



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101903026 B

(45) 授权公告日 2013. 05. 08

(21) 申请号 200880116387. X

(22) 申请日 2008. 09. 18

(30) 优先权数据

60/973, 309 2007. 09. 18 US

61/088, 759 2008. 08. 14 US

61/092, 537 2008. 08. 28 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010. 05. 17

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2008/076806 2008. 09. 18

(87) PCT申请的公布数据

W02009/039248 EN 2009. 03. 26

(73) 专利权人 斯坦福大学

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 谢里特·安纳夫 杰弗里·S·格伦

罗伯特·麦克道尔 文锦·杨

哈达斯·多沃里-索博尔

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理

有限公司 11262

代理人 陶贻丰 郑霞

(51) Int. Cl.

A61K 31/4184 (2006. 01)

A61P 1/16 (2006. 01)

A61P 31/12 (2006. 01)

(56) 对比文件

US 20040097438 A1, 2004. 05. 20, 参见说明书摘要, 说明书化合物 1005、1006、1095、1096、1098, 说明书第 [2124] 段.

W0 2006131737 A2, 2006. 12. 14, 参见全文.

审查员 韩征

权利要求书2页 说明书77页

序列表4页 附图14页

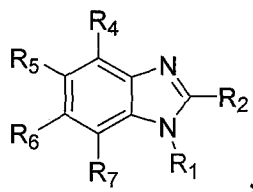
(54) 发明名称

抑制剂在制备用于治疗黄病毒家族病毒感染的药物中的用途

(57) 摘要

简单地说, 本公开内容的实施方式包括组合物、药物组合物、治疗受来自黄病毒 (Flaviviridae) 病毒家族的病毒感染的宿主的方法、治疗宿主中 HCV 复制的方法、抑制宿主中 NS4B 多肽与 HCV 负链 RNA 的 3' UTR 结合的方法、治疗宿主中肝纤维化的方法, 以及其它。

1. 抑制剂在制备用于治疗受丙型肝炎病毒感染的宿主的药物中的用途,其中所述抑制剂是具有下式的化合物:

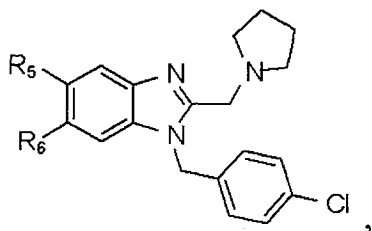


其中 R_1 为未取代的或被卤素、 $\text{C}(=\text{O})\text{O}$ 、 $\text{C}(\text{C})(\text{C})$ 、 $-\text{CH}_3$ 或 $-\text{O}$ 取代的苯甲基;

其中 R_2 选自由 $-\text{H}$ 、 $-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{OH}$ 和吡咯烷基甲基组成的组;

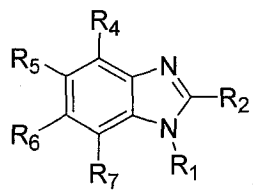
其中 R_4 – R_7 中的每一个独立地选自由以下组成的组: $-\text{H}$ 、 $-\text{Cl}$ 、 $-\text{F}$ 和 $-\text{CH}_3$ 。

2. 如权利要求 1 所述的用途,其中所述抑制剂是具有下式的化合物:

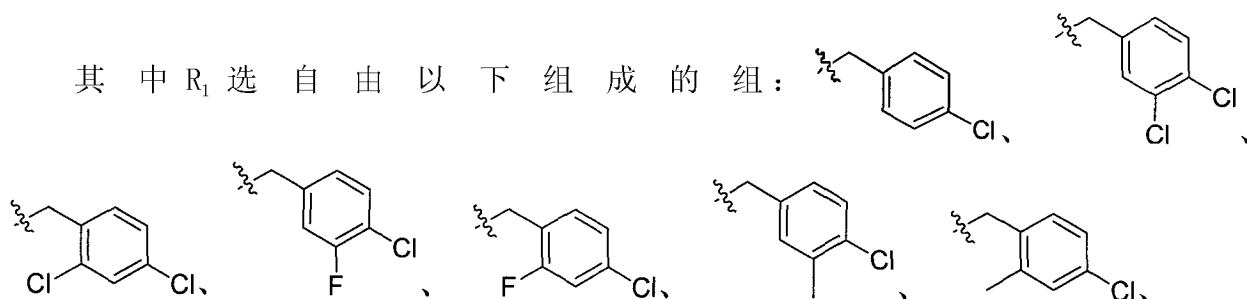


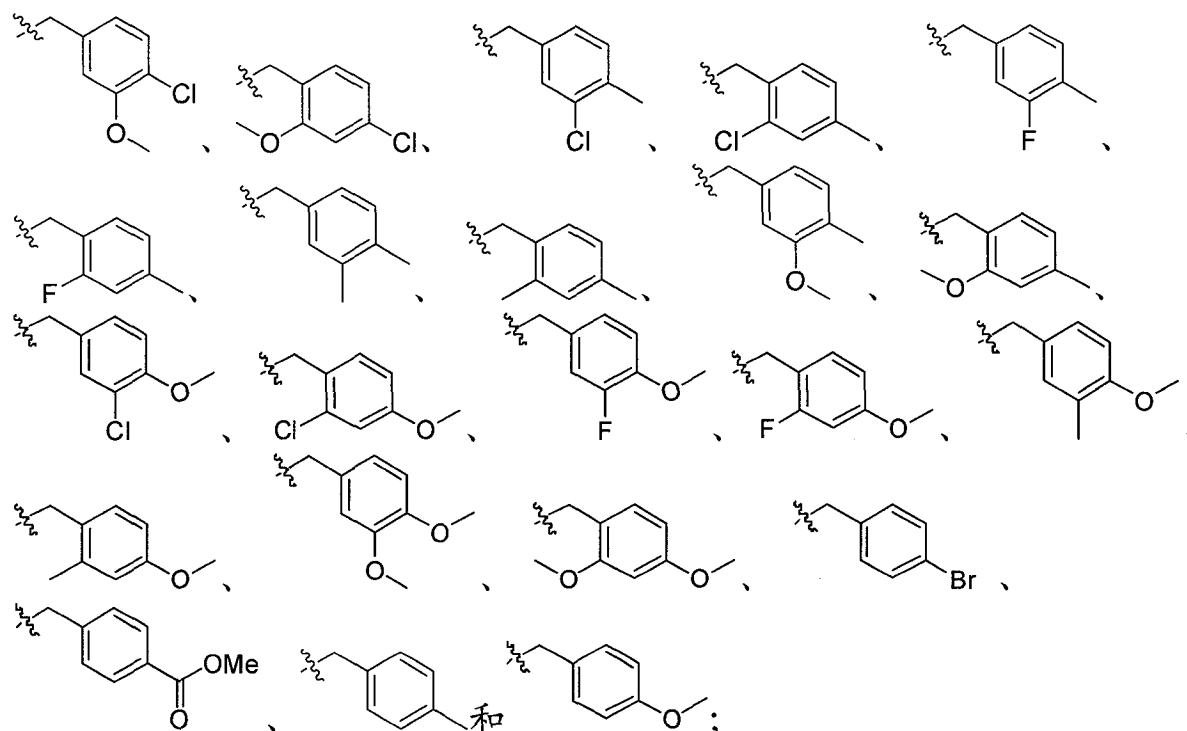
其中 R_5 和 R_6 独立地选自以下组成的组: $-\text{H}$ 、 $-\text{CH}_3$ 、 $-\text{Cl}$ 和 $-\text{F}$ 。

3. 如权利要求 1 所述的用途,其中所述抑制剂是具有下式的化合物:

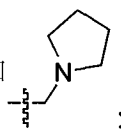


其中 R_1 选自由以下组成的组:





R_2 选自由以下组成的组：-H、-CH₃、-CH₂OH 和



R_4 是 -H；

R_5 和 R_6 独立选自由以下组成的组：-H、-CH₃、-Cl 和 -F；且

R_7 是 -H。

4. 如权利要求 1 所述的用途，其中所述抑制剂选自由以下组成的组：克立咪唑和克立咪唑的盐。

5. 如权利要求 4 所述的用途，其中所述克立咪唑的盐是克立咪唑盐酸盐，其中克立咪唑盐酸盐以每剂 15mg 至 200mg 的量被施用，其中所述克立咪唑盐酸盐每天被施用一次或者多次。

6. 如权利要求 1 所述的用途，所述药物还包括选自由以下组成的组的至少一种其他治疗剂：HCV NS3 蛋白酶抑制剂、HCV NS5B RNA- 依赖性 RNA 聚合酶抑制剂、噻唑烷和干扰素- α 。

7. 抑制剂在制备用于治疗具有 HCV 病毒感染的宿主中 HCV 复制的药物中的用途，其中所述抑制剂选自由以下组成的组：克立咪唑和克立咪唑的药用盐。

抑制剂在制备用于治疗黄病毒家族病毒感染的药物中的用途

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求 2007 年 9 月 18 日提交的名为“治疗丙型肝炎病毒感染的方法”的序列号为 60/973,309 的美国临时申请的优先权,其通过引用在文中全部并入。

[0003] 此外,本申请要求 2008 年 8 月 14 日提交的名为“用于治疗丙型肝炎病毒感染的方法和组合物”的序列号为 61/088,759 的美国临时申请的优先权,其通过引用在文中全部并入。

[0004] 此外,本申请要求 2008 年 8 月 28 日提交的名为“治疗黄病毒家族病毒感染的方法,治疗黄病毒家族病毒感染的组合物,以及鉴别用于治疗黄病毒家族病毒感染的组合物的筛选测定”的序列号为 61/092,537 的美国临时申请的优先权,其通过引用在文中全部并入。

[0005] 关于联邦资助研究的声明

[0006] 关于联邦资助研究的声明

[0007] 根据国立卫生研究院授予的基金第 R01 DK066793 和 1R01 HG002644-01A1 号,美国政府对本发明具有某些权益。

[0008] 背景

[0009] 全世界超过 1.5 亿人口受丙型肝炎病毒 (HCV) 感染。不幸的是,这些个人中的许多在目前的护理标准下不能清除他们的感染,该护理标准由用干扰素和利巴韦林的组合组成。此外,这种治疗伴随着明显的副作用,妨碍许多个体使用。因此,目前的治疗对于大部分患者是不够的,并且对于治疗 HCV 感染的新药物存在迫切需要 (参见,Annals Internal Med. 132 :296-305 (2000))。

[0010] 9.6-kb 正单链 RNA HCV 基因组编码 3,000-氨基酸多蛋白,其被蛋白水解地加工成是成熟病毒组分的结构蛋白和参与复制病毒基因组的非结构蛋白 (NS) (Curr Top Microbiol Immunol 242,55-84 (2000))。如同其它正链 RNA 病毒 (B.N.Fields、D.M.Knipe 和 P.M.Howley (编著),Fields Virology (费氏病毒学) (Lippincott-Raven Publications, Philadelphia, Pa., 1996, 于“The viruses and their replication (病毒及其复制)”中)),显示 HCV 复制与细胞内膜结构相关。在 HCV 的情况下,该结构被称为膜状网 (membranous web) (J Virol 76,5974-5984 (2002)),并且被认为由 NS4B 蛋白诱导。在 RNA 复制的明显位点内装配其它病毒 NS 蛋白也需要 NS4B (J Virol 78, 11393-11400 (2004))。病毒 RNA,尤其是产生子代基因组所需的负链模板如何可被引入或者维持在这些复制位点上是未知的。

[0011] 在该领域中,对治疗 HCV 感染的药剂和对鉴别适合治疗 HCV 感染的候选剂的方法存在持续的需要。

[0012] 概述

[0013] 简明地说,本公开内容的实施方式包括化合物组合物、药物组合物、治疗受来自黄病毒病毒家族的病毒感染的宿主的方法,治疗宿主中 HCV 复制的方法,抑制宿主中 NS4B 多

肽与 HCV 负链 RNA 的 3' UTR 结合的方法,治疗宿主中肝纤维化的方法,以及其他。

[0014] 其中,治疗受来自黄病毒病毒家族的病毒感染的宿主的一个示例性方法包括:向宿主施用治疗有效量的抑制剂以降低宿主中的病毒量。在一种实施方式中,该抑制剂选自由以下组成的组:克立咪唑、克立咪唑类似物、具有克立咪唑骨架的化合物、这些化合物中的每一个的药用盐,以及这些化合物的电子等排物。

[0015] 其中,治疗宿主中 HCV 复制的一个示例性方法包括:向具有 HCV 病毒感染的宿主施用抑制剂。在一种实施方式中,该抑制剂选自由以下组成的组:克立咪唑、克立咪唑类似物、具有克立咪唑骨架的化合物、这些化合物中的每一个的药用盐,以及这些化合物的电子等排物。

[0016] 其中,抑制在宿主中 NS4B 多肽与 HCV 负链 RNA 的 3' UTR 结合的一个示例性方法包括:向具有病毒感染的宿主施用抑制剂。在一种实施方式中,该抑制剂选自由以下组成的组:克立咪唑、克立咪唑类似物、具有克立咪唑骨架的化合物、这些化合物中的每一个的药用盐,以及这些化合物的电子等排物。

[0017] 其中,治疗宿主中肝纤维化的一个示例性方法包括:向宿主施用治疗有效量的抑制剂。在一种实施方式中,该抑制剂选自由以下组成的组:克立咪唑、克立咪唑类似物、具有克立咪唑骨架的化合物、这些化合物中的每一个的药用盐,以及这些化合物的电子等排物。

[0018] 其中,治疗受来自黄病毒病毒家族的病毒感染的宿主的一个示例性药物组合物包括:抑制剂。在一种实施方式中,该抑制剂选自由以下组成的组:克立咪唑类似物、具有克立咪唑骨架的化合物、这些化合物中的每一个的药用盐,以及这些化合物的电子等排物。

[0019] 其中,一个示例性组合物包括:抑制剂。在一种实施方式中,该抑制剂选自由以下组成的组:克立咪唑类似物、具有克立咪唑骨架的化合物、这些化合物中的每一个的药用盐,以及这些化合物的电子等排物。

[0020] 其中,一个示例性药物组合物包括:选自下组的化合物:克立咪唑类似物、具有克立咪唑骨架的化合物、这些化合物中的每一个的药用盐,以及这些化合物的电子等排物。

[0021] 附图简述

[0022] 图 1A 和 1B HCV 表示说明在多种克立咪唑和 NS3 蛋白酶抑制剂 (SCH503034) 的组合存在下,使用荧光素酶报道基因-连接的 HCV 基因组的复制测定的数据的图。

[0023] 图 2 说明基线特征和患者血清中的系列 HCV 病毒量。

[0024] 图 3 说明 HCV 正链 RNA 基因组的 5' 非翻译区和 HCV 负链 RNA 的 3' 非翻译区的 RNA 链。

[0025] 图 4A 说明合成 5,6-二取代的克立咪唑化合物的通用方法的实施方式。图 4B 和 4C 说明合成两个 5,6-二取代的克立咪唑化合物的实施方式。

[0026] 图 5a-5d 说明在微流平台上测定的蛋白质-RNA 相互作用的结果。

[0027] 图 6a 和 6b 说明显示 NS4B 特异性结合到 HCV 负链 RNA 的 3' 末端上的结果。

[0028] 图 7a-7d 说明 NS4B 内 RNA 结合结构域的鉴别以及与之相关的结果。

[0029] 图 8a-8d 说明:小分子筛选显示克立咪唑盐酸盐抑制 NS4B 结合 RNA 和体内 HCV RNA 复制。

[0030] 图 9a-9e 说明关于克立咪唑-耐受性突变体的结果。

[0031] 图 10a-10c 说明基于微流的 RNA 结合测定的图示。

[0032] 图 11a-11b 说明显示在 RNA 结合测定中信噪比的图。

[0033] 图 12a-12c 说明 RNA 与来自 ELAV- 样家族的另一人类蛋白 HuR(ELAV L1) 结合的基于微流的分析的结果。

[0034] 图 13a-13c 说明 NS4B 与 HCV RNA 结合相关的结果。

[0035] 图 14 说明显示 ATA 以剂量依赖方式抑制 RNA 与 NS4B 结合的结果。

[0036] 图 15 说明以下的结果：该结果显示如实时 PCR 测定证实，克立咪唑抑制 HCV 复制。HCV 复制水平的实时 PCR 测定显示克立咪唑抑制 HCV 复制（左轴◆（底部曲线））且对细胞没有可测量的毒性（右轴■（顶部曲线））。

[0037] 图 16 显示 RRb 突变减少了～45 倍的复制，以及包含 RRa 突变的复制子完全缺乏 RNA 复制的数字图像。

[0038] 图 17A 显示克立咪唑盐酸盐的化学结构。

[0039] 图 17B 显示具有提高的效力和功效的克立咪唑衍生分子的化学结构。

[0040] 图 17C 说明显示按照微流所测量的克立咪唑衍生分子（●）与母体克立咪唑盐酸盐化合物（□）的体外抑制曲线的图（结合的 RNA/ 蛋白质比对化合物浓度（ μ M））。

[0041] 图 17D 说明显示按照 HCV- 感染细胞中实时详细描述

[0042] PCR 测定所测量的在渐增浓度的克立咪唑衍生分子（●）和母体克立咪唑盐酸盐化合物（□）存在下的 HCV 复制的剂量反应曲线的图（相对的病毒复制对化合物浓度（ μ M））。

[0043] 详细描述

[0044] 在更详细地描述本公开内容之前，应当理解，本公开内容不限于描述的具体实施方式，因此本发明的实施方式当然可以变化。还应当理解，文中使用的术语仅出于描述具体实施方式的目的，而不是意欲限制，因为本公开内容的范围仅由所附的权利要求限制。

[0045] 除非另外定义，否则文中使用的所有技术和科学术语与本公开内容所属领域的普通技术人员通常理解的含义相同。虽然相似于或者等同于文中描述的方法和材料的任何方法和材料也可以在本发明的实践或试验中使用，但描述了优选的方法和材料。

[0046] 本说明书中引用的所有出版物和专利通过引用在此并入，就如每个个体出版物或者专利被具体地和单独地表明通过引用并入，并通过引用在此并入以公开和描述与所引用的出版物相关的方法和 / 或材料。引用早于提交日期的任何出版物的公开内容，而不应当被理解为承认由于在先公开本公开内容而没有权利居先所述出版物。此外，提供的出版物的日期可以不同于可能需要单独确认的实际出版物日期。

[0047] 阅读本公开内容之后，对于本领域技术人员将是明显的是：文中每个描述和说明的个别实施方式具有独特的组成和特征，其可以容易地不同于任何其他几个实施方式的特征或者与任何其他几个实施方式的特征结合，且不偏离本公开内容的范围或者精神。任何所述方法可以以叙述的事件顺序或者以任何逻辑上可能的其他顺序进行。

[0048] 除非另外表明，否者本公开内容的实施方式可以使用属于本领域的技术的合成有机化学、生物化学、生物学、分子生物学、重组 DNA 技术、药理学等等。这些技术在文献中予以充分地说明。

[0049] 列举文中的实施例以向本领域普通技术人员提供如何进行文中公开和要求的方法和如何使用文中公开和要求的化合物的说明性公开内容和描述。已经努力确保数字（例

如,量、温度,等)的准确性,但是应当允许一些误差和偏离。除非另外表明,份数是重量份数,温度以℃计,并且压力是或者接近大气压。标准温度和压力被定义为 20℃和 1 个大气压。

[0050] 在详细描述本公开内容的实施方式之前,应当理解,除非另外表明,否则本公开内容不限于具体材料、试剂、反应材料、制造方法,或者类似物,因为这些可以改变。也应当理解,文中使用的术语仅出于描述具体实施例的目的,而不是意欲限定。在本公开内容中也可能的是:可以以不同的顺序实施步骤,只要这是逻辑上可能的。

[0051] 应当注意的是,如说明书和所附权利要求中所用,单数形式“一(a)”,“一(an)”和“所述(the)”包括复数指代,除非上下文清楚表明之外。因此,例如言及“一种化合物”包括多种化合物。在本说明书和随后的权利要求中,提及的多个术语将被定义为具有以下意义,除非相反意图是明显的。

[0052] 定义

[0053] 在描述和要求公开的主题中,按照下面列出的定义使用下面的术语。

[0054] “黄病毒科病毒”是指任何黄病毒家族的病毒,包括感染人类和非人动物的那些病毒。编码这些病毒的多核苷酸和多肽序列是本领域熟知的,并且可以在 NCBI 的 GenBank 数据库中找到,例如,如 Genbank 登录号 NC_004102、AB031663、D11355、D11168、AJ238800、NC_001809、NC_001437、NC_004355 NC_004119、NC_003996、NC_003690、NC_003687、NC_003675、NC_003676、NC_003218、NC_001563、NC_000943、NC_003679、NC_003678、NC_003677、NC_002657、NC_002032 和 NC_001461,该数据库记录的内容通过引用将其整体并入文中。

[0055] 如文中所用,术语“治疗(treatment)”、“治疗(treating)”和“治疗(treat)”被定义为用药剂作用于疾病、病症或者疾患以减小或者减轻该疾病、病症或者疾患和/或其症状的药理和/或生理影响。如文中所用,“治疗”包括在宿主(例如,哺乳动物,通常是人类或者兽医关注的非人动物)中任何疾病的治疗,并且包括:(a)在确定易感染该疾病但未确诊为受该疾病感染的受治疗者内降低疾病发生的风险(b)阻碍疾病的发展,以及(c)减轻疾病,即使疾病消退和/或减轻一种或者多种疾病症状。“治疗”也指包括递送抑制剂以提供药理效应,即使不存在疾病或者疾患。例如,“治疗”包括在受治疗者内提供增强的或者期望的效应(例如,减少病原体量,减轻疾病症状等)的疾病或者病原体抑制剂的递送。

[0056] 如文中所用,术语“预防治疗(prophylactically treat)”或者“预防治疗(prophylactically treating)”是指完全地或者部分地预防疾病或者其症状,和/或就疾病和/或归因于疾病的副作用的部分或者完全的治愈方面而言可以是治疗性的。

[0057] 如文中所用,术语“宿主”、“受治疗者”、“患者”或者“生物”包括人类和哺乳动物(例如,小鼠、大鼠、猪、猫、狗和马)。可施用本公开内容的化合物的典型宿主将是哺乳动物,特别是灵长类,尤其是人类。对于兽医应用,很多受治疗者将是合适的,例如,家畜例如牛、绵羊、山羊、奶牛、猪以及类似动物;家禽诸如鸡、鸭、鹅、火鸡,以及类似动物;以及家养动物,特别是宠物,诸如狗和猫。用于诊断或者研究应用,很多哺乳动物将是合适的受治疗者,包括啮齿类(例如,小鼠、大鼠、仓鼠),兔,灵长类和猪,诸如近亲繁殖的猪,以及类似动物。术语“活宿主”是指活的上面描述的宿主或者其他生物。术语“活宿主”是指完整的宿主或者生物,而不是仅从活宿主切除的一部分(例如,肝或者其他器官)。

[0058] 术语“分离的化合物”是指已经基本上从与其一起天然存在的其他化合物中分离的化合物或者相对与其一起天然存在的其他化合物富集的化合物。分离的化合物的纯度按重量计通常是至少约 80%，至少 90%，至少 98%，或者至少 99%。本公开内容是指包括非对映体以及它们的外消旋和拆分的对映体纯的形式，及其药学上可接受的盐。

[0059] 如文中所用，术语“单位剂量形式”是指物理上分离的单位，其适合作为单一剂量用于人类和 / 或动物受治疗者，每个单位包含以足以产生期望效果的量计算的预定量的化合物（例如，如文中所述的抗病毒化合物）以及药学上可接受的稀释剂、载体或者赋形剂。单位剂量形式的说明取决于具体使用的化合物，施用途和频率，以及达到的效果，以及每个化合物在宿主中的药效动力学。

[0060] “药学上可接受的赋形剂”、“药学上可接受的稀释剂”、“药学上可接受的载体”或者“药学上可接受的佐剂”是指在制备药物组合物中有用的基本上安全、无毒并且非生物学不期望的或者其他方面不期望的赋形剂、稀释剂、载体和 / 或佐剂，并且包括兽医使用和 / 或人类药物使用可接受的赋形剂、稀释剂、载体和佐剂。如说明书和权利要求书中使用，“药学上可接受的赋形剂、稀释剂、载体和 / 或佐剂”包括一种和多种这种赋形剂、稀释剂、载体和佐剂。

[0061] 如文中所用，“药物组合物”是指包括适合向受治疗者，诸如哺乳动物，尤其是人类施用的组合物。总的来说，“药物组合物”是无菌的，并且优选地没有能够在受治疗者内引起不期望的反应的杂质（例如，药物组合物中的化合物是药品级）。药物组合物可以被设计用于经许多不同的施用途向需要其的受治疗者或者患者施用，该施用途包括：口服、静脉内、颊面、直肠、肠胃外、腹膜内、皮内、气管内、肌肉内、皮下、吸入以及类似途径。

[0062] 术语文中使用的术语“治疗有效量”是指将在一定程度上减轻所治疗疾病，即感染，的一种或者多种症状的所施用的药剂（其可以被称作化合物、抑制剂和 / 或药物）的实施方式的量，和 / 或将在一定程度上预防所治疗的宿主患有的或者具有发展的风险的疾病，即感染，的一种或者多种症状的量。

[0063] “药学上可接受的盐”是指保留生物学效力和任选地游离碱的其它性质，并且通过与无机酸或者有机酸反应获得的那些盐，该酸诸如盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、磷酸、甲磺酸、乙磺酸、对甲苯磺酸、水杨酸、苹果酸、马来酸、琥珀酸、酒石酸、柠檬酸，以及类似的酸。

[0064] 如果公开的药剂的实施方式形成盐，这些盐属于本公开内容的范围。除非另外表明，否则文中对任何式的药剂的引用被理解为包括对其盐的引用。如文中所用，术语“盐”表示由无机酸和 / 或有机酸和碱形成的酸式盐和 / 或碱式盐。此外，当药剂包含碱性部分和酸性部分时，可以形成两性离子（“内盐”），并且属于在文中使用的术语“盐”。优选药学上可接受的（例如，无毒的、生理上可接受的）盐，尽管其它盐也可用于，例如在制备中可能使用的分离或者纯化步骤。可以例如，在诸如使盐沉淀的介质中或者在含水介质中（然后冷冻干燥），通过将该药剂与一定量诸如等量的酸或碱反应，形成药剂化合物的盐。

[0065] 包含碱性部分的药剂的实施方式可以与多种有机酸和无机酸形成盐。示例性的酸加成盐包括乙酸盐（诸如与乙酸或者三卤代乙酸例如三氟乙酸形成的盐）、己二酸盐、藻酸盐、抗坏血酸盐、天冬氨酸盐、苯甲酸盐、苯磺酸盐、硫酸氢盐、硼酸盐、丁酸盐、柠檬酸盐、樟脑酸盐、樟脑磺酸盐、环戊烷丙酸盐、二葡萄糖酸盐、十二烷基硫酸盐、乙磺酸盐、延胡索酸盐、葡庚糖酸盐、甘油磷酸盐、半硫酸盐、庚酸盐、己酸盐、盐酸盐（由盐酸形成）、氢溴酸盐

(由氢溴酸形成)、氢碘酸盐、2-羟基乙磺酸盐、乳酸盐、马来酸盐(由马来酸形成)、甲磺酸盐(由甲磺酸形成)、2-萘磺酸盐、烟酸盐、硝酸盐、草酸盐、果胶酸盐、过硫酸盐、3-苯基丙酸盐、磷酸盐、苦味酸盐、特戊酸盐、丙酸盐、水杨酸盐、琥珀酸盐、硫酸盐(诸如由硫酸形成的盐)、磺酸盐(诸如文中提到的磺酸盐)、酒石酸盐、硫氰酸盐、甲苯磺酸盐诸如甲苯磺酸盐(tosylate)、十一酸盐,以及类似的盐。

[0066] 包含酸部分的药剂的实施方式可以与多种有机碱和无机碱形成盐。示例性碱式盐包括铵盐、碱金属盐诸如钠盐、锂盐和钾盐、碱土金属盐诸如钙盐和镁盐、有机碱(例如,有机胺)的盐,诸如苺星(benzathine)、二环己胺、海巴(hydrabamine)(由N,N-双(去氢枞基)乙二胺形成)、N-甲基-D-葡萄糖胺、N-甲基-D-葡萄糖酰胺、叔丁胺,以及诸如精氨酸、赖氨酸的氨基酸的盐,以及类似的盐。

[0067] 可以用剂诸如低级烷基卤化物(例如,甲基、乙基、丙基和丁基氯化物、溴化物和碘化物)、硫酸二烷基酯(例如,硫酸二甲酯、硫酸二乙酯、硫酸二丁酯和硫酸二戊酯)、长链卤化物(例如,癸基、月桂基、肉豆蔻基和硬脂基氯化物、溴化物和碘化物),芳烷基卤化物(例如,苺基和苺乙基溴化物),以及其他剂季铵化碱性含氮基团。

[0068] 本文还包括本公开内容的剂的溶剂化物。

[0069] 就公开的活性化合物及其盐可以以它们的互变异构体形式存在而言,本文包括所有这种互变异构体形式作为本公开内容的一部分。

[0070] 剂的所有立体异构体,诸如由于各种取代基上的不对称碳而存在的立体异构体,包括对映体形式(即使不存在不对称碳时,其也可以存在)和非对映体形式,属于本公开内容的范围。本公开内容的化合物的个体立体异构体,例如,基本上不含其它异构体,或可以被混合成例如外消旋化体,或者与所有其它的立体异构体或者其它选择的立体异构体混合。本公开内容的化合物的立体基因中心(stereogenic center)可以具有由IUPAC 1974推荐定义的S或者R构型。

[0071] 术语“前药”是指在体内转化成生物活性形式的药剂的无活性前体。前药通常是有用的,因为在一些情形下,它们比母体化合物更容易施用。例如,它们可以通过口服施用被生物利用而母体化合物则不行。在药物组合物中前药相比母体化合物也可以具有提高的溶解度。前药可以通过各种机制转化成母体药物,该机制包括酶过程和代谢水解。Harper, NJ. (1962). Jucker 编辑的 Progress in Drug Research (药物研究进展) 中的 Drug Latentiation (药物潜效化), 4:221-294; Morozowich 等 (1977). Roche 编辑的 Design of Biopharmaceutical Properties through prodrugs and analogs (经前药和类似物的生物制药性质的设计) 中的 Application of Physical Organic Principles to prodrugs Design (物理有机原理对前药设计的应用), APhA; Acad. Pharm. Sci; E. B. Roche 编辑 (1977). Bioreversible Carriers in Drug in Drug Design, Theory and Application (药物设计、理论和应用中的药物的生物可逆载体) APhA; H. Bundgaard, 编辑 (1985) Design of Prodrugs (前药设计), Elsevier; Wang 等 (1999) Prodrug approaches to the improved delivery of peptide drug (提高肽药物递送的前药途径), Curr. Pharm. Design. 5(4):265-287; Pauletti 等 (1997). Improvement in peptide bioavailability: Peptidomimetics and prodrug Strategies (肽生物利用度的进步:模拟肽学和前药策略), Adv. Drug. delivery Rev. 27:235-256; Mizen 等 (1998). The Use of Esters as

prodrugs for Oral delivery of β -Lactam antibiotics(使用酯作为前药用于 β -内酰胺抗生素的口服递送), Pharm. Biotech. 11, :345-365 ;Gaignault 等 (1996). Designing prodrugs and Bioprecursors I. Carrier Prodrugs(设计前药和生物前体 I. 载体前药), Pract. Med. Chem. 671-696 ;M. Asghamejad(2000). 在 G. L. Amidon, P. I. Lee 和 E. M. Topp 编辑的 Transport Processes in Pharmaceutical Systems(药物系统中的输送方法)中的 Improving Oral Drug Transport Via prodrugs(通过前药提高口服药物输送), Marcell Dekker, 第 185-218 页 ;Balant 等 (1990) Prodrugs for the improvement of drug absorption via different routes of administration(提高药物经不同施用途径的吸收的前药), Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet, 15(2) :143-53 ;Balimane 和 Sinko(1999). Involvement of multiple transporters in the oral absorption of nucleoside analogues(核苷类似物的口服吸收中多种转运蛋白的参与), Adv. Drug delivery Rev., 39(1-3) :183-209 ;Browne(1997). Fosphenytoin(Cerebyx)(磷苯妥英(Cerebyx)), Clin. Neuropharmacol. 20(1) :1-12 ;Bundgaard(1979). Bioreversible derivatization of drugs-principle and applicability to improve the therapeutic effects of drugs(药物的生物可逆的衍生物——改进药物的治疗效果的原理和适用性), Arch. Pharm. Chem. 86(1) :1-39 ;H. Bundgaard, 编辑 (1985) Design of Prodrugs(前药设计), New York:Elsevier ;Fleisher 等 (1996). Improved oral drug delivery : solubility limitations overcome by the use of Prodrugs(改进的口服药物递送 : 通过使用前药克服溶解度限制), Adv. Drug delivery Rev. 19(2) :115-130 ;Fleisher 等 (1985). Design of prodrugs for improved gastrointestinal absorption by intestinal enzyme targeting(通过肠酶靶向改进胃肠内吸收的前药设计), Methods Enzymol. 112 : 360-81 ;Farquhar D, 等 (1983). Biologically Reversible Phosphate-Protective Groups(生物学上可逆的磷酸酯保护基), J. Pharm. Sci. ;72(3) :324-325 ;Han, H. K. 等 (2000). Targeted Prodrug design to optimize drug delivery(最优化药物递送的靶向前药设计), AAPS PharmSci., 2(1) :E6 ;Sadzuka Y. (2000). Effective Prodrug liposome and conversion to active metabolite(有效的前药脂质体和向活性代谢物的转化), Curr. Drug Metab., 1(1) :31-48 ;D. M. Lambert(2000) Rationale and applications of lipids as Prodrug carriers(脂类作为前药载体的原理和应用), Eur. J. Pharm. Sci., 11 增刊 2 : S15-27 ;Wang, W. 等 (1999) Prodrug approaches to the improved delivery of peptide drugs(改进肽药物递送的前药方法). Curr. Pharm. Des., 5(4) :265-87。

[0072] 术语“施用”是指将本公开内容的药剂导入到宿主内。药剂的一个优选的施用途径是口服施用。另一个优选的途径是静脉内施用。然而,可以使用任何施用途径,诸如局部、皮下、腹膜内、动脉内、吸入、阴道内、直肠内、鼻内、导入脑脊液,或者滴入身体腔室。

[0073] 术语“脂肪族基团”是指饱和的和不饱和的直链或者支链烃基,并且包含例如烷基、烯基和炔基基团。

[0074] 术语“烷”或者“烷基”是指具有 1 到 12 个碳原子,优选地具有 1 到 8 个碳原子的直链或者支链烃基,诸如甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、叔丁基、戊基、己基、庚基、正辛基、十二烷基、十八烷基、戊基、2-乙基己基,以及类似基团。术语“取代烷基”是指被一个或者多个基团取代的烷基基团,所述一个或者多个基团优选地选自芳基、取代芳基、

杂环、取代杂环、碳环、取代碳环、卤代、羟基、被保护的羟基、烷氧基（例如， C_1 到 C_7 ）（任选地取代的）、酰基（例如， C_1 到 C_7 ）、芳氧基（例如， C_1 至 C_7 ）（任选地取代的）、烷基酯（任选地取代的）、芳基酯（任选地取代的）、烷酰基（任选地取代的）、芳酰基（任选地取代的）、羧基、被保护的羧基、氰基、硝基、氨基、取代氨基、（单取代）氨基、（二取代）氨基、被保护的氨基、酰氨基、内酰胺、脲、氨基甲酸乙酯、磺酰基等。

[0075] 术语“烯基”是指具有 2 到 12 个碳原子，优选地 2 到 4 个碳原子，和至少一个碳碳双键（顺式或者反式）的直链或者支链烃基，诸如乙烯基。术语“取代烯基”是指由一个或者多个基团取代的烯基基团，所述一个或者多个基团优选地选自芳基、取代芳基、杂环、取代杂环、碳环、取代碳环、卤代、羟基、烷氧基（任选地取代的）、芳氧基（任选地取代的）、烷基酯（任选地取代的）、芳基酯（任选地取代的）、烷酰基（任选地取代的）、芳酰基（任选地取代的）、氰基、硝基、氨基、取代氨基、酰氨基、内酰胺、脲、氨基甲酸乙酯、磺酰基，以及类似基团。

[0076] 术语“炔基”是指具有 2 到 12 个碳原子，优选地 2 到 4 个碳原子，和至少一个碳碳三键的直链或者支链烃基，诸如乙炔。术语“取代炔基”是指由一个或者多个基团取代的炔基基团，所述一个或者多个基团优选地选自芳基、取代芳基、杂环、取代杂环、碳环、取代碳环、卤代、羟基、烷氧基（任选地取代的）、芳氧基（任选地取代的）、烷基酯（任选地取代的）、芳基酯（任选地取代的）、烷酰基（任选地取代的）、芳酰基（任选地取代的）、氰基、硝基、氨基、取代氨基、酰氨基、内酰胺、脲、氨基甲酸乙酯、磺酰基，以及类似基团。

[0077] 术语“烷氧基”是指与氧连接的烷基基团，因此： $R-O-$ 。在这个官能团中， R 表示烷基基团。一个实例可以是甲氧基 CH_3O- 。

[0078] “有机基团”可以被官能化或者另外包含与有机基团相关的附加官能团，诸如羧基、氨基、羟基，以及类似基团，其可以是受保护的或者未被保护的。例如，短语“烷基基团”意欲不仅包括开链饱和的烃烷基取代基，诸如甲基、乙基、丙基、叔丁基，以及类似基团，还包括带有该领域已知的进一步的取代基的烷基取代基，诸如羟基、烷氧基、烷基磺酰基、卤素原子、氰基、硝基、氨基、羧基等。因此，“烷基基团”包括醚、酯、卤代烷基、硝基烷基、羧基烷基、羟基烷基、磺基烷基等。

[0079] 术语“卤代”和“卤素”是指氟、氯、溴或碘基团。可以具有一个或者多个卤素，它们是相同的或者不同的。特别关注的卤素包括氯和溴基团。

[0080] 术语“卤代烷基”是指被一个或者多个卤素原子取代的上面定义的烷基基团。卤素原子可以是相同的或者不同的。术语“二卤代烷基”是指被两个卤代基团取代的上面定义的烷基基团，卤代基团可以是相同的或者不同的。术语“三卤代烷基”是指由三个卤代基团取代的上面所述的烷基基团，卤代基团可以是相同的或者不同的。术语“全卤代烷基”是指其中烷基基团中每个氢原子已经被卤素原子取代的上面定义的卤代烷基基团。术语“全氟烷基”是指其中烷基基团中每个氢原子已经被氟基团取代的上面定义的卤代烷基基团。

[0081] 术语“环烷基”是指单环、双环或者三环饱和环，其是完全饱和的或者部分不饱和的。这种基团的实例包括环丙基、环丁基、环戊基、环己基、环庚基、金刚烷基、环辛基、顺式-或者反式萘烷、双环 [2.2.1] 庚-2-烯基、环己-1-烯基、环戊-1-烯基、1,4-环辛二烯基，以及类似基团。

[0082] 术语“（环烷基）烷基”是指由上面定义的烷基基团取代的上面定义环烷基基

团。这种基团的实例包括(环己基)甲基、3-(环丙基)-正丙基、5-(环戊基)己基、6-(金刚烷基)己基,以及类似基团。

[0083] 术语“取代苯基”是指由一个或者多个部分,并且在一些实例中由一个、两个或者三个部分取代的苯基基团,所述部分选自由以下组成的组:卤素、羟基、被保护的羟基、氰基、硝基、三氟甲基、 C_1 到 C_7 烷基、 C_1 到 C_7 烷氧基、 C_1 到 C_7 酰基、 C_1 到 C_7 酰氧基、羧基、氧羧基、被保护的羧基、羧甲基、被保护的羧甲基、羟基甲基、被保护的羟基甲基、氨基、被保护的氨基、(单取代)氨基、被保护的(单取代)氨基、(二取代)氨基、甲酰胺、被保护的甲酰胺、 $N-(C_1$ 到 C_6 烷基)甲酰胺、被保护的 $N-(C_1$ 到 C_6 烷基)甲酰胺、 N,N -二(C_1 到 C_6 烷基)甲酰胺、三氟甲基、 $N-((C_1$ 到 C_6 烷基)磺酰基)氨基、 N -(苯基磺酰基)氨基或者苯基,它们是取代的或者未取代,诸如例如,为联苯基或者萘基基团。

[0084] 术语“取代苯基”的实例包括单(卤代)苯基基团或者二(卤代)苯基基团,诸如2,3或4-氯苯基、2,6-二氯苯基、2,5-二氯苯基、3,4-二氯苯基、2,3或4-溴苯基、3,4-二溴苯基、3-氯-4-氟苯基、2,3或4-氟苯基以及类似物;单(羟基)苯基基团或者二(羟基)苯基基团,诸如2,3或4-羟基苯基、2,4-二羟基苯基,其被保护的羟基衍生物以及类似基团;硝基苯基基团,诸如2,3或4-硝基苯基;氰基苯基基团,例如,2,3或4-氰基苯基;单(烷基)苯基基团或二(烷基)苯基基团,诸如2,3或4-甲基苯基、2,4-二甲基苯基、2,3或4-(异丙基)苯基、2,3或4-乙基苯基、2,3或4-(正丙基)苯基以及类似基团;单(烷氧基)苯基基团或者二(烷氧基)苯基基团,例如,2,6-二甲氧基苯基、2,3或4-(异丙氧基)苯基、2,3或4-(叔丁氧基)苯基、3-乙氧基-4-甲氧基苯基以及类似基团;2,3或4-三氟甲基苯基;单-或二羧基苯基或(被保护的羧基)苯基基团,诸如2,3或4-羧基苯基或2,4-二(被保护的羧基)苯基;单-或二(羟基甲基)苯基或(被保护的羟基甲基)苯基诸如2,3或者4-(被保护的羟基甲基)苯基或者3,4-二(羟基甲基)苯基;单-或二(氨基甲基)苯基或者(被保护的氨基甲基)苯基,诸如2,3或4-(氨基甲基)苯基或者2,4-(被保护的氨基甲基)苯基;或者单-或二(N -(甲基磺酰基氨基))苯基,诸如2,3或4-(N -(甲基磺酰基氨基))苯基。同样,术语“取代苯基”表示二取代苯基基团,其中取代基是不同的,例如,3-甲基-4-羟基苯基、3-氯-4-羟基苯基、2-甲氧基-4-溴代苯基、4-乙基-2-羟基苯基、3-羟基-4-硝基苯基、2-羟基-4-氯苯基以及类似基团。

[0085] 术语“(取代苯基)烷基”是指连接到上述烷基基团之一的上述取代苯基基团之一。这种基团的实例包括2-苯基-1-氯乙基、2-(4'-甲氧基苯基)乙基、4-(2',6'-二羟基苯基)正己基、2-(5'-氰基-3'-甲氧基苯基)正戊基、3-(2',6'-二甲基苯基)正丙基、4-氯-3-氨基苄基、6-(4'-甲氧基苯基)-3-羧基(正己基)、5-(4'-氨基甲基苯基)-3-(氨基甲基)正戊基、5-苯基-3-氧代-正戊-1-基、(4-羟基萘-2-基)甲基以及类似基团。

[0086] 术语“芳”或者“芳基”是指优选地具有6到12个成员的含有芳族碳环(即烃)的单环、双环或者三环的基团,诸如苯基、萘基和联苯基。术语“取代芳基”是指由一个或者多个基团取代的芳基基团,所述一个或者多个基团优选地选自:烷基、取代烷基、烯基(任选地取代的)、芳基(任选地取代的)、杂环(任选地取代的)、卤代、羟基、烷氧基(任选地取代的)、芳氧基(任选地取代的)、烷酰基(任选地取代的)、芳酰基(任选地取代的)、烷基酯(任选地取代的)、芳基酯(任选地取代的)、氰基、硝基、氨基、取代氨基、酰氨基、内酰

胺、脲、氨基甲酸乙酯、磺酰基等，其中任选地一对或者多对取代基与它们键合的原子合在一起形成 3 到 7 元环。

[0087] 术语“杂芳基”是指具有诸如氧、硫和 / 或氮原子，特别是氮的 1 到 4 个杂原子的，单独地或者与硫或者氧环原子结合的，任选地取代的五元或六元环。此外，上面任选地取代五元或六元环可以任选地被稠合到芳族五元或六元环系统。例如，该环可以被任选地稠合到芳族五元或六元环系统，诸如吡啶或者三唑系统，以及优选地稠合到苯环。

[0088] 下面的环系统是术语“杂芳基”表示的杂环（取代或者未取代的）基团的实例：噻吩基、呋喃基、吡咯基、吡咯烷基、咪唑基、异噻唑基、三唑基、噻二唑基、噁二唑基、四唑基、噻三唑基、噁三唑基、吡啶基、嘧啶基、吡嗪基、哒嗪基、噁嗪基、三嗪基、噻二嗪基四唑并、1,5-[b] 哒嗪基和嘌呤基，以及苯并 - 稠合衍生物，例如，苯丙噻唑基、苯并噻唑基、苯并咪唑基和吲哚基。

[0089] 上面的任选取代杂芳基环的取代基可以包括一个到三个卤代、三卤甲基、氨基、被保护的氨基、氨基盐、单 - 取代氨基、双 - 取代氨基、羧基、被保护的羧基、羧酸盐、羟基、被保护的羟基、羟基基团的盐、低级烷氧基、低级烷基硫、烷基、取代烷基、环烷基、取代环烷基、（环烷基）烷基、取代（环烷基）烷基、苯基、取代苯基、苯基烷基和（取代苯基）烷基。杂芳基基团的取代基如之前所定义，或者在三卤甲基的情况下，可以是三氟甲基、三氯甲基、三溴甲基或者三碘甲基。如结合上面杂芳基环的取代基使用，“低级烷氧基”是指 C_1 到 C_4 烷氧基基团，类似地，“低级烷基硫”是指 C_1 到 C_4 烷基硫基团。

[0090] 术语“杂环 (heterocycle)”、“杂环的 (heterocyclic)”、“杂环基团 (heterocyclic group)”或者“杂环 (heterocyclo)”是指完全饱和的或者部分不饱和的或者完全不饱和的，包括在至少一个含碳原子的环中具有至少一个杂原子的芳族（“杂芳基”）或者非芳族环状基团（例如，3 到 13 元单环、7 到 17 元双环，或者 10 到 20 元三环环系统，优选地包含总计 3 到 10 个环原子）。含有杂原子的杂环基团的每个环可以具有 1、2、3 或者 4 个杂原子，其选自：氮原子、氧原子和 / 或硫原子，其中氮和硫杂原子可以任选地被氧化，并且氮杂原子可以任选地被季铵化。杂环基团可以在环或者环系统的任何杂原子或者碳原子处连接。多环杂环的环可以是稠环，桥环和 / 或通过一个或者多个螺接结合环。

[0091] 示例性单环杂环基团包括：吡咯烷基、吡咯基、吡唑基、氧杂环丁烷基、吡唑啉基、咪唑基、咪唑啉基、咪唑烷基、噁唑基、噁唑烷基、异噻唑啉基、异噻唑基、噻唑基、噻二唑基、噻唑烷基、异噻唑基、异噻唑烷基、呋喃基、四氢呋喃基、噻吩基、噁二唑基、哌啶基、哌嗪基、2-氧代哌嗪基、2-氧代哌啶基、2-氧代吡咯烷基、2-氧代氮杂基、氮杂基、4-哌啶酮基、吡啶基、吡嗪基、嘧啶基、哒嗪基、三嗪基、四氢吡喃基、四唑基、三唑基、吗啉基、硫代吗啉基、硫代吗啉基亚砷、硫代吗啉基砷、1,3-二氧戊环以及四氢 -1,1-二氧噻吩基，以及类似基团。

[0092] 示例性双环杂环基团包括：吲哚基、苯并噻唑基、苯并噁唑基、苯并噻吩基、奎宁环基、喹啉基、四氢异喹啉基、异喹啉基、苯并咪唑基、苯并吡喃基、吲哚基、苯并呋喃基 (benzofuryl)、苯并呋喃基 (benzofuranyl)、二氢苯并呋喃基、色酮基、香豆素基、苯并间二氧杂环戊烯基、二氢苯并间二氧杂环戊烯基、苯并二噁英基 (benzodioxinyl)、噌啉基、喹啉基、吲唑基、吡咯并吡啶基、呋喃并吡啶基（诸如呋喃并 [2,3-c] 吡啶基、呋喃并 [3,2-b] 吡啶基）或者呋喃并 [2,3-b] 吡啶基）、二氢异吲哚基、二氢喹啉基（诸如 3,4-二氢 -4-氧代 - 喹啉基）、四氢喹啉基、氮杂双环烷基（诸如 6-氮杂双环 [3.2.1] 辛烷）、氮

杂螺烷基（诸如 1,4 二氧杂 -8- 氮杂螺 [4.5] 癸烷）、咪唑并吡啶基（诸如咪唑并 [1,5-a] 吡啶 -3- 基）、三唑并吡啶基（诸如 1,2,4- 三唑并 [4,3-a] 吡啶 -3- 基），以及六氢咪唑并吡啶基（诸如 1,5,6,7,8,8a- 六氢咪唑并 [1,5-a] 吡啶 -3- 基），以及类似基团。

[0093] 示例性三环杂环基团包括咪唑基、苯并咪唑基 (benzimidolyl)、菲咯啉基、吡啶基、菲啶基、咕吨基以及类似基团。

[0094] 术语“取代杂环 (substituted heterocycle)”、“取代杂环的 (substituted heterocyclic)”、“取代杂环基团 (substituted heterocyclic group)”以及“取代杂环 (substituted heterocycle)”是指由一个或者多个基团取代的杂环 (heterocycle)、杂环的和杂环 (heterocycle) 基团，所述一个或者多个基团优选地选自烷基、取代烷基、烯基、氧代、芳基、取代芳基、杂环、取代杂环、碳环（任选地取代的）、卤代、羟基、烷氧基（任选地取代的）、芳氧基（任选地取代的）、烷酰基（任选地取代的）、芳酰基（任选地取代的）、烷基酯（任选地取代的）、芳基酯（任选地取代的）、氰基、硝基、酰氨基、氨基、取代氨基、内酰胺、脲、氨基甲酸乙酯、磺酰基等，其中任选地一对或者多对取代基与它们所键合的原子合在一起形成 3 到 7 元环。

[0095] 术语“烷酰基”是指与羰基基团连接的烷基基团（其可以是如上面所述任选地取代的）（即， $-\text{C}(\text{O})-\text{烷基}$ ）。类似地，术语“芳酰基”是指与羰基基团连接的芳基基团（其可以是如上述任选地取代的）（即 $-\text{C}(\text{O})-\text{芳基}$ ）。

[0096] 术语“（单取代）氨基”是指具有一个取代基的氨基基团，所述取代基优选地选自由以下组成的组：苯基、取代苯基、烷基、取代烷基、 C_1 到 C_4 酰基、 C_2 到 C_7 烯基、 C_2 到 C_7 取代烯基、 C_2 到 C_7 炔基、 C_7 到 C_{16} 烷基芳基、 C_7 到 C_{16} 取代烷基芳基和杂芳基基团。（单取代）氨基可以额外地具有术语“被保护的（单取代）氨基”所包含的氨基保护基。术语“（二取代）氨基”是指具有两个选自以下组成的组的取代基的氨基基团：苯基、取代苯基、烷基、取代烷基、 C_1 到 C_7 酰基、 C_2 到 C_7 烯基、 C_2 到 C_7 炔基、 C_7 到 C_{16} 烷基芳基、 C_7 到 C_{16} 取代烷基芳基和杂芳基。两个取代基可以是相同的或者是不同的。

[0097] 术语“杂芳基（烷基）”是指在任何位置被如上定义的杂芳基基团取代的上面定义的烷基基团。

[0098] “电子等排物”是具有不同分子式但具有相似或者相同外层电子排列并且具有相似性质（例如，药学性质（例如，药物动力学和药代动力学））的不同的原子、分子或者离子。

[0099] 讨论

[0100] 本公开内容的实施方式提供治疗黄病毒病毒家族的病毒引起的病毒感染的方法，用于治疗黄病毒病毒家族的成员引起的感染的组合物（包括抑制剂和这种药剂与其他抗病毒治疗的组合），以及类似物。具体地，本发明的实施方式提供治疗由丙型肝炎病毒引起的感染的方法和由丙型肝炎病毒引起的感染的组合物。

[0101] 本公开内容的实施方式提供预防性治疗黄病毒病毒家族的病毒引起的病毒感染的方法，用于预防性治疗由黄病毒病毒家族的成员引起的感染的组合物（其包括抑制剂和这种药剂与其他抗病毒治疗的组合），以及类似物。具体地说，本发明的实施方式提供用于预防性治疗丙型肝炎病毒的方法和用于治疗丙型肝炎病毒的组合物。

[0102] 本发明的实施方式提供组合物（其包括药物组合物），所述组合物包括可以用于

治疗受黄病毒病毒家族的病毒感染的宿主的抑制剂。具体地说,该抑制剂可以用于治疗被丙型肝炎病毒感染的宿主。该抑制剂可以是下面的组中的一种或者多种:克立咪唑、克立咪唑类似物和具有克立咪唑骨架的化合物;以及前述组的任何一组中的化合物的电子等排物。

[0103] 如实施例 1 中所描述,已经观察到,HCV NS4B 结合 HCV RNA 的 3' -UTR。这种相互作用已经用于鉴定抑制剂,该抑制剂干扰相互作用,并因此是作为治疗 HCV 感染的药物的临床研究的候选物。

[0104] 文中所述的抑制剂在病毒感染的治疗中是有用的,其中所述病毒是编码 NS4B 的病毒。编码 NS4B 的病毒包括黄病毒家族病毒,其包括,但不限于,虫媒病毒、鼠疫病毒和丙型肝炎病毒。其他编码 NS4B 的病毒包括黄热病病毒 (YFV);登革热病毒,其包括登革热 1-4 型;日本脑炎病毒;墨莱溪谷脑炎病毒;圣路易斯脑炎病毒;西尼罗河病毒;蜱传播的脑炎病毒;丙型肝炎病毒 (HCV);库京病毒;中欧脑炎病毒;俄罗斯春夏型脑炎病毒;波瓦桑病毒;科萨努尔森林病病毒;以及鄂木斯克出血热病毒。在一种实施方式中,用于抑制 HCV 复制和治疗 HCV 感染中的抑制剂(例如,抗-HCV 药物)是特别受关注的。本公开内容包括的 HCV 可以具有任何基因型(基因型 1、2、3、4、5、6,以及类似),以及 HCV 基因型的亚型(例如,1a、1b、2a、2b、3a 等)。因为 HCV 基因型 1 通常是最难治疗的,用于治疗 HCV 基因型 1 和基因型 1 亚型引起的感染的本发明的组合物和方法是特别受关注的。

[0105] 当说明书下面提到 HCV 时,这种提及仅仅为了清晰,并且不是意欲如下面对 HCV 更加详细地描述来限制本公开内容。如上面所注,本发明的方法和组合物可以被应用于编码核苷酸-结合 NS4B 蛋白的任何病毒(例如,具有结合 HCV 负链 RNA 的 3' -UTR 的 NS4B 多肽的黄病毒科病毒)。

[0106] 本公开内容描述鉴定调节 RNA 结合到 RNA-结合蛋白的药剂(抑制剂)的体外无细胞方法。抑制 NS4B 多肽与 HCV 负链 RNA 的 3' -UTR 结合的试验剂可以在基于细胞的测定中进一步测试其抑制 HCV 复制的能力。例如,可以使受关注的试验剂与含有所有或者部分 HCV 基因型的哺乳动物细胞接触;并且测量试验剂对 HCV 复制的作用。合适的细胞包括允许 HCV 复制的哺乳动物肝细胞,例如,允许 HCV 的无限繁殖化人类肝细胞系。例如,合适的哺乳动物细胞是 Huh7 肝细胞或者 Huh7 肝细胞的亚克隆,例如,Huh-7.5。合适的细胞系描述于,例如,Blight 等(2002)J. Virol. 76:13001;和 Zhang 等(2004)J. Virol. 78:1448。在一种实施方式中,细胞中 HCV 基因组包括报道基因,例如,编码荧光素酶、荧光蛋白,或者提供可检测信号的其他蛋白的核苷酸序列;并且检测试验剂对 HCV 复制的作用(如果有的话)是通过检测来自报道基因的信号来完成。

[0107] 在一种实施方式中,试验剂是有机部分。在这种实施方式中,如在 WO 94/24314 中一般描述的,试验剂由可以被化学修饰的一系列底物合成,该专利通过引用在此并入。文中“化学修饰”包括常规化学反应以及酶反应。这些底物一般包括,但不限于,烷基基团(包括烷基、烯基、炔基和杂烷基)、芳基基团(包括芳烃和杂芳基)、醇类、醚类、胺类、醛类、酮类、酸类、酯类、酰胺类、环状化合物、杂环化合物(包括嘌呤、嘧啶、苯并二氮杂卓、 β -内酰胺、四环素、头孢菌素以及碳水化合物)、类固醇(包括雌激素、雄激素、可的松、蜕皮激素等)、生物碱类(包括麦角类、长春花属、箭毒、吡咯烷士定(pyrollizidine)和丝裂霉素)、有机金属化合物、具有杂原子的化合物、氨基酸和核苷。可以在该部分完成化学(包括酶)反应以

形成新的底物或者候选药物,其然后可以使用本方法测试。

[0108] 因此,在一种实施方式中,与不存在试验剂时 HCV 复制水平相比,受关注的试验剂(例如,本发明的抑制剂)将 HCV 复制抑制了至少约 5%、至少约 10%、至少约 15%、至少约 20%、至少约 25%、至少约 30%、至少约 35%、至少约 40%、至少约 45%、至少约 50%、至少约 60%、至少约 70%、至少约 80%,或者至少约 90%,或者更多。

[0109] 具体地说,本发明的实施方式包括以下的抑制剂:与不存在试验剂时 NS4B 多肽与 HCV 负链 RNA 的 3' UTR 结合相比,该抑制剂将 NS4B 多肽 与 HCV 负链 RNA 的 3' UTR 结合抑制了至少约 5%、至少约 10%、至少约 15%、至少约 20%、至少约 25%、至少约 30%、至少约 35%、至少约 40%、至少约 45%、至少约 50%、至少约 60%、至少约 70%、至少约 80%,或者至少约 90%,或者更多。

[0110] 在一种实施方式中,抑制剂是以以下的 50%抑制浓度 (IC_{50}) 抑制 NS4B 多肽与 HCV 负链 RNA 的 3' UTR (SEQ ID NO :2) 结合的抑制剂:约 100 μ M 到 50 μ M、约 50 μ M 到 25 μ M、约 25 μ M 到 10 μ M、约 10 μ M 到 5 μ M、约 5 μ M 到 1 μ M、约 1 μ M 到 500nM、约 500nM 到 400nM、约 400nM 到 300nM、约 300nM 到 250nM、约 250nM 到 200nM、约 200nM 到 150nM、约 150nM 到 100nM、约 100nM 到 50nM、约 50nM 到 30nM、约 30nM 到 25nM、约 25nM 到 20nM、约 20nM 到 15nM、约 15nM 到 10nM、约 10nM 到 5nM,或者少于约 5nM。

[0111] 在一种实施方式中,抑制剂抑制 NS4B 与负链 HCV RNA 的 3' UTR 的结合。在一种实施方式中,抑制剂以小于约 500nM 的 IC_{50} 抑制 NS4B 与负链 HCV RNA 的 3' UTR 的结合,例如,在一些实施方式中,抑制剂以以下的 IC_{50} 抑制 NS4B 与负链 HCV RNA 的 3' UTR 的结合:约 500nM 到 400nM、约 400nM 到 300nM、约 300nM 到 250nM、约 250nM 到 200nM、约 200nM 到 150nM、约 150nM 到 100nM、约 100nM 到 50nM、约 50nM 到 30nM、约 30nM 到 25nM、约 25nM 到 20nM、约 20nM 到 15nM、约 15nM 到 10nM、约 10nM 到 5nM,或者少于约 5nM。

[0112] 在一种实施方式中,抑制剂当与 HCV- 感染的细胞(例如,HCV- 感染的肝细胞)接触时,与未与抑制剂接触的 HCV- 感染细胞中 HCV 复制的水平相比,该抑制剂在细胞中将 HCV 复制抑制了至少约 5%、至少约 10%、至少约 15%、至少约 20%、至少约 25%、至少约 30%、至少约 35%、至少约 40%、至少约 45%、至少约 50%、至少约 60%、至少约 70%、至少约 80%,或者至少约 90%,或者更多。

[0113] 在一种实施方式中,抑制剂当与 HCV- 感染的细胞(例如,HCV- 感染的肝细胞)接触时,与由未与抑制剂接触的细胞产生的感染 HCV 病毒颗粒的数量相比,该抑制剂将由 HCV- 感染的细胞产生的感染的 HCV 病毒颗粒的量减少了至少约 5%、至少约 10%、至少约 15%、至少约 20%、至少约 25%、至少约 30%、至少约 35%、至少约 40%、至少约 45%、至少约 50%、至少约 60%、至少约 70%、至少约 80%,或者至少约 90%,或者更多。

[0114] 在一种实施方式中,除了测定试验剂对抑制 NS4B 结合 HCV 负链 RNA 的 3' UTR 的作用,使用熟知的测定,诸如台盼蓝染色排除,MTT(溴化 3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基-2H-四唑)测定,以及类似测定,评价试验剂可针对活的真核细胞显示的任何细胞毒素活性。不显示显著的细胞毒素活性的药剂被认为是用于进一步开发成药物的优选药剂。在一种实施方式中,抑制剂当以一种或者多种剂量施用于 HCV- 感染的个体(例如,人)时,与未用抑制剂治疗的个体中 HCV 病毒量相比,该抑制剂将个体中的 HCV 病毒量减少了至少约 5%、至少约 10%、至少约 15%、至少约 20%、至少约 25%、至少约 30%、至少约 35%、

至少约 40%、至少约 45%、至少约 50%、至少约 60%、至少约 70%、至少约 80%，或者至少约 90%，或者更多。

[0115] 抑制剂

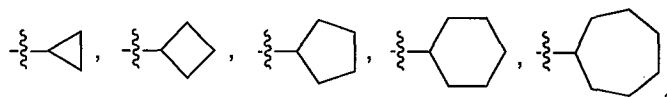
[0116] 本公开内容的实施方式提供可以用于治疗由黄病毒病毒家族的病毒感染的宿主的抑制剂。具体地说，抑制剂可以被用于治疗丙型肝炎病毒感染的宿主。抑制剂可以是下面的组中的一种或者多种：克立咪唑，克立咪唑类似物和具有克立咪唑骨架的化合物；这些化合物中的每一个的药用盐；以及前述组的任何一组中的化合物的电子等排物。本发明的实施方式包括抑制剂的盐。本发明的实施方式包括抑制剂的前药。本发明的实施方式包括组合物、药物组合物、液体组合物、凝胶组合物，以及类似物，每个包含文中鉴定的抑制剂，并且在一种实施方式中，这些组合物中的每一个可以是控释制剂或者持续释放制剂的形式。在一种实施方式中，抑制剂可以与用于治疗黄病毒家族病毒感染的其它药剂联合使用，并且如前面所述，该药剂（抑制剂和其它药剂）的任何一种或者两种药剂可以是控释或者持续释放的形式。在一些实例中，术语“抑制剂”可以被称作活性药剂或者药物。

[0117] 如上面所提到的，抑制剂可以是下面的组中的一种或者多种：克立咪唑、克立咪唑类似物，以及具有克立咪唑骨架的化合物；以及前述组的任何一组中的任何化合物的电子等排物。例如，本发明实施方式的抑制剂包括 H1 受体拮抗剂，其具有与克立咪唑的类似结构并且显示出抗病毒活性。

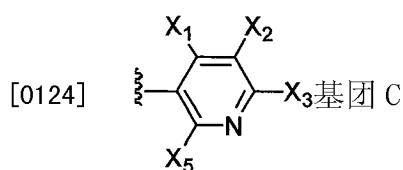
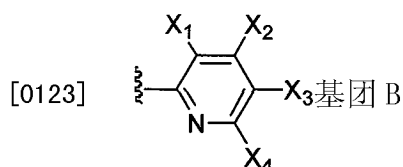
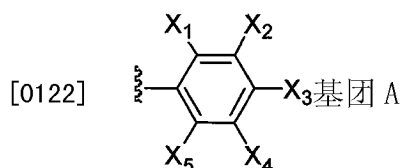
[0118] 在下面化合物的描述中，上面定义的术语具有它们定义的含义，并且下面提到的定义描述所述抑制剂优选的实施方式。本部分描述的优选实施方式中提及“芳基基团”和/或“烷基基团”是指芳基和烷基的优选实施方式定义。

[0119] 术语“烷基”是指诸如甲基、乙基、异丙基、异丁基和三氟甲基的基团。此外，对于这些实施方式，术语烷基包括具有以下结构之一的基团：

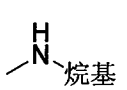
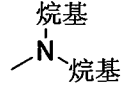
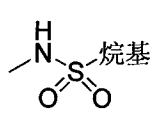
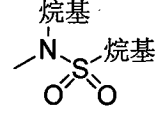
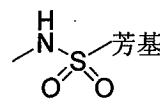
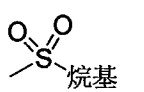
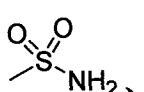
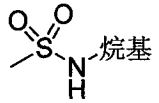
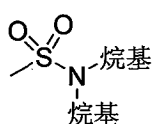
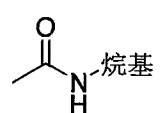
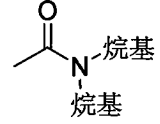
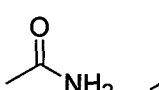
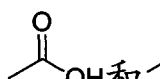
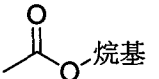
[0120]



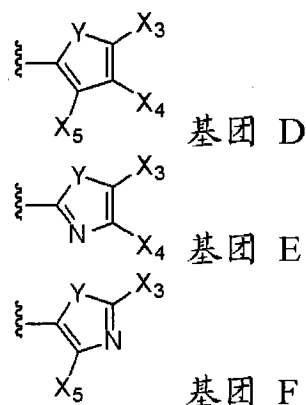
[0121] 术语“芳基”是指选自以下基团 A-F 的基团。



[0125] 其中，当存在于基团 A、B，和 C 的化合物中时， X_1 - X_5 各自独立地选自

由以下组成的组：-H、-烷基、-Br、-Cl、-F、-O-烷基、、、、、、、、、、、、、和。在一种实施方式中，基团 C 的至少一个位置 (X1-X4 和 X5) 被取代 (非氢)。

[0126]

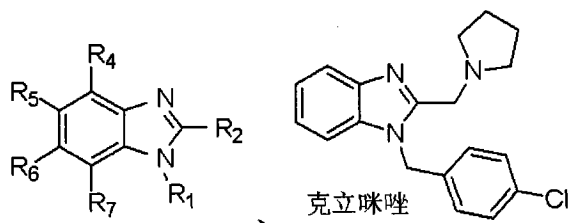


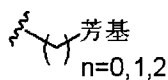
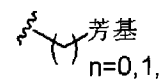
[0127] 其中在基团 D、E 和 F 的化合物中，Y 选自由以下组成的组：-O、-S、-NH、-N-烷基和 -N-酰基；X₃ 选自由以下组成的组：-H、-CH₃、-Cl、-F、CF₃ 和 -OCH₃；以及当 X₄ 和 X₅ 存在时，它们独立地选自由 H 和 CH₃ 组成的组。

[0128] 如上面所注，抑制剂包括，但不限于，克立咪唑、克立咪唑类似物和具有克立咪唑骨架的化合物；以及前述组的任何一组中的任何化合物的电子等排物。

[0129] 因此，本发明的实施方式包括克立咪唑和具有克立咪唑骨架的抑制剂。克立咪唑和具有克立咪唑骨架的化合物的结构在下面表示 (克立咪唑骨架显示在左，克立咪唑在右)。

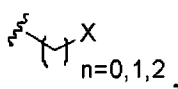
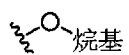
[0130]

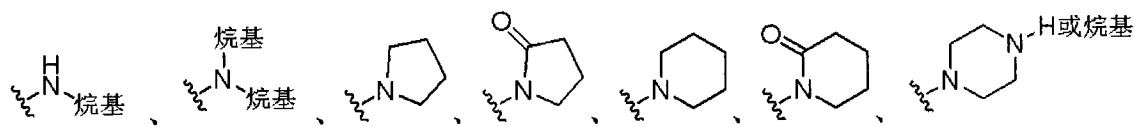


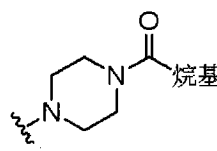
[0131] 在克立咪唑骨架的实施方式中，R₁ 选自由以下组成的组：-H、和 。在一种实施方式中，R₁ 是 ，并且芳基基团 (上面所示的基团 A-F)

在 X₃ 处被取代。在一种实施方式中，芳基和烷基基团可以选自本部分所述的优选实施方式。

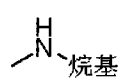
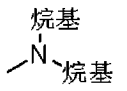
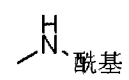
[0132] 在克立咪唑骨架的实施方式中，R₂ 选自由以下组成的组：-H

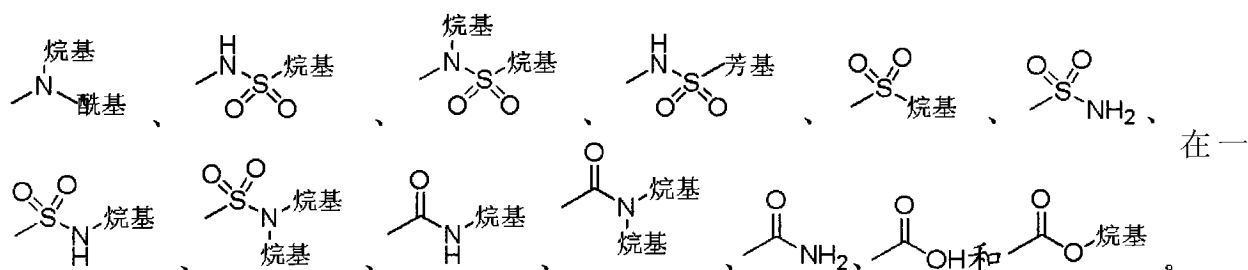
和  $n=0,1,2$, 其中 X 选自由以下组成的组: -烷基、-芳基、、



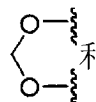
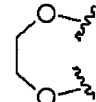
 一种实施方式中, 芳基和烷基基团可以选自本部分所述优选

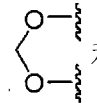
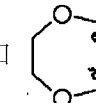
的实施方式。

[0133] 在克立咪唑骨架的实施方式中, R_4 - R_7 中的每一个独立地选自由以下组成的组: -H、-Cl、-F、-CH₃、-OCH₃、NH₂、、、、



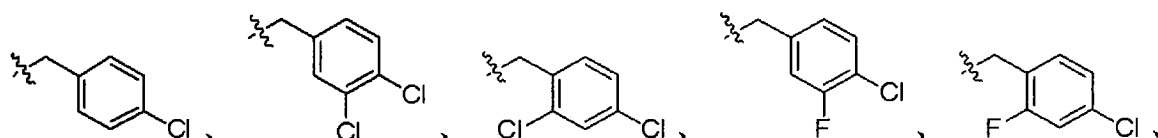
种实施方式中, 烷基基团可以选自本部分描述的优选实施方式。在一种实施方式中, 这些位置中仅有两个 (R_4 - R_7 中的两个) 被取代, 并且每个取代位置的取代部分独立地选自由以下组成的组: -Cl、-F、-CH₃ 和 -OCH₃, 而其他位置是未取代的 (在这种位置具有 -H)。在另一实施方式中, R_5 和 R_6 是取代的, 并且每个取代位置的取代部分独立地选自由以下组成的组: -Cl、-F、-CH₃ 和 -OCH₃, 而 R_4 和 R_7 是未取代的。

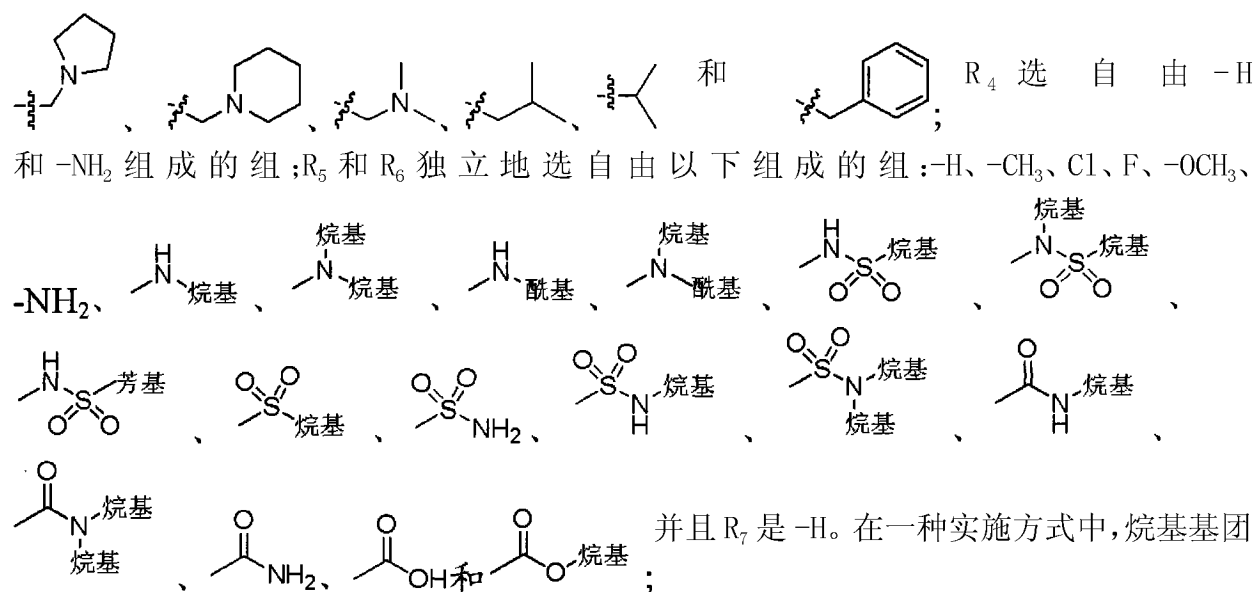
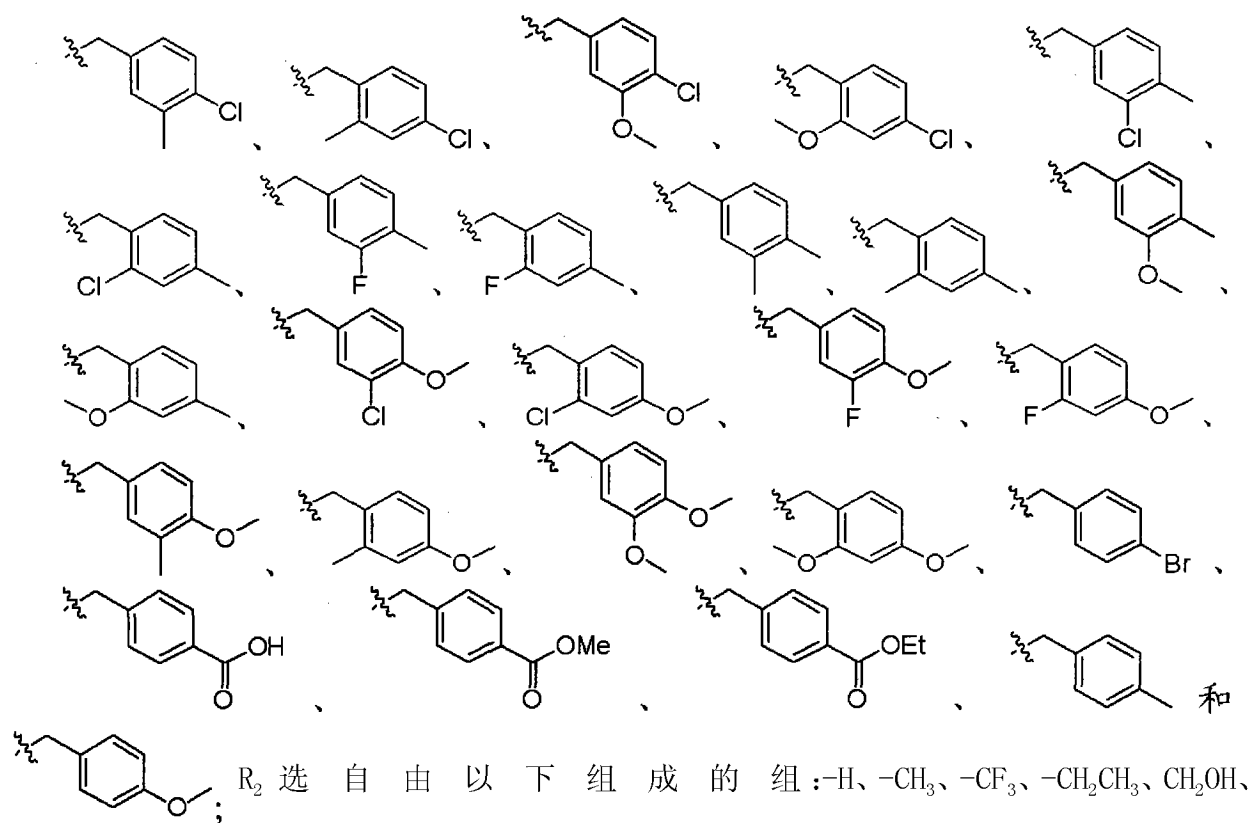
[0134] 在克立咪唑骨架的实施方式中, 一组或者多组邻接基团 (R_4 和 R_5 、 R_5 和 R_6 , 或者 R_6 和 R_7) 通过含有 5 至 7 个原子的环连接。在一种实施方式中, 环包括选自由 和

组成的组的结构。在一种实施方式中, R_5 和 R_6 通过一个具有选自由 和组成的

组的结构的环连接。

[0135] 在克立咪唑骨架的实施方式中, R_1 选自由以下组成的组:



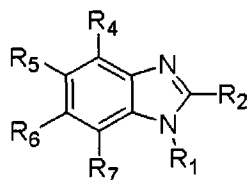


可以选自本部分描述的优选实施方式。

[0136] 本发明的抑制剂的附加实施方式包括克立咪唑和具有克立咪唑骨架的化合物的电子等排物。克立咪唑的苯并咪唑核结构的电子等排物包括下面结构定义的化合物（显示苯并咪唑核结构作参考；在每个结构中 R_1 - R_2 和 R_4 - R_7 如上面所定义并且 R_3 可以是诸如由 R_4 - R_7 所述的基团）。

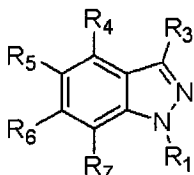
[0137] 下面的结构是苯并咪唑核结构。

[0138]



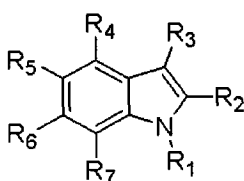
[0139] 下面的化合物是咪唑核结构——苯并咪唑核结构的电子等排物。

[0140]



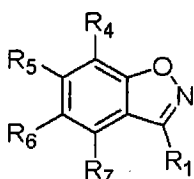
[0141] 以下化合物是咪唑核结构——苯并咪唑核结构的电子等排物。

[0142]



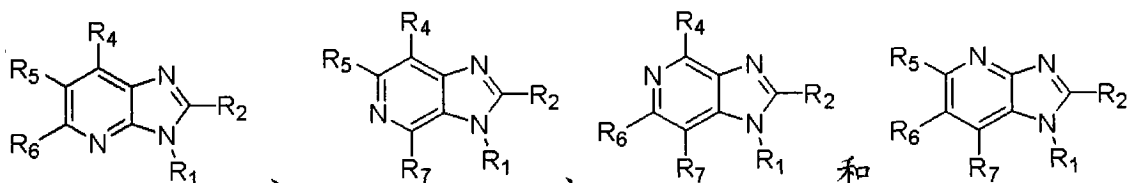
[0143] 以下化合物是苯并异噁唑核结构——苯并咪唑核结构的电子等排物。

[0144]



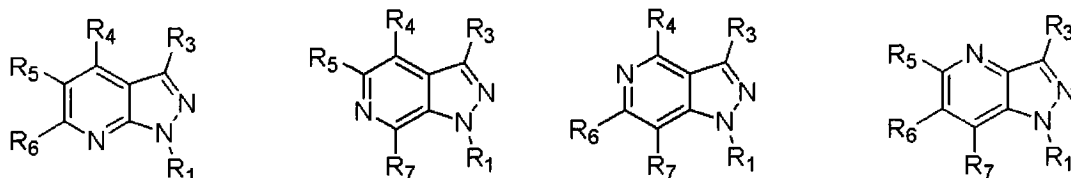
[0145] 以下化合物是咪唑并吡啶核结构——苯并咪唑核结构的电子等排物。

[0146]



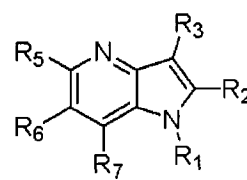
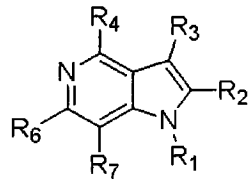
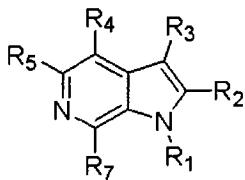
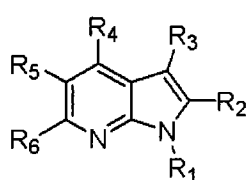
[0147] 以下化合物是吡唑并吡啶核结构——苯并咪唑核结构的电子等排物。

[0148]



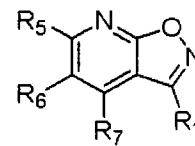
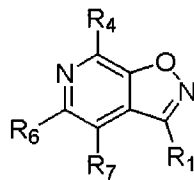
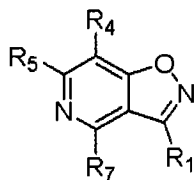
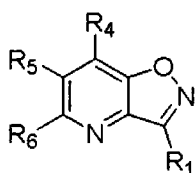
[0149] 以下化合物是吡咯并吡啶（氮杂咪唑）核结构——苯并咪唑核结构的电子等排物。

[0150]



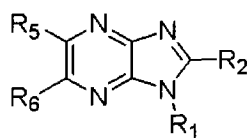
[0151] 以下化合物是异噁唑并吡啶核结构——苯并咪唑核结构的电子等排物。

[0152]



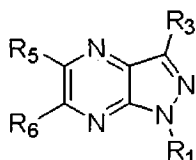
[0153] 以下化合物是咪唑并吡嗪核结构——苯并咪唑核结构的电子等排物。

[0154]



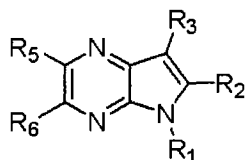
[0155] 以下化合物是吡唑并吡嗪核结构——苯并咪唑核结构的电子等排物。

[0156]



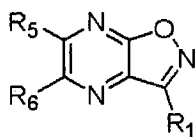
[0157] 以下化合物是吡咯并吡嗪核结构——苯并咪唑核结构的电子等排物。

[0158]



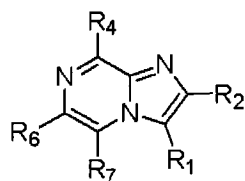
[0159] 以下化合物是异噁唑并吡嗪核结构——苯并咪唑核结构的电子等排物。

[0160]



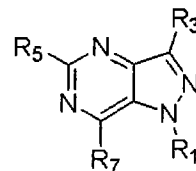
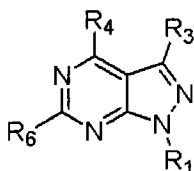
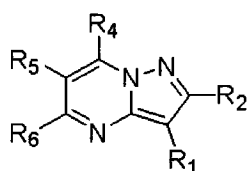
[0161] 以下化合物是咪唑并吡嗪核结构——苯并咪唑核结构的电子等排物。

[0162]



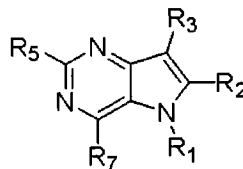
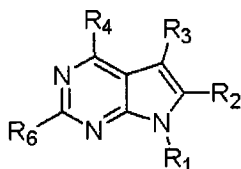
[0163] 以下化合物是吡唑并嘧啶核结构——苯并咪唑核结构的电子等排物。

[0164]



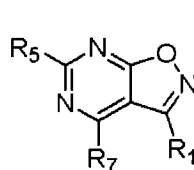
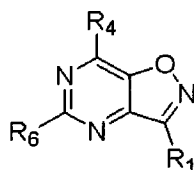
[0165] 以下化合物是吡咯并嘧啶核结构——苯并咪唑核结构的电子等排物。

[0166]



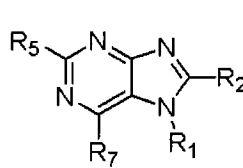
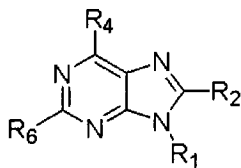
[0167] 以下化合物是异噁唑并嘧啶核结构——苯并咪唑核结构的电子等排物。

[0168]



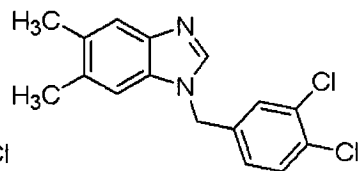
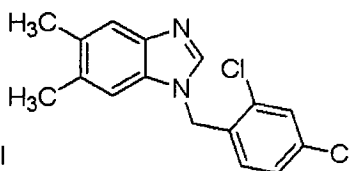
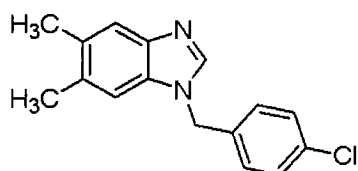
[0169] 以下化合物是嘌呤核结构——苯并咪唑核结构的电子等排物。

[0170]



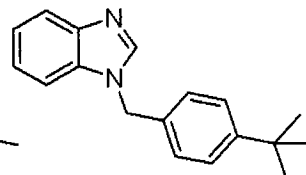
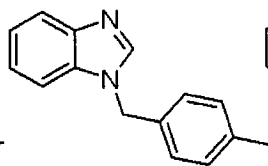
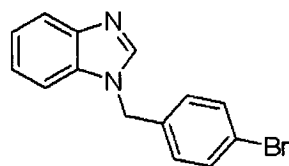
[0171] 在一种实施方式中,抑制剂是具有以下结构之一的化合物:

[0172]

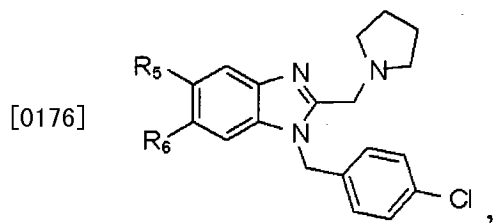


[0173] 在一种实施方式中,抑制剂是具有以下结构之一的化合物:

[0174]

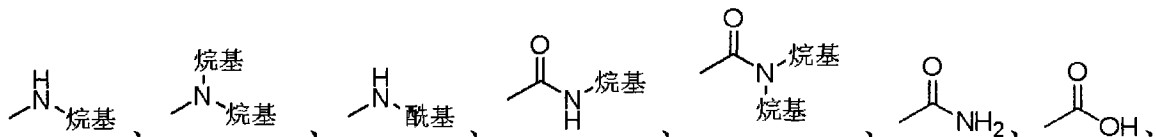


[0175] 在一种实施方式中,抑制剂包括 5,6- 双取代克立咪唑化合物。在一种实施方式中,抑制剂包括新的 5,6- 双取代克立咪唑化合物,其中取代不包括二乙氧基取代。在一种实施方式中,抑制剂可以包括下面结构的 5,6- 双取代克立咪唑化合物:

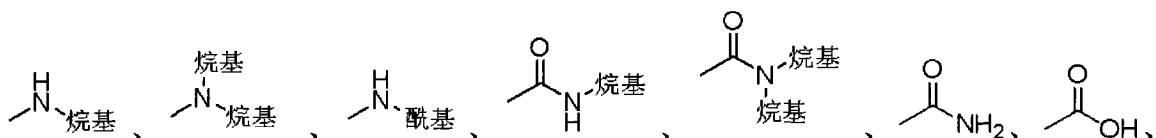


其中 R_5 和 R_6 包括上面对 R_5 和 R_6 所注的基

团。在另一实施方式中, R_5 选自由以下组成的组: $-H$ 、 $-CH_3$ 、 Cl 、 F 、 $-OCH_3$ 、 $-NH_2$ 、



和 $-SO_2CH_3$; R_6 选自由以下组成的组: $-H$ 、 $-CH_3$ 、 Cl 、 F 、 $-OCH_3$ 、

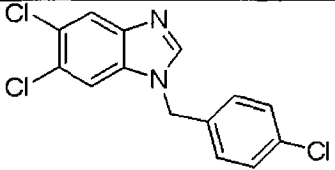
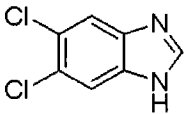
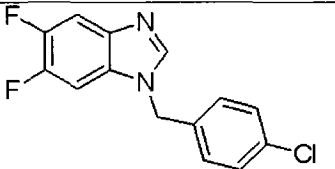
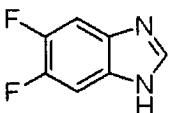
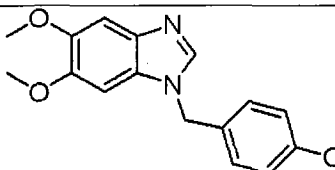
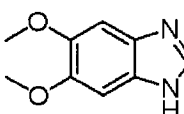
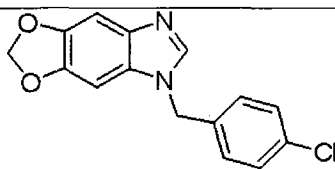
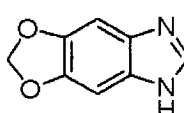
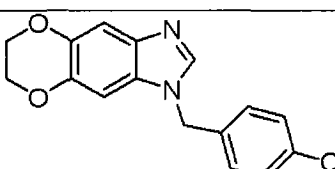
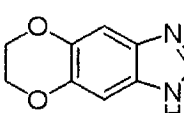


和 $-NH_2$ 。在一种实施方式中, 烷基基团可以选自本部分描述的优选实施方式。

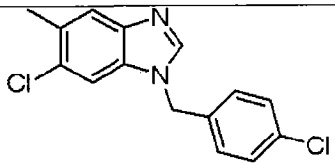
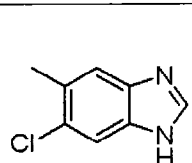
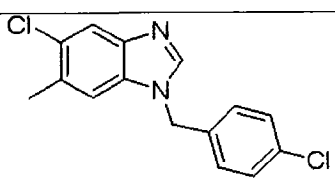
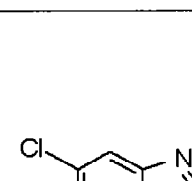
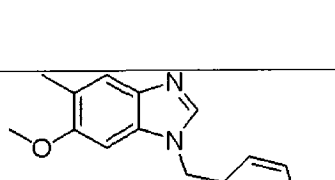
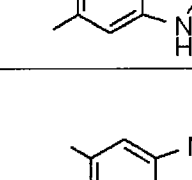
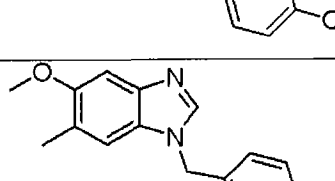
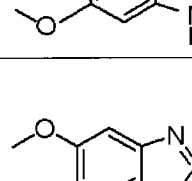
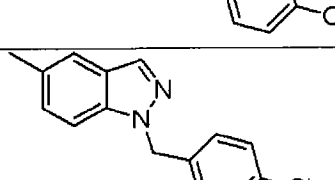
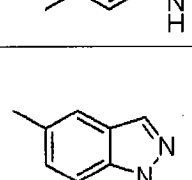
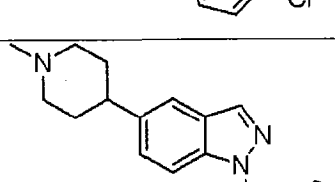
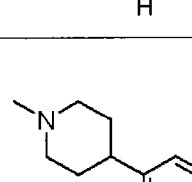
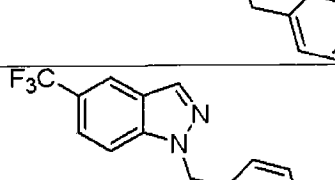
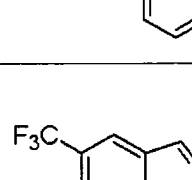
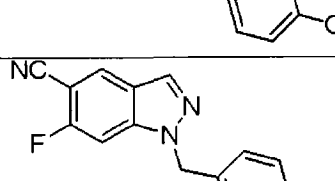
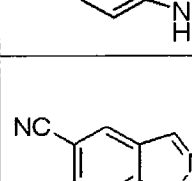
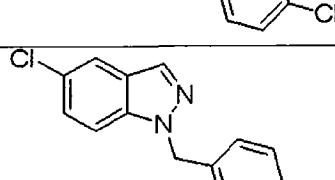
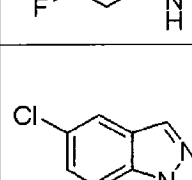
[0177] 表 1 显示本发明的附加抑制剂的结构和制备它们的示例性原料。

[0178] 表 1

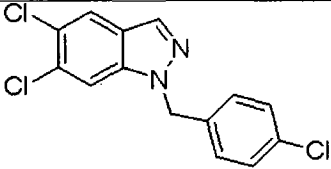
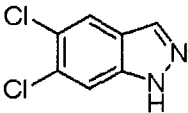
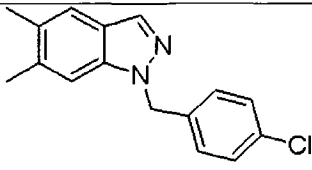
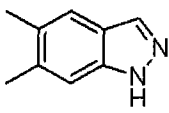
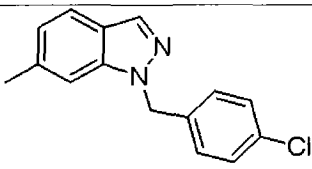
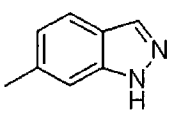
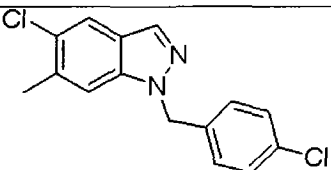
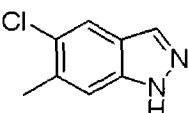
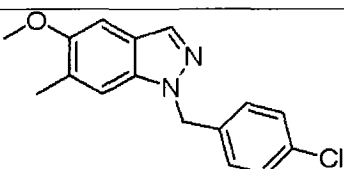
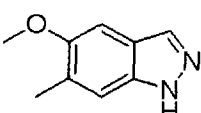
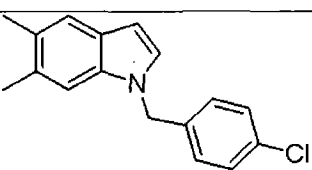
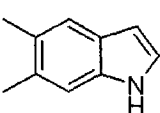
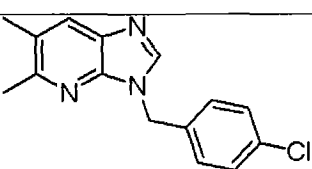
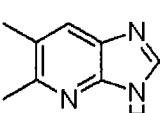
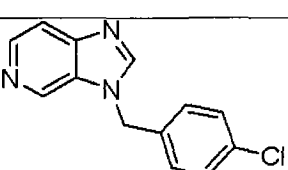
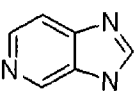
[0179]

	结构	示例性原料
1		
2		
3		
4		
5		

[0180]

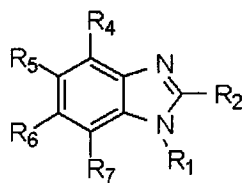
6		
7		
8		
9		
10		
11		
12		
13		
14		

[0181]

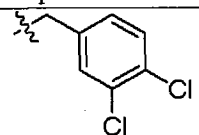
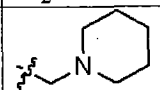
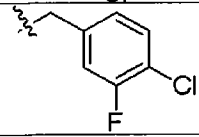
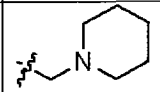
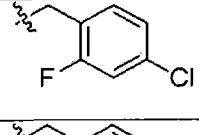
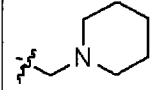
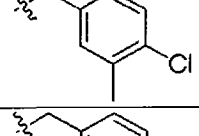
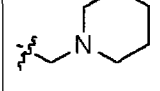
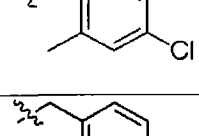
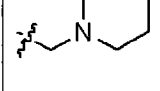
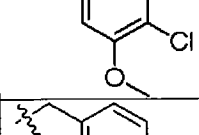
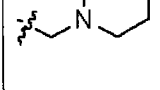
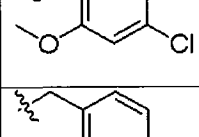
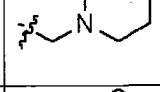
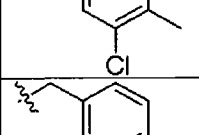
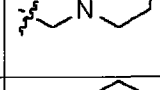
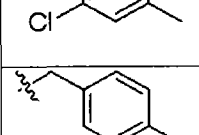
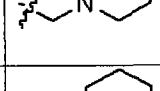
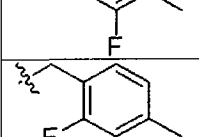
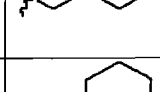
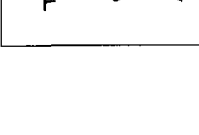
15		
16		
17		
18		
19		
20		
21		
22		

[0182] 表 2 显示基于以下结构的本发明的附加抑制剂的结构：

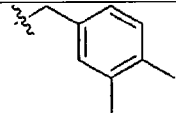
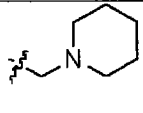
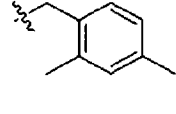
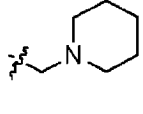
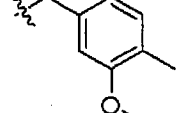
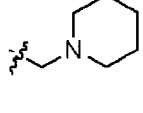
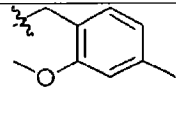
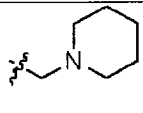
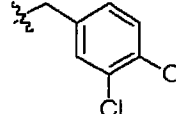
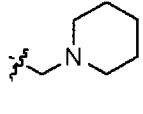
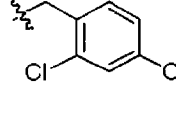
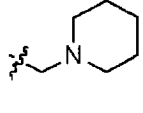
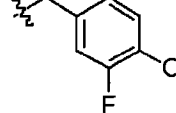
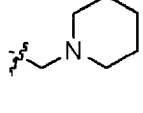
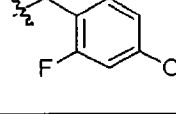
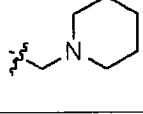
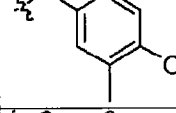
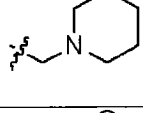
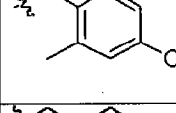
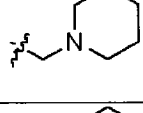
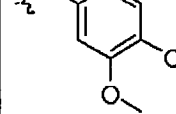
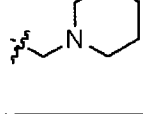
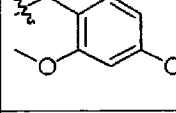
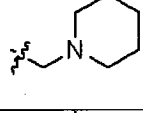
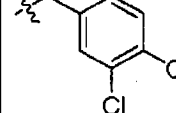
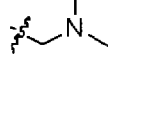
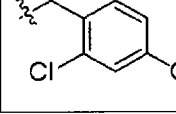
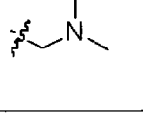
[0183]



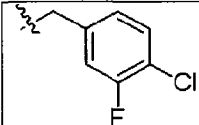
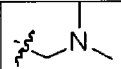
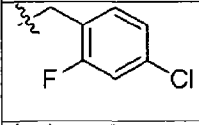
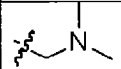
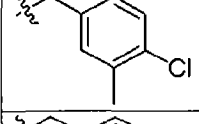
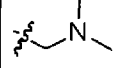
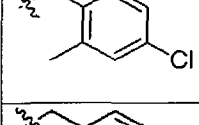
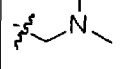
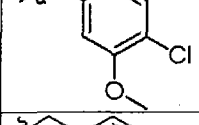
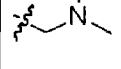
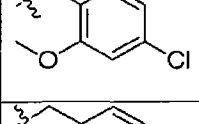
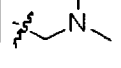
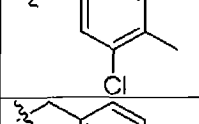
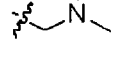
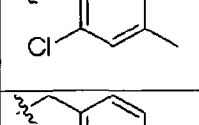
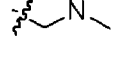
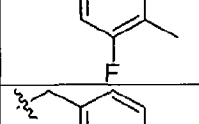
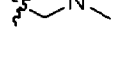
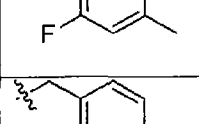
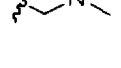
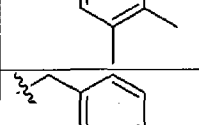
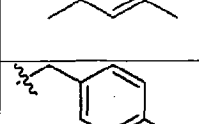
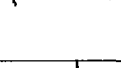
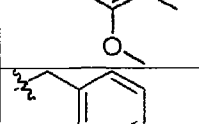
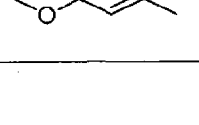
[0184]

R ₁	R ₂	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H

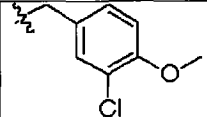
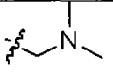
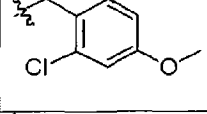
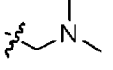
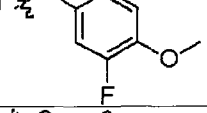
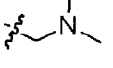
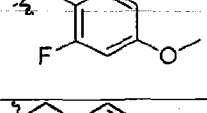
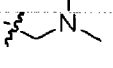
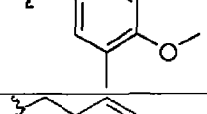
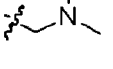
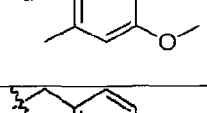
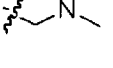
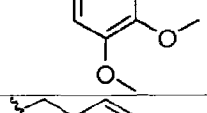
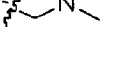
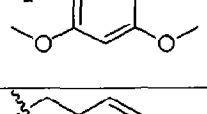
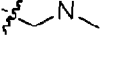
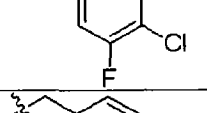
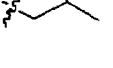
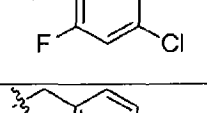
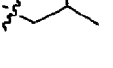
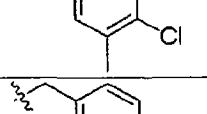
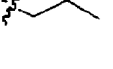
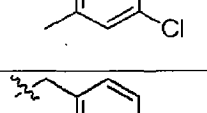
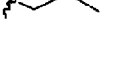
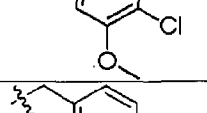
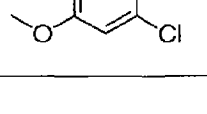
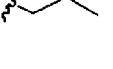
[0185]

		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H

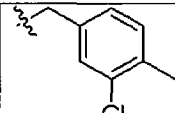
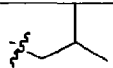
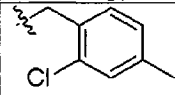
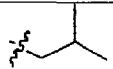
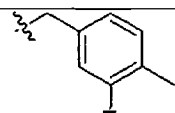
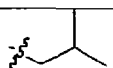
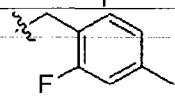
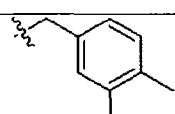
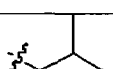
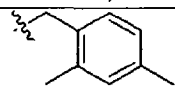
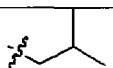
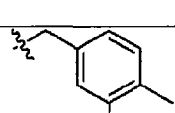
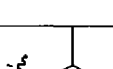
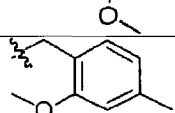
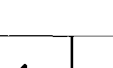
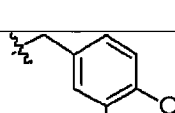
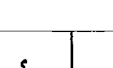
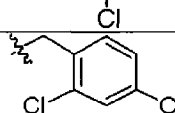
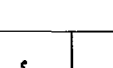
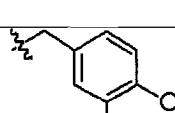
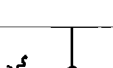
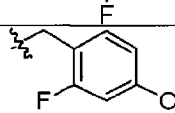
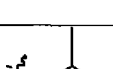
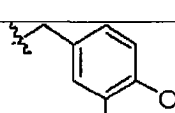
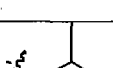
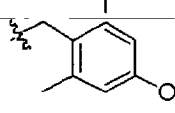
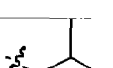
[0186]

		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H

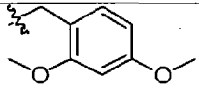
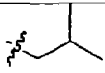
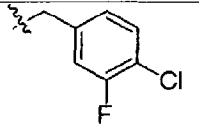
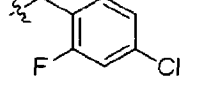
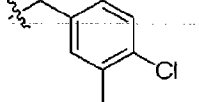
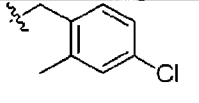
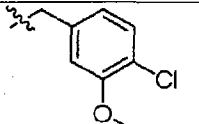
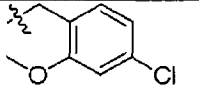
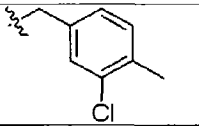
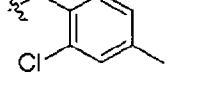
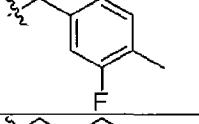
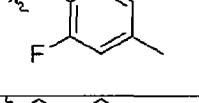
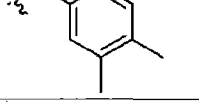
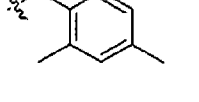
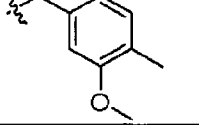
[0187]

		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H

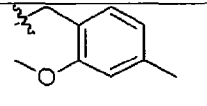
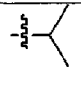
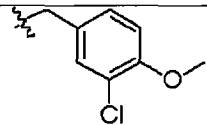
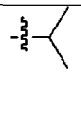
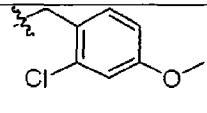
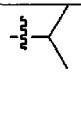
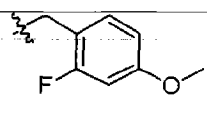
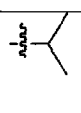
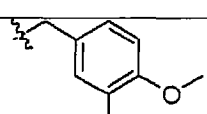
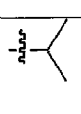
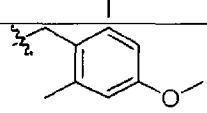
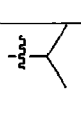
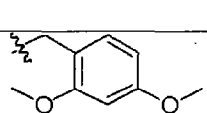
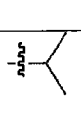
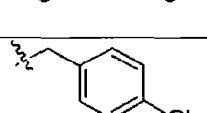
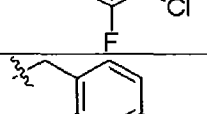
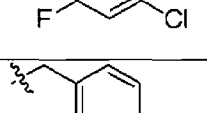
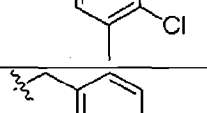
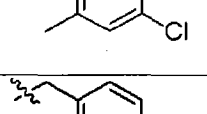
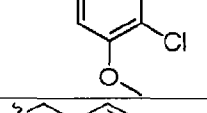
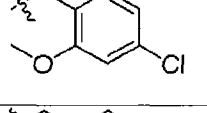
[0188]

		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H

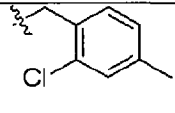
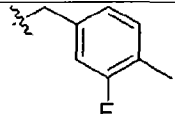
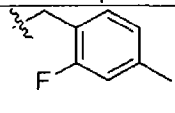
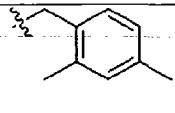
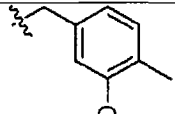
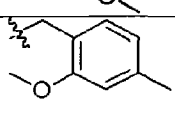
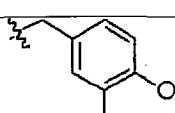
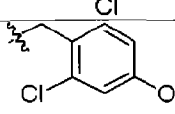
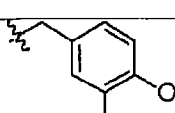
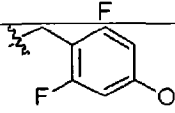
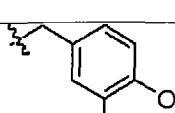
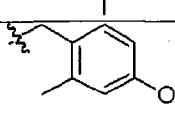
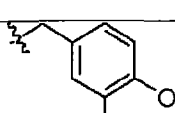
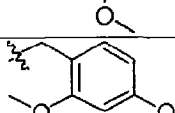
[0189]

		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H

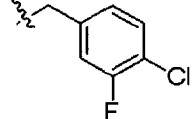
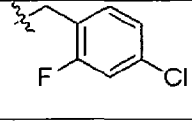
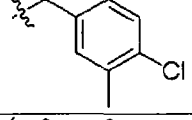
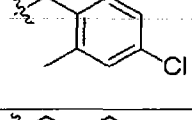
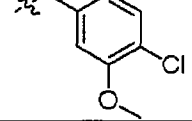
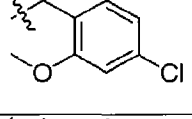
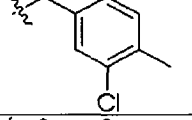
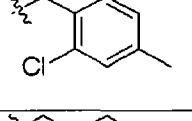
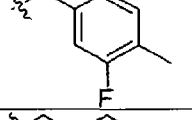
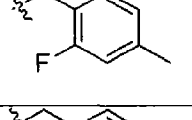
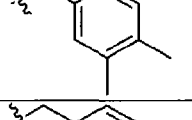
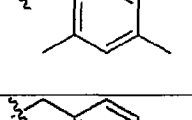
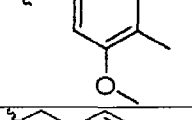
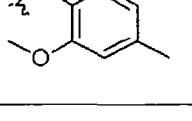
[0190]

		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
	H	H	CH ₃	CH ₃	H
	H	H	CH ₃	CH ₃	H
	H	H	CH ₃	CH ₃	H
	H	H	CH ₃	CH ₃	H
	H	H	CH ₃	CH ₃	H
	H	H	CH ₃	CH ₃	H
	H	H	CH ₃	CH ₃	H

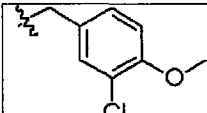
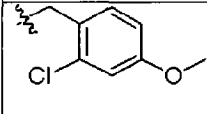
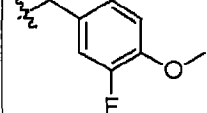
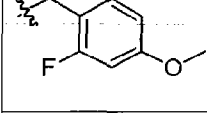
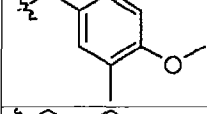
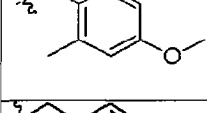
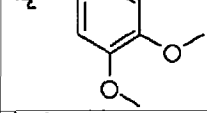
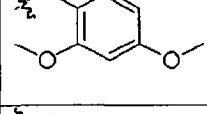
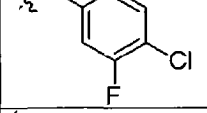
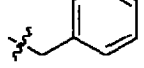
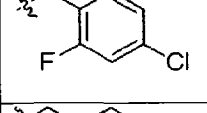
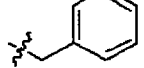
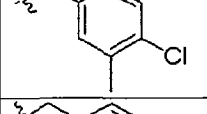
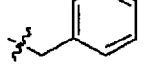
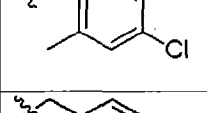
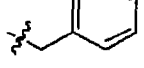
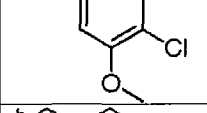
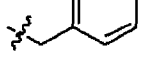
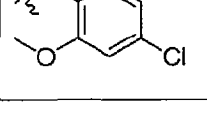
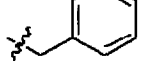
[0191]

	H	H	CH ₃	CH ₃	H
	H	H	CH ₃	CH ₃	H
	H	H	CH ₃	CH ₃	H
	H	H	CH ₃	CH ₃	H
	H	H	CH ₃	CH ₃	H
	H	H	CH ₃	CH ₃	H
	H	H	CH ₃	CH ₃	H
	H	H	CH ₃	CH ₃	H
	H	H	CH ₃	CH ₃	H
	H	H	CH ₃	CH ₃	H
	H	H	CH ₃	CH ₃	H
	H	H	CH ₃	CH ₃	H
	H	H	CH ₃	CH ₃	H
	H	H	CH ₃	CH ₃	H

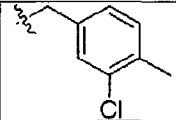
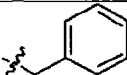
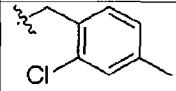
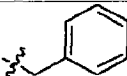
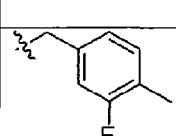
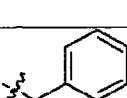
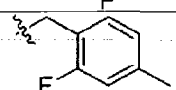
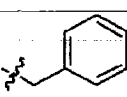
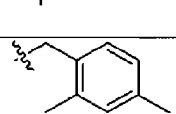
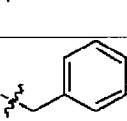
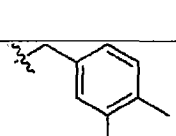
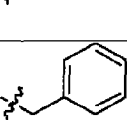
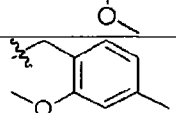
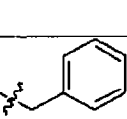
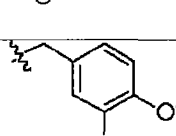
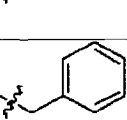
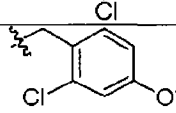
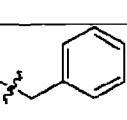
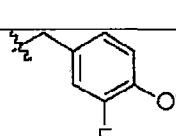
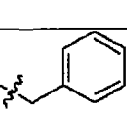
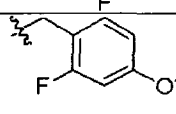
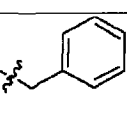
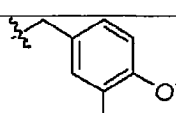
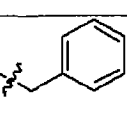
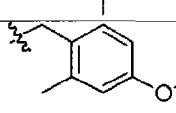
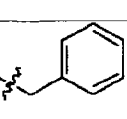
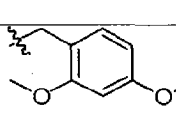
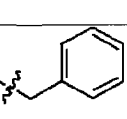
[0192]

	CF ₃	H	H	H	H
	CF ₃	H	H	H	H
	CF ₃	H	H	H	H
	CF ₃	H	H	H	H
	CF ₃	H	H	H	H
	CF ₃	H	H	H	H
	CF ₃	H	H	H	H
	CF ₃	H	H	H	H
	CF ₃	H	H	H	H
	CF ₃	H	H	H	H
	CF ₃	H	H	H	H
	CF ₃	H	H	H	H
	CF ₃	H	H	H	H
	CF ₃	H	H	H	H

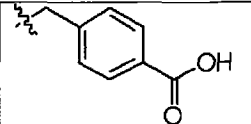
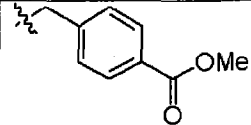
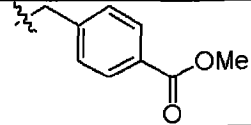
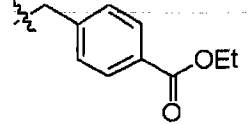
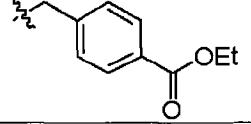
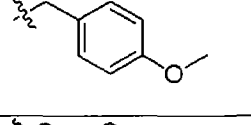
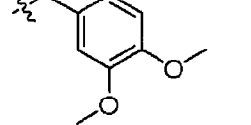
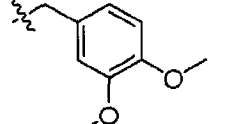
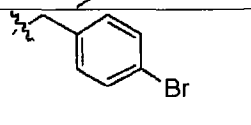
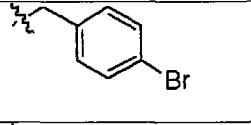
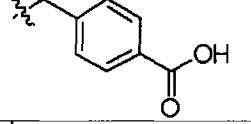
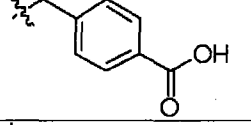
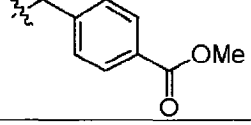
[0193]

	CF ₃	H	H	H	H
	CF ₃	H	H	H	H
	CF ₃	H	H	H	H
	CF ₃	H	H	H	H
	CF ₃	H	H	H	H
	CF ₃	H	H	H	H
	CF ₃	H	H	H	H
	CF ₃	H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H

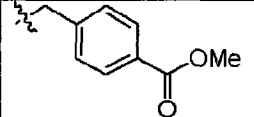
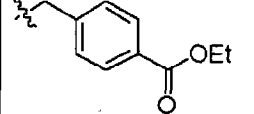
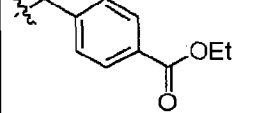
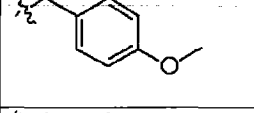
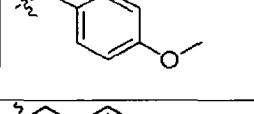
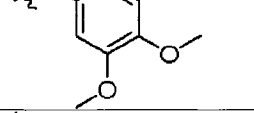
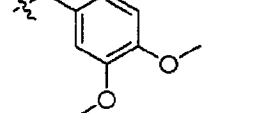
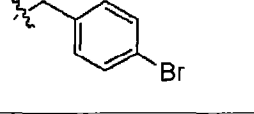
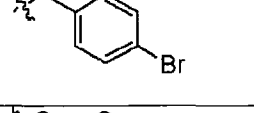
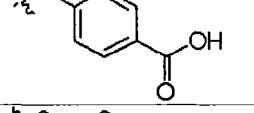
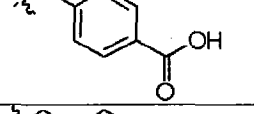
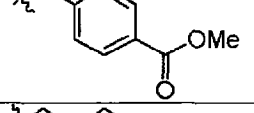
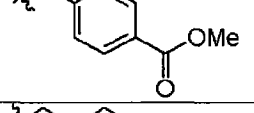
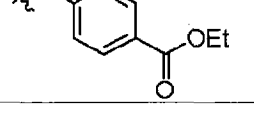
[0194]

		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H
		H	H	H	H

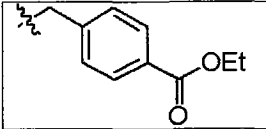
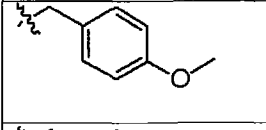
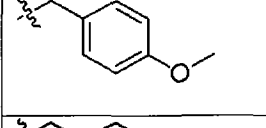
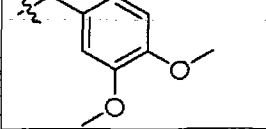
[0195]

	CH ₃	H	CH ₃	CH ₃	H
	H	H	CH ₃	CH ₃	H
	CH ₃	H	CH ₃	CH ₃	H
	H	H	CH ₃	CH ₃	H
	CH ₃	H	CH ₃	CH ₃	H
	CH ₃	H	CH ₃	CH ₃	H
	H	H	CH ₃	CH ₃	H
	CH ₃	H	CH ₃	CH ₃	H
	H	H	Cl	Cl	H
	CH ₃	H	Cl	Cl	H
	H	H	Cl	Cl	H
	CH ₃	H	Cl	Cl	H
	H	H	Cl	Cl	H

[0196]

	CH ₃	H	Cl	Cl	H
	H	H	Cl	Cl	H
	CH ₃	H	Cl	Cl	H
	H	H	Cl	Cl	H
	CH ₃	H	Cl	Cl	H
	H	H	Cl	Cl	H
	CH ₃	H	Cl	Cl	H
	H	H	OCH ₃	OCH ₃	H
	CH ₃	H	OCH ₃	OCH ₃	H
	H	H	OCH ₃	OCH ₃	H
	CH ₃	H	OCH ₃	OCH ₃	H
	H	H	OCH ₃	OCH ₃	H
	CH ₃	H	OCH ₃	OCH ₃	H
	H	H	OCH ₃	OCH ₃	H

[0197]

	CH ₃	H	OCH ₃	OCH ₃	H
	H	H	OCH ₃	OCH ₃	H
	CH ₃	H	OCH ₃	OCH ₃	H
	CH ₃	H	OCH ₃	OCH ₃	H

[0198] 克立咪唑是 H1 受体拮抗剂,且享有与克立咪唑结构相似的其它 H1 受体拮抗剂可用于本发明的方法的实施方式中。享有与克立咪唑结构相似的示例性 H1 受体拮抗剂包括,但不限于,已知类别为醇胺类(例如苯海拉明、卡比沙明和氯马斯汀)、乙二胺类(例如美吡拉敏和曲吡那敏(克立咪唑属于该类别))、烷基胺类(例如曲普利啶和氯苯那敏)、哌嗪类(例如美克洛嗪和高氯环嗪(homchlorcyclizine))和吩噻嗪类(例如异丙嗪)的化合物。

[0199] 本发明的实施方式包括被肝酶活化的克立咪唑的前药、克立咪唑类似物和具有具有克立咪唑骨架的化合物,以及它们的电子等排物(例如被促进 CYP3A 的氧化切割反应的基团取代的环-1,3-丙基酯类等)。这些修饰可以使克立咪唑失活或者具有较低活性直到在肝中被活化为止(参见,Current Opinion in Investigational Drugs 2006 第 7 卷第 2 册,109-117;J. Med. Chem. 2008, 51, 2328-2345;以及 Nucleosides, Nucleotides, and Nucleic Acids, 24(5-7):375-381, (2005),它们每个的相关讨论通过引用在文中并入。

[0200] 克立咪唑在 1952 年由 Zierz 和 Greither(Arztliche Wochenschrift 7:30, 704-7, Clinical evaluation of Allercur, a new antihistamine(一种新的抗组胺药 Allercur 的临床评价))描述,报道了来自 Schering AG 的产品。Finkelstein 等((1960) J Am Pharm Assoc Am Assoc;49:18-22)报道了克立咪唑盐酸盐的药理学,说明其显示有效的持续的抗组胺活性和相对较高程度的抗组胺特异性,并且在拮抗组胺气溶胶支气管痉挛中非常有效。据报道,离体兔回肠的自发性活动和麻醉的狗的肠能动性被降低,并且对慢性胃萎的狗内的组胺诱发的胃分泌没有显著影响,显示其对 H1 受体的选择性。

[0201] A. A. Jacques 和 V. H. Fuchs(1960, International record of medicine, "Clinical Evaluation of Clemizole in Allergic Rhinitis(克立咪唑在过敏性鼻炎中的临床评价)")报道:克立咪唑可用于变态反应病症的控制的临床研究。他们报道:克立咪唑的抗组胺活性在豚鼠和人的中被评价,并且在豚鼠中,克立咪唑在预防组胺-诱发的哮喘中优于阿托品和其它抗组胺药。通过在人类受治疗者中皮下注射产生的效果比较组胺和组胺与克立咪唑的混合物。据报道,向组胺中加入克立咪唑使得组胺诱发的风疹减少和注射疼痛减轻。克立咪唑被选择用于这种研究是基于之前临床报道的过敏症状的迅速减轻和显著的低的副作用发生率,以及在多于 500 名患有季节性和常年性枯草热和多种皮肤疾患

(例如, 荨麻疹、神经性皮炎、湿疹、食物和药物过敏) 的患者中报道的优良临床结果。如 Jacques 和 Fuchs 所概述, 之前关于克立咪唑的临床经验显示抗组胺药对长期施用具有特别好的耐受性。

[0202] Zierz 和 Greither 报道: 在仅百分之 1.3 的受治疗患者中产生困倦, 并且 Dulce 未观察到副反应, 即使日剂量为 120mg 时。据报道每天被给予 90 到 300mg 的克立咪唑持续多达五天的时间的二十四位患者仅仅轻度的疲劳和, 更少见的胃压。据报道, 对其他抗组胺药具有较差的耐受性的患者对克立咪唑没有反应。在儿童中, 施用克立咪唑未产生不耐受的迹象。成人和儿童被给予克立咪唑鞣酸盐或者克立咪唑盐酸盐用于减轻与过敏性鼻炎、哮喘、血管运动性鼻炎, 以及各种同时发生的疾患相关的症状。症状包括通常与过敏性 - 鼻溢、喷嚏、后鼻滴涕、流泪, 以及鼻和眼部搔痒相关的那些症状。在研究中包括三种剂型, 并且通常根据患者的年龄和症状的严重性使用该三种剂型。四位成人仅仅肌肉注射接受 10mg(1ml) 克立咪唑, 而另外 3 个患者肌肉注射接受单个 10mg(1ml) 剂量的克立咪唑盐酸盐, 然后 2 茶匙口服悬浮液每日四次服用五天。其它患者每日两至四次接受 1 或 2 片 (总剂量 20 或 40mg) 克立咪唑盐酸盐, 持续一个或者两个星期的时间; 1 位成人每日六次接受 1 片, 持续一个星期。其它患者接受一或二茶匙 (总剂量 20 或 40mg 的克立咪唑盐酸盐) 的口服悬浮液, 每天二到四次, 持续五到六天。在给予不同剂型的克立咪唑的 104 位受治疗者中, 92 位响应治疗。克立咪唑在减轻喷嚏和鼻漏中特别有效。结果是, 克立咪唑表现为一种具有显著低的副作用发生率的有效的抗组胺药。困倦是使用该药物引起的唯一不良反应; 该副反应仅仅在 104 位受治疗的患者的 2 位中是明显的, 并且不必需中断治疗。

[0203] B. A. Wansker (1962, Skin, "Clemizole Hydrochloride : A Clinical Evaluation of its Antipruritic Effect (克立咪唑盐酸盐 : 其止搔痒效果的临床评价)") 报道了在随机选择的搔痒为其皮肤病的主要症状的患者上进行的临床研究。有效性的标准是减轻搔痒。克立咪唑盐酸盐的剂量是根据搔痒的严重性适应个体需要。大多数患者在白天接受 20mg, 3 次加上就寝时的 40mg, 24 小时的时间内共 100mg。总计, 剂量在每日 40 到 160mg 的范围内。治疗的持续时间从 1 到 12 周变化。四十三位患者被治疗持续 2 周或者更短, 而 24 位患者被治疗超过两周。没有患者被治疗少于 1 周。77 位患者接受克立咪唑 (以 20mg 片剂的形式) 或者安慰剂 (看起来相同的玉米淀粉和乳糖片)。患者以 40 到 160mg/ 天 (大多数接受 100mg) 被治疗。24 位患者被治疗超过 2 周, 且一些患者被治疗持续多达 12 周。报道了 66% 搔痒减轻出色和 23% 搔痒减轻良好。注意到 4 位患者的轻微副作用 (最常见是困倦)。结果是, 克立咪唑盐酸盐是安全的, 良好耐受的药物, 化合物基本上没有临床上可观察到的副作用, 并且在其减轻搔痒的能力方面显得作用十分迅速——通常在 24 到 48 小时之内。

[0204] 克立咪唑在美国作 **Allercur®** 出售, **Allercur®** 是 J. B. Roerig 和 Company, Div., Chas. Pfizer & Co., Inc 的产品。J. B. Roerig & Co. Division, Chas. Pfizer & Co., Inc. 的商标名, 对于克立咪唑鞣酸盐是 Allercur 口服悬浮液; 对于克立咪唑盐酸盐是 Alkrcur 肠胃外片和 Allercur 片。1966 年 PDR 出售克立咪唑的优势为: 特别好的耐受性。然而, 该药目前在美国未上市, 尽管纯的形式的该化合物可以从 Sigma-Aldrich 获得。

[0205] 根据本发明的实施方式, 治疗 HCV 感染的患者简单和方便的剂量方案包括前面显示的有效地使用克立咪唑作为止痒剂的任何方案。在一种实施方式中, 使用每天两次给药

方案。在一种实施方式中,该方案是 100mg 口服,每天两次。本发明的实施方式提供克立咪唑的新的单位剂量形式,其包括 25mg、50mg、75mg、100mg、125mg、150mg,以及 200mg 单位剂量形式。在一种实施方式中,单位剂量形式是片剂;在另一种中,单位剂量形式是胶囊。在一种实施方式中,克立咪唑持续释放的剂型是本发明提供的片剂和胶囊。在另一实施方式中,单位剂量形式是液体。

[0206] HCV 慢性感染(基因型 4)的三位患者根据本发明的方法的实施方式被治疗。全部是男性并且具有基线 ALT 升高和范围在 290,000–730,000IU/ml 的明显的 HCV 病毒量。接着在克立咪唑给药方案(100mg 口服每天两次)的第二周测量时,所有人经历了 HCV 病毒量下降,并且到第四周,所有人的 HCV 水平接近于或者低于 HCV 的检测极限。可能的是:如果在克立咪唑单一疗法治疗的数天后进行病毒量的测量,所有患者的 HCV 水平将低于检测极限。在 4 周的克立咪唑单一疗法之后,加上 4 周的克立咪唑 – 标准剂量聚乙二醇化的干扰素的治疗,所有患者的 HCV 病毒量低于检测极限。

[0207] 因为根据本发明的方法的实施方式克立咪唑已经被证明具有针对基因型 1、2 和 4(从进化年龄和响应干扰素的角度其跨越全部 HCV 基因型)的抗 HCV 活性,不考虑基因型,克立咪唑对于治疗所有的 HCV 患者将是理想的。

[0208] 根据本发明的方法的实施方式克立咪唑的有效给药也包括以 150mg 口服每天两次、75mg 口服每天两次和 50mg 口服每天两次的给药。总的日剂量也可以分裂成多个剂量,其允许每次施用较低的剂量具有较低的镇静可能性而维持足够的效力。可选地,并且具体地对于难以治疗情况,可以使用根据本发明的方法的较频繁的给药方案(例如每日三次施用或者每 4 或 6 小时施用):25mg、50mg、75mg、150mg 或者更高剂量。

[0209] 相似地,本发明的实施方式的持续释放剂型可以帮助在较长的时间间隔内维持病毒 – 抑制浓度。在说明性的实施方式中,持续释放剂型剂量是 50mg 口服每天两次、75mg 口服每天两次、100mg 口服每天两次和 150mg 口服每天两次,和 100mg 口服每日一次、150mg 口服每日一次、200mg 口服每日一次和 300mg 口服每日一次。克立咪唑也可以根据本发明的方法的实施方式通过透皮、舌下、肌内或者直肠途径施用。在一种实施方式中,将克立咪唑向具有 HCV 但没有需要抗组胺药治疗的其他疾患的患者施用。在另一实施方式中,所述患者具有 HCV 和需要抗组胺药治疗的疾患,克立咪唑和除克立咪唑之外的抗组胺药被联合使用以分别治疗患者的 HCV 感染和需要抗组胺药治疗的疾患。

[0210] 然而,在上述 3 位患者中,克立咪唑单一疗法在第 4 周结束,其可以根据本发明的方法继续作为单一疗法持续多达 12、24、36,或者 48 或者更多星期以提供持续的病毒学反应,并且在本发明的一些实施方式中,给药被无限期地继续,或者继续直到进一步的治疗不再明显的有益为止。

[0211] 在进行 HCV- 相关的末期肝病(ESLD)的肝移植的患者的病例下,已知的是如果病毒血症在移植时间存在,新的移植体被 HCV 感染机率是 ~ 100%。然而,也知晓:在移植前有效的 HCV 治疗可以降低或者消除 HCV 在新的移植体中的复发。因此,根据本发明的方法可以在肝移植之前进行克立咪唑单一疗法的治疗以减少或者消除 HCV 病毒量,并且可以帮助防止移植后 HCV 的复发。此外,通常移植前 ESLD 患者,或者移植后 HCV 复发患者,不能承受完全剂量的护理治疗标准(聚乙二醇化的干扰素和利巴韦林)。因此,根据本发明的方法克立咪唑单一治疗,或者克立咪唑加减少剂量的聚乙二醇化的干扰素和利巴韦林,可以被

用于治疗这些患者。相似地, 克立咪唑加硝唑尼特 (或者其他噻唑烷 (thiazolide), 或者这些任一持续剂型) 可以被用于治疗这些患者, 如克立咪唑加硝唑尼特 (或者其他噻唑烷, 或者这些任一持续剂型) 加标准的护理疗法 (以容忍的减少的或者常用的剂量)。

[0212] 4 周克立咪唑单一疗法然后 4 周克立咪唑和标准剂量的聚乙二醇化的干扰素治疗的患者, 然后进一步用硝唑尼特和聚乙二醇化的干扰素联合疗法治疗。然而, 根据本发明的方法, 克立咪唑与聚乙二醇化的干扰素的组合可以继续共 12、24、36 或者 48 或者更多周的干扰素以帮助促进持续的病毒学反应。相似地, 利巴韦林可以被加入到用聚乙二醇化的干扰素治疗的阶段 (或者从治疗的开始) 以在干扰素治疗间隔中提供三重联合疗法。可选地, 在这种治疗中, 硝唑尼特可以与聚乙二醇化的干扰素一起使用, 或者与聚乙二醇化的干扰素和利巴韦林一起使用。

[0213] 相似地, 在上述方案中的克立咪唑单一疗法阶段可以是, 例如但不限于 4 周或者 12 周。在其它实施方式中, 也可以是: 根据本发明的方法, 立即开始 3 天、7 天或者 2 周, 或者克立咪唑联合疗法 (即无克立咪唑单一疗法治疗阶段)。

[0214] 根据本发明的方法的实施方式的克立咪唑的联合疗法包括, 例如但不限于, 用克立咪唑加硝唑尼特治疗, 先用克立咪唑然后用硝唑尼特治疗, 用克立咪唑加硝唑尼特和 NS3 蛋白酶抑制剂治疗, 用克立咪唑加硝唑尼特加 NS3 蛋白酶抑制剂加 NS5B 聚合酶抑制剂治疗, 用克立咪唑加 NS3 蛋白酶抑制剂加 NS5B 聚合酶抑制剂治疗, 用克立咪唑加硝唑尼特加 NS3 蛋白酶抑制剂加 NS4B 第二两亲性螺旋抑制剂治疗, 用克立咪唑加硝唑尼特加 NS4B 第二两亲性螺旋抑制剂治疗, 用克立咪唑加 NS3 蛋白酶抑制剂加 NS4B 第二两亲性螺旋抑制剂治疗, 以及以上所有添加利巴韦林、克立咪唑加利巴韦林、克立咪唑然后加硝唑尼特加利巴韦林。

[0215] 根据本发明的联合疗法的硝唑尼特施用可以是, 例如但不限于, 500mg 口服每天两次。其它剂量, 其它噻唑烷, 或者硝唑尼特或者另一噻唑烷的其它剂型, 诸如持续释放剂型, 也可以在本发明的联合疗法中使用。

[0216] 在本发明的实施方式提供的其它方法和单位剂量形式中, 使用本文描述的克立咪唑衍生物和类似物替代在上面的治疗方法和单位剂量形式中的克立咪唑。

[0217] 药物制剂和施用途径

[0218] 本公开内容的实施方式包括文中鉴定的一种或者多种抑制剂, 并且与一种或者多种药学上可接受的赋形剂、稀释剂、载体和 / 或佐剂一起配制。此外, 本发明的实施方式包括与一种或者多种药学上可接受的辅助物质一起配制的这种抑制剂。特别是, 一种或者多种抑制剂可以与一种或者多种药学上可接受的赋形剂、稀释剂、载体和 / 或佐剂配制以提供本发明组合物的实施方式。

[0219] 在一种实施方式中, 抑制剂可以与其它抗病毒剂联合以制备本发明的组合物, 并且该组合物可以包括一种或者多种药学上可接受的赋形剂、稀释剂、载体和 / 或佐剂。

[0220] 在一种实施方式中, 抑制 NS4B 多肽与 HCV 负链 RNA 的 3' UTR 结合的抑制剂 (在下面称作“标题活性剂”; 或者“药物”) 可以与一种或者多种药学上可接受的赋形剂、稀释剂、载体和 / 或佐剂一起配制。

[0221] 许多的药学上可接受的赋形剂是本领域已知的。药学上可接受的赋形剂已经在许多出版物中充分描述, 该出版物包括, 例如, A. Gennaro (2000) “Remington: The Science

and Practice of Pharmacy(雷明顿:药剂学科学与实践),”第20版,Lippincott, Williams, & Wilkins;Pharmaceutical DosageForms and Drug Delivery Systems(药物剂型和药物递送系统)(1999)H. C. Ansel 等著,第7版,Lippincott, Williams, & Wilkins; 以及 Handbook ofPharmaceutical Excipients(药物赋形剂手册)(2000)A. H. Kibbe 等著,第3版,Amer. Pharmaceutical Assoc.

[0222] 药学上可接受的赋形剂,诸如媒介物、佐剂、载体或者稀释剂对于公众是容易获得的。此外,药学上可接受的辅助物质,诸如pH调节剂和缓冲剂、等渗调节剂、稳定剂、湿润剂以及类似物,对于公众是容易获得的。

[0223] 在本公开内容的实施方式中,用能够产生理想效果(例如,降低病毒量,降低肝纤维化,提高肝功能,以及类似效果)的任何方法将抑制剂向宿主施用。因此,抑制剂可以被掺入到多种剂型中用于治疗施用。例如,抑制剂可以通过与合适的药学上可接受的载体或者稀释剂结合被配制成药物组合物,并且可以被配制成固体、半固体、液体或者气体形式的制剂,诸如片剂、胶囊、粉剂、颗粒、软膏、溶液、栓剂、注射剂、吸入剂和气溶胶。

[0224] 在药物剂型中,抑制剂可以以其药学上可接受的盐的形式施用,或者标题活性剂可以被单独使用,或者与其它药学上地活性化合物适当的联合以及组合使用。下面的方法和赋形剂仅为示例性的并且绝非限制。

[0225] 对于口服制剂,抑制剂可以单独被使用或者与合适的添加剂组合使用以制造片剂、粉末、颗粒或者胶囊使用,例如与以下组合:常规添加剂,诸如乳糖、甘露醇、玉米淀粉或者马铃薯淀粉;粘合剂,诸如晶体纤维素、纤维素衍生物、阿拉伯胶、玉米淀粉或者明胶;崩解剂,诸如玉米淀粉、马铃薯淀粉或者羧甲基纤维素钠;润滑剂,诸如滑石或者硬脂酸镁;以及必要时,稀释剂、缓冲剂、润湿剂、防腐剂和调味剂。

[0226] 通过将抑制剂溶解、悬浮或者乳化在水或者非水溶剂,诸如植物油或者其它相似的油、合成脂肪酸甘油酯,高级脂肪酸酯或者丙二醇中;并且必要时,与常规添加剂诸如增溶剂、等渗剂、悬浮剂、乳化剂、稳定剂和防腐剂一起溶解、悬浮或者乳化,抑制剂的实施方式被配制成用于注射的制剂。

[0227] 抑制剂的实施方式可以经吸入施用的气溶胶制剂使用。抑制剂的实施方式可以被配制到加压的可接受的推进剂,诸如二氯二氟甲烷、丙烷、氮和类似物中。

[0228] 此外,抑制剂的实施方式可以通过与多种基质,诸如乳化基质或者水溶性基质混合来制成栓剂。抑制剂的实施方式可以通过栓剂经直肠施用。栓剂可以包括赋形剂诸如可可油、碳蜡和聚乙二醇,其在体温下融化,而在室温下固化。

[0229] 可以提供用于口服或者直肠施用的单位剂量形式,诸如糖浆、酏剂以及悬浮剂,其中每个剂量单位,例如,茶匙、汤匙、片剂或者栓剂包含预先确定的量的包含一种或者多种抑制剂的组合物。相似地,用于注射或者静脉施用的单位剂量形式可以包括组合物中的抑制剂,如在无菌水、生理盐水或者其它药学上可接受的载体中的溶液。

[0230] 抑制剂的实施方式可以在根据本发明的可注射组合物中被配制。通常,可注射组合物被制备成液体溶液或者悬浮液;也可以制备在注射之前适合溶解或悬浮于液体媒介物的固体形式。该制剂也可以被乳化,或者活性成分(抑制剂)也可被包裹在根据本发明的脂质体媒介物中。

[0231] 在一种实施方式中,抑制剂配制为由持续递送系统递送。术语“持续递送系统”在

文中与“控制递送系统”可交换使用,并且包括持续的(例如,控制的)递送装置(例如,泵)以及导管、注射装置,以及本领域已知的多种类似装置。

[0232] 机械的或者机电的输液泵也可适合本公开内容的使用。这种装置的实例包括描述在,例如,美国专利第 4,692,147 号;第 4,360,019 号;第 4,487,603 号;第 4,360,019 号;第 4,725,852 号;第 5,820,589 号;第 5,643,207 号;第 6,198,966 号;以及类似文献中的那些装置。总的来说,抑制剂的递送可以使用任何多种可填充的泵系统完成。泵随时提供一致的、控制的释放。在一些实施方式中,抑制剂是在药物不可渗透的容器中的液体制剂,并且以连续的方式向个体递送。

[0233] 在一种实施方式中,药物递药系统是至少部分可植入的装置。可植入装置可以在任何合适的植入位置使用本领域熟知的方法和装置植入。植入位置是受治疗者体内的药物递送装置被导入并且放置的位置。植入位置包括,但不一定限于,真皮下、皮下、肌肉或者受治疗者体内的其它合适位置。在一些实施方式中使用皮下植入位置,这是因为便于植入和移除递药装置。

[0234] 适合在本公开内容中使用的药物释放装置可以是基于多种操作方式中的任何一种。例如,药物释放装置可以基于扩散系统、对流系统,或者侵蚀系统(例如,基于侵蚀的系统)。例如,药物释放装置可以是电化学泵、渗透泵、电渗泵、蒸汽压泵或者渗透爆式基质(osmotic bursting matrix),例如,其中药物被掺入聚合物中,并且该聚合物提供药物制剂的释放同时伴随着药物-浸渗的聚合材料(例如,生物降解的药物-浸渗材料)的降解。在其它实施方式中,药物释放装置基于电扩散系统、电解泵、泡腾泵、压电泵、水解系统等。

[0235] 基于机械或者机电输液泵的药物释放装置也可以适合与本公开内容使用。所述装置的实例包括描述在例如,美国专利第 4,692,147 号;第 4,360,019 号;第 4,487,603 号;第 4,360,019 号;第 4,725,852 号,以及类似文献中的那些装置。总的来说,标题治疗方法可以使用多种可再充的、非-可交换的泵系统中的任何一种完成。通常优选泵和其它对流系统,这归因于它们的时间间隔内通常更一致、控制的释放。在一些实施方式中使用渗透泵,这归因于它们更加一致控制的释放与相对小的大小的结合优势(参见,例如,PCT 公布申请号 WO 97/27840 和美国专利第 5,985,305 号和第 5,728,396 号)。在本公开内容中适合使用的示例性渗透-驱动装置包括,但不一定限于,描述在美国专利第 3,760,984 号;第 3,845,770 号;第 3,916,899 号;第 3,923,426 号;第 3,987,790 号;第 3,995,631 号;第 3,916,899 号;第 4,016,880 号;第 4,036,228 号;第 4,111,202 号;第 4,111,203 号;第 4,203,440 号;第 4,203,442 号;第 4,210,139 号;第 4,327,725 号;第 4,627,850 号;第 4,865,845 号;第 5,057,318 号;第 5,059,423 号;第 5,112,614 号;第 5,137,727 号;第 5,234,692 号;第 5,234,693 号;第 5,728,396 号;以及类似文献中的那些装置。

[0236] 在一些实施方式中,药物递送装置是可植入的装置。药物递送装置可以在任何合适的植入位置使用本领域熟知的方法和装置植入。如文中所注,植入位置是受治疗者体内药物递送装置被导入和放置的位置。植入位置包括,但不一定限于真皮下、皮下、肌肉,或者受治疗者体内其它合适的位置

[0237] 在一些实施方式中,活性药物使用可植入递送系统递送,例如,可编程以提供药剂施用的系统。示例性可编程的、可植入的系统包括可植入输液泵。示例性可植入输液泵,或者在用于与这些泵连接的装置被描述在,例如,美国专利第 4,350,155 号;第 5,443,450 号;

第 5,814,019 号 ;第 5,976,109 号 ;第 6,017,328 号 ;第 6,171,276 号 ;第 6,241,704 号 ;第 6,464,687 号 ;第 6,475,180 号 ;和第 6,512,954 号中。适合本公开内容的进一步示例性装置是 Synchromed 输液泵 (Medtronic)。

[0238] 抑制剂的合适赋形剂媒介物是,例如,水、盐水、右旋糖、甘油、乙醇,或者类似物,以及其混合物。此外,必要时,媒介物可以包含小量的辅助物质,诸如润湿剂或者乳化剂或者 pH 缓冲剂。对于本领域技术人员,制备所述剂型的方法是已知的,或者在考虑本公开内容之后将是显然的。参见,例如,Remington's Pharmaceutical Sciences (雷明顿药物科学), Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania, 第 17 版,1985。在任何事件中,施用的组合物或制剂将包括足够在被治疗的受治疗者体中达到期望状态的量的抑制剂。

[0239] 本发明的组合物包括包含持续释放或者控释基质的组合物。此外,本发明的实施方式可以结合使用持续释放剂型的其它治疗来使用。如文中所用,持续释放基质是由物质,通常聚合物制成的基质,其可通过酶水解或者酸-基水解或者通过溶解降解。嵌入到体内之后,基质受酶和体液作用。持续释放基质期望地选自可生物相容的材料,诸如脂质体、聚交酯(聚乳酸)、聚乙醇酸交酯(乙醇酸聚合物)、聚交酯共-乙交酯(乳酸和乙醇酸的共聚物)、聚酐、聚(元酸)酯类、多肽、透明质酸、胶原、硫酸软骨素、羧酸、脂肪酸、磷脂类、多糖类、核酸、聚氨基酸、氨基酸诸如苯丙氨酸、酪氨酸、异亮氨酸,多核苷酸、聚乙烯丙烯、聚乙烯吡咯酮以及硅酮。示例性可生物降解的基质包括聚交酯基质、聚乙醇酸交酯、聚乳酸共-乙交酯(乳酸和乙醇酸的共聚物)基质。

[0240] 在另一实施方式中,本公开内容的药物组合物(以及混合组合物)以控释系统递送。例如,可以使用静脉输注、可植入渗透泵、透皮贴片、脂质体,或者其它施用形式施用抑制剂。在一种实施方式中,可以使用泵 (Sefton (1987). CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14 :201 ; Buchwald 等 (1980). Surgery 88 :507 ;Saudek 等 (1989). N. Engl. J. Med. 321 :574)。在另一实施方式中,使用聚合材料。在又一实施方式中,控释系统被放置在治疗靶(即肝)附近,因此仅需要全身剂量的一部分。在又一实施方式中,控释系统被放置在治疗靶附近,因此仅需要全身的一部分。其它控释系统在 Langer (1990). Science 249 :1527-1533 的综述中被讨论。

[0241] 在另一实施方式中,本发明的组合物(以及各自的和一起的混合组合物)包括由文中所述的抑制剂渗透进入吸收性材料诸如缝线、绷带以及纱布,或者涂层到固相材料,诸如外科缝线钉 (surgical staple)、拉链和导管表面以递送组合物而形成的那些组合物。这种类型的其它递送系统依照本公开内容对于本领域的技术人员是显然的。

[0242] 治疗方法

[0243] 本发明的实施方式包括治疗黄病毒病毒家族的病毒感染的方法。具体地,文中所述的抑制剂可以被用于治疗黄病毒病毒家族的病毒感染。在一种实施方式中,本公开内容提供治疗来自黄病毒病毒家族的病毒感染的宿主的方法,其通过向宿主施用治疗有效量的一个或者多个剂量的抑制剂以降低宿主体中的病毒量。在一种实施方式中,治疗受来自黄病毒病毒家族的病毒感染的宿主的方法,所述方法包括向宿主施用治疗有效量的抑制剂以减少宿主中病毒量。

[0244] 本发明的实施方式包括预防性治疗黄病毒病毒家族的病毒感染的方法。具体地,文中所述的抑制剂可以被用于预防性治疗黄病毒病毒家族的病毒感染。在一种实施方式

中,本公开内容提供预防性治疗来自黄病毒病毒家族的病毒感染的宿主的方法,其通过向宿主施用治疗有效量的一个或者多个剂量的抑制剂以降低宿主中的病毒量。在一种实施方式中,预防性治疗受来自黄病毒病毒家族的病毒感染的宿主的方法,所述方法包括向宿主施用治疗有效量的抑制剂以减少宿主体中病毒量。上面描述了关于克立咪唑和克立咪唑给药的其他细节。

[0245] 在一种实施方式中,文中描述的抑制剂与其它药剂(例如,抗病毒剂)组合使用以治疗来自黄病毒病毒家族的病毒的感染。在一种实施方式中,文中描述的抑制剂与其它药物(例如,抗病毒剂)组合使用以预防性治疗来自黄病毒病毒家族的病毒的感染。方法的实施方式包括向需要其的个体施用抑制 NS4B 多肽与 HCV 负链 RNA 的 3' UTR 结合的一种或者多种抑制剂。在一种实施方式中,本发明提供治疗黄病毒感染,例如,HCV 感染的方法,和减少作为 HCV 感染的后遗症出现的肝纤维化的方法。

[0246] 在一种实施方式中,抑制剂包括上面所述的抑制剂中的一种或者多种。在不同实施方式中,抑制剂是克立咪唑、克立咪唑类似物,和具有克立咪唑骨架的化合物,和任何所述化合物的电子等排物。在不同实施方式中,抑制剂是克立咪唑盐酸盐(1-对氯苄基-2-(1-吡咯烷基)甲基苯并咪唑盐酸盐),类似物或者克立咪唑,或者其衍生物。上面描述了关于克立咪唑和克立咪唑给药的其他细节。

[0247] 在一种实施方式中,抑制剂的有效量是如下量:当以一个或者多个剂量向需要其的宿主(例如人)施用时,与未用抑制剂治疗的个体中的病毒量相比,其在个体中 HCV 病毒量降低了至少约 10%、至少约 15%、至少约 20%、至少约 25%、至少约 30%、至少约 35%、至少约 40%、至少约 45%、至少约 50%、至少约 55%、至少约 60%、至少约 65%、至少约 70%、至少约 75%、至少约 80%、至少约 85%,或者至少约 90%,或者更多。

[0248] 病毒量可以通过测量效价或者血清中病毒水平测量。这些方法包括,但不限于,定量的聚合酶链反应(PCR)和分支 DNA(bDNA)试验。已经开发用于测量 HCV RNA 的病毒量(效价)的定量测定。许多所述测定是商业上可获得的,其包括定量逆转录 PCR(RT-PCR)(Amplicor HCVMonitor™, Roche Molecular Systems, New Jersey);和分支 DNA(脱氧核糖核酸)信号放大测定(Quantiplex™ HCV RNA 测定(bDNA), ChironCorp., Emeryville, California)。参见,例如, Gretch 等(1995)Ann. Intern. Med. 123:321-329。还受关注的是 Chiron Corporation 在商标名 **Procleix®** 下出售的核酸试验(NAT),所述 NAT 同时测试 HIV-1 和 HCV 的存在。参见,例如, Vargo 等(2002)Transfusion 42:876-885。

[0249] 在一些实施方式中,抑制剂的有效量是如下量:当以一个或者多个剂量向需要其的宿主(例如人)施用时,与未用抑制剂治疗的个体中的肝功能相比,其在个体中肝功能提高了至少约 10%、至少约 15%、至少约 20%、至少约 25%、至少约 30%、至少约 35%、至少约 40%、至少约 45%、至少约 50%、至少约 55%、至少约 60%、至少约 65%、至少约 70%、至少约 75%、至少约 80%、至少约 85%,或者至少约 90%,或者更多。

[0250] 在一些实施方式中,抑制剂的有效量如下量:当以一个或者多个剂量向需要其的宿主(例如人)施用时,与未用抑制剂治疗的个体中的肝纤维化程度相比,其在宿主中肝纤维化减少了至少约 10%、至少约 15%、至少约 20%、至少约 25%、至少约 30%、至少约 35%、至少约 40%、至少约 45%、至少约 50%、至少约 55%、至少约 60%、至少约 65%、至少约 70%、至少约 75%、至少约 80%、至少约 85%,或者至少约 90%,或者更多。

[0251] 肝纤维化减少通过分析肝脏活组织检查样品测定。肝脏活组织检查的分析包括两个主要组分的评价：由“等级”评价的坏死性炎症作为严重性和进行性疾病活动的量度，以及由“阶段”评价的纤维化损伤和实质（parenchymal）重塑或者血管重塑作为长期疾病发展的反映。参见，例如，Brunt (2000) Hepato. 31 :241-246 ;和 METAVIR (1994) Hepatology 20 :15-20。基于肝脏活组织检查的分析，指定分数。存在许多提供纤维化的程度和严重性的定量评价的标准化评分系统。这些包括 METAVIR、Knodell、Scheuer、Ludwig 以及 Ishak 评分系统。

[0252] METAVIR 评分系统基于肝脏活组织检查的各种特征的分析，包括纤维化（肝门纤维化、小叶中心纤维化以及肝硬化）；坏死（碎片状坏死和小叶坏死，嗜酸性收缩和气胀性退化）；炎症（肝门束炎症，肝门集合淋巴结和肝门炎症的分布）；胆管变化；以及 Knodell 指数（门静脉周围坏死、小叶坏死、肝门炎症、纤维化以及综合疾病活动的分数）。METAVIR 系统中每个阶段的定义如下：分数：0，无纤维化；分数：1，肝门束的星状扩大但没有隔膜形成；分数：2，肝门束扩大伴随少量的隔膜形成；分数：3，许多隔膜但未出现肝硬化；以及分数：4，肝硬化。

[0253] Knodell 评分系统，也称作肝炎活性指数，基于四类组织学特征中的分数将样本分类：I. 门静脉周围坏死和 / 或桥接坏死；II. 小叶内退化和局灶性坏死；III. 肝门炎症；以及 IV. 纤维化。在 Knodell 疾病分期系统中，分数如下：分数：0，无纤维化；分数：1，轻微的纤维化（纤维性肝门扩张）；分数：2，中等纤维化；分数：3，严重纤维化（桥接纤维化）；以及分数：4，肝硬化。分数越高，肝组织损坏越严重。Knodell (1981) Hepatol. 1 :431。

[0254] 在 Scheuer 评分系统中分数如下：分数：0，无纤维化；分数：1，扩大的纤维性肝门束；分数：2，门静脉周围隔膜或者门 - 门隔膜，但结构完好；分数：3，纤维化伴随结构扭曲；但无明显的肝硬化；分数：4，很可能的或者确诊的肝硬化。Scheuer (1991) J. Hepatol. 13 :372。

[0255] Ishak 评分系统被描述在 Ishak (1995) J. Hepatol. 22 :696-699 中。阶段 0，无纤维化；阶段 1，某些门管区的纤维性扩张，伴随或者缺少短的纤维性隔膜；阶段 2，大多数门管区的纤维性扩张，伴随或者缺少短的纤维性隔膜；阶段 3，大多数门管区的纤维性扩张伴随偶然的门与门 (P-P) 桥接；阶段 4，门管区的纤维扩张伴随明显的桥接 (P-P) 以及门 - 中心 (P-C) 桥接；阶段 5，明显的桥接 (P-P 和 / 或 P-C) 伴随偶然的小结（不完全肝硬化）；阶段 6，很可能的或者确诊的肝硬化。

[0256] 本发明提供的治疗的益处也可以通过使用包括多组分打分系统的 Child-Pugh 评分系统测定和评价，该多组分打分系统基于血清胆红素水平异常、血清白蛋白水平异常、凝血酶原时间异常、腹水的出现和严重性，以及脑病的出现和严重性。基于这些参数异常的出现和严重性，可以将患者放置到临床疾病的渐增的严重性的三个类别 A、B 或者 C 之一。

[0257] 本公开内容的实施方式提供同于治疗患有病毒感染的患者的方法、抑制剂和药物制剂。在一种实施方式中，患者受 HCV 感染但未已知受其它病毒，包括但不限于 HIV 感染。在另一实施方式中，患者受 HCV 和一种或者多种其他病毒，包括但不限于 HIV 感染。在一种实施方式中，通过仅施用文中描述的用于 HCV 感染的治疗的单一抑制剂治疗患者的病毒感染。在另一实施方式中，通过施用文中描述的用于 HCV 感染的治疗的抑制剂以及已知用于病毒感染的治疗的一种或者多种其他药剂治疗患者的病毒感染。在一种实施方式中，所述

一种或者多种其他药剂不包括 CCR-5 拮抗剂。在另一实施方式中,所述一种或者多种其他药剂包括 CCR-5 拮抗剂,并且患者受 HCV 感染但未知(或者未)被 HIV 感染。

[0258] 剂量

[0259] 可以将抑制剂的实施方式以一个或多个剂量向宿主施用。在一种实施方式中,抑制剂可以以每剂约 10mg 到 1000mg 的量施用,例如,每剂约 10mg 到 20mg、约 20mg 到 25mg、约 25mg 到 50mg、约 50mg 到 75mg、约 75mg 到 100mg、约 100mg 到 125mg、约 125mg 到 150mg、约 150mg 到 175mg、约 175mg 到 200mg、约 200mg 到 225mg、约 225mg 到 250mg、约 250mg 到 300mg、约 300mg 到 350mg、约 350mg 到 400mg、约 400mg 到 450mg、约 450mg 到 500mg、约 500mg 到 750mg,或者约 750mg 到 1000mg。

[0260] 在一种实施方式中,每剂抑制剂的量是基于每体重确定。例如,在一种实施方式中,抑制剂可以以约 0.5mg/kg 到 100mg/kg,例如,每剂约 0.5mg/kg 到 1mg/kg、约 1mg/kg 到 2mg/kg、约 2mg/kg 到 3mg/kg、约 3mg/kg 到 5mg/kg、约 5mg/kg 到 7mg/kg、约 7mg/kg 到约 10mg/kg、约 10mg/kg 到 15mg/kg、约 15mg/kg 到 20mg/kg、约 20mg/kg 到 25mg/kg、约 25mg/kg 到 30mg/kg、约 30mg/kg 到 40mg/kg、约 40mg/kg 到 50mg/kg、约 50mg/kg 到 60mg/kg、约 60mg/kg 到 70mg/kg、约 70mg/kg 到 80mg/kg,约 80mg/kg 到 90mg/kg,或者约 90mg/kg 到 100mg/kg,或者多于约 100mg/kg 的量施用。

[0261] 上面描述了关于克立咪唑给药的其它细节。

[0262] 技术人员将容易地认识到:剂量水平可以根据施用的具体抑制剂、症状的严重性和受治疗者对副作用的易感性而变化。给予的化合物的优选剂量是本领域技术人员通过多种方法容易确定的。

[0263] 在一种实施方式中,施用多个剂量的抑制剂。施用抑制剂的频率可以取决于任何类型的因素,例如,症状的严重性,以及其它因素而变化。例如,在一种实施方式中,每月一次、每月两次、每月三次、每隔一周(qow)、每周一次(qw)、每周两次(biw)、每周三次(tiw)、每周四次、每周五次、每周六次、每隔一日(qod)、每日一次(qd)、每日两次(qid),或者每日三次(tid)施用抑制剂。如上面所讨论,在一种实施方式中,持续施用抑制剂。

[0264] 施用抑制剂期间,例如,施用抑制剂的一段时间可以,取决于多种因素中的任一种,例如,患者反应等而变化。例如,可以在约一天到一周、约两周到四周、约一个月到两个月、约两个月到四个月、约四个月到六个月、约六个月到八个月、约八个月到一年、约 1 年到 2 年,或者约 2 年到 4 年,或者更久的一段时间内施用抑制剂。

[0265] 施用途径

[0266] 本发明的实施方式提供使用任何可用的方法和适合药物递送的途径,包括体内和体外方法,以及全身和局部施用途径,向宿主(例如人类)施用抑制剂的方法和组合物。

[0267] 施用途径包括:鼻内、肌内、气管内、皮下、皮内、局部应用、静脉内、直肠、鼻内、口服,和其它肠内和肠胃外施用途径。必要时,可以组合施用途径,或者根据药剂和/或期望的效果调节施用途径。可以以单一剂量或者多剂量施用活性剂。

[0268] 可以使用可用的常规方法和适合常规药物递药的途径,包括全身或者局部途径,向宿主施用抑制剂的实施方式。总的来说,本公开内容涵盖的施用途径包括,但不限于,肠内、肠胃外,或者吸入途径。

[0269] 除了吸入施用之外的肠胃外施用途径包括,但不限于,局部、透皮、皮下、肌内、眼

内、囊内、脊柱内、胸骨内以及静脉内途径,即除了通过消化道的任何施用途径。肠胃外施用旨在实现抑制剂的全身或者局部递送药物。如果期望全身递送,施用通常包括药物制剂的侵入的或者全身吸收的局部或者粘膜施用。

[0270] 也可以通过肠内施用向受治疗者递送抑制剂。施用的肠内途径包括,但不限于,口服和直肠(例如,使用栓剂)递送。

[0271] 通过皮肤和粘膜的抑制剂的施用方法包括,但不限于,合适药物制剂的局部应用、透皮传递、注射和表皮施用。对于透皮传递,吸收促进剂或者离子电渗疗法是合适的方法。离子电渗传递可以使用商业上可获得的“贴片”完成,其在几天或者更久的时间内借助电脉冲穿过完整皮肤持续传递它们的产品。

[0272] 联合疗法

[0273] 本发明的实施方式包括用于治疗病毒感染的方法、抑制剂,以及药物制剂。在本公开内容的方法中使用的抑制剂和药物制剂的实施方式可以与其它抗病毒剂组合使用以治疗病毒感染。在一种实施方式中,根据本发明的方法,用于治疗受黄病毒家族病毒感染的宿主的抑制剂与一种或者多种其它抗-HCV剂组合使用以治疗HCV感染。在一种实施方式中,根据本发明的方法,阻止NS4B与HCV RNA的3'-UTR结合的抑制剂(文中也称作“HCV NS4B拮抗剂”)可以与一种或者多种其它抗-HCV剂组合使用以治疗HCV感染。

[0274] 目前的治疗HCV感染的药物实践通常使用干扰素- α 单一疗法或者与利巴韦林的联合疗法(诸如Rebeto1或者Copegus)和干扰素- α (诸如干扰素 α 2b)或者聚乙二醇化的干扰素(诸如Pegasys,Roche出售,或者PEG-Intron,Schering Plough出售)。根据本公开内容的方法,抑制性化合物可以与这些标准的治疗组合使用以治疗HCV感染。

[0275] 许多HCV蛋白酶抑制剂处在HCV感染的治疗的开发中,并且根据本公开内容的方法,防止NS4B与HCV RNA的3'-UTR结合的抑制剂和HCV蛋白酶抑制剂的共同施用有效地治疗HCV。在一种实施方式中,在这种联合疗法中也使用干扰素 α 和/或核苷类似物,诸如利巴韦林。合适的HCV蛋白酶抑制剂包括,但不限于,telaprevir(VX-950, Vertex)、BILN 2061和BI12202(Boehringer Ingelheim)、boceprevir(SCH 503034, ScheringPlough)、ITMN191(Roche/InterMune/Array BioPharma)、MK-7009(Merck)、TMC435350(Tibotec/Medivir)、ACH-1095和ACH-806(Achillion/Gilead),以及NS3/NS4A蛋白酶的其它抑制剂,包括,但不限于Presidio开发中的化合物。

[0276] 许多HCV RNA聚合酶(NS5B)抑制剂处于为HCV感染的治疗的开发中,并且根据本公开内容的方法,防止NS4B与HCV RNA的3'-UTR的结合的抑制剂与HCV RNA聚合酶抑制剂共同施用有效治疗HCV。在一种实施方式中,在这种联合疗法中也使用干扰素 α 和/或核苷类似物诸如利巴韦林和/或HCV蛋白酶抑制剂。合适的HCV RNA聚合酶抑制剂包括但不限于, valopicitabine(NM283, Idenix/Novartis)、HCV-796(Wyeth/ViroPharma)、R1626(Roche)、R7128(Roche/Pharmasset)、GS-9190(Gilead)、MK-0608(Merck)、PSI-6130(Pharmasset),以及PFE-868,554(PFE)。

[0277] 许多toll样受体(TLR)激动剂处于用于治疗HCV感染的开发中,并且根据本发明的方法,防止NS4B与HCV RNA的3'-UTR结合的NS4B拮抗剂与TLR激动剂共同施用有效治疗HCV。在一种实施方式中,在这种联合疗法中也使用干扰素 α 和/或核苷类似物诸如利巴韦林和/或HCV蛋白酶抑制剂和/或HCV RNA聚合酶抑制剂。合适的TLR激动剂包

括,但不限于,TLR7 激动剂(即 ANA245 和 ANA975(Anadys/Novartis))和 TLR9 激动剂(即 Actilon(Coley) 和 IM0-2125(Idera))。

[0278] 许多噻唑烷衍生物处于对 HCV 感染的治疗的开发中,并且根据本公开内容的方法,防止 NS4B 与 HCV RNA 的 3' -UTR 结合的 NS4B 拮抗剂和噻唑烷,包括但不限于硝唑尼特(阿替洛尔,或者硝唑尼特或者其它噻唑烷的其它持续释放剂型,Romark Laboratories)的共同施用有效治疗 HCV。在一种实施方式中,在这种联合疗法中也使用干扰素 α 和 / 或核苷类似物诸如利巴韦林和 / 或 HCV 蛋白酶抑制剂和 / 或 HCV RNA 聚合酶抑制剂和 / 或 TLR 激动剂。

[0279] 在本公开内容的方法的其它实施方式中,防止 NS4B 与 HCV RNA 的 3' -UTR 结合的抑制剂与亲环蛋白抑制剂(即 NIM-811(Novartis) 和 DEBIO-025(Debiopharm))和 / 或 α -葡萄糖苷酶抑制剂(即 Celgosivir(Migenix))和 / 或来自文中讨论的 HCV 治疗剂的一种或者多种其它类别的一种或者多种药剂的共同施用被用于治疗 HCV 感染。此外,在 NS4B 内有几个靶,并且根据本公开内容的方法,与这些其它靶相互作用的化合物可以与防止 NS4B 与 HCV RNA 的 3' -UTR 的结合的 NS4B 拮抗剂,以及任选地,文中提到的抑制剂的其它类别中的一种或者多种组合使用以治疗 HCV 感染。所述其他 NS4B 靶包括:N-末端两亲性螺旋(参见 PCT 公布 WO 2002/089731,通过引用在此并入)、NS4B GTP 酶(参见 PCT 公布 WO 2005/032329,通过引用在此并入)、第二两亲性螺旋,NS4B 中第一两亲性螺旋的 PIP2 结合活性(参见 US 临时专利申请序列号 60/057,188,通过引用在此并入)。

[0280] 防止 NS4B 与 HCV RNA 的 3' -UTR 结合的可以与本公开内容的抑制剂组合使用的其它剂包括(i)靶向 NS5A 的剂,包括,但不限于,A-831(Arrow Therapeutics)、AZD2836(Astra Zeneca),和由 XTL/Presidio 或者 BMS 开发中的剂(参见 PCT 公布 WO 2006/133326 和 WO 2008/021928,通过引用在此并入);(ii)靶向 TBC1D20 和 / 或 NS5A 与 TBC1D20 的相互作用的剂(参见 PCT 公布 WO 2007/018692 和美国专利申请序列号 11/844,993,通过引用在此并入);(iii)靶向 NS4B 的 GTP 酶活性的剂(参见 PCT 公布 WO 2005/032329 和美国专利申请公开 2006/0199174,通过引用在此并入);(iv)抑制由 HCV 两亲性螺旋介导的膜结合的剂,诸如在 NS5A、NS4B 和 NS5B 中发现的那些(参见 PCT 公布 WO 2002/089731,同上),(v)在 HCV 蛋白中靶向 PIP2 或者 BAAPP 结构域的剂,诸如在 NS4B 和 NS5A 中找到的那些剂(参见美国临时专利申请 60/057,188,同上);(vi)靶向 HCV 进入、装配或释放的剂,包括共同受体的抗体;(vii)靶向 HCV NS3 解旋酶的剂;(viii)siRNA、shRNA、反义 RNA,或者靶向 HCV 中的序列的其它基于 RNA 的分子;(ix)靶向小 RNA122 或者调节 HCV 复制的其它小 RNA 的剂;(x)靶向 PD-1、PD-L1 或者 PD-L2 的相互作用或者途径的剂(参见美国专利申请公布 20080118511、20070065427、20070122378,通过引用在此并入);以及(xi)靶向 HCV 两亲性螺旋功能的剂,诸如 AH2 抑制剂。

[0281] 在本公开内容的另一实施方式中,防止 NS4B 与 HCV RNA 的 3' -UTR 结合的抑制剂与能够治疗 HIV 感染的一种或者多种药物组合使用以治疗被 HIV 和 HCV 共同感染的患者。在本公开内容的另一实施方式中,阻止 NS4B 与 HCV RNA 的 3' -UTR 结合的抑制剂与能够治疗 HBV 感染的一种或者多种药物组合使用以治疗被 HBV 和 HCV 共同感染的患者。在一种实施方式中,防止 NS4B 与 HCV RNA 的 3' -UTR 结合的抑制剂与 PD-L1 抑制剂组合使用以治疗病毒感染。

[0282] 如上面提到的,本实施方式包括施用文中(或者通过使用本发明的筛选的实施方式)鉴定的抑制剂与至少一种其他治疗剂组合施用以治疗病毒 感染。合适的其他治疗剂包括,但不限于,利巴韦林;核苷类似物(例如,左旋韦林、韦拉密汀(viramidine)等);NS3 抑制剂;NS5 抑制剂;干扰素;以及副作用处理剂。

[0283] 在一种实施方式中,所述至少一种其他的合适的治疗药物包括利巴韦林。利巴韦林,1- β -D-呋喃核糖基-1H-1,2,4-三唑-3-羧酰胺,可从 ICN Pharmaceuticals, Inc., Costa Mesa, Calif. 获得,其被描述在 Merck 索引中,化合物编号 8199,第十一版。其制备和配制被描述在美国专利第 4,211,771 号中。本公开内容也包括使用利巴韦林衍生物(参见,例如,美国专利第 6,277,830 号)。

[0284] 在一种实施方式中,所述至少一种其他的合适的治疗剂包括左旋韦林。左旋韦林是利巴韦林的 L-对映体,并且显示了增高 Th1 免疫反应超过 Th2 免疫反应的性质。左旋韦林由 ICN Pharmaceuticals 制造。

[0285] 在一种实施方式中,所述至少一种其他的合适的治疗药物包括韦拉密汀。韦拉密汀是利巴韦林的 3-甲脒衍生物,并且作为利巴韦林的前药起作用。其通过腺苷脱氨酶被有效地转化成利巴韦林。

[0286] 适合在联合疗法中使用的核苷类似物包括,但不限于,利巴韦林、左旋韦林、韦拉密汀、艾托立宾——一种在美国专利第 5,559,101 号中公开的和包括在美国专利第 5,559,101 号的式 I 之内的 L-呋喃核糖基核苷(例如,1- β -L-呋喃核糖基尿嘧啶、1- β -L-呋喃核糖基-5-氟尿嘧啶、1- β -L-呋喃核糖基胞嘧啶、9- β -L-呋喃核糖基腺嘌呤、9- β -L-呋喃核糖基次黄嘌呤、9- β -L-呋喃核糖基鸟嘌呤、9- β -L-呋喃核糖基-6-硫鸟嘌呤、2-氨基- α -L-呋喃核糖[1',2':4,5]噁唑啉、O²O²-脱水-1- α -L-呋喃核糖基尿嘧啶、1- α -L-呋喃核糖基尿嘧啶、1-(2,3,5-三-O-苯甲酰基- α -呋喃核糖基)-4-硫尿嘧啶、1- α -L-呋喃核糖基胞嘧啶、1- α -L-呋喃核糖基-4-硫尿嘧啶、1- α -L-呋喃核糖基-5-氟尿嘧啶、2-氨基- β -L-阿拉伯呋喃并[1',2':4,5]噁唑啉、O²,O²-脱水- β -L-阿拉伯呋喃糖尿嘧啶、2'-去氧- β -L-尿嘧啶核苷、3'-5'-双-O-苯甲酰基-2'-去氧-4-硫代- β -L-尿嘧啶核苷、2'-去氧- β -L-胞嘧啶核苷、2'-去氧- β -L-4-硫代尿嘧啶核苷、2'-去氧- β -L-胸腺嘧啶核苷、2'-去氧- β -L-5-氟尿嘧啶核苷、2',3'-二去氧- β -L-尿嘧啶核苷、2'-去氧- β -L-5-氟尿嘧啶核苷,以及 2'-去氧- β -L-肌苷);公开在美国专利第 6,423,695 号中并被包括在美国专利第 6,423,695 号的式 I 之内的化合物;公开在美国专利公布第 2002/0058635 号中并被包括在美国专利公布第 2002/0058635 号的式 I 之内的化合物;公开在 W001/90121 A2(Idenix) 中的核苷类似物;公开在 W0 02/069903 A2(Biocryst Pharmaceuticals Inc.) 中的核苷类似物;公开在 W0 02/057287 A2 或者 W002/057425 A2 中的核苷类似物(两者都是 Merck/Isis);以及类似物。

[0287] 在一种实施方式中,所述至少一种其他的合适的治疗剂可以包括 HCVNS3 抑制剂。合适的 HCV 非结构蛋白-3(NS3) 抑制剂包括,但不限于,公开在美国专利第 6,642,204 号、第 6,534,523 号、第 6,420,380 号、第 6,410,531 号、第 6,329,417 号、第 6,329,379 号以及第 6,323,180 号中的三肽(Boehringer-Ingelheim);公开在美国专利第 6,143,715 号(Boehringer-Ingelheim) 中的化合物;公开在美国专利第 6,608,027 号中的大环化合物(Boehringer-Ingelheim);公开在美国专利第 6,617,309 号,第 6,608,067 号

和第 6,265,380 号中的 NS3 抑制剂 (Vertex Pharmaceuticals);描述在美国专利第 6,624,290 号中的氮杂肽化合物 (Schering);描述在美国专利第 5,990,276 号中的化合物 (Schering);描述在 Pause 等 (2003) *J. Biol. Chem.* 278:20374-20380 中的化合物;NS3 抑制剂 BILN 2061 (Boehringer-Ingelheim;Lamarre 等 (2002) *Hepatology* 36:301A;和 Lamarre 等 (2003 年 10 月 26 日) *Nature* doi:10.1038/nature02099);NS3 抑制剂 VX-950 (Vertex Pharmaceuticals;Kwong 等 (2003 年 10 月 24-28 日) 第 54 期 *Ann. 会议 AASLD*);NS3 抑制剂 SCH6 (Abib 等 (2003 年 10 月 24-28 日) 摘要 137. 美国肝病研究会 (AASLD) 第 54 次年度会议的纲要和摘要,2003 年十月 24-28 日. Boston, MA.);公开在 WO 99/07733、WO99/07734、WO 00/09558、WO 00/09543、WO 00/59929 或者 WO 02/060926 中的任何 NS3 蛋白酶抑制剂 (例如,公开在 WO 02/060926 中第 224-226 页的表中的化合物 2、3、5、6、8、10、11、18、19、29、30、31、32、33、37、38、55、59、71、91、103、104、105、112、113、114、115、116、120、122、123、124、125、126 和 127);公开在美国专利公布第 2003019067 号、第 20030187018 号以及第 20030186895 号中的任何一个的 NS3 蛋白酶抑制剂;以及类似物。

[0288] 在一种实施方式中,在本发明的联合疗法中使用的 NS3 抑制剂是特异性 NS3 抑制剂类别中的成员,例如抑制 NS3 丝氨酸蛋白酶活性并且未显示出针对其它丝氨酸蛋白酶诸如人白细胞弹性蛋白酶、猪胰弹性蛋白酶或者牛胰凝乳蛋白酶,或者半胱氨酸蛋白酶诸如人肝脏组织蛋白酶 B 的显著抑制活性的 NS3 抑制剂。

[0289] 在一种实施方式中,所述至少一种其他的合适的治疗药物包括 NS5B 抑制剂。合适的 HCV 非结构蛋白 -5 (NS5;RNA- 依赖性 RNA 聚合酶) 抑制剂包括,但不限于,公开在美国专利第 6,479,508 号中的化合物 (Boehringer-Ingelheim);公开在 Boehringer Ingelheim 在 2002 年 7 月 18 日提交的国际专利申请第 PCT/CA02/01127 号、第 PCT/CA02/01128 号和第 PCT/CA02/01129 号中任何一个的化合物;公开在美国专利第 6,440,985 号中的化合物 (ViroPharma);公开在 WO 01/47883 中的化合物,例如, JTK-003 (Japan Tobacco);公开在 Zhong 等 (2003) *Antimicrob. Agents Chemother.* 47:2674-2681 中的二核苷酸类似物;公开在 Dhanak 等 (2002) *J. Biol. Chem.* 277(41):38322-7 中的苯并噻二嗪化合物;公开在 WO 02/100846 A1 或者 WO 02/100851 A2 中的 NS5B 抑制剂 (两者是 Shire);公开在 WO01/85172 A1 或者 WO 02/098424 A1 中的 NS5B 抑制剂 (两者是 GlaxoSmithKline);公开在 WO 00/06529 或者 WO 02/06246 A1 中的 NS5B 抑制剂 (两者是 Merck);公开在 WO 03/000254 中的 NS5B 抑制剂 (日本烟草公司);公开在 EP 1 256,628 A2 (Agouron) 中的 NS5B 抑制剂;JTK-002 (Japan Tobacco);JTK-109 (Japan Tobacco);以及类似物。

[0290] 在一种实施方式中,在本发明的联合疗法中使用的 NS5 抑制剂是特异性 NS5 抑制剂类别中的成员,例如抑制 NS5RNA- 依赖性 RNA 聚合酶并且缺乏对 RNA 依赖性 RNA 聚合酶和 DNA 依赖性 RNA 聚合酶的显著抑制效果的 NS5 抑制剂。

[0291] 在一种实施方式中,所述至少一种其他的治疗剂是干扰素,例如,干扰素- α (IFN- α)。任何已知的 IFN- α 可以在本发明的治疗方法中使用。文中使用的术语“干扰素- α ”是指抑制病毒复制和细胞增殖并且调节免疫反应的相关多肽的家族。术语“IFN- α ”包括天然存在的 IFN- α ;合成的 IFN- α ;衍生的 IFN- α (例如,PEG 化的 IFN- α 、糖基化 IFN- α ,以及类似物);以及天然存在的或者合成的 IFN- α 的类似物;具有抗病毒性质的基本上任何 IFN- α ,如为天然存在的 IFN- α 所描述。

[0292] 合适的 α 干扰素包括,但不限于,天然存在的 IFN- α (包括,但不限于,天然存在 IFN- α 2a、IFN- α 2b);重组干扰素 α -2b,诸如从 Schering Corporation, Kenilworth, N. J. 获得的 Intron-A 干扰素;重组干扰素 α -2a 诸如从 Hoffmann-La Roche, Nutley, N. J. 获得的 Roferon 干扰素;重组干扰素 α -2C,诸如从 Boehringer Ingelheim Pharmaceutical, Inc., Ridgefield, Conn. 获得的 Berofer α 2 干扰素;干扰素 α -n1,天然 α 干扰素的纯的混合物,如从 Sumitomo, Japan 获得的 Sumiferon 或者从 Glaxo-Wellcome Ltd., London, Great Britain 获得的 Wellferon 干扰素 α -n1 (INS);以及干扰素 α -n3,通过干扰素科学制备并且从 Purdue Frederick Co., Norwalk, Conn. 在商标名 Alferon 下获得的天然 α 干扰素的混合物。

[0293] 术语“IFN- α ”也包括集成 IFN- α 。集成 IFN- α (也称作“CIFN”和“IFN-con”以及“集成干扰素”)包括,但不限于指定为 IFN-con₁、IFN-con₂ 和 IFN-con₃ 的氨基酸序列,其公开在美国专利第 4,695,623 号和第 4,897,471 号中;以及由确定天然存在的干扰素 α 的共有序列所定义的集成干扰素 (例如, **Infergen®**, InterMune, Inc., Brisbane, Calif.)。IFN-con₁ 在 **Infergen®** alfacon-1 产品中是集成干扰素剂。 **Infergen®** 集成干扰素产品在文中被称为商标名 (**Infergen®**) 或者通用名 (干扰素 alfacon-1)。编码的 IFN-con 的 DNA 序列可以如在前面所述的专利或者其它标准方法中所描述被合成。在一种实施方式中,所述至少一个其他治疗剂是 CIFN。

[0294] 在一种实施方式中,包括 IFN- α 和异源多肽的融合多肽也可以在本发明的联合疗法中使用。合适的 IFN- α 融合多肽包括,但不限于, Albuferon- α [™] (人白蛋白和 IFN- α 的融合产物;人类基因组科学;参见,例如, Osborn 等 (2002) J. Pharmacol Exp. Therap. 303:540-548)。IFN- α 的基因改组形式也适合在本公开内容中使用。参见,例如, Masci 等 (2003) Curr. Oncol. Rep. 5:108-113。其它合适的干扰素包括, Multiferon (Viragen)、Medusa 干扰素 (Flamel Technology)、Locteron (Octopus), 以及 Omega 干扰素 (Intarcia/Boehringer Ingelheim)。

[0295] 术语“IFN- α ”还涵盖被衍生 (例如,对于天然存在的肽化学修饰) 以改变某些特性如血清半衰期的 IFN- α 衍生物。因此,术语“IFN- α ”包括糖基化的 IFN- α ;用聚乙二醇衍生的 IFN- α (“PEG 化的 IFN- α ”) 等。PEG 化的 IFN- α , 以及制备其的方法在例如美国专利第 5,382,657 号;第 5,981,709 号;和第 5,951,974 号中讨论。PEG 化的 IFN- α 涵盖 PEG 和任何上述的 IFN- α 分子的轭合物,包括但不限于与干扰素 α -2a (Roferon, Hoffman La-Roche, Nutley, N. J.)、干扰素 α 2b (Intron, Schering-Plough, Madison, N. J.)、干扰素 α -2c (Berofer Alpha, Boehringer Ingelheim, Ingelheim, Germany) 轭合的 PEG;和如通过测定天然存在的干扰素 α 的共有序列而定义的集成干扰素 (**Infergen®**, InterMune, Inc., Brisbane, Calif.)。

[0296] 在一种实施方式中,可以用一种或多种聚乙二醇部分修饰 IFN- α 多肽,即 PEG 化。PEG 化的 IFN- α 多肽的 PEG 分子与 IFN- α 多肽的一个或多个氨基酸侧链轭合。在一种实施方式中,PEG 化的 IFN- α 仅在一个氨基酸上含有 PEG 部分。在另一实施方式中,PEG 化的 IFN- α 在两个或多个氨基酸上含有 PEG 部分,例如,IFN- α 含有连接在 2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个不同氨基酸残基上的 PEG 部分。IFN- α 可以通过氨基、巯基、羟基或羧基直接与

PEG 偶联（即，没有连接基团）。

[0297] 为了测定诸如克立咪唑的抑制剂与其他抗 HCV 剂的最佳组合，可以在多种抗 HCV 剂的不同组合存在下进行 HCV 复制测定和 / 或动物研究。在另外的药剂存在下增加的复制抑制（高于单一疗法所观察到的复制抑制）是联合疗法可能有利的证据。

[0298] 例如，在克立咪唑和 NS3 蛋白酶抑制剂（SCH503034）的各种组合存在下采用荧光素酶报道基因连接的 HCV 基因组的 HCV 复制测定显示在图 1A 和 1B 中。在该测定中，荧光素酶活性与 HCV RNA 基因组复制直接成比例。在此方法中，用野生型荧光素酶报道基因连接的 HCV 基因组对 Huh7.5 细胞电穿孔，并在存在指示浓度的克立咪唑和 SCH503034（SCH）下培养涂板的复制物 72 小时，然后裂解和荧光素酶活性测定，其基本上如所描述的（Nature Biotechnology 26, 1019-1027 (2008)，通过引用并入本文）。可以以线性或对数分度将结果绘制成药物浓度的函数以得到复制抑制曲线。NS3 抑制剂的抑制曲线显示在渐增浓度的克立咪唑的存在下具有显著更高的抑制。具体地，在低微摩尔浓度的 SCH503034（如 1-5 微摩尔）下，添加克立咪唑可以剂量依赖的方式将 HCV 复制的抑制作用增加高达几个 log 值。当 NS4B 拮抗剂与其他 NS3 蛋白酶抑制剂以及与 NS4B 拮抗剂的作用机制不同并且与克立咪唑作用的机制相同的其他抗 HCV 剂共同施用，根据本发明的方法预计联合疗法具有类似的增加效力（高于单一疗法）。这些结果不仅提供了克立咪唑和 SCH503034 的联合疗法的有益效果的清楚证据，还证明了可以预计用本公开内容所提供的这种和类似的联合疗法进行体内治疗之后具有改善的效力和可能降低的耐受性。此外，这些结果证明本领域的技术人员可以根据本文的公开内容容易地进行测定以确定可用于本发明的方法的实施方式的 NS4B 拮抗剂与其他抗 HCV 剂的最佳联合疗法。

[0299] 在一种实施方式中，可以将副作用处理剂用于本发明的治疗方法，并且这些副作用处理剂包括：在疼痛处理中有效的药剂；改善胃肠不适的药剂；止痛剂、消炎剂、抗精神病药、抗神经毒素剂、抗焦虑剂和造血剂。此外，本发明的实施方式涵盖了使用在用标题疗法的治疗的过程中用于镇静治疗患有疼痛或任何其他副作用的患者的任何化合物。示例性镇静剂包括：对乙酰氨基酚、布洛芬、其他 NSAID、H2 阻断剂和抗酸剂。

[0300] 适于治疗的宿主

[0301] 适于用所述抑制剂的实施方式或所述方法的实施方式治疗的宿主包括黄病毒感染的宿主。如本文所用，术语“黄病毒”包括黄病毒家族的任何成员，包括但不限于：登革热病毒，包括登革热病毒 1、登革热病毒 2、登革热病毒 3、登革热病毒 4（参见，例如 GenBank 登录号 M23027、M19197、A34774 和 M14931）；黄热病病毒；西尼罗病毒；日本脑炎病毒；圣路易脑炎病毒；牛病毒性腹泻病毒（BVDV）和丙型肝炎病毒（HCV）；以及上述任一种的血清型、菌株、基因型、亚型、准种或分离物。如果黄病毒为 HCV，则 HCV 为大量基因型、亚型或准种的任何一种，包括：例如，基因型 1（包括 1a 和 1b）、基因型 2、基因型 3、基因型 4、基因型 6 等和亚型（例如，亚型 2a、亚型 2b、亚型 3a、亚型 4a、亚型 4c 等）和准种。

[0302] 适于用本发明的实施方式治疗的宿主包括治疗失败的患者。本文所用的术语“治疗失败的患者”（或“治疗失败”）一般指对之前的 HCV 治疗不反应的 HCV 感染的患者（称为“不反应者”）或开始对之前的治疗反应但是治疗反应未能持续的患者（称为“复发者”）。之前的治疗一般可以包括用非本公开内容的抑制剂的任何抗病毒剂的治疗。

[0303] 适于用本公开内容的实施方式治疗的宿主包括在临床上被诊断为 HCV 感染的个

体。可以通过检测个体血液中的 HCV RNA 和 / 或在他们血清中具有抗 HCV 抗体来鉴定他们感染了 HCV。

[0304] 在临床上被诊断为感染了 HCV 的个体包括首次用于实验的个体（例如，之前未受 HCV 治疗的个体）。

[0305] 适于用本公开内容的实施方式治疗的宿主包括 HCV 效价为每毫升血清至少约 10^5 、至少约 5×10^5 、或至少约 10^6 HCV 基因组拷贝的个体。患者可以是被任何 HCV 基因型（基因型 1（包括 1a 和 1b）、基因型 2、基因型 3、基因型 4、基因型 6 等和亚型（例如，2a、2b、3a 等））感染，尤其是难以治疗的基因型，如 HCV 基因型 1 和特定的 HCV 亚型和准种感染。

[0306] 还适于治疗的是如下的 HCV 阳性宿主（如上文所述）：由于慢性 HCV 感染而显示重度纤维化或早期肝硬化（非代偿失调，Child-Pugh 分级为 A 或更低）或更晚期的肝硬化（代偿失调，Child-Pugh 分级为 B 或 C）的宿主；和尽管先前接受了抗病毒治疗还具有病毒血症的宿主或对已知的抗病毒剂治疗具有禁忌症的宿主。

[0307] 在一种实施方式中，根据 METAVIR 评分系统具有 3 期或 4 期肝纤维化的 HCV 阳性宿主适于用本公开内容的方法治疗。在另一实施方式中，适于用本公开内容的实施方式治疗的宿主是患有具有临床表现的代偿失调性肝硬化的患者，包括具有末期肝硬化的患者，包括那些等待肝移植的患者。在又一实施方式中，适于用本公开内容的实施方式治疗的宿主包括具有轻度纤维化的患者，包括具有早期纤维化（在 METAVIR、Ludwig 和 Scheuer 评分系统中为 1 期和 2 期；或 Ishak 评分系统中的 1 期，2 期和 3 期）的那些患者。

[0308] 在本公开内容的一种实施方式中，为了帮助最佳地选择最可能从治疗获益的患者并监测治疗的效力 – 尤其是在面对可能的药物耐受性突变病毒时 – 使用本发明所提供的合适的诊断测试可能是很有益的。例如，评估给定患者中所发现的具体病毒对所包括的治疗的敏感性可能有助于鉴定最佳匹配的候选患者与相应的合适治疗。在克立咪唑、克立咪唑类似物、具有克立咪唑骨架的化合物或本文所鉴定的其他抑制剂的情况下，这可以通过从给定患者的 HCV 分离物中分离 NS4B 序列，并测定药物抑制患者的 NS4B 同种型结合 RNA 的效力。这是尤为重要的，因为当前还没有研究给定患者病毒的药物敏感性的有效方法，这是由于来源于患者的接种物不能够容易地培养。使用这种诊断测定来指导治疗的价值已经在 HIV 中得到了广泛地验证。

[0309] 复制测定方案

[0310] 在一种实施方式中，复制测定方案可以包括下列阶段。应注意下列复制测定方案是非限制性的，且提供为复制测定方案的示例性实施方式。

[0311] 阶段 1：RNA 转录

[0312] 1) 在 37°C 下用 XbaI 将 FL-J6/JFH-5' C19R1uc2Aubi 质粒线性化 2 小时，并在 1% 琼脂糖凝胶上运行以检查消化的完全度。

[0313] 2) 通过在 30°C 下用绿豆核酸酶处理来消化 5' 突出端 30 分钟。

[0314] 3) 为了 Bart79I-luc 质粒线性化（与 Elazar 等人 J. Virol. 2003, 77(10) :6055-61 中所述的 Bart79I 质粒类似，不同的是用编码萤火虫荧光素酶的基因代替新霉素磷酸转移酶基因）使用 ScaI 限制性核酸内切酶，然后在凝胶上检测线性化的模板 DNA 以确定裂解完全，随后进行蛋白酶 k 消化。

[0315] 4) 通过用蛋白酶 K 消化 30 分钟、苯酚 – 氯仿抽提、乙醇沉淀来纯化模板，然后以

1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 重悬。

[0316] 5) 为了转录反应,通过使用 FL-J6/JFH-5' C19Rluc2AUbi 的 T7Megascript 试剂盒 (Ambion, Austin, TX) 或 Bart79I-luc 的 RiboMax™ 试剂盒 (Promega, Madison, WI) 来使用 1 μg 纯化的模板。在 37°C 下孵育反应 4h。

[0317] 6) 添加 DNA 酶,持续 15 分钟。

[0318] 7) 先后用等体积的苯酚 / 氯仿抽提,然后用等体积的氯仿抽提。回收水相并将其转移到新的试管中。

[0319] 8) 通过添加 1 体积的异丙醇并良好混合来沉淀 RNA。

[0320] 9) 在 -20°C 下冷却该混合物至少 15 分钟。在 4°C 下以最大的速度离心 15 分钟以沉淀 RNA。

[0321] 10) 小心移去上清液并在不含 RNA 酶 /DNA 酶的水中以 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 重悬 RNA。

[0322] 11) 在凝胶上运行以检测 RNA 浓度。

[0323] 12) 制备等分试样并储存在 -80°C。

[0324] 阶段 2 :电穿孔 Huh7.5 细胞

[0325] 1) 用 PBS 洗涤细胞一次,使之胰蛋白酶化。

[0326] 2) 在 50ml 试管中,以每个 10cm 平板中总体积 5ml 的完全培养基 (所有合在一起) 将细胞重悬细胞。

[0327] 3) 在 4°C 下以 1000×RPM 沉淀细胞 5 分钟。一点一点吸出并在 10ml 冰的不含 RNA 酶的过滤的 1×PBS (BioWhitaker) 中重悬 - 轻轻来回移液 5 次以去掉细胞团块。

[0328] 4) 如之前一样再次以 1000×RPM 沉淀细胞,并且再次在 10ml 冰冷 PBS (BioWhitaker) 中重悬。

[0329] 5) 移出 10 μl 等分试样以测定细胞浓度。

[0330] 6) 再次沉淀细胞并在不含 RNA 酶的冰冷 PBS 中将其以终浓度为 1.5×10^7 个细胞 /ml 重悬。

[0331] 需要: 每次电穿孔 (ep) 6×10^6 个细胞于 0.4ml 中和 5 μg FL-J6/JFH-5' C19Rluc2AUbi RNA 或 Bart79I-luc RNA。

[0332] 7) 将 5 μg RNA 等分试样置于 eppendorf 管中 (每次电穿孔一个管)。

[0333] 8) 移出 0.4ml 的细胞悬液并添加至 RNA 中。通过移液混合两次。

[0334] 9) 立即转移 0.4ml 到 2mm 间隙的电击杯中。

[0335] 10) 对细胞施加脉冲: 820v、5 次脉冲、99 微秒、220ms 间隔、单极。

[0336] 11) 使细胞静置 15 分钟。

[0337] 12) 使用巴斯德 (Pasteur) 吸管将杯体中的细胞转移到培养基中。由所有的管中制备总储备液。

[0338] 13) 将细胞以 10,000 个细胞 / 孔涂布在 96 孔板中。

[0339] 14) 稍微旋转平板以便细胞均匀涂布。

[0340] 15) 孵育 24 小时,然后处理。

[0341] 阶段 3 处理板

[0342] 1) 在电穿孔后约 24 小时,制备具有所需浓度的药物的培养基。

[0343] 2) 吸出培养基并添加 100 μl 的新鲜培养基和药物。在开始留下未处理的孔,并在

结束时再次留下未处理的孔。

[0344] 3) 每天一次重复,持续 2 天以上。

[0345] 阶段 4:收获(电穿孔后 5 天)

[0346] 1) 阿尔玛蓝(Alamar Blue)测定 -

[0347] a) 包括用于背景扣除的培养基(并且还用于容易地观察颜色改变)。

[0348] b) 吸出培养基。

[0349] c) 制备培养基加 10%阿尔玛蓝的储备液。每孔的总体积为 100 μ l。

[0350] d) 在 37°C 下孵育 2-2.5 小时(或直到有颜色改变)。

[0351] c) 在 flex station 上读板。

[0352] 2) 海肾荧光素酶(Renilla Luciferase)测定 -

[0353] a) 吸出具有阿尔玛蓝的培养基。

[0354] b) 用 1×PBS 洗涤。

[0355] c) 完全吸出(吸出,然后倾斜并再次吸出剩余缓冲液)。

[0356] d) 确定需要的裂解缓冲液:萤火虫还是海肾。

[0357] e) 添加 30 μ l 的 1×裂解缓冲液(将 1 体积的 5×裂解缓冲液添加到 4 体积的无菌水中)。

[0358] f) 将板振荡 15 分钟。

[0359] g) 在 -80°C 下冷冻。此时,技术人员可以停止,也可以继续下一步。

[0360] 步骤 5:通过发光计读数

[0361] a) 将板解冻

[0362] b) 将板放置在冰上直到准备好读数。

[0363] c) 制备技术人员所需的底物试剂;对于海肾:将海肾缓冲液解冻,制备 1 体积 100×海肾荧光素酶(luc)底物加 100 体积荧光素酶测定缓冲液 2ml,用于预先处理发光计。(例如,对于 4ml 海肾荧光素酶底物(lucsubstrate),添加 40 μ l 测定缓冲液)。对于萤火虫:解冻 10ml 萤火虫缓冲液并将其添加到荧光素酶试剂中。

[0364] d) 根据厂商的指示使用标准发光计读板。

[0365] 实施例

[0366] 列出了下列实施例以便为本领域的普通技术人员提供完整的公开内容和如何制备和使用本公开内容的说明,并不意欲限制发明人所认为的公开内容范围,也不意欲表示下列实验是所进行的所有或仅有的实验。已经努力确保所用数字的准确性(例如,量、温度等),但是应考虑一些实验误差和偏差。除非另有说明,否则份数是重量份数。分子量是重量平均分子量,温度是摄氏度,并且压力为大气压或接近大气压。可以使用标准的缩写,例如,bp,碱基对;kb,千碱基;pL,皮升;s 或 sec,秒;min,分钟;h 或 hr,小时;aa,氨基酸;kb,千碱基;bp,碱基对;nt,核苷酸;i.m.,肌内;i.p.,腹膜内;s.c,皮下等等。

[0367] 实施例 1:

[0368] 全世界超过 1.5 亿人口受丙型肝炎病毒(HCV)感染。不幸的是,这些个人中的许多在目前的护理标准下不能清除他们的感染,该护理标准由用干扰素和利巴韦林的组合组成¹(参见本实施例后面编号的参考文献列表)。此外,这种治疗伴随着明显的副作用,妨碍许多个体使用。因此,目前的治疗对于大部分患者是不够的¹,并且对于新的 HCV 药物存在

迫切需要¹。

[0369] 9.6-kb 正单链 RNA HCV 基因组编码 3,000-氨基酸多蛋白,其被蛋白水解地加工成是成熟病毒组分的结构蛋白和参与复制病毒基因组²的非结构蛋白(NS)²。如同其它正链 RNA 病毒³,显示 HCV 复制与细胞内膜结构相关。在 HCV 的情况中,该结构被称为膜状网⁴,并且被认为由 NS4B 蛋白诱导。在 RNA 复制的明显位点内装配其它病毒 NS 蛋白也需要 NS4B⁵。病毒 RNA,尤其是产生子代基因组所需的负链模板如何可被引入或者维持在这些复制位点上未知。

[0370] 已经显示 NS4B 和 HCV RNA 共存在膜网上^{6,7},这表明在实际的病毒 RNA 复制的情况下 NS4B 与病毒 RNA 密切接触。甲型肝炎和脊髓灰质炎小 RNA 病毒具有复制所需的称为 2C 的蛋白质,结合 RNA^{8,9},并且具有 N 末端两亲性螺旋和核苷酸结合基序⁸⁻¹⁰。NS4B 含有相同的结构特征,并且它们都是 HCV 复制所需要的^{5,11}。本发明的方法部分源自以下发现: NS4B 类似地结合 RNA,这种相互作用对于 HCV 生命周期是关键的,并且 NS4B 与 RNA 的结合适合被药理破坏。本发明提供了体外 RNA 结合测定,该体外 RNA 结合测定的形式使得能够进行多种条件、突变和复制的同时分析、定量解离常数(Kd) 测量以及可能的药理抑制剂的高通量筛选。

[0371] 如大多数药物靶标一样¹²,NS4B 是膜蛋白(SEQ ID No:13),如图 7b 中所显示。膜蛋白非常难于生物化学地表达和表征,尤其是以药物筛选所需要的量表达和表征。此外,去污剂的增溶作用可以改变他们的天然膜相关的拓扑学。为了改进这些问题,本发明提供了微流工具以用纳升的蛋白消耗量来进行结合测定。这使得能够使用体外细胞裂解物表达系统,该系统补充有微粒体膜以产生更自然的折叠条件,在该条件下获得了目前可用的最佳的 NS4B 拓扑学数据¹³。低样品消耗量抵消了相对于常规表达方法的降低的产量。

[0372] 之前测量药物相互作用的微流工具限制在可以催化荧光底物形成的酶靶标¹⁴内。在本发明的一种实施方式中,通过使用分子相互作用的机械截获(MITOMI)直接测量结合常数,分子相互作用的机械截获是之前被用于测量转录因子与 DNA 的相互作用的微流亲和力测定¹⁵。使用本发明的方法获得的结果显示 MITOMI 可用于测量膜蛋白-RNA 相互作用的结合常数并用于在高通量筛选中测量小分子对这些相互作用的抑制。后一点是尤其出乎意料的,因为已知用于制造该装置的弹性体具有化学相容性方面的限制^{16,17},此处我们显示了这并不防止其用于药物筛选,其也未防止具有所需药物特性的小分子的发现。总之,使用本发明的这些方法所获得的结果揭示了新的 HCV 靶标,并且首次证明微流技术可用于发现新的药物,从而成功地实现了将微流工具应用于药物发现的超过十年的努力^{18,19}。

[0373] 结果

[0374] 通过研究 RNA 结合活性在之前已被很好地表征了的胎胚致死异常视觉系统(ELAV)家族的两种人蛋白来验证用于 RNA 结合的微流平台的使用。然后,将该方法应用于研究 RNA 与跨膜 HCV NS4B 蛋白的相互作用。该平台用于:(i) 测试 HCV NS4B 结合 RNA 的假说;(ii) 测定这一相互作用的 Kd;(iii) 研究此结合的底物特异性;(iv) 测定 NS4B 内 RNA 结合所需要的氨基酸;和(v) 筛选 NS4B RNA 结合和 HCV 复制的药理学抑制剂的化合物文库。

[0375] 微流测定验证:HuD 与 RNA 的结合。HuD 是来自 ELAV 样家族的具有良好表征的 RNA 结合活性的宿主细胞蛋白²⁰⁻²²。它是含有 3 个保守 RNA 识别基序的胞质蛋白,它通过该基

序结合如编码细胞因子的基因和原癌基因等基因的 3' UTR(非翻译区)中的富含 AU 元件(ARE)。测试针对两种 Cy3 标记的 RNA 探针的结合:AU3 和已知与 HuD 结合被削弱的 AU3 突变体^{21,22}(图 5)。使用 MITOMI 的 RNA 结合实验基本上如 Maerkl 和 Quake¹⁵所述进行,不同的是此时使用 RNA 代替 DNA(图 10)。

[0376] 简言之,将用 Cy3 标记的靶 RNA 序列的微阵列点样在涂覆环氧树脂的载玻片上。通过将阵列中的各点与装置中单元池比对而将这些阵列用于编程微流装置。在微流装置与微阵列结合之后,使其进行表面图式形成,从而在各单元池中产生涂覆有生物素化抗组氨酸抗体的圆形区域。然后将含有编码与 C 末端 V5-6 组氨酸标签框内融合的 HuD(HuD-V5-his)的 DNA 模板或编码与 C 末端 6 组氨酸标签框内融合的 Gus 蛋白(Gus-his)的 DNA 模板的体外转录/翻译混合物加载到装置中。添加氟硼荧(bodipy)标记的 tRNA_{Lys}用于蛋白质标记。然后使用微机械阀分离各单元池,随后孵育以使得蛋白质合成,合成的蛋白质与表面生物素化的抗 his 抗体结合、靶 RNA 溶剂化以及蛋白质和靶 RNA 平衡。然后通过刺激“按钮”膜来进行 MITOMI,以截获表面结合的复合体,同时排除任何液相分子。简单地洗涤以移除未截获的未结合物质后,随后用阵列扫描仪检测截获的分子和表达的蛋白质。通过测量 Cy3 的中值信号与氟硼荧的中值信号的比来计算各数据点的结合的 RNA 与表达的蛋白质的比。

[0377] 如图 5a 中所显示,该测定检测到了强的 HuD 与 AU3 RNA 探针的结合;Gus-his 的背景结合比 HuD 信号低 7-16 倍。该背景水平不随 RNA 探针浓度增加,将其从所有的室中扣除(图 11)。HuD 与 AU3 探针的结合亲和力显著高于 AU3 突变体探针;测得 AU3 结合的 K_d 为 23±5nM,并且 AU3 突变体结合的 K_d 为 268±95nM(图 5a)。这些值与先前在凝胶迁移测定中的测量结果一致^{21,22}并且用于验证了 RNA-蛋白相互作用的 MITOMI 微流亲和力测定。来自 ELAV 样家族的另一蛋白 HuR 的 RNA 结合分析显示在图 12 中。

[0378] 依据微流体系统的 NS4B 与 HCV RNA 的结合和 K_d 测定。然后使用此系统来测试 HCV NS4B 是否结合 RNA。由于 NS4B 在病毒 RNA 复制中是重要的,并且正链 RNA 合成的起始可能在负链 RNA 的 3' 末端开始,因此首先使用称为 3' 负末端的探针测试了 NS4B 与此区域的结合。使用 NS5A 的两亲性螺旋(AH)与 GFP⁵ 的 N 末端的融合体作为阴性对照。此蛋白质还结合于膜,并且因此可以经由 GFP 与抗 GFP 的相互作用而将微粒体膜锚定在装置表面(图 5c)。测得 NS4B 与 HCV 负链 RNA 的 3' 末端结合的 K_d 为 3.4±1.0nM(图 5d)。这似乎是 HCV NS4B 与 RNA 结合的首个证据。使用在大肠杆菌中表达的重组形式的纯化 NS4B 的常规 GST 沉降(pull down)测定和 RNA 滤膜结合测定证实了此结果(图 13),尽管这些测定不够简便并且不太适合本发明的方法所提供的分析类型和高通量形式。

[0379] NS4B 特异性结合病毒负链的 3' 末端 使用 3 种另外的 HCV 探针测量所观察到的 NS4B-HCV RNA 相互作用的底物特异性(图 6a)。称为 5' UTRpos 和 3' UTR pos 的探针分别对应于病毒正链的 5' UTR 和 3' UTR,并且 5' 负末端对应于负链的 5' 末端。重复 RNA 结合实验,并比较了 NS4B 与等摩尔浓度(3nM)的不同探针的结合。如图 6b 中所显示,尽管 NS4B 结合所有 4 种 HCV 探针,但是它与 3' 负末端探针的表观亲和力比所测试的其他三种 HCV RNA 区域或不相关的 δ 病毒 RNA 基因组序列^{23,24}高 5-12 倍(参见图 6b)。这些结果支持如下的结论:RNA 序列,并且很可能是二级 RNA 结构决定 NS4B 与负链 3' 末端结合的特异性。

[0380] NS4B 中富含精氨酸样的基序对 RNA 结合和 HCV 复制是重要的。已经报道了引起蛋白质与 RNA 之间相互作用的多种结构基序²⁵。这些结构基序中的一种是富含精氨酸的基序

(ARM)。ARM 最初被定义为病毒、噬菌体和核糖体蛋白质中所发现的短的 (10 至 20 个氨基酸) 富含精氨酸的序列 (图 7a)^{9,25,26}。除了精氨酸残基较多之外, ARM 序列之间存在极少的同一性。随后, 鉴定了由含有较少的精氨酸的较长序列组成的 ARM 样基序^{9,26}。NS4B 一级序列的检测表明存在多个带正电荷的氨基酸 (参见图 7b)。大多数的这些精氨酸残基在 NS4B 的 C 末端区的最后 71 个氨基酸中 (图 7b 和 7c)。根据经验拓扑学 (empirical topology) 研究, 使用糖基化标志物, 预测此区域形成胞质区段¹³。此区域的元件与先前所描述的 ARM 样基序一致。

[0381] 我们使用一系列的点突变测试了 NS4B 对 RNA 的结合是否是由其带正电荷的残基中的一些介导。在位置 192-193 处用 Ala-Ala 取代 Arg-Arg 称为“RRa 突变体”并且在位置 247-248 处的类似取代称为“RRb 突变体”。如图 7d 所显示, 尽管 RRb 突变体将 NS4B 与 3' 负末端探针的结合降低了 5 倍, 但是 RNA 与 RRa 突变体的结合活性在相同的探针浓度 (1.5nM) 下则完全消失。这些结果支持了所测试的精氨酸残基介导 NS4B 体外结合 RNA 的假说。为了检测这些带正电荷的残基对于 HCV 复制也很重要这一假说, 将这些突变引入高效的亚基因组 HCV 复制子中, 并在标准复制子集落形成测定中测定那些复制子。如图 16 中所显示, 尽管 RRb 突变将复制降低了 ~45 倍, 但是含有 RRa 突变的复制子则完全缺乏 RNA 复制。此外, 复制抑制程度与不同突变所引起的 NS4B RNA 结合削弱的程度相关 (参见图 7d)。此外, 对照实验表明对复制的显著作用并非因为蛋白质的表达改变或错误定位。而是这些微小的突变似乎影响了 NS4B 中的关键调节位点。这些结果支持了病毒体外复制需要 HCV RNA 的有效结合这一结论。数据库中目前可用的天然 HCV 分离物序列的比对揭示这些带正电荷的残基在所有 HCV 基因型中是高度保守的。这种保守支持了体内生产性病毒感染需要 RNA 结合残基这一结论。

[0382] 抑制化合物的高通量筛选。根据本发明的方法筛选化合物文库以鉴定能够抑制 RNA-NS4B 相互作用的小分子。如图 8a 中所显示, 将来自小分子文库的 1280 种化合物以微阵列点样在涂覆有环氧树脂的载玻片上。使该阵列干燥, 然后如上文所述将其与微流装置对准并结合在微流装置上。如前面一样进行剩余的测定, 不同的是用 NS4B-GFP 随后用 Cy5 标记的 3' 末端负 RNA 探针加载装置。在初步筛选中, 化合物以约 1mM 的浓度点样。仅使用两个微流装置对整个文库两次重复筛选。发现在 1280 种化合物中有 104 种对 RNA 与 NS4B 的结合具有抑制作用 (>90% 的抑制)。此外, 有 110 种化合物在两次重复测试之间有显著的偏差, 或者由于技术原因使它们的一次或两次测量被中断。

[0383] 将在初步筛选中鉴定的 214 种化合物 (104+110) 进行二级筛选 (图 8a)。这以类似的方式进行, 不同的是使用更小的装置, 点样的化合物浓度低于初步筛选 10 倍, 并且每个化合物重复 5 次点样。在所测试的 214 种化合物中有 18 种被证实能显著地抑制 NS4B 结合 RNA (图 8b)。大部分所鉴定的化合物不抑制 HuR 蛋白与其自身 4A 靶 RNA 序列的结合 (图 12), 它们也不抑制 HuR 与先前所述的 HCV RNA 靶标: 病毒负链的 3' 末端的结合²⁷, 这表明这些命中 (hit) 是特异性的。支持筛选的有效性的这些数据和其他数据提供于图 14。

[0384] HCV RNA 复制的抑制剂。测量了上述筛选中所鉴定的抑制化合物对 HCV RNA 复制的体内抗病毒作用。用含有荧光素酶报道基因的全长 HCV RNA 基因组电穿孔之后²⁸, Huh7.5 细胞在存在渐增浓度的这些化合物下生长。在 72 小时进行荧光素酶测定。同时, 通过基于阿尔玛蓝的测定来评估化合物存在下的细胞存活率。6 种化合物显示出超过仅由细胞毒性

引起的抗病毒作用的一些抗病毒作用。发现一种 H1 组胺受体拮抗剂克立咪唑盐酸盐 (1-对氯苄基-2-(1-吡咯烷基)甲基苯并咪唑盐酸盐) 显著抑制 HCV 复制。在 $20\text{ }\mu\text{M}$ 的药物浓度下测量到了 10 倍降低的病毒复制和 $\sim 8\text{ }\mu\text{M}$ 的 EC_{50} (图 8c)。在这些浓度下, 没有可测量的细胞毒性 (图 8c)。通过在用克立咪唑处理的用感染性 HCV 克隆 (J6/JFH) 感染的 Huh7.5 细胞进行的实时 PCR 测定获得了类似的结果²⁹ (图 15)。克立咪唑对 NS4B 结合 RNA 的体外 IC_{50} 为 $\sim 24\pm 1\text{ nM}$ (图 8d)。

[0385] 克立咪唑盐酸盐衍生分子的增加的效价和效力: 使用本申请中所述的方法进行的筛选鉴定了具有增加的效价的克立咪唑类似物。一个这种分子的实例显示在图 17 中, 其具有下列数据:

[0386] Fig. 17A- 克立咪唑盐酸盐的化学结构。

[0387] Fig. 17B- 具有增加的效价和效力的克立咪唑衍生分子的化学结构。

[0388] 图 17C- 如微流所测定的克立咪唑衍生分子 (●) 与母体克立咪唑盐酸盐化合物 (□) 的体外抑制曲线。

[0389] 图 17D- 如在 HCV 感染的细胞中的实时 PCR 所测量的, 在存在渐增浓度的克立咪唑衍生分子 (●) 和克立咪唑盐酸盐 (□) 下 HCV 复制的剂量反应曲线。

[0390] 误差线表示标准偏差。

[0391] 如可以看到的, 这种衍生化合物具有增加的体外效价 (IC_{50} 为 6 nM , 对克立咪唑的 24 mM) (图 17C)。重要的是, 这种化合物还表现出在细胞中抗 HCV 复制的较高抗病毒活性, 且 EC_{50} 为 $1\text{ }\mu\text{M}$ (对克立咪唑的 $8\text{ }\mu\text{M}$) (图 17D)。

[0392] 总之, 上述数据与耐受性突变体的分析结合提供了克立咪唑作用机制的引人注目的遗传学、生物化学和药理学证据。此外, 这些数据证明使用本发明的方法可以鉴定更多有效的抑制分子。

[0393] 克立咪唑耐受性突变体通过选择克立咪唑耐受性 HCV 突变体来进一步证实克立咪唑抗病毒活性的作用机制。将已建立的含有 HCV 复制子的细胞和重新用基因型 1b 亚基因组 HCV 复制子 (Bart 79I) 电穿孔的 Huh7 细胞³⁰ 在药物存在下传代, 产生能够在化合物存在下生长的 ~ 60 个集落。成功扩展了 11 个单个集落, 传代 5-10 次, 并且将细胞中复制的 HCV RNA 进行序列分析。此外, 分离来自克立咪唑耐受性集落库的 RNA 并进行类似的分析。发现 3 个集落含有具有定位在 NS4B 区的突变的复制子, 并发现 6 个集落含有具有定位在负链 3' 末端 RNA 区的突变的复制子。(值得注意的是, 在图 17B 的克立咪唑衍生分子存在下选择的耐受性突变的位置定位在 HCV 基因组中的类似位置)。此外, 有一个集落具有定位在 NS4B 和负链 3' 末端两者的突变, 并且还未鉴定出其中突变的位置赋予克立咪唑耐受性的集落。在不存在药物下平行传代的 10 个复制子集落中没有鉴定出这种突变。

[0394] 详细表征了克立咪唑耐受性 NS4B 突变体中的两种。第一种为描绘在图 9a 中的 W55R。它包括在预计的胞质定向的 NS4B 区段中氨基酸 55 处用精氨酸取代色氨酸。这种突变足以在如下细胞中赋予克立咪唑耐受性表型: 用从 W55R 突变体细胞中提取的全细胞 RNA 转染的 Huh7.5 细胞或用编码该点突变的体外转录的 J6/JFH RNA 转染的 Huh7.5 细胞 (图 9b), 并且所连接的荧光素酶报道基因 (图 9c) 不受 $10\text{ }\mu\text{M}$ 克立咪唑的影响。克立咪唑对 W55R 突变体 J6/JFH RNA 的 EC_{50} 为 $\sim 18\text{ }\mu\text{M}$ (对野生型 RNA 的 EC_{50} 的 2.25 倍)。与 NS3 蛋白酶抑制剂耐受的其他 HCV 突变体类似³¹, W55R 突变体的绝对复制水平低于野生型基因

组,这表明药物耐受性突变是以损伤的复制适应性为代价。

[0395] 还将该突变导入 NS4B-GFP 载体中并且使用本发明的体外微流测定来测试所得载体的 RNA 结合活性。尽管,突变体和野生型 NS4B 蛋白都经历了 10nM 克立咪唑存在下的 ~ 2 倍的 RNA 结合降低,但是由于突变体的基线 RNA 结合较高,在克立咪唑存在下,突变体结合 RNA 的残余量与不存在克立咪唑下野生型结合 RNA 的量相当(图 9d)。此外,如图 9e 中所显示,这种突变体表现出较高的与病毒 RNA 的表观亲和力,具有 0.75nM 的 K_d (对野生型 NS4B 的 3.4nM)。

[0396] 称为 R214Q 的第二个克立咪唑耐受性突变在耐受性集落以及合并的耐受性细胞中鉴定。它包括在 NS4B 的胞质 C 末端区段中氨基酸 214 处用谷氨酰胺取代精氨酸。在对这种突变进行的细胞分析和体外分析中获得了与第一种突变类似的结果,它在荧光素酶报道基因连接的复制测定中具有 40.3 μM 的 EC_{50} (比野生型 RNA 的 EC_{50} 高约 5 倍)并且在体外结合测定中具有 0.6nM 的 K_d 。推测这两种突变都改变了 NS4B 的构象,从而增加了它对病毒 RNA 的亲和力。实际上,体外 RNA 结合测定所测量的 K_d 也反映了这点。总之,上述数据提供了克立咪唑作用机制的引人注目的遗传学和生物化学证据。

[0397] 讨论

[0398] 上述结果证明 HCV NS4B 结合 RNA,并且这种结合具有对病毒基因组负链的 3'末端的特异性。由于这种相互作用的体内特异性还未被定量地测定,技术人员采用推断此处所报道的体外结果的数值的一般注意事项。NS4B 中富含精氨酸样的基序对 RNA 结合和 HCV 复制是重要的。发现克立咪唑盐酸盐具有通过它抑制 NS4B 的 RNA 结合介导的对 HCV RNA 复制的显著体内抗病毒作用,并对宿主细胞具有极小的毒性。

[0399] 由于 NS4B 与膜结合⁵并且已知它诱导膜复制位点⁴,因此它的 RNA 结合活性提供了将病毒基因组导入 HCV 复制区室的机制。这可以促进启动从锚定在膜上的负链合成新的正链。NS4B 还可以通过经由其与 NS5B 聚合酶或复制复合体的其他组分的相互作用而将聚合酶复合体募集至 HCV RNA 来起作用³²。

[0400] 克立咪唑对 NS4B 结合 RNA 的体外 IC_{50} 为 $\sim 24 \pm 1nM$,而它对病毒复制的 EC_{50} 为 $\sim 8 \mu M$ 。可能是由于较低的细胞透性导致了细胞中所测得的对 NS4B 体外结合 RNA 的 IC_{50} 与所测得的对抗病毒作用的 EC_{50} 之间的 ~ 400 倍的差异。预计结构-活性关系 (SAR) 分析之后的改善的药物递送和化合物优化能提供更有效的抗病毒剂,并且本发明的微流系统和筛选方法可能有助于该过程。

[0401] 此研究还证明了微流方法的效用。微流亲和力测定与目前所用的方法相比具有几个重要的优点,这些优点使其成为药物发现,特别是针对结合膜的靶的药物发现的有希望的和普通的工具。首先,在微粒体膜存在下通过哺乳动物网织红细胞裂解物合成蛋白质提供了蛋白质折叠所需的天然条件。其次,微流测定消除了对高水平的蛋白表达和纯化的需要,这种需要是目前所用方法所面临的一个问题。再次,这种测定能够检测瞬时的和低的亲和相互作用¹⁵。第四,微流装置能够进行一些平行的测量,并且因此可用于高通量筛选。最后,尽管已知用于制造装置的弹性体具有化学相容性问题,但是技术人员可以使用该装置和方法成功地筛选和发现具有所需的药物特性的小分子。

[0402] 对于 HIV 和结核病,可能通过针对独立性病毒特异性靶的多种药物的混合物而最好地实现有效的 HCV 的药理控制。因此,甚至中等的 NS4B 抑制剂与现有的和/或其他出现

的抗 HCV 剂的组合代表了用于增加目前病毒性反应率的吸引人的范例。尽管可以获得比克立咪唑更有效的抑制剂,但是由于克立咪唑已经广泛地用于人中(虽然用于不同的适应症),它可以立即用作抗 HCV 治疗剂并且作为根据本发明的下一代抗 HCV 策略的关键组分。

[0403] 方法

[0404] 质粒:使用标准的重组 DNA 技术来构建和纯化所有质粒。用 PCR 扩增的所有区域都通过自动 DNA 测序来分析。质粒 DNA 由大规模细菌培养物制备,并且通过 Maxiprep 试剂盒 (Marligen Biosciences) 纯化。限制酶购自 New England Biolabs。

[0405] HuR 和 HuD 的可读框 (ORF) 从 cDNA 克隆的 ORFeome 文库 (Openbiosystems) 获得。通过使用容许添加 C 末端 V5-his 标签的 gateway 技术 (Invitrogen) 将这些 ORF 插入表达载体 pcDNA-Dest 40 载体 (Invitrogen) 中。

[0406] 先前描述了将编码基因型 1a NS4B 的质粒 pcDNA-NS4B-GFP 与 C 末端 GFP 进行框内融合⁵。通过定点诱变(使用 QuikChange 试剂盒 (Stratagene)) 将突变 RRa、RRb 和 W55R 导入这种质粒。如先前所报道地构建质粒 NS5A (AH) GFP。Gus-his 载体自 Roche 获得。

[0407] 编码病毒正链 5' UTR 的质粒 pcDNA3.1-5' UTR pos 如下产生:用含 EcoRV 限制位点的引物从 Bart79I 质粒扩增 5' UTR pos 序列³³,用 EcoRV 消化并连接至 pcDNA3.1 (Invitrogen) 中的相应位点。编码 RNA 负链的 3' 末端区的质粒 pcDNA3.1-3' 负末端以相同的方法产生,不同的是以相反的定位连接侧翼为 EcoRV 的插入基因。

[0408] 类似地产生质粒 pcDNA3.1-3' UTR pos 和 5' 负末端,不同的是插入基因的侧翼为 HindIII 和 XhoI 限制性位点。

[0409] 通过将侧翼为 NheI 的 HDV 序列插入用 XbaI 切割的 pSPT19 载体 (Roche Diagnostics) 克隆编码 δ 病毒基因组 RNA 序列的载体^{23,24}。

[0410] 由全长 HCV 基因组构成并表达海肾荧光素酶的质粒 FL-J6/JFH-5' C19Rluc2AUbi 由 Charles M. Rice 博士赠予²⁸。通过定点诱变(使用 QuikChange 试剂盒 (Stratagene)) 将 W55R 突变导入该质粒。

[0411] 体外 RNA 转录和荧光标记和放射性标记用 XbaI 将病毒负链和正链的 5' 和 3' 末端区的质粒 DNA 线性化。用 XbaI 将 δ 基因组序列的质粒 DNA 线性化。然后用蛋白酶 K 处理线性化的质粒,随后用苯酚-氯仿抽提并用乙醇沉淀。将 DNA 在不含 RNA 酶的水中重悬至终浓度为 1 μ g/ μ l。根据厂商的方案,将 4 μ g DNA 用做模板用于用 T7MEGAscript (Ambion) 转录。通过添加 5U 的 RQ1DNA 酶 (Ambion) 并在 37°C 下孵育 15 分钟来消化模板 DNA。通过用 Micro Bio-Spin P-30 柱 (Bio-Rad) 的尺寸排阻来移除未导入的核糖核苷酸,并用苯酚-氯仿抽提转录的 RNA,随后在乙醇中沉淀。用 70%乙醇洗涤 RNA 沉淀,并在 H₂O 中重悬。通过测量 260nm 处的光密度进行 RNA 浓度测定。通过 1%琼脂糖凝胶电泳和溴化乙锭染色确定 RNA 的完整性及其浓度。

[0412] 通过使用 Label IT 试剂盒 (Mirus) 根据厂商的方案用 Cy5 标记 RNA 序列,随后在 microspin 柱 (Mirus) 上纯化并进行乙醇沉淀。通过在 260nm 和 Cy5 的 λ_{MAX} (650nm) 处测量核-染料轭合物的分光光度吸收来测定每个 RNA 分子的荧光标记数。这与探针长度成比例,并且被用于调整结合实验结果。

[0413] 用于研究 HuR 和 HuD 结合 RNA 的 Cy3 标记的 RNA 探针购自 IDT。

[0414] 用 32P 放射性标记 RNA 探针如先前所述进行³⁴。

[0415] 装置设计：装置制造和设计基本上如所描述的¹⁵进行。简言之，将含有启动阀所需要的所有槽的“控制”层设置在含有受控制的槽的网络的“流动”层上。所有的生物学测定和流体操作都在流动层上进行。在控制槽与流动槽交叉处设置阀。在两种槽的结合处的所得薄膜可以通过液压促动而偏转。使用多路阀系统容许具有大量弹性体微阀在这些装置中进行复杂的流体操作。通过将钢丝针插入孔穿通硅树脂中将流体导入这些装置。受计算机控制的外部螺线管阀容许启动多路调节器，这继而容许大量微阀的复杂访问。每个单元池由三个微机械阀和“按钮”膜控制（图 10）。每个单元池的“按钮膜”在两个“夹心”阀之间的流动槽内遮盖了一个圆形区域。微阵列与装置的对准和结合容许放置点样材料（RNA 探针或抑制化合物）到各单元池的“RNA 室”中。然后通过控制“颈阀”将这种室开向流动槽。所用的装置具有 640 个或 2400 个单元池。

[0416] RNA 结合测定所用的方法是先前所述的用于蛋白-DNA 相互作用的方法¹⁵的修改方法（图 10）

[0417] 1. 可溶蛋白质：A. RNA 排列和装置对准首先，通过 OmniGridMicro (GeneMachines) 微阵列仪使用 CMP3B 针 (TeleChem International, Inc.) 将连续稀释的 Cy3 标记的靶 RNA 序列 (IDT) 以微阵列点样在涂覆有环氧 树脂的玻璃衬底载玻片 (CEL Associates) 上，所述微阵列具有分别为 680mm 和 320mm 的列间距和行间距。每个样品溶液含有在 dH₂O 中的 1% BSA 以防止靶 RNA 与环氧官能团的共价连接，并为了在对准期间可见。点样后，在 GenePix4000b (Molecular Devices) 上对阵列质量控制。然后通过 SMZ1500 (Nikon) 实体镜手动将阵列与微流装置对准，并避光在 40℃ 下在加热的板上结合过夜。

[0418] B. 表面化学（图 10c）所有的装置的控制线都在 10psi 和 15psi 之间驱动，并且流动线都在 4psi 和 6psi 之间驱动。对于最初的表面衍生步骤，室阀保持关闭以防止液体进入含有点样有 RNA 靶的室中。首先，通过使以 2mg/mL 重悬在 dH₂O 中的生物素化 BSA (Pierce) 溶液流动通过所有槽 30 分钟，然后进行 10 分钟的 PBS 洗涤来衍生所有可接近的表面区域。然后使在 PBS 中的 500 μg/mL 中和亲和素 (Neutravidin, Pierce) 溶液在表面上流动 20 分钟，随后进行 10 分钟的 PBS 洗涤。接着，关闭“按钮”膜，继续进行 PBS 洗涤 5 分钟。然后用如上文用的相同生物素化溶液将除按钮所遮盖的 60 μm 环圆区域外的所有剩余的可接近表面区域钝化 30 分钟，随后进行 10 分钟的 PBS 洗涤。最后加载生物素化的 5- 组氨酸抗体 (Qiagen) 在含 2% BSA 的 PBS 中的 1 : 1 溶液，持续 2-5 分钟，然后打开“按钮”膜并使其继续流动 20 分钟，使得之前被遮盖的圆形区域被特异性地官能化。这之后再次进行 10 分钟的 PBS 洗涤，完成了表面衍生步骤。

[0419] C. 蛋白合成和 MITOMI 接下来制备标准 25 μL TNT T7 偶联的麦胚抽提物混合物 (Promega)，并用 1 μL tRNA^{Lys}- 氟硼荧 -f1 (Promega) 和 2 μL 编码合适蛋白 (HuR、HuD 或 Gus) 的质粒 DNA 模板对其加标 (spike)。立即将混合物加载到装置上并冲洗 5 分钟，然后打开室阀以容许用麦胚抽提物对室进行死端式填充。将室阀再次关闭并继续再冲洗 5 分钟。接着，将分隔各单元池的分离阀关闭，随后打开室阀使得单元池通过扩散平衡。在温控的显微镜台上将整个装置加热至 30℃，并孵育多达 90 分钟以完成蛋白合成、蛋白与表面结合的生物素化 -5- 组氨酸抗体结合、靶 RNA 溶剂化以及蛋白与靶 RNA 的平衡。然后通过关闭“按钮”膜和室阀来进行 MITOMI，以使得截获表面结合的复合体，同时排除任何液相分子。径向闭合防止两个界面之间形成溶剂袋并且有效地产生 0 死体积，同时保持待检测的分子相互

作用的平衡浓度。这之后进行 5 分钟的 PBS 洗涤以移除未截获的未结合物质。然后将装置在改进的 arrayWoRxe (AppliedPrecision) 微阵列扫描仪上成像以检测蛋白质合成和截获的分子。

[0420] D. 图像和数据分析所有的图像都用 GenePix3.0 (Molecular Devices) 分析。对于每个实验,在 MITOMI 和最后的 PBS 洗涤后采集图像。使用该图像来测定表面结合的蛋白 (FITC 通道) 的浓度和表面结合的靶 RNA (Cy3 通道) 的浓度。每个单元池产生由 Cy3 中值信号与氟硼荧中值信号的比组成的单个数据点;因此,该数据点表示表面结合的 RNA 与表面结合的表达的蛋白质的比。将来自多个数据点的数据平均,并计算它们的标准偏差。然后将结果标准化至 1。每种测试的探针包括 10-20 个重复。对照蛋白 Gus-his (Roche) 包含在每个实验中,并进行相同的分析。如果存在,则检测到的 Gus-his 信号用于背景扣除。

[0421] 2. 对于膜结合的蛋白 NS4B 结合 RNA 的检测与上文所述方法类似地进行,除了如下改动。通过使用偶联转录 / 翻译兔网织红细胞系统 (Promega) 表达 NS4B,然后将其加载到微流装置中。将 2 μ L 犬微粒体膜 (Promega) 添加到反应混合物中以容许合适的蛋白折叠。使用 NS4B-GFP 构建体,从而消除了对反应混合物中 $\text{tRNA}_{\text{Lys-氟硼荧-fl}}$ 的需要。使用生物素化的抗 GFP 抗体 (Abcam) 特异性地功能化由按钮所界定的受保护的环状区域。蛋白质经它与表面结合的抗 GFP 抗体的相互作用锚定在芯片上。将表面结合的蛋白质和 Cy5- 标记的 HCV RNA 探针加载到芯片中,并容许其在 50mMHepes KOH (pH 6.8) 缓冲液中孵育 5-20 分钟。接着,进行 MITOMI,然后在 Hepes KOH (pH 6.8) 缓冲液中简单地洗涤。然后扫描装置,如上文所述定量结果。以同样的方法测定 NS4B-GFP 突变体和 NS5A (AH) -GFP。用 NS5A (AH) -GFP 检测的信号用于背景扣除。

[0422] 抑制化合物文库的筛选使用 OmniGrid Micro (GeneMachines) 微阵列仪和 CMP3B 针 (TeleChem International, Inc.) 将溶解在二甲基亚砜 (DMSO) 中的 Lopac 文库的 1280 种化合物 (Sigma) 以微阵列点样在涂覆有环氧树脂的玻璃衬底载玻片 (CEL Associates) 上。对于初步的筛选,化合物以高浓度 (约 1mM) 点样,重复两次。使该阵列干燥,然后将其与所述的微流装置对准并结合在微流装置上。初步筛选使用两台大的装置 (每个装置 2400 个单元池)。剩余的步骤与上文所述的步骤 (RNA 结合测定) 类似地进行。简言之,使装置进行表面图式形成,这在每个单元池内产生了涂覆有生物素化的抗 GFP 抗体的圆形区域。接着,将在微粒体膜 (Promega) 存在下使用偶联转录 / 翻译兔网织红细胞系统 (Promega) “芯片外 (off chip)” 制备表达的 NS4B-GFP 加载到芯片上,并结合在表面生物素化的抗 GFP 抗体上。然后以 1.5nM 的浓度加载 Cy5 标记的 3' 负末端 RNA 探针。然后分离各单元池,随后孵育 30 分钟以容许蛋白质与表面生物素化的抗 GFP 抗体结合、文库化合物溶剂化和蛋白与靶 RNA 的平衡。接着,进行 MITOMI,截获表面结合的复合体,同时排除任何液相分子。简单地洗涤以移除未截获的未结合的物质后,扫描装置并分析结果。通过测量 Cy3 的中值信号与氟硼荧的中值信号的比来计算各数据点的结合的 RNA 与表达的蛋白质的比。将结果相对于不含抑制化合物的单元池中测得的信号标准化。将大于 90% 的抑制率定义为初步筛选中抑制率的截断值。将在此截断值之上的 104 种化合物和产生不明确结果的另外 110 种化合物进行二级筛选。这类似地进行,不同的是使用两个较小的装置 (每个装置 640 个单元池),点样的化合物浓度低于初步筛选 10 倍,每种化合物进行重复 5 次点样。大于 2.5 倍的抑制被认为是显著的。进一步分析在此筛选中鉴定的 18 种化合物对 HCV RNA 复制的抗病

毒作用。

[0423] 体外 RNA 结合的 IC₅₀ 的测定对于准确测量 IC₅₀, 将连续稀释的抑制化合物通过连续流动加载到微流装置上, 同时保持流动槽中化合物的浓度稳定。这有助于避免由于不完全的溶剂化和 / 或化合物与 PDMS 的结合引起的点样化合物的预期损失。基本上如用于跨膜蛋白的 RNA 结合测定所述进行该实验, 不同的是在存在抑制化合物或不存在抑制化合物下在装置中孵育表达的蛋白质和 Cy5 标记的 HCV RNA 探针。如下面的统计分析部分所述测量 IC₅₀。

[0424] 重组 NS4B 的表达和纯化在大肠杆菌 BL21 中表达 GST-NS4B 和 GST, 并且如别处所述¹¹ 纯化。将 NS4B 与 N 末端 6his-MISTIC 蛋白 (用于翻译 IM 蛋白构建体的膜整合序列) 框内融合³⁵。将用 mistic-NS4B 质粒 转化的大肠杆菌过夜培养物在 400ml 新鲜培养基中以 1 : 100 稀释, 并在 37℃ 下生长至 OD 为 0.8。然后添加异丙基-β-D- 硫代吡喃半乳糖苷 (IPTG) (Invitrogen) 至终浓度为 0.1mM。在 37℃ 下生长 3 小时, 沉淀细胞并将其重悬在 30ml 裂解缓冲液 (50mM NaCl、50mM Tris HCl (pH8)、100mM 咪唑、10mM 癸基麦芽糖苷、不含 EDTA 的完全蛋白酶抑制剂 (Roche Applied Science)) 中。通过在 French Press 中以 10,000psi 进行一次 1 分钟的循环来裂解细胞, 然后在 4℃ 下以 12,000g 离心 5 分钟。将上清液加载到镍柱 (Amersham) 上。洗涤, 然后在含有 400mM 咪唑的缓冲液中洗脱蛋白质。以 20% 的终浓度添加甘油并将样品储存在 -20℃ 下。通过 SDS-PAGE 监测纯化。使用 RC-DC 测定 (Bio-Rad) 测量总蛋白浓度。通过使用抗 6-his 的单克隆抗体 (Santa Cruz Biotechnology) 和抗 NS4B 的单克隆抗体 (Virostat) 的蛋白印迹分析鉴定 NS4B-mistic。以类似地方式表达和纯化 6his-mistic。

[0425] GST 沉降测定与先前所述的策略³⁶ 类似, 在 37℃ 下将 1 μg 纯化的 GST-NS4B 或 GST 在含有 ³²P 标记的体外转录的 HCV RNA (对应于病毒负链的 3' 末端) 和结合缓冲液 (10mM DTT、10mM Na HEPES (pH 7.4)、33mM NaCl、0.1mM EDTA、10mM MgCl₂) 的 50 μl 反应混合物中孵育 1 小时。然后添加 50 μl 用 tRNA 预涂覆的谷胱甘肽-琼脂糖小珠 (Sigma), 随后在 4℃ 下孵育 1 小时以容许 GST 与小珠结合。然后在结合缓冲液中洗涤小珠 3 次, 并通过样品等分试样的液体闪烁计数来测量结合的 RNA。将用不存在 T7 RNA 聚合酶下制备的 RNA 探针孵育的对照用于背景扣除。

[0426] RNA 滤器结合测定. 基本上如所描述的³⁴ 进行测定。简言之, 将不同浓度的 mistic-NS4B 蛋白或 mistic 对照与 3.3nM ³²P- 标记的体外转录的 HCV RNA 探针一起在终体积 40 μl 的结合缓冲液 (50mM HEPES pH 7.0、50mM NaCl、1mM MgCl₂、10ng/μl tRNA 和 0.2mM 癸基麦芽糖苷) 中在 30℃ 下孵育 1 小时。将膜在结合缓冲液中预浸, 并如下从上到下在斑点印迹设备 (Schleicher & Schull) 中组装: 硝酸纤维素 (Biorad)、Hybond N+ (Amersham Biosciences)、Whatman 3mm 滤纸。将结合反应物加载到该斑点标示 (dot-plot) 设备上并通过膜过滤。洗涤, 然后将膜空气干燥并通过磷光成像显像。结果表明通过在硝酸纤维素膜中所检测到的信号除以硝酸纤维素膜和 Hybond 膜中所检测到的信号的总和而计算的结合的 RNA 的百分比。

[0427] 细胞培养物和电穿孔. 将 Huh-7.5 细胞保持在补充有下列物质的 Dulbecco 改良的极限必须培养基 (Dulbecco's modified minimal essential medium, Gibco) 中: 1% L- 谷氨酰胺 (Gibco)、1% 青霉素、1% 链霉素 (Gibco)、1× 非必须氨基酸 (Gibco) 和 10%

胎牛血清 (Omega Scientific)。用 0.05%胰蛋白酶-0.02% EDTA 处理并以 1 : 5 稀释接种之后,将细胞系每周传代两次。胰蛋白酶化亚汇合的 Huh-7.5 细胞并通过 700g 离心 5 分钟来收集。然后将细胞在不含 RNA 酶的冰冷 PBS (BioWhittaker) 中洗涤 3 次并以 1.5×10^7 个细胞 /ml 在 PBS 中重悬。基本上如上文所述 (体外 RNA 转录和荧光标记),通过使用 T7 MEGAscript 试剂盒 (Ambion) 体外转录 XbaI 线性化的 DNA 模板,然后纯化来产生用于电穿孔的野生型或突变体 FL-J6/JFH-5' C19R1uc2Aubi RNA。将 5 μ g RNA 与 400 μ l 洗涤过的 Huh-7.5 细胞在 2mm 间隙的电击杯 (BTX) 中混合,立即用 BTX-830 电转化仪施加脉冲 (0.82kV, 5 次 99 μ s 脉冲)。在 25°C 恢复 10 分钟后,将脉冲过的细胞稀释在 10ml 预热的生长培养基中。将来自几次电穿孔的细胞汇集成总储备液并接种在 6 孔板中 (每孔 5×10^5 个细胞)。24 小时后,更换培养基并使细胞在存在筛选中所鉴定的各种抑制化合物 (Sigma) 的连续稀释物下生长。分析了所鉴定的 18 种化合物中的 17 种商购获得的化合物。使用未处理的细胞用作水溶性化合物的阴性对照。对于溶解在 DMSO 中的化合物,在存在相应浓度的溶剂下生长的未处理细胞作为阴性对照。每天更换培养基。处理 72 小时后,对细胞进行基于阿尔玛蓝的存活率测定和荧光素酶测定。

[0428] 存活率测定. 处理 72 小时后,将细胞在存在 10%阿尔玛蓝试剂 (TREKDiagnostic Systems) 在 37°C 孵育 3 小时。然后通过使用 FLEXstation II 384 (Molecular Devices, Inc.) 扫描板并检测荧光。依据抑制化合物的溶剂是水 (不在 DMSO 中的其他化合物) 还是 DMSO (D042、(烯丙基降阿朴吗啡)、R-108、托吡卡胺、沙利度胺、格列本脲、LFM-A13),将信号分别相对于未处理的样品或在存在 DMSO 下生长的样品标准化。

[0429] 荧光素酶测定. 使用海肾荧光素酶测定 (Promega) 来检测病毒 RNA 复制。在此测定中分析进行上述存活率测定的相同样品。根据厂商的方案,用冰冷 PBS 洗涤细胞并将细胞从板上刮入 250 μ l 的冰冷海肾裂解缓冲液中。然后将 20 μ l 的细胞裂解液加载到 96 孔板上。注射含有测定底物的 100 μ l 海肾荧光素酶测定缓冲液并使用 Berthold LB 96V 发光计测量荧光素酶活性。如上面一样,将信号相对于未处理的样品或在相应浓度的 DMSO 存在下生长的样品标准化。

[0430] 使用 100u/ml 干扰素 α B2 (PBL biomedicallabs) 处理的样品中检测到的荧光素酶活性作为阳性对照,它在处理 72 小时时显示出 3 的对数降低。重复进行实验 4 次,每次进行 3 个重复。通过将数据与使用式 $Y = a + (b-a) / (1 + 10^{(X-c)})$ 的三参数逻辑曲线拟合 (BioDataFit, ChangBioscience, Inc) 来测量 IC50。

[0431] 实时 PCR. 如所描述的²⁹,用以 1.4×10^4 TCID50/ml 滴定的细胞培养物生长 HCV 感染 5×10^4 个 Huh7.5 细胞。感染 2 小时后,在培养基中洗涤细胞 3 次。然后用各种浓度的克立咪唑每天一次处理细胞。72 小时后,对样品进行上述存活率测定,然后添加 TRIzol 试剂 (Invitrogen) 并根据厂商的说明书提取总细胞 RNA,重复 3 次。然后使用随机六聚体和 Superscript II 逆转录酶 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 进行逆转录。对所得的 cDNA 进行实时 PCR 以定量各样品中的 HCV 和肌动蛋白 RNA (在分开的反应中进行) 的量。使用体外转录的 HCV RNA 和人肌动蛋白标准物 (Applied Biosystems, Foster City, CA) 来制备标准物。使用引物 AGAGCCATAGTGGTCT (SEQ ID No :17) 和 CCAAATCTCCAGGCATTGAGC (SEQ ID No :18) 以及探针 6-羧基荧光素-CACCGGAATTGCCAGGACGACCGG-6 (SEQ ID No :19) 羧基四甲基罗丹明来定量 HCV。根据厂商的说明书使用 β -肌动蛋白对照试剂 (Applied Biosystems)

定量肌动蛋白。将 HCV RNA 水平调整至肌动蛋白水平并相对于未处理的样品标准化。

[0432] 耐受性突变体的选择将已建立的含有 HCV 复制子的细胞和重新用基因型 1b 亚基因组 HCV 复制子 (Bart 79I) 电穿孔的 Huh7 细胞³⁰ 在新霉素和渐增浓度的克立咪唑 (1-16 μ M) 存在下传代。分离能够在化合物存在下生长的集落并使其繁殖 5 至 10 代。(约 60 个中的) 11 个集落在传代后存活并且将它们如先前所述¹¹ 进行序列分析。

[0433] 全细胞 RNA 电穿孔. 使用 TRIzol 试剂 (Invitrogen) 从克立咪唑耐受性的复制子克隆和未处理的复制子细胞中提取全细胞 RNA。如上所述将等量的全细胞 RNA (50 μ g) 电穿孔到 Huh7.5 细胞中。在存在或不存在克立咪唑下使细胞在 G418 选择下生长 3 周。固定并用结晶紫染色, 然后用 Image J (NIH) 确定克隆数。

[0434] 统计分析. 通过非线性最小二乘回归拟合 (BioDataFit, ChangBioscience) 将数据与描述平衡结合的等式 $Y = a \cdot X / (b + X)$ (a 和 b 分别代表最大的结合和 K_d) 拟合来确定解离平衡常数。通过将数据与使用式 $Y = a + (b - a) / (1 + 10^{(X - c)})$ (a 、 b 和 c 分别表示最小结合、最大结合和 $\log EC_{50}$) 的三参数逻辑曲线拟合 (BioDataFit, Chang Bioscience, Inc) 来测量 IC_{50} 。

[0435] 其他信息.

[0436] 校准曲线: 为了确定干燥的点样 RNA 探针充分溶解并且排除大部分溶剂粘附到构成微流装置的聚二甲基硅氧烷 (PDMS) 上的可能, 制作了校准曲线。通过连续流动将已知浓度的可溶性的标记的 RNA 探针加载到装置中并且将来自多个单元池的 Cy3 信号的均值进行平均。根据这个曲线, 计算测定中所用的靶 RNA 序列的实际浓度。平均来说, 点样的靶 RNA 序列的实际测定的浓度为 0.55 ± 0.02 。注意, 根据典型的印迹体积和单元池体积的比计算类似因子 (0.57)。将所有显示的数据根据该因子调整。

[0437] 使用高离子强度缓冲液的 RNA 结合实验: RNA 结合实验中所用的缓冲液的离子强度可能对蛋白质-RNA 相互作用具有影响。为了确定 RNA 结合测定中检测到的高亲和相互作用不是由于低离子强度的缓冲液所引起的静电相互作用的增强的结果, 通过使用高 (150mM) 离子强度条件的微流来进行 NS4B 的 RNA 结合实验。在 PBS (137mM NaCl、2.7mM KCl、10mM Na_2HPO_4 、2mM KH_2PO_4) 或 150mM Hepes 存在下, NS4B 结合 RNA 与用 50mM Hepes 缓冲液所检测到的类似, 其他人常用该 50mM Hepes 缓冲液进行 RNA 结合测定 (J Biol Chem 280, 36417-36428 (2005) 和 J Virol 80, 9865-9875 (2006), 它们每个都通过引用并入本文)。测得在高离子强度条件下 NS4B 与 HCV 负链 RNA 的 3' 末端结合的 K_d 为 6.6 ± 3.3 nM (对存在于低 (50mM) 离子强度的条件下的 3.4 ± 1.0 nM 的 K_d)。这些结果表明对于所观察到的 RNA 结合只有很小的静电成分。

[0438] ATA 以剂量依赖方式抑制 NS4B 结合 RNA: 在文库筛选之前, 已确定可以从药理学上抑制 NS4B 结合 HCV RNA。金精三羧酸 (ATA) 是已知抑制蛋白质与核酸相互作用的一种化合物 (Nucleic acids res 4, 3055-3064 (1977), 通过引用并入本文)。因此, ATA 应该抑制 NS4B 与 HCV RNA 结合。为了测试这个假说, 在存在渐增浓度的 ATA 下重复了 NS4B RNA 结合测定。确实, 发现 ATA 以剂量依赖方式抑制 NS4B 结合 HCV RNA, 并且具有 0.49 ± 0.01 μ M (p 值 -0.0003) 的 IC_{50} (图 14)。

[0439] 与此结果一致的是, ATA 是 LOPAC 文库的筛选中鉴定出的 18 种化合物中的一种。由于先前已显示这种化合物抑制 NS4B 的 RNA 结合活性, 所以该化合物作为筛选验证的可用

内部对照。

[0440] 小分子筛选中所鉴定的化合物的特异性:为了确定小分子筛选中所鉴定的化合物的特异性,选择了 HuR 蛋白(用于验证我们的 RNA 结合测定的人 RNA 结合蛋白中的一种)。有趣的是,除了与其靶 RNA 序列 4A(图 12) 结合之外,其他人员之前已显示该蛋白结合 HCV 负链的 3' 末端(Virology 274, 378-390 (2000), 通过引用并入本文)。在存在显示抑制 NS4B 结合 RNA 的抑制分子下测试 HuR 与 4A RNA 共有序列的结合。在 0.1mM 的浓度下,包括克立咪唑的大多数化合物没有检测到对 RNA 结合的抑制作用。类似地,0.1mM 的已鉴定的化合物对 HuR 与 HCV RNA 负链的 3' 末端结合没有抑制作用。与其他化合物相反,已知为蛋白质-核酸相互作用的非特异性抑制剂的 ATA 显著抑制 HuR 与 4A 和 HuR 与 HCV 负链的 3' 末端两者的结合。这些结果支持了包括克立咪唑的所鉴定的化合物对 NS4B 结合 RNA 确实具有特异性。

[0441] 实施例 1 的附图说明

[0442] 图 4A 说明合成 5,6- 二取代的克立咪唑化合物的一般方法的实施方式。图 4B 和 4C 说明合成两种 5,6- 二取代的克立咪唑化合物的实施方式。

[0443] 图 5a-5d 说明在微流平台上测量的蛋白质-RNA 相互作用的结果。图 5a 为说明用于研究 HuD 与 RNA 的结合的靶 RNA 序列和使用微流亲和力分析测量的 Kd 值与之前通过凝胶迁移测定^{21,22} 测量的值的比较的表。ND = 未测定。图 5b 说明如在微流亲和力测定中所测定的 HuD 与渐增浓度的 AU3(●) 和 AU3 突变体(△) RNA 的结合曲线。每个图中显示了在两次独立的实验中测量的 10 至 20 个重复的标准化平均值。误差线表示标准偏差。图 5c 为来自微流芯片的荧光图像的数字图像:左: NS4B-GFP 和 NS5A(AH)-GFP 经由它们与抗 GFP 的相互作用而锚定在微流装置表面;中:对应于病毒负链的 3' 末端区的 RNA 探针用 Cy5 标记,并将其与蛋白质一起在装置上孵育。在简单的洗涤之后,显示出表示结合的 RNA 的 Cy5 信号;右:表示结合的 RNA 与蛋白质的比的 Cy5 信号与 GFP 信号的叠加。图 5d 为说明 NS4B 与连续稀释的 RNA 探针的体外结合曲线的图。

[0444] 图 6a 和 6b 说明显示 NS4B 特异性结合 HCV 负链 RNA 的 3' 末端的结果。图 6a 说明被设计用于本公开内容的实施方式的 HCV 探针。5'UTR(非翻译区)pos 和 3'UTR pos 分别对应于病毒正链的 5' UTR 序列和 3' UTR 序列,并且 5' 负末端和 3' 负末端分别对应于负链的 5' 末端区和 3' 末端区。显示了这些序列关于 HCV 可读框(ORF) 的位置。图 6b 为说明 NS4B 与等摩尔浓度的 4 种 HCV 探针和与非 HCV RNA(δ 病毒 RNA) 探针的部分结合的图。负基因组链的 3' 末端具有大于 5 倍的优势。

[0445] 图 7a-7d 说明 NS4B 中的 RNA 结合结构域的鉴定和结果。图 7a 说明在病毒和噬菌体蛋白中发现的已知赋予 RNA 结合的富含精氨酸的序列^{9,25,26}。底行显示了在 NS4B 的末端环中与富含精氨酸样基序极为一致的元件。所列出来的蛋白质为 HIV Rev 和 Tat²⁵; λ、Φ21 和 P22 噬菌体抗终止子 N 蛋白²⁵; 竹花叶病毒的三基因块蛋白 1(TGBp1) (BaMV)²⁶ 和脊髓灰质炎病毒 2C⁹。图 7b 说明在 NS4B(基因组 1a) 一级序列中带正电荷的氨基酸(R 和 RR, 黑体和下划线)。图 7c 为显示 NS4B 的预测的跨膜和胞内结构域的示意图。NS4B 的 C 末端区段中保守的带正电荷的氨基酸显示为 R 或 RR。图 7d 为说明精氨酸残基介导 NS4B 结合 RNA 的图。野生型 NS4B-GFP、RRa 和 RRb NS4B-GFP 突变体和 NS5A(AH)-GFP 与病毒 RNA 负链的 3' 末端(1.5nM) 的结合通过微流亲和力分析测定。误差线表示标准偏差。

[0446] 图 8a-8d 说明小分子筛选揭示克立咪唑盐酸盐抑制 NS4B 结合 RNA 和体内 HCV RNA 复制的结果。图 8a 为初次筛选的数字图像,该图像代表了 1280 种化合物的抑制的低严格性测量,其中将化合物按照具有高(浅灰)、模糊(黑)或无(灰)抑制作用分类。然后基于最初的筛选,再以较高的严格性和较多的重复数测量 214 种化合物,经由体内细胞测定,测试出了具有抑制 HCV 复制能力最佳的 18 种抑制剂。图 8b 说明显示最佳的 18 种小分子体外抑制 NS4B-RNA 结合的图。图 8c 为显示体内 HCV 荧光素酶连接的报道基因细胞测定的图,该图显示克立咪唑抑制 HCV 复制(左侧轴,下面的线◆),而如用阿尔玛蓝测量(右侧轴,上面的线□),对细胞没有可测量的毒性。图 8d 为显示体外 NS4B-RNA 结合的图:克立咪唑的抑制曲线。

[0447] 图 9a-9e 说明对应于克立咪唑耐受性突变体数据的结果。在克立咪唑存在下传代复制子细胞并且分离、繁殖单个集落,对其中含有的 HCV 基因组进行序列分析。图 9a 为显示 NS4B 的预测的跨膜和胞内区段的示意图。保守的带正电荷的氨基酸显示为 R 或 RR。克立咪唑耐受性突变 W55R 显示为 WR。图 9b 为说明用从含有野生型或 W55R 突变体克隆的细胞中提取的 50 μ g 全细胞 RNA 电穿孔,然后在不存在(白色柱)或存在(灰色柱)10 μ M 克立咪唑下生长的 Huh7.5 细胞中的 HCV 复制的图。结果表示与各自对应的未处理对照相比,所获得的相对集群数。图 9c 说明 HCV 复制测定,该测定通过在不存在(白色柱)或存在(灰色柱)10 μ M 克立咪唑下进行的体外转录的荧光素酶报道基因连接的野生型或 W55R 突变体 HCV RNA 基因组的电穿孔启动。结果表示各基因组相对于其未处理的水平的复制水平。图 9d 说明如在存在 10nM 克立咪唑(灰色柱)和不存在 10nM 克立咪唑(白色柱子)下通过微流体外测量的野生型 NS4B 和 W55R NS4B 突变体的 HCV RNA 结合。图 9e 说明 W55R NS4B 突变体(实线,○)和野生型 NS4B(虚线,▲)与连续稀释的 RNA 探针的体外结合曲线。

[0448] 图 10a-10c 说明基于微流的 RNA 结合测定的示意图。此图示中显示了每个微流装置中数百个/数千个单独的单元池中的 3 个。图 10a 说明隔室和微机械阀。在控制槽与流动槽交叉处设置阀。在两种槽的结合处的所得薄膜可以通过液压促动而偏转。使用多路阀系统容许具有大量弹性体微阀在这些装置中进行复杂的流体操作。

[0449] 图 10a 说明实验方案。上面的●表示 Cy3 标记的 RNA 探针。下面的⊙表示表面结合的氟硼荧标记的蛋白质。

[0450] 图 10b(1) 说明将用 Cy3 标记的靶 RNA 序列以微阵列点样在涂覆有环氧树脂的载玻片上。

[0451] 图 10b(2) 说明微流装置与载玻片对准并结合在载玻片上,以容许阵列中的各点与装置中的单元池接触。使装置进行表面图式形成,该图式形成在每个单元池内产生涂覆有生物素化的抗组氨酸抗体的圆形区域(参见补充的图 10c)。将流动槽与 RNA 室隔开的“颈阀”在此过程中保持关闭。

[0452] 图 10b(3) 说明然后将含有编码 his 标记的蛋白质的 DNA 模板的体外转录/翻译混合物加载到装置中。添加氟硼荧标记的 tRNA^{Lys} 以用于蛋白质标记。

[0453] 图 10b(4) 说明然后通过控制两个“夹心”微机械阀来分离各单元池。

[0454] 图 10b(5) 说明打开“颈阀”通过合并流动槽隔室和 RNA 室而形成单个隔室。随后孵育以容许蛋白质合成、合成的蛋白质与表面生物素化的抗 his 抗体结合、靶 RNA 溶剂化以及蛋白质和靶 RNA 的平衡。

[0455] 图 10b(6) 说明然后通过启动“按钮”膜进行 MITOMI, 从而截获表面结合的复合体, 同时排除任何液相分子。

[0456] 图 10b(7) 说明打开“夹心阀”, 然后简单地洗涤以移除未截获的未结合物质。

[0457] 图 10b(8) 说明打开“按钮”膜并通过阵列扫描仪来扫描装置。检测截获的 RNA 分子和表达的蛋白质。通过测量 Cy3 的中值信号与氟硼荧(由下面的○表示)的中值信号的比来计算各数据点的结合的 RNA 与表达的蛋白质的比。

[0458] 图 10c 说明表面图式形成。图 10c(1) 说明通过使生物素化的 BSA (▲) 溶液流动穿过所有流动槽来衍生可接近的表面区域。图 10c(2) 说明加载中和亲和素溶液 (●)。图 10c(3) 说明激活“按钮”膜。图 10c(4) 说明用生物素化的溶液 (▲) 将除按钮所遮盖的 60 μm 圆形区域外的所有剩余的可接近表面区域钝化; 5) 打开“按钮”膜; 6) 加载生物素化的抗体溶液 (●) 以容许之前被遮盖的圆形区域被特异性地官能化。图 10c(7) 说明将体外表达的蛋白质 (⚡) 加载到装置中, 并且其结合至覆盖分离的圆形区域的生物素化的抗体。在所描述的每个步骤之后进行 PBS 洗涤。

[0459] 图 11a-11b 说明显示我们的 RNA 结合测定中的信噪比的图。图 11a 为说明 HuD-his(●) 和 Gus-his(□) 与渐增浓度的 AU3 RNA 探针结合的图。显示了代表性实验。误差线表示标准偏差。图 11a 和 11b 为说明 NS4B-GFP-微粒体膜(mm)(●, 实线) 和 NS5A(AH)-GFP-mm(■, 虚线) 与渐增浓度的负链 3' 末端的结合的图。灰色条柱代表信噪比最大的探针浓度的范围。我们所报道的所有实验均在这个范围内进行。显示了代表性实验。误差线表示标准偏差。

[0460] 图 12a-12c 说明来自 ELAV 样家族的另一人蛋白质 HuR(ELAV L1) 结合 RNA 的基于微流的分析。图 12a 说明用于研究 HuR 与 RNA 结合的靶 RNA 序列和常规 RNA 结合法所证实的表型(EMBO J 16, 2130-2139(1997), 通过引用并入)。

[0461] 图 12b 说明按照微流, HuR 结合 RNA。使用 Cy3 标记的靶 RNA 序列的微阵列来编程微流装置, 并且测定了在装置上表达的氟硼荧标记的蛋白质与 RNA 序列的结合。结果表示结合的 RNA(中值 Cy3 信号)与表达的蛋白质(中值氟硼荧信号)的比。显示了在两次独立的实验中测量的 10 至 20 个重复的标准化平均值。误差线表示标准偏差。灰色柱表示 HuR-his 的结合, 空心柱表示用作阴性对照的 Gus-his 的结合。

[0462] 图 12c 说明 HUR 结合不受 5 种最有活性的化合物影响, 但是受 ATA 影响。我们测试了在存在或不存在 NS4B RNA 结合抑制剂下 HUR 与其 4ARNA 靶的结合。数据表示 10-20 个重复的平均值, 并且误差线表示标准偏差。

[0463] 图 13a-13c 说明通过常规方法进行的 NS4B 与 HCV RNA 的结合的结果。在大肠杆菌中表达与 GST 或 mistic-6his 融合的 NS4B 并将其纯化。图 13a 说明 GST-NS4B 和 GST 与对应于病毒负链 3' 末端的 ³²P- 标记的 RNA 探针的结合活性, 其如 GST 沉降测定所测量。图 13b 说明来自代表性 RNA 滤膜结合测定的硝酸纤维素膜。显示了与 10mM(左列) 或 2mM(右列) mistic-NS4B 或 mistic 对照结合的 ³²P- 标记的 HCV RNA 探针。图 13c 说明如通过滤膜结合测定所测得, 在 10mM(灰色柱) 和 2mM(白色柱) 的蛋白质浓度下与 mistic-NS4B 和 mistic 蛋白结合的 RNA 的百分比。

[0464] 图 14 说明显示 ATA 以剂量依赖方式抑制 NS4B 结合 RNA 的结果。如通过微流测量

的,在存在渐增浓度的 ATA 下 NS4B 结合 RNA 的剂量反应曲线。Y 坐标为相对于不存在 ATA 下结合的 RNA 对蛋白质的比。X 坐标为 ATA 浓度 (μM)。将数据与使用式 $Y = a + (b-a)/(1+10^{(X-c)})$ 的 3 参数逻辑曲线拟合 (BioDataFit, Chang Bioscience) 并计算得到 IC50 为 $0.49 \pm 0.01 \mu\text{M}$ (p 值 -0.0003)。

[0465] 图 15 说明通过实时 PCR 测定显示克立咪唑抑制 HCV 复制的结果。HCV 复制水平的实时 PCR 测定显示克立咪唑抑制 HCV 复制 (左侧轴 ◆ (下部曲线)) 而对细胞没有可测量的毒性 (右侧轴, ■ (上部曲线))。

[0466] 图 16 为显示 RRb 突变将复制降低了约 45 倍,并且含有 RRa 突变的复制子完全缺乏 RNA 复制的数字图像。

[0467] 图 17A- 显示克立咪唑盐酸盐的化学结构。

[0468] 图 17B- 显示具有增加的效价和效力的克立咪唑衍生分子的化学结构。

[0469] 图 17C 说明显示如通过微流测量的,克立咪唑衍生分子 (●) 和母体克立咪唑盐酸盐化合物 (□) 的体外抑制曲线的图 (结合的 RNA/ 蛋白质比对化合物浓度 (μM))。

[0470] 图 17D 说明如在 HCV 感染的细胞中的实时 PCR 测定所测量的,在存在渐增浓度的克立咪唑衍生分子 (●) 和母体克立咪唑盐酸盐化合物 (□) 下 HCV 复制的剂量反应曲线的图 (相对病毒复制对化合物浓度 (μM))。

[0471] 参考文献,它们每个都并入本文:

[0472] 1. Liang, T. J., Rehermann, B., Seeff, L. B. & Hoofnagle, J. H. Pathogenesis, natural history, treatment, and prevention of hepatitis C (丙型肝炎的发病、博物学、治疗和预防). *Ann Intern Med* 132, 296-305 (2000).

[0473] 2. Reed, K. E. & Rice, C. M. Overview of hepatitis C virus genome structure, polyprotein processing, and protein properties (丙型肝炎病毒基因组结构、多蛋白质加工和蛋白质特性的综述). *Curr Top Microbiol Immunol* 242, 55-84 (2000).

[0474] 3. B. N. Fields, D. M. Knipe 和 P. M. Howley (编辑), *Fields Virology* (费氏病毒学) 中的 Rice, C. M. *Flaviviridae: The viruses and their replication* (黄病毒科: 病毒及其复制). (Lippincott-Raven Publications, Philadelphia, Pa., 1996).

[0475] 4. Egger, D. 等人 Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex (丙型肝炎病毒蛋白的表达诱导包括候选病毒复制复合体的明显膜改变). *J Virol* 76, 5974-5984 (2002).

[0476] 5. Elazar, M., Liu, P., Rice, C. M. & Glenn, J. S. An N-terminal amphipathic helix in hepatitis C virus (HCV) NS4B mediates membrane association, correct localization of replication complex proteins, and HCV RNA replication (丙型肝炎病毒 (HCV) NS4B 中的 N 末端两亲性螺旋介导复制复合体蛋白的膜结合、正确定位以及 HCV RNA 复制). *J Virol* 78, 11393-11400 (2004).

[0477] 6. Gosert, R. 等人 Identification of the hepatitis C virus RNA replication complex in Huh-7 cells harboring subgenomic replicons (含有亚基因组复制子的 Huh-7 细胞中的丙型肝炎病毒 RNA 复制复合体的鉴定). *J Virol* 77, 5487-5492 (2003).

- [0478] 7. El-Hage, N. & Luo, G. Replication of hepatitis C virus RNA occurs in a membrane-bound replication complex containing nonstructural viral proteins and RNA (含有非结构病毒蛋白和 RNA 的膜结合复制复合体中出现丙型肝炎病毒 RNA 的复制). *J Gen Virol* 84, 2761-2769 (2003).
- [0479] 8. Kusov, Y. Y., Probst, C., Jecht, M., Jost, P. D. & Gauss-Müller, V. Membrane association and RNA binding of recombinant hepatitis A virus protein 2C (重组甲型肝炎病毒蛋白 2C 的膜结合和 RNA 结合). *Arch Virol* 143, 931-944 (1998).
- [0480] 9. Rodríguez, P. L. & Carrasco, L. Poliovirus protein 2C contains two regions involved in RNA binding activity (脊髓灰质炎病毒蛋白 2C 含有参与 RNA 结合活性的两个区域). *J Biol Chem* 270, 10105-10112 (1995).
- [0481] 10. Echeverri, A. C. & Dasgupta, A. Amino terminal regions of poliovirus 2C protein mediate membrane binding (脊髓灰质炎病毒 2C 蛋白的氨基末端区介导膜结合). *Virology* 208, 540-553 (1995).
- [0482] 11. Einav, S., Elazar, M., Danieli, T. & Glenn, J. S. A nucleotide binding motif in hepatitis C virus (HCV) NS4B mediates HCV RNA replication (丙型肝炎病毒 (HCV) 中的核苷酸结合基序 NS4B 介导 HCV RNA 复制). *J Virol* 78, 11288-11295 (2004).
- [0483] 12. Overington JP, A. -L. B., Hopkins AL. How many drug targets are there? (有多少药物靶标?) *Nat Rev Drug Discov* 5, 993-996 (2006).
- [0484] 13. Lundin, M., Monné, M., Widell, A., Von Heijne, G. & Persson, M. A. A. Topology of the membrane-associated hepatitis C virus protein NS4B (膜结合的丙型肝炎病毒蛋白 NS4B 的拓扑学). *J Virol* 77, 5428-5438 (2003).
- [0485] 14. Hadd AG, R. D., Halliwell JW, Jacobson SC, Ramsey JM. Microchip device for performing enzyme assays (用于进行酶测定的微芯片装置). *Anal Chem* 69, 3407-3412 (1997).
- [0486] 15. Maerkl, S. J. & Quake, S. R. A systems approach to measuring the binding energy landscapes of transcription factors (测量转录因子的结合能量景观的系统方法). *Science* 315, 233-237 (2007).
- [0487] 16. Toepke, M. W. & Beebe, D. J. PDMS absorption of small molecules and consequences in microfluidic applications (微流应用中小分子的 PDMS 吸收和后果). *Lab on a chip* 6, 1484-1486 (2006).
- [0488] 17. Lee, J. N., Park, C. & Whitesides, G. M. Solvent compatibility of poly(dimethylsiloxane)-based microfluidic devices (基于聚(二甲基硅氧烷)的微流装置的溶剂相容性). *Anal chem* 75, 6544-6554 (2003).
- [0489] 18. Whitesides, G. M. The origins and the future of microfluidics (微流的起源与前景). *Nature* 442, 368-373 (2006).
- [0490] 19. Kang, L., Chung, B. G., Langer, R. & Khademhosseini, A. Microfluidics for drug discovery and development: from target selection to product lifecycle management (用于药物发现和开发的微流技术: 从靶选择到产品生命周期管控). *Drug discovery today* 13, 1-13 (2008).

- [0491] 20. Myer, V. E., Fan, X. C. & Steitz, J. A. Identification of HuR as a protein implicated in AUUUA-mediated mRNA decay (HuR 作为牵涉 AUUUA 介导的 mRNA 降解的蛋白质的鉴定). *EMBO J* 16, 2130-2139 (1997).
- [0492] 21. Park, S., Myszka, D. G., Yu, M., Littler, S. J. & Laird-Offringa, I. A. HuD RNA recognition motifs play distinct roles in the formation of a stable complex with AU-rich RNA (HuD RNA 识别基序在与富含 AU 的 RNA 形成稳定的复合体中发挥明显的作用). *Mol Cell Biol* 20, 4765-4772 (2000).
- [0493] 22. Park-Lee, S., Kim, S. & Laird-Offringa, I. A. Characterization of the interaction between neuronal RNA-binding protein HuD and AU-rich RNA (神经元 RNA 结合蛋白 HuD 与富含 AU 的 RNA 之间的相互作用的表征). *J Biol Chem* 278, 39801-39808 (2003).
- [0494] 23. Glenn, J. S., Taylor, J. M. & White, J. M. In vitro-synthesized hepatitis delta virus RNA initiates genome replication in cultured cells (体外合成的肝炎 δ 病毒 RNA 启动培养的细胞中的基因组复制). *J Virol* 64, 3104-3107 (1990).
- [0495] 24. Glenn, J. S., Watson, J. A., Havel, C. M. & White, J. M. Identification of a prenylation site in delta virus large antigen (大型 δ 病毒抗原中异戊二烯化位点的鉴定). *Science* 256, 1331-1333 (1992).
- [0496] 25. Burd, C. G. & Dreyfuss, G. Conserved structures and diversity of functions of RNA-binding proteins (RNA 结合蛋白的保守结构和功能多样性). *Science* 265, 615-621 (1994).
- [0497] 26. Wung, C. H. 等人 Identification of the RNA-binding sites of the triple gene block protein 1 of bamboo mosaic potexvirus (竹花叶病毒的三基因块蛋白 1 的 RNA 结合位点的鉴定). *J Gen Virol* 80 (Pt 5), 1119-1126 (1999).
- [0498] 27. Spångberg, K., Wiklund, L. & Schwartz, S. HuR, a protein implicated in oncogene and growth factor mRNA decay, binds to the 3' ends of hepatitis C virus RNA of both polarities (一种参与癌基因和生长因子 mRNA 降解的蛋白质结合两种极性的丙型肝炎病毒 RNA 的 3' 末端). *Virology* 274, 378-390 (2000).
- [0499] 28. Tscherne, D. M. 等人 Time- and temperature-dependent activation of hepatitis C virus for low-pH-triggered entry (低 pH 触发性进入的时间依赖性和温度依赖性丙型肝炎病毒活化). *J Virol* 80, 1734-1741 (2006).
- [0500] 29. Lindenbach, B. D. 等人 Complete replication of hepatitis C virus in cell culture (丙型肝炎病毒在细胞培养物中的完全复制). *Science* 309, 623-626 (2005).
- [0501] 30. Elazar, M. 等人 Amphipathic helix-dependent localization of NS5A mediates hepatitis C virus RNA replication (两亲性螺旋依赖性 NS5A 定位介导丙型肝炎病毒 RNA 复制). *J Virol* 77, 6055-6061 (2003).
- [0502] 31. Tong, X. 等人 Identification and analysis of fitness of resistance mutations against the HCV protease inhibitor SCH 503034 (针对 HCV 蛋白酶抑制剂 SCH 503034 的耐受性突变的适应性的鉴定和分析). *Antiviral Res* 70, 28-38 (2006).

[0503] 32. Dimitrova, M., Imbert, I., Kieny, M. P. & Schuster, C. Protein-protein interactions between hepatitis C virus nonstructural proteins(丙型肝炎病毒非结构蛋白之间的蛋白-蛋白相互作用). J Virol 77, 5401-5414(2003).

[0504] 33. Blight, K. J., Kolykhalov, A. A. & Rice, C. M. Efficient initiation of HCV RNA replication in cell culture(细胞培养物中 HCV RNA 复制的有效开启). Science 290, 1972-1974(2000).

[0505] 34. Huang, L. 等人 Hepatitis C virus nonstructural protein 5A(NS5A) is an RNA-binding protein(丙型肝炎病毒非结构蛋白 5A(NS5A) 是 RNA 结合蛋白). J Biol Chem 280, 36417-36428(2005).

[0506] 35. Roosild, T. P. 等人 NMR structure of Mistic, a membrane-integrating protein for membrane protein expression(用于膜蛋白表达的膜整合蛋白 Mistic 的 NMR 结构). Science 307, 1317-1321(2005).

[0507] 36. Schilders, G., Raijmakers, R., Raats, J. M. H. & Pruijn, G. J. M. MPP6 is an exosome-associated RNA-binding protein involved in 5.8S rRNA maturation(MPP6 为参与 5.8S rRNA 成熟的外来体相关性 RNA 结合蛋白). Nucleic acids res 33, 6795-6804(2005).

[0508] 实施例 2:

[0509] 为了证明克立咪唑在治疗 HCV 感染的患者中的体内效力,用克立咪唑 100 毫克每天 2 次口服治疗 HCV 慢性感染的 3 位患者 8 周。在前四周的克立咪唑单一疗法之后,添加聚乙二醇化的干扰素(每周 180 微克 Pegasus(Roche) 皮下)。此后继续对患者每天两次口服施用聚乙二醇化的干扰素和硝唑尼特(500mg. (Romark))。基线特征和血清中的系列 HCV 病毒量显示在图 2 中。HCV 病毒量在克立咪唑单独治疗时显著降低,在处理 4 周后完全或几乎检测不出。这些结果证明克立咪唑有效地治疗感染 HCV 的患者。

[0510] 实施例 3:

[0511] 图 4A 示出可用于制备 5-6 二取代的克立咪唑化合物的方法。具体地,该方法可以制备化合物 1(在 5 和 6 位被甲基二取代(图 4B))和化合物 2(在 5 和 6 位被 Cl 基团二取代(图 4C))。

[0512] 二取代的克立咪唑可以如下合成:缩合 4,5-二取代的-苯-1,2-二胺(A)和 2-氯-乙酰亚氨酸乙酯(B)产生 2-氯甲基-5,6-二取代的-1H-苯并咪唑(C);随后用 1-溴甲基-4-氯-苯(D)烷基化以得到 1-(4-氯-苄基)-2-氯甲基-5,6-二取代的-1H-苯并咪唑(E);最后用吡咯烷烷基化 1-(4-氯-苄基)-2-氯甲基-5,6-二取代的-1H-苯并咪唑(E)产生 5,6-二取代的克立咪唑(1-(4-氯-苄基)-5,6-二取代的-2-吡咯烷-1-基甲基-1H-苯并咪唑)(G)。

[0513] 实施例 4:

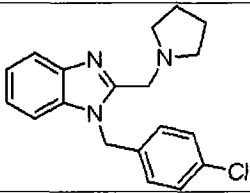
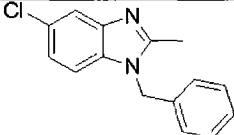
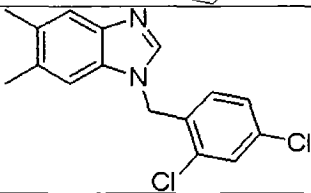
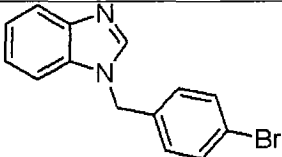
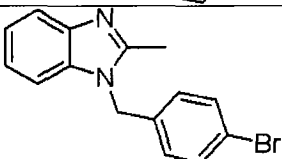
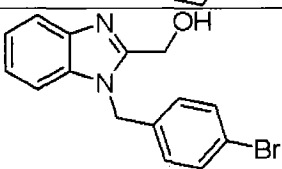
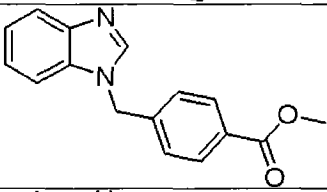
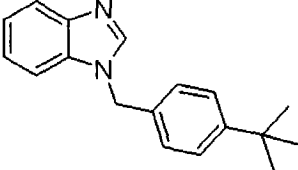
[0514] 下面显示的表 3 使用本文所述的荧光素酶和阿尔玛蓝测定说明克立咪唑类似物对 HCV RNA 复制(AV)和细胞存活率(Viab)的作用。在两个浓度下测量了化合物活性以确定该作用是否为剂量依赖性。数值表示化合物处理后保持正常活性(病毒复制或细胞存活率)的百分比;还将这些值汇总以提供相对活性的大致测量。

[0515] 在 5 微摩尔和 10 微摩尔两个化合物浓度下测定每种化合物相对于无药物对照的百分比抑制率,并记录在表中。此外,将这些百分比如下转化为评分系统: " - " = 90-100%残余活性(即,无作用); " + " = 60-90%残余活性; " ++ " = 30-60%残余活性; " +++ " = 0-30%残余活性。因此,在复制测定中被评分为 +++ 的化合物具有比被评分为 + 的化合物高的抗病毒活性(AV)。类似地,在细胞代谢测定(Viab = 存活率)中被评分为 + 的化合物比被评分为 +++ 的化合物毒性低。

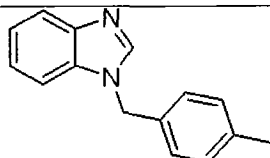
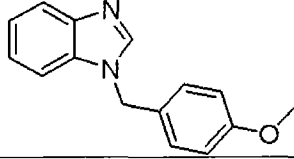
[0516] 结果证明 H1 拮抗作用可从抗病毒活性分离,并且缺乏 H1 活性所需的叔胺基团的化合物显示出相对于克立咪唑的增强的抗病毒作用;大量化合物显示出在抗病毒活性和对细胞存活率影响之间的明显分离,这支持了抗病毒活性源自 NS4B/RNA 结合的特异性抑制的结论;并且一些化合物表现出剂量依赖活性,因为 HCV RNA 复制的抑制在较高的浓度(10uM)下更显著。总之,这些结构-活性关系证明本文所述的已知的和新的克立咪唑类似物可以阻止 HCV 复制,并且缺乏 H1 拮抗作用(和伴随的 CNS 作用)的类似物保持可接受的治疗比。

[0517] 表 3

[0518]

	5 uM		10 uM		5 uM		10 uM	
	AV	Viab	AV	Viab	AV	Viab	AV	Viab
	62	107	37	93	+	-	++	-
	87	99	60	94	+	-	+	-
	30	83	8	70	+++	+	+++	+
	23	81	8	68	+++	+	+++	+
	3	54	2	51	+++	++	+++	++
	50	97	28	90	++	-	+++	-
	74	101	54	96	+	-	++	-
	30	87	12	76	+++	+	+++	+

[0519]

	49	99	23	84	++	-	+++	+
	70	98	58	100	+	-	++	-

[0520] 说明：

[0521] -90-100%残余活性（无作用）

[0522] +60-90%残余活性

[0523] ++30-60%残余活性

[0524] +++0-30%残余活性

[0525] 应注意比率、浓度、量和其他数值数据在本文中 can 表示为范围形式。应理解这种范围形式是为了方便和简洁而使用的，因此应以灵活地方式理解为不止包括作为范围界线而明确列出的数值，还包括该范围内所涵盖的所有单个数值或子范围，就如同各数值和子范围被明确地列出一样。例如，约“0.1%至约5%”的浓度范围应被理解为不止包括明确列出的约0.1wt%至约5wt%的浓度，还包括在所指示范围内的单个浓度（例如，1%、2%、3%和4%）和子范围（例如，0.5%、1.1%、2.2%、3.3%和4.4%）。术语“约”可以包括被修饰的数值的±1%、±2%、±3%、±4%、±5%、±6%、±7%、±8%、±9%或±10%或更多。此外，短语“约‘x’至‘y’”包括“约‘x’至约‘y’”。

[0526] 应强调的是本公开内容的上述实施方式仅为实现方式的可能实例，并且仅为清楚地说明本公开内容的原理而列出。可以对本公开内容的上述实施方式进行一些变化和改良，且基本上不背离本公开内容的精神和原理。所有的这些修改和变化都意欲包括在本公开内容的范围内。

序列表

<110> 斯坦福大学

谢里特·安纳夫

杰弗里·s·格伦

文锦·杨

哈达斯·多沃里-索博尔

英格丽德·C·钟

<120> 治疗黄病毒家族病毒感染的方法和组合物

<130>221907-1330

<140>TBD

<141>2009-03-18

<150>PCT/US2008/076804

<151>2008-09-18

<150>PCT/US2008/076806

<151>2008-09-18

<150>60/973, 309

<151>2007-09-18

<150>61/088, 759

<151>2008-08-14

<150>61/092, 537

<151>2008-08-28

<160>5

<170>PatentIn version 3.5

<210>1

<211>341

<212>RNA

<213> 丙型肝炎病毒

<400>1

cggucggggg	acuacccccg	cugugaggug	guacuuagug	aggggacacu	ccuugaugac	60
agaagugcgu	cuuucgcaga	ucgguaccgc	aaucauacuc	acagcacguc	ggagguccug	120
ggggggaggg	cccucucggu	aucaccagac	gccuuggcca	cucauguggc	cuuaacgguc	180
cugcuggccc	aggaaagaac	cuauuugggc	gaguuaacga	ccucuaaacc	cgcacggggg	240
cguucugacg	aucggcucau	cacaaccag	cgcuuuccgg	aacaccauga	cggacuaucc	300
cacgaacgcu	cacggggccc	uccagagcau	cuggcacgug	g		341

<210>2

<211>261

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 膜蛋白序列

<400>2

Ala	Ser	His	Leu	Pro	Tyr	Ile	Glu	Gln	Gly	Met	Met	Leu	Ala	Glu	Gln
1				5					10					15	
Phe	Lys	Gln	Lys	Ala	Leu	Gly	Leu	Leu	Gln	Thr	Ala	Ser	Arg	His	Ala
			20					25					30		
Glu	Val	Ile	Thr	Pro	Ala	Val	Gln	Thr	Asn	Trp	Gln	Lys	Leu	Glu	Val
		35					40					45			
Phe	Trp	Ala	Lys	His	Met	Trp	Asn	Phe	Ile	Ser	Gly	Ile	Gln	Tyr	Leu
	50					55					60				
Ala	Gly	Leu	Ser	Thr	Leu	Pro	Gly	Asn	Pro	Ala	Ile	Ala	Ser	Leu	Met
65					70					75				80	
Ala	Phe	Thr	Ala	Ala	Val	Thr	Ser	Pro	Leu	Thr	Thr	Gly	Gln	Thr	Leu
			85						90					95	
Leu	Phe	Asn	Ile	Leu	Gly	Gly	Trp	Val	Ala	Ala	Gln	Leu	Ala	Ala	Pro
		100						105					110		
Gly	Ala	Ala	Thr	Ala	Phe	Val	Gly	Ala	Gly	Leu	Ala	Gly	Ala	Ala	Ile
		115					120					125			
Gly	Ser	Val	Gly	Leu	Gly	Lys	Val	Leu	Val	Asp	Ile	Leu	Ala	Gly	Tyr
	130					135					140				
Gly	Ala	Gly	Val	Ala	Gly	Ala	Leu	Val	Ala	Phe	Lys	Ile	Met	Ser	Gly
145					150					155				160	
Glu	Val	Pro	Ser	Thr	Glu	Asp	Leu	Val	Asn	Leu	Leu	Pro	Ala	Ile	Leu

<210>5

<211>24

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 化学合成引物序列

<400>5

Cys Ala Cys Cys Gly Gly Ala Ala Thr Thr Gly Cys Cys Ala Gly Gly

1 5 10 15

Ala Cys Gly Ala Cys Cys Gly Gly

20

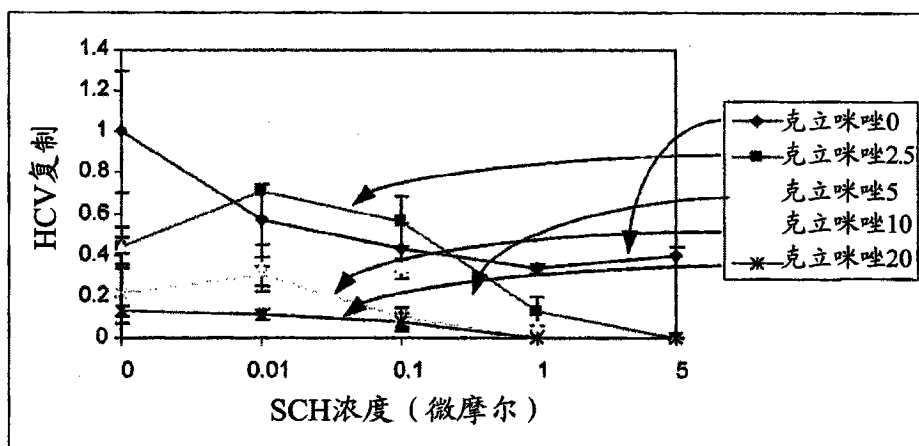


图 1A

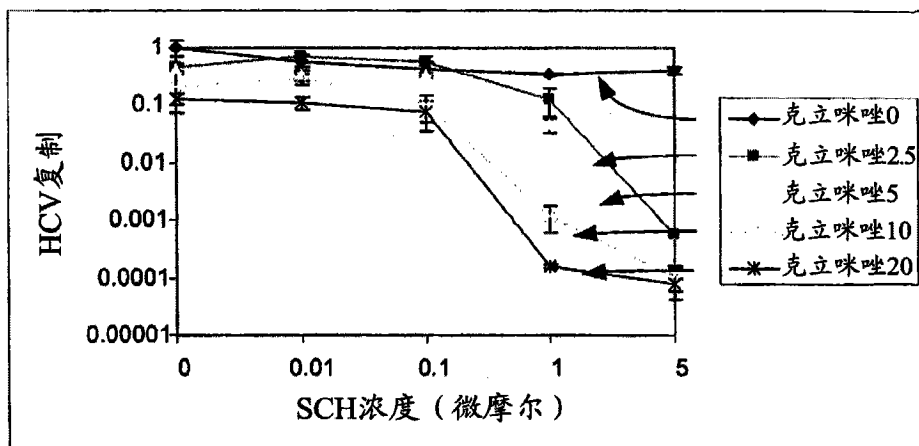


图 1B

3男性HCV基因型4患者:

	基线	第2周	第4周	第8周
#1 24 y.o., ALT 59	290,000	190,000	2,400	<10
#2 27y.o., ALT 124	730,000	320,000	<10	<10
#3 32y.o., ALT 99	489,000	70,000	<10	<10

正常 ALT = <45

每天两次100毫克克立咪唑×8周
第4-8周180 μg/周pegasys
继续用硝唑尼特和pegasys

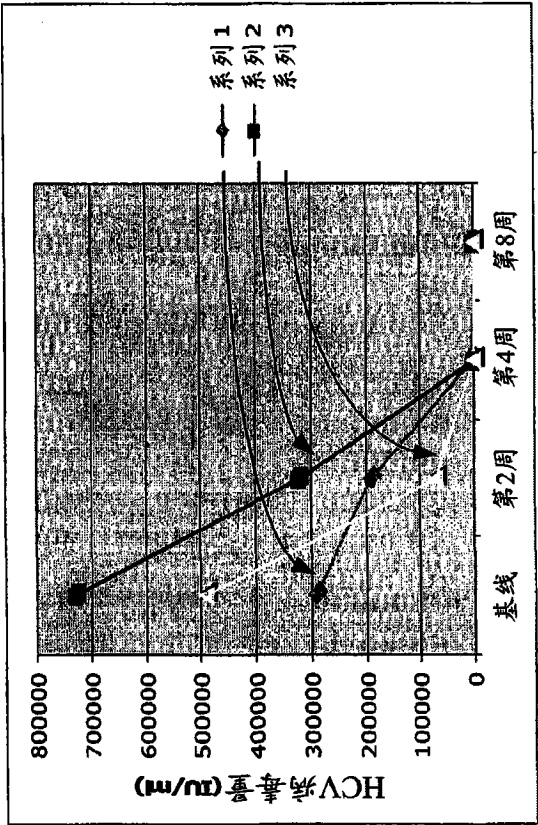


图 2

上行: HCV 5'-UTR正链 (SEQ ID NO. 1); GenBank NC_004102; nt 1-341
5'UTR
下行: HCV 3'UTR负链 (SEQ ID NO. 2)

```
5' 1 gccagccccc tgatgggggc gacactccac catgaatcac tcccctgtga ggaactactg  
    cggucggggg acuacccccg cugugaggug guacuuagug aggggacacu ccuugaugac  
61 tcttcacgca gaaagcgtct agccatggcg ttagtatgag tgtcgtgcag cctccaggac  
    agaagugogu cuuucgcaga ucgguaccgc aaucuaucuc acagcacguc ggagguccug  
121 cccccctccc gggagagcca tagtgggtctg cggaaccggt gagtacaccg gaattgccag  
    ggggggaggg ccucucgggu auaaccagac gccuuggcca cucauguggc cuuaacggug  
181 gacgaccggg tcctttcttg gataaacccg ctcaatgcct ggagatttgg gcgtgcccc  
    cugcugggcc aggaagaac cuauuugggc gaguacgga ccucuaaacc cgcacggggg  
241 gcaagactgc tagccgagta gtgttgggtc gcgaaaggcc ttgtgttact gcctgatagg  
    cguucugacg aucggcucan cacaaccag cgcuuuccgg aacaccauga cggacuauc  
301 gtgcttgcca gtgccccggg aggtctcgta gaccgtgcac c  
    cacgaacgcu cagggggccc uccagagcau cuggcacgug g 5'
```

(SEQ ID NO. 3)

5' UTR pos (1b)

```
agaccaagctggctagcgtttaacttaagcttgggtaccgagctcggatccactagtccagtgtggtggaattctgca  
gatatcataatacgaactcactatagccagccccgattggggcgacactccaccatagatcactcccctgtgaggaac  
tactgtcttcacgcagaaagcgtctagccatggcgttagtatgagtgtcgtgcagcctccaggacccccctccggga  
gagccatagtgggtctgcggaaccggtgagtacaccggaattgccaggacgaccgggtcctttcttgatcaaccgctc  
aatgcctggagatttggcggtgccccgcgagactgctagccgagtagtgttgggtcgcgaaaggccttgtggtactgc  
ctgatagggtgcttgcgagtgccccgggaggtctcgtagaccgtgcaccatgagcacgaatcctaaacctcaaagaaa  
accaaagggcgcgcatggatcgatatccagcacagtggcgccgctcgagt
```

(SEQ ID NO. 4)

3' UTR neg (1b)

```
acucgagcggcccgccacugugcuggauaucgaucgaucgagggcgcccuuugguuuuucuuugagguuaggaucgugcu  
cauggugcagcggucacgagaccuccggggcacucgcaagcaccuauacaggcaguaccacaaggccuuucgcgaccc  
aacacuacucggcuagcagucucgcgggggcacgccccaaucuccaggcauugagcggguugauccaagaaaggacccg  
guccugcggcaauuccgguguaucacccggauuccgcagaccacuauggcucuccgggaggggggguccugggagcug  
cacgacacucauacuaacgcccauggcuaagcgcuuucugcgugaagacaguauuccucacaggggagugaucuaggu  
ggagugucgccccaaucggggcuggcuaugagugcguauuauugauaucugcagaauuccaccacacuggacuaugu  
ggauccgagcucgguaaccaagcuuaaguuaaagcuagccagcuugggucu
```

图 3

5,6-二取代的克立咪唑 化合物的制备

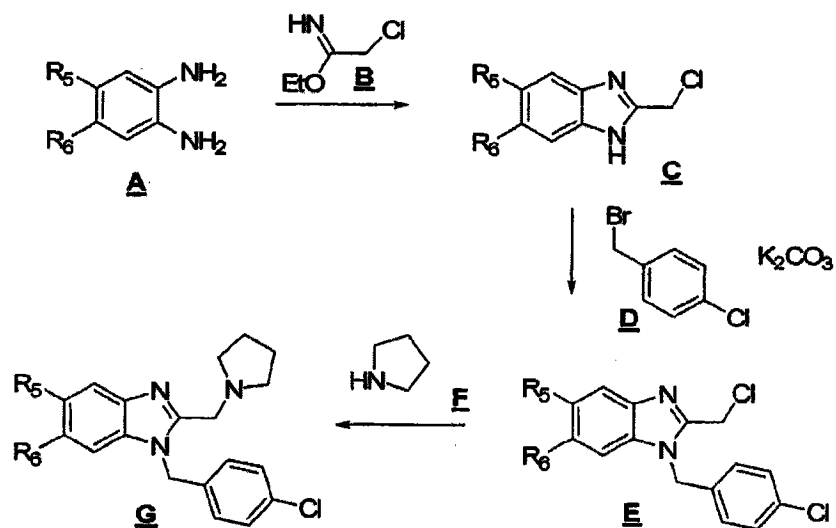


图 4A

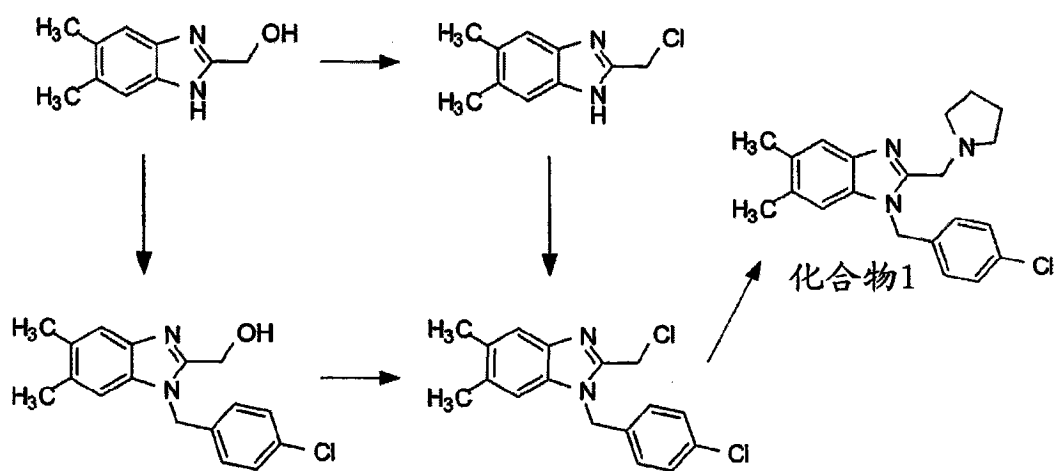


图 4B

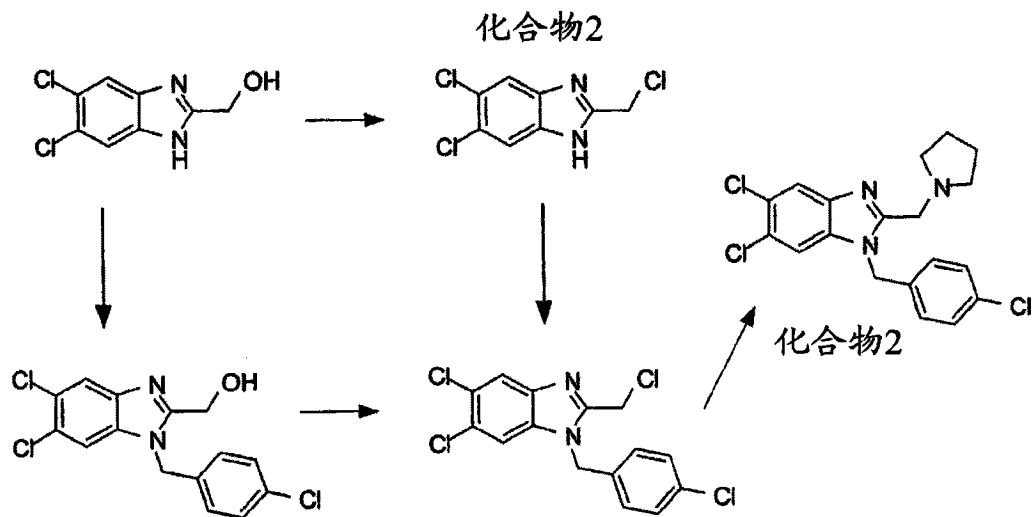


图 4C

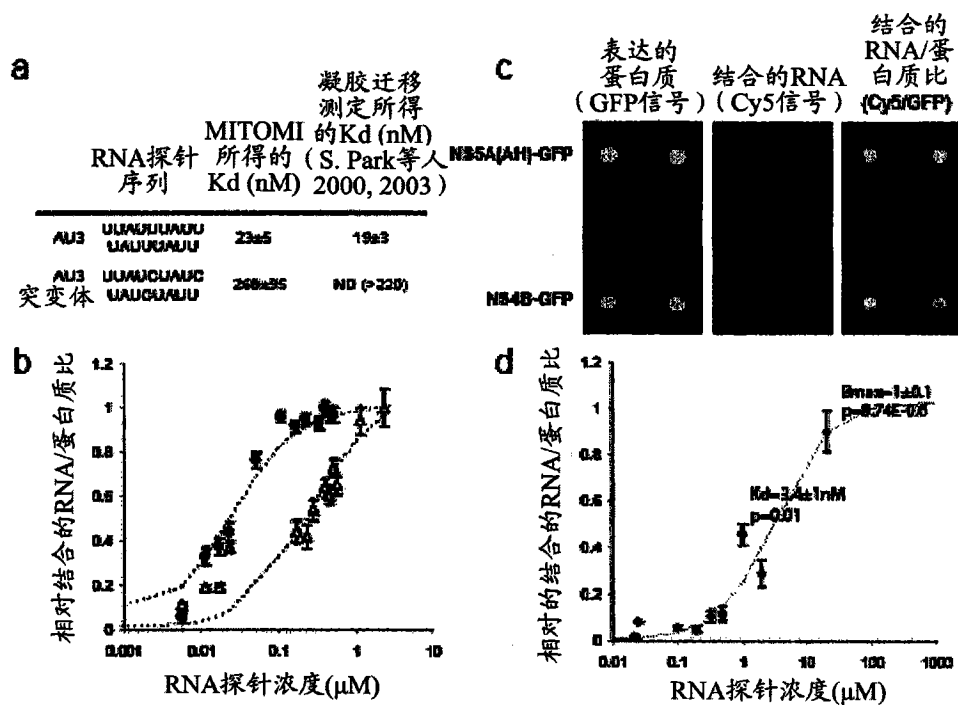


图 5

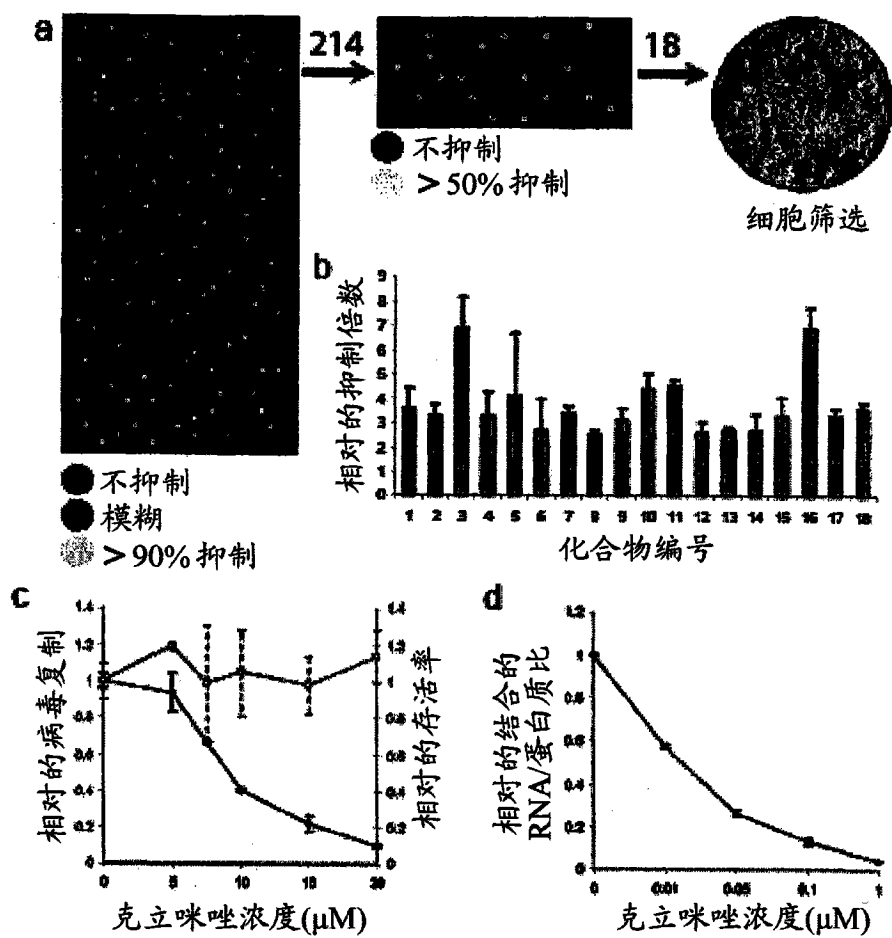


图 8

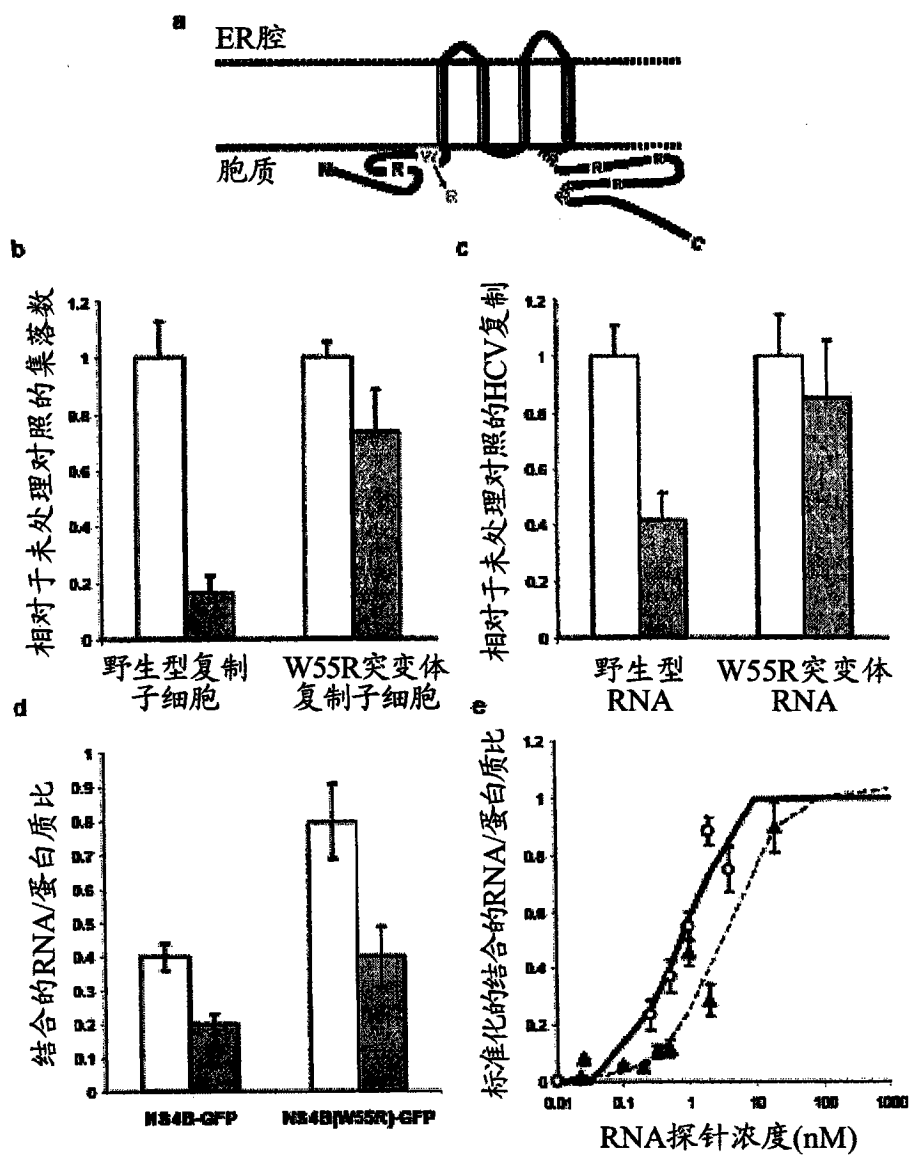


图 9

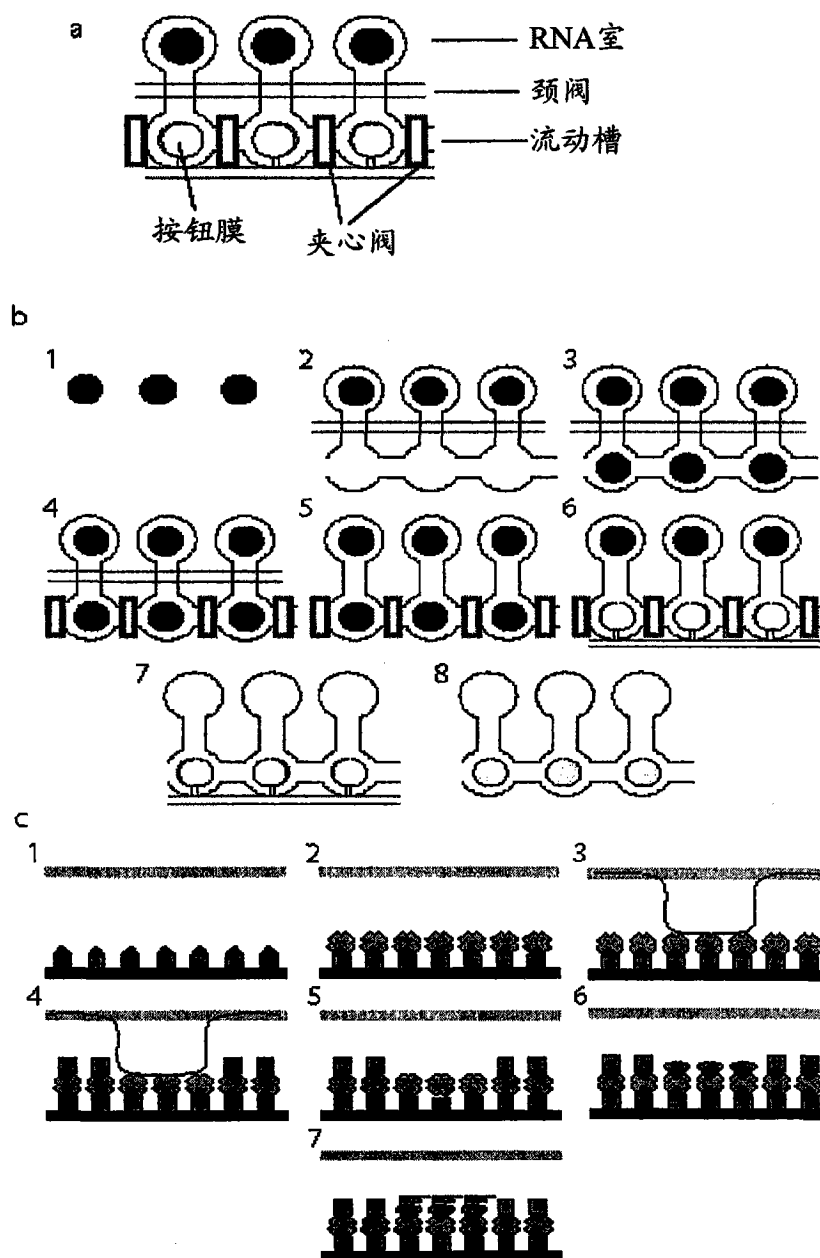


图 10

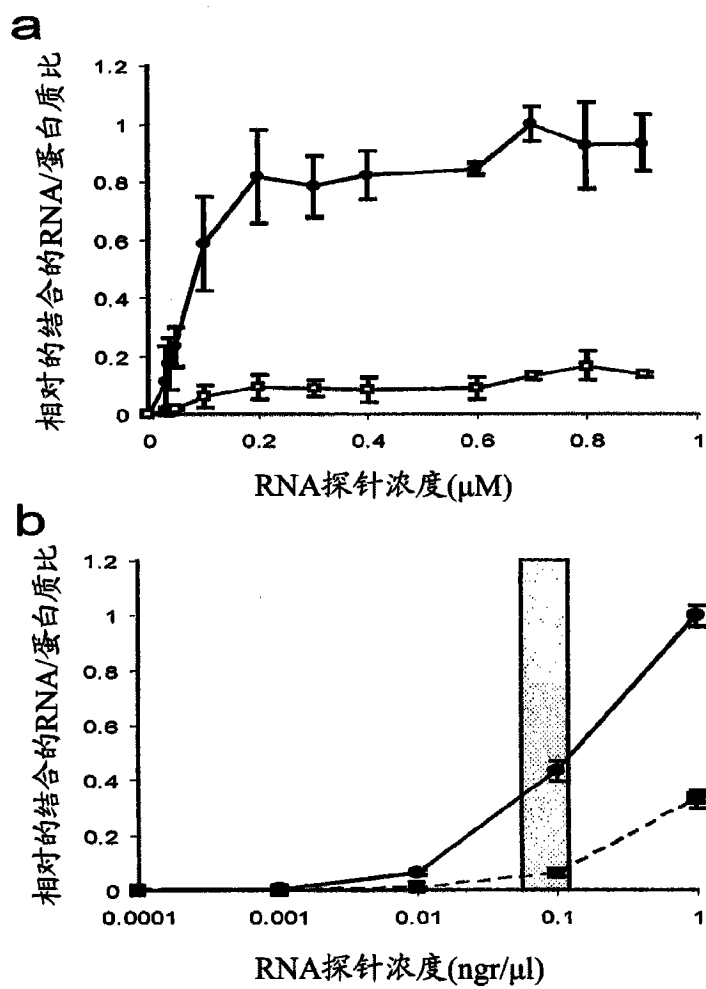


图 11

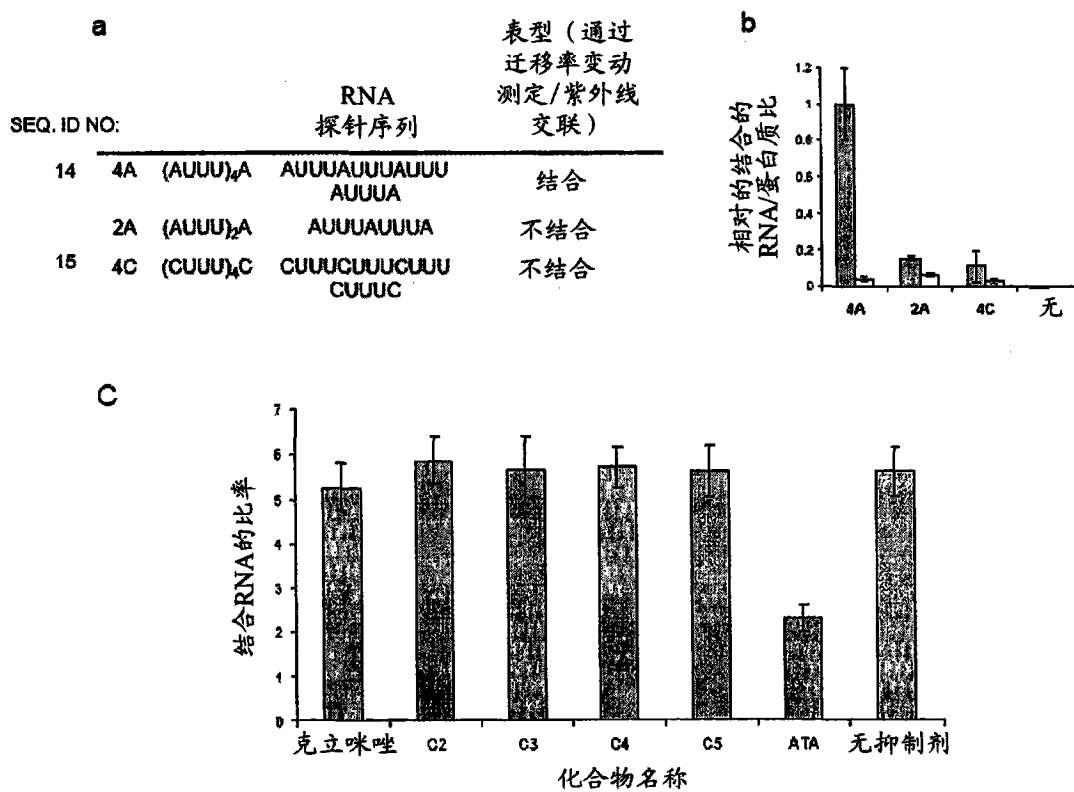


图 12

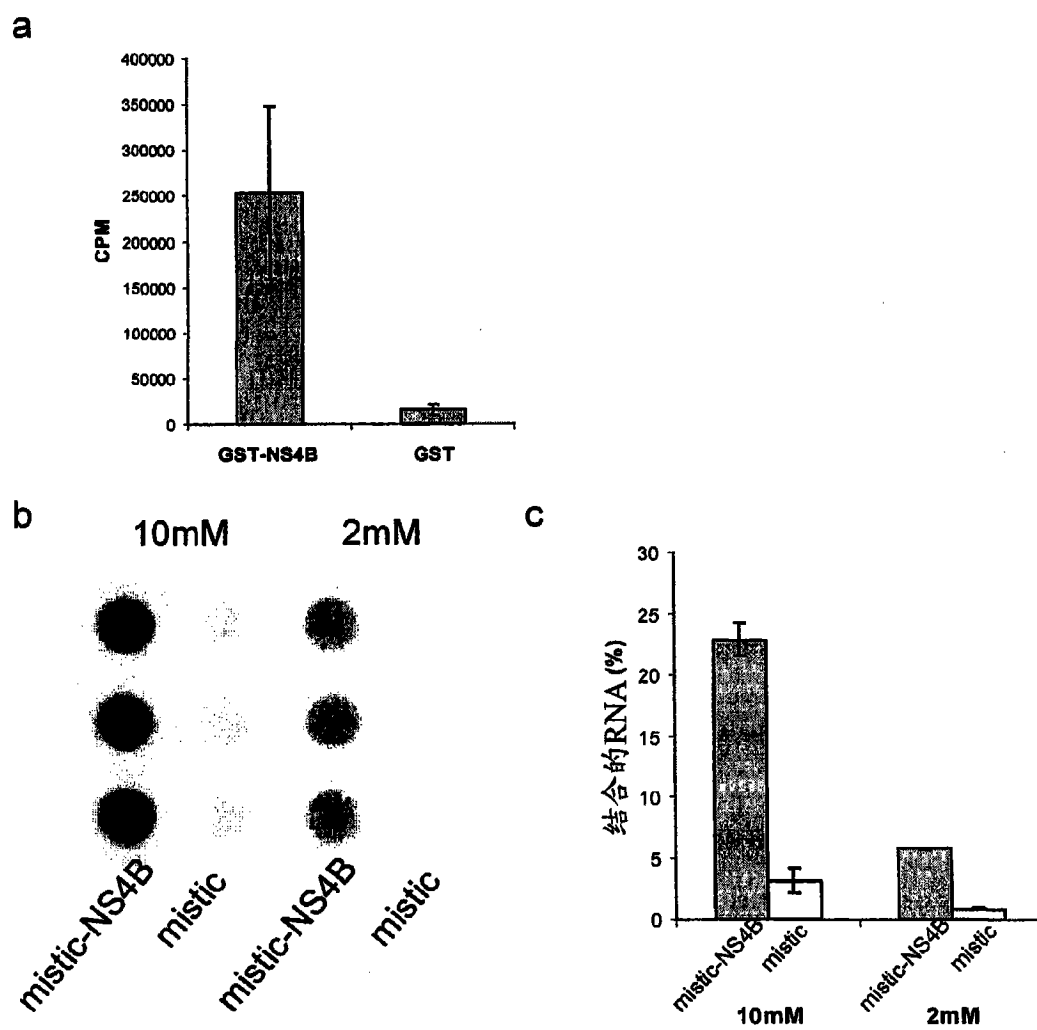


图 13

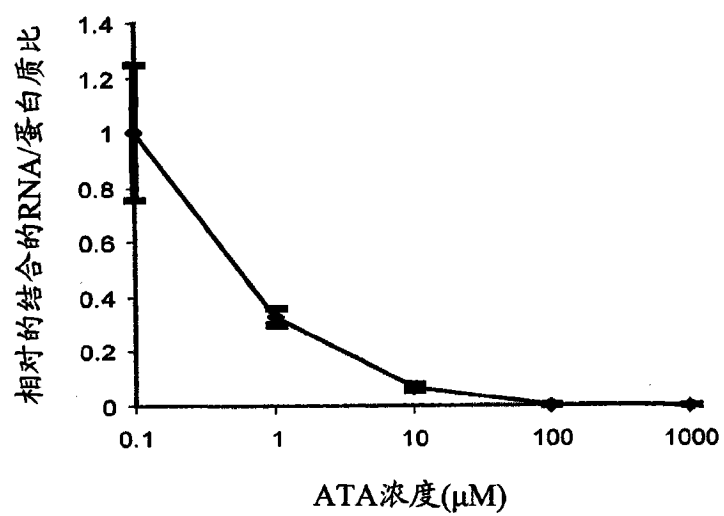


图 14

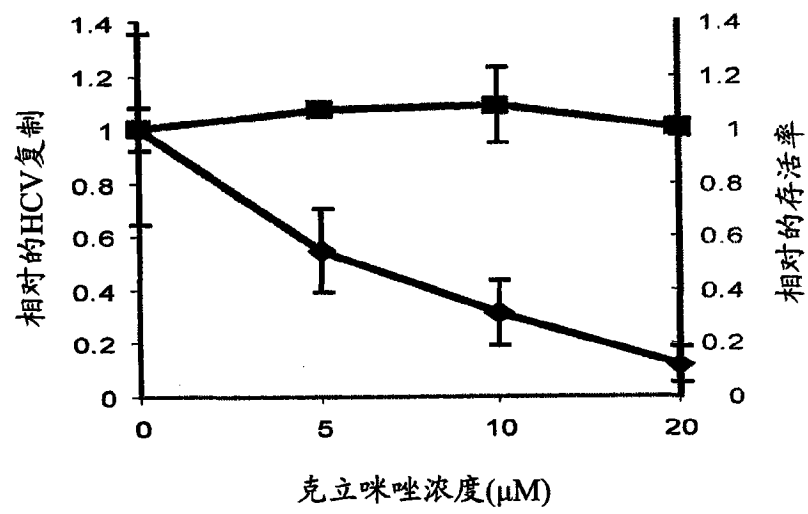


图 15

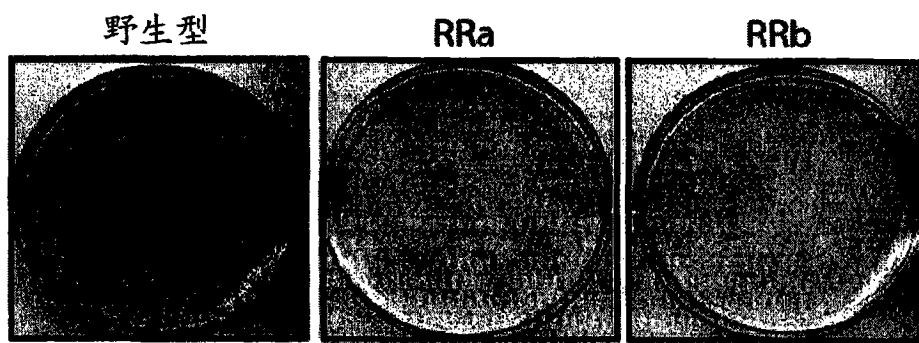


图 16

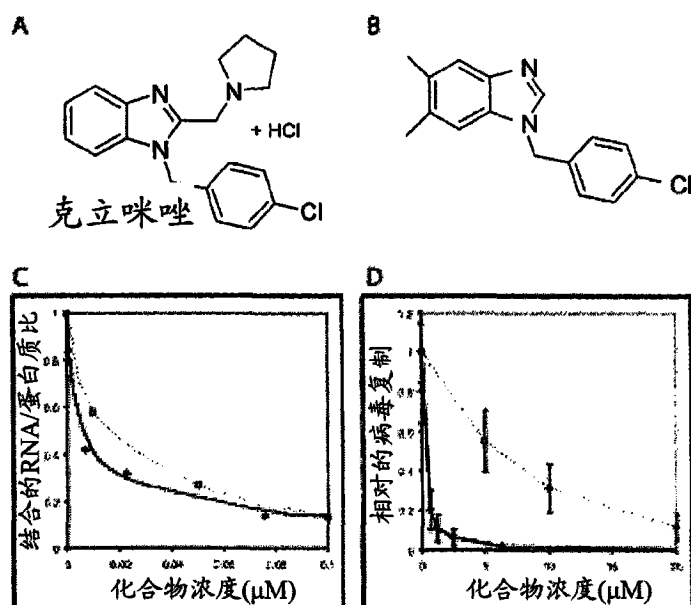


图 17