

發明專利說明書 200307692

(填寫本書件時請先行詳閱申請書後之申請須知，作※記號部分請勿填寫)

※申請案號：9-101813 ※IPC分類：C07K5/08; A61K38/065
※申請日期：92.1.28 A61P31/14

壹、發明名稱

(中文) 具有抗C型肝炎病毒活性之大環肽
(英文) MACROCYCLIC PEPTIDES ACTIVE AGAINST THE HEPATITIS C VIRUS

貳、發明人(共2人)

發明人 1 (如發明人超過一人，請填說明書發明人續頁)

姓名：(中文) 曼特斯 林爾-保尼
(英文) MONTSE LLINAS-BRUNET

住居所地址：(中文) 加拿大魁北克省達拉-德-歐蒙奧市陸布克街14號
(英文) 14 RUSHBROOKE, DOLLARD-DES-ORMEAUX (QUEBEC),
H9B 3K6, CANADA

國籍：(中文) 加拿大 (英文) CANADA

參、申請人(共1人)

申請人 1 (如申請人超過一人，請填說明書申請人續頁)

姓名或名稱：(中文) 加拿大商百靈佳殷格翰有限公司
(英文) BOEHRINGER INGELHEIM (CANADA) LTD.

住居所或營業所地址：(中文) 加拿大魁北克省雷維市邱納路2100號
(英文) 2100 CUNARD, LAVAL, QUEBEC, CANADA H7S
2G5, CANADA

國籍：(中文) 加拿大 (英文) CANADA

代表人：(中文) 路易斯 G. 柏尼爾
(英文) LOUISE G. BERNIER

發明人 2

姓名：(中文) 維狄 J. 葛芮

(英文) VIDA J. GORYS

住居所地址：(中文) 加拿大魁北克省達拉-德-歐蒙奧市蒙塔維斯塔街114號

(英文) 114 MONTEVISTA, DOLLARD-DES-ORMEAUX (QUEBEC),

H9B 2Z9, CANADA

國籍：(中文) 加拿大

(英文) CANADA

捌、聲明事項

☐ 本案係符合專利法第二十條第一項 ☐ 第一款但書或 ☐ 第二款但書規定之期間，其日期為：_____

☒ 本案已向下列國家（地區）申請專利，申請日期及案號資料如下：

【格式請依：申請國家（地區）；申請日期；申請案號 順序註記】

1. 加拿大；2002年01月30日；2,369,711

2. _____

3. _____

☒ 主張專利法第二十四條第一項優先權：

【格式請依：受理國家（地區）；日期；案號 順序註記】

1. 加拿大；2002年01月30日；2,369,711

2. _____

3. _____

4. _____

5. _____

6. _____

7. _____

8. _____

9. _____

10. _____

☐ 主張專利法第二十五條之一第一項優先權：

【格式請依：申請日；申請案號 順序註記】

1. _____

2. _____

3. _____

☐ 主張專利法第二十六條微生物：

☐ 國內微生物 【格式請依：寄存機構；日期；號碼 順序註記】

1. _____

2. _____

3. _____

☐ 國外微生物 【格式請依：寄存國名；機構；日期；號碼 順序註記】

1. _____

2. _____

3. _____

☐ 熟習該項技術者易於獲得，不須寄存。

(1)

玖、發明說明

(發明說明應敘明：發明所屬之技術領域、先前技術、內容、實施方式及圖式簡單說明)

發明範圍

本發明係關於一類化合物，其合成方法，組合物及治療C型肝炎病毒(HCV)感染的方法。具體地說，本發明提供新穎肽類似物，含此類似物的醫藥組合物及使用此類似物治療HCV感染的方法。

發明背景

C型肝炎病毒(HCV)全世界上都是輸血後及社會上獲得的非-A非-B肝炎的主要病因劑。據估計，世界上有超過二億人受此病毒感染。有高百分比的帶病毒者變成慢性感染，其中多數發展成慢性肝病，即所謂慢性C型肝炎。而這一組又成為嚴重肝疾病如肝硬化，肝細胞癌及導至死亡的肝病的高危險群。

HCV確立病毒抗性的機轉及導致慢性肝病高發生率的原因現尚不完全明瞭。現尚不知HCV如何與病主免疫系統互動及避開主免疫系統。此外，有關避免HCV感染及疾病的細胞及體液免疫反應詳情現也尚未確定。據報告，免疫球蛋白可預防輸血引起的病毒性肝炎，但疾病控制中心(the Center for Disease Control)現尚未推薦免疫球蛋白治療用於此目的。有效的保護性免疫反應的缺乏妨礙了疫苗的發展或適宜的曝露後預防手段，所以近期內希望仍寄託於對抗病毒的干擾。

各臨床研究的目的是在確定能有效地治療受慢性C型肝炎困擾的病人的HCV感染的醫藥劑。此等研究包括使用 α -

干擾素，單獨使用或與其他抗病毒劑合併使用。此類研究顯示有當數目的受試驗者對此類治療無反應，也有相當多受試者有不錯的反應，發現大部分在治療完了後復發。

直到最近，干擾素(IFN)是臨床上唯一證明對慢性C型肝炎有利的治療。但其持續反應率仍低，而且干擾素治療也會引起嚴重的副作用(即視網膜病變，甲狀腺炎，急性胰臟炎，壓抑)，此等副作用降低了接受治療的病人的生活品質。最近已許可對單獨使用IFN無反應的病人合併使用干擾素與病毒唑(ribavirin)。但由IFN所致的副作用並未因使用此合併治療而減輕。聚乙二醇型的干擾素如PEG-Intron[®]及Pegasys[®]能明顯地部分指出此等有害的副作用，但仍未取得治療HCV的供口服的抗病毒藥物。

所以，現在需要發展出治療HCV的克服現有的藥物治療限制的有效的抗病毒劑。

HCV是黃病毒科有包膜的正鏈RNA病毒。單鏈HCV RNA基因組的長度約9500個核苷酸，具有編碼約3000個胺基酸的單一大多蛋白的開放讀架(ORF)。於受感染的細胞內，此多蛋白由細胞及病毒蛋白酶於多位裂解生成結構蛋白及非結構蛋白(NS)。於HCV的情形，成熟非結構蛋白(NS2，NS3，NS4A，NS4B，NS5A及NS5B)之增殖是由二種病毒蛋白酶完成。第一種，現尚未完全明瞭其特性，於NS2-NS3連接處(過去稱NS2/3蛋白酶)裂解；第二種為絲胺酸蛋白酶，含於NS3(NS3蛋白酶)的N-端區，引發NS3下流所有順式，於NS3-NS4A列解位，及反式剩餘的

NS4A-NS4B，NS4B-NS5A，NS5A-NS5B位的裂解。NS4A蛋白質有多種功能，有NS3蛋白酶的輔因子的作用，並可能有助於NS3膜及其他病毒複製酶成分的定位。NS3蛋白酶與NS4A之複合形成(complex formation)在所有位的加工(processing events)，增進蛋白水解上似是必需的。NS3蛋白也展現核苷三磷酸酶及RNA解旋酶活性。NS5B是涉及HCV複製的RNA-依賴性RNA聚合酶。

發展抗病毒劑的一般策略是鈍化(inactivate)病毒複製所必需的病毒編碼的酶。

下面是最近幾年所公告的揭示HCV NS3蛋白酶抑制劑肽類似物的專利申請案，此等HCV NS3蛋白酶抑制劑肽類似物不同於本發明化合物：

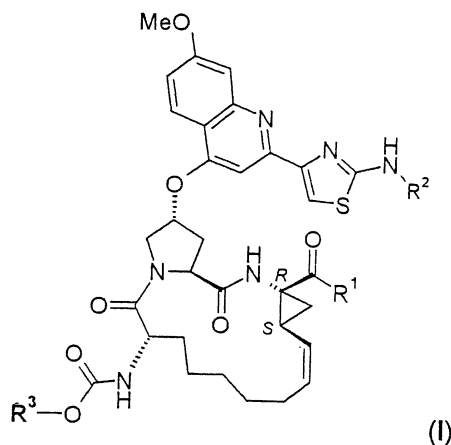
GB 2,337,262；JP 10298151；JP 11126861；JP 11292840；JP 2001-103993；US 6,159,938；US 6,187,905；WO 97/43310；WO 98/17679；WO 98/22496；WO 98/46597；WO 98/46630；WO 99/38888；WO 99/50230；WO 99/64442；WO 99/07733；WO 99/07734；WO 00/09543；WO 00/09558；WO 00/20400；WO 00/59929；WO 00/31129；WO 01/02424；WO 01/07407；WO 01/16357；WO 01/32691；WO 01/40262；WO 01/58929；WO 01/64678；WO 01/74768；WO 01/77113；WO 01/81325；WO 02/08187；WO 02/08198；WO 02/08244；WO 02/08251；WO 02/08256；WO 02/18369；WO 02/60926及WO 02/79234。

本發明化合物的不同處在與其不同的化學構造及其令人驚奇的特異地抑制HCV NS3蛋白酶，同時對其他絲胺酸蛋白酶展現明顯的抑制活性。此外，此等化合物在細胞培

養中是有活性的，並在活體內具極良好藥物動力學性質。

本發明概述

本發明範圍內包括式I化合物：



其中 R¹ 是羥基或 NHSO₂R^{1A}；其中 R^{1A} 是 (C₁₋₈) 烷基，(C₃₋₇) 環烷基或 {(C₁₋₆) 烷基-(C₃₋₇) 環烷基}，其視需要以鹵，氰基，硝基，O-(C₁₋₆) 烷基，鹽胺基，胺基或苯基作 1 至 3 次之取代，或 R^{1A} 是 C₆ 或 C₁₀ 芳基，其視需要以鹵，氰基，硝基，(C₁₋₆) 烷基，O-(C₁₋₆) 烷基，鹽胺基，胺基或苯基作 1 至 3 次之取代；R² 是 (C₅₋₆) 環烷基及 R³ 是環戊基；或其醫藥上可接受的鹽。

本發明範圍內包括醫藥組合物，其含抗 C 型肝炎病毒有效量的式 I 化合物或其治療上可接受的鹽，及與其混合的醫藥上可接受的載劑介質或助劑。

根據本發明一具體實施例，本發明醫藥組合物尚含干擾素 (聚乙二醇型或非聚乙二醇型的) 或病毒唑，或一或多種抗-HCV 劑，或以上諸劑的任何混合物。

本發明另一重要方面包括藉給予哺乳動物抗 C 型肝炎

病毒有效量的式 I 化合物，其治療上可接受的鹽，或上述組合物，單獨給予或與一或多種干擾素(聚乙二醇型或非聚乙二醇型)或病毒唑，或一或多種其他抗-HCV劑一起給予或分別給予以治療 C 型肝炎病毒感染的方法，

本發明另一重要方面包括藉給予哺乳動物抗 C 型肝炎病毒有效量的式 I 化合物，其治療上可接受的鹽，或上述組合物，單獨給予或與一或多種干擾素(聚乙二醇型或非聚乙二醇型)或病毒唑，或一或多種其他抗-HCV劑一起給予或分別給予以預防 C 型肝炎病毒感染的方法。

本發明範圍還包括式 I 化合物，如此處所述者，在製成藥物以治療或預防 C 型肝炎病毒感染的用途。

較佳具體實施例詳述

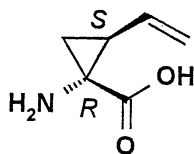
定義

如此處所述，下述定義除非另有說明適用於：

在述及各實例時，(R)或(S)用以指示不對稱中心之絕對構形，此指示是用於整個化合物之說明而非只用於取代基的說明。

此處“P1，P2及P3”意謂從肽類似物 C-端開始延伸至 N-端的胺基酸殘基的位置(即 P1 是指從 C-端開始的 1 位，P2 是指從 C-端開始的 2 位，依此類推)(見 Berger A. & Schechter I., Transactions of the Royal Society London series B257, 249-264 (1970))。

此處所謂“(1R,2S)-乙烯基-ACCA”意謂下式化合物：



即，(1R,2S)1-胺基-2-乙烯基環丙基羧酸。

此處所謂“鹵”一詞意謂鹵素取代基，選自溴，氯，氟或碘。

此處所謂“(C₁₋₆)烷基”或“(低)烷基”一詞，不管單獨使用或與另一取代基共同使用，意謂非環形直鏈或支鏈烷基取代基，含1至6個碳原子，包括，例如，甲基，乙基，丙基，丁基，己基，1-甲基乙基，1-甲基丙基，2-甲基丙基及1,1-二甲基乙基。

此處所謂“(C₁₋₈)烷基”一詞，不管單獨使用或與另一取代基共同使用，意謂非環形直鏈或支鏈烷基取代基，含1至8個碳原子，包括，例如，甲基，乙基，2,2-二甲基丁基，己基，1-甲基乙基，庚基及辛基。

此處所謂“(C₃₋₇)環烷基”一詞，不論單獨使用或與其他取代基一起使用，意謂環烷基取代基，其含3至7個碳原子，包括環丙基，環丁基，環戊基，環己基及環庚基。

此處所謂“{(C₁₋₆)烷基-(C₃₋₇)環烷基}”一詞，意謂含3至7個碳原子的環烷基，直接鍵合於含1至6個碳原子的伸烷基上；例如環丙基甲基，環戊基乙基，環己基甲基，環己基乙基及環庚基丙基。在R^{3A}是{(C₁₋₆)烷基-(C₃₋₇)環烷基}時，此基團是經由(C₁₋₆)烷基(即伸烷基部分)聯於SO₂上。

此處所謂“O-(C₁₋₆)烷基”一詞，不論單獨使用或與其他基團合併使用，意謂-O-(C₁₋₆)烷基，其中烷基之定義如上述，含達六個碳原子。O-(C₁₋₆)烷基包括甲氧基，乙氧基，丙氧基，1-甲基乙氧基，丁氧基及1,1-二甲基乙氧基。後

一取代基一般稱作第三-丁氧基。

此處所謂“醫藥上可接受的鹽”一詞意謂式I化合物的鹽，其在正確的醫學判斷範圍內，適用於與人及低等動物的組織接觸而無毒性，刺激性，過敏反應等，具有合理的利益/風險比。一般是水溶性或油溶性，或是易分散的，在其使用上是有效的。此詞包括醫藥上可接受的酸加成鹽及醫藥上可接受的鹼加成鹽。適宜的鹽的表見於：S. M. Birge et al., J. Pharm. Sci., 1977, 66, 頁1-19，今全文附上供參考。

“醫藥上可接受的酸加成鹽”一詞意謂保有生物效果的及自由態鹼性質的，並且是非生物上或其他方面不需要的，其是與無機酸如鹽酸，氫溴酸，氫碘酸，硫酸，胺基磺酸，硝酸，磷酸等，及有機酸如醋酸，三氯醋酸，三氟醋酸，己二酸，藻酸，抗壞血酸，天冬胺酸，苯磺酸，苯甲酸，2-乙醯氧基苯甲酸，丁酸，樟腦酸，樟腦磺酸，肉桂酸，檸檬酸，二葡萄糖酸，乙烷磺酸，穀胺酸，乙醇酸，甘油基磷酸，半硫酸，庚酸，己酸，甲酸，富馬酸，2-羥基乙烷磺酸(羥乙磺酸)，乳酸，馬來酸，羥基馬來酸，蘋果酸，丙二酸，扁桃酸，三甲基苯磺酸，甲烷磺酸，萘磺酸，菸鹼酸，2-萘磺酸，草酸，雙羥萘酸，果膠酯酸，苯基醋酸，3-苯基丙酸，苦味酸，新戊酸，丙酸，丙酮酸，水楊酸，硬脂酸，丁二酸，對胺基苯磺酸，酒石酸，對-甲苯磺酸，十一碳烷酸等所成的鹽。

“醫藥上可接受的鹼加成鹽”一詞意謂保有生物效果的

及自由態酸性質的，並且是非生物上或其他方面不需要的，其是與無機鹼如氨或氫氧化物，銨金屬陽離子如鈉，鉀，鋰，鈣，鎂，鐵，鋅，銅，錳，鋁等的碳酸鹽或碳酸氫鹽所成的鹽。特佳的是銨，鉀，鈉，鈣及鎂鹽。由醫藥上可接受的有機的無毒的鹼衍生的鹽包括初級，二級及三級胺，四級胺化合物，經取代的胺，包括天然的經取代的胺，環形胺及鹼離子交換樹脂，如甲基胺，二甲基胺，三甲基胺，乙基胺，二乙基胺，三乙基胺，異丙基胺，三丙基胺，三丁基胺，乙醇胺，二乙醇胺，2-二甲基胺基乙醇，2-二乙基胺基乙醇，二環己基胺，賴胺酸，精胺酸，組胺酸，咖啡因，哈胺青黴素，膽鹼，甜菜鹼，伸乙基二胺，葡糖胺，甲基葡糖胺，可可鹼，嘌呤，六氫吡啶，六氫吡啶，N-乙基六氫吡啶，四甲基銨化合物，四乙基銨化合物，吡啶，N,N-二甲基苯胺，N-甲基六氫吡啶，N-甲基嗎啉，二環己基胺，二苄基胺，N,N-二苄基苯乙胺，1-phenamine，N,N'-二苄基伸乙基二胺，聚胺樹脂等所成的鹽。特佳的有機無毒性鹼是異丙基胺，二乙基胺，乙醇胺，三甲基胺，二環己基胺，膽鹼及咖啡因。

此處所謂“抗病毒劑”一詞意謂有效抑制哺乳動物內病毒生成及/或複製的劑(化合物或生物製劑)。包括干擾哺乳動物內病毒生成及/或複製機轉的劑。抗病毒劑包括，例如，病毒唑，金鋼胺，VX-497(merimepodib, Vertex Pharmaceuticals), VX-498 (Vertex Pharmaceuticals), Levovirin, Viramidine, Ceplene (maxamine), XTL-001 及 XTL-002(CTL

Biopharmaceuticals)。

此處所謂“其他抗-HCV劑”一詞意謂減少或預防有關C型肝炎疾病症狀的進行的劑。此類劑可選自：免疫調節劑，HCV NS3蛋白酶抑制劑或HCV生命週期中另一標的抑制劑。

此處所謂“免疫調節劑”一詞意謂有效增強哺乳動物免疫系統反應的劑(化合物或生物製劑)。免疫調節劑包括，例如，I類干擾素(如 α -， β -， δ -及 ω 干擾素，T-干擾素，共有區干擾素及脫唾液酸干擾素(asialo-interferons))，II類干擾素(如 γ -干擾素)及聚乙二醇型干擾素。

此處所謂“HCV NS3蛋白酶抑制劑”一詞意謂有效抑制哺乳動物HCV NS3蛋白酶的劑(化合物或生物製劑)。HCV NS3蛋白酶抑制劑包括WO 99/07733，WO 99/07734，WO 00/09558，WO 00/09543或WO 00/59929及Vertex/Eli Lilly預發展候補確證為VX-950或LY-570310，所述的化合物。

此處所謂“HCV生活週期中另一標的抑制劑”意謂有效抑制哺乳動物內HCV生成及/或複製的而非抑制HCV NS3蛋白酶功能的劑(化合物或生物製劑)。此包括干擾寄主或HCV病毒於哺乳動物內生成及/或HCV複製所需的機轉的劑。HCV生活週期內另一標的抑制劑包括，例如，抑制選自解旋酶、HCV NS2/3蛋白酶內源性核糖體進入位點(IRES)的劑。HCV生活週期內另一標的抑制劑的特定例包括JTK-003/002(Japan Tobacco)及ISIS-14803(ISIS Pharmaceuticals)。

此處所謂“HIV抑制劑”一詞意謂有效抑制哺乳動物內

HIV生成及/或複製的劑(化合物或生物製劑)。此包括干擾HIV於哺乳動物內生成及/或複製所需的寄主或病毒機轉的劑，HIV抑制劑包括，例如，核苷抑制劑，非核苷抑制劑，蛋白酶抑制劑，融合抑制劑及整合酶抑制劑。

此處所謂“HAV抑制劑”一詞意謂有效抑制哺乳動物內HAV生成及/或複製的劑(化合物或生物製劑)。此包括干擾HAV於哺乳動物內生成及/或複製所需的寄主或病毒機轉的劑，HAV抑制劑包括A型肝炎疫苗，例如，Havrix[®] (GlaxoSmithKline), VAQTA[®] (Merck)及Avaxim[®] (Aventis Pasteur)。

此處所謂“HBV抑制劑”一詞意謂有效抑制哺乳動物內HBV生成及/或複製的劑(化合物或生物製劑)。此包括干擾HBV於哺乳動物內生成及/或複製所需的寄主或病毒機轉的劑。HBV抑制劑包括，例如，抑制HBV病毒DNA聚合酶或HBV疫苗的劑。HBV抑制劑的特定例包括Lamivudine (Epivir-HBV[®]), Adefovir Dipivoxil, Entecavir, FTC(Coviracil[®]), DAPD (DXG), L-FMAU (Clevudine[®]), AM365(Amrad), Ldt(Telbivudine), monoval-LdC(Valtorcitabine), ACH-126,443(L-Fd4C) (Achillion), MCC478(Eli Lilly), Racivir (RCV), Fluoro-L及D核苷，Robustaflavone, ICN 2001-3(ICN), Bam 205 (Novelos), XTL-001(CTL), Imino-Sugars (Nonyl-DNJ)(Synergy), HepBzyme；及免疫調節劑產物如：干擾素 α -2b, HE2000 (Hollis-Eden), Theradigm (Epimmune), EHT899 (Enzo Biochem), Thymosin α -1 (Zadaxin[®]), HBV DNA疫苗 PowderJect), HBV DNA疫苗 (Jefferson Center), HBV抗原 (OraGen), BayHep B[®] (Bayer), Nabi-HB[®] (Nabi)及 Anti-hepatitis B (Cangene)；及HBV疫苗

產物如：Engerix B, Recombivax HB, GenHevac B, Hepacare, Bio-Hep B, TwinRix, Comvax, Hexavac。

此處所謂“I類干擾素”意謂選自都結合於I型受體的干擾素。此包括天然的及合成的I類干擾素。I類干擾素的例包括 α -， β -， ω 干擾素，T-干擾素，共有區干擾素及脫唾液酸干擾素。

此處所謂“II類干擾素”意謂選自都結合於II型受體的干擾素。II類干擾素的例包括 γ -干擾素。

本發明醫藥組合物可含一或多種另外的活性劑，選自，例如，抗病毒劑，免疫調節劑，其他HCV NS3蛋白酶抑制劑，HCV生活週期中另一標的抑制劑，HIV抑制劑，HAV抑制劑及HBV抑制劑。此類劑的例見以上定義段內所提供者。

此類劑中較佳的例如下：

- 抗病毒劑：病毒唑及金鋼胺；
- 免疫調節劑：I類干擾素，II類干擾素及聚乙二醇型干擾素；
- HCV生活週期中另一標的抑制劑，其抑制標的選自：NS3解旋酶，HCV NS2/3蛋白酶或內部核糖體進入位點(IRES)；
- HIV抑制劑：核苷抑制劑，非核苷抑制劑，蛋白酶抑制劑，融合抑制劑及整合酶抑制劑；或
- HBV抑制劑：抑制HBV病毒DNA聚合酶的劑，或是HBV疫苗。

如前所述，可考慮合併治療，其中是將式(1)化合物，或其醫藥上可接受的鹽與至少一種另外的劑一起給予，此另外的劑是選自：抗病毒劑，免疫調節劑，另一種HCV NS3蛋白酶抑制劑，另一種HCV生活週期內標的抑制劑，HIV抑制劑，HAV抑制劑及HBV抑制劑。此類劑的例見上定義段所述。此等另外的劑可與本發明化合物合併製成單一醫藥劑形。或者是，此等另外的劑可作為多種劑形的一部分給予病人，例如，使用套件給予。此等另外的劑可於給予式(1)化合物，或醫藥上可接受的鹽，之前、同時、或之後給予病人。

此處所謂“治療”一詞意謂給予本發明化合物或組合物以減輕或排除C型肝炎疾病症狀及/或減少病人病毒載量。

此處所謂“預防”一詞意謂在個體曝露於病毒後但尚未出現症狀前，及/或在血中檢查出病毒前，給予本發明化合物或組合物。

較佳具體實施例

較佳是，上述式I化合物，其中 R^1 是羥基或 $\text{NH}\text{SO}_2\text{R}^{1A}$ ，其中 R^{1A} 是 (C_{1-6}) 烷基， (C_{3-7}) 環烷基或 $\{(\text{C}_{1-6})$ 烷基- (C_{3-7}) 環烷基 $\}$ ，其都是視需要以鹵，硝基或 $\text{O}-(\text{C}_{1-6})$ 烷基作1-3次之取代，或苯基，其是視需要以鹵，硝基， (C_{1-6}) 烷基或 $\text{O}-(\text{C}_{1-6})$ 烷基作1至3次之取代。

更佳是上述式I化合物，其中 R^1 是羥基或 $\text{NH}\text{SO}_2\text{R}^{1A}$ ，其中 R^{1A} 是甲基，乙基，環丙基，環丁基，環戊基，環丙基甲基，環己基乙基， CCl_3 ， CF_3 ，苯基，2-氟苯基或4-甲

基苯基。

最佳是如上界定的式 I 化合物，其中 R^1 是羥基或 $\text{NH}\text{SO}_2\text{R}^{1A}$ ，其中 R^{1A} 是甲基，環丙基， CF_3 或苯基。尤佳是 R^{1A} 為環丙基。

R^1 最佳是羥基。

R^2 最佳是環戊基。

本發明較佳具體實施例內包括所有表 1 所列式 I 化合物。

根據另一具體實施例，本發明組合物可尚含另一抗-HCV 劑。抗-HCV 劑的例包括 α -， β -， δ -， γ -或 ω -干擾素，病毒唑及金銅胺。

根據又一具體實施例，本發明組合物可尚含另一 HCV NS3 蛋白酶抑制劑。

根據又一具體實施例，本發明組合物可尚含 HCV 生活週期中其他標的抑制劑，包括，但不限於，解旋酶，NS2/3 蛋白酶或內部核糖體進入位點 (IRES)。

本發明醫藥組合物可經口，非經腸或經植入的儲存器給予。較佳是經口給予或以注射給予。本發明醫藥組合物可含任何習用的無毒醫藥載劑，助劑或載體。在某些情形下，調配物 pH 可用醫藥上可接受的酸、鹼或緩衝劑調整以增強已調配的化合物或其投送形式的安定性。此處所謂非經腸包括皮下，皮內，靜脈內，肌肉內，關節內，滑膜腔內，胸骨內，鞘膜內及病灶內注射或輸液技術。

此醫藥組合物可以是滅菌注射製劑形式，例如滅菌的可注射的水性或油性懸浮液。此等懸浮液可根據此技藝已知

技術用適宜的分散劑或濕潤劑(如吐溫80)及懸浮劑調配。

本發明醫藥組合物可以任何可接受的劑形經口給予，包括但不限於，膠囊，錠及水性懸浮液與溶液。如係用錠作經口給予，一般使用的載劑包括乳糖及玉米澱粉。也可加滑潤劑如硬脂酸鎂。以膠囊形式作經口給予時，可用的稀釋劑包括乳糖及乾玉米澱粉。在以水性懸浮液作經口給予時，是將活性成分與乳化劑或懸浮劑結合。如有必要，可加某些甘味劑及/或矯味劑及/或增色劑。

供上述調配物及組合物用的其他適宜的載劑或載體見於標準醫藥文件，例如“Remington's Pharmaceutical Sciences”, The Science and Practice of Pharmacy, 19th Ed., Mack Publishing Company, Easton, Penn., (1995)。

劑量水平是約每天每公斤體重0.01至約100毫克之間，較佳是約每天每公斤體重0.1至約50毫克此處所述蛋白酶抑制劑化合物用作單一治療以預防及治療由HCV引起的疾病。一般是以本發明醫藥組合物每天給予約1至約5次，或是以連續輸液給予。此種給予可用作慢性和急性治療。可與載劑物質合併製成單一劑形的活性成分的量可視要治療的病主及特定給予方式而變化。典型製劑可含約5%至約95%活性化合物(重量/重量)。較佳是此種製劑含約20%至約80%活性化合物。

精於此技藝者會了解到，可能需較上述劑量為低或高的劑量。特定病人所需的特定劑量及治療方案可取決於各種因素，包括所用特定化合物的活性，年齡，體重，一般健

康情況，性別，飲食，給予時間，排出速度，合用藥物，感染的嚴重性及感染過程，病人感染的情況及醫生的判斷。一般而言，治療是以較肽的適度劑量為小的劑量開始。所以，劑量是從小幅增加直至達適當效果。一般而言，化合物最需要是以產生抗病毒效果而不產生不良副作用的濃度給予。

當本發明組合物含式I化合物及一或多種其他治療劑或預防劑時，此化合物及另外的劑在一劑量內的含量約10至100%，較佳是單一治療方案所給予的劑量的約10至80%。

當此等化合物或其醫藥上可接受的鹽與醫藥上可接受的載劑一起調配時，所得組合物可活體內給予哺乳動物，如人，以抑制HCV NS3蛋白酶或治療或預防HCV病毒感染。此種治療也可以本發明化合物與其他的劑混合達成，此等劑包括，但不限於， α -， β -， δ -， ω -或 γ -干擾素，病毒唑及金鋼胺；其他HCV NS3蛋白酶抑制劑；其他HCV生活週期標的抑制劑，包括但不限於解旋酶，NS2/3蛋白酶，或內部核糖體進入位點(IRES)；或其混合物。此等另外的劑可與本發明化合物製成單一劑形。或者是，此等另外的劑可作為多劑形的一部分分別給予哺乳動物。

如果醫藥組合物只含本發明化合物作為活性成分，此法還包括給予該哺乳動物選自免疫調節劑，抗病毒劑，HCV NS3蛋白酶抑制劑，或其他HCV生活週期標的抑制劑如解旋酶，NS2/3蛋白酶或IRES的劑。此等另外的劑可在給予

本發明組合物之前、同時或之後給予哺乳動物。

此處所述式I化合物也可用作實驗室試劑。本發明化合物也可用以治療或預防物料的病毒污染，所以減少接觸此類物料(例如血液，組織，外科器材及衣物，實驗室儀器及衣物，以及血液收集設備及物料)的實驗室或醫務人員或病人的病毒感染的危險性。

此處所述式I化合物也可用作研究試劑。式I化合物也可用作正面對照以完成細胞為基礎的鑑定或活體外或活體內病毒複製鑑定。

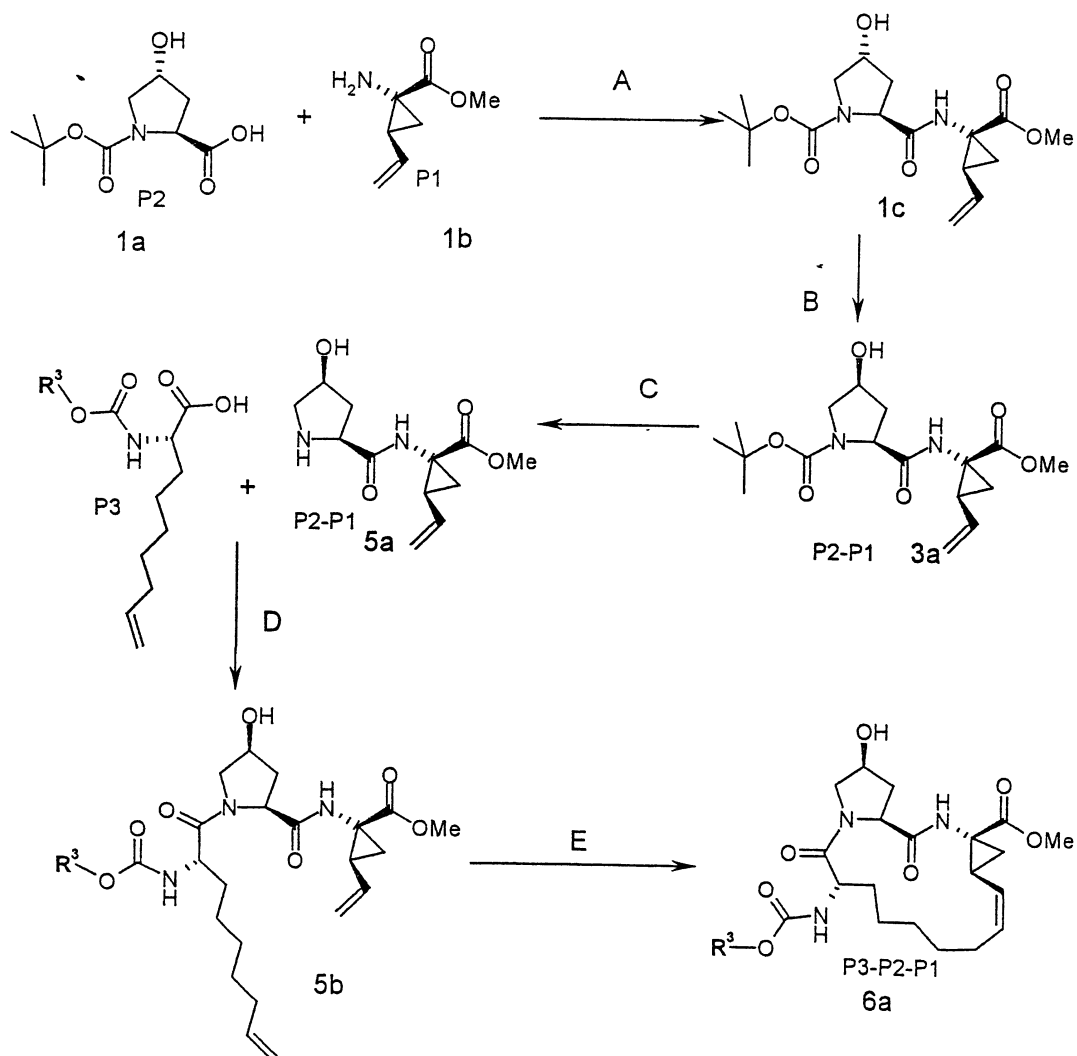
本發明其他詳情以下述實例說明，應了解到此等實例並非限制後附申請專利範圍。

方法論

一般而言，式I化合物及其中間體是以已知方法用適於反應物的條件製備。有數種方法揭示於WO 00/09543及WO 00/09558，今一併附上供參考。

下列方案說明用非環形中間體以已知方法製備式6a關鍵中間體。

方案 1



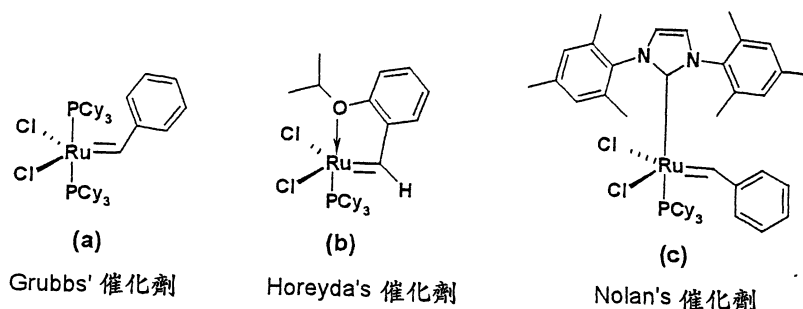
方案 1：

步驟 A，C，D：簡言之，P1，P2 及 P3 部分可用揭示於 WO 00/09543 及 WO 00/09558 的已知肽偶合技術鍵聯。

步驟 B：此步驟包括 4-羥基取代基構形的轉換。有數種方法，其中此種轉換是精於此技藝者所已知的。習用方法之一例是已知的 Mitsunobu 反應 (Mitsunobu Synthesis 1981,

January, 1-28; Rano et al. Tet. Lett. 1994, 36, 3779-3792; Krchnak et al. Tet. Lett. 1995, 36, 6193-6196)。

步驟 E：大環之生成可經由烯烴置換 (metathesis) 用 Ru-為基礎的催化劑進行，如 Miller, S.J.; Blackwell, H.E.; Grubbs, R.H. J. Am. Chem. Soc. 1996, 118, 9606-9614(a); Kingsbury, J.S.; Harrity, J.P.A.; Bonitatebus, P.J.; Hoveyda, A.H. J. Am. Chem. Soc. 1999, 121, 791-799 (b) and Huang, J.; Stevens, E.D.; Nolan, S.P.; Petersen, J.L.; J. Am. Chem. Soc. 1999, 121, 2674-2678 (c) 或如 WO 00/59929 內所述者。也應了解到，含其他過渡金屬元素的催化劑也可用於本發明。



之後，式 6a 關鍵中間體之轉化成本發明式 I 化合物於如下實例中詳述。

式 I 化合物，其中 R^1 是上述 $\text{NH}\text{SO}_2\text{R}^{1A}$ ，是用對應的式 I 之酸 (即 R^1 是羥基) 與適宜的式 $\text{R}^{1A}\text{SO}_2\text{NH}_2$ 之磺醯胺在有偶合劑之存在下於標準條件偶合製備。雖則可用一般習用的偶合劑，但發現 TBTU 及 HATU 是實用的。磺醯胺可由市場購得或可用已知方法製備。

實例

今以非限制性實例詳細說明本發明。其他特定合成或解

析方法見 WO 00/09543；WO 00/09558 及 WO 00/59929 及一起申請案 09/368,670，所有此等文件一併附上供參考。

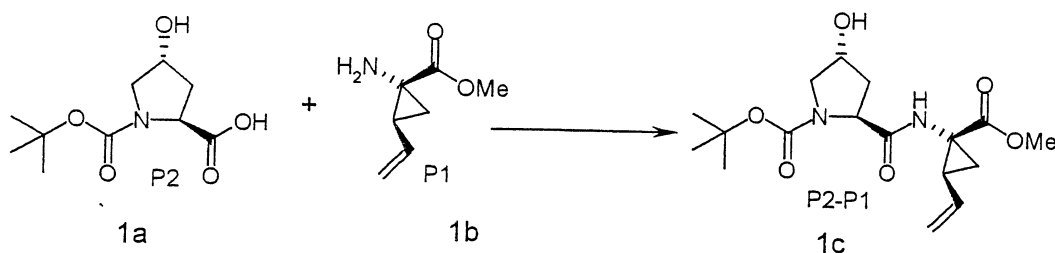
溫度以攝氏度表示。除非另有說明，溶液百分比表現重量/容積關係，溶液比表現容積/容積關係。核磁共振 (NMR) 譜以 Bruker 400 MHz 分光計記錄；化學化移 (δ) 以每百萬分之份報告，除非另有說明是指內氘化的溶劑。所有終化合物 (抑制劑) 的 NMR 譜以 DMSO- d_6 記錄。閃柱色層分析以二氧化矽膠 (SiO_2) 根據 Still 氏閃色層分析技術進行 (W.C. Still et al., J. Org. Chem., 1978, 43, 2923)。

實例中所用縮寫包括：Boc：第三-丁基氧基羰基 [$Me_3COC(O)$]；BSA：牛血清白蛋白；CHAPS：3-[(3-膽鹼胺基丙基)-二甲基胺基]-1-丙烷磺酸酯； CH_2Cl_2 =DCM：二氯甲烷；DEAD：二乙基氮二羧酸酯；DIAD：二異丙基氮二羧酸酯；DIPEA：二異丙基乙基胺；DMAP：二甲基胺基吡啶；DMF：N,N-二甲基甲醯胺；DMSO：二甲基亞砷；(S,S)-Et-DUPHOS Rh (COD)OTf：(+)-1,2-雙(2S,5S)-2,5-二乙基膦腴基)苯(細胞辛二烯)羅丁鎢(1)三氟甲烷磺酸鹽；EtOH：乙醇；EtOAc：醋酸乙酯；ESMS：電噴質譜；HATU：O-(7-氮雜苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基錄六氟磷酸鹽；HPLC：高效液體色層分析；MS：質譜；MALDI-TOF：Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight；FAB：Fast Atom Bombardment)；Me：甲基；MeOH：甲醇；R.T.：室溫 (18° 至 22°)；TBTU：2-(1H-苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基錄四氟硼酸鹽；TFA：三氟醋酸；THF：四氫呋喃；TLC：薄

層色層分析；Tris/HCl：參(羥基甲基)胺基甲烷鹽酸鹽。

實例 1

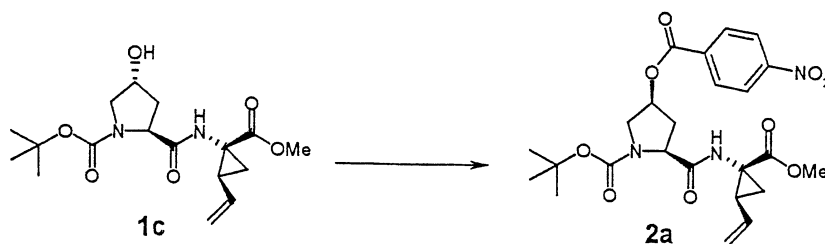
二肽 1c 之合成



將 Boc-羥基脯胺酸 1a (50.0 克，216 毫莫耳)，(1R,2S)-乙烯基-ACCA 鹽酸鹽 1b (42.25 克，238 毫莫耳)，TBTU (76.36 克，238 毫莫耳) 及 DIPEA (113 毫升，649 毫莫耳) 於 DMF (800 毫升) 內的混合物在氮氣下於室溫攪拌。3.5 小時後，蒸發溶劑，殘餘物用 EtOAc 萃取。萃取物用鹽酸 (10%)，飽和碳酸氫鈉及鹽水洗。然後將有機相於硫酸鎂上乾燥，過濾，蒸發，得油體。於高真空乾燥過夜 (18 小時) 乾燥後，得二肽 1c，為黃色泡沫 (72.0 克，94%，以 HPLC 測定純度 >95%)。

實例 2

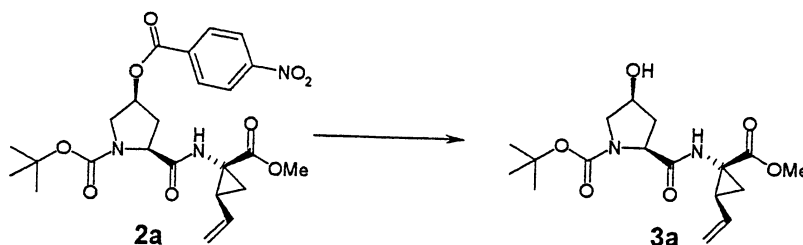
二肽 2a 之合成



將二肽 1c (72.0克, 203毫莫耳), 三苯基膦(63.94克, 243.8毫莫耳, 1.2當量)及4-硝基苯甲酸(41.08克, 245.8毫莫耳, 1.2當量)溶於無水THF(1.4公升)內。將此攪拌的溶液在氮氣下冷至0℃。然後用45分鐘滴加DEAD(38.4毫升, 244毫莫耳, 1.2當量), 任反應物升至室溫。4小時後, 蒸發溶劑, 將殘餘物分成四部分。每一部分都於細二氧化矽膠(10-40微米網眼, 柱直徑12公分, 柱長16公分)上用梯度2:1己烷/EtOAc至1:1己烷/EtOAc至純EtOAc作色層分析純化。得酯2a, 經蒸發溶劑及於70℃高真空乾燥1小時後為無定形白色固體(108.1克, 定量產出)。

實例 3

醇二肽 3a之合成

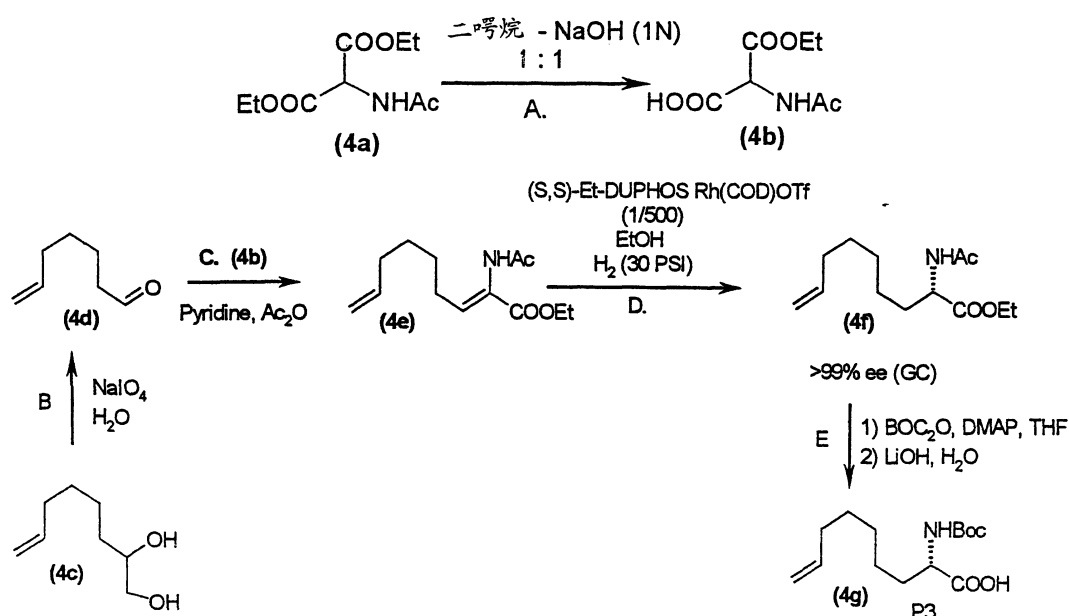


將硝基苯甲酯基酯 2a(108.1克, 203.1毫莫耳)溶於THF(1.0公升)內, 將所得溶液冷至0℃。然後快速加單水合氫氧化鋰(10.66克, 253.9毫莫耳)於水(225毫升)內的溶液, 此反應物於0℃攪拌30分鐘, 之後用鹽酸(1N, 50.8毫升)中和剩餘的鹼。再緩慢加酸至黃色褪去(7毫升)。然後將所得混合物蒸發, 殘餘物用EtOAc(3×150毫升)萃取。萃取物用飽和碳酸氫鈉(150毫升)及鹽水(150毫升)洗。有機相

於硫酸鎂上乾燥，用矽藻土過濾，蒸發。殘餘物於高真空乾燥過夜，得醇 3a，為無色泡沫(70.1克，98%，HPLC測定純度>99%)。

實例 4

(2S)-N-Boc-胺基-壬-8-烯酸(4g)之合成



步驟 A. 於市場上購得的二乙基 2-乙醯胺基丙二酸酯 4a (100克，0.46莫耳)於二噁烷(500毫升)內的溶液中滴加氫氧化鈉水溶液(1M，1當量，460毫升)，費時 30 至 45 分鐘。將所得混合物攪拌 16.5 小時，然後真空蒸發二噁烷。所得水溶液用三份 300 毫升的 EtOAc 萃取，用濃 HCl 酸化至 pH 1。任此溶液於冰水浴內結晶。待少許晶體出現後，混合物以超音波振動，出現大量沉澱。過濾，真空乾燥，得化合物 4b (62.52克，72%產出率)，為白色固體。

步驟 B. 將於 1 公升圓底燒瓶內的以磁力攪拌的商業上

可購得的 7-辛烯-1,2-二醇 4c (25 克, 0.173 莫耳) 及 H_2O (100 毫升) 乳液中加過碘酸鈉水溶液 (40.7 克, 0.190 莫耳, 1.1 當量, 於 475 毫升 H_2O 內), 費時 20 分鐘 (有少許放熱)。生成的混合物再於室溫攪拌 1 小時 (以 TLC 證實反應已完全)。然後將混合物倒入分離漏斗內, 由有機層分離出水層。水溶液用 NaCl 飽和, 傾出, 再一次分離有機部分。合併二次分離出的有機部分, 於硫酸鈉上乾燥, 用棉塞過濾 (於巴斯得滴管內), 得化合物 4d (15.135 克, 無色油體, 78% 產出率)。水溶液用 CH_2Cl_2 過濾, 用無水 MgSO_4 乾燥, 真空濃縮 (不加熱, 6-庚醛沸點 153°C) 又得一部分化合物 4d (1.957 克, 無色油體, 10% 產出率)。總產出率 88%。

步驟 C. 於固體 2-乙醯胺基丙二酸乙酯 4b (7.57 克, 40 毫莫耳) 內加 6-庚醛 4d (4.48 克, 40 毫莫耳) 於吡啶 (32 毫升, 10 當量) 內的溶液, 費時 1 分鐘。所得溶液於 10°C 浴內冷卻。費時 4 分鐘加醋酸酐 (12 毫升, 3.2 當量)。將所得有機溶液於室溫攪拌 3 小時, 加另一部分 2-乙醯胺基丙二酸乙酯 4b (2.27 克)。此混合物再於室溫攪拌 11 小時。然後加冰 (60 毫升), 將此溶液攪拌 1.5 小時, 此混合物再以 250 毫升水稀釋, 用二部分二乙醚萃取。此醚溶液用 1N HCl , 飽和 NaHCO_3 洗, 乾燥 (Na_2SO_4), 濃縮, 作閃色層分析 (EtOAc 40%/己烷), 得化合物 4e (4.8 克, 50% 產出率), 為淡黃色油體。

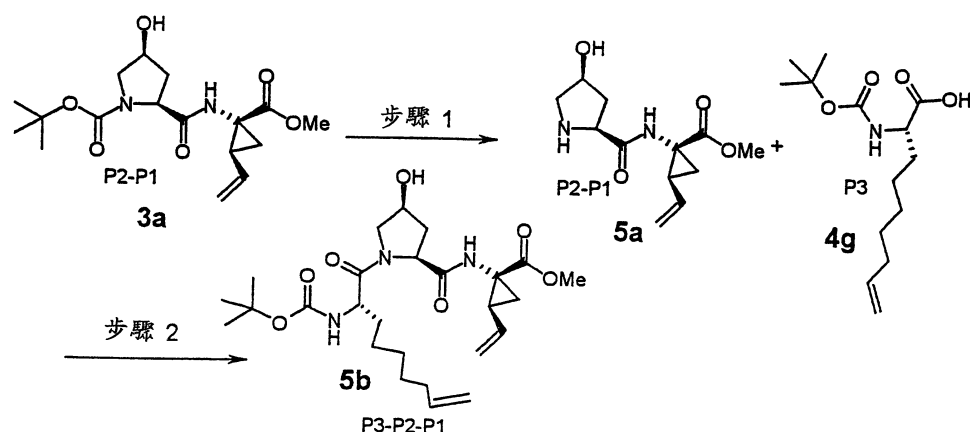
步驟 D. 於去氣 (以氫氣通入 30 分鐘) 的 Z-2-乙醯胺基-2,8-壬烯酸乙酯 4e (8.38 克, 35 毫莫耳) 於無水乙醇 (70 毫

升)內的溶液中加(S,S)-Et-DUPHOS Rh(COD)Otf (51毫克, 基質/催化劑=496)。將此混合物置於30磅/吋²氬下(4-真空-H₂循環後)於Parr搖動器上攪拌2小時。將所得混合物蒸發至乾得粗製化合物4f, 其用於下一步驟不必純化。

步驟E. 於粗製(S)-2-乙醯胺基-8-壬烯酸乙酯4f (7.3克, 30.3毫莫耳)於THF(100毫升)內的溶液中加Boc₂O (13.2克, 2當量)及DMAP(740毫克, 0.2當量)。此反應混合物於回流加熱2.5小時。然後蒸發大部分THF溶劑, 粗製混合物用CH₂Cl₂稀釋, 用1N HCl洗以除去DMAP。有機層再以飽和NaHCO₃水溶液萃取, 用無水Na₂SO₄乾燥, 真空濃縮。粗製產物以THF(50毫升)及水(30毫升)稀釋, 加LiOH.H₂O(2.54克, 2當量), 此混合物於室溫攪拌25小時(以TLC證實水解已完全)。將反應混合物真空濃縮除去大部THF溶劑, 用CH₂Cl₂稀釋。所得溶液用1N HCl洗, 用無水Na₂SO₄乾燥, 真空下濃縮。為除去少量雜質及過多的Boc₂O, 將粗製產物作閃色層分析純化(用溶劑梯度100%己烷-100% EtOAc作洗離劑)。得高純度標題化合物4g, 為淡黃色油體(5.82克, 71%產出率)。¹H NMR (DMSO, 400 MHz): δ 7.01 (d, J=8 Hz, 1H), 5.79 (tdd, Jt=6.7 Hz, Jd=17.0, 10.2 Hz, 1H), 5.00 (md, Jd=17.0 Hz, 1H), 4.93 (md, Jd=10.2 Hz, 1H), 3.83 (m, 1H), 2.00 (q, J=6.9 Hz, 2H), 1.65-1.5 (m, 2H), 1.38 (s, 9H), 1.35-1.21 (m, 6H)。

實例5

三肽5b之合成



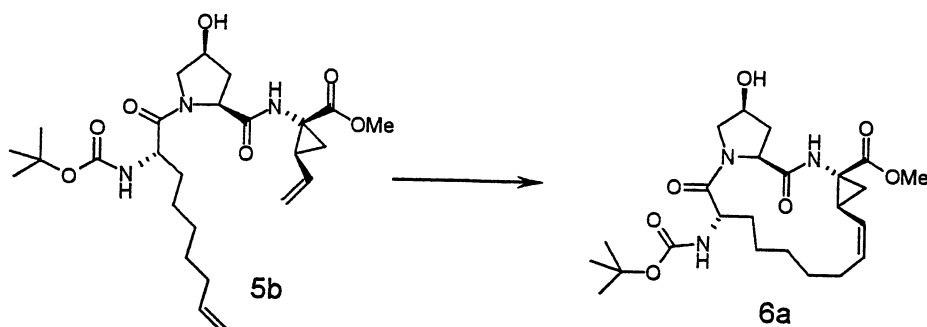
步驟 1：將氯化氫於二噁烷內的溶液 (4N) 加於 BocP2-P1 碎片 3a (5.32 克，15.0 毫莫耳) 內成為無色溶液。於室溫攪拌 1 小時後，蒸發溶劑，殘餘物置於高真空下 3 小時，製得化合物 5a 的鹽酸鹽，為無定形固體，原樣使用。

步驟 2：將 DIPEA (2.6 毫升，15 毫莫耳) 加於上面製備的 P1-P2 鹽酸鹽 (15 毫莫耳) 於無水 DCM (100 毫升) 內的混合物中，生成均質溶液。分別將 TBTU (5.30 克，16.5 毫莫耳，1.1 當量) 加於攪拌的 C9-接頭 4g (4.07 克，15.0 毫莫耳) 於無水 DCM (130 毫升) 內的溶液中，試劑部分溶解。加 DIPEA (2.6 毫升，15 毫莫耳)，10 分鐘後生成基本均質溶液。然後於此溶液內加 P1-P2 溶液，並加 DIPEA 至反應物呈鹼性 (pH > 8，石蕊試驗)。於氮氣下攪拌 5 小時後，蒸發溶劑，殘餘物用 EtOAc (2 × 250 毫升) 萃取，用稀鹽酸 (0.05N，400 毫升)，水 (400 毫升) 及飽和碳酸氫鈉 (400 毫升) 洗。然後將合併之有機相於硫酸鎂上乾燥，過濾，蒸發，得黃色漿體。此粗製產物於二氧化矽膠上作色層分析，用 6 : 1 EtOAc / 己烷至純 EtOAc 作洗離劑，得所需三肽，二烯 5b，為白色

泡沫 (5.88 克, 82%, HPLC 測定純度 >95%)。

實例 6

大環中間體 6a 之合成

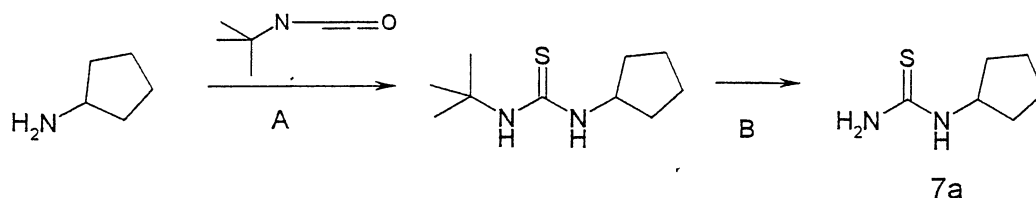


於二烯 5b (4.0 克, 7.88 毫莫耳) 於無水 DCM (800 毫升) 內的溶液內通入 Ar 2 小時脫氧。然後加固體 Hoveyda 氏催化劑 (262 毫克, 0.434 毫莫耳, 5.5 莫耳%), 將此反應物於 Ar 氣下回流。28 小時後, 將紅橘色溶液蒸發成無定形固體, 於二氧化矽膠上作柱色層分析純化。開始溶劑系統為 10% EtOAc 於 CH₂Cl₂ 內。一但由柱洗去催化劑後, 將溶劑換成純 EtOAc。由柱洗離催化劑可由其顏色證明。分離大環產物 6a, 為無色泡沫, 再將其溶於 CH₂Cl₂/己烷 (約 1:2) 內。蒸發溶劑, 得白色粉 (3.362 克, 89% 產出率)。

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 1.20-1.50 (m, 6H), 1.43 (s, 9H), 1.53 (dd, J=9.5&5.4, 1H), 1.61-1.70 (m, 1H), 1.76-1.90 (m, 2H), 2.05-2.26 (m, 4H), 2.45 (d, J=14.3, 1H), 3.67 (s, 3H), 3.71 (d, J=11.1, 1H), 3.90 (dd, J=11.1&4.3, 1H), 4.43-4.53 (m, 2H), 4.76 (d, J=8.6, 1H), 4.86 (bd, J=9.8, 1H), 5.20-5.23 (m, 2H), 5.57 (dt, J=7.0&9.8, 1H), 7.32 (bs, 1H)。

實例 7

硫脲 7 之製備

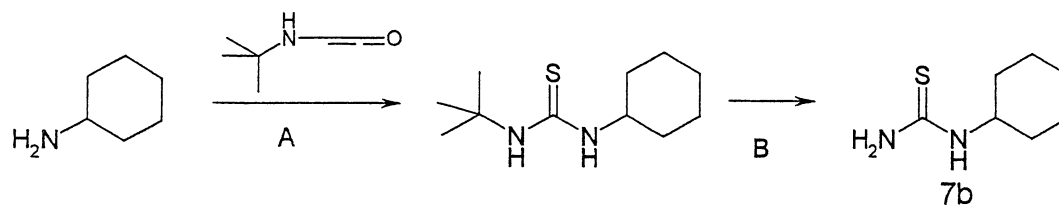
硫脲 7a 之合成：

於第三-異硫代氰酸丁酯 (5.0 毫升；39.4 毫莫耳) 於 DCM (200 毫升) 內的溶液中加環戊基胺 (4.67 毫升；47.3 毫莫耳)，再加 DIEA，此反應混合物於室溫攪拌 2 小時。此混合物以 EtOAc 稀釋，用 10% 檸檬酸水溶液 (2x)，飽和 NaHCO₃ (2x)，H₂O (2x) 及鹽水 (1x) 洗。將有機層於無水 MgSO₄ 上乾燥，過濾，蒸發，得 N-第三-丁基-N'-環戊基硫脲，為白色固體 (3.70 克；47% 產出率)。將此 N-第三-丁基-N'-環戊基硫脲 (3.70 克) 溶於濃 HCl (46 毫升) 內。所得暗黃色溶液於回流輕輕加熱。40 分鐘後，將反應混合物冷至室溫，再於冰內冷卻，以固體及飽和 NaHCO₃ 水溶液鹼化至 pH 9.5。將產物萃取入 EtOAc (3x) 內。合併之 EtOAc 萃取物用 H₂O (2x) 及鹽水 (1x) 洗。將有機層乾燥 (MgSO₄)，過濾，濃縮，得米色固體 (2.46 克粗製產物)。此粗製產物以己烷/EtOAc 95/5 研磨，經過濾後得 N-環戊基硫脲 7a，為白色固體 (2.38；90% 產出率)。

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ 7.58 (bs, 1H), 7.19 (bs, 1H), 6.76 (bs, 1H), 4.34 (bs, 1H), 1.92-1.79 (m, 2H), 1.66-1.55 (m, 2H), 1.55-1.30 (m, 4H)。MS; es⁺ 144.9(M+H)⁺, es⁻: 142.8(M-H)⁻。

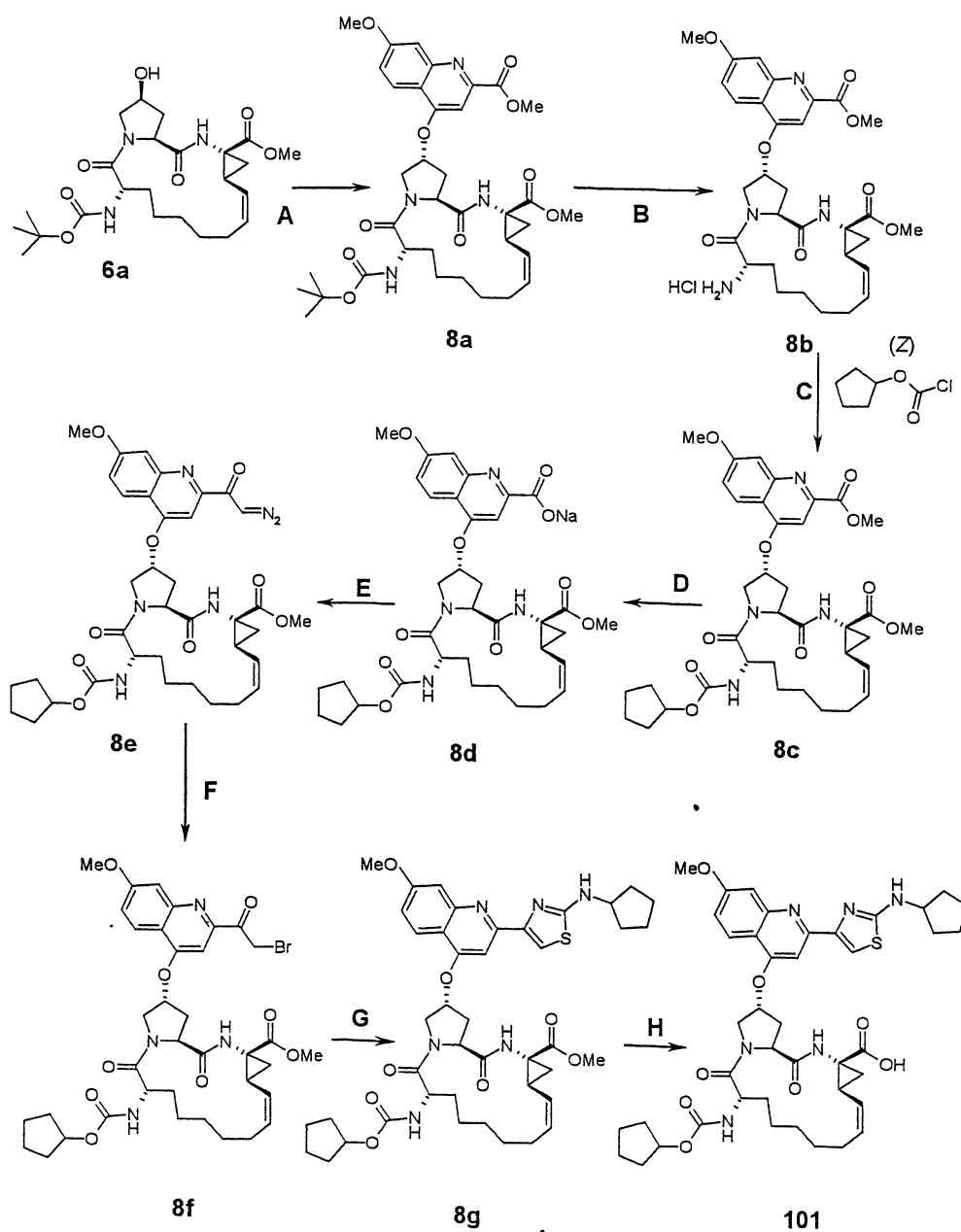
硫脲 7b 之製備

用上述方法使用商業上可購得的環己基胺代替環戊基胺，製得硫脲 7b



實例 8

化合物 101 之合成



步驟 A. 於大環中間體 6a (13.05 克, 27.2 毫莫耳, 1.0 當量), Ph_3P (14.28 克, 54.4 毫莫耳, 2.0 當量) 及 2-羧基甲氧基-4-羥基-7-甲氧基喹啉 (WO 00/09543; WO 00/09558 及 WO 00/59929) (6.67 克, 28.6 毫莫耳, 1.05 當量) 於 THF (450 毫升) 內的溶液中於 0℃ 費時 15 分鐘滴加 DIAD (10.75 毫升, 54.6 毫莫耳, 2.0 當量)。然後移去冰浴, 將反應混合物於室溫攪拌 3 小時。待起始物完全轉化成產物後, 真空蒸發溶劑, 殘餘物用 EtOAc 稀釋, 用飽和 NaHCO_3 (2x) 及鹽水 (1x) 洗, 有機層於無水硫酸鎂上乾燥, 過濾, 蒸發至乾。作閃色層分析後得純化合物 7a; 柱先用己烷/EtOAc (50:50) 洗, 再用 CHCl_3 /EtOAc (95:5) 洗除去 Ph_3PO 及 DIAD 副產物, 以 TLC 監測洗離雜質。最後用 CHCl_3 /EtOAc (70:30) 由柱洗離所需產物 8a。一般情形下色層分析步驟須重複 2-3 次後可得高純度化合物 8a, 為白色固體, 總產出率 68% (12.8 克, 99.5% 純度, 以 HPLC 測定)。

步驟 B. 於 Boc-保護的中間體 8a (1.567 克) 於 CH_2Cl_2 (15 毫升) 內的溶液中加 4N HCl 於二噁烷內的溶液 (12 毫升)。此反應混合物於室溫攪拌 1 小時。[如在反應到半途有黏稠膠體生成時, 再加 10 毫升 CH_2Cl_2] 在去保護完成時, 蒸發去溶劑至乾, 得黃色固體及糊樣物質。將此混合物溶於約 5% MeOH 於 CH_2Cl_2 內的溶液中, 再於真空下蒸發至乾, 得化合物 8b, 為黃色固體, 將其用於下一步驟, 不必純化。

步驟 C. 於環戊醇 (614 微升, 6.76 毫莫耳) 於 THF (15 毫升) 內的溶液中滴加光氣於甲苯內的溶液 (1.93M, 5.96 毫

升，11.502毫莫耳)，此混合物於室溫攪拌2小時生成環戊基氯甲酸酯試劑(z)。然後真空下蒸發去約半量溶劑。所餘淺黃色溶液藉加 CH_2Cl_2 (5毫升)稀釋，濃縮至原容積的半量，以確保已除去超量的光氣。將上述環戊基氯甲酸酯試劑進一步以THF (15毫升)稀釋，加於胺-2HCl鹽8b內。將此混合物在冰浴內冷至 0°C ，滴加 Et_3N 調整pH至約8.5-9，此反應混合物再於 0°C 攪拌1小時。然後用EtOAc稀釋混合物，用水(1x)，飽和 NaHCO_3 (2x)， H_2O (2x)及鹽水(1x)洗。有機層於無水 MgSO_4 上乾燥，過濾，真空蒸發，得黃琥珀色泡沫。以閃柱色層分析(用EtOAc內的30%己烷至20%己烷梯度溶劑洗離)純化，得二甲基酯8c，產出率80%(1.27克)，純度>93%。

步驟D. 將二甲基酯8c (1.17克)溶於THF/MeOH/ H_2O (20毫升，2:1:1比)內，加NaOH水溶液(1.8毫升，1N，1當量)。此反應混合物於室溫攪拌1小時，然後蒸發至乾，得鈉鹽8d，為白色固體(約1.66毫莫耳)。化合物8d直接用於下一步驟不必純化。

步驟E. 將粗製鈉鹽8d(1.66毫莫耳)溶於THF (17毫升)內，加 Et_3N ，此混合物於冰浴內冷至 0°C 。滴加異丁基氯甲酸酯(322微升，2.5毫莫耳)，此混合物於 0°C 攪拌75分鐘。然後加二氮甲烷(15毫升)，於 0°C 攪拌30分鐘，再於室溫攪拌1小時。真空下蒸發去大部溶劑，剩餘混合物用EtOAc稀釋，用飽和 NaHCO_3 (2x)， H_2O (2x)及鹽水(1x)洗，於無水 MgSO_4 上乾燥，過濾，真空蒸發，得化合物8e，為

黃色泡沫(1.2克, 約1.66毫莫耳)。此二氮酮中間體8e直接用於下一步驟不必純化。

步驟F. 將二氮酮8e(1.2克, 1.66毫莫耳)溶於THF (17毫升)內的溶液於冰浴內冷至0°C。滴加HBr水溶液(48%, 1.24毫升), 此反應混合物於0°C攪拌1小時。此混合物以EtOAc稀釋, 用飽和NaHCO₃(2x), H₂O(2x)及鹽水(1x)洗, 於無水MgSO₄上乾燥, 過濾, 蒸發至乾, 得 α -溴酮中間體8f, 為淺黃色泡沫(約1.657毫莫耳)。

步驟G. 於溴酮8f(2.51克, 3.27毫莫耳)於異丙醇(105毫升)內之溶液中加環戊基硫脲7a(565毫克, 3.92毫莫耳), 將此反應混合物置於預熱至70°C之油浴內並攪拌1.5小時。真空除去異丙醇, 將產物溶於EtOAc內。此溶液用飽和NaHCO₃, 水及鹽水洗, 有機層於無水MgSO₄上乾燥, 過濾, 蒸發, 得粗製產物8g(1.35克), 為淺黃色固體。此粗製產物以閃色層分析於二氧化矽膠上純化(1:1己烷/EtOAc), 得2.12毫克灰白色固體(80%產出率)。

步驟H. 將甲基酯8g(1.82克, 2.2毫莫耳)溶於THF/MeOH/H₂O(38/20/18毫升)內, 用LiOH.H₂O(935毫克, 22.3毫莫耳)皂化。此水解反應於室溫進行18小時。然後將溶液蒸發至乾, 得灰白色糊。此糊用EtOAc及鹽水稀釋。用1N HCl將混合物pH調整至6。分離EtOAc層, 水層用EtOAc萃取二次。合併之EtOAc層用去離子水(2x)及鹽水(1x)洗, 乾燥(MgSO₄), 蒸發, 得環形三肽化合物101, 為黃色固體(1.76克, 99%產出率)。

轉化成Na鹽

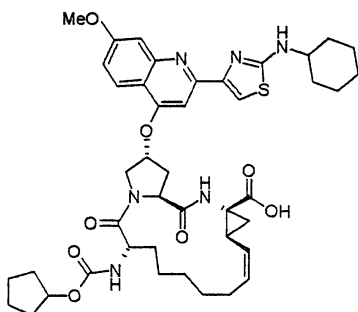
將化合物 8h (106 毫克, 0.132 毫莫耳) 溶於 MeOH (20 毫升) 內, 加 0.01N NaOH 溶液 (13.2 毫升)。此澄清黃色溶液用水稀釋, 凍乾, 得化合物 8h Na 鹽, 為黃白色不定形固體 (106 毫克, 97% 產出率)。

M.S. (電噴): 799.3 (M-H) - 801.4 (M+H) 反相 HPLC 同一性 (0.06% TFA; CH₃CN : H₂O): 99%。

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ 8.02(d, J=9.2 Hz, 1H), 7.90 (d, J=6.4 Hz, 1H), 7.76 (s, 1H), 7.44 (bs, 2H), 7.27 (d, J=1.9 Hz, 1H), 7.11 (d, J=7.0 Hz, 1H), 7.03 (d, J=9.2 Hz, 1H), 5.48 (dd, J=18.4, 9.9 Hz, 1H), 5.43 (bs, 1H), 5.15 (dt, J=17.8, 7.63 Hz, 1H), 4.70 (bs, 1H), 4.49-4.34 (m, 2H), 4.34-4.25 (m, 1H), 4.13-4.03 (m, 1H), 3.99-3.86 (m, 1H), 3.90 (s, 3H), 2.58-2.44 (m, 1H), 2.42-2.32 (m, 1H), 2.15-1.93 (m, 4H), 1.83-1.14 (m, 24H), 1.14-1.12 (m, 1H)。

實例 9

用實例 8 所述相同工序, 但於步驟 G 中用環己基硫脲 7b, 得化合物 102 鈉鹽。



化合物 102

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ 8.02(d, J=9.2 Hz, 1H), 7.86 (bs, 1H), 7.78 (d, J=7.3 Hz, 1H), 7.43 (s, 2H), 7.27 (d, J=2.2 Hz, 1H), 7.12 (d,

$J=6.9$ Hz, 1H), 7.03 (dd, $J=9.2, 1.9$ Hz, 1H), 5.57-5.40 (m, 1H), 5.40 (s, 1H), 5.26-5.17 (m, 1H), 4.70 (bs, 1H), 4.52-4.35 (m, 2H), 4.29-4.23 (m, 1H), 4.18-4.00 (m, 1H), 3.90 (s, 3H), 3.87-3.65 (m, 1H), 2.42-2.32 (m, 1H), 2.19-2.10 (m, 1H), 2.07-1.96 (m, 3H), 1.82-0.95 (m, 28H)。MS; es^+ : 815.4 (M+H)⁺。 es^- : 813.4 (M-H)⁻。

實例 10

NS3-NS4A 蛋白酶鑑定

此用以評估本發明化合物的酶鑑定見 WO 00/09543 及 WO 00/59929。

實例 11

以細胞為基礎的 HCV RNA 複製鑑定

細胞培養：

以前述方法 (Lohman et al., 1990, Science 285:110-113) 確立安定地保留亞基因組 HCV 複製子的 Huh7 細胞，並定為 S22.3 細胞系 (WO 02/052015)。將 S22.3 細胞保留於 Dulbecco's Modified Earle 培養基 (DMEM) 內，此培養基內加有 10% FBS 及 1 毫克/毫升新黴素 (標準培養基)。鑑定期間，使用加有 10% FBS 的 DMEM 培養基，內含 0.5% DMSO，但不含新黴素 (鑑定培養基)。加化合物前 16 小時，將 S22.3 細胞用胰蛋白酶消化，並用標準培養基稀釋至 50000 細胞/毫升。取 200 微升 (10000 個細胞) 分布於 96 凹碟的每一凹內。然後將碟於 37°C 在 5% CO₂ 下培養至第二天。

試劑及物料：

產物	公司	目錄編號	儲存
DMEM	Wisent Inc.	10013CV	4°C
DMSO	Sigma	D-2650	室溫
Dulbecco's PBS	Gibco-BRL	14190-136	室溫
胎牛血清	Bio-Whittaker	14-901F	-20°C/4°C
新黴素(G418)	Gibco-BRL	10131-027	-20°C/4°C
胰蛋白酶-EDTA	Gibco-BRL	25300-054	-20°C/4°C
96凹的碟	Costar	3997	室溫
PVDF 0.22微米過濾器	Millipore	SLGV025LS	室溫
深凹滴定碟 聚丙烯	Beckman	267007	室溫

試驗化合物之製備

將10微升試驗化合物(於100% DMSO內)加於2毫升鑑定培養基內，使DMSO終濃度為0.5%，此溶液以超音波振動15分鐘，用0.22微米 Millipore Filter Unit過濾。將900微升移入聚丙烯深凹滴定碟之A排。B至H排含400微升整數份的鑑定培養基(含0.5% DMSO)，用以藉將400微升由一排移至另一排(H排不含化合物)作系列稀釋(1/2)。

試驗化合物用於細胞

由含S22.3細胞的96凹的碟吸出細胞培養物。將有適宜稀釋的試驗化合物的175微升鑑定培養基由含化合物的碟的每一凹轉移至細胞培養物碟每一對應凹(H排用作“無抑制對照”)。將細胞培養碟於37°C在5% CO₂下培養72小時。

總細胞RNA之萃取

培養72小時後，用RNeasy 96套件(Qiagen[®], RNeasy Handbook, 1999)由96凹碟的S22.3細胞萃取總細胞RNA。簡言之，由細胞完全取出鑑定培養基，加含143 mM β -硫氫基乙醇的

100 微升 RLT 緩衝液 (Qiagen®) 於 96 凹細胞培養碟的每一凹內。將此微碟 (microplate) 輕輕搖動 20 秒。然後將 100 微升 70% 乙醇加於每一微碟凹內，藉吸管混合。取出溶胞產物，用於 RNeasy 96 (Qiagen®) 碟的凹，此碟係置於 Qiagen® Square-Well Block 的頂部。用膠帶將 RNeasy 96 碟密封，將有 RNeasy 96 凹碟的 Square-Well Block 載入固定器內，置於 4K15C 離心轉頭 (rotor bucket) 上。將樣品於室溫以 6000 轉/分鐘 (約 5600 x g) 離心 4 分鐘。由碟上除去膠帶，RNeasy 96 碟的每一凹內加 0.8 毫升 Buffer RW1 (Qiagen® RNeasy 96 套件)。再用新膠帶密封 RNeasy 96 碟，於室溫以 6000 轉/分鐘離心 4 分鐘。將 RNeasy 96 碟置於另一清潔的 Square-Well Block 頂上，除去膠帶，於 RNeasy 96 碟的每一凹內加 0.8 毫升 Buffer RPE (Qiagen® RNeasy 96 套件)。再用新膠帶密封 RNeasy 96 碟，於室溫以 6000 轉/分鐘離心 10 分鐘。除去膠帶，將 RNeasy 96 碟置於含 1.2 毫升收集微管的支架頂端。藉加 50 微升無 RNase 的水於每一凹內洗離 RNA，用新膠帶將碟密封，於室溫培養 1 分鐘。然後將碟於室溫以 6000 轉/分鐘離心 4 分鐘。再用第二容積 50 微升無 RNase 的水重複此一洗離步驟。將含總細胞 RNA 的微管存於 -70°C。

總細胞 RNA 之定量

用 RiboGreen® RNA 定量套件 (Molecular Probes®) 於 STORM® 系統 (Molecular Dynamics®) 上定量 RNA。簡言之，將 RiboGreen 試劑於 TE (10 mM Tris-HCl pH=7.5, 1 mM EDTA) 內稀釋 200 倍。一般是，將 50 微升試劑用 10 毫升 TE 稀釋。將核糖體 RNA

標準曲線於 TE 內稀釋至 2 微克 / 毫升，再將預定量 (100，50，40，20，10，5，2 及 0 微升) 的核糖體 RNA 溶液移入新 96 凹碟 (COSTAR #3997) 內，再用 TE 將容積加至 100 微升。一般而言，96 凹碟的第一列用於標準曲線，其他的凹用於要定量的 RNA 樣品。將要定量的 10 微升每一 RNA 樣品移至 96 凹碟的對應的凹，加 90 微升 TE。於 96 凹碟的每一凹內加一容積 (100 微升) 稀釋的 RiboGreen 試劑，於室溫培養 2 至 5 分鐘，避光 (200 微升終容積內的 10 微升 RNA 樣品產生 20 X 稀釋)。每一凹的螢光強度用 STORM[®] 系統 (Molecular Dynamics[®]) 測定。以已知量的核糖體 RNA 為基礎製出標準曲線及生成的螢光強度。由標準曲線及 20X 稀釋校對測出實驗樣品的 RNA 濃度。

試劑及物料

產物	公司	目錄#	儲存
DEPC	Sigma	D5758	4°C
EDTA	Sigma	E5134	室溫
Trizma-Base	Sigma	T8524	室溫
Trizma-HCl	Sigma	T7149	室溫
收集管條	Qiagen	19562	室溫
Ribogreen RNA 定量套件	Molecular Probe	R11490	-20°C
RNeasy 96 套件	Qiagen	74183	室溫
Square-Well Blocks	Qiagen	19573	室溫

真實時間 R.T.-PCR

真實時間 R.T.-PCR 是用 TaqMan EZ R.T.-PCR 套件 (Perkin-Elmer Applied Biosystems[®]) 於 ABI Prism 7700 Sequence Detection System 完成。用類似前述技術 (Martell et al., 1999, J. Clin. Microbiol. 37:327-332) 的 Taqman 技術 (Roche Molecular

Diagnostics System) 使 R.T.-PCR 適合於 HCV RNA 的 5' IRES 定量。此系統利用 AmpliTaq DNA 聚合酶的 5'-3' 溶核活性。簡言之，此法利用雙重標記的螢光雜交探針 (PUTR Probe)，此探針特別使 PCR 引物 (引物 8125 及 7028) 間的模板退火。探針的 5' 端含螢光報告劑 (6-羧基螢光素 [FAM])，其 3' 端含螢光熄滅劑 (6-羧基四甲基羅丹明 [TAMRA])。完整雜交探針上的熄滅劑抑制 FAM 報告劑的發射光譜。雜交探針的核酸酶降解釋出報告劑，導致螢光射出的增加。ABI Prism 7700 序列測定器在 PCR 放大過程中連續測定螢光射出的增加，致使放大的產物直接與信號成正比。於反應早期在代表產物累積的對數相點分析放大圖。代表已界定出的伴有 PCR 產物指數增長的螢光信號增加測定閾的點界定為循環閾 (C_T)。 C_T 值與輸入的 HCV RNA 量成反比；這樣，在相同 PCR 條件下，HCV RNA 的起始濃度越高， C_T 越低。藉將 C_T 與已知的 HCV RNA 每一濃度標準稀釋相比製成曲線圖即可用 ABI Prism 7700 測定系統自動製成標準曲線。

將標準曲線的參考樣品置於每一 R.T.-PCR 碟上。活體外合成 HCV 複製 RNA (藉 T7 轉錄)，純化，並以 OD_{260} 定量。考慮及 1 微克 RNA = 2.15×10^{11} RNA 拷貝，作稀釋以求有 10^8 ， 10^7 ， 10^6 ， 10^5 ， 10^4 ， 10^3 或 10^2 RNA 拷貝 / 5 微升。每一稀釋中也加總細胞 Huh-7 RNA (50 毫微克 / 5 微升)。將 5 微升每一參考標準 (HCV 複製子 + Huh-7 RNA) 與 45 微升 Reagent Mix 合併，用於真實時間 R.T.-PCR 反應。

確立實驗樣品的真實時間 R.T.-PCR 反應，此等實驗樣品

已於 RNeasy 96-凹碟上藉以 5 微升每一總細胞 RNA 樣品與 45 微升 Reagent Mix 合併純化。

試劑及物料：

產物	公司	目錄#	儲存
TaqMan EZ R.T.-PCR Kit	PE Applied Biosystems	N808-0236	-20°C
MicroAmp Optical Caps	PE Applied Biosystems	N801-0935	室溫
MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate	PE Applied Biosystems	N801-0560	室溫

試劑混合物製備：

成分	一個樣品容積 (微升)	一個碟容積(微升) (91個樣品+死容積)	終濃度
無Rnase水	16.5	1617	
5X TaqMan EZ緩衝液	10	980	1X
Mn (OAc) ₂ (25 mM)	6	588	3 mM
dATP(10 mM)	1.5	147	300 μM
dCTP(10 mM)	1.5	147	300 μM
dGTP(10 mM)	1.5	147	300 μM
dUTP(20 mM)	1.5	147	600 μM
Forward Primer (10 μM)	1	98	200 nM
Reverse Primer (10 μM)	1	98	200 nM
PUTR探針(5 μM)	2	196	200 nM
rTth DNA聚合酶 (2.5 U/微升)	2	196	0.1 U/微升
AmpErase UNG (1U/微升)	0.5	49	0.01 U/微升
總容積	45	4410	

正向引物序列 (SEQ ID NO. 1): 5'-ACG CAG AAA GCG TCT AGC
CAT GGC GTT AGT-3'

反向引物序列 (SEQ ID NO. 2): 5' TCC CGG GGC ACT CGC AAG
CAC CCT ATC AGG-3'

註：此等引物放大 HCV 5' 未翻譯區內的 256-nt。

PUTR 探針序列 (SEQ ID NO. 3): 6FAM-TGG TCT GCG GAA CCG
GTG AGT ACA CC-TAMRA

無模板對照 (NTC)：每一碟上使用 4 個凹作為“NTC”。於此等對照凹內加 5 微升水代替 RNA。

熱循環條件：

50°C	2 分鐘		
60°C	30 分鐘		
95°C	5 分鐘		
	95°C	15 秒	} 2 循環
60°C	1 分鐘		
	90°C	15 秒	} 40 循環
60°C	1 分鐘		

R.T.-PCR 反應終了後，數據分析需設定 PCR 碟的熾螢光信號，藉將 Ct 值與每一參考反應所用的 RNA 拷貝數製圖構成標準曲線。供鑑定樣品取得的 Ct 值用以插入由標準曲線取得的 RNA 拷貝數。

最後，將 RNA 拷貝數正常化 (以由細胞培養凹萃取的總 RNA 之 RiboGreen RNA 定量為基礎) 並以基因組當量 / 微克總 RNA [ge/μg] 表達。

由細胞培養碟每一凹得到的 RNA 拷貝數 [g.e./μg] 是在抑制劑各種濃度的複製 HCV RNA 量的測定。抑制 % 是以如下方程式計算：

$$100 - \left[\left(\frac{[g.e./\mu g \text{ inh}]}{[g.e./\mu g \text{ ct1}]} \right) \times 100 \right]$$

將適合 Hill 模型的非線性曲線使用於抑制-濃度數據，用 SAS 軟體 (Statistical Software System; SAS Institute, Inc. Cary, N.C.) 計算 50% 有效濃度 (EC_{50})。

實例 12

特異性鑑定

用於評估此化合物選擇性的特異性鑑定揭示於 WO 00/09543。

實例 13

藥物動力學性質

本發明化合物也有良好藥物動力學性質，如於鼠在經口投送 5 毫克/公斤後於 1 小時及 2 小時可測出有意義的血漿含量。

更明顯的是，下述鑑定，活體內經口吸收篩檢，用以測定於鼠經口給予後試驗化合物的血漿含量：

材料及方法：

1. 用以集中化合物的方法 (“彈夾選擇”)：

要裝入“彈夾”的化合物的選擇是基於其構造的相似性及物理化學性質。確立可用於所有選擇的化合物的固體相萃取方法。以起始試驗為基礎，將每一化合物送入鼠血漿，並以 HPLC 或 /HPLC/MS 於 $0.5 \mu M$ 濃度測定其停滯時間，離子質量，並以 HPLC 及 /或 HPLC/MS 測定出的各化合物間可能的分離作為基礎將 3-4 個化合物裝入“彈夾”。

2. 口服載體及化合物製備：

每一“彈夾”含 3-4 種化合物，每一化合物為 5 或 4 毫克/公

斤。彈夾可製成 0.5% 的水性甲基纖維素及 0.3% 聚氧乙烯 (20) 山梨糖酮單油酸鹽 (吐溫 80) 內的懸浮液。投藥容積為 10 毫升/公斤，經由口服用管。

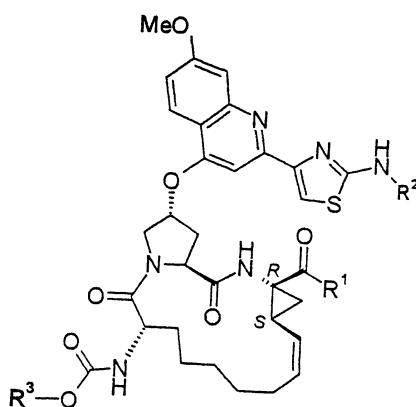
3. 投藥及血漿抽樣：

將 Male Sprague Dawley 鼠於各自籠內空腹過夜，但可喝 10% 葡萄糖水溶液。給鼠投送每種“彈夾”。投藥後 1 及 2 小時由 2 隻鼠採取血漿樣品 (約 1 毫升)，集中備萃取及分析。

4. 化合物萃取及分析：

以固體相萃取方法萃取每一彈夾內的投藥後 1 及 2 小時所取血漿樣品，空白血漿，含所有化合物各 $0.5 \mu\text{M}$ 的空白血漿。以 HPLC 及 HPLC/MS 分析樣品作為比較。以 $0.5 \mu\text{M}$ 濃度標準評估血漿濃度。

表 1



Cpd#	R ¹	R ²	R ³	MS (M-H)-
101	OH	環戊基	環戊基	799.3
102	OH	環己基	環戊基	813.4
103	NH-SO ₂ - 環丙基	環戊基	環戊基	

在以本發明化合物評估上述酶及細胞為基礎的鑑定

時，發現此等化合物具高活性。更特定地說，於NS3-NS4A蛋白酶鑑中此等化合物之 IC_{50} 低於 $0.01\mu M$ ，於以細胞為基礎的HCV RNA鑑定中其 EC_{50} 低於 $0.01\mu M$ 。

在此等化合物作特異性評估時，發現式I化合物之選擇性在於其於人白血球彈性蛋白酶及組織蛋白酶B鑑定中無明顯抑制性。

在此等化合物以鼠作藥物動力學鑑定評估時，於Methocel:Tween20[®](0.5%:0.3%)內5毫克/公斤的劑量即產生出乎意料的良好血漿濃度。化合物101及102之曲線下面積(AUC)分別為16及18 μM -小時，而與其最接近的類似物之AUC為0.8至4.5 μM -小時。此種鼠血漿內化合物吸收量的顯著增加使此等化合物作為經口給予的有效藥物令人發生特別興趣。

(43)

序列表

<110> BOEHRINGER INGELHEIM (CANADA) LTD.

<120> MARCROCYCLIC PEPTIDES ACTIVE AGAINST THE
HEPATITIS C VIRUS

<130> 13/092

<140> 092101813

<141> 2003-01-28

<150> 2,369,711

<151> 2002-01-30

<160> 3

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 正向引物

<400> 1
acgcagaaag cgtctagcca tggcgtagt

<210> 2

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 反向引物

<400> 2
tcccggggca ctcgcaagca ccctatcagg

<210> 3

<211> 26

<212> DNA

<213> 人工序列

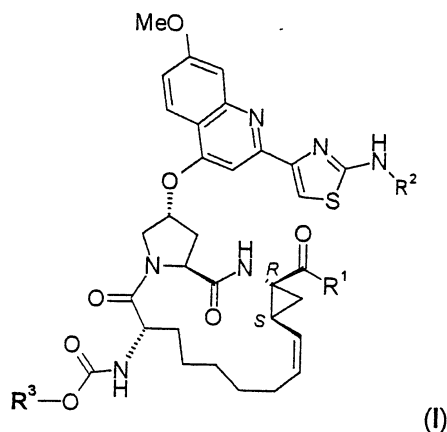
<220>

<223> PUTR 探針

<400> 3
tggctctgcgg aaccggtgag tacacc

肆、中文發明摘要

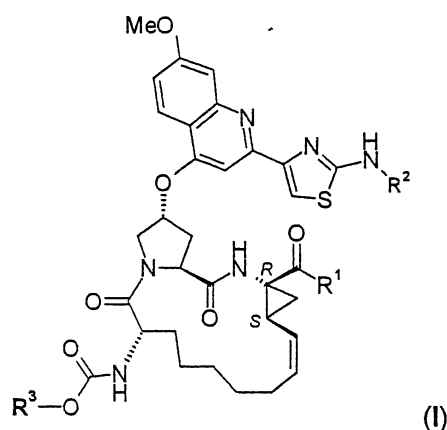
式 (I) 化合物：



其中 R^1 是羥基或 NHSO_2R^{1A} ；其中 R^{1A} 是 (C_{1-8}) 烷基， (C_{3-7}) 環烷基或 $\{(C_{1-6})$ 烷基 $-(C_{3-7})$ 環烷基 $\}$ ，其視需要以鹵，氰基，硝基， $\text{O}(C_{1-6})$ 烷基，鹽胺基，胺基或苯基作 1 至 3 次之取代，或 R^{1A} 是 C_6 或 C_{10} 芳基，其視需要以鹵，氰基，硝

伍、英文發明摘要

Compounds of formula I:



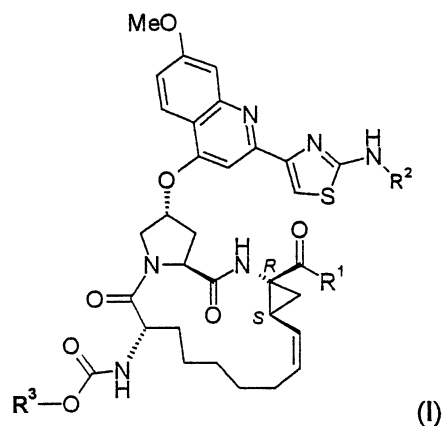
wherein R^1 is hydroxy or NHSO_2R^{1A} wherein R^{1A} is (C_{1-8}) alkyl, (C_{3-7}) cycloalkyl or $\{(C_{1-6})$ alkyl $-(C_{3-7})$ cycloalkyl $\}$, which are all optionally substituted from 1 to 3 times with halo, cyano, nitro, $\text{O}(C_{1-6})$ alkyl, amido, amino or phenyl, or R^{1A} is C_6 or C_{10} aryl which

基，(C₁₋₆)烷基，O(C₁₋₆)烷基，鹼胺基，胺基或苯基作1至3次之取代；R²是(C₅₋₆)環烷基及R³是環戊基；或其醫藥上可接受的鹽，可用作HCV NS3蛋白酶抑制劑。

is optionally substituted from 1 to 3 times with halo, cyano, nitro, (C₁₋₆)alkyl, O(C₁₋₆)alkyl, amido, amino or phenyl; R² is (C₅₋₆)cycloalkyl and R³ is cyclopentyl; or a pharmaceutically acceptable salt thereof, useful as inhibitors of the HCV NS3 protease.

拾、申請專利範圍

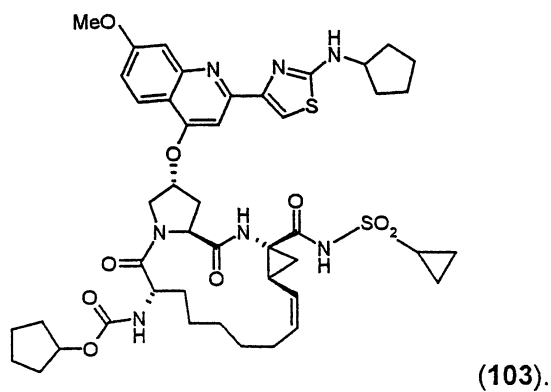
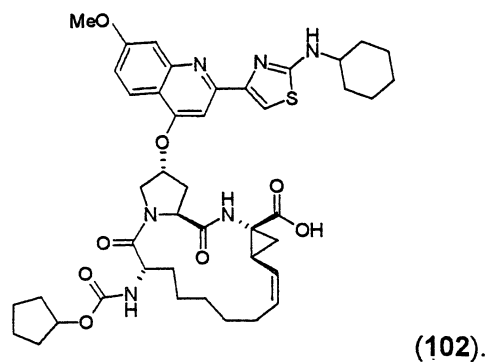
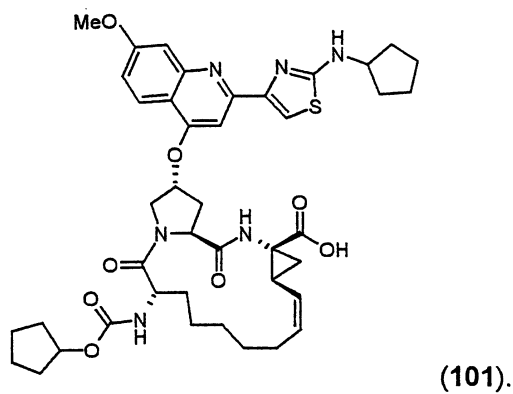
1. 一種式 I 化合物：



其中 R¹ 是羥基或 NHSO₂R^{1A}；其中 R^{1A} 是 (C₁₋₈) 烷基，(C₃₋₇) 環烷基或 {(C₁₋₆) 烷基-(C₃₋₇) 環烷基}，其均視需要以鹵，氰基，硝基，O(C₁₋₆) 烷基，鹽胺基，胺基或苯基作 1 至 3 次之取代，或 R^{1A} 是 C₆ 或 C₁₀ 芳基，其視需要以鹵，氰基，硝基，(C₁₋₆) 烷基，O(C₁₋₆) 烷基，鹽胺基，胺基或苯基作 1 至 3 次之取代；R² 是 (C₅₋₆) 環烷基及 R³ 是環戊基；或其醫藥上可接受的鹽。

2. 根據申請專利範圍第 1 項之化合物，其中 R¹ 是羥基或 NHSO₂R^{1A}，其中 R^{1A} 是 (C₁₋₆) 烷基，(C₃₋₇) 環烷基或 {(C₁₋₆) 烷基-(C₃₋₇) 環烷基}，其均視需要以鹵，硝基或 O(C₁₋₆) 烷基作 1 至 3 次之取代，或苯基其係視需要以鹵，硝基，(C₁₋₆) 烷基或 O(C₁₋₆) 烷基作 1 至 3 次之取代。
3. 根據申請專利範圍第 1 或 2 項之化合物，其中 R¹ 是 NHSO₂R^{1A}，其中 R^{1A} 是甲基，乙基，環丙基，環丁基，環戊基，環丙基甲基，環己基乙基，CCl₃，CF₃，苯基，

- 2-氟苯基或4-甲基苯基。
4. 根據申請專利範圍第1或2項之化合物，其中 R^1 是羧基。
5. 根據申請專利範圍第1或2項之化合物，其中 R^2 是環戊基。
6. 根據申請專利範圍第1或2項之化合物，其是選自由式101，102及103所構成的群：

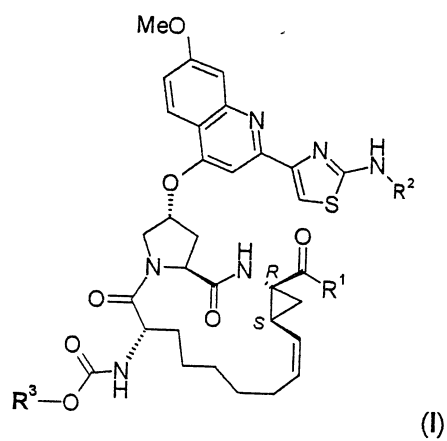


7. 一種醫藥組合物，其含抗C型肝炎病毒有效量的根據申請專利範圍第1或2項之式I化合物或其醫藥上可接受的鹽，及與其混合的醫藥上可接受的載劑介質或助劑。
8. 根據申請專利範圍第7項之醫藥組合物，其尚含治療有效量的一或多種其他抗-HCV劑。
9. 根據申請專利範圍第8項之醫藥組合物，其中該其他抗-HCV劑是選自： α -干擾素或聚乙二醇化的 α -干擾素。
10. 根據申請專利範圍第8或9項之醫藥組合物，其中該其他抗-HCV劑是病毒唑。
11. 根據申請專利範圍第8或9項之醫藥組合物，其中該其他抗-HCV劑是選自如下的抑制劑：解旋酶，NS2/3蛋白酶及內部核糖體進入位(IRES)。
12. 根據申請專利範圍第1或2項之式I化合物，或其醫藥上可接受的鹽，其係用於治療或預防C型肝炎病毒之感染。
13. 根據申請專利範圍第1或2項之式I化合物在製造藥物以供治療或預防C型肝炎病毒感染上的用途。
14. 一種零組件套件供製造藥物以治療或預防C型肝炎病毒感染，其包括二部分：
 - (a) 其中之一包括至少一種根據申請專利範圍第1至2項之化合物；及
 - (b) 其他部分包括一或多種抗HCV劑。

陸、(一)、本案指定代表圖為：第_____圖

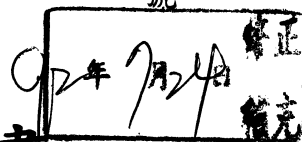
(二)、本代表圖之元件代表符號簡單說明：

柒、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：



(此處由本局於收
文時黏貼條碼)

(92)理專化 2730 字第 21486 號



專利補充、修正申請書

(本申請書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※案 由：21000；21002；24010；24012

申請案號：○九二一○一八一三

申請補充修正日期：中華民國九十二年七月二十四日

依據：貴局九十二年五月二日(九二)智專一(二)15121 字第○九二四○七八三七九○號函辦理。

壹、專利名稱：類別：☒發明 ☐新型 ☐新式樣

「具有抗 C 型肝炎病毒活性之大環肽

MACROCYCLIC PEPTIDES ACTIVE AGAINST THE HEPATITIS C VIRUS」

貳、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)(簽章) ID：

加拿大商百靈佳殷格翰有限公司

BOEHRINGER INGELHEIM (CANADA) LTD.

代表人：(中文/英文)(簽章)

路易斯 G. 柏尼爾/LOUISE G. BERNIER

參、專利代理人：

姓 名：陳 長 文 律 師 (蓋章)

證書字號：台代字第 1117 號

事務所地址：台北市敦化北路二○一號七樓

電話/傳真/手機：(02)2715-3300/(02)2718-8497

連絡人(電話分機)：分機 2730

E-MAIL：attorneys@leeandli.com



ID：A100743645

肆、規費：

(無)

伍、附送書件：

中文說明書第 7、10 及 11 頁替換頁各乙式三份。

陸、補充、修正說明事項：

申請人謹遵 貴局九十二年五月二日來函指示，修正本案中文說明書使其符合專利法施行細則第十五條所規定之格式要求。

第 092101813 號專利申請案
中文說明書替換頁(92 年 7 月)

(1)

玖、發明說明

(發明說明應敘明：發明所屬之技術領域、先前技術、內容、實施方式及圖式簡單說明)

技術領域

本發明係關於一類化合物，其合成方法，組合物及治療 C 型肝炎病毒 (HCV) 感染的方法。具體地說，本發明提供新穎肽類似物，含此類似物的醫藥組合物及使用此類似物治療 HCV 感染的方法。

先前技術

C 型肝炎病毒 (HCV) 全世界上都是輸血後及社會上獲得的非-A非-B肝炎的主要病因劑。據估計，世界上有超過二億人受此病毒感染。有高百分比的帶病毒者變成慢性感染，其中多數發展成慢性肝病，即所謂慢性 C 型肝炎。而這一組又成為嚴重肝疾病如肝硬化，肝細胞癌及導至死亡的肝病的高危險群。

HCV 確立病毒抗性的機轉及導致慢性肝病高發生率的原因現尚不完全明瞭。現尚不知 HCV 如何與病主免疫系統互動及避開主免疫系統。此外，有關避免 HCV 感染及疾病的細胞及體液免疫反應詳情現也尚未確定。據報告，免疫球蛋白可預防輸血引起的病毒性肝炎，但疾病控制中心 (the Center for Disease Control) 現尚未推薦免疫球蛋白治療用於此目的。有效的保護性免疫反應的缺乏妨礙了疫苗的發展或適宜的曝露後預防手段，所以近期內希望仍寄託於對抗病毒的干擾。

各臨床研究的目的是在確定能有效地治療受慢性 C 型肝炎困擾的病人的 HCV 感染的醫藥劑。此等研究包括使用 α -

第 092101813 號專利申請案
中文說明書替換頁(92 年 7 月)

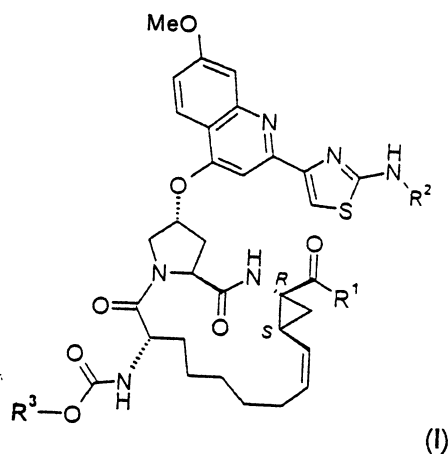
(4)



養中是有活性的，並在活體內具極良好藥物動力學性質。

發明內容

本發明範圍內包括式 I 化合物：



其中 R^1 是羥基或 $\text{NH}\text{SO}_2\text{R}^{1A}$ ；其中 R^{1A} 是 (C_{1-8}) 烷基， (C_{3-7}) 環烷基或 $\{(\text{C}_{1-6})$ 烷基 $-(\text{C}_{3-7})$ 環烷基 $\}$ ，其視需要以鹵，氟基，硝基， $\text{O}-(\text{C}_{1-6})$ 烷基，鹽胺基，胺基或苯基作 1 至 3 次之取代，或 R^{1A} 是 C_6 或 C_{10} 芳基，其視需要以鹵，氟基，硝基， (C_{1-6}) 烷基， $\text{O}-(\text{C}_{1-6})$ 烷基，鹽胺基，胺基或苯基作 1 至 3 次之取代； R^2 是 (C_{5-6}) 環烷基及 R^3 是環戊基；或其醫藥上可接受的鹽。

本發明範圍內包括醫藥組合物，其含抗 C 型肝炎病毒有效量的式 I 化合物或其治療上可接受的鹽，及與其混合的醫藥上可接受的載劑介質或助劑。

根據本發明一具體實施例，本發明醫藥組合物尚含干擾素(聚乙二醇型或非聚乙二醇型的)或病毒唑，或一或多種抗-HCV 劑，或以上諸劑的任何混合物。

本發明另一重要方面包括藉給予哺乳動物抗 C 型肝炎

第 092101813 號專利申請案
中文說明書替換頁(92 年 7 月)

(5)



病毒有效量的式 I 化合物，其治療上可接受的鹽，或上述組合物，單獨給予或與一或多種干擾素(聚乙二醇型或非聚乙二醇型)或病毒唑，或一或多種其他抗-HCV劑一起給予或分別給予以治療 C 型肝炎病毒感染的的方法，

本發明另一重要方面包括藉給予哺乳動物抗 C 型肝炎病毒有效量的式 I 化合物，其治療上可接受的鹽，或上述組合物，單獨給予或與一或多種干擾素(聚乙二醇型或非聚乙二醇型)或病毒唑，或一或多種其他抗-HCV劑一起給予或分別給予以預防 C 型肝炎病毒感染的的方法。

本發明範圍還包括式 I 化合物，如此處所述者，在製成藥物以治療或預防 C 型肝炎病毒感染的用途。

實施方式

定義

如此處所述，下述定義除非另有說明適用於：

在述及各實例時，(R)或(S)用以指示不對稱中心之絕對構形，此指示是用於整個化合物之說明而非只用於取代基的說明。

此處“P1，P2及P3”意謂從肽類似物 C-端開始延伸至 N-端的胺基酸殘基的位置(即 P1 是指從 C-端開始的 1 位，P2 是指從 C-端開始的 2 位，依此類推)(見 Berger A. & Schechter I., Transactions of the Royal Society London series B257, 249-264 (1970))。

此處所謂“(1R,2S)-乙烯基-ACCA”意謂下式化合物：

