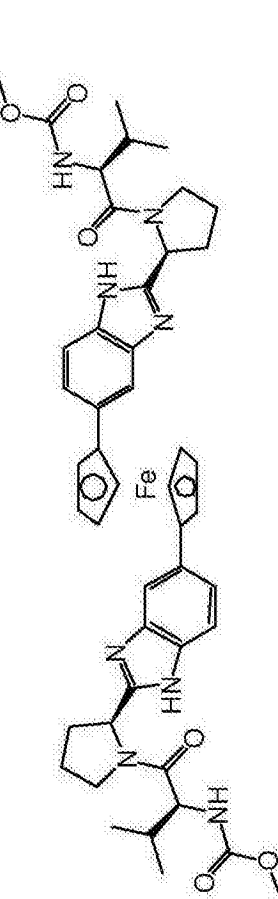
[0290]

编号	结构	EC50 (μM)		LC	HPLC 方法	MS
		NS5A1b	NS5A1b			
40		0.000012		1.57	1	945
41		<0.0032	0.00781	1.67	1	923
42		<0.0032	0.0044	2.15	1	945

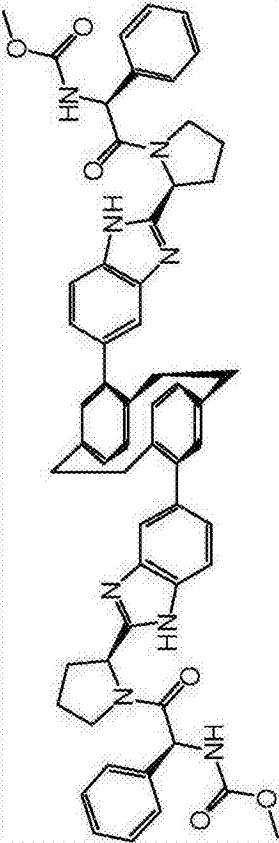
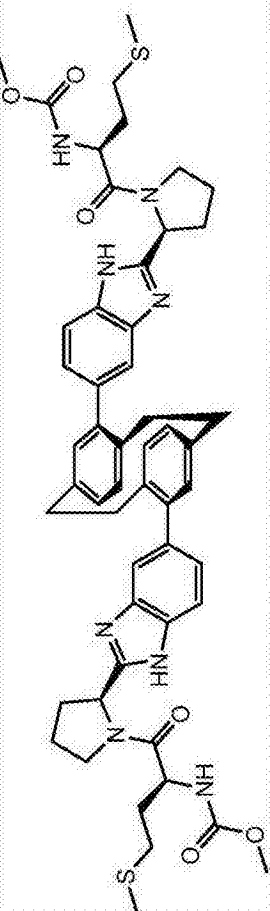
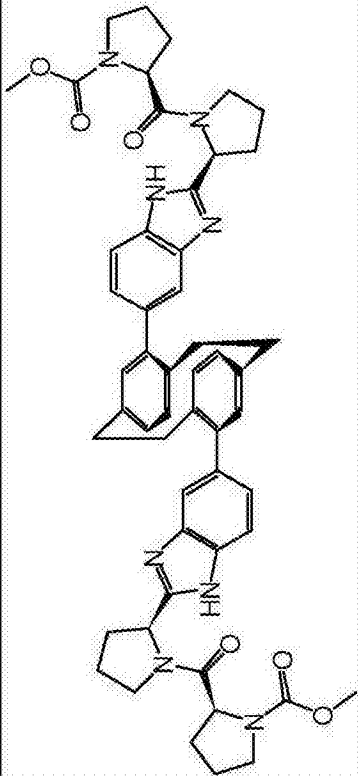
[0291]

编号	结构	EC50 (μM)		LC	HPLC 方法	MS
		NS5A1b	NS5A1b			
43		0.00285		2.86	1	1001
44		0.00408		1.35	1	805
45		<0.0032		1.93	1	893

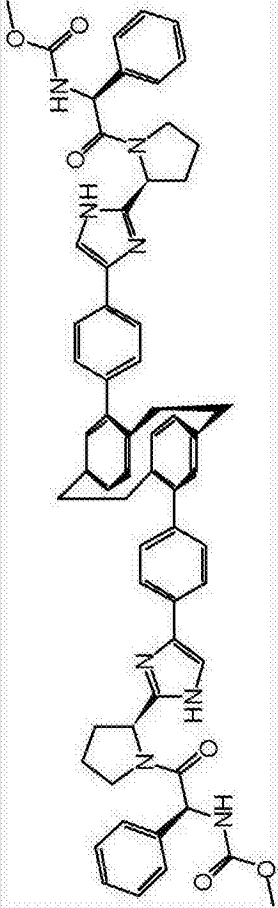
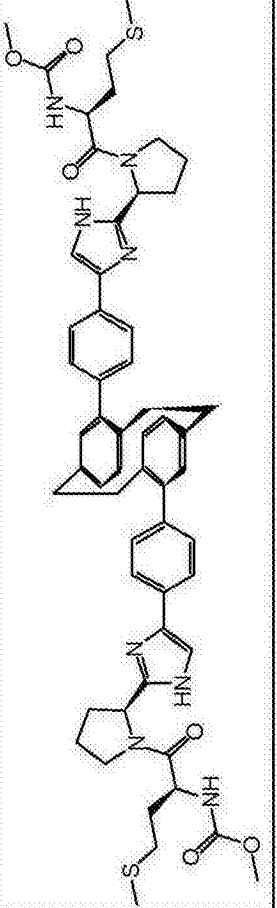
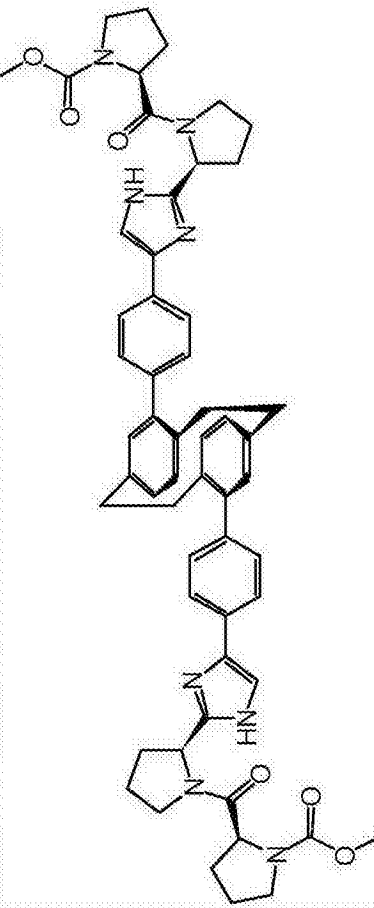
[0292]

编号	结构	EC50 (μM)		LC	HPLC 方法	MS
		NS5A1b	NS5A1b			
46		<0.00317		1.69	1	870
47		0.00502		1.67	1	870
48		<0.00317		6.06	2	871

[0293]

编号	结构	EC50 (μM)		LC	HPLC 方法	MS
		NS5A1b	NS5A1b			
49		0.0102		1.94	1	962
50		0.00841		1.8	1	957
51		>1		1.62	1	889

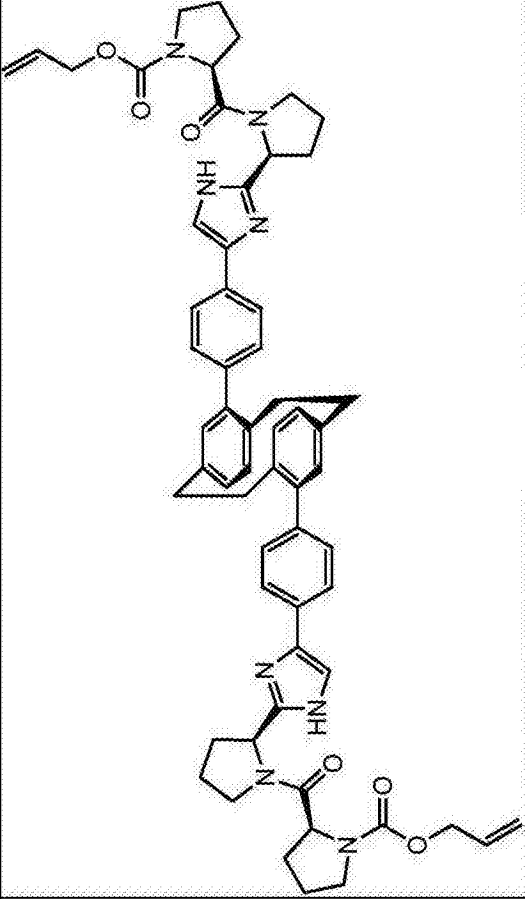
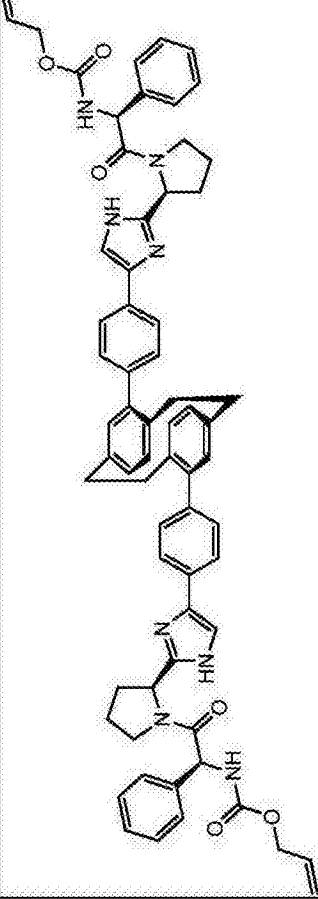
[0294]

编号	结构	EC50 (μM)		LC	HPLC 方法	MS
		NS5A1b	NS5A1b			
52		0.00983		1.88	1	1014
53		0.211		1.78	1	1009
54		>1		1.64	1	942

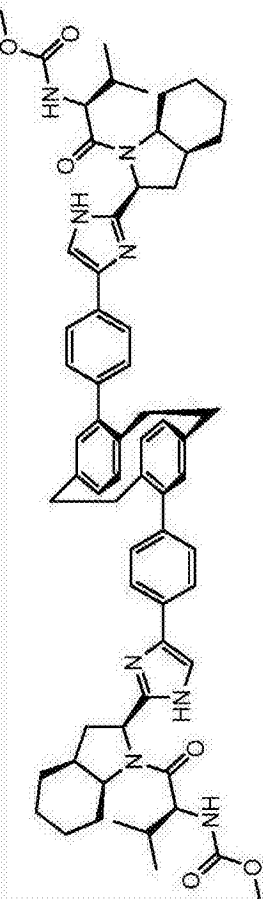
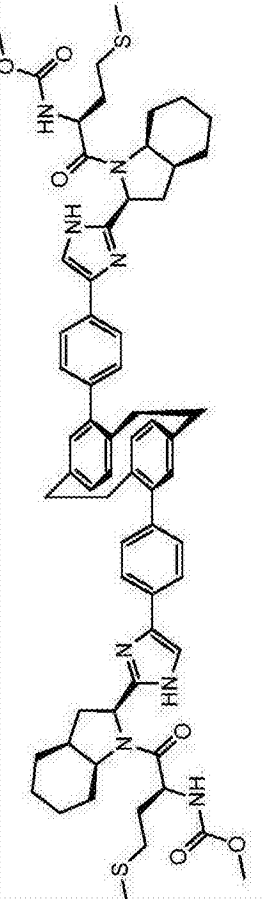
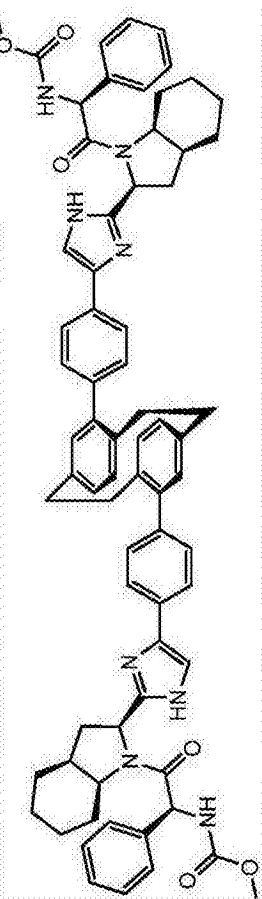
[0295]

编号	结构	EC50 (μM)		LC	HPLC 方法	MS
		NS5A1b	NS5A1b			
55		>1		2.02	1	998
56		0.00164		8.18	2	979
57		>1		2.04	1	1062

[0296]

编号	结构	EC50 (μM)		LC	HPLC 方法	MS
		NS5A1b	NS5A1b			
58		>1		1.9	1	994
59		0.548		2.21	1	1066

[0297]

编号	结构	EC50 (μM)		LC	HPLC 方法	MS
		NS5A1b	NS5A1b			
60		0.128		2.45	1	1054
61		0.0752		2.43	1	1118
62		0.075		2.58	1	1122

[0298]

编号	结构	EC50 (μM)		LC	HPLC 方法	MS
		NS5A1b	NS5A1b			
63		0.899		2.33	1	1051
64						
65						

[0299]

编号	结构	EC50 (μM)		LC	HPLC 方法	MS
		NS5A1b	NS5A1b			
66		0.0000005		1.99	1	921
67						
68						

[0300]

编号	结构	EC50 (μM)		LC	HPLC 方法	MS
		NS5A1b	NS5A1b			
69				2.21	1	921
70						
71						

[0301]

编号	结构	EC50 (μM)		LC	HPLC 方法	MS
		NS5A1b	NS5A1b			
72				2.03	1	1079
73				1.86	1	1143
74						

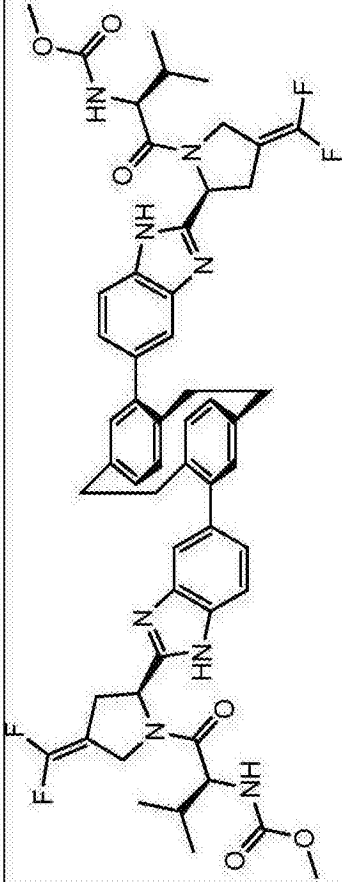
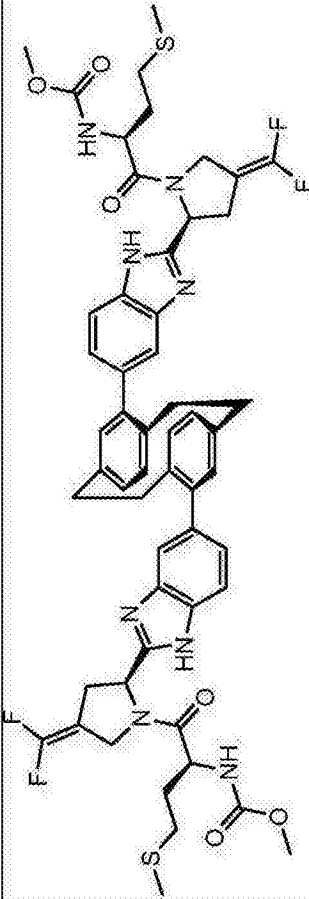
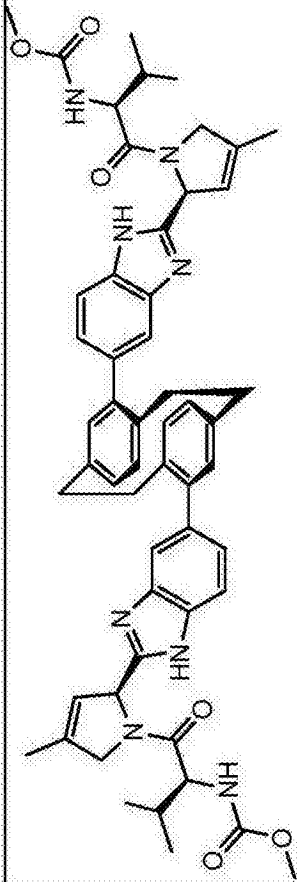
[0302]

编号	结构	EC50 (μM)		LC	HPLC 方法	MS
		NS5A1b	NS5A1b			
75						
76						
77				1.33	1	917

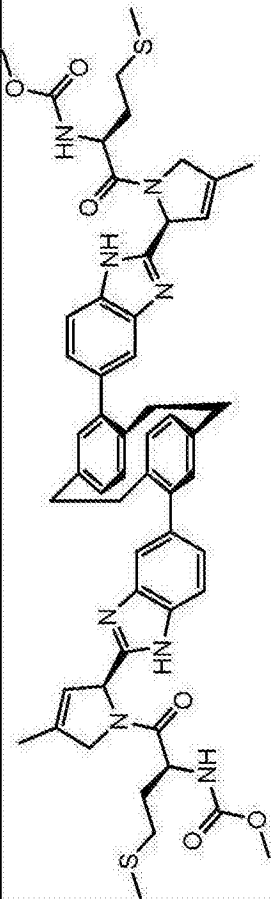
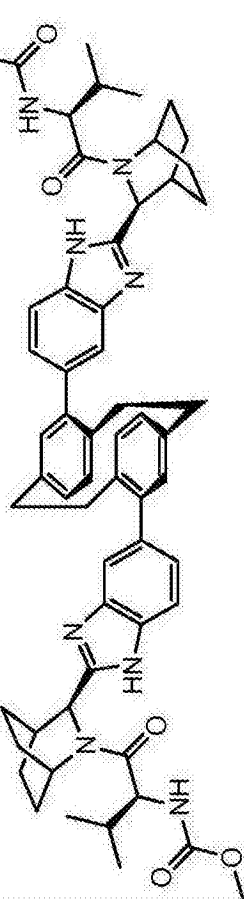
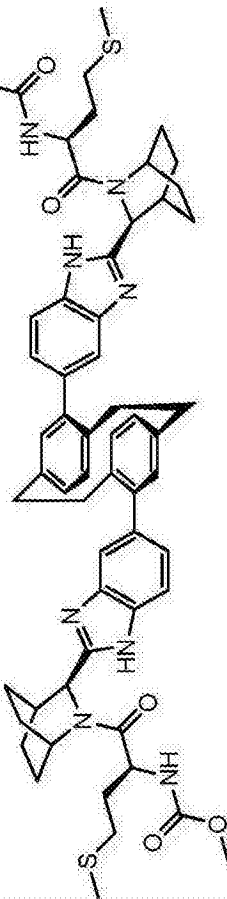
[0303]

编号	结构	EC50 (μM)		LC	HPLC 方法	MS
		NS5A1b	NS5A1b			
78				1.64	1	981
79						
80						

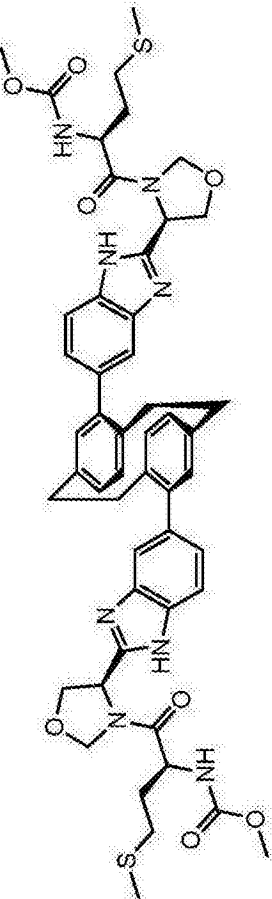
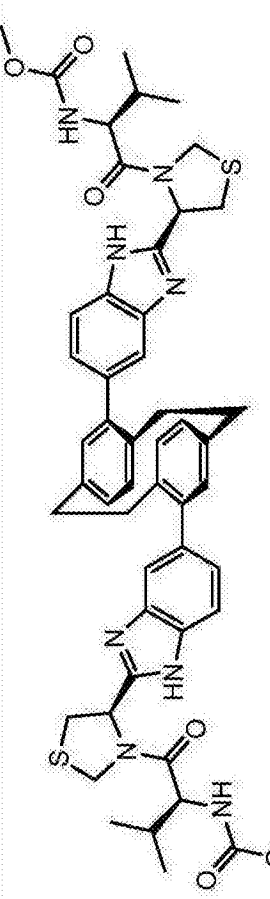
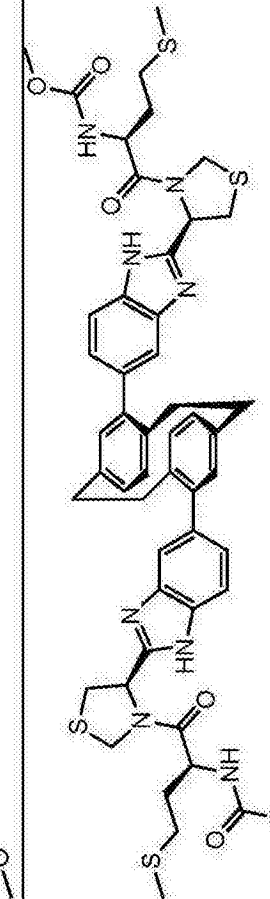
[0304]

编号	结构	EC50 (μM)		LC	HPLC 方法	MS
		NS5A1b	NS5A1b			
81						
82						
83						

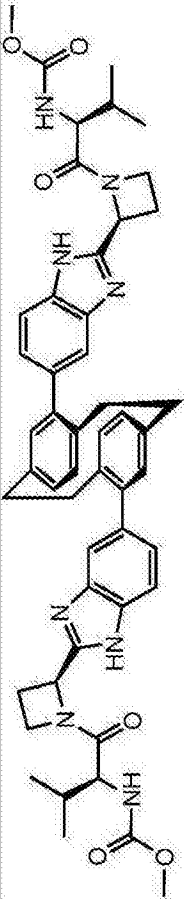
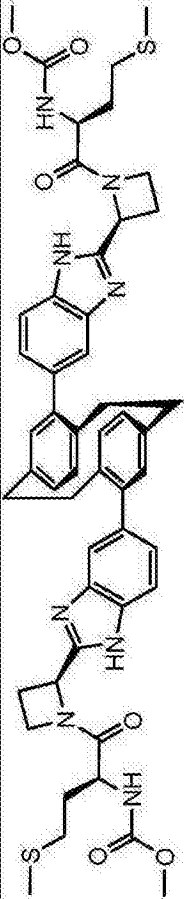
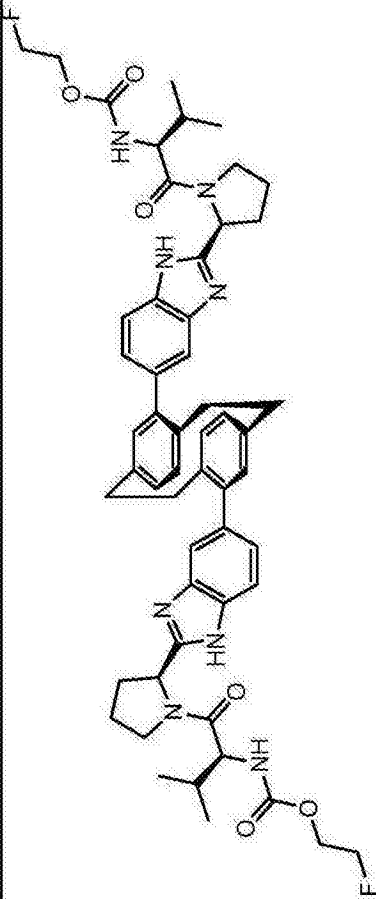
[0305]

编号	结构	EC50 (μM)		LC	HPLC 方法	MS			
		NS5A1b	NS5A1b						
84									
85									
86									

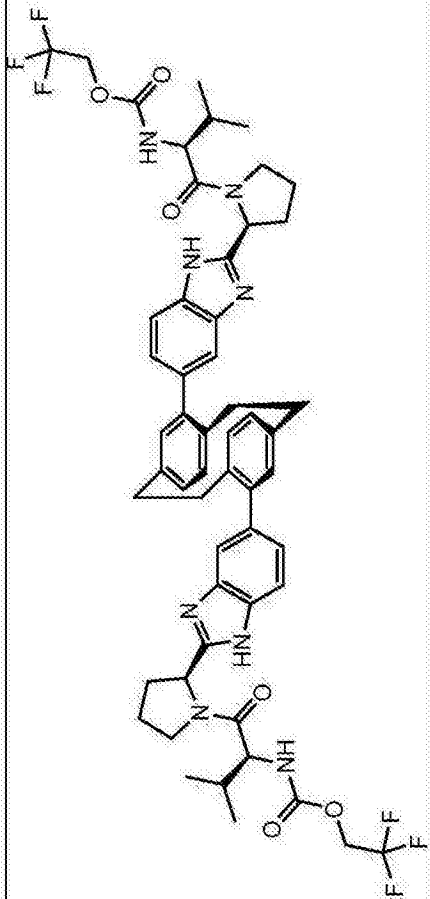
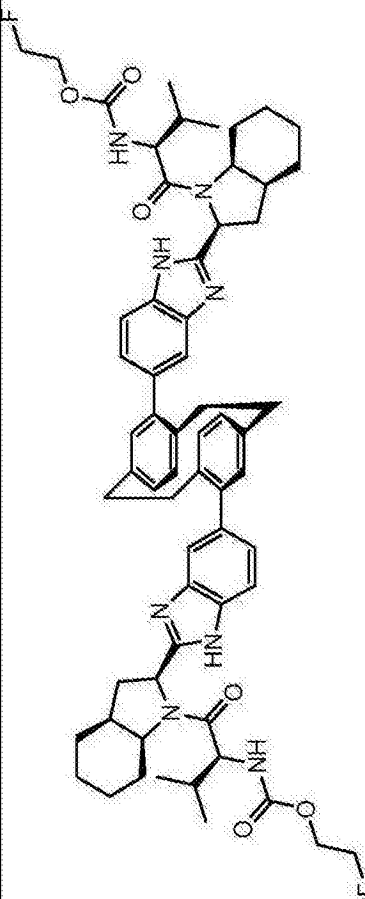
[0306]

编号	结构	EC50 (μM)		LC	HPLC 方法	MS
		NS5A1b	NS5A1b			
90						
91				1.68	1	929
92						

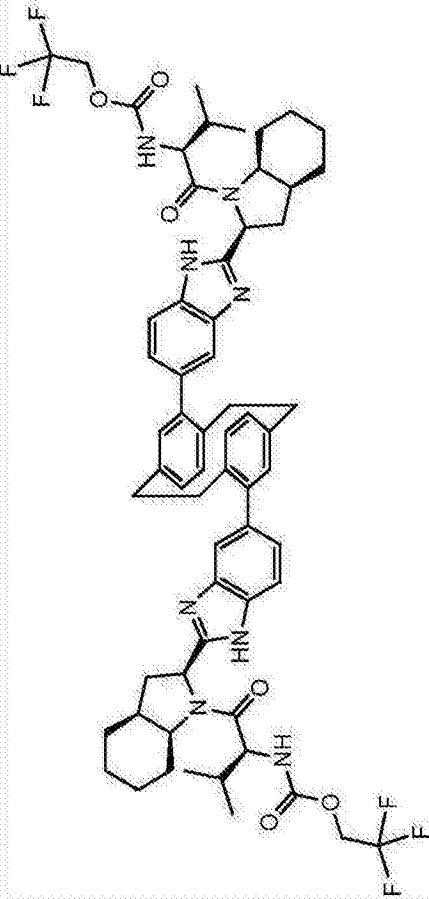
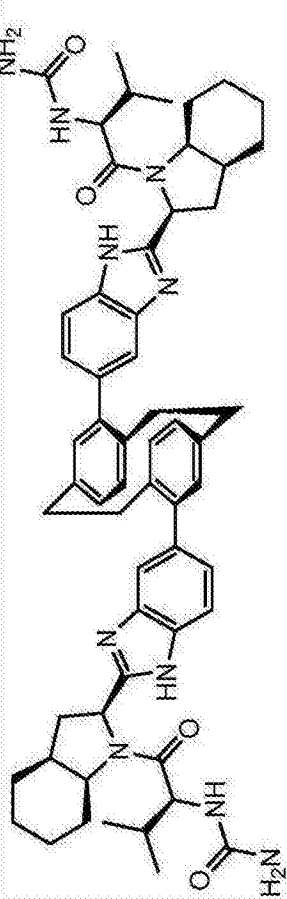
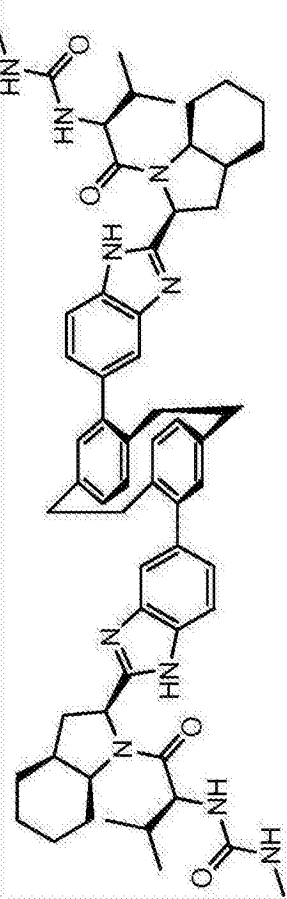
[0308]

编号	结构	EC50 (μM)		LC	HPLC 方法	MS
		NS5A1b	NS5A1b			
93						
94						
95				1.76	1	957

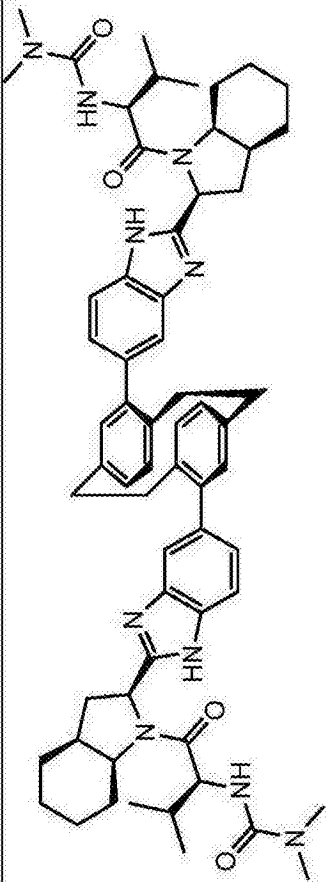
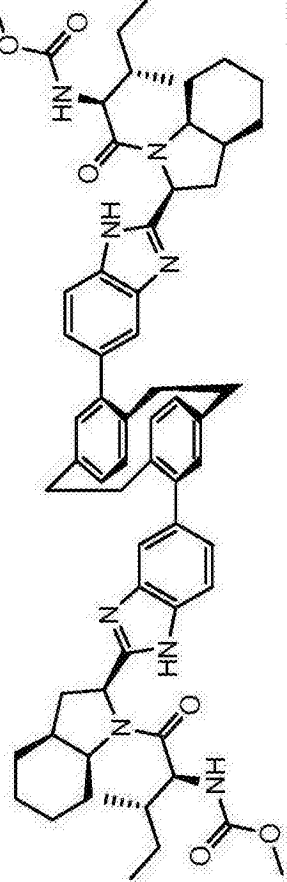
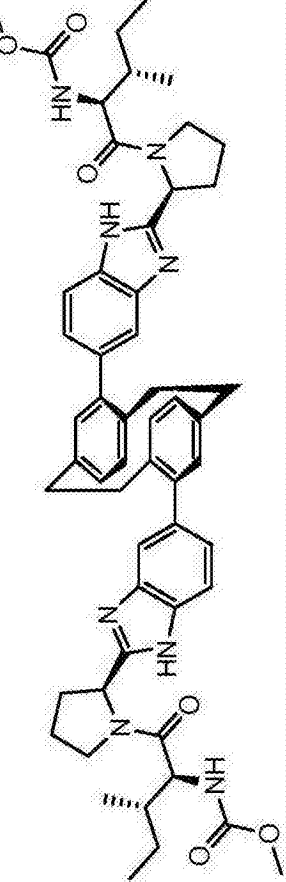
[0309]

编号	结构	EC50 (μM)		LC	HPLC 方法	MS
		NS5A1b	NS5A1b			
96				2.11	1	1029
97				2.51	1	1060

[0310]

编号	结构	EC50 (μM)		LC	HPLC 方法	MS
		NS5A1b	NS5A1b			
98				2.93	1	1138
99						
100						

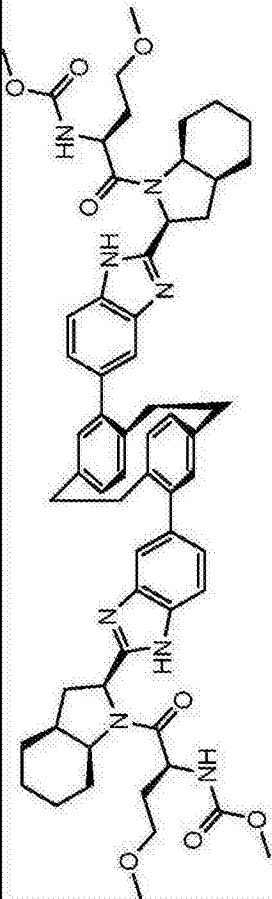
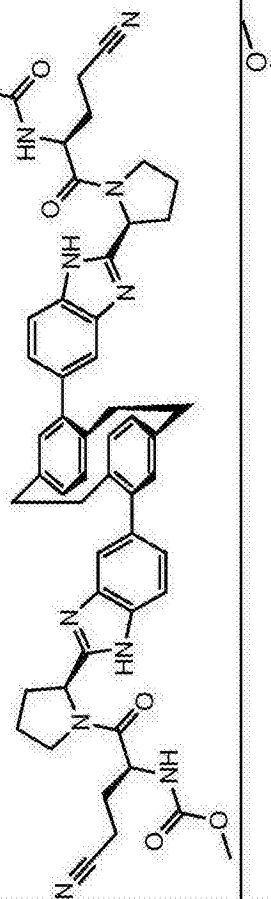
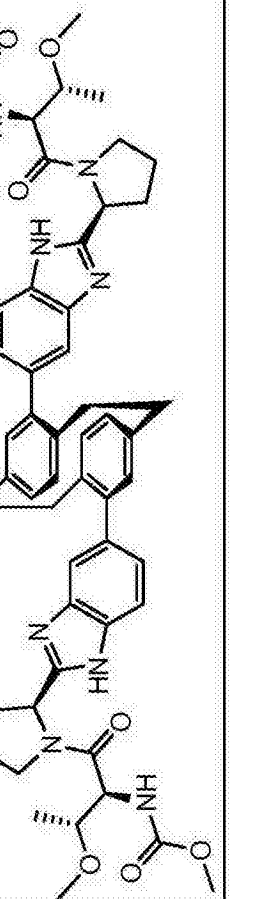
[0311]

编号	结构	EC50 (μM)		LC	HPLC 方法	MS
		NS5A1b	NS5A1b			
101				2.17	1	1028
102		0.0119	0.0358	2.79	1	1030
103		<0.00317	0.47	1.99	1	922

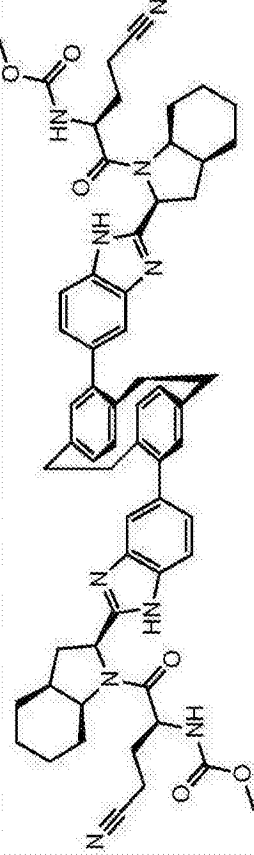
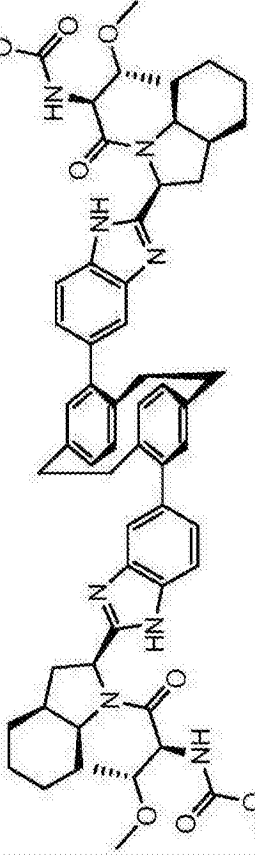
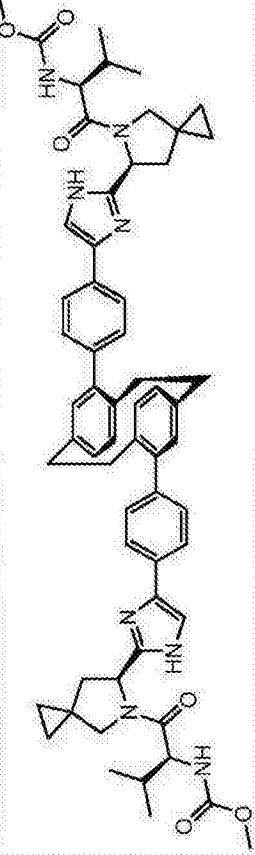
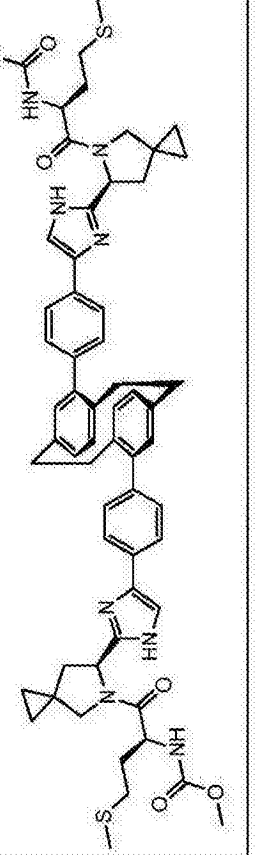
[0312]

编号	结构	EC50 (μM)		LC	HPLC 方法	MS
		NS5A1b	NS5A1b			
104				2.24	1	996
105				1.51	1	888
106						

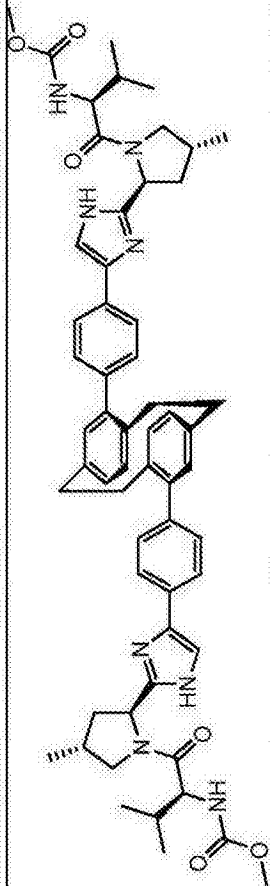
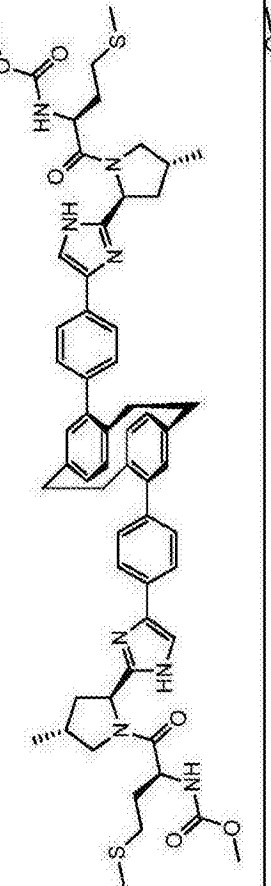
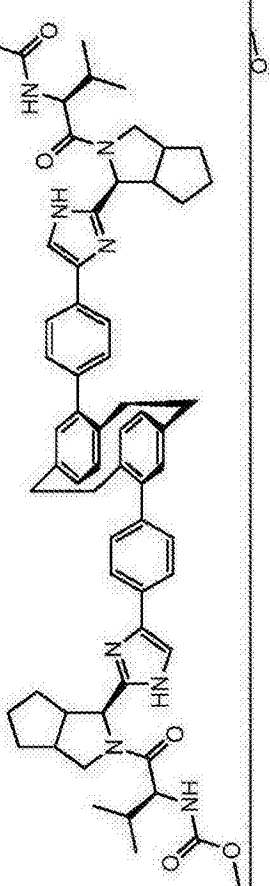
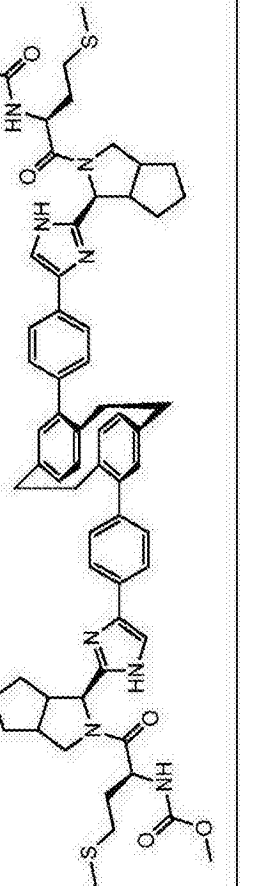
[0313]

编号	结构	EC50 (μM)		LC	HPLC 方法	MS
		NS5A1b	NS5A1b			
107						
108				1.63	1	915
109		0.00883	0.0118	1.63	1	926

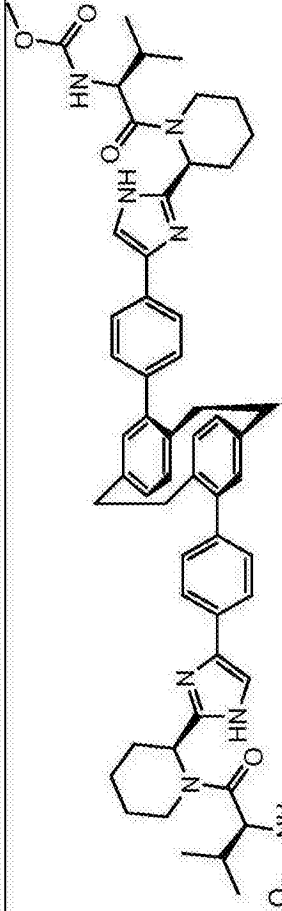
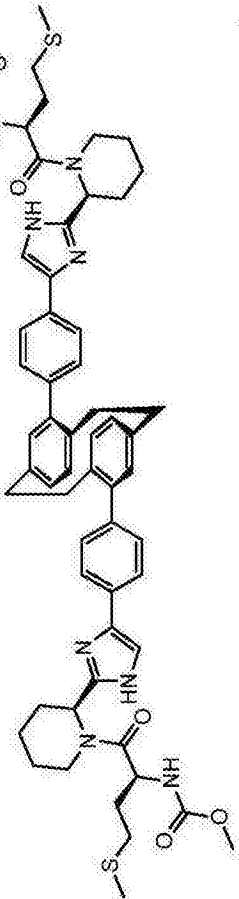
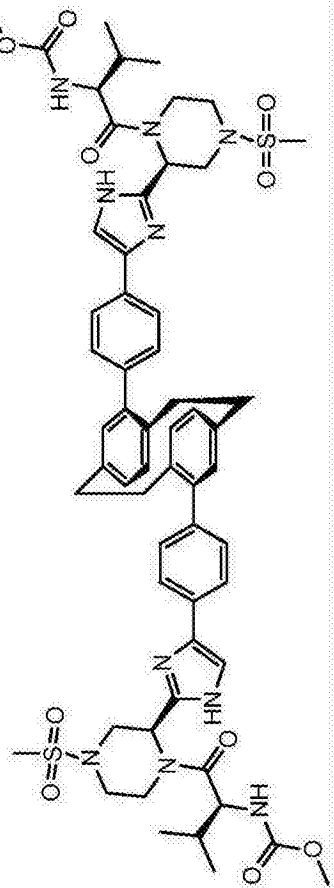
[0314]

编号	结构	EC50 (μM)		LC	HPLC 方法	MS
		NS5A1b	NS5A1b			
110		0.000006		2.11	1	1024
111		0.000005		2.37	1	1034
112						
113						

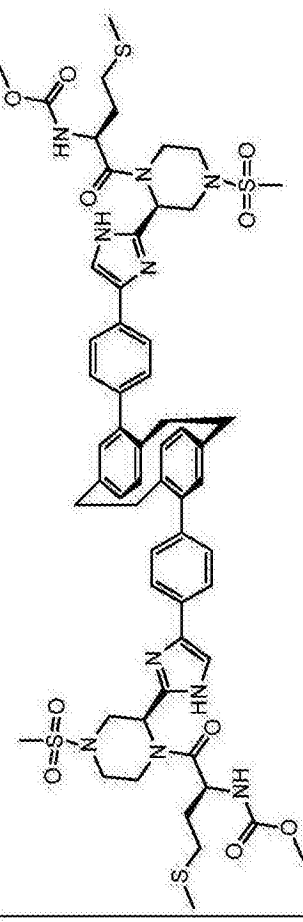
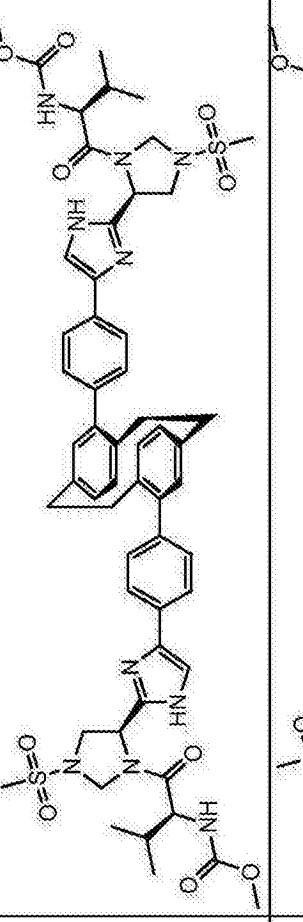
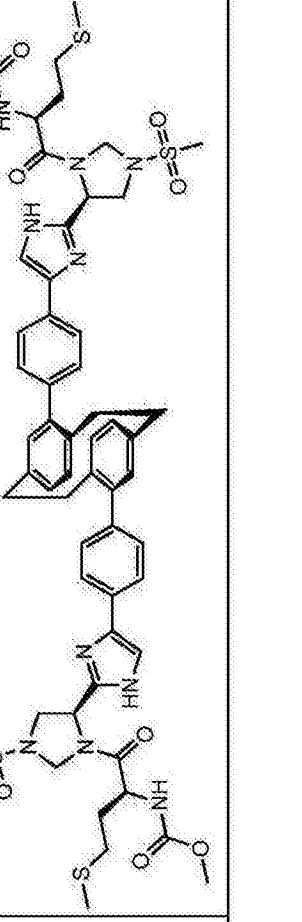
[0315]

编号	结构	EC50 (μM)		LC	HPLC 方法	MS
		NS5A1b	NS5A1b			
114						
115						
116						
117						

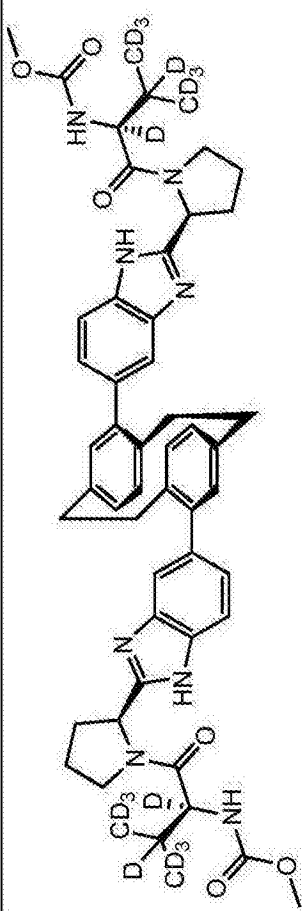
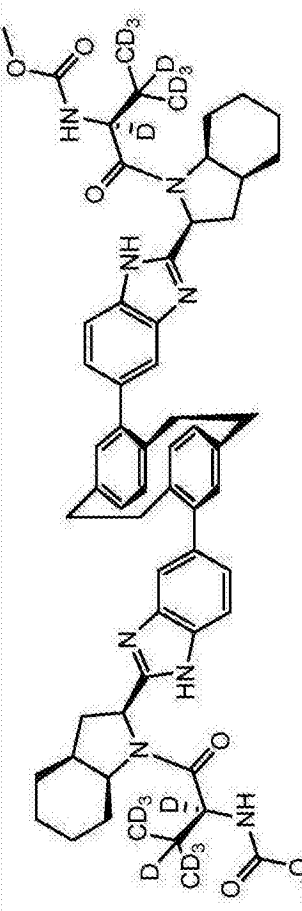
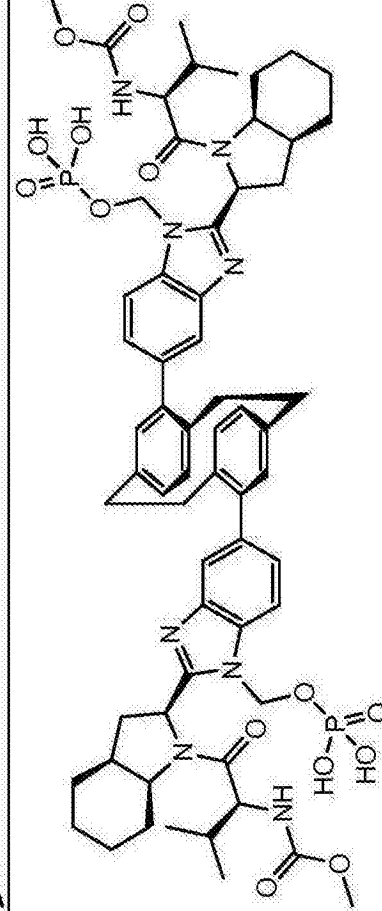
[0316]

编号	结构	EC50 (μM)		LC	HPLC 方法	MS
		NS5A1b	NS5A1b			
118						
119						
120						

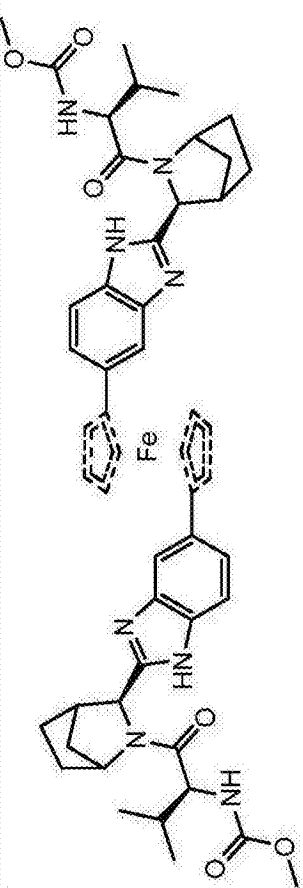
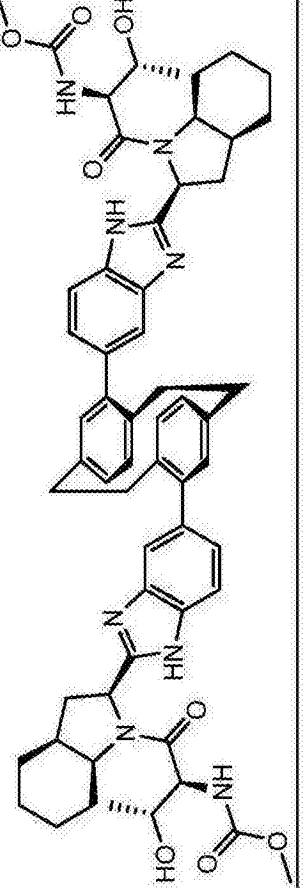
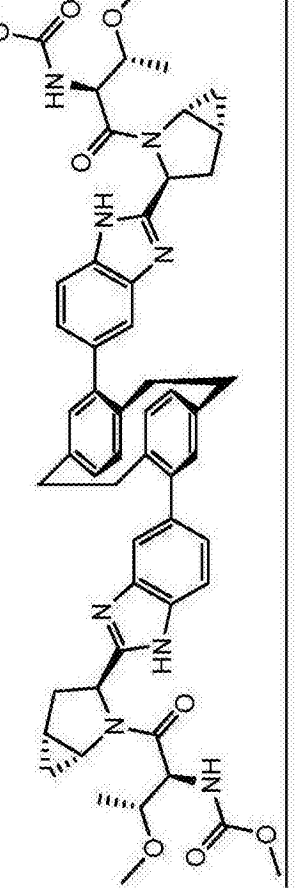
[0317]

编号	结构	EC50 (μM)		LC	HPLC 方法	MS
		NS5A1b	NS5A1b			
121						
122						
123						

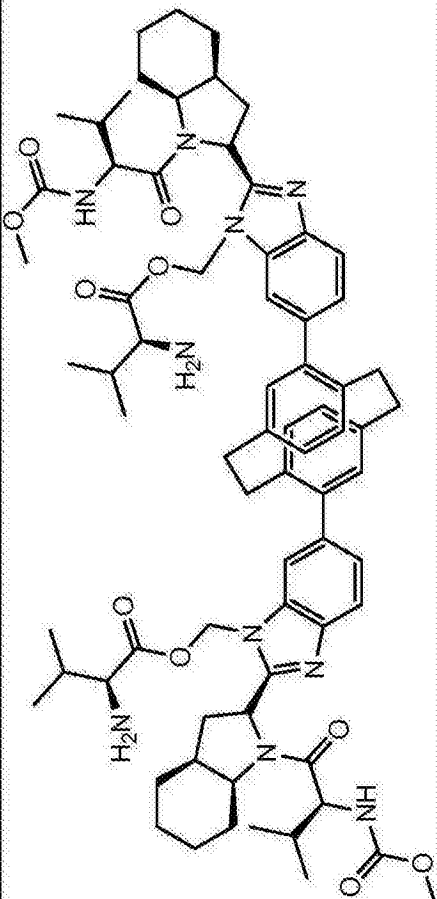
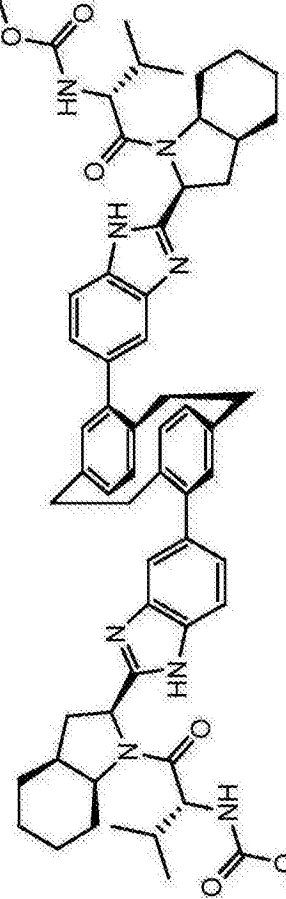
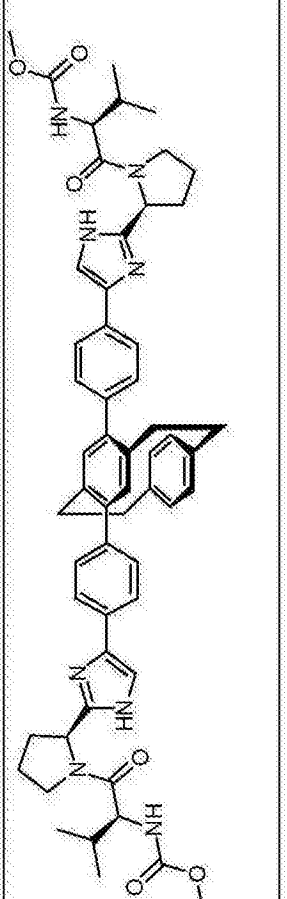
[0318]

编号	结构	EC50 (μM)		LC	HPLC 方法	MS
		NS5A1b	NS5A1b			
124				1.8	1	910
125				2.73	1	1018
126				2.08	1	1222

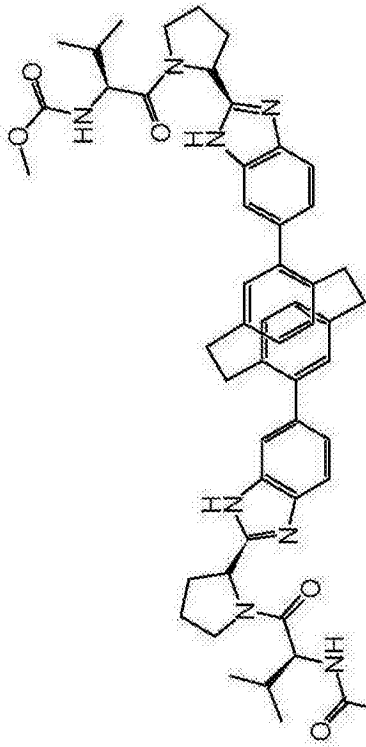
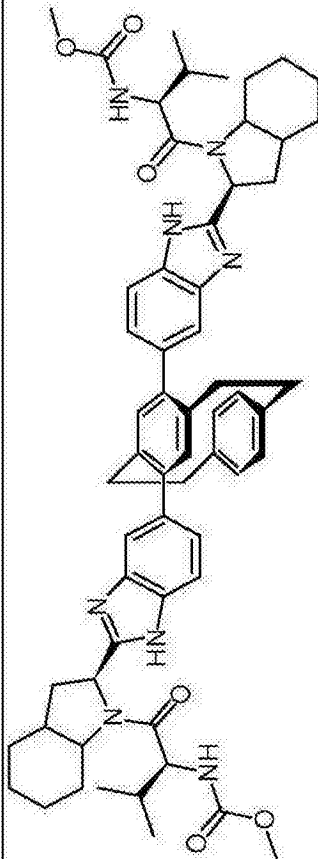
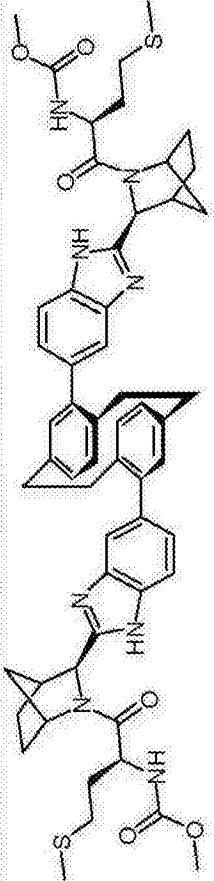
[0319]

编号	结构	EC50 (μM)		LC	HPLC 方法	MS
		NS5A1b	NS5A1b			
127		0.633	>1	8.2	2	923
128		0.000008		2.15	1	1006
129						

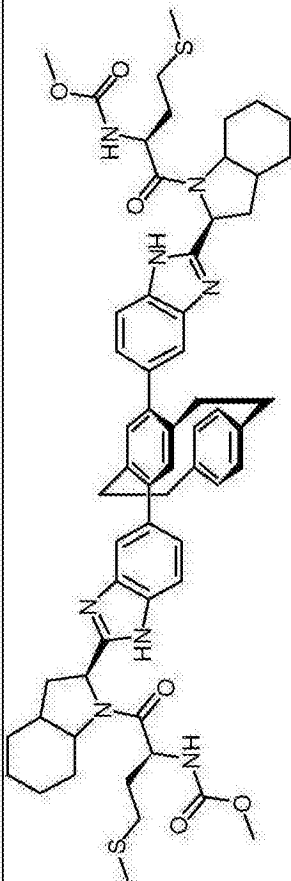
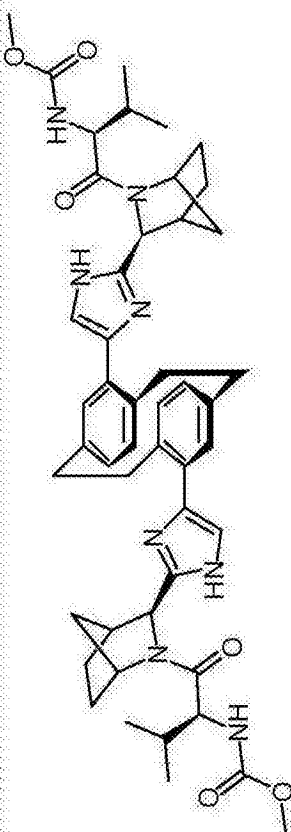
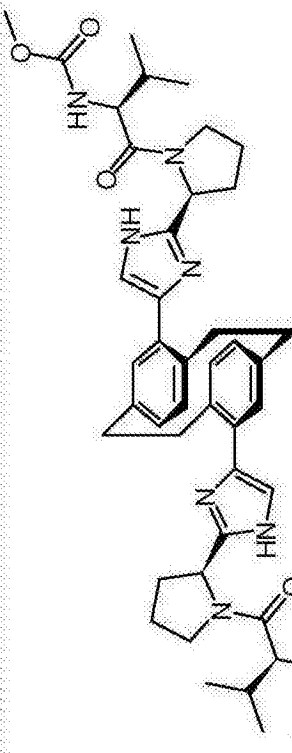
[0320]

编号	结构	EC50 (μM)		LC	HPLC 方法	MS
		NS5A1b	NS5A1b			
130		0.000009		2.2	1	1261
131						
132						

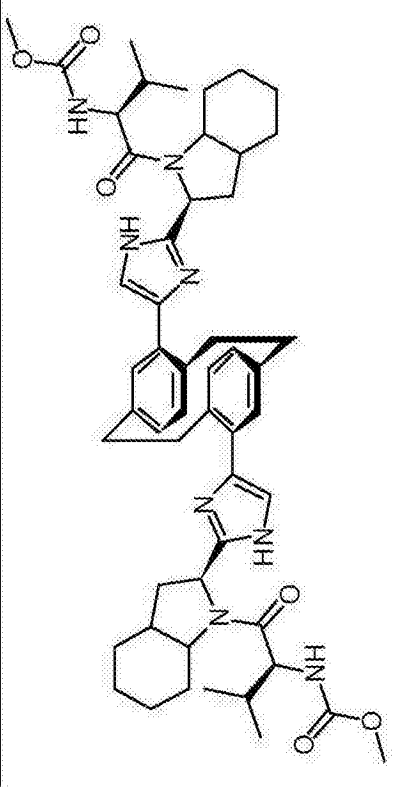
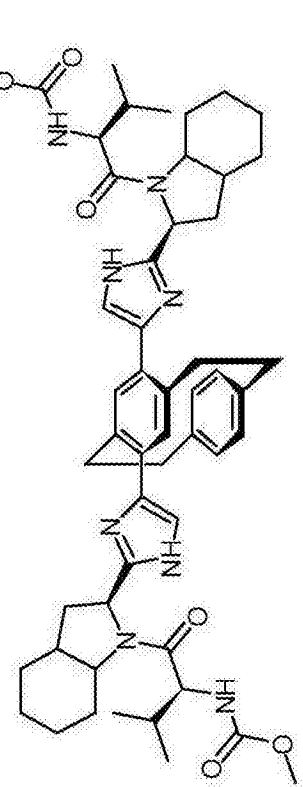
[0321]

编号	结构	EC50 (μM)		LC	HPLC 方法	MS			
		NS5A1b	NS5A1b						
133									
134									
135									

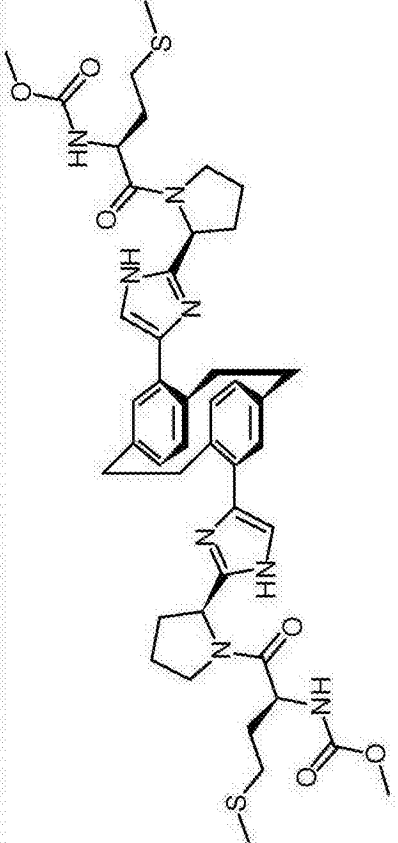
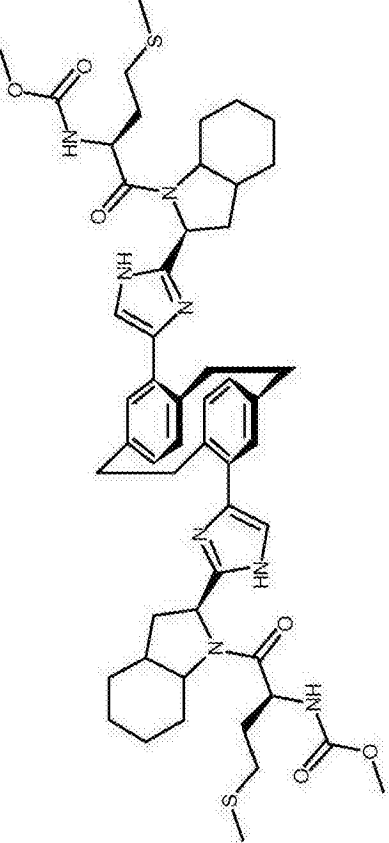
[0322]

编号	结构	EC50 (μM)		LC	HPLC 方法	MS
		NS5A1b	NS5A1b			
136						
137						
138						

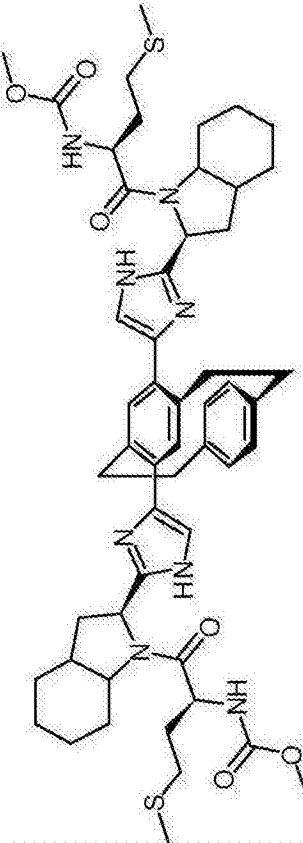
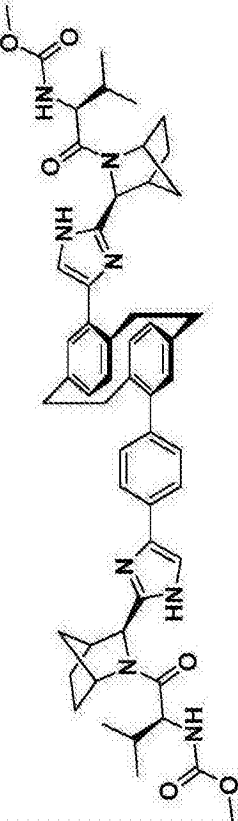
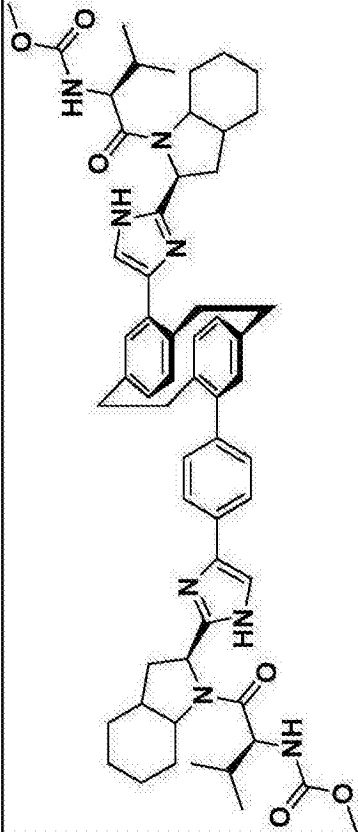
[0323]

编号	结构	EC50 (μM)		LC	HPLC 方法	MS
		NS5A1b	NS5A1b			
139						
140						

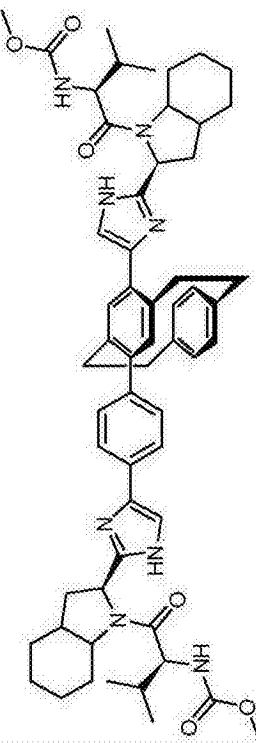
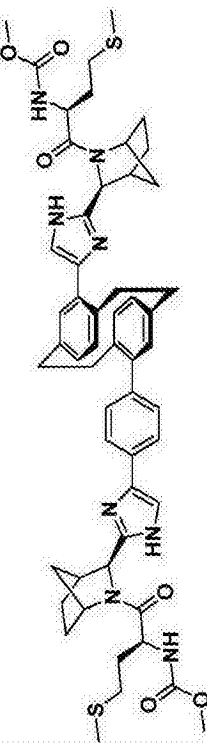
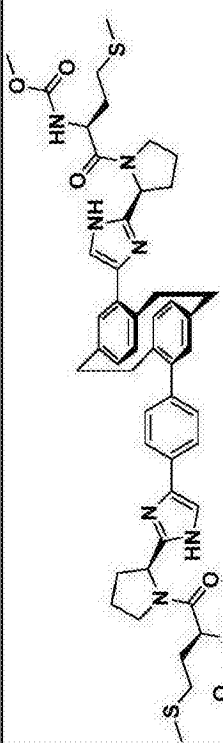
[0324]

编号	结构	EC50 (μM)		LC	HPLC 方法	MS			
		NS5A1b	NS5A1b						
141									
142									

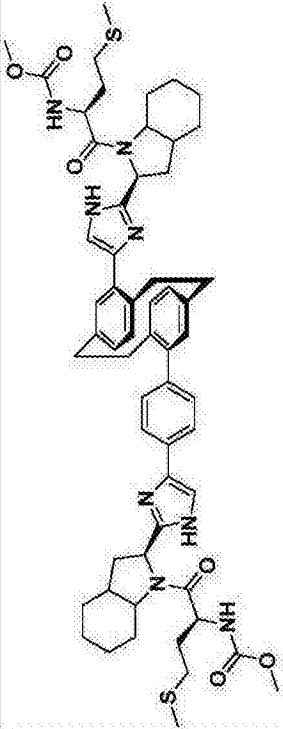
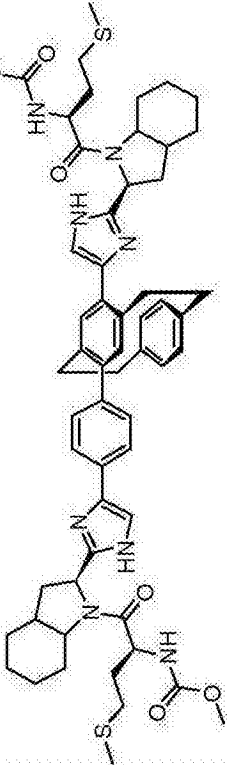
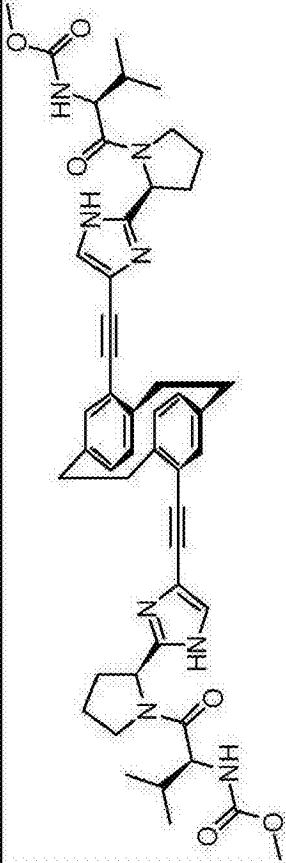
[0325]

编号	结构	EC50 (μM)		LC	HPLC 方法	MS
		NS5A1b	NS5A1b			
143						
144						
145						

[0326]

编号	结构	EC50 (μM)		LC	HPLC 方法	MS
		NS5A1b	NS5A1b			
146						
147						
148						

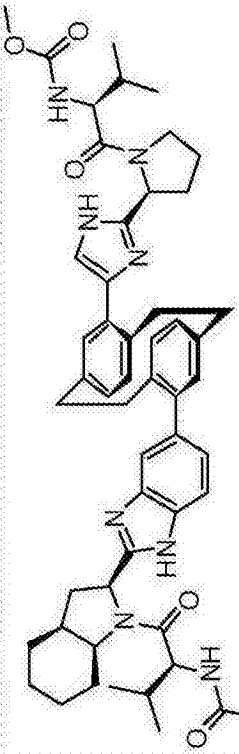
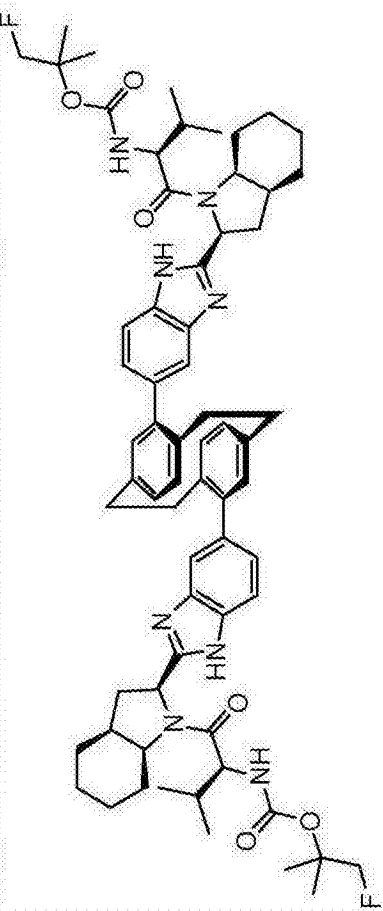
[0327]

编号	结构	EC50 (μM)		LC	HPLC 方法	MS
		NS5A1b	NS5A1b			
149						
150						
151						

[0328]

编号	结构	EC50 (μM)		LC	HPLC 方法	MS
		NS5A1b	NS5A1b			
152						
153						
154						

[0329]

编号	结构	EC50 (μM)		LC	HPLC 方法	MS
		NS5A1b	NS5A1b			
155						
156						

[0330] 实施例 9. 鉴定抑制 HCV 复制之化合物的测定方法

[0331] 在培养的细胞中测试本文所要求保护之化合物抑制丙型肝炎复制子之病毒复制的能力,所述培养的细胞中已经并入了 HCV 复制子构建体 (construct)。HCV 复制子系统由 Bartenschlager 等人描述 (Science, 285, 110-113 页 (1999))。该复制子系统可预测体内抗 HCV 活性;对人有活性的化合物在该复制子测定中也一样显示出活性。

[0332] 在该测定中,用不同浓度的测试化合物处理含 HCV 复制子的细胞,以确定测试化合物抑制 HCV 复制子复制的能力。作为阳性对照,用不同浓度的干扰素 α (已知的 HCV 复制抑制剂) 处理含 HCV 复制子的细胞。所述复制子测定系统包括新霉素磷酸转移酶 (Neomycin Phosphotransferase, NPT) 作为复制子自身的一个组分,以检测宿主细胞中复制子基因产物的转录。HCV 复制子复制活跃的细胞具有高水平的 NPT ;NPT 水平与 HCV 复制成比例。HCV 复制子不在其中复制的细胞也具有低水平的 NPT,因此当用新霉素处理时不能存活。使用捕获 ELISA 测量每个样品的 NPT 水平。

[0333] 测试化合物抑制丙型肝炎复制子在培养的细胞 (其中已并入所述复制子构建体) 中病毒复制之能力的方案如下。

[0334] 9A. HCV 复制子和复制子表达

[0335] HCV 基因组由编码 3000 个氨基酸之多蛋白的单 ORF 组成。所述 ORF 侧翼的 5' 一侧是用作内部核糖体进入位点 (internal ribosome entry site, IRES) 的非翻译区,3' 一侧是病毒复制所必需的高度保守序列 (3' -NTR)。病毒感染必需的结构蛋白位于所述 ORF 的 5' 端附近。命名为 NS2 至 NS5B 的非结构蛋白包含 ORF 的其余部分。

[0336] 按 5, -3, 方向, HCV 复制子含有 HCV-IRES、新霉素磷酸转移酶 (neo) 基因、指导 HCV 序列 NS3 至 NS5B 翻译的脑心肌炎病毒的 IRES、以及 3' NTR。HCV 复制子的序列已保存在 GenBank 中 (登录号 AJ242652)。

[0337] 使用标准方法 (例如电穿孔) 将所述复制子转染进 Huh-7 细胞中。

[0338] 9B. 细胞维持 (cell maintenance)

[0339] 设备和材料包括但不限于:含 HCV 复制子的 Huh-7 细胞、维持培养基 (添加了 10% FBS、L-谷氨酰胺、非必需氨基酸、青霉素 (100 单位/ml)、链霉素 (100 微克/ml) 和 500 微克/ml 的遗传霉素 (Geneticin) (G418) 的 DMEM (达尔伯克氏改良伊格尔培养基 (Dulbecco's modified Eagle media)))、筛选培养基 (添加了 10% FBS、L-谷氨酰胺、非必需氨基酸、青霉素 (100 单位/ml) 和链霉素 (100 微克/ml) 的 DMEM)、96 孔组织培养板 (平底)、96 孔板 (U 形底,用于药物稀释)、用于阳性对照的干扰素 α 、固定试剂 (例如甲醇:丙酮)、一抗 (兔抗 -NPTII)、二抗 Eu-N11、以及增强溶液。

[0340] 当其密度合适时,含 HCV 复制子的细胞支持高水平的病毒 RNA 复制子复制。过度汇合 (over-confluency) 导致病毒 RNA 复制降低。因此,细胞必需在 500 微克/ml 的 G418 存在下保持生长于对数期。一般地,细胞应以 1 : 4-6 的稀释度每周传代两次。按照下文所述进行细胞维持:

[0341] 在显微镜下检查含 HCV 复制子的细胞,以确保细胞生长良好。用 PBS 冲洗细胞 1 次,添加 2ml 胰酶。将细胞/胰酶混合物于 37°C 下在 CO₂ 培养箱中孵育 3 至 5 分钟。孵育之后,添加 10 毫升完全培养基以使胰酶消化反应停止。轻轻吹起细胞,使其进入 15ml 管中,以 1200rpm 离心 4 分钟。除去胰酶/培养基溶液。添加培养基 (5ml),小心混合细胞。对细胞计数。

[0342] 然后将细胞接种于 96 孔板,密度为 6000 至 7500 个细胞/100 微升/孔 (6 至 7.5×10^5 个细胞/10ml/板)。然后将所述板在 37°C 下于 5% CO₂ 培养箱中孵育。

[0343] 接种后约 24 小时在显微镜下检查细胞,之后添加药物。如果正确进行计数和稀释,则细胞是 60% 至 70% 汇合度,并且几乎所有细胞都应贴壁并在孔中均匀铺展。

[0344] 9C. 用测试化合物处理含 HCV 复制子的细胞

[0345] 用 PBS 清洗含 HCV 复制子的细胞 1 次, 然后添加 2ml 胰酶。将细胞于 37℃ 下在 5% CO₂ 培养箱中孵育 3 至 5 分钟。添加 10 毫升完全培养基以使反应停止。轻轻吹起细胞, 使其进入 15ml 管中, 以 1200rpm 离心 4 分钟。除去胰酶 / 培养基溶液, 添加 5ml 培养基 (500ml DMEM (高葡萄糖), 来自 BRL 目录号 12430-054), 50ml 10% FBS, 5% 遗传霉素 G418 (50mg/ml, BRL 目录号 10131-035), 5ml MEM 非必需氨基酸 (100×BRL#11140-050) 和 5ml 青霉素 - 链霉素 (pen-strep) (BRL#15140-148)。将细胞和培养基小心混合。

[0346] 用筛选培养基 (500ml DMEM (BRL#21063-029), 50ml FBS (BRL#10082-147) 和 5ml MEM 非必需氨基酸 (BRL#11140-050)) 以 6000 至 7500 个细胞 / 100 μl / 孔将细胞铺板至 96 孔板 (6 至 7.5×10⁵ 个细胞 / 10ml / 板)。将板置于 37℃ 的 5% CO₂ 培养箱中过夜。

[0347] 9D. 测定

[0348] 第二天早上, 根据所选用于筛选的最终浓度用培养基或 DMSO / 培养基在 U 形底 96 孔板中稀释药物 (测试化合物或干扰素 α)。一般使用每个测试化合物 6 个浓度, 从 10 微摩尔至 0.03 微摩尔。将 100 μl 测试化合物稀释物置于含 HCV 复制子细胞的 96 孔板的孔中。将不含药物的培养基添加到一些孔中作为阴性对照。已知 DMSO 影响细胞生长。因此, 对于单个剂量筛选, 如果使用在 DMSO 中稀释的药物, 则包括阴性对照 (仅培养基) 孔和阳性对照 (干扰素 α) 孔在内的所有孔都必须含有相同浓度的 DMSO。将所述板在 37℃ 下加湿的 5% CO₂ 环境中孵育 3 天。

[0349] 在第 4 天, 对 NPTII 测定进行定量。从板中倒出培养基, 用 200 μl 的 PBS 清洗所述板 1 次。然后倾倒入 PBS, 将所述板于纸巾上敲打以除去任何残留 PBS。用 100 微升 / 孔的预冷 (-20℃) 甲醇: 丙酮 (1 : 1) 将细胞原位固定, 将所述板置于 -20℃ 保持 30 分钟。

[0350] 从板中倒出固定溶液, 使所述板完全风干 (约 1 小时)。记录干燥细胞层的外观, 用肉眼对有毒孔中细胞的密度进行评分。或者, 可以使用下文所述 MTS 测定来评估细胞活力。

[0351] 在室温下, 用 200 微升封闭溶液 (10% FBS ; 3% NGS, 在 PBS 中) 封闭所述孔 30 分钟。除去封闭溶液, 将在封闭溶液中按 1 : 1000 稀释的 100 μl 兔抗 NPTII 添加到各孔中。然后将所述板在室温下孵育 45 至 60 分钟。孵育后, 用 PBS-0.05% 吐温 -20 溶液清洗孔 6 次。将 100 μl 在封闭缓冲液中按 1 : 15000 稀释的缀合铋 (EU) 的山羊抗兔抗体添加到各孔中, 并在室温下孵育 30 至 45 分钟。再次清洗所述板, 向每个孔中添加 100 μl 增强溶液 (Perkin Elmer#4001-0010)。在平板振荡器上振荡每个板 (约 30rpm) 3 分钟。从每个孔转移 95 μl 至黑色板; 在 Perkin-Elmer VICTOR 读板仪 (EU-Lance) 上对 EU 信号进行定量。

[0352] 实施例 10. 细胞毒性测定

[0353] 为了确定复制子复制的降低是由于化合物抗 HCV 复制子活性而不是非特异性的, 使用毒性测定来定量化合物细胞毒性。

[0354] 10A. 细胞毒性的细胞蛋白白蛋白测定

[0355] 细胞蛋白白蛋白测量提供了一种细胞毒性的标志物。从细胞白蛋白测定中获得的蛋白质水平还可用于为化合物抗病毒活性提供归一化的参照。在所述蛋白质白蛋白测定中, 用不同浓度的赛菊宁黄质 (helioxanthin, 已知在高浓度下具有细胞毒性的化合物) 处理含 HCV 复制子的细胞 3 天。裂解细胞, 将细胞裂解物用于在室温下 (25℃ 至 28℃) 结合

与板结合的山羊抗白蛋白抗体,持续 3 小时。然后用 1X PBS 清洗所述板 6 次。在洗去未结合的蛋白质之后,将小鼠单克隆抗人血清白蛋白用于结合板上的白蛋白。然后用磷酸酶标记的抗小鼠 IgG 作为第二抗体来检测复合物。

[0356] 10B. 细胞毒性的 MTS 测定

[0357] 还可以通过单溶液细胞增殖测定试剂盒 (CELLTITER96AQUEOUS ONE Solution Cell Proliferation Assay) (Promega, Madison WI) (一种用于确定活细胞数的比色测定) 来确定细胞活力。在该方法中,在固定细胞之前,按照生产商说明书将 10 μ l 至 20 μ l MTS 试剂添加到每个孔,将板在 37°C 孵育,并在 OD490nm 处读数。在孵育期间,活细胞将 MTS 试剂转变为吸收 490nm 处光的甲臞产物。因此 490nm 吸光度与培养物中活细胞的数目成正比。

[0358] 可以按照如下所述获得用于确定细胞毒性的细胞白蛋白方法和 MTS 方法的直接比较:用不同浓度的测试化合物或赛菊宁黄质处理细胞 3 天时间。在按照上文所述的用于检测白蛋白的裂解之前,根据生产商说明书向每个孔添加 MTS 试剂,并在 37°C 孵育,在 OD490nm 处读数。然后如上文所述进行细胞白蛋白定量。