

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200880008338.4

[51] Int. Cl.

C07D 279/18 (2006.01)

C07D 417/14 (2006.01)

A61K 31/437 (2006.01)

A61P 31/12 (2006.01)

[43] 公开日 2010 年 1 月 20 日

[11] 公开号 CN 101631780A

[22] 申请日 2008.4.3

[21] 申请号 200880008338.4

[30] 优先权

[32] 2007.4.3 [33] US [31] 60/909,928

[86] 国际申请 PCT/US2008/059326 2008.4.3

[87] 国际公布 WO2008/124550 英 2008.10.16

[85] 进入国家阶段日期 2009.9.14

[71] 申请人 普罗瑟塔生物谐成公司

地址 美国加利福尼亚

[72] 发明人 V·林格帕 J·普莱特尼尔

C·克莱尔 B·弗瑞曼 W·汉森

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
商标事务所

代理人 唐晓峰 杜京英

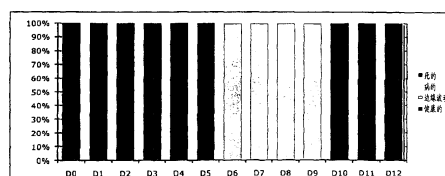
权利要求书 3 页 说明书 26 页 附图 4 页

[54] 发明名称

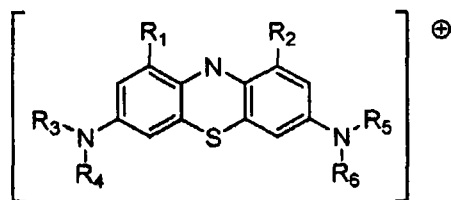
用于抗病毒治疗的吩噻嗪衍生物

[57] 摘要

提供预防和治疗病毒感染的化合物和方法。在一些实施方案中，提供具有广谱抗病毒活性的新化合物。在更特别的实施方案中，所述化合物和方法可以有效对抗病毒例如委内瑞拉马脑炎、西尼罗河病毒和丙型肝炎。



1. 一种具有下列结构的化合物:



包括其药学可接受的盐、溶剂化物和水合物, 其中:

R_1 和 R_2 独立地选自: 氢、卤素、氰基、羰基、羧基、任选取代的低级烷基、任选取代的低级烷氧基和任选取代的低级烷基羰基; 和

R_3 - R_6 独立地选自: 任选取代的低级烷基和低级羟基烷基, 此外 R_3 和 R_4 , R_5 和 R_6 可以独立地与和它们分别相连的氮一起形成任选取代的饱和或不饱和的 5-或 6-元环;

条件是, 当 R_1 和 R_2 选自氢、 C_{1-4} 烷基、 C_{2-4} 烯基或卤代的 C_{1-4} 烷基时, R_3 - R_6 都不是取代或未取代的 C_{1-4} 烷基、取代或未取代的 C_{2-4} 烯基; 并且当 R_1 和 R_2 都是氢时, R_3 - R_6 都不与和它们分别相连的氮一起形成哌嗪-1-基。

2. 权利要求 1 的化合物, 其中 R_1 和 R_2 中的至少一个是氢。

3. 权利要求 2 的化合物, 其中 R_1 和 R_2 都是氢。

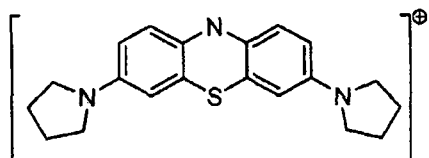
4. 权利要求 1 的化合物, 其中 R_3 - R_6 中的至少一个与和它们分别相连的氮形成任选取代的饱和或不饱和的 5-或 6-元环。

5. 权利要求 4 的化合物, 其中所述 5-或 6-元环是饱和的。

6. 权利要求 5 的化合物, 其中所述 5-或 6-元环是 5 元环。

7. 权利要求 6 的化合物, 其中所述 5 元环是吡咯基。

8. 权利要求 7 的化合物, 具有下列结构:



9. 权利要求 1 的化合物, 其中 R_1 和 R_2 独立地选自: 卤素、羧基、

24. 权利要求 23 的方法，其中所述病毒选自：HCV、VEEV、RVFV、LASV 和 EBOV。

25. 权利要求 24 的方法，其中所述病毒是 HCV 或 VEEV。

26. 权利要求 25 的方法，其中所述病毒是 HCV。

27. 权利要求 25 的方法，其中所述病毒是 VEEV。

28. 权利要求 24 的方法，其中所述病毒是 LASV、RVFV 或 EBOV。

29. 权利要求 28 的方法，其中所述病毒是 RVFV。

30. 权利要求 28 的方法，其中所述病毒是 EBOV。

31. 权利要求 28 的方法，其中所述病毒是 LASV。

用于抗病毒治疗的吩噻嗪衍生物

1 发明背景

1.1 技术领域

[0001] 本发明提供预防和治疗病毒感染的组合物和方法。因此本发明可以用于医学、药理学、病毒学和药物化学领域。

1.2 相关技术

[0002] 几乎没有好的选择可以用于预防或治疗病毒感染。大多数的抗病毒药物通过抑制病毒基因组的转录来干扰病毒复制。通常，这些药物抑制与病毒基因组转录有关的特定蛋白质，例如聚合酶或转录酶；这些药物常会产生不需要的毒性，因为病毒极大地依赖于病毒基因组复制的宿主因素。此外，对于给定的靶点的高特异性性质，病毒基因组中的小突变通常足以产生对化疗耐受的病毒株。此外，尽管药物抑制活病毒的复制，但它们不能消灭宿主中潜伏或退隐的病毒；因此，患者被迫——如果非不确定的话，长期——服用抗病毒药物并遭受它们的毒性效果。不出意外地，这样用药的患者不能持续治疗，仍然被感染，并产生了其他感染的潜在持续来源。

[0003] 因此，需要更好的抗病毒化疗药物和鉴定这些化疗药物的更有效策略。这种需要对于患有慢性和令人虚弱的病毒感染例如人免疫缺陷病毒(HIV)和丙型肝炎(HCV)的患者是特别迫切的，由于上述原因，对于这些病毒还没有好的治疗方法。

[0004] 但是，新的病毒威胁迫在眉睫。文明不断扩散到地球上最偏远的地区，给大量人口带来了异地病毒感染的危险。过去每一年，出血性发热例如埃博拉病毒(EBOV)、马尔堡病毒(马尔堡)和立夫特山谷热病毒(RVFB)感染的报告数字逐渐增加。还有其他的病毒感染也可

以导致潜在的虚弱效果，例如回归热、关节痛和疲劳；这些病毒包括：庞塔托鲁病毒 (PTV)、西尼罗河病毒 (WNV)、基孔肯雅病毒 (CHK)、东方马脑炎病毒 (EEEV)、西方马脑炎病毒 (WEEV)，拉萨病毒 (LASV) 和登革热病毒 (DENV)。

[0005] 例如，其他“新”病毒(也就是说，相对于工业化世界是新的)之一是委内瑞拉马脑炎病毒(也称委内瑞拉马脑脊髓炎，“VEEV”)。VEEV 是所有马科动物包括马、驴(野生和家养)和斑马的一种蚊传播的病毒疾病。感染 VEEV 的马科动物显示一种或多种下列症状：发热、抑郁、食欲不振、虚弱以及中枢神经系统障碍(不协调、咀嚼动作、垂头、“锯木架”姿势、转圈、四肢划动和抽搐)。在一些情况中，感染 VEEV 的马在临死前可以没有临床体征。VEEV 的临床体征会与其他影响中枢神经系统的疾病体征混淆。其他疾病包括东方马脑炎、西方马脑炎、非洲马病、狂犬病、破伤风和细菌性脑膜炎。VEE 也可能被错认为中毒。可以通过在实验室中分离病毒或通过测定血液中病毒抗体的存在来进行确定性诊断。

[0006] 人类也会接触到这种疾病。病毒感染的健康成年人会发生流行性感冒样症状，例如高烧和疼痛；那些免疫系统较弱的患者，以及儿童和老人的病情会变得更为严重或者甚至死亡。

[0007] 导致 VEEV 的病毒主要是通过蚊子传播的，它们叮咬受感染的动物，然后叮咬其他动物或人并以其他动物或人为食。疾病的传播速度取决于 VEEV 病毒的亚型和蚊子群的密度。VEEV 的地方性亚型是某些地区特有的疾病。一般这些亚型不会传播到其他地区。地方性亚型与啮齿动物—蚊子的传播循环有关。这些形式的病毒会导致人疾病，但是一般不会影响马的健康。另一方面，流行性亚型会通过大群体迅速传播。这些形式的病毒对于马是高致病性的，也会影响人的健康。马，而非啮齿动物，是携有和传播该疾病的主要动物种类。受感染的马在它们的循环系统中产生出种类庞大的病毒。当食血昆虫以这些动物为食时，它就会染上这些病毒并将其传播给其他动物或人。尽管其他动物，例如牛、猪和狗会被感染，但是它们一般不显示疾病体

征或者使其传播。

[0008] VEEV 的自然爆发是少见的。在 1936 年，在马脑脊髓炎大规模爆发后在委内瑞拉第一次将 VEEV 识别为一种受关注的疾病。从 1936 年到 1968 年，数个南美国家的马遭受到破坏性的爆发。在 1969 年，该疾病向北传播到中美洲，最后在 1971 年到达墨西哥和德克萨斯。1971 年以来美国还没出现高致病性的 VEEV。但是，在 1993 年 VEEV 在墨西哥的契亚帕斯省爆发，促使美国农业部临时增加其监视行动并提高对由墨西哥进入美国的马类检疫要求。在爆发期间，预防疾病进一步传播的最有效方法是对受感染的马进行检疫。通过杀虫剂处理控制蚊群和消除昆虫繁殖点也会增强疾病控制。这些措施应当伴随大规模的马免疫计划。仅当出现该疾病可能传播到美国的严重威胁时，应当使美国的马都针对 VEE 接种。

[0009] 与 VEE 类似的是西尼罗河病毒 (“WNV”)，其在上文提及，西尼罗河病毒是根据病毒在 1937 年从人中首次鉴定出来的乌干达的一个地区命名的。从那时起，病毒已经在欧洲、中东、非洲、中亚和澳大利亚的很多国家爆发。在 1999 年在西半球首先检测出了 WNV，此后该疾病传播到了北美、墨西哥、波多黎各、多米尼加共和国、牙买加、瓜德罗普和 EI 萨尔瓦多。症状范围从轻度感冒样病症(发热、头痛、肌肉和关节痛)和红泡疹至脑膜炎。在少数情况下，感染者会发生产生脑炎，包括高烧、颈强直、方向感消失、麻痹、抽搐、昏迷，和约 10% 的病例死亡。

[0010] VEEV 或 WNV，或上述其他病毒还没有治愈或治疗方法；因此，公共卫生专家强调通过避开已经检测到疾病或已经鉴定出疾病载体(通常是蚊子)的地区来预防。但是，由于世界人口的增加，这种途径变得不再合理。此外，一些官员担心，这些疾病中的一种或两种或者披膜病毒科和黄病毒科中的其他类似病毒可能被敌对政府或恐怖组织“武器化”以使受攻击的军事人员或重要地区的人口无法行动。

[0011] 更为复杂的是，上述病毒威胁跨越了几乎所有已识别的病毒类型，包括布亚病毒、虫媒病毒、纤丝病毒、沙粒病毒和披膜病毒。

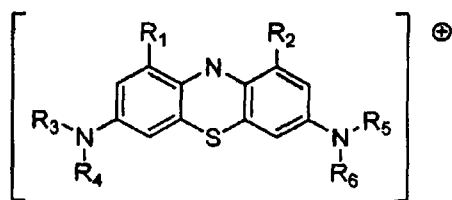
由于主要通过它们基因组复制的机制差异定义了病毒类型，因此聚焦于抑制基因组复制的治疗策略对于新的，特别是武器化的病毒的大规模爆发是不够的。

[0012] 因此，迫切需要提供这些和其他病毒疾病的药物治疗。本发明满足了这些和其他需要。

2 发明简述

[0013] 本发明提供了新的抗病毒化合物以及预防和治疗病毒感染的方法。出人意料地，本发明提供的化合物和方法可以对抗范围广泛的病毒类型；并且本发明的化合物和方法具有与广谱抗病毒治疗剂相同的活性。

[0014] 在第一个方面，本发明提供具有下列结构的化合物：

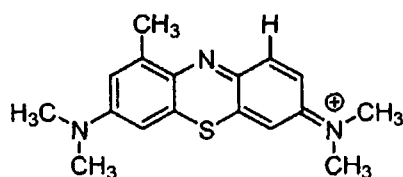
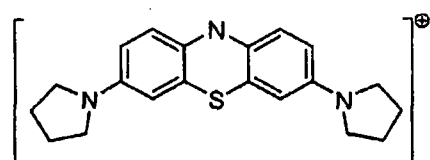
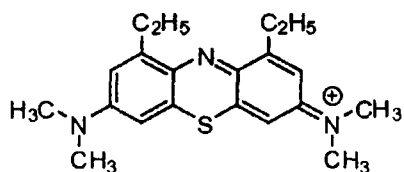
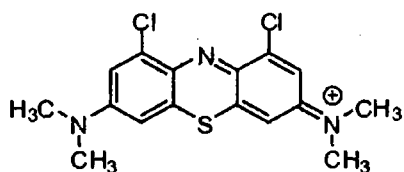
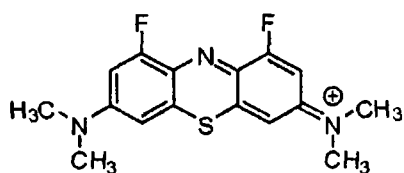
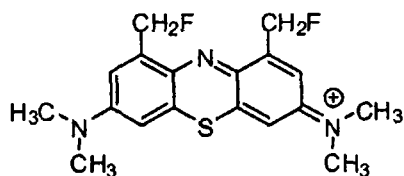


包括其药学可接受的盐、溶剂化物和水合物， R_1 和 R_2 独立地选自：氢、卤素、氰基、羰基、羧基、任选取代的低级烷基、任选取代的低级烷氧基和任选取代的低级烷基羰基。 R_3 - R_6 独立地选自：任选取代的低级烷基和低级羟基烷基，此外 R_3 和 R_4 ， R_5 和 R_6 可以独立地与和它们分别相连的氮一起形成任选取代的饱和或不饱和的5-或6-元环。但是，当 R_1 和 R_2 都选自氢、 C_{1-4} 烷基、 C_{2-4} 烯基或卤代的 C_{1-4} 烷基时， R_3 - R_6 都不是取代或未取代的 C_{1-4} 烷基、取代或未取代的 C_{2-4} 烯基；并且当 R_1 和 R_2 都是氢时， R_3 - R_6 都不与和它们分别相连的氮一起形成哌嗪-1-基。

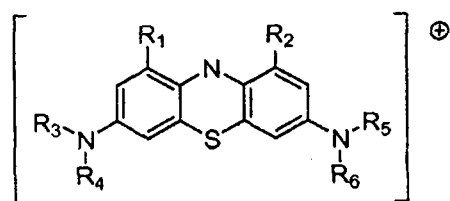
[0015] 在一些实施方案中， R_1 和 R_2 中的至少一个是氢，在上述更特别的实施方案中， R_1 和 R_2 都是氢。在其他实施方案中， R_3 - R_6 中的至少一个与和它们分别相连的氮一起形成任选取代的饱和或不饱和的5-或6-元环，在上述更特别的实施方案中，上述5-或6-元环是饱和的。更特别的实施方案是其中上述饱和5-或6-元环是5-元环的那些。

在更特别的实施方案中，上述饱和 5-元环是吡咯基。

[0016]在另一方面，本发明提供如下所示的新化合物和它们的药学可接受的盐、水合物和复合物：



[0016] 在另一方面，本发明提供一种治疗感染病毒的动物的方法，包括给该动物施用治疗有效量的具有下列结构的化合物：



包括其药学可接受的盐、溶剂化物和水合物。 R_1 和 R_2 独立地选自：

氢、卤素、氰基、羰基、羧基、任选取代的低级烷基、任选取代的低级烷氧基和任选取代的低级烷基羰基。R₃-R₆独立地选自：任选取代的低级烷基和低级羟基烷基，此外 R₃和 R₄，R₅和 R₆可以独立地与和它们分别相连的氮一起形成任选取代的饱和或不饱和的 5-或 6-元环。

[0018] 在一些实施方案中，该病毒选自：HCV、VEEV、RVFV、LASV 和 EBOV。

[0019] 当联系附属的附图阅读下列说明书时，本发明的这些要素和其他方面以优点将变得显而易见。

3 附图简述

[0020] 附图 1A 和 1B 显示了一项研究，其中测定本发明的化合物保护小鼠免于埃博拉病毒 (EBOV) 感染的能力。附图 1A 显示的是对照组的结果。附图 1B 显示的是研究组的结果。

[0021] 附图 2A 和 2B 显示了一项研究，其中测定本发明的化合物保护小鼠免于马尔堡病毒感染的的能力。附图 2A 显示的是对照组的结果。附图 2B 显示的是研究组的结果。

4 本发明的一些实施方案的描述

4.1 定义

4.1.1 任选取代的

[0022] “任选取代的”是指用一价或二价基团取代氢。适当的取代基包括，例如，羟基、硝基、氨基、亚胺基、氰基、卤素、硫代、硫酰氨基、脒基、氧代、氧代脒基、甲氧脒基、imidino、胍基、磺酰氨基、羧基、甲酰基、低级烷基、卤代低级烷基、低级烷氧基、卤代低级烷氧基、低级烷氧基烷基、烷基羰基、芳基羰基、芳烷基羰基、杂芳基羰基、杂芳烷基羰基、烷硫基、氨基烷基、氰基烷基等等。取代基本身也可以被取代。取代基上取代的基团可以是例如，羧基、卤素；硝基、氨基、氰基、羟基、低级烷基、低级烷氧基、氨基羰基、-SR、硫氨基、-SO₃H、-SO₂R 或环烷基，其中 R 典型地是氢、羟基或低

级烷基。当被取代的取代基包括直链基团时，取代可以发生在链内(例如，2-羟基烷基、2-氨基丁基等等)或在链末端(例如，2-羟基乙基、3-氰基丙基等等)。被取代的取代基可以是直链的，支链的或环状排列的共价结合的碳或杂原子。

4.1.2 低级烷基和相关术语

[0023] 本文使用的“低级烷基”是指包含1到10个碳原子的支链或直链烷基，所述碳原子独立地是未取代的或取代的，例如被一个或多个卤素、羟基或其他基团取代。低级烷基的例子包括但不限于，甲基、乙基、丙基、异丙基、正丁基、叔丁基、正己基、新戊基、三氟甲基、五氟乙基等等。

[0024] “烷基”是指具有1到20个碳原子的二价直链或支链饱和脂肪族基团。用于本发明的化合物的典型烷基是在它们主链上具有1到约6个碳原子的低级烯基。“烯基”是指具有一个或多个双键并具有2到20个碳原子的直链、支链或环状基团。“炔基”是指具有一个或多个叁键并具有2到20个碳原子的直链、支链或环状基团。

[0025] 术语“卤代低级烷基”是指被一个或多个卤素原子取代的低级烷基。

[0026] 本文使用的“低级烷氧基”是指 $RO-$ ，其中R是低级烷基。低级烷氧基的代表性例子包括甲氧基、乙氧基、叔丁氧基、三氟甲氧基等等。

[0027] 本文使用的“低级烷硫基”是指 $RS-$ ，其中R是低级烷基。

[0028] 术语“烷氧基烷基”是指基团 $alk_1-O-alk_2$ ，其中 alk_1 是亚烷基或烯基， alk_2 是烷基或烯基。术语“低级烷氧基烷基”是指其中 alk_1 是低级亚烷基或低级烯基并且 alk_2 是低级烷基或低级烯基的烷氧基烷基。术语“芳氧基烷基”是指基团-亚烷基-O-芳基。术语“芳烷氧基烷基”是指基团-亚烷基-O-芳烷基，其中芳烷基是低级芳烷基。

[0029] “环烷基”是指单环或多环低级烷基取代基。典型的环烷基取代基具有3-到8个主链(即环)原子，其中每个主链原子是任选取代的碳。当在本文中以环烷基取代基使用时，本文的术语“多环”是

指稠合、非稠合的环碳结构和螺环。环烷基的例子包括但不限于，环丙基、环丁基、环戊基、环己基、金刚烷基、冰片基、降冰片基等等。

[0030] 本文的术语“环杂烷基”是指在环结构中具有1到5个，更典型地1到4个杂原子(即，非碳原子例如氮、硫和氧)的环烷基取代基，其中在环中其余原子是任选取代的碳。代表性的杂环烷基部分包括，例如，吗啉代基、哌嗪基、哌啶基、吡咯烷基、甲基吡咯烷基、吡咯烷酮-基等等。

[0031] 术语“(环烷基)烷基”和“环杂烷基烷基”是指分别被环烷基或环杂烷基取代的烷基链。

[0032] 术语“卤代烷氧基”是指被一个或多个卤素原子取代的烷氧基。术语“卤代低级烷氧基”是指被一个或多个卤素原子取代的低级烷氧基。

4.1.3 卤素

[0033] 本文的“卤素”是指卤素基团，例如氟、氯、溴或碘。

4.1.4 芳基和相关术语

[0034] “芳基”是指单环和多环芳香基，或具有至少一个芳香环的稠合环系统，具有3到14个主链碳原子。芳基的例子包括但不限于，苯基、萘基、二氢萘基、四氢萘基等等。

[0035] “芳烷基”是指被芳基取代的烷基。典型地，用于本发明的化合物的芳烷基具有掺入到芳烷基的烷基部分的1到6个碳原子。在本发明的化合物中使用的适当的芳烷基包括例如，苄基、吡啶甲基等等。

4.1.5 杂芳基和相关术语

[0036] 本文的术语“杂芳基”是指在芳香环中具有1到4个杂原子作为环原子，环原子的其余部分是芳香或非芳香碳原子的芳基。当与芳基取代基结合使用时，本文的术语“多环”是指稠合和非稠合的环结构，其中至少一个环结构是芳香族，例如，苯并二噁唑、萘基等等。在本发明的化合物中作为取代基使用的示例性的杂芳基部分包括吡啶基、嘧啶基、噻唑基、吡唑基、咪唑基、噁唑基、四唑基、吡嗪

基、三唑基、噻吩基、呋喃基、喹啉基、嘌呤基、苯并噻唑基、苯并吡啶基和苯并咪唑基等等。

4.1.6 氨基和相关术语

[0037] 本文的“氨基”是指基团 -NH_2 。本文的术语“低级烷基氨基”是指基团 $\text{-NRR}'$ ，其中 R 和 R' 分别独立地选自氢或低级烷基。本文的术语“芳基氨基”是指基团 $\text{-NRR}'$ ，其中 R 是芳基，R' 是氢、低级烷基、芳基或芳烷基。本文的术语“芳烷基氨基”是指基团 $\text{-NRR}'$ ，其中 R 是芳烷基，R' 是氢、低级烷基、芳基或芳烷基。术语“杂芳基氨基”和“杂芳烷基氨基”定义与芳基氨基和芳烷基氨基类似。

[0038] 本文的术语“氨基羰基”是指基团 -C(=O)-NH_2 。术语“低级烷基氨基羰基”、“芳基氨基羰基”、“芳烷基氨基羰基”、“杂芳基氨基羰基”和“杂芳烷基氨基羰基”是指基团 $\text{-C(=O)NRR}'$ ，其中 R 和 R' 独立地分别是氢和上述相应术语类似的任选取代的低级烷基、芳基、芳烷基、杂芳基和杂芳烷基。

4.1.7 巯基、磺酰基、亚磺酰基和相关术语

[0039] 术语“巯基”是指 -SH 。术语“低级烷基巯基”“芳巯基”、“杂芳巯基”、“环烷基巯基”、“杂环烷基巯基”、“芳烷基巯基”、“杂芳烷基巯基”、“(环烷基)烷基巯基”和“(杂环烷基)烷基巯基”是指 -SR ，其中 R 分别是任选取代的低级烷基、芳基、杂芳基、环烷基、杂环烷基、芳烷基、杂芳烷基、(环烷基)烷基和(杂环烷基)烷基。

[0040] 本文的术语“磺酰基”是指基团 $\text{-SO}_2\text{-}$ 。术语“低级烷基磺酰基”、“芳基磺酰基”、“杂芳基磺酰基”、“环烷基磺酰基”、“杂环烷基磺酰基”、“芳烷基磺酰基”、“杂芳烷基磺酰基”、“(环烷基)烷基磺酰基”和“(杂环烷基)烷基磺酰基”是指 $\text{-SO}_2\text{R}$ ，其中 R 分别是任选取代的低级烷基、芳基、杂芳基、环烷基、杂环烷基、芳烷基、杂芳烷基、(环烷基)烷基和(杂环烷基)烷基。

[0041] 本文的术语“亚磺酰基”是指基团 -SO- 。术语“低级烷基亚磺酰基”、“芳基亚磺酰基”、“杂芳基亚磺酰基”、“环烷基亚磺酰基”、“杂环烷基亚磺酰基”、“芳烷基亚磺酰基”、“杂芳烷基亚磺酰基”

基亚磺酰基”、“(环烷基)烷基亚磺酰基”和“(杂环烷基)烷基亚磺酰基”是指-SOR, 其中 R 分别是任选取代的低级烷基、芳基、杂芳基、环烷基、杂环烷基、芳烷基、杂芳烷基、(环烷基)烷基和(杂环烷基)烷基。

4.1.8 甲酰基、羧基、羰基、硫羰基和相关术语。

[0042] “甲酰基”是指-C(O)H。

[0043] “羧基”是指 -C(O)OH。

[0044] “羰基”是指二价基团-C(O)-。术语“低级烷基羰基”、“芳基羰基”、“杂芳基羰基”、“环烷基羰基”、“杂环烷基羰基”、“芳烷基羰基”、“杂芳烷基羰基”、“(环烷基)烷基羰基”和“(杂环烷基)烷基羰基”是指-C(O)R, 其中 R 分别是任选取代的低级烷基、芳基、杂芳基、环烷基、杂环烷基、芳烷基、杂芳烷基、(环烷基)烷基和(杂环烷基)烷基。

[0045] “硫代羰基”是指基团-C(S)-。术语“低级烷基硫代羰基”、“芳基硫代羰基”、“杂芳基硫代羰基”、“环烷基硫代羰基”、“杂环烷基硫代羰基”、“芳烷基硫代羰基”、“杂芳烷基硫代羰基”、“(环烷基)烷基硫代羰基”和“(杂环烷基)烷基硫代羰基”是指-C(S)R, 其中 R 分别是任选取代的低级烷基、芳基、杂芳基、环烷基、杂环烷基、芳烷基、杂芳烷基、(环烷基)烷基和(杂环烷基)烷基。

[0046] “羧基”一般是指基团-C(O)-O-。术语“低级烷基羧基”、“芳基羧基”、“杂芳基羧基”、“环烷基羧基”、“杂环烷基羧基”、“芳烷基羧基”、“杂芳烷基羧基”、“(环烷基)烷基羧基”和“(杂环烷基)烷基羧基”是指-C(O)OR, 其中 R 分别是任选取代的低级烷基、芳基、杂芳基、环烷基、杂环烷基、芳烷基、杂芳烷基、(环烷基)烷基和(杂环烷基)烷基。

[0047] “氧基羰基”是指基团-O-C(O)-。术语“低级烷基氧基羰基”、“芳基氧基羰基”、“杂芳基氧基羰基”、“环烷基氧基羰基”、“杂环烷基氧基羰基”、“芳烷基氧基羰基”、“杂芳烷基氧基羰基”、“(环烷基)烷基氧基羰基”和“(杂环烷基)烷基氧基羰基”是指

-O-C(O)R, 其中 R 分别是任选取代的低级烷基、芳基、杂芳基、环烷基、杂环烷基、芳烷基、杂芳烷基、(环烷基)烷基和(杂环烷基)烷基。

[0048] “羰基氨基”是指基团-NH-C(O)-。术语“低级烷基羰基氨基”、“芳基羰基氨基”、“杂芳基羰基氨基”、“环烷基羰基氨基”、“杂环烷基羰基氨基”、“芳烷基羰基氨基”、“杂芳烷基羰基氨基”、“(环烷基)烷基羰基氨基”和“(杂环烷基)烷基羰基氨基”是指-NH-C(O)R, 其中 R 分别是任选取代的低级烷基、芳基、杂芳基、环烷基、杂环烷基、芳烷基、杂芳烷基、(环烷基)烷基和(杂环烷基)烷基。此外, 本发明包括 N-取代的羰基氨基(-NR'C(O)R), 其中 R' 是任选取代的低级烷基、芳基、杂芳基、芳烷基或杂芳烷基并且 R 保持前述定义。

[0049] “羰硫基”是指基团-C(O)-S-。术语“低级烷基羰硫基”、“芳基羰硫基”、“杂芳基羰硫基”、“环烷基羰硫基”、“杂环烷基羰硫基”、“芳烷基羰硫基”、“杂芳烷基羰硫基”、“(环烷基)烷基羰硫基”和“(杂环烷基)烷基羰硫基”是指-C(O)SR, 其中 R 分别是任选取代的低级烷基、芳基、杂芳基、环烷基、杂环烷基、芳烷基、杂芳烷基、(环烷基)烷基和(杂环烷基)烷基。

4.1.9 亚甲基和次甲基

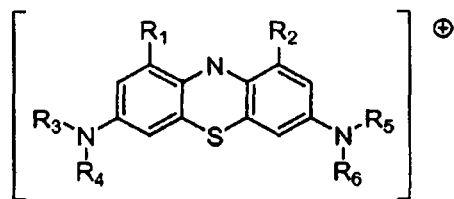
[0050] 本文使用的术语“亚甲基”是指具有甲醛 sp^3 杂化的未取代、单取代或二取代的碳原子(即, -CRR'-, 其中 R 和 R' 是氢或独立的取代基)。

[0051] 本文使用的术语“次甲基”是指未取代的或具有甲醛 sp^2 -杂化的碳原子(即, -CR=或=CR-, 其中 R 是氢或取代基)。

4.2 用于治疗疾病的新化合物

4.2.1 新化合物的定义

[0052] 在第一个方面, 本发明提供具有下列结构的化合物:



化合物 1

包括其药学可接受的盐、溶剂化物和水合物， R_1 和 R_2 独立地选自：氢、卤素、氰基、羰基、羧基、任选取代的低级烷基、任选取代的低级烷氧基和任选取代的低级烷基羰基。 R_3 - R_6 独立地选自：任选取代的低级烷基和低级羟基烷基，此外 R_3 和 R_4 ， R_5 和 R_6 可以独立地与和它们分别相连的氮一起形成任选取代的饱和或不饱和的 5-或 6-元环。但是，当 R_1 和 R_2 都选自氢、 C_{1-4} 烷基、 C_{2-4} 烯基或卤代的 C_{1-4} 烷基时， R_3 - R_6 都不是取代或未取代的 C_{1-4} 烷基、取代或未取代的 C_{2-4} 烯基；并且当 R_1 和 R_2 都是氢时， R_3 - R_6 都不与和它们分别相连的氮一起形成哌嗪-1-基。

[0053] 如上所示的化合物 1 的结构式隐含包括所有等价的共振结构。类似地，本文的所有特定共振结构的图示定义为，除非另有特别说明，隐含包括所有等价的共振结构。这些共振结构和它们等价体的鉴定是本领域普通技术人员公知的。此外，尽管本文的图示结构表示阳离子化合物，但是应当理解的是，本发明的化合物还包括与任何适当的互补阴离子配对的图示阳离子。这些适当的互补阴离子的识别对于本领域普通技术人员是显而易见的。

[0054] 在化合物 1 的一些实施方案中， R_1 和 R_2 中的至少一个是氢，在上述更特别的实施方案中， R_1 和 R_2 都是氢。

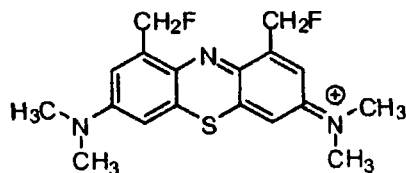
[0055] 在化合物 1 的其他实施方案中， R_3 - R_6 中的至少一个与分别和它们相连的氮一起是任选取代的饱和或不饱和的 5-或 6-元环；在上述更特别的实施方案中，上述 5-或 6-元环是饱和的。所述的化合物 1 的更特别的实施方案是其中上述饱和 5-或 6-元环是 5-元环的那些。在更特别的实施方案中，上述饱和 5-元环是吡咯基。

[0056] 在化合物 1 的其他实施方案中， R_1 和 R_2 独立地选自：卤素、羧基、羰基、氰基。在化合物 1 更特别的实施方案中，其中 R_1 和

R_2 独立地选自：卤素、羧基、羰基、氰基， R_1 和 R_2 中的至少一个是卤素；在更特别的实施方案中， R_1 和 R_2 中的至少一个是氯或氟。在更特别的实施方案中， R_1 和 R_2 中的至少一个是氟，或者 R_1 和 R_2 中的至少一个是氯。在化合物1的其他实施方案中，其中 R_1 和 R_2 独立地选自：卤素、羧基、羰基、氰基， R_1 和 R_2 中的至少一个是卤素， R_1 和 R_2 都是卤素；在后者中，更特别的实施方案是其中 R_1 和 R_2 是氯或氟的那些。后者的更特别的实施方案是其中 R_1 和 R_2 都是氟的那些，其中 R_1 和 R_2 都是氯的那些，和其中 R_1 和 R_2 中的一个氯并且 R_1 和 R_2 中的另一个是氟的那些。

[0057]在其中 R_1 和 R_2 独立地选自：卤素、羧基、羰基、氰基， R_1 和 R_2 都是卤素的化合物1的这些实施方案中，进一步是那些，其中 R_3 - R_6 分别是任选取代的低级烷基；更特别地，其中 R_3 - R_6 分别是任选取代的甲基或任选取代的乙基；更特别地，其中 R_3 - R_6 分别是甲基或乙基；更特别地，其中 R_3 - R_6 分别是甲基。

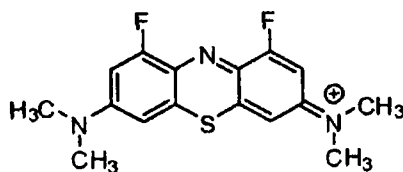
[0058] 在另一个方面，本发明提供如下所示的新化合物：



化合物 2

及其其药学可接受的盐、水合物和复合物。

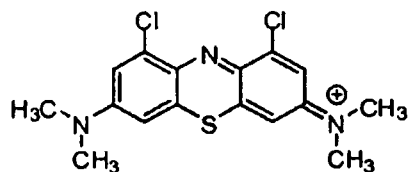
[0059] 在另一个方面，本发明提供如下所示的新化合物：



化合物 3

及其其药学可接受的盐、水合物和复合物。

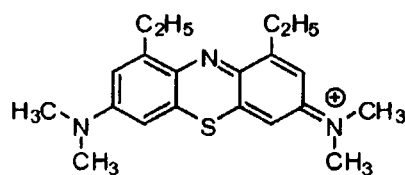
[0060] 在另一个方面，本发明提供如下所示的新化合物：



化合物 4

及其其药学可接受的盐、水合物和复合物。

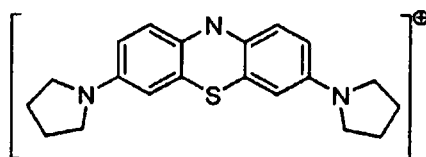
[0061] 在另一个方面，本发明提供如下所示的新化合物：



化合物 5

及其其药学可接受的盐、水合物和复合物。

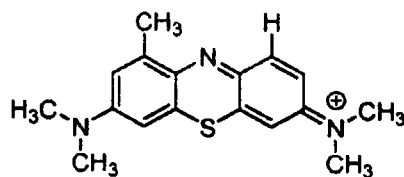
[0062] 在另一个方面，本发明提供如下所示的新化合物：



化合物 6

及其其药学可接受的盐、水合物和复合物。

[0063] 在另一个方面，本发明提供如下所示的新化合物：



化合物 7

及其其药学可接受的盐、水合物和复合物。

4.2.2 本发明的化合物的合成

[0064] 可以使用本领域普通技术人员公知的方法和物质，结合本发明的内容来制备本发明的化合物。例如，上述化合物 1 所述的那些化合物的实施方案中，其中 R_1 和 R_2 独立地是氢、烷基或卤素，特别是氟和氯， R_3 - R_6 独立地是低级烷基，特别是甲基或乙基，或者与和它们

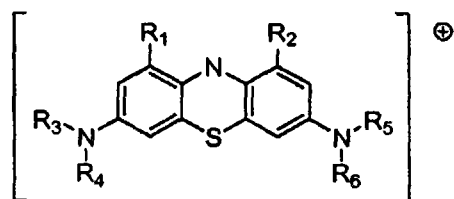
相连的各个氮形成吡咯烷环，本领域普通技术人员可以使用如公开的美国专利申请 US 2006/0287523 A1 所述的方法来制备这些化合物，出于所有目的将该专利以整体通过参考引入本文。下面的 4.3 部分提供了实施例。

[0065] 上述化合物 1 所述的化合物，其中 R_1 和 R_2 都是氢， R_3 - R_6 包括与它们相连的各个氮形成取代的吡咯烷环，本领域普通技术人员可以使用例如 Tetrahedron 1997, 53(29), 10083-10092; J. Heterocyclic. Chem. 1993, 30, 1693; J. Med. Chem. 2007, 50(10), 2281-2284; 和 Histochemical Journal, I (1969), 199-204 提供的方法来制备这些化合物。出于所有目的将这些参考文献都以整体通过参考引入本文。

[0066] 本领域普通技术人员使用已知方法和物质来制备本文所述的其他化合物。

4.3 治疗病毒疾病的方法

[0067] 在另一方面，本发明提供一种处理感染病毒的动物的方法，包括给该动物施用治疗有效量的具有下列结构的化合物：



化合物 8

包括其药学可接受的盐、溶剂化物和水合物。 R_1 和 R_2 独立地选自：氢、卤素、氰基、羰基、羧基、任选取代的低级烷基、任选取代的低级烷氧基和任选取代的低级烷基羰基。 R_3 - R_6 独立地选自：任选取代的低级烷基和低级羟基烷基，此外 R_3 和 R_4 ， R_5 和 R_6 可以独立地与和它们分别相连的氮一起形成独立的任选取代的饱和或不饱和的 5-或 6-元环。

[0068] 在一些实施方案中，病毒选自：HCV、VEEV、RVFV、LASV

和 EBOV。在特别的实施方案中，病毒是 HCV 或 VEEV；在更特别的实施方案中，病毒是 HCV，在其他更特别的实施方案中，病毒是 VEEV。在其他实施方案中，病毒是 LASV、RVFV 或 EBOV；在更特别的实施方案中，病毒是 RVFV，在其他更特别的实施方案中，病毒是 EBOV，在其他更特别的实施方案中，病毒是 LASV。

[0069] 本发明的化合物对于不同病毒类型，包括 HCV、VEEV、RVFV、EBOV、WNV、DENV、LASV、CHK、WEEV、EEEV 和 PTV 具有通过 EC_{50} (μM) 所测定的所证明的活性，如表 1 所示：

表 1

化合物	HCV	VEEV	RVFV	EBOV	WNV	DENV	LASV	CHK	WEEV	EEEV	PTV
亚甲基兰(MB)	0.02-0.08	<1	>5	>3.2	<1	10		1	1	1	
二甲基MB	0.2-0.5	0.02-0.1	<10	0.025-0.1	0.025-0.1		<1	0.1-1	0.1	<0.1	5
二乙基MB		0.1-1	0.1	>3.2	<0.05	0.05-1		0.05			
化合物4		<1	0.05		<1		<5				
化合物3		<1	>5		1		>5				
甲苯胺蓝		<10				1					
天蓝A		0.1-1				1					
天蓝B		0.1-1				1					
天蓝C		0.1				<1					
化合物6		<1	2.5		<1		<5				

[0070] 此外, 根据公开方法 (Bray, M., K. Davis, T. Geisbert, C. Schmaljohn, 和 J. Huggins. 1998. "A mouse model for evaluation of prophylaxis and therapy of Ebola hemorrhagic fever." J. Infect. Dis. 178: 651-661, 出于所有目的将其以整体通过参考引入本文), 在如 4.4.2.1 部分所述的埃博拉病毒 (EBOV) 和马尔堡感染的动物模型中测定二甲基亚甲基蓝 (二甲基 MB)。结果分别如附图 1A 和 1B, 以及附图 2A 和 2B 所示。

[0071] 附图 1A 显示的是对照组, 其没有接受任何化合物。在第 3 天对照小鼠显示是健康的, 但是到第 5 天都显示出应激症状 ("边缘波动 (ruffling)")。在第 6 天, 超过一半的小鼠死亡; 另一半明显感染病毒患病。至第 10 天, 对照组的所有小鼠都死亡了。相反 (附图 1B), 用本发明的化合物处理的小鼠在第 5 天都没有显示症状, 在第 6 至第 9 天出现一些应激体征, 然后至第 10 天完全恢复。因此, 本发明的化合物为研究组提供了完全的预防作用。

[0072] 附图 2A 显示的是对照组, 其没有接受任何化合物。在第 4 天对照小鼠显示是健康的, 但是到第 5 天都显示出应激症状 ("边缘波动") 并有 2 只小鼠死亡。在第 6 天, 所有小鼠都死亡或染病。至第 7 天, 对照组的所有小鼠都死亡了。相反, 如附图 2B 所示, 用本发明的化合物处理的所有小鼠在第 3 天都没有显示症状。在第 4 天, 2 只小鼠死亡, 存活的小鼠显示应激。至第 6 天, 4 只小鼠死亡, 剩余的 6 只显示应激。但是至第 9 天, 存活的小鼠都恢复了。因此本发明的化合物为研究组的 60% 的小鼠提供了预防作用。

[0073] 上表和附属的附图所示的数据表明, 本发明针对令人惊奇的广谱病毒类型提供了治疗病毒感染的化合物和方法, 这与现有的一般只能针对特定病毒类型的化疗方法完全不同。由于不同病毒家族具有显著不同的复制机制, 本发明提供的新化合物和方法可以确定地认为是广谱抗病毒化合物和抗病毒治疗方法。

[0074] 可以用本领域普通技术人员已知的方法和物质配制本发明的新化合物并施用于患者。类似地, 可以用本领域普通技术人员已

知的方法和物质实施本发明的方法。

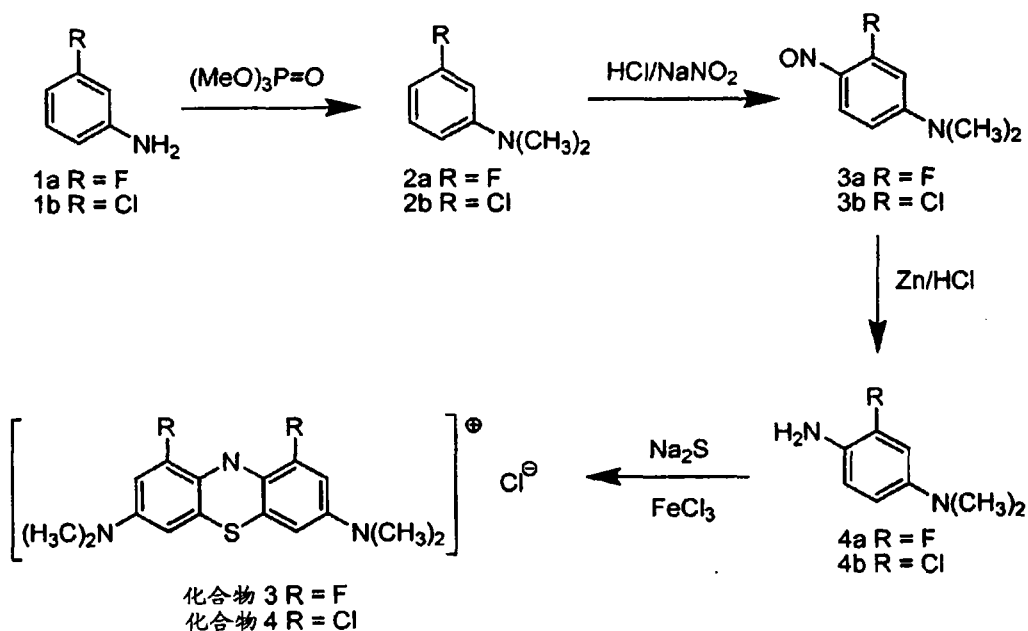
4.4 实施例

[0075] 提供下列实施例来说明本发明的某些方面并帮助本领域技术人员实施本发明。不能认为这些实施例是以任何方式限制本发明的范围。

4.4.1 化合物的合成

4.4.1.1 化合物 3 和化合物 4 的合成

[0076] 化合物 3 和化合物 4 的合成如合成路线 1 所述。



合成路线 1

[0077] 将商业可购得的原料 **1a** 或 **1b** (0.1 mol) 置于氮气大气下，并与三甲基磷酸酯 $((CH_3)_3P=O, 0.102 \text{ mol})$ 混合。将该混合物缓慢加热至约 $150^\circ C$ (不少于 40 分钟的时间)，该混合物在约 $200^\circ C$ 的最终温度下回流 2 小时。然后将反应混合物冷却至室温，缓慢加入约 100 毫升 (ml) 的 $NaOH$ (15 g) 水溶液中。然后用二氯甲烷 (CH_2Cl_2) 萃取所得到的水混合物，并用 $Na_2SO_4/NaOH$ 干燥。收率 **2a**: 10.8 g; **2b**: 12.0 g。

[0078] 接着，将中间体 **2a** 或 **2b** (77.7 mmol) 溶于约 60 ml 的 6N 盐酸，在冰浴下将该溶液缓慢加入到约 20 ml 的 $NaNO_2$ 水溶液中。

将所得到的混合物在室温下搅拌约 1 小时。形成了黄色沉淀，收集并用冷 2N HCl 和乙醚洗涤，分别得到基本上纯的所需的产物 3a 或 3b。
收率：3a: 8.2 g; 3b: 10.0 g。

[0079] 然后将产物 3a (或 3b) (5.0 g) 悬浮于约 80 ml 的 4N HCl 中，向该混悬液中加入足够的锌 (Zn)，直至反应混合物变无色。过滤该无色混合物，用 NaOH 水溶液中中和滤液。用 CH_2Cl_2 萃取该水溶液；用 Na_2SO_4 干燥有机层，并用硅胶柱进行色谱纯化，用 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ (100: 3) 溶剂混合物洗脱。收率 4a: 3.0 g; 4b 2.8 g。

4.4.1.1.1 化合物 3 的合成

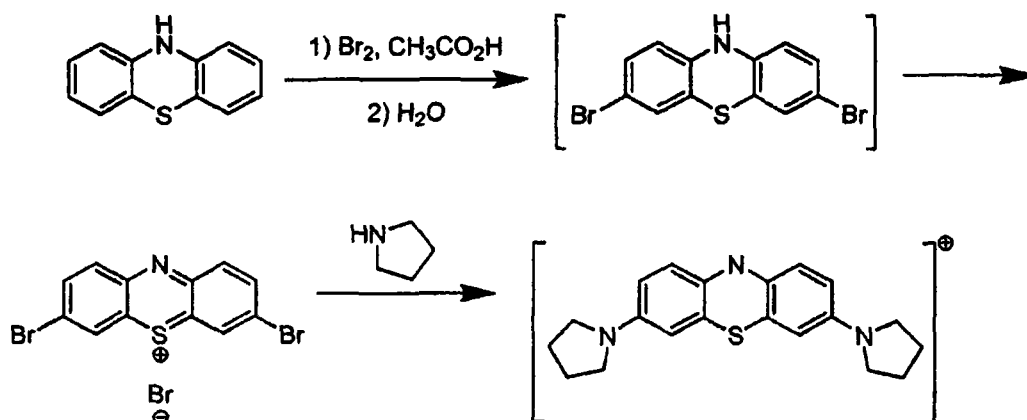
[0080] 将约 2.0 g 的硫化钠 ($\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$) 溶于约 8 ml 的水；将约 8.1 g 的三氯化铁溶于 50 ml 的 2N 盐酸。将中间体 4a (2.0 g) 溶于约 20 ml 3N HCl，在搅拌下，交替加入 0.8 ml 的硫化钠溶液的等分部分，并然后加入约 5 ml 的三氯化铁溶液的等分部分，直至这两种溶液都已经加入。在加入最终的等分部分后继续搅拌约 2 小时，在此期间形成了沉淀。过滤沉淀；将滤饼溶于甲醇；用 CH_2Cl_2 (100 ml, 3 次) 萃取滤液。干燥 (Na_2SO_4) 有机层，并与滤饼的甲醇溶液混合。浓缩该溶液，粗产物用硅胶柱进行色谱纯化 (数次)，用 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ (12: 1) 洗脱，然后真空干燥。收率：12.2 mg。

4.4.1.1.2 化合物 4 的合成：

[0081] 将约 6.4 g 的硫化钠 ($\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$) 溶于约 25 ml 的水，将约 8.1 g 的三氯化铁溶于 160 ml 的 2N 盐酸。将中间体 4b (5.0 g) 溶于约 65 ml 3N HCl，在搅拌下，交替加入 1.25 ml 的硫化钠溶液的等分部分，然后加入约 8 ml 的三氯化铁溶液的等分部分，直至这两种溶液都已经加入。在加入最终的等分部分后继续搅拌约 12 小时，在此期间形成了沉淀。过滤沉淀 (粗产品)，将滤饼溶于甲醇，用硅胶柱进行色谱纯化 (数次)，用 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ (14: 1) 洗脱，然后真空干燥。收率：9.1 mg。

4.4.1.2 化合物 6 的合成

[0082] 化合物 6 的合成如合成路线 2 所述。



合成路线 2

4.4.1.2.1 溴化 3, 7-二溴吩噻嗪-5-磺的合成:

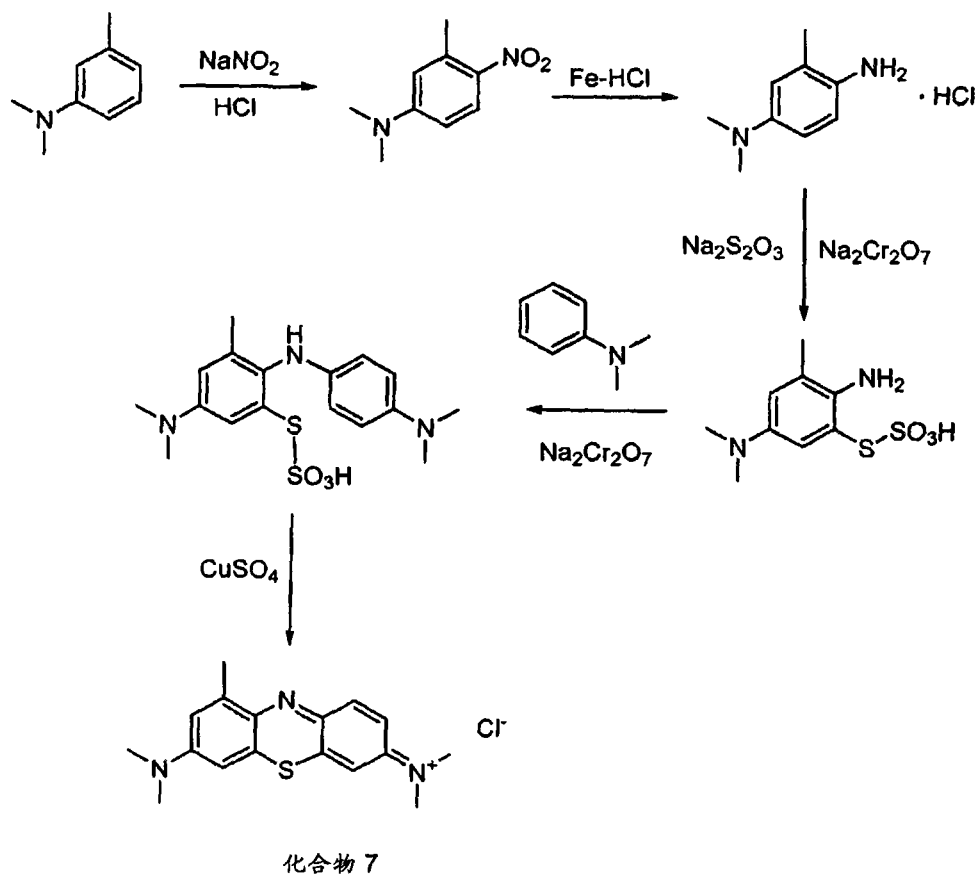
[0083] 将商业可购得的吩噻嗪 (2.0 g, 10.0 mmol) 溶于约 120 ml 的基本上不含氧的冰醋酸, 在强烈搅拌下, 以单一份将溴 (Br₂) 的乙酸溶液 (100 ml, 10%, v/v, 195 mmol) 加入到吩噻嗪溶液中。继续搅拌约 1 分钟, 然后向该混合物中加入约 400 ml 的水, 因此形成了红色沉淀。过滤该红色沉淀, 用水和二乙基醚 (CH₃OCH₃) 洗涤并真空干燥。收率: 4.4 g (粗, 约 100%)。

4.4.1.2.2 化合物 6 的合成:

[0084] 在强烈搅拌下, 以单一份向保持在 N₂ 下的吡咯烷 (1.5 ml, 18 mmol) 的约 250 ml CHCl₃ 溶液中加入如上制备的约 1.0 g (2.3 mmol) 的溴化 3, 7-二溴吩噻嗪-5-磺。3 小时后, 真空下除去 CHCl₃, 将粗产物溶于约 150 ml 的 CH₂Cl₂, 用约 50 ml HBr (1%, v/v) 萃取 1 次, 用约 50 ml 水萃取 1 次。用 Na₂SO₄ 干燥有机层, 浓缩, 粗产物在硅胶上进行色谱纯化 (2 次), 首先用 CH₂Cl₂/CH₃OH (20:1), 然后用 CH₂Cl₂/CH₃OH (10:1) 洗脱。通过重结晶 (CH₂Cl₂/PE, 2 次) 纯化所得到的粗产物并真空干燥。收率: 145 mg (15%)。

4.4.1.2.3 化合物 7 的合成

[0085] 化合物 7 的合成如合成路线 3 所述。



合成路线 3

4.4.2 生物学研究

4.4.2.1 埃博拉 (EBOV) 和马尔堡活病毒的动物分析

[0086] 将受试化合物(亚甲基蓝, 二甲基 MB)以 800 $\mu\text{g/ml}$ 溶于盐水, 从第 2 天开始, 通过腹腔内注射 (IP) 施用 100 μl , 每天 2 次。

[0087] 将受试化合物(二甲基 MB)以 160 $\mu\text{g/ml}$ 溶于盐水, 从第 2 天开始, 通过 IP 施用 100 $\mu\text{g/ml}$, 每天 2 次。

[0088] 在第 2 天施用化合物, 但无病毒和盐水对照组 (第 3 和 4 组)。从第 0 天开始病毒培养 (第 1, 2 和 4 组)。注意, 在病毒培养前, 盐水对照组的动物 (第 4 组) 接受 2 天的盐水。

[0089] 在第 0 天将 1, 000 pfu EBOV 或马尔堡病毒通过 IP 给予第 1, 2, 4, 5 和 6 组。

组	说明	#小鼠	处死的时间 (每次处死 3 只小鼠)
1 (高剂量)	1,000 pfu EBOV: 5mg/kg/日 二甲基 MB	16	天数+4, 天数+7, 结束时
2 (低剂量)	1,000 pfu EBOV: 1.0mg/kg/日 二甲基 MB	16	天数+4, 天数+7, 结束时
3	5mg/kg/日的二甲基 MB	16	天数+4, 天数+7, 结束时
4	盐水+ 1000 pfu EBOV	16	天数+4, 天数+7, 结束时

[0090] 每天监测小鼠的临床体征, 包括边缘波动、不动性。每天给小鼠称重, 并记录它们的体重。

[0091] EBOV 的结果如附图 1A 和 1B 所示。对照组的小鼠(即, 未处理的小鼠)至第 3 天有明显的发病率, 至第 6 天发病率为 100%。用该化合物处理的小鼠从第 3 天开始显示发病率, 但是至第 6 天已经恢复, 100%存活。

[0092] 马尔堡的结果如附图 2A 和 2B 所示。对照组的小鼠在第 4 天显示应激, 并死亡。

4.4.3 病毒收率降低和标准病毒斑试验

4.4.3.1 病毒斑减少试验

[0093] 以 2.5 μ M, 10 μ M 和 20 μ M 的浓度, 以一式三份进行上述各化合物的所述测定。

[0094] 将维洛(Vero)细胞置于 12-或 24-孔板上。当细胞 80%-90% 融合时, 在 37°C 下分别用 100 pfu 或 50 pfu 的 VEEV 特立尼达病毒感染它们 1 小时, 并分别摇动 15 分钟。

[0095] 在感染后, 移除接种物, 用最终浓度 1%琼脂, 1 x EMEM, 10% FBS, Pen/Strep 和不同浓度的受试化合物的标准病毒斑试验涂液替代。这些是预定的或者是由高浓度得到的“系列稀释液”。出于对照和比较目的, 包括不含受试剂的 VEEV 特立尼达。

[0096] 该 12-孔板的每个孔使用 1ml 的涂液。24-孔板的每个孔

需要 0.5 ml 的涂液。

[0097] 将该板在 37℃ 和 5% CO₂ 下培养过夜。

[0098] 在约 24 hpi 下, 加入第二涂液, 包含最终浓度为 1% 琼脂, 1 x EMEM, 10% FBS, Pen/Strep 和 5% 中性红; 将该板在 37℃ 和 5% CO₂ 下培养过夜。

[0099] 将病毒斑计数, 记录数据并分析。

[00100] 对 EEEV、WNV、CHK 和 WEEV 进行相同的试验; 这些病毒的各 EC₅₀ 值如上所述。用该方案确定 DENV 的活性, 其中以一 (1) 的多重感染, 用 DENV 感染细胞。在感染后六 (6) 天收集细胞, 如上所述分析。

4.4.4 HCV 活性试验

4.4.4.1.1 复制子效力和细胞毒性:

[00101] 用化合物的系列稀释液 (DMSO 用作溶剂) 处理 Huh-1uc 细胞 (稳定复制 Bartenschlager I3891uc-ubi-neo/NS3-3'/ET 遗传型 1b 复制子) 72 小时。通过生物发光法测定复制子的复制数, 进行非线性回归以计算 EC₅₀。用 Promega 细胞滴定-Glo 细胞存活试验测定用相同药物稀释液处理的平行板的细胞毒性。

4.4.4.2 抗感染性 HCV 的效力和细胞毒性:

[00102] 感染过表达 CD81 的 Huh-7 细胞 (称作 Lun-CD81) ~ 8 天, 在该时间大部分细胞都被感染 (即, 对 HCV 核心蛋白呈阳性)。在 ~ 10³ 灶形成单位 (ffu)/ml 产生病毒。

[00103] 分别以 5x10³/孔和 2.5x10⁴/孔的密度将被感染的细胞植入 96 孔和 24 孔板中。在下一日, 用 PBS 洗涤细胞 3 次, 向各孔中加入化合物稀释液 (在完全 DMEM 中)。然后将细胞在 37℃ 下培养 3 天。

[00104] 在 3 天结束时, 以下列方法测定感染和病毒产生:

a. RNA 复制 (EC₅₀) - 96 孔板用于 EC₅₀ 测定, 使用新 NS3 蛋白酶底物测定。

b. 病毒产生 (EC₅₀) - 从 24 孔板中除去上清液, 进行端点限定稀释

测定，其中再用 3 天感染首次用于实验的细胞以确定上清液中感染性病毒的量。然后用 4% 的多聚甲醛固定细胞，用抗-HCV 核心抗体进行间接免疫荧光检验。将各化合物稀释液的 HCV-阳性病灶计数，以计算 EC_{50} 值。

c. 细胞毒性 (EC_{50}) -96 孔板用于 EC_{50} 测定，使用 Promega 细胞滴定-Glo 测定。

4.4.5 RVFV 和 LASV 的标准病毒斑试验

[00105] 将约 540 μ l 的培养基(完全 EMEM)等分到 6 排滴定盒中。通过向每排的第一个孔中加入约 60 μ l 的各样品来制备样品稀释液。首先加入所有样品，然后将板下的总共 6 组稀释液稀释成 1:10 (60 μ l 加入 540 μ l，在分别转移前通过来回吸取 6 次彻底混合)。包括阳性对照组。

[0100] 用微量化学方法将维洛 6-孔板的培养基排空到 dispo/kill 盘中。该板是 200 μ l/孔，一式两份(顶部和底部)。通过下列方式，以-6 稀释液开始并使用相同的尖端，直至-1 倍稀释：

-1	-2	-3
-1	-2	-3

-4	-5	-6
-4	-5	-6

[0101] 在装入样品后适当摇动该板，以使病毒分散到整个孔中。

[0102] 将样品在 37℃ 下培养约 1 小时，确保每 15 分钟摇动板，以使中间的板不会变干燥。

[0103] 在水浴中将该板 2 x EBME + 10%FBS + 1%药剂加热至 37℃。

[0104] 制备 1%琼脂糖 (100 ml diH₂O 中含 1g 琼脂糖) 并通过微波加热直至琼脂糖溶解。在培养期间，将剩余的溶液在水浴中冷却至 45

℃。

✓ [0105] 从培养器中取出该板，并在涂液前立即与等份的 2 x EBME 和 1%琼脂糖混合(以避免凝集和固化)。每孔加入约 2 ml 的涂液培养基(2 x EBME + 补充/1%琼脂糖)，约 12 ml 涂液/板。

[0106] 在第 3 天,用 2 ml 的涂液培养基+ 4%中性红溶液(4ml/100 ml 涂液)进行另外的涂液。

[0107] 在下一日读取每种稀释液的病毒斑数。

5 结论

[0108] 从上文中本领域普通技术人员将会意识到,本发明提供了新的化合物和方法，这是对现有抗病毒治疗的重要补充，提供了确定的广谱抗病毒活性。后述的性质是重要的，提供了能够对抗现有病毒、新出现病毒和武器化的病毒的日益增长的危险的化疗方法。尽管本文已经描述了各种特定的实施方案和实施例，但是本领域普通技术人员将会理解，可以通过很多不同的方法实现本发明而不脱离本说明书的精神或范围。

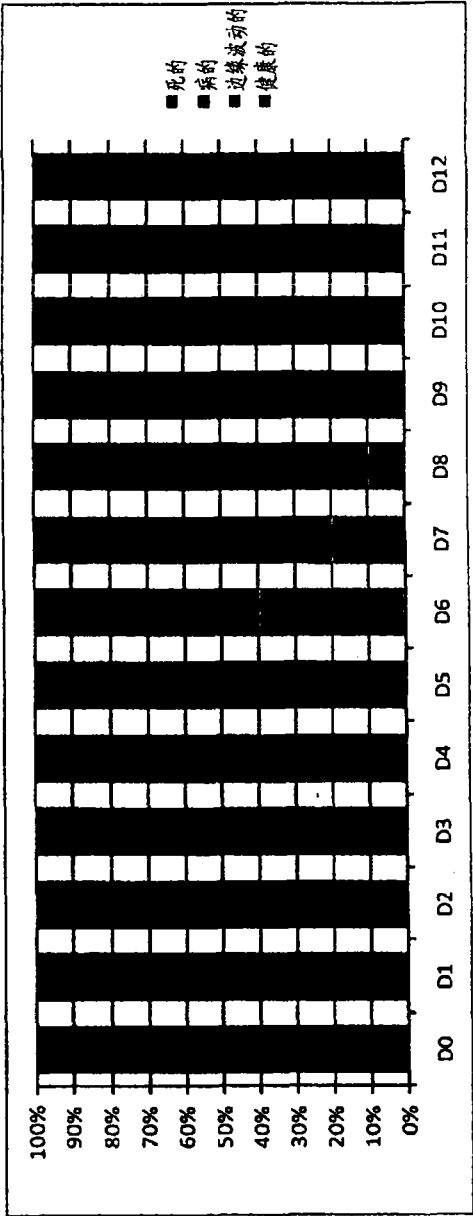


图1A

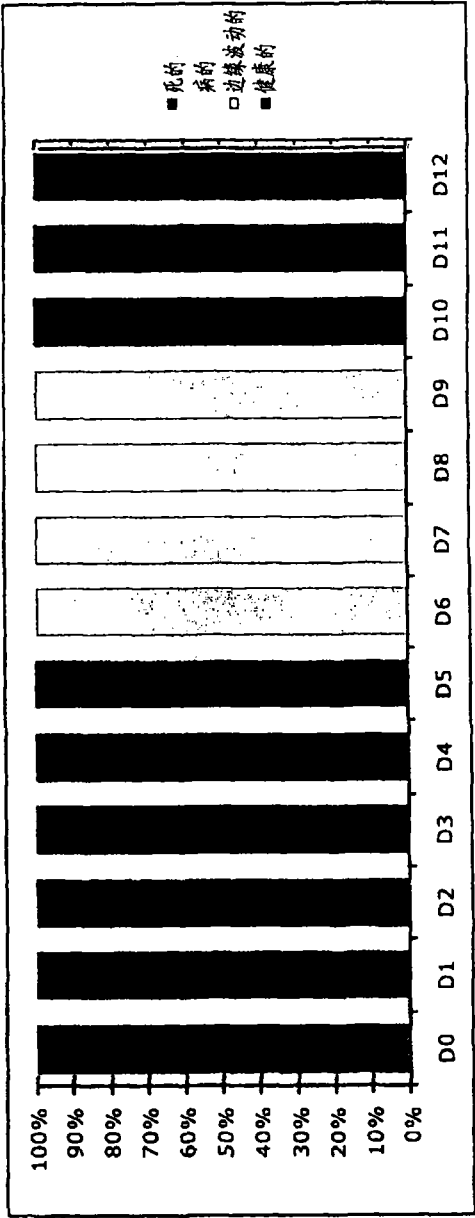


图1B

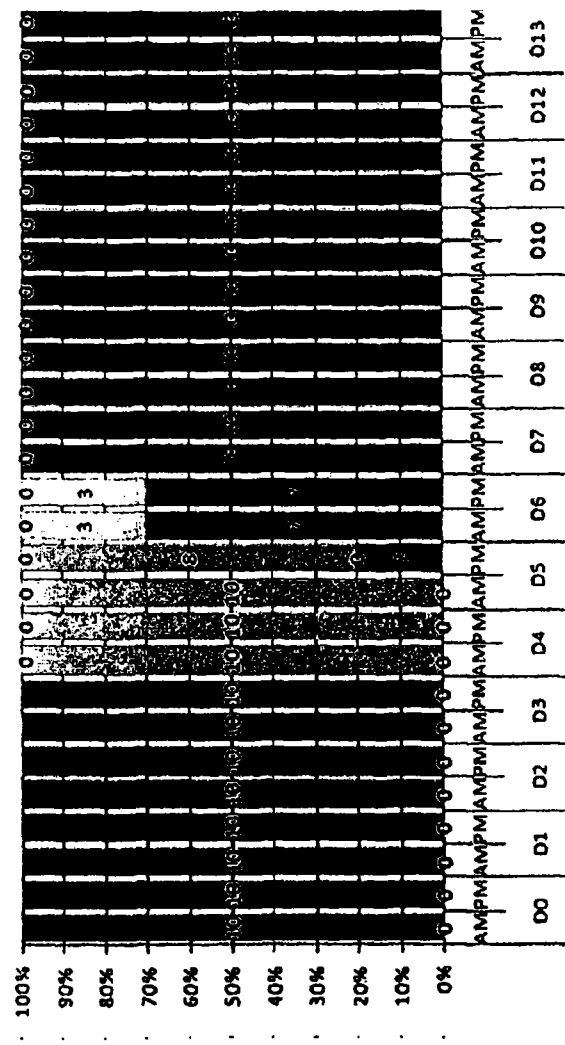


图 2A

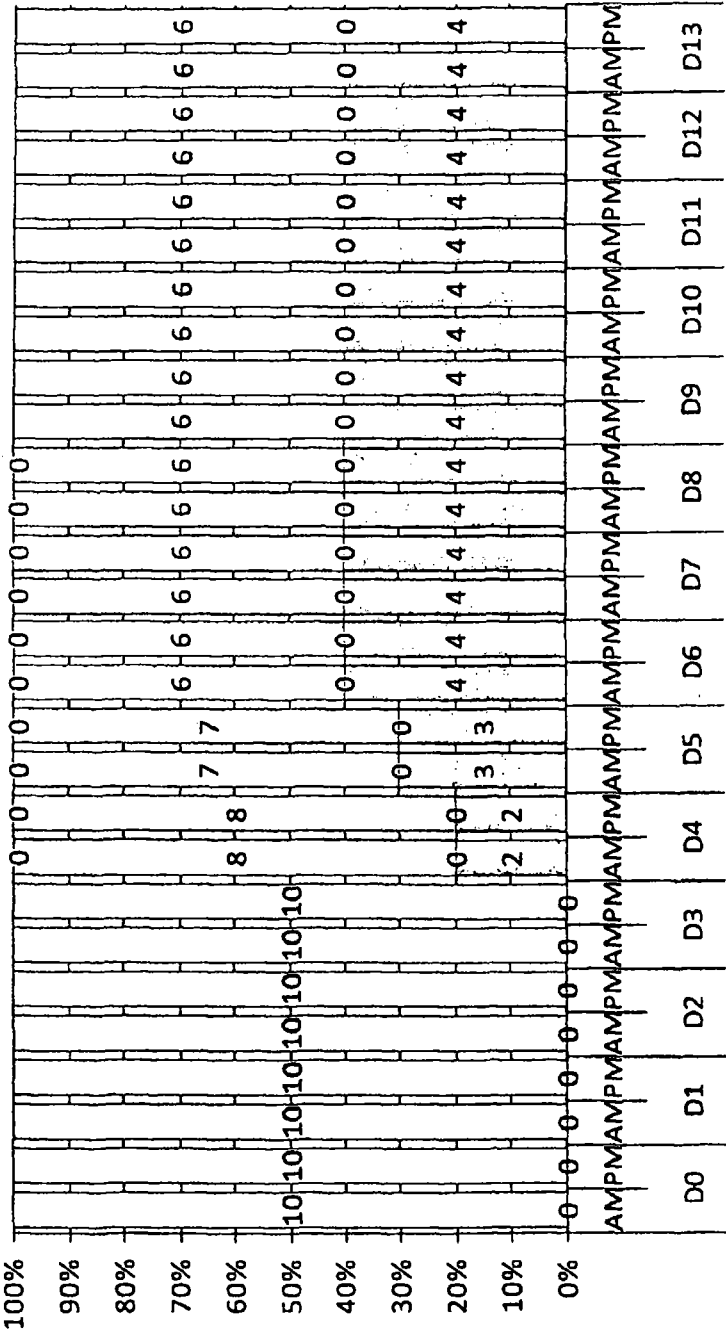


图 2B