



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101580535 B

(45) 授权公告日 2012. 10. 03

(21) 申请号 200810174302. 5

(22) 申请日 2008. 10. 28

(30) 优先权数据

61/053, 857 2008. 05. 16 US

(73) 专利权人 太景生物科技股份有限公司

地址 中国台湾台北市内湖区新明路 138 号 7 楼

(72) 发明人 林助强 李广元 刘永庆 罗斌
陈荣峻 刘振富 陈志明 金其新

(74) 专利代理机构 上海一平知识产权代理有限公司 31266

代理人 祝莲君

(51) Int. Cl.

C07K 5/12 (2006. 01)

C07D 519/00 (2006. 01)

C07D 487/04 (2006. 01)

A61K 38/12 (2006. 01)

A61K 31/473 (2006. 01)

A61K 31/4741 (2006. 01)

A61K 31/4745 (2006. 01)

A61P 1/16 (2006. 01)

A61P 31/12 (2006. 01)

(56) 对比文件

WO 2004/094452 A2, 2004. 11. 04,

WO 2004/094452 A2, 2004. 11. 04,

WO 2005/028501 A1, 2005. 03. 31,

WO 2005/028501 A1, 2005. 03. 31,

WO 2005/070955 A1, 2005. 08. 04,

WO 2005/070955 A1, 2005. 08. 04,

Montse Llina`s-Brunet et

al. Structure-Activity Study on a Novel Series of Macrocyclic Inhibitors of the Hepatitis C Virus NS3 Protease Leading to the Discovery of BILN 2061. 《J. Med. Chem. 》. 2004, 第 47 卷 1605-1608.

Montse Llina`s-Brunet et

al. Structure-Activity Study on a Novel Series of Macrocyclic Inhibitors of the Hepatitis C Virus NS3 Protease Leading to the Discovery of BILN 2061. 《J. Med. Chem. 》. 2004, 第 47 卷 1605-1608.

审查员 何奕秋

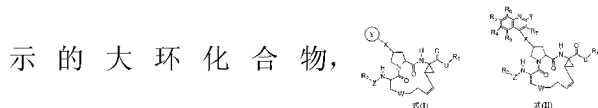
权利要求书 8 页 说明书 26 页

(54) 发明名称

丙型肝炎病毒蛋白酶抑制剂

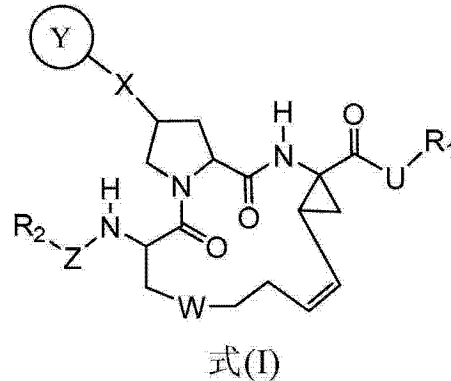
(57) 摘要

本发明涉及丙型肝炎病毒蛋白酶抑制剂。更具体地, 涉及式 (I) 或 (II) 所示的大环化合物,



式 (I) 中各取代基 R₁、R₂、U、W、X、Y 和 Z, 以及式 (II) 各取代基 R₁、R₂、R₃、R₄、R₅、R₆、R₇、U、W、X、T 和 Z 的定义如说明书所述。这些化合物可用来治疗丙型肝炎病毒感染。本发明还公开了含有所述大环化合物的药学组合物以及所述大环化合物在制备治疗丙型肝炎病毒感染的药物中的应用。

1. 式 (I) 的化合物：



其中，

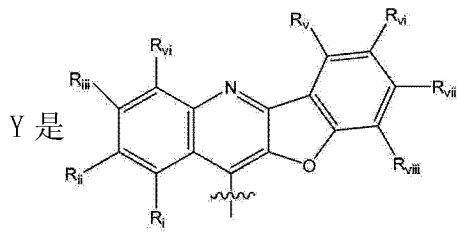
R_1 为 C_{3-10} 环烷基；

R_2 为 C_{1-6} 烷基或 C_{3-10} 环烷基；

U 是 $-NH(CO)-$, $-NHSO-$ 或 $-NHSO_2-$ ；

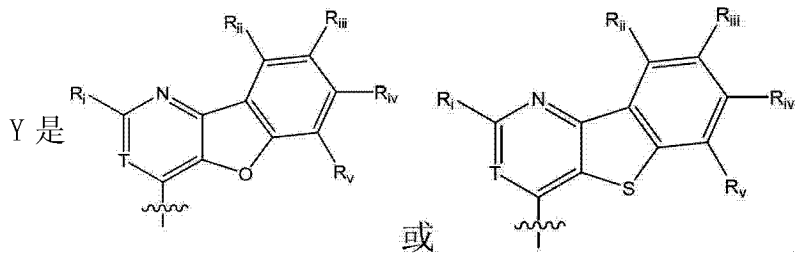
W 是 $-(CH_2)_m-$, $-O(CH_2)_n-$, $-(CH_2)_nO-$, $-S(CH_2)_n-$, $-(CH_2)_nS-$, $-SO(CH_2)_n-$, 或 $-(CH_2)_nSO-$, m 是 1, 2 或 3, n 是 0, 1 或 2；

X 是 $-O-$, 或 $-S-$ ；



其中 $R_i, R_{ii}, R_{iii}, R_{iv}, R_v, R_{vi}, R_{vii}$ 和 R_{viii} 各自独立地是

H, 卤素, C_{1-6} 烷基, 或 C_{1-6} 烷氧基；或



其中 R_i 为芳基或杂芳基；

R_{ii}, R_{iii}, R_{iv} , 和 R_v 各自独立地是 H, 卤素, C_{1-6} 烷基, 或 C_{1-6} 烷氧基；T 是 $-CH-$ 或 $-N-$ ；

Z 是 $-C(O)-$, $-OC(O)-$, $-NR' C(O)-$, 或 $-OC(S)-$ ；其中 R' 是 H；

其中, 所述的环烷基、芳基或杂芳基同时包括取代的和未取代的基团；所述环烷基、芳基或杂芳基上的取代基选自： C_1-C_{10} 烷基, C_1-C_{10} 烷氧基, 卤素；

所述芳基为苯基, 萘基, 茚基, 蒽基或菲基；

所述杂芳基为咪唑基, 吡咯基, 噻吩基, 噁唑基, 咪唑基, 噻唑基, 吡啶基, 嘧啶基, 喹啉基, 喹啉基, 异喹啉基或吲哚基。

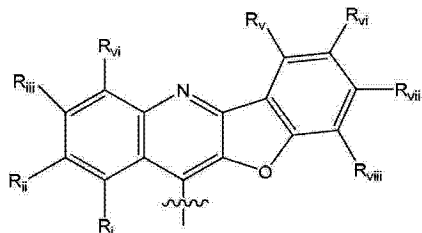
2. 如权利要求 1 所述的化合物, 其特征在于, W 是 $-CH_2CH_2-$, $-OCH_2-$, $-SCH_2-$ 或 $-SOCH_2-$ 。

3. 如权利要求 2 所述的化合物, 其特征在于, X 是 O。

4. 如权利要求 3 所述的化合物, 其特征在于, T 是 $-N-$ 。

5. 如权利要求 3 所述的化合物, 其特征在于, Z 是 $-OC(O)-$ 。

6. 如权利要求 5 所述的化合物,其特征在于,U 是 $-\text{NHSO}_2-$ 。
7. 如权利要求 6 所述的化合物,其特征在于, R_1 是环丙基。
8. 如权利要求 7 所述的化合物,其特征在于, R_2 是 C_{1-5} 烷基或 C_{3-8} 环烷基。
9. 如权利要求 1 所述的化合物,其特征在于,所述环烷基、芳基或杂芳基包括取代的基团,是指所述环烷基、芳基或杂芳基上的取代基选自: C_1-C_{10} 烷基, C_1-C_{10} 烷氧基,卤素。
10. 如权利要求 1 所述的化合物,其特征在于,Y 是

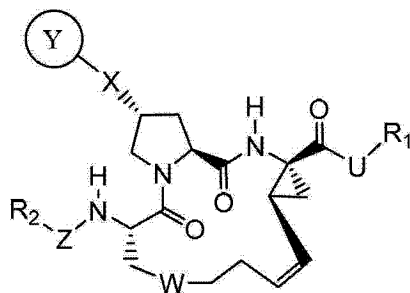


其中 $R_i, R_{ii}, R_{iii}, R_{iv}, R_v, R_{vi}, R_{vii}$ 和 R_{viii} 各自独立地是 H,

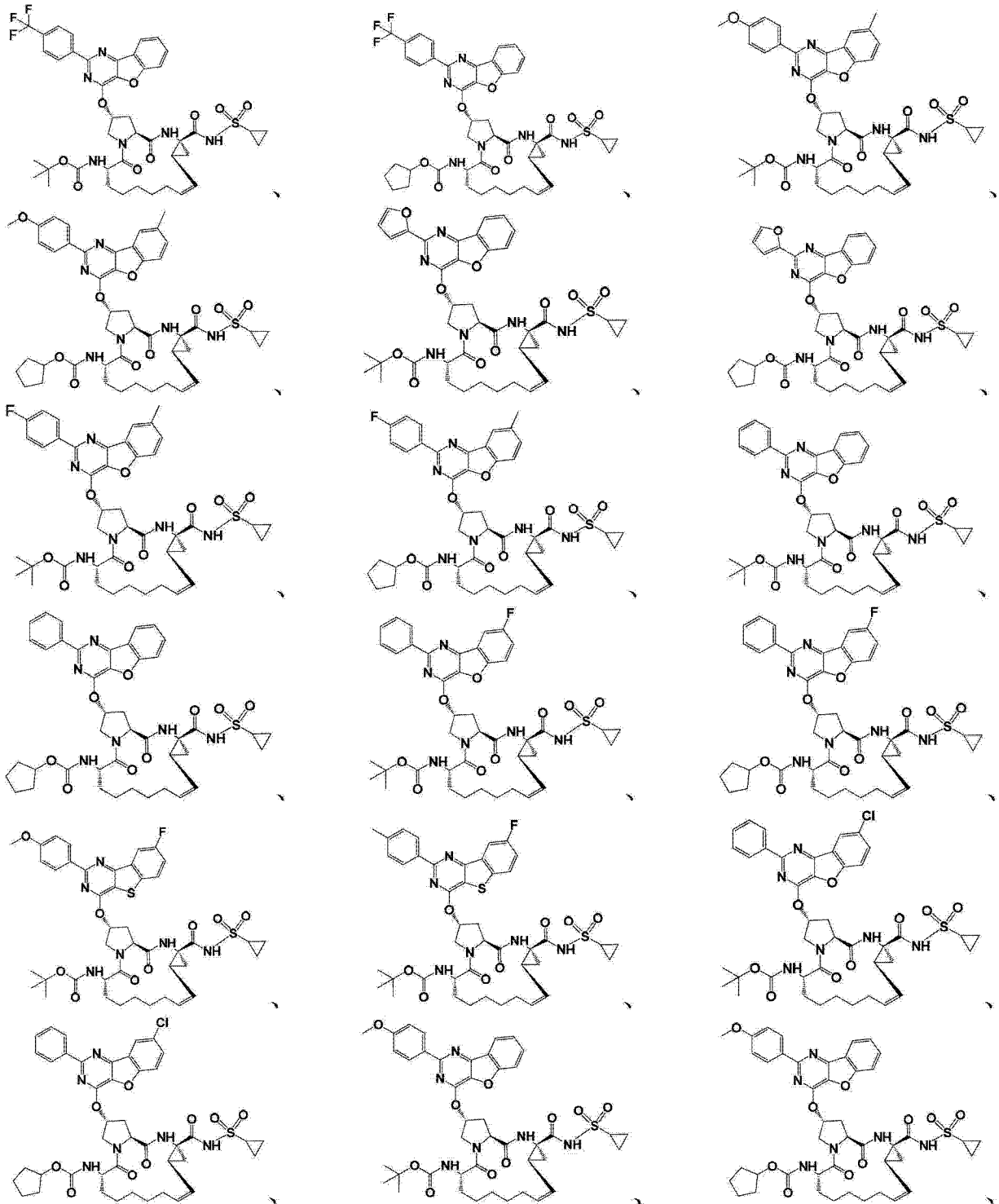
卤素, C_{1-6} 烷基, 或 C_{1-6} 烷氧基。

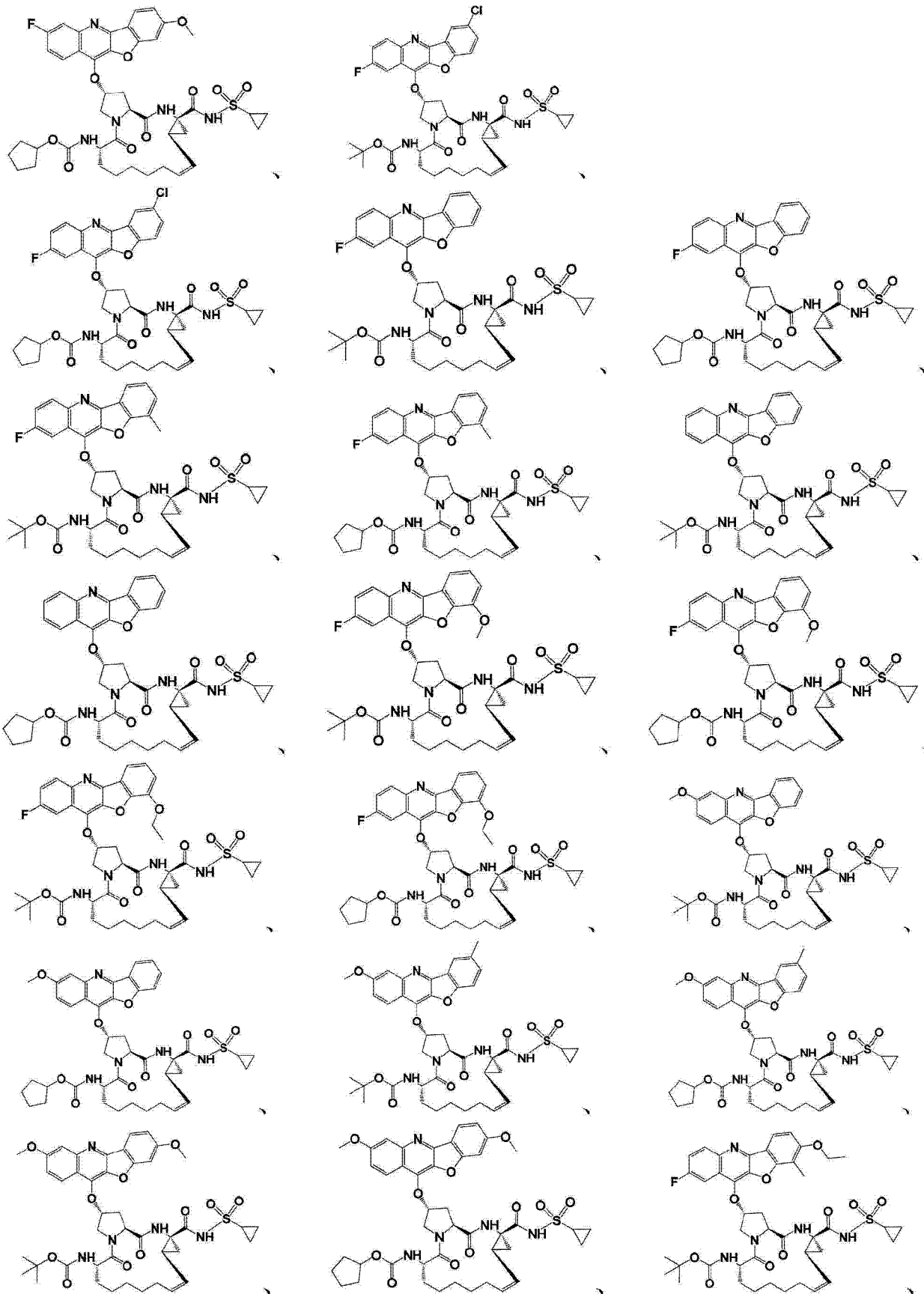
11. 如权利要求 1 所述的化合物,其特征在于,X 是 O,Z 是 $-\text{OC}(O)-$, U 是 $-\text{NHSO}_2-$, R_1 是环丙基, R_2 是 C_{1-5} 烷基或 C_{3-8} 环烷基。

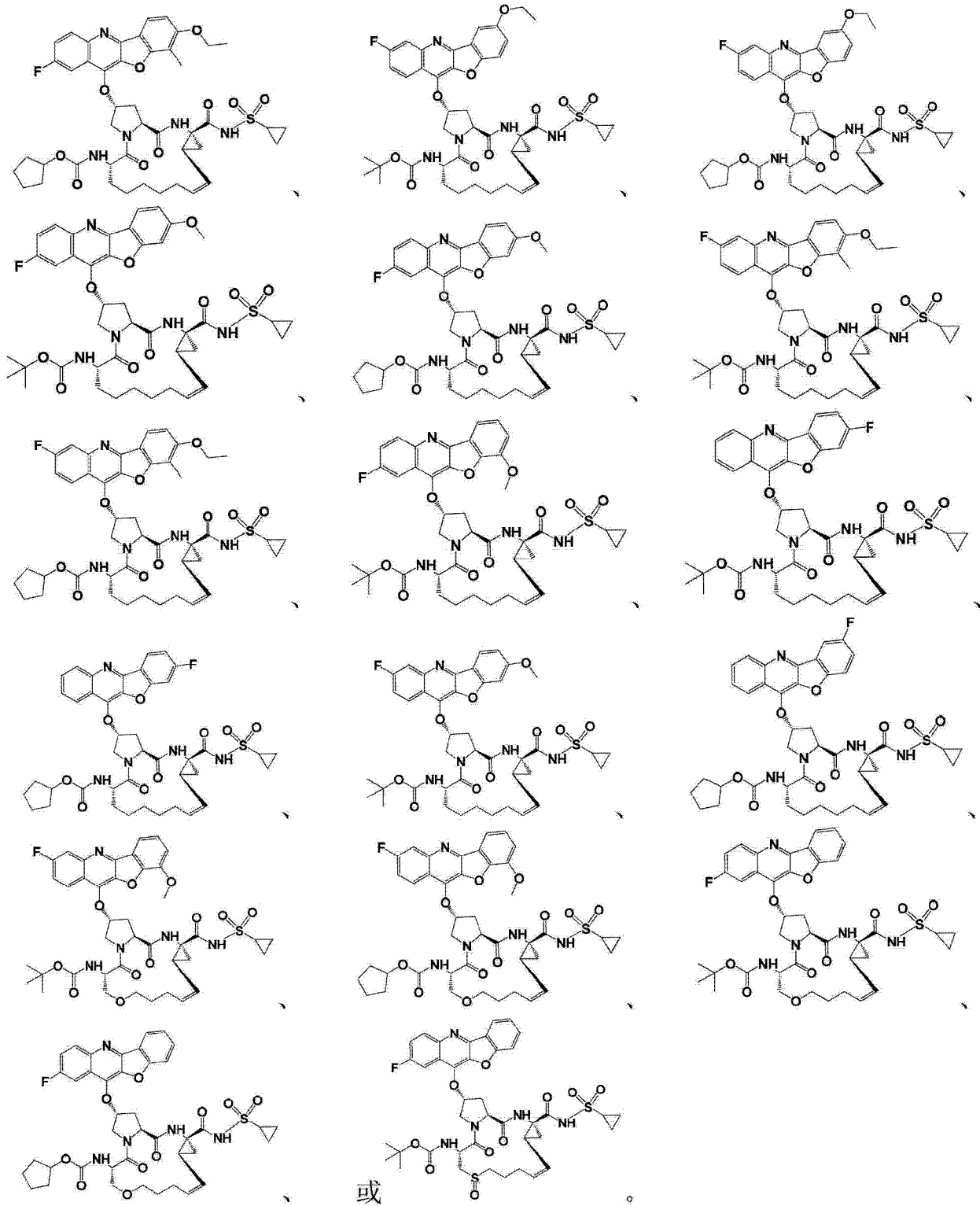
12. 如权利要求 1 所述的化合物,其特征在于,所述化合物具有以下所示的立体化学特征:



13. 一种化合物,其特征在于,所述化合物的结构式为





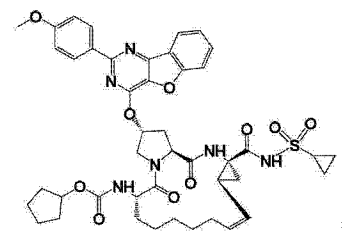
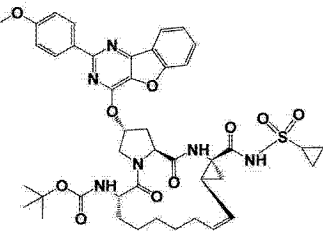
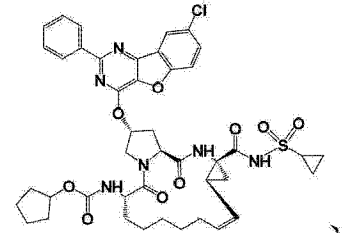
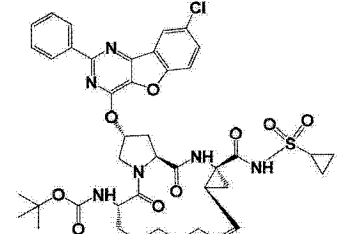
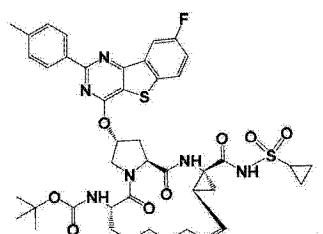
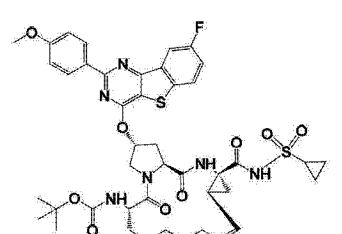
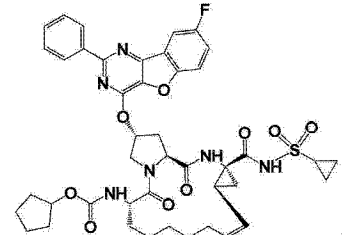
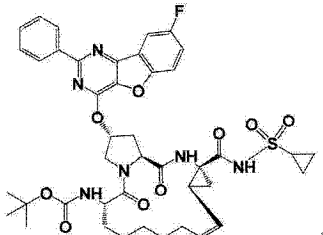
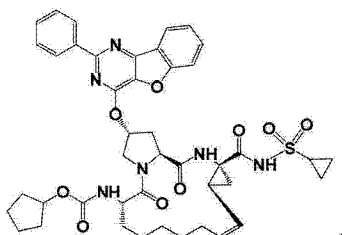
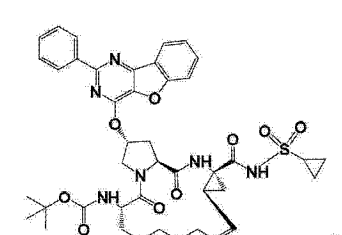
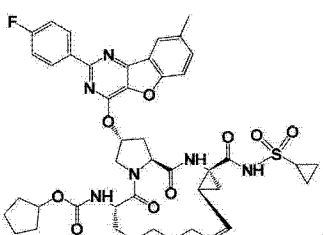
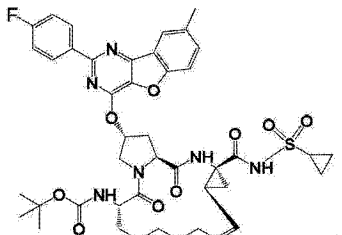
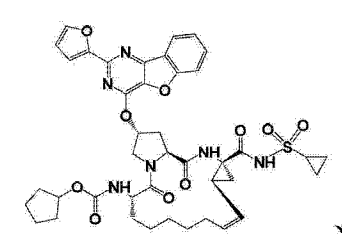
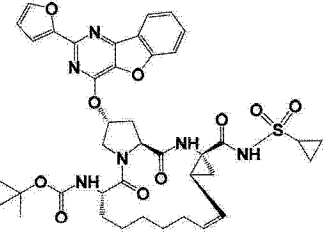
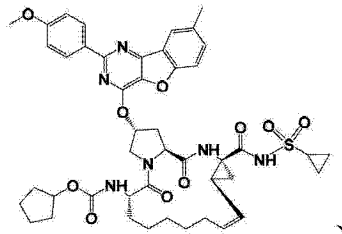
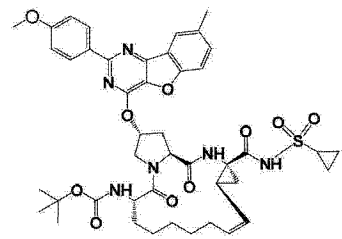
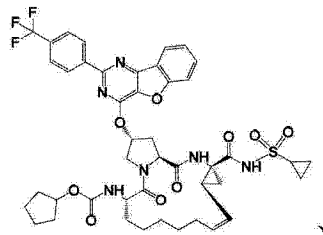
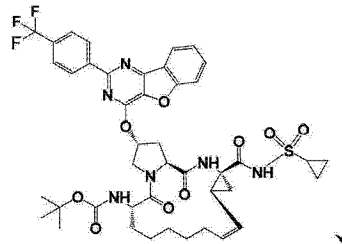


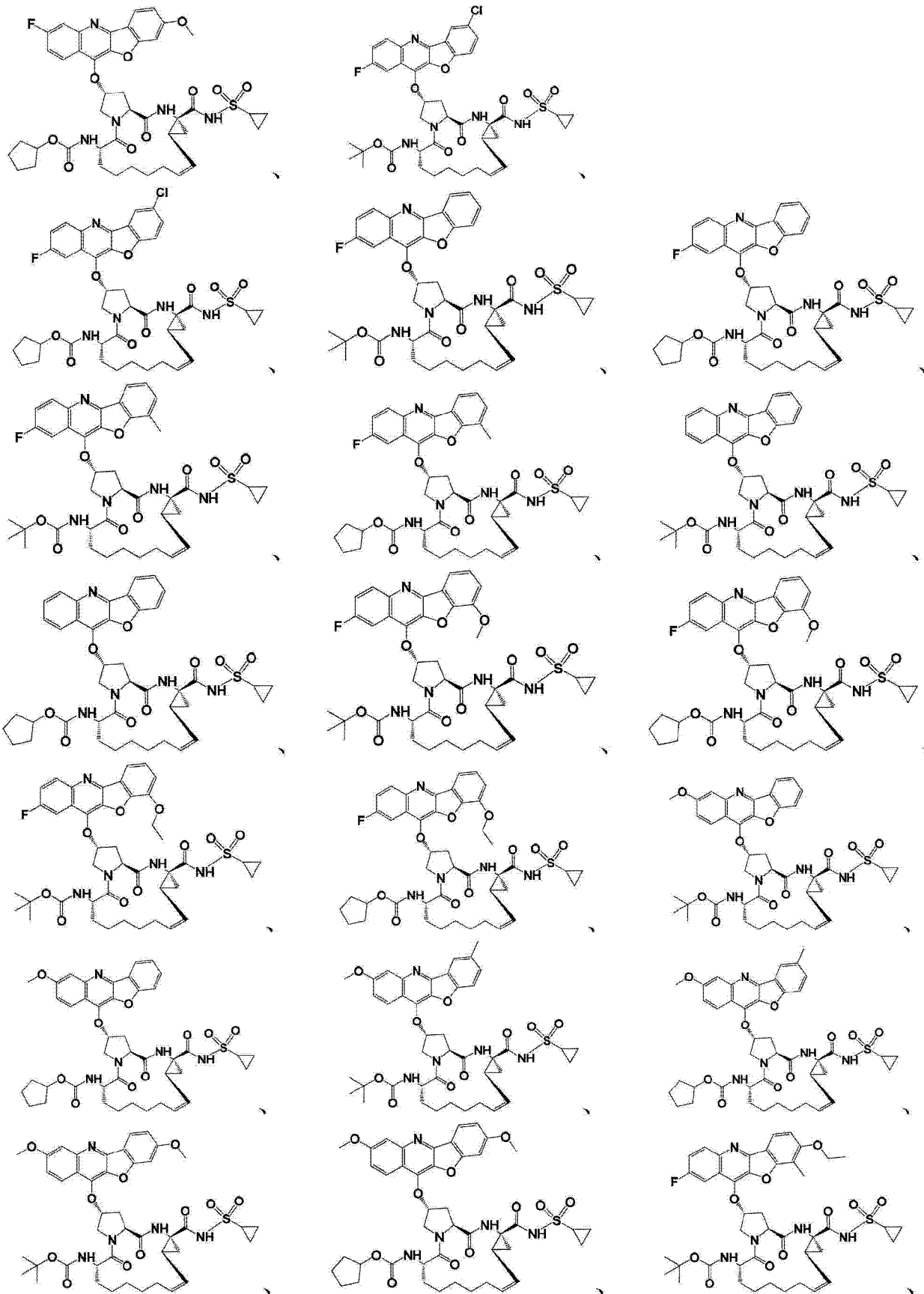
14. 一种药学组合物, 包含权利要求 1 或 13 所述的化合物, 以及药学上可接受的载体。

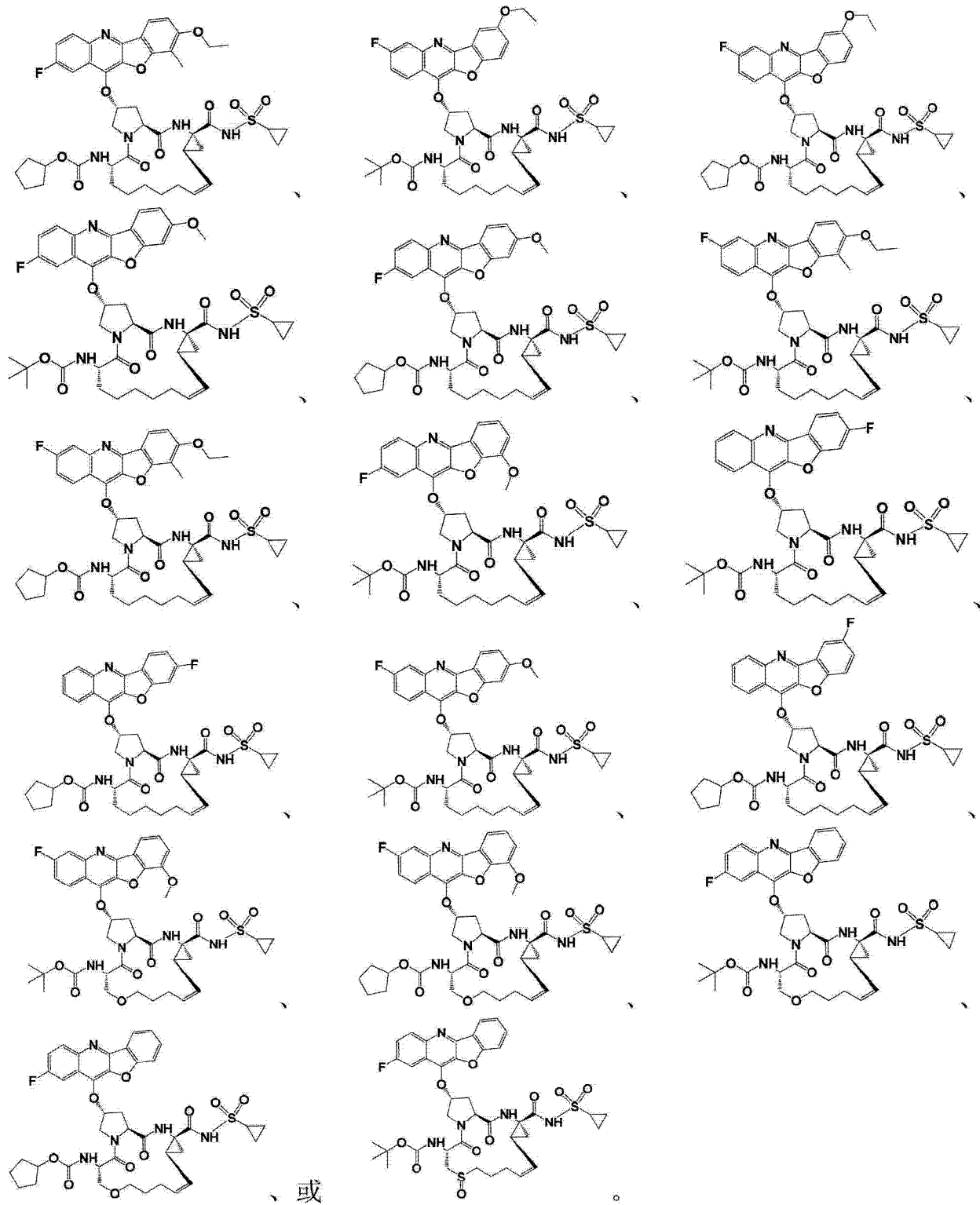
15. 如权利要求 14 所述的药学组合物, 该组合物还包含免疫调节剂, 另一种抗病毒剂或者 NS5B 聚合酶抑制剂, NS5A 抑制剂, NS4B 抑制剂或 p7 的抑制剂。

16. 如权利要求 1 或 13 所述的化合物或其药学上可接受的盐的用途, 其特征在于, 用于制备治疗丙型肝炎病毒感染的药物。

17. 如权利要求 16 所述的用途, 其特征在于, 所述的化合物的结构式为







丙型肝炎病毒蛋白酶抑制剂

背景技术

[0001] 丙型肝炎病毒 (HCV) 是一种 (+)-有义的单链 RNA 病毒 ((+)-sense single-stranded RNA), 也是主要引起非甲型、非乙型肝炎的致病因子。HCV 感染是威胁人类健康的问题。例如参见 W005/007681 ; W089/04669 ; EP381216 ; Alberti 等人的 J. Hepatology, 31 (增刊 1), 17-24 (1999) ; Alter, J. Hepatology, 31 (增刊 1), 88-91 (1999) ; 以及 Lavanchy, J. Viral Hepatitis, 6, 35-47 (1999)。

[0002] 因为 HCV 病毒可以迅速变异并逃过自然免疫响应, HCV 感染造成的肝炎难以治愈。目前仅有的抗 -HCV 疗法是干扰素 - α , 干扰素 - α / 病毒唑组合和 PEG 化的 (pegylated) 干扰素 - α 。但是, 发现干扰素 - α 或干扰素 - α / 病毒唑组合的持续响应率 <50%, 而且病人会很大程度地受到这些治疗剂的副反应影响。例如参见 Walker, DDT, 4, 518-529 (1999) ; Weiland, FEMS Microbiol. Rev., 14, 279-288 (1994) ; 以及 W002/18369。因此, 人们仍然需要开发更有效、更易承受地治疗药物。

[0003] 病毒复制所需的 HCV 蛋白酶包含约 3000 个氨基酸。其包含核壳蛋白 (C), 膜蛋白 (E1 和 E2) 和一些非结构蛋白 (NS2, NS3, NS4a, NS5a 和 NS5b)。

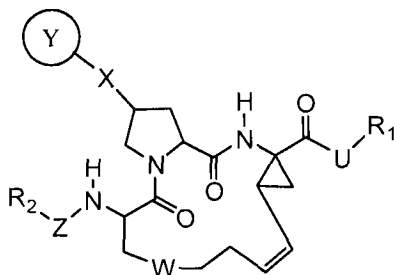
[0004] NS3 蛋白具有丝氨酸蛋白酶活性, 被认为对于病毒复制和感染是必需的。NS3 蛋白酶的必需性通过黄热病毒 NS3 蛋白酶的变异降低病毒感染性这一现象得以证明。例如参见 Chamber 等人的 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 8898-8902 (1990)。还证明 HCV NS3 蛋白酶活性位点的变异完全抑制了黑猩猩模型中的 HCV 感染。例如参见 Rice 等人的 J. Virol. 74 (4) 2046-51 (2000)。另外, 发现所述 HCV NS3 蛋白酶能够在 NS3/NS4a, NS4a/NS4b, NS4b/NS5a, NS5a/NS5b 连接点促进蛋白质水解, 因此对病毒复制过程中四种病毒蛋白质的产生负责。例如参见 US2003/0207861。因此, 所述 HCV NS3 蛋白酶是用来治疗 HCV 感染的一个吸引人的目标。可能的 NS3HCV 蛋白酶抑制剂可以在以下文献中找到 : W002/18369, W000/09558, W000/09543, W099/64442, W099/07733, W099/07734, W099/50230, W098/46630, W098/17679, W097/43310, US5, 990, 276 ; Dunsdon 等, Biorg. Med. Chem. Lett. 10, 1571-1579 (2000) ; Llinas-Brunet 等, Biorg. Med. Chem. Lett. 10, 2267-2270 (2000) ; 以及 S. LaPlante 等, Biorg. Med. Chem. Lett. 10, 2271-2274 (2000)。

发明内容

[0005] 本发明是基于以下出人意料的发现, 即某些大环化合物能够有效地抑制 HCV NS3 活性和 HCV RNA 水平。

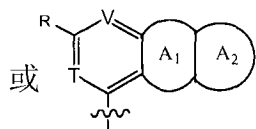
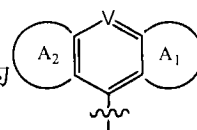
[0006] 一方面, 本发明涉及式 (I) 的化合物 :

[0007]



[0008] 式 (I)

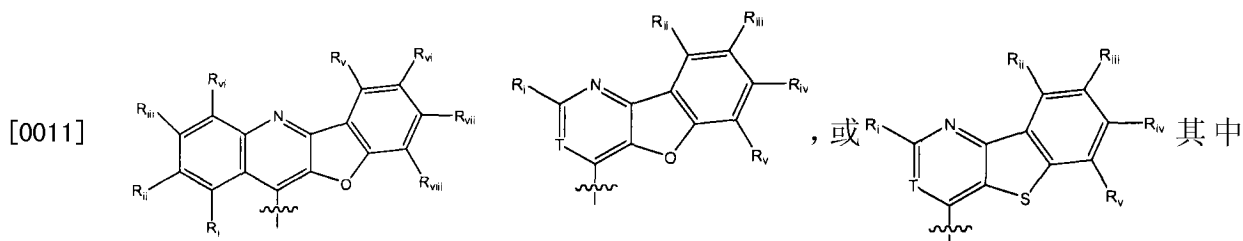
[0009] 其中 R_1 和 R_2 各自独立地是 H, C_{1-6} 烷基, C_{3-10} 环烷基, C_{1-10} 杂环烷基, 芳基, 或杂芳基; U 是 $-O-$, $-NH-$, $-NH(CO)-$, $-NHSO-$, 或 $-NHSO_2-$; W 是 $-(CH_2)_m-$, $-NH(CH_2)_n-$, $-(CH_2)_nNH-$, $-O(CH_2)_n-$, $-(CH_2)_nO-$, $-S(CH_2)_n-$, $-(CH_2)_nS-$, $-SO-$, $-SO(CH_2)_n-$, $-(CH_2)_nSO-$, $-SO_2(CH_2)_n-$ 或 $-(CH_2)_nSO_2-$, m 为 1, 2 或 3, n 为 0, 1 或 2; X 为 $-O-$, $-S-$, $-NH-$ 或 $-OCH_2-$; Y 为



其中 V 和 T 各自独立地为 $-CH-$ 或 $-N-$; R 为 H, 卤素, 硝基, 氰基, 氨基,

C_{1-6} 烷基, C_{1-6} 烷氧基, C_{2-6} 烯基, C_{2-6} 炔基, C_{3-10} 环烷基, C_{1-10} 杂环烷基, 芳基或杂芳基; A_1 和 A_2 各自独立地是 C_{4-10} 环烷基, C_{1-10} 杂环烷基, 芳基或杂芳基, 它们任选地被以下基团取代: 卤素, 硝基, 氰基, C_{1-6} 烷基, C_{1-6} 烷氧基, C_{2-6} 烯基, C_{2-6} 炔基, 芳基或杂芳基; 或者任选地与另外的 C_{3-10} 环烷基, C_{1-10} 杂环烷基, 芳基或杂芳基稠合, 这些另外的基团任选地被以下基团取代: 卤素, 硝基, 氰基, C_{1-6} 烷基, C_{1-6} 烷氧基, C_{2-6} 烯基, C_{2-6} 炔基, C_{3-10} 环烷基, C_{1-10} 杂环烷基, 芳基或杂芳基; Z 是 $-C(O)-$, $-OC(O)-$, $-NR' C(O)-$, $-OC(S)-$, $-NR' C(S)-$ 或 $-OC(NH)-$; 其中 R' 是 H, C_{1-6} 烷基, C_{3-10} 环烷基, C_{1-10} 杂环烷基, 芳基或杂芳基。各可变项 U, W, X 和 Z 表示的基团当然是二价的基团。上述各个基团的取向与式中所示的可变项的取向相同。例如, 如果可变项 U 为基团 $-NHSO-$, 如图所示, 其位于 $C=O$ 和 R_1 之间。该 $-NHSO-$ 基团中的 N 原子与 $C=O$ 键合, S 原子与 R_1 键合。

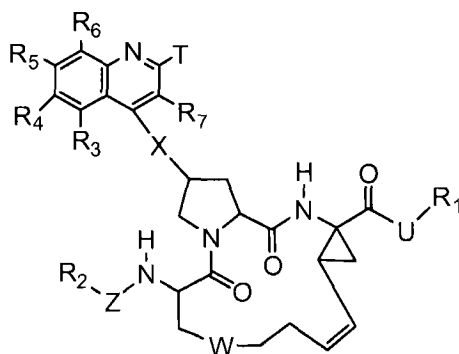
[0010] 见式 (I), 上述化合物的一个亚组是具有以下特征的化合物: R_1 是环丙基; R_2 是 C_{1-5} 烷基或 C_{3-8} 环烷基; W 是 $-CH_2CH_2-$, $-OCH_2-$, $-SCH_2-$ 或 $-SOCH_2-$; U 是 $-NHSO_2-$; Z 是 $-OC(O)-$; X 是 O; Y 是



$R_i, R_{ii}, R_{iii}, R_{iv}, R_v, R_{vi}, R_{vii}$ 和 R_{viii} 各自独立地是 H, 卤素, 硝基, 氰基, 氨基, C_{1-6} 烷基, C_{1-6} 烷氧基, C_{2-6} 烯基, C_{2-6} 炔基, C_{3-10} 环烷基, C_{1-10} 杂环烷基, 芳基, 或杂芳基。

[0012] 在另一个方面, 本发明涉及式 (II) 的化合物:

[0013]



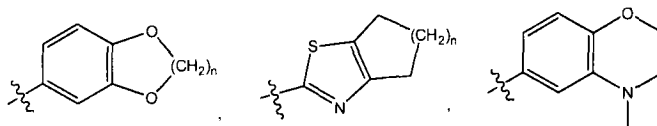
[0014] 式 (II),

[0015] 其中 R_1 和 R_2 各自独立地是 H, C_{1-6} 烷基, C_{3-10} 环烷基, C_{1-10} 杂环烷基, 芳基或杂芳基; R_3, R_4, R_5, R_6 和 R_7 各自独立地是 H, 卤素, 硝基, 氰基, 氨基, C_{1-6} 烷基, C_{1-6} 烷氧基, C_{2-6} 烯基, C_{2-6} 炔基, C_{3-10} 环烷基, C_{1-10} 杂环烷基, 芳基或杂芳基; U 是 $-O-$, $-NH-$, $-NH(CO)-$, $-NHSO-$ 或 $-NHSO_2-$; W 是 $-(CH_2)_m-$, $-NH(CH_2)_n-$, $-(CH_2)_nNH-$, $-O(CH_2)_n-$, $-(CH_2)_nO-$, $-S(CH_2)_n-$, $-(CH_2)_nS-$, $-SO-$, $-SO(CH_2)_n-$, $-(CH_2)_nSO-$, $-SO_2(CH_2)_n-$ 或 $-(CH_2)_nSO_2-$, m 是 1, 2 或 3, n 是 0, 1 或 2;

X 是 $-O-$, $-S-$, $-NH-$ 或 $-OCH_2-$; T 是 $\begin{matrix} \text{A}_1 & \text{A}_2 \\ \text{---} & \text{---} \end{matrix}$ 其中 A_1 和 A_2 各自独立地是 C_{3-10} 环烷基, C_{1-10} 杂环烷基, 芳基或杂芳基, 它们各自任选地被以下基团取代: 卤素, 硝基, 氰基, 氨基, C_{1-6} 烷基, C_{1-6} 烷氧基, C_{2-6} 烯基, C_{2-6} 炔基, C_{3-10} 环烷基, C_{1-10} 杂环烷基, 芳基或杂芳基; Z 是 $-C(O)-$, $-OC(O)-$, $-NR'-C(O)-$, $-OC(S)-$, $-NR'-C(S)-$ 或 $-OC(NH)-$; 其中 R' 是 H, C_{1-6} 烷基, C_{3-10} 环烷基, C_{1-10} 杂环烷基, 芳基或杂芳基。上述各可变项 U, W, X 和 Z 表示的基团与式中可变项的取向相同。

[0016] 参见式 (II), 上述化合物的一个亚组是具有以下特征的化合物: R_1 是环丙基; R_2 是 C_{1-5} 烷基或 C_{3-8} 环烷基; W 是 $-CH_2CH_2-$, $-OCH_2-$, $-SCH_2-$ 或 $-SOCH_2-$; U 是 $-NHSO_2-$; Z 是 $-OC(O)-$; T 是

[0017]



[0018] 其中 n 为 1 或 2。

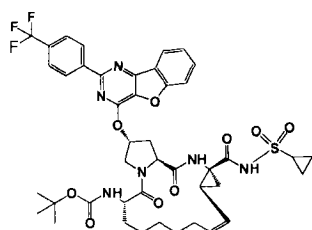
[0019] 术语“烷基”表示饱和的线性或支链烃部分, 例如 $-CH_3$ 或 $-CH(CH_3)_2$ 。术语“烷氧基”表示 $-O-(C_{1-6} \text{ 烷基})$ 基团。术语“烯基”表示包含至少一个双键的直链或支链烃基部分, 例如 $-CH=CH-CH_3$ 。术语“炔基”表示包含至少一个三键的直链或支链烃基部分, 例如 $-C\equiv C-CH_3$ 。术语“环烷基”表示饱和的环状烃基部分, 例如环己基。术语“环烯基”表示包含至少一个双键的非芳香性环状烃基部分, 例如环己烯基。术语“杂环烷基”表示包含至少一个环杂原子 (例如 N, O 或 S) 的饱和的环状部分, 例如 4-四氢吡喃基。术语“杂环烯基”表示包含至少一个环杂原子 (例如 N, O 或 S) 和至少一个环双键的非芳香性环状部分, 例如吡喃基。术语“芳基”表示包含一个或多个芳环的烃基部分。芳基部分的例子包括苯基 (Ph), 亚苯基, 萘基, 亚萘基, 茈基, 葱基和菲基。术语“杂芳基”表示包含一个或多个具有至少一个杂原子 (例如 N, O 或 S) 的芳环的部分。杂芳基部分的例子包括咪唑基, 亚咪唑

基, 茱基, 吡咯基, 噻吩基, 噁唑基, 咪唑基, 噻唑基, 吡啶基, 嘧啶基, 喹啉基, 喹啉基, 异喹啉基和吲哚基。术语“氨基”表示 $-NH_2$, $-NH-(C_{1-6} \text{烷基})$ 或 $-N(C_{1-6} \text{烷基})_2$ 。

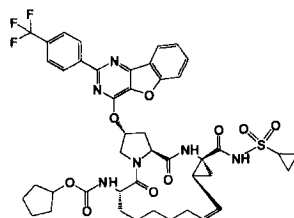
[0020] 除非另外说明, 本文所述的烷基, 烯基, 炔基, 环烷基, 环烯基, 杂环烷基, 杂环烯基, 芳基和杂芳基同时包括取代的和未取代的部分。环烷基, 环烯基, 杂环烷基, 杂环烯基, 芳基和杂芳基上可能的取代基包括, 但不限于: C_1-C_{10} 烷基, C_2-C_{10} 烯基, C_2-C_{10} 炔基, C_3-C_{20} 环烷基, C_3-C_{20} 环烯基, C_1-C_{20} 杂环烷基, C_1-C_{20} 杂环烯基, C_1-C_{10} 烷氧基, 芳基, 芳氧基, 杂芳基, 杂芳氧基, 氨基, C_1-C_{10} 烷基氨基, C_1-C_{20} 二烷基氨基, 芳基氨基, 二芳基氨基, C_1-C_{10} 烷基氨磺酰基, 芳基氨磺酰基, C_1-C_{10} 烷基亚氨基, 芳基亚氨基, C_1-C_{10} 烷基磺基亚氨基, 芳基磺基亚氨基, 羟基, 卤素, 巯基, C_1-C_{10} 烷硫基, 芳硫基, C_1-C_{10} 烷基磺酰基, 芳基磺酰基, 酰基氨基, 氨酰基, 氨基硫代酰基, 脒基, 胍基, 脲基, 氰基, 硝基, 亚硝基, 叠氮基, 酰基, 硫代酰基, 酰氧基, 羧基和羧酸酯基。另一方面, 烷基, 烯基或炔基上可能的取代基包括上述所有的取代基, 但是 C_1-C_{10} 烷基除外。环烷基, 环烯基, 杂环烷基, 杂环烯基, 芳基和杂芳基也可互相稠合。

[0021] 下面显示了本发明的 60 种示例性化合物。

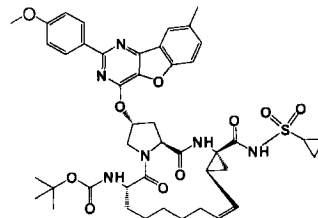
[0022]



[0023] 化合物 1

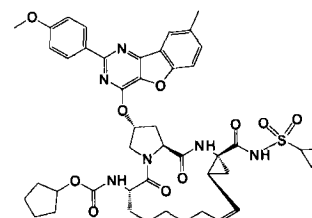


化合物 2

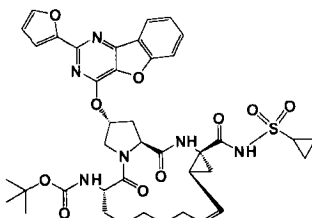


化合物 3

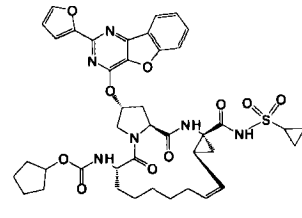
[0024]



[0025] 化合物 4

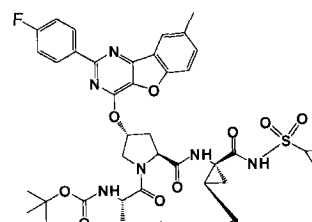


化合物 5

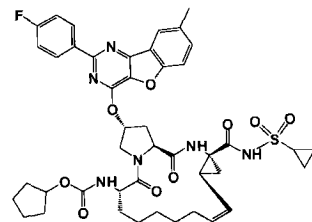


化合物 6

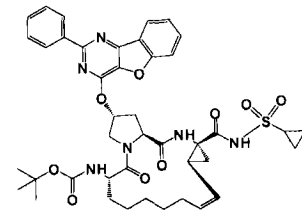
[0026]



[0027] 化合物 7

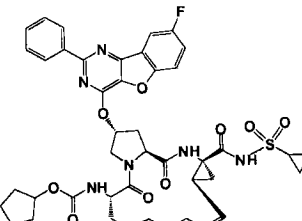
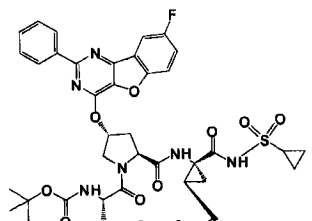
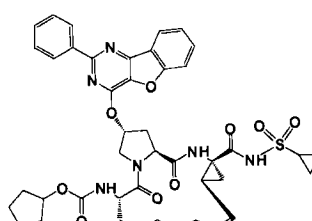


化合物 8

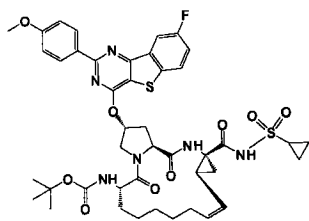


化合物 9

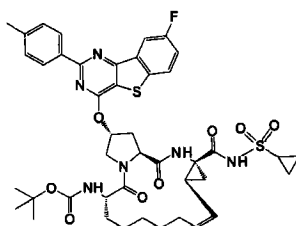
[0028]



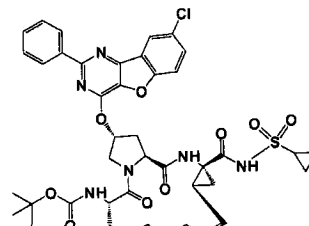
[0029] 化合物 10



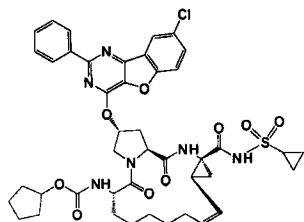
化合物 11



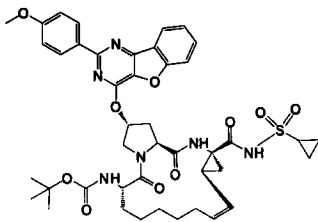
化合物 12



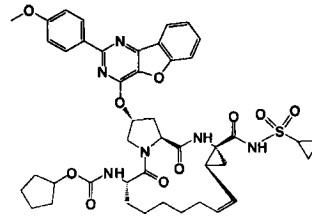
[0031] 化合物 13



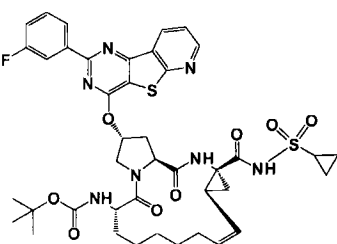
化合物 14



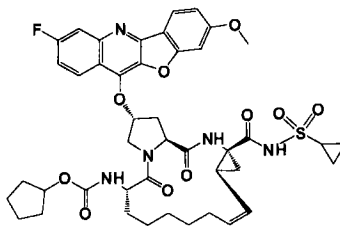
化合物 15



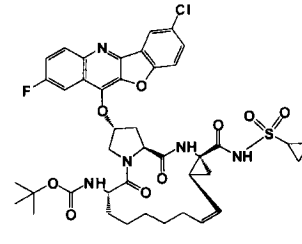
[0033] 化合物 16



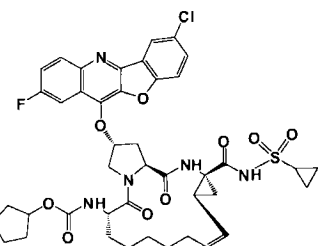
化合物 17



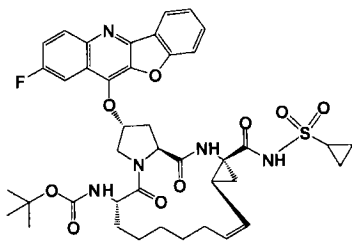
化合物 18



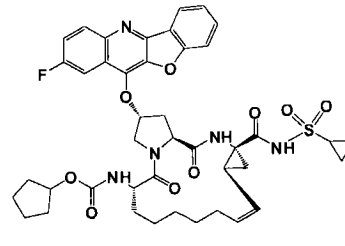
[0035] 化合物 19



化合物 20

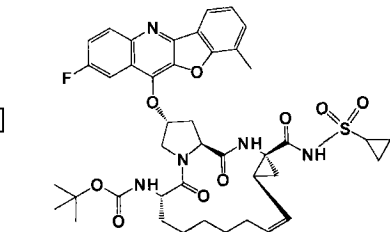


化合物 21

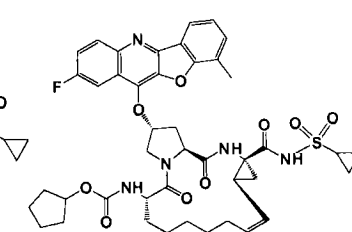


[0036]

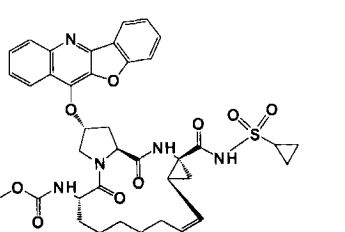
[0037] 化合物 22



化合物 23



化合物 24

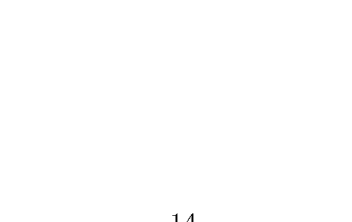


[0038]

[0039] 化合物 25



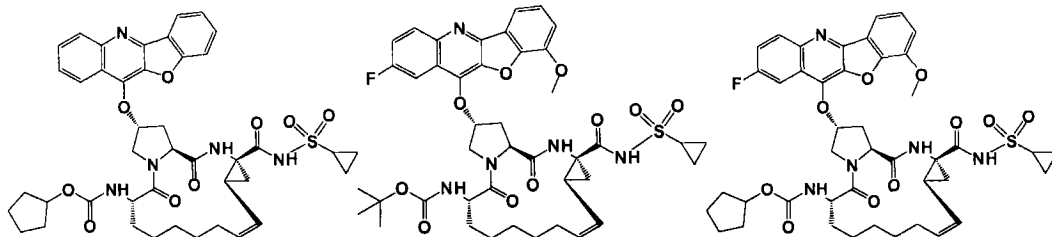
化合物 26



化合物 27



[0040]

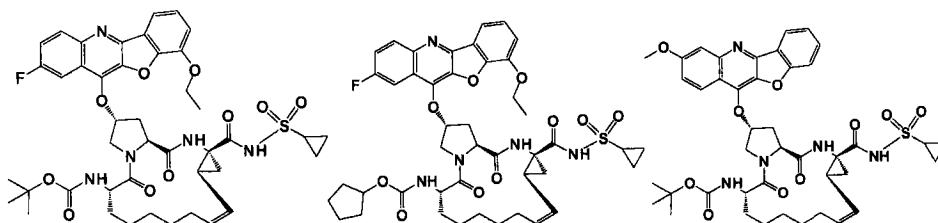


[0041] 化合物 28

化合物 29

化合物 30

[0042]

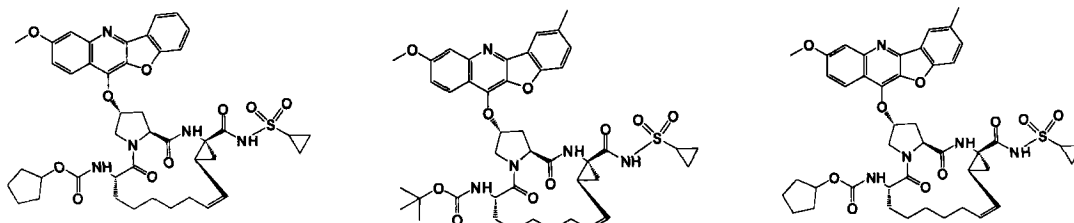


[0043] 化合物 31

化合物 32

化合物 33

[0044]

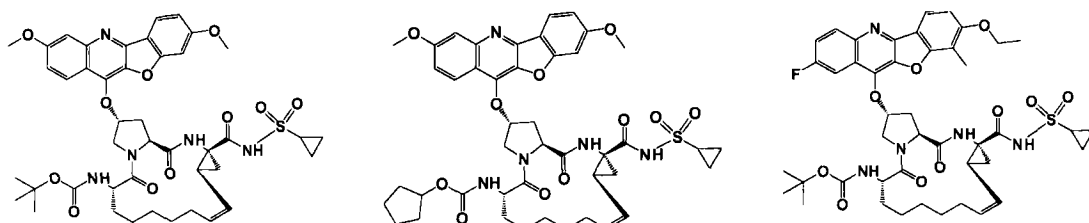


[0045] 化合物 34

化合物 35

化合物 36

[0046]

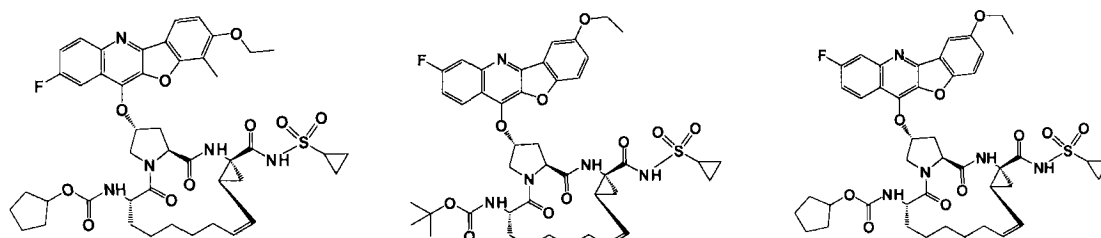


[0047] 化合物 37

化合物 38

化合物 39

[0048]

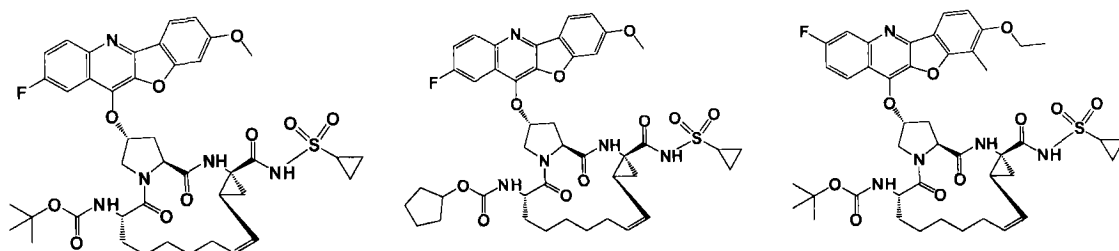


[0049] 化合物 40

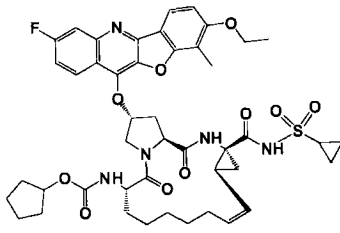
化合物 41

化合物 42

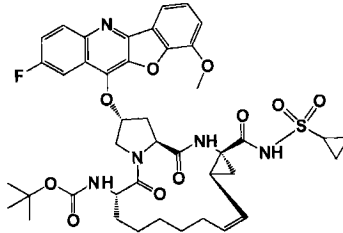
[0050]



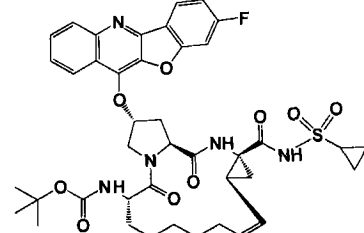
[0051] 化合物 43



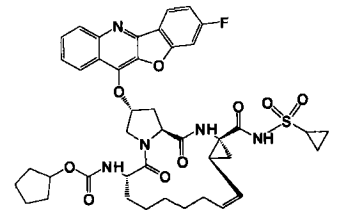
化合物 44



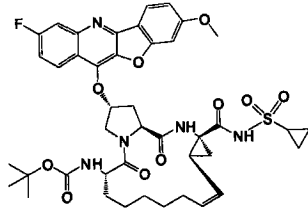
化合物 45



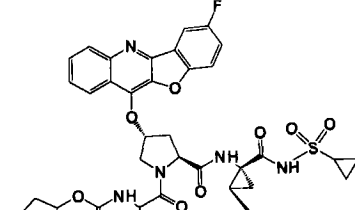
[0053] 化合物 46



化合物 47

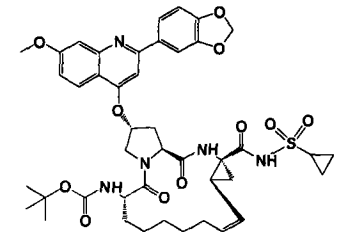


化合物 48

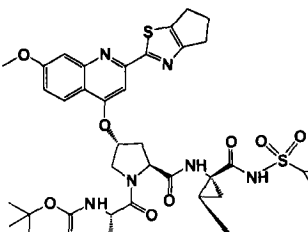


[0054]

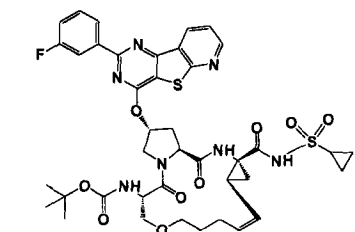
[0055] 化合物 49



化合物 50

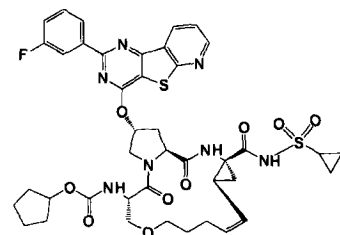


化合物 51

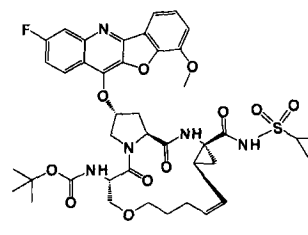


[0056]

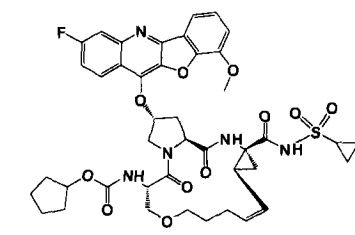
[0057] 化合物 52



化合物 53

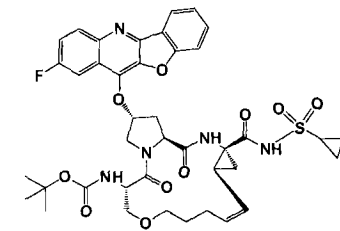


化合物 54

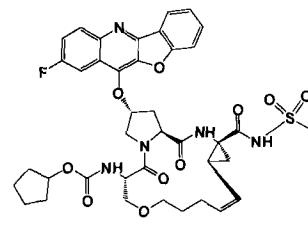


[0058]

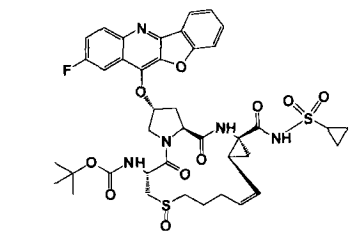
[0059] 化合物 55



化合物 56

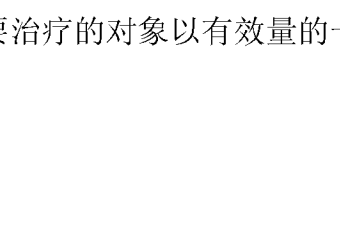


化合物 57

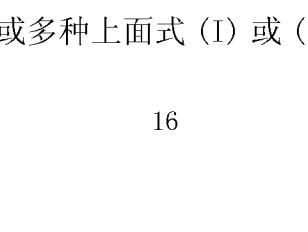


[0060]

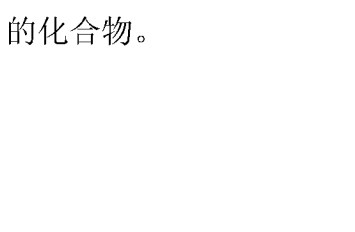
[0061] 化合物 58



化合物 59



化合物 60



[0062] 在另一个方面,本发明涉及一种治疗丙型肝炎病毒感染的方法。该方法包括给予需要治疗的对象以有效量的一种或多种上面式 (I) 或 (II) 的化合物。

[0063] 在另一个方面,本发明涉及一种用来治疗 HCV 感染的药物组合物。所述组合物包含有效量的至少一种式 (I) 或 (II) 的化合物,以及药学上可接受的载体。该组合物还可包含在 HCV 生命周期种除了 HCV NS3 蛋白酶以外的靶的抑制剂,所述靶是例如 NS5B 聚合酶, NS5A, NS4B 或 p7。这些抑制剂的例子包括,但不限于: N-[3-(1-环丁基甲基-4-羟基-2-氧代-1,2-二氢-喹啉-3-基)-1,1-二氧化-1,4-二氢-116-苯并[1,2,4]噻二嗪-7-基]-甲磺酰胺 (W004041818), 反式-1,2-二-4-[(苯基乙酰基-吡咯烷-2-(S)-羰基)氨基]-苯基乙烯 (W00401413) 和 1-氨基金刚烷 (Amentadine, Griffin, 2004, J. Gen. Virol. 85:第 451 页)。所述药学组合物还可包含免疫调节剂或第二抗病毒剂。免疫调节剂表示能够调节免疫反应的活性试剂。免疫调节剂的例子包括但不限于 Nov-205 (诺文罗斯医疗有限公司 (Novelos Therapeutics Inc.), W002076490) 和 IM0-2125 (艾德拉药物有限公司 (Idera Pharmaceuticals Inc.), W005001055)。抗病毒剂表示能够杀死病毒或者抑制其复制的活性试剂。抗病毒剂的例子包括但不限于病毒唑, α -干扰素, 聚乙二醇化的干扰素和 HCV 蛋白酶抑制剂, 例如 2-(2-{2-环己基-2-[(吡嗪-2-羰基)-氨基]-乙酰基氨基}-3,3-二甲基-丁酰基)-八氢-环戊二烯并[c]吡咯-1-羧酸 (1-环丙基氨基草酰基-丁基)-酰胺 (Telaprevir, 威特克斯药有限公司 (Vertex Pharmaceuticals Inc.), W002018369), 3-[2-(3-叔丁基-脲基)-3,3-二甲基-丁酰基]-6,6-二甲基-3-氮杂-二环[3.1.0]己烷-2-羧酸 (2-氨基甲酰基-1-环丁基甲基-2-氧代-乙基)-酰胺 (Boceprevir, 先灵保雅研究所 (Schering-Plough Research Institute), W003062265) 和 4-氟-1,3-二氢-异吲哚-2-羧酸 14-叔丁氧基羰基氨基-4-环丙烷磺酰基氨基羰基-2,15-二氧化-3,16-二氮杂-三环[14.3.0.04,6]十九碳-7-烯-18-基酯 (ITMN-191, 国际沐恩有限公司 (InterMune Inc.), US2005/0267018)。

[0064] 本发明还包括将这样的组合物用来生产上述治疗所用药物的应用。

[0065] 在另一方面,本发明涉及上述式 (I) 或 (II) 化合物或其药学上可接受的盐的用途,它们被用于制备治疗丙型肝炎病毒感染的药物。更佳地,所述的化合物是化合物 1-60 中的一种。

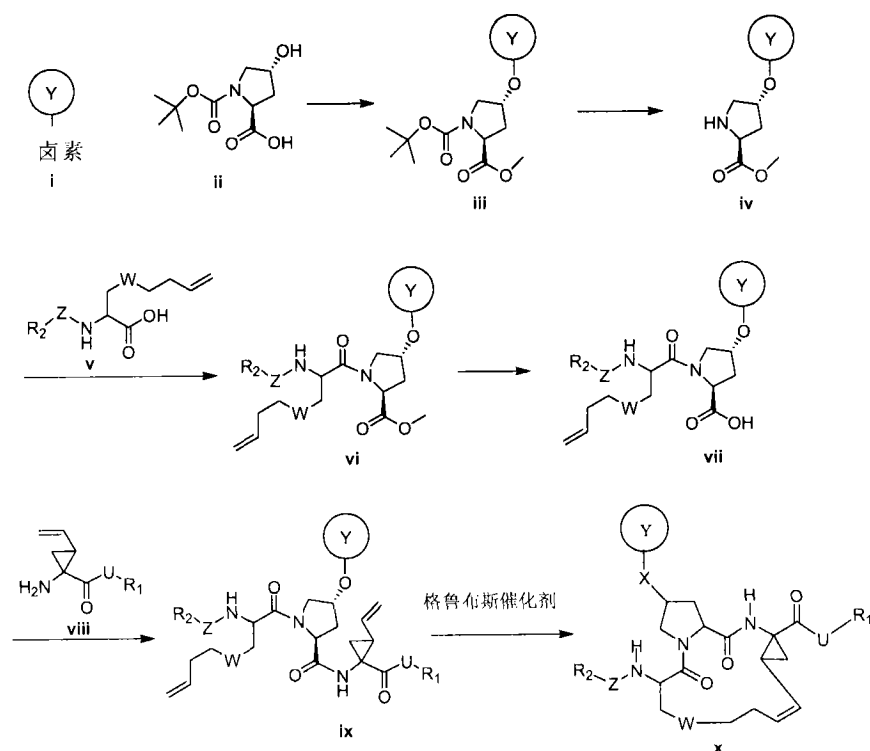
[0066] 下面对本发明的一个或多个实施方式进行详细描述。由说明书和权利要求书可以显而易见地看出本发明地其它特征、目标和优点。

具体实施方式

[0067] 本发明的化合物可以通过本领域熟知的方法,由市售的原料合成。例如,可以通过下面的流程 1 所述的流程合成本发明地化合物:

[0068] 流程 1

[0069]

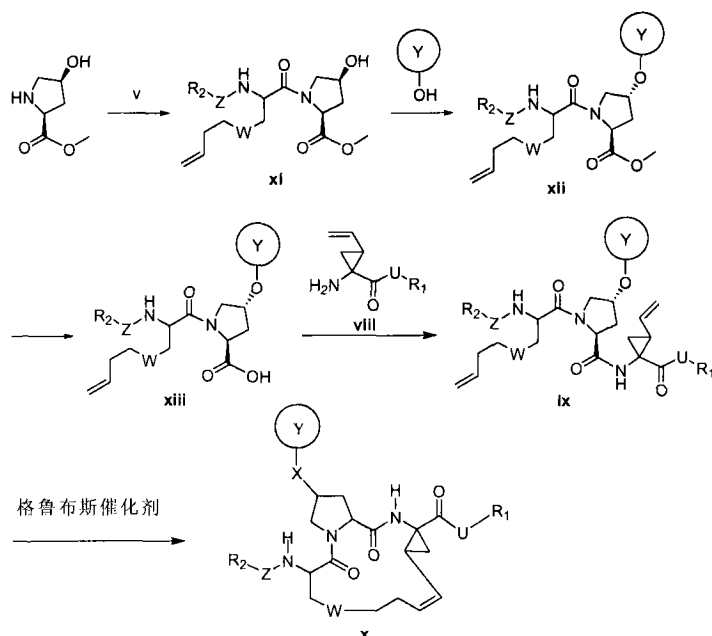


[0070] 如流程 1 所示,首先使得多环化合物 (i) 与 N-(叔丁氧基羰基)-L-脯氨酸 (ii) 偶联,然后进行甲基化,形成中间体 (iii)。中间体 (iii) 进行去保护反应,除去 N-叔丁氧基羰基,形成 N-游离化合物 (iv),其与羧酸 (v) 偶联,形成中间体 (vi)。中间体 (vi) 进行水解反应,形成酸 (vii),酸与胺化合物 (viii) 偶联,制得包含两个烯基端基的吡咯烷化合物 (ix)。中间体 (ix) 在格鲁布斯催化剂 (Grubbs' catalyst) 的存在下发生烯炔易位反应,生成所需的大环化合物 (x)。

[0071] 下面的流程 2 和 3 显示了合成本发明化合物的另外两种途径。

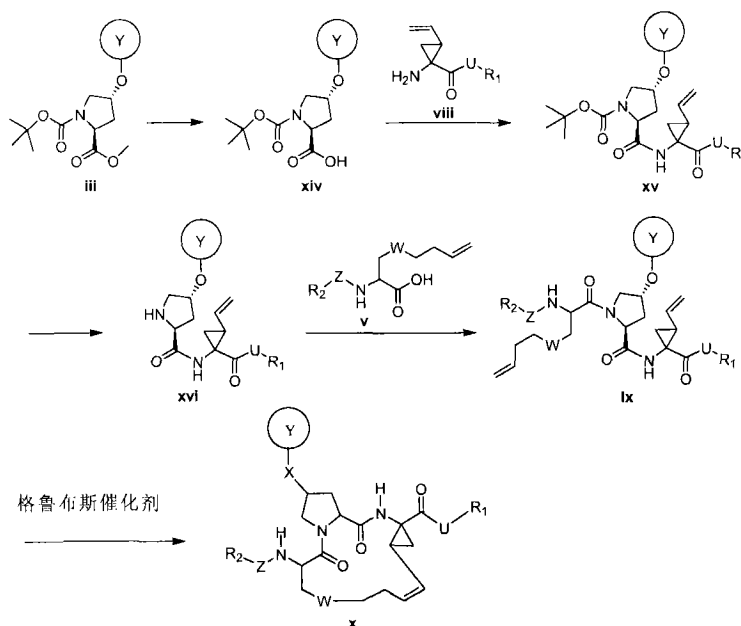
[0072] 流程 2

[0073]



[0074] 流程 3

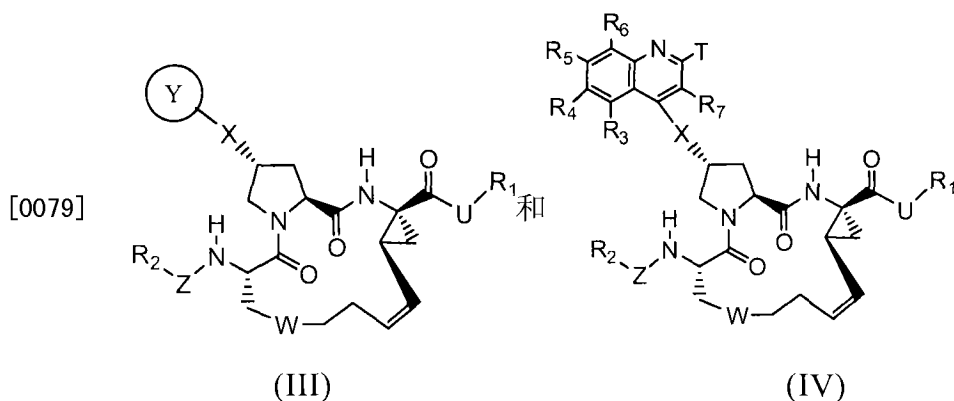
[0075]



[0076] 另外,上述方法还可包括在流程 1-3 所述步骤之前或之后添加或除去合适的保护基团的步骤,以便最终合成所需的化合物。另外,可以按照另外的次序或顺序进行各个合成步骤,以制备所需的化合物。可用来合成可用的式 (I) 化合物的合成化学转化和保护基团方法(保护和去保护)是本领域已知的,包括例如以下文献所述的那些: R. Larock, *Comprehensive Organic Transformations*, VCH 出版社(1989); T. W. Greene 和 P. G. M. Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 第二版, 约翰威力和萨孙出版社(John Wiley and Sons)(1991); L. Fieser 和 M. Fieser, *Fieser and Fieser's Reagents for Organic Synthesis*, 约翰威力和萨孙出版社(1994); 以及 L. Paquette 著的 *Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis*, 约翰威力和萨孙出版社(1995), 以及其随后的版本。

[0077] 下面的实施例 1-60 详细描述了示例性的化合物 1-60 的实际制备方式。

[0078] 本文所述的化合物包含非芳香性的双键和不对称中心。因此,它们可以是外消旋体和外消旋混合物,单独的对映异构体,独立的非对映异构体,非对映异构体混合物,互变异构体以及顺式或反式-异构形式。所有的这些异构形式都包括在本发明范围内。例如,上面显示的式 (I) 和 (II) 的化合物可分别具有以下立体化学构型 (III) 和 (IV):



[0080] 上述化合物包括这些化合物本身,如果可能的话,还可包括这些化合物的盐、前药或溶剂合物。例如,盐可以是阴离子与式 (I) 的化合物上带正电荷的基团形成的盐。合适

的阴离子包括氯离子、溴离子、碘离子、硫酸根、硝酸根、磷酸根、柠檬酸根、甲基磺酸根、三氟乙酸根、乙酸根、苹果酸根、甲苯磺酸根、酒石酸根、富马酸根、谷氨酸根、葡糖醛酸根、乳酸根、戊二酸根和马来酸根。类似地,可以由阳离子与式(I)的化合物上的带负电荷的基团(例如羧酸根)形成盐。合适的阳离子包括钠离子、钾离子、镁离子、钙离子和铵离子,例如四甲基铵离子。式(I)的化合物还可包括含有季氮原子的盐。前药的例子包括酯和其它药学上可接受的衍生物,它们在给予目标的时候,能够提供式(I)的活性化合物。溶剂合物表示式(I)的活性化合物与药学上可接受的溶剂形成的络合物。药学上可接受的溶剂的例子包括水、乙醇、异丙醇、乙酸乙酯、乙酸和乙醇胺。

[0081] 本发明还包括一种通过对病人给予有效量的一种或多种式(I)的化合物以治疗HCV感染的方法。术语“治疗”表示给予感染了HCV、表现出感染HCV的症状、或者易受HCV感染的对象所述化合物,以获得治疗效果,例如治愈、缓解、改变、影响、改善或防止HCV感染、感染HCV的症状、或者易受HCV感染的倾向。术语“有效量”表示使得被治疗的对象获得治疗效果所需的本发明活性化合物的量。本领域技术人员应当认识到,有效剂量可根据所治疗的疾病种类、给药途径、所用赋形剂、以及可能一同使用的其它治疗而改变。

[0082] 为了实施本发明的方法,包含一种或多种本发明化合物的组合物可以肠道外给药、口服给药、鼻内给药、直肠给药、局部给药或向颊给药。术语“肠道外”表示皮下注射,皮内注射,静脉注射,肌肉注射,关节内注射,动脉注射,滑膜内注射,胸骨内注射,鞘内注射,伤口内注射或颅内注射,以及任何合适的灌注技术。

[0083] 无菌可注射组合物可以是位于无毒的可不经肠道给药的可接受的稀释剂或溶剂中的溶液或悬浮液,例如在1,3-丁二醇中的溶液。可以接受的媒介物和溶剂为甘露醇,水,林格溶液和等渗氯化钠溶液。另外,通常可用不挥发性油作为溶剂或悬浮介质(例如合成的单甘油酯或二甘油酯)。脂肪酸,例如油酸及其甘油酯衍生物用来制备可注射药品,例如可使用药学上可接受的天然油类,例如橄榄油或蓖麻油,特别是它们的聚氧乙烯化形式。这些油溶液或悬浮液还可包含长链醇稀释剂或悬浮剂,羧甲基纤维素或类似的分散剂。其它常用的表面活性剂,例如吐温(Tween)或斯潘(Span)或通常用于生产药学上可接受的固体、液体或者其它剂型的其它类似的乳化剂或生物利用度促进剂,用来配制所述组合物。

[0084] 用于口服给药的组合物可以是任何可以接受的口服剂型,包括胶囊、片剂、乳液和水悬浮液、分散体和溶液。对于片剂,常用的载体包括乳糖和玉米淀粉。通常还可加入润滑剂,例如硬脂酸镁。对于胶囊形式的口服给药,可用的稀释剂包括乳糖和干燥的玉米淀粉。当水悬浮液或乳液口服给药的时候,可以将活性组份悬浮或溶解在与乳化剂或悬浮剂合并的油相中。如果需要,可以加入某些甜味剂、香料或着色剂。

[0085] 可以根据制药领域众所周知的技术制备鼻喷雾剂或鼻吸入组合物。例如,可以使用苯醇或其它合适的防腐剂、提高生物利用度的吸收促进剂、氟代烃、和/或本领域已知的其它增溶剂或分散剂来将这样的组合物制成在盐水中的溶液。

[0086] 包含一种或多种本发明的活性化合物的组合物还可以用于直肠给药的栓剂的形式给药。

[0087] 药学组合物中的载体必须是“可以接受”的,即能够与组合物的活性组份相容(优选能够使活性组份稳定化),且不会对被治疗的对象造成不利影响。可以将一种或多种增溶剂作为用来递送本发明活性组份的药物赋形剂。其它载体的例子包括胶体氧化硅、硬脂酸

镁、纤维素、月桂基硫酸钠和 D & C Yellow#10。

[0088] 上述本发明的化合物可以通过体外试验（下面的实施例 61 和 62）初步筛选，以筛选它们在治疗 HCV 感染方面的效率，然后通过动物试验和临床试验进行验证。其他的方法对于本领域普通技术人员来说也是显而易见的。

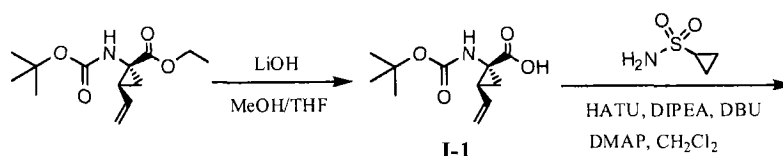
[0089] 下面的这些具体实施例仅仅使示例性的，不会对其余的公开部分构成任何限制。我们相信，本领域技术人员基于本文的描述，无需另外的工作便可最大程度地应用本发明。本文引用的出版物的所有内容都以引用的方式全文纳入本文中。

[0090] 实施例

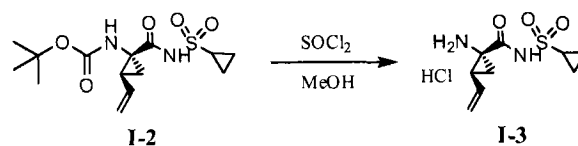
[0091] **实施例 1**：{4-环丙烷磺酰基氨基羰基-2,15-二氧化-18-[2-(4-三氟甲基-苯基)-苯并[4,5]呋喃并(furo)[3,2-d]嘧啶-4-基氧基]-3,16-二氮杂三环[14.3.0.04,6]十九碳-7-烯-14-基}-氨基甲酸环戊酯（化合物 1）的合成

[0092] 首先通过以下途径，由市售的 1-叔丁氧基羰基氨基-2-乙烯基-环丙烷羧酸乙基酯制备化合物 I-3：

[0093]



[0094]



[0095] 向 1-叔丁氧基羰基氨基-2-乙烯基-环丙烷羧酸乙基酯 (0.34 克, 1.3 毫摩尔) 在 THF (5 毫升) 和甲醇 (5 毫升) 中的溶液加入 LiOH (0.13 克, 5.3 毫摩尔) 在水 (1.4 毫升) 中的悬浮液。在室温下搅拌过夜之后, 用 10% HCl (2 毫升) 使反应结束, 真空除去溶剂。所得的固体粉末用水 (10 毫升) 洗涤, 制得化合物 I-1 (0.27 克, 90%)。MS m/z 249.9 ($M^+ + 23$); 1H NMR ($CDCl_3$) δ 10.35 (brs, 1H), 5.84-5.71 (m, 1H), 5.29 (d, $J = 17.4$ Hz, 1H), 5.12 (d, $J = 10.2$ Hz, 1H), 2.23-2.14 (m, 1H), 1.87-1.65 (m, 1H), 1.58-1.41 (m, 1H), 1.43 (s, 9H)。

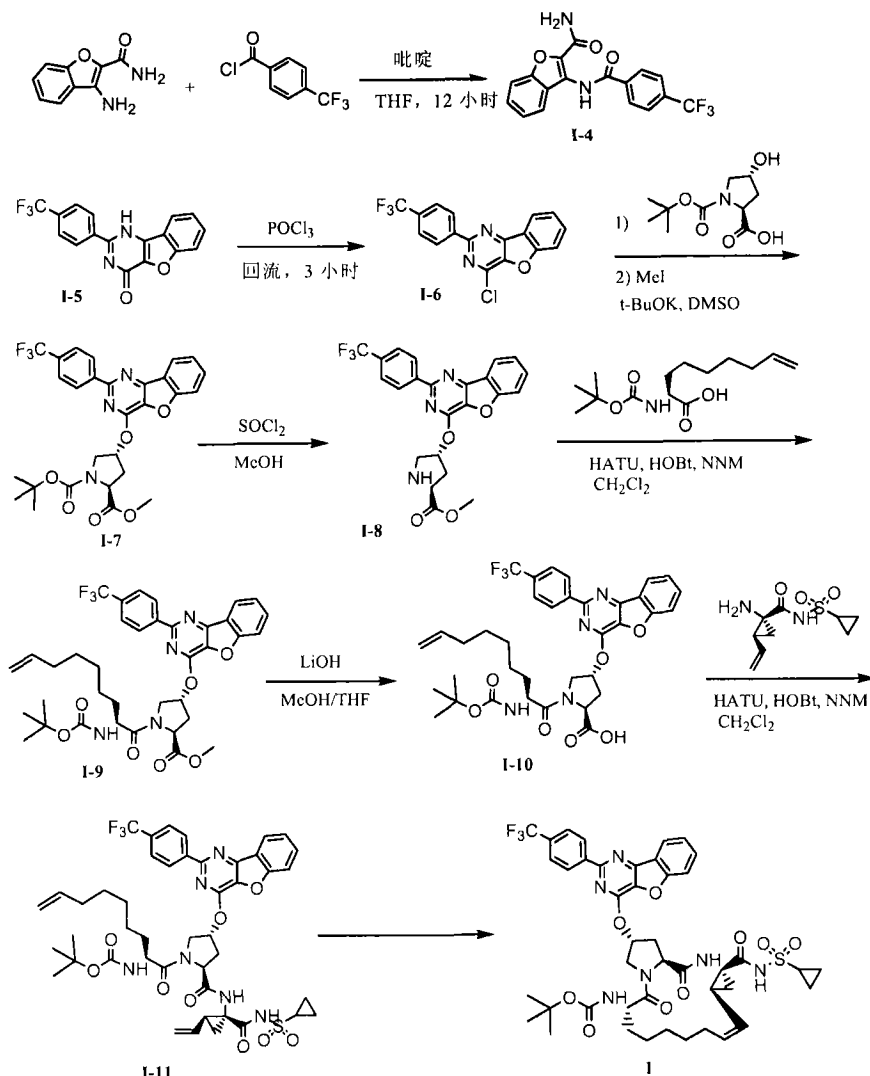
[0096] 化合物 I-1 (0.52 克, 2.3 毫摩尔), 2-(1H-7-氮杂苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基脒阳离子 (uronium) 六氟-磷酸甲铵 (methanaminium) (HATU, 1.74 克, 4.6 毫摩尔) 和 4-二甲基氨基吡啶 (1.39 克, 11.6 毫摩尔) 在 CH_2Cl_2 (40 毫升) 中的溶液在室温下搅拌 1 小时, 然后在 15 分钟内缓慢加入环丙烷磺酰胺 (0.57 克, 4.7 毫摩尔), 二异丙基乙胺 (1.81 毫升, 14.0 毫摩尔) 和 1,8-二氮杂二环[5,4,0]十一碳-7-烯 (1.80 克, 11.7 毫摩尔)。反应混合物在室温下搅拌过夜, 真空除去溶剂。残余物通过硅胶柱色谱纯化, 制得化合物 I-2 (0.51 克, 66%)。MS m/z 353.1 ($M^+ + 23$); 1H NMR ($CDCl_3$) δ 9.75 (brs, 1H), 5.64-5.51 (m, 1H), 5.30 (d, $J = 17.4$ Hz), 5.16 (d, $J = 10.2$ Hz, 1H), 2.95-2.89 (m, 1H), 2.19-2.10 (m, 1H), 1.93-1.88 (m, 1H), 1.47 (s, 9H), 1.46-1.38 (m, 1H), 1.32-1.23 (m, 2H), 1.15-1.00 (m, 2H)。

[0097] 在室温下向化合物 I-2 (0.50 克, 1.5 毫摩尔) 在 MeOH (8 毫升) 中的溶液加入 $SOCl_2$ (0.26 克, 2.2 毫摩尔)。该反应混合物回流 1 小时, 然后在真空下除去 MeOH 和 $SOCl_2$ 。残余物在戊烷中研磨, 过滤, 得到白色固体中间体 I-3 (0.32 克, 91%)。MS m/z ($M^+ + 1$);

$^1\text{H NMR}$ (CD_3COD) δ 5.77-5.65 (m, 1H), 5.43 (d, $J = 17.4\text{Hz}$, 1H), 5.32 (d, $J = 10.2\text{Hz}$, 1H), 3.06-2.97 (m, 1H), 2.45 (dd, $J = 17.4\text{Hz}$, $J = 7.8$, 1H), 2.16 (dd, $J = 8.0\text{Hz}$, $J = 7.8\text{Hz}$, 1H), 1.75 (dd, $J = 10.1\text{Hz}$, $J = 7.8\text{Hz}$, 1H), 1.32-0.86 (m, 4H)。

[0098] 化合物 1 通过以下所示的流程制备：

[0099]



[0100] 在 0°C 下搅拌 3-氨基-苯并呋喃-2-羧酰胺 (1.00 克, 5.7 毫摩尔) 和吡啶 (1 毫升, 12.26 毫摩尔) 在 THF (25 毫升) 中的溶液 10 分钟。向所得的溶液中缓慢地加入 4-三氟甲基-苯甲酰氯 (1.48 克, 7.1 毫摩尔)。然后升温至室温, 该混合物搅拌 12 小时。在减压条件下除去溶剂之后, 收集所得的固体, 用水洗涤, 空气干燥制得 I-4 (1.92 克, 96.0%)。MS : m/z 349.0 ($\text{M}^+ + 1$)。

[0101] 在 85°C 下加热 I-4 (1.92 克, 5.5 毫摩尔) 和 2N NaOH (13 毫升) 在 EtOH (25 毫升) 中的溶液 12 小时。冷却之后, 酸化该混合物, 然后除去 EtOH。收集所得的固体, 过滤, 用水洗涤, 然后干燥, 制得 I-5 (1.71 克, 95.0%)。MS m/z 331 ($\text{M}^+ + 1$)。

[0102] 回流 I-5 (1.71 克, 5.2 毫摩尔) 和过量的磷酰氯 (POCl_3) 的溶液 2 小时。冷却并充分浓缩之后, 用二氯甲烷和 10% 的氢氧化钠萃取所述混合物。有机层用 MgSO_4 干燥, 浓缩, 用 CH_2Cl_2 和正己烷结晶, 制得化合物 I-6 (1.49 克, 82%)。MS m/z 348.8, 350.9 ($\text{M}^+ + 1$); $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 8.70 (d, 2H), 8.34 (d, 1H), 7.82-7.75 (m, 4H), 7.57 (ddd, 1H)。

[0103] 在 0℃ 下向叔丁氧羰基 - 反式 -4- 羟基 -L- 脯氨酸 (0.53 克, 2.3 毫摩尔) 在 DMSO (25 毫升) 中的悬浮液加入 t-BuOK (0.82 克, 5.1 毫摩尔)。使得该混合物升温至室温, 搅拌 1 小时, 在 10℃ 缓慢地加入化合物 I-6 (0.81 克, 2.3 毫摩尔)。继续搅拌过夜。加入碘代甲烷 (1.02 克, 6.9 毫摩尔), 反应混合物在室温下再搅拌 30 分钟。所述反应混合物用 10% 的 HCl 水溶液中和至 pH 为 6 ~ 7, 用二氯甲烷进行萃取。有机层用 MgSO₄ 干燥, 真空蒸发, 用硅胶柱色谱纯化, 制得化合物 I-7 (1.12 克, 86%)。MS m/z 557.8 (M⁺+1); ¹H NMR (CDCl₃) δ 8.63 (d, 2H), 8.28 (d, 1H), 7.80-7.74 (m, 2H), 7.70 (d, 2H), 7.51 (ddd, 1H)。

[0104] 在室温下向化合物 I-7 (1.13 克, 2.0 毫摩尔) 在 MeOH (20 毫升) 的溶液中加入 SOCl₂ (1.21 克, 9.8 毫摩尔)。该反应混合物回流 1 小时, 除去 MeOH 和 SOCl₂。残余物在戊烷中研碎。过滤悬浮液, 制得白色固体状化合物 I-8 (0.87 克, 95%)。MS m/z 458.1 (M⁺+1)。

[0105] 在室温下, 向 HATU (1.12 克, 3.0 毫摩尔), 1- 羟基苯并三唑 (HOBT, 0.41 克, 3.0 毫摩尔), I-8 (0.86 克, 1.9 毫摩尔) 和 2- 叔丁氧基羰基氨基 - 壬 -8- 稀酸 (1.21 克, 1.9 毫摩尔) 在 CH₂Cl₂ (40 毫升) 中的溶液加入 N- 甲基吗啉 (NMM, 1.02 克, 9.9 毫摩尔)。搅拌过夜之后, 该混合物真空浓缩。残余物用硅胶柱色谱纯化, 制得化合物 I-9 (1.03 克, 73%)。MS m/z 711.3 (M⁺+1)。

[0106] 在室温下, 向化合物 I-9 (1.01 克, 1.4 毫摩尔) 在 THF (20 毫升) 中的溶液中加入 0.5M LiOH (5.7 毫升, 2.9 毫摩尔)。搅拌过夜之后, 反应混合物用 10% HCl 中和至 pH < 7, 真空浓缩。所得的残余物进行过滤, 用水洗涤, 得到化合物 I-10 (0.91 克, 92%)。MS :m/z 697.3 (M⁺+1)。

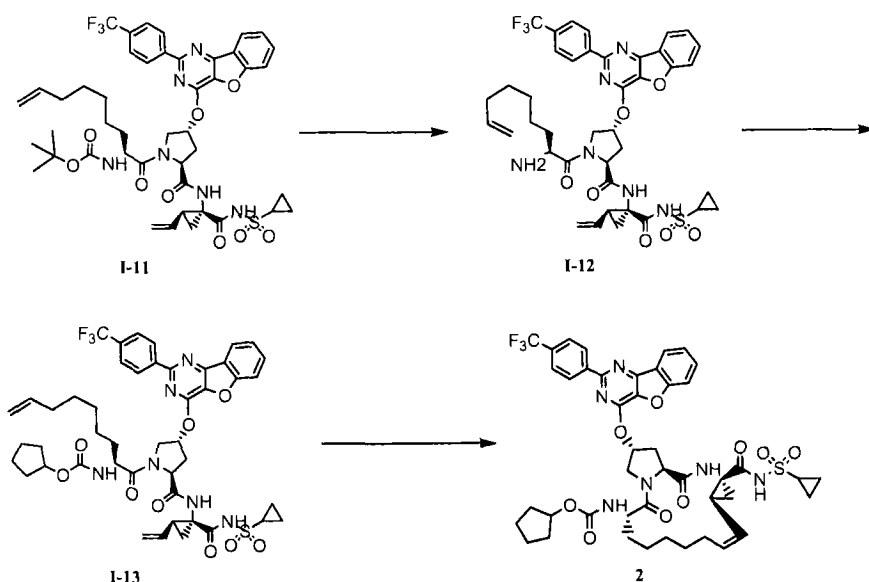
[0107] 在室温下, 将 NMM (0.12 克, 1.2 毫摩尔) 加入化合物 I-3 (0.28 克, 0.4 毫摩尔), HATU (0.31 克, 0.8 毫摩尔), HOBT (0.08 克, 0.6 毫摩尔) 和化合物 I-10 (0.09 克, 0.4 毫摩尔) 在 CH₂Cl₂ (10 毫升) 中的溶液。搅拌过夜之后, 反应混合物在真空下浓缩。残余物通过硅胶柱色谱纯化, 制得化合物 I-11 (0.10 克, 85%)。MS m/z 921.3 (M⁺+1); ¹H NMR (CDCl₃) δ 10.24 (s, 1H), 8.61 (d, 2H), 8.26 (d, 1H), 7.77 (d, 2H), 7.73-7.64 (m, 2H), 7.54-7.47 (m, 1H), 7.11 (s, 1H), 6.19 (d, 1H), 5.88-5.70 (m, 2H), 5.38-5.25 (m, 2H), 5.16 (d, 1H), 5.00-4.90 (m, 2H), 4.60 (dd, 1H), 4.88-4.34 (m, 2H), 4.18-4.10 (m, 1H), 2.98-2.89 (m, 1H), 2.68 (dd, 2H), 2.18-1.96 (m, 6H), 1.50-1.32 (m, 7H), 1.28 (s, 9H), 1.09-1.25 (m, 2H)。

[0108] 在室温和氮气气氛条件下, 向化合物 I-11 (0.10 克, 0.11 毫摩尔) 在 CH₂Cl₂ (10 毫升) 中的溶液加入第二代哈威德格拉比催化剂 (Hoveyda-Grubbs 2nd) (35 毫克, 0.056 毫摩尔)。然后, 所述反应混合物在 40℃ 搅拌 24 小时, 以进行易位成环。中止反应, 用柱色谱纯化反应混合物, 制得化合物 1 (30 毫克, 31%)。MS :m/z 881.3 (M⁺+1); ¹H NMR (CDCl₃) δ 10.39 (s, 1H), 8.59 (d, 2H), 8.21 (d, 1H), 7.77 (d, 2H), 7.69-7.57 (m, 2H), 7.46 (dd, 1H), 7.20 (s, 1H), 6.12 (s, 1H), 5.69 (q, 1H), 5.12 (d, 1H), 4.97 (dd, 1H), 4.81-4.68 (m, 2H), 4.28-4.07 (m, 2H), 2.96-2.49 (m, 3H), 2.30 (q, 1H), 1.96-1.12 (m, 14H), 1.08 (s, 9H), 0.96-0.82 (m, 2H)。

[0109] **实施例 2**: {4- 环丙烷磺酰基氨基羰基 -2, 15- 二氧化 -18- [2- (4- 三氟甲基 - 苯基) - 苯并 [4, 5] 糠基呋喃并 [3, 2-d] 嘧啶 -4- 基氧基] -3, 16- 二氮杂 - 三环 [14. 3. 0. 04, 6] 十九碳 -7- 烯 -14- 基} - 氨基甲酸环戊酯 (化合物 2) 的合成

[0110] 通过以下显示的路径制备化合物 2:

[0111]



[0112] 在室温下,向化合物 I-11 (0.11 克,0.14 毫摩尔) 在 5 毫升 CH_2Cl_2 中的溶液加入 4N 的 HCl 在二噁烷中的溶液 (2 毫升) 4 小时。通过蒸发除去 HCl,二噁烷和 CH_2Cl_2 ,得到粗产物化合物 I-12,该粗产物 I-12 不经进一步纯化,直接用于以后的步骤。

[0113] 将粗产物 I-12 溶解在 2 毫升丙烯腈中,然后加入饱和 NaHCO_3 水溶液 (1 毫升)。搅拌 10 分钟,然后在室温下将氯代甲酸环戊酯 (0.02 克,0.15 毫摩尔) 加入反应混合物中。再搅拌该反应混合物 2 小时。用饱和 NaHCO_3 水溶液中止反应,用 CH_2Cl_2 萃取该混合物,制得粗制化合物 I-13 (0.11 克,83%)。MS : m/z 921.3 (M^+); $^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3)$ δ 10.39 (s, 1H), 8.59 (d, 2H), 8.21 (d, 1H), 7.77 (d, 2H), 7.69-7.57 (m, 2H), 7.46 (dd, 1H), 7.20 (s, 1H), 6.12 (s, 1H), 5.69 (q, 1H), 5.12 (d, 1H), 4.97 (dd, 1H), 4.81-4.68 (m, 2H), 4.28-4.07 (m, 2H), 2.96-2.49 (m, 3H), 2.30 (q, 1H), 1.96-1.12 (m, 15H), 1.08 (s, 9H), 0.96-0.82 (m, 2H)。

[0114] 化合物 I-13 用第二代哈威德格拉比催化剂 (35 毫克,0.056 毫摩尔) 进行处理,以进行实施例中所所述的易位环化,制得化合物 2。MS : m/z 893.3 (M^+); $^1\text{HNMR}(\text{CDCl}_3)$ δ 10.36 (s, 1H), 8.61 (d, 2H), 8.23 (d, 1H), 7.77 (d, 2H), 7.69-7.43 (m, 3H), 7.09 (s, 1H), 6.16 (s, 1H), 5.71 (q, 1H), 5.17 (d, 1H), 4.98 (dd, 1H), 4.77 (dd, 1H), 4.48 (brs, 1H), 4.63 (d, 1H), 4.30-4.07 (m, 2H), 2.97-2.46 (m, 3H), 2.29 (q, 1H), 1.96-1.06 (m, 22H), 0.96-0.82 (m, 2H)。

[0115] 实施例 3-52: 化合物 3-52 的合成

[0116] 各化合物 3-52 依照与实施例 1 和 2 中所述类似的方式制备。

[0117] 化合物 3: MS : m/z 857.3 (M^+); $^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3)$ δ 10.42 (s, 1H), 8.41 (d, 2H), 7.97 (s, 1H), 7.51-7.35 (m, 2H), 7.20 (s, 1H), 7.02 (d, 2H), 6.10 (s, 1H), 5.68 (q, 1H), 5.16 (d, 1H), 4.96 (dd, 1H), 4.75 (dd, 1H), 4.65 (d, 1H), 4.34-4.07 (m, 2H), 3.90 (s, 3H), 2.97-2.50 (m, 3H), 2.51 (s, 3H), 2.30 (q, 1H), 2.05-0.81 (m, 25H)。

[0118] 化合物 4: MS : m/z 869.3 (M^+);

[0119] 化合物 5: MS : m/z 803.3 (M^+); $^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3)$ δ 10.31 (s, 1H), 8.29 (d, 1H), 7.67-7.54 (m, 3H), 7.44 (dd, 1H), 7.27 (d, 1H), 7.03 (s, 1H), 6.58 (dd, 1H), 6.09 (s, 1H), 5.69 (q, 1H), 5.05 (d, 1H), 4.97 (dd, 1H), 4.74 (dd, 1H), 4.63 (d, 1H), 4.26-4.04 (m, 2H),

2.95-2.20(m,4H),1.95-1.15(m,14H),1.08(s,9H),0.98-0.81(m,2H)。

[0120] 化合物 6:MS:m/z815.3(M⁺+1);¹H NMR(CDC1₃) δ 10.38(s,1H),8.29(d,1H),7.67-7.38(m,4H),7.28-7.21(m,2H),6.58(s,1H),6.11(s,1H),5.30(q,1H),5.26(d,1H),5.02-4.86(m,1H),4.80-4.68(m,1H),4.57(d,1H),4.53-4.46(m,1H),4.31-4.18(m,1H),4.08(dd,1H),2.96-2.18(m,4H),2.04-0.82(m,24H)。

[0121] 化合物 7:MS:m/z845.3(M⁺+1);

[0122] 化合物 8:MS:m/z857.3(M⁺+1);¹H NMR(CDC1₃) δ 10.33(s,1H),8.46(dd,2H),7.99(s,1H),7.46(dd,2H),7.18(dd,2H),7.02(s,1H),6.14(s,1H),5.70(q,1H),5.18-4.83(m,3H),4.73(dd,1H),4.55(d,1H),4.36-4.06(m,2H),3.63(brs,1H),2.95-2.46(m,3H),2.51(s,3H),2.25(q,1H),2.05-0.76(m,23H)。

[0123] 化合物 9:MS:m/z813.3(M⁺+1);¹H NMR(CDC1₃) δ 10.44(s,1H),8.48(dd,2H),8.23(d,1H),7.64-7.42(m,7H),6.13(s,1H),5.66(q,1H),5.25(d,1H),4.95(dd,1H),4.75(dd,1H),4.68(d,1H),4.26-4.10(m,2H),2.96-2.22(m,4H),1.93-1.15(m,22H),1.11(s,9H),0.98-0.80(m,2H)。

[0124] 化合物 10:MS:m/z825.3(M⁺+1);

[0125] 化合物 11:MS:m/z831.5(M⁺+1);¹H NMR(CDC1₃) δ 10.45(s,1H),8.42(d,2H),7.82(d,1H),7.58-7.42(m,4H),7.40-7.21(m,2H),6.07(s,1H),5.63(q,1H),5.23(d,1H),4.91(dd,1H),4.82-4.70(m,1H),4.67(d,1H),4.24-4.02(m,2H),2.94-2.36(m,3H),2.34-2.18(m,1H),1.94-1.18(m,14H),1.08(s,9H),0.98-0.78(m,2H)。

[0126] 化合物 12:MS:m/z843.3(M⁺+1);

[0127] 化合物 13:MS:m/z877.3(M⁺+1);¹H NMR(CDC1₃) δ 10.38(s,1H),8.51(d,2H),8.19(d,1H),7.78(dd,1H),7.40-7.24(m,2H),7.06(d,2H),6.12(s,1H),5.70(q,1H),5.10(d,1H),4.98(dd,1H),4.68(brs,1H),4.58(d,1H),4.32-4.12(m,2H),3.91(s,3H),2.98-0.78(m,30H)。

[0128] 化合物 14:MS:m/z861.3(M⁺+1);¹H NMR(CDC1₃) δ 10.35(s,1H),8.43(d,2H),8.18(dd,1H),7.76(dd,1H),7.38-7.28(m,3H),7.08(s,1H),6.11(s,1H),5.69(q,1H),5.02(d,1H),4.95(dd,1H),4.67(dd,1H),4.59(d,1H),4.28-4.08(m,2H),2.95-2.48(m,3H),2.44(s,3H),2.32-2.16(m,1H),1.94-0.78(m,25H)。

[0129] 化合物 15:MS:m/z847.2,849.2(M⁺+1);¹H NMR(CDC1₃) δ 10.40(s,1H),8.42(d,2H),8.14(s,1H),7.58-7.42(m,5H),7.38(s,1H),6.07(s,1H),5.64(q,1H),5.16(d,1H),4.93(dd,1H),4.75(dd,1H),4.65(d,1H),4.24-4.30(m,1H),2.95-2.20(m,4H),1.96-1.68(m,5H),1.60-1.20(m,10H),1.09(s,9H),0.98-0.80(m,2H)。

[0130] 化合物 16:MS:m/z859.6,861.6(M⁺+1);¹H NMR(CDC1₃) δ 10.29(s,1H),8.46(dd,2H),8.20(s,1H),7.60-7.49(m,5H),6.98(s,1H),6.16(s,1H),5.69(q,1H),5.10(d,1H),4.95(dd,1H),4.73(dd,1H),4.55(d,1H),4.25-4.10(m,2H),2.96-2.22(m,4H),1.96-0.84(m,25H)。

[0131] 化合物 17:MS:m/z843.3(M⁺+1);¹H NMR(CDC1₃) δ 10.41(s,1H),8.44(d,2H),8.23(d,1H),7.68-7.42(m,3H),7.19(s,1H),7.04(d,2H),6.14(s,1H),5.68(q,1H),5.15(d,1H),4.97(dd,1H),4.78-4.73(m,1H),4.65(d,1H),4.25(dd,1H),4.12(d,1H),

3. 90 (s, 3H), 2. 96-2. 22 (m, 4H), 1. 96-1. 17 (m, 14H), 1. 13 (s, 9H), 0. 96-0. 82 (m, 2H)。

[0132] 化合物 18 :MS :m/z855. 3 (M^+); ^1H NMR (CDCl_3) δ 10. 37 (s, 1H), 8. 45 (d, 2H), 8. 25 (d, 1H), 7. 70-7. 53 (m, 2H), 7. 45 (d, 1H), 7. 09 (s, 1H), 7. 04 (d, 2H), 6. 17 (s, 1H), 5. 69 (q, 1H), 5. 24 (d, 1H), 4. 98 (dd, 1H), 4. 75 (dd, 1H), 4. 57 (d, 1H), 4. 30-4. 09 (m, 2H), 3. 90 (s, 3H), 2. 97-2. 44 (m, 3H), 2. 28 (q, 1H), 1. 96-1. 06 (m, 25H), 0. 96-0. 82 (m, 2H)。

[0133] 化合物 19 :MS :m/z848. 3 (M^+); ^1H NMR (CDCl_3) δ 10. 48 (s, 1H), 8. 77 (s, 1H), 8. 74 (d, 1H), 8. 34 (d, 1H), 8. 24 (d, 1H), 7. 55-46 (m, 2H), 7. 19 (dd, 1H), 6. 96 (d, 1H), 6. 14 (s, 1H), 5. 70 (q, 1H), 5. 05-4. 94 (m, 2H), 4. 70 (dd, 1H), 4. 63 (d, 1H), 4. 67-4. 51 (m, 2H), 2. 96-2. 51 (m, 3H), 2. 28 (q, 1H), 1. 96-1. 12 (m, 14H), 1. 12 (s, 9H), 0. 96-0. 82 (m, 2H)。

[0134] 化合物 20 :MS :m/z846. 3 (M^+);

[0135] 化合物 21 :MS :m/z838. 3 (M^+); ^1H NMR (CDCl_3) δ 10. 34 (s, 1H), 8. 28 (d, 1H), 8. 11 (dd, 1H), 7. 82 (dd, 1H), 7. 62-7. 52 (m, 2H), 7. 40 (ddd, 1H), 7. 07 (s, 1H), 6. 15 (s, 1H), 5. 65 (q, 1H), 5. 06 (d, 1H), 4. 93 (dd, 1H), 4. 75 (d, 1H), 4. 68 (dd, 1H), 4. 26-4. 16 (m, 1H), 4. 07 (dd, 1H), 2. 92-2. 50 (m, 3H), 2. 30 (q, 1H), 1. 93-0. 81 (m, 25H)。

[0136] 化合物 22 :MS :m/z850. 3 (M^+); ^1H NMR (CDCl_3) δ 10. 34 (s, 1H), 8. 28 (d, 1H), 8. 10 (dd, 1H), 7. 92 (dd, 1H), 7. 62-7. 52 (m, 2H), 7. 38 (ddd, 1H), 7. 12 (s, 1H), 6. 11 (s, 1H), 5. 64 (q, 1H), 5. 19 (d, 1H), 4. 97-4. 83 (m, 2H), 4. 76 (d, 1H), 4. 66 (dd, 1H), 4. 31-4. 20 (m, 1H), 4. 06 (dd, 1H), 2. 94-2. 48 (m, 3H), 2. 28 (q, 1H), 1. 90-0. 82 (m, 24H)。

[0137] 化合物 23 :MS :m/z804. 3 (M^+); ^1H NMR (CDCl_3) δ 10. 41 (s, 1H), 8. 31 (d, 1H), 8. 13 (dd, 1H), 7. 79 (dd, 1H), 7. 67-7. 56 (m, 2H), 7. 46 (dd, 1H), 7. 39 (ddd, 1H), 7. 16 (s, 1H), 6. 18 (s, 1H), 5. 66 (q, 1H), 5. 07 (d, 1H), 4. 94 (dd, 1H), 4. 75 (d, 1H), 4. 68 (dd, 1H), 4. 27-4. 17 (m, 1H), 4. 08 (dd, 1H), 2. 93-2. 48 (m, 3H), 2. 31 (q, 1H), 1. 92-1. 26 (m, 13H), 1. 22 (s, 9H), 1. 20-0. 81 (m, 4H)。

[0138] 化合物 24 :MS :m/z816. 3 (M^+); ^1H NMR (CDCl_3) δ 10. 33 (s, 1H), 8. 30 (d, 1H), 8. 11 (dd, 1H), 7. 88 (dd, 1H), 7. 67-7. 56 (m, 2H), 7. 46 (dd, 1H), 7. 43-7. 30 (m, 2H), 6. 12 (s, 1H), 5. 64 (q, 1H), 5. 22 (d, 1H), 4. 92 (dd, 1H), 4. 77 (d, 1H), 4. 66 (dd, 1H), 4. 32-4. 22 (m, 1H), 4. 04 (dd, 1H), 2. 93-2. 46 (m, 3H), 2. 31 (q, 1H), 1. 92-0. 80 (m, 25H)。

[0139] 化合物 25 :MS :m/z818. 3 (M^+);

[0140] 化合物 26 :MS :m/z830. 3 (M^+); ^1H NMR (CDCl_3) δ 10. 40 (s, 1H), 8. 18-8. 00 (m, 2H), 7. 85 (d, 1H), 7. 55 (s, 1H), 7. 47-7. 25 (m, 3H), 6. 09 (s, 1H), 5. 65 (q, 1H), 5. 21 (d, 1H), 5. 02-4. 66 (m, 4H), 4. 33-4. 20 (m, 1H), 4. 04 (d, 1H), 4. 03 (s, 3H), 2. 95-2. 40 (m, 6H), 2. 32 (q, 1H), 1. 96-0. 78 (m, 24H)。

[0141] 化合物 27 :MS :m/z786. 3 (M^+);

[0142] 化合物 28 :MS :m/z798. 3 (M^+); ^1H NMR (CDCl_3) δ 10. 37 (s, 1H), 8. 35 (d, 1H), 8. 22 (d, 1H), 8. 17 (d, 1H), 7. 67-7. 61 (m, 3H), 7. 49-7. 38 (m, 2H), 7. 33 (s, 1H), 6. 17 (s, 1H), 5. 64 (q, 1H), 5. 29 (d, 1H), 4. 92 (dd, 1H), 4. 83-4. 64 (m, 2H), 4. 33 (dd, 1H), 4. 08 (d, 1H), 2. 96-2. 24 (m, 4H), 1. 91-1. 02 (m, 23H), 0. 96-0. 82 (m, 2H)。

[0143] 化合物 29 :MS :m/z834. 3 (M^+); ^1H NMR (CDCl_3) δ 10. 31 (s, 1H), 8. 20-8. 09 (m, 1H), 7. 87 (d, 1H), 7. 78 (d, 1H), 7. 45-7. 32 (m, 2H), 7. 14 (s, 1H), 7. 12 (d, 1H), 6. 25 (s, 1H),

5.66 (q, 1H), 5.06 (d, 1H), 4.94 (dd, 1H), 4.77 (d, 1H), 4.72-4.62 (m, 1H), 4.29-4.14 (m, 1H), 4.09 (d, 1H), 4.03 (s, 3H), 2.93-2.24 (m, 4H), 1.96-0.78 (m, 25H)。

[0144] 化合物 30 :MS :m/z847.3 (M^{+1}) ; 1H NMR($CDCl_3$) δ 10.37 (s, 1H), 8.13 (dd, 1H), 7.93-7.77 (m, 2H), 7.46-7.28 (m, 3H), 7.12 (d, 1H), 6.19 (s, 1H), 5.64 (q, 1H), 5.21 (d, 1H), 4.98-4.83 (m, 2H), 4.77 (d, 1H), 4.64 (dd, 1H), 4.34-4.05 (m, 2H), 4.02 (s, 3H), 2.92-2.24 (m, 4H), 1.94-0.76 (m, 24H)。

[0145] 化合物 31 :MS :m/z848.3 (M^{+1}) ; 1H NMR($CDCl_3$) δ 10.29 (s, 1H), 8.16 (dd, 1H), 7.88 (d, 1H), 7.81 (dd, 1H), 7.48-7.34 (m, 2H), 7.20-7.06 (d, 2H), 6.27 (s, 1H), 5.69 (q, 1H), 5.05 (d, 1H), 4.96 (dd, 1H), 4.83 (d, 1H), 4.69 (dd, 1H), 4.36-4.16 (m, 3H), 4.10 (dd, 1H), 2.95-2.54 (m, 3H), 2.36 (q, 1H), 1.96-0.81 (m, 28H)。

[0146] 化合物 32 :MS :m/z860.3 (M^{+1}) ; 1H NMR($CDCl_3$) δ 10.41 (s, 1H), 8.10 (dd, 1H), 7.93-7.68 (m, 3H), 7.39-7.28 (m, 2H), 7.09 (d, 1H), 6.12 (s, 1H), 5.58 (q, 1H), 5.38 (d, 1H), 4.96-4.76 (m, 3H), 4.68 (dd, 1H), 4.36-4.19 (m, 3H), 4.05 (dd, 1H), 2.92-2.30 (m, 4H), 1.94-0.76 (m, 27H)。

[0147] 化合物 33 :MS :m/z816.3 (M^{+1}) ; 1H NMR($CDCl_3$) δ 10.33 (s, 1H), 8.31 (d, 1H), 8.11 (d, 1H), 7.66-7.56 (m, 2H), 7.51-7.41 (m, 2H), 7.06 (s, 1H), 7.05 (dd, 1H), 6.16 (s, 1H), 5.40 (q, 1H), 5.07 (d, 1H), 4.95 (dd, 1H), 4.76 (d, 1H), 4.64 (dd, 1H), 4.32-4.21 (m, 1H), 4.06 (dd, 1H), 3.92 (s, 3H), 2.93-2.24 (m, 4H), 1.94-0.78 (m, 25H)。

[0148] 化合物 34 :MS :m/z828.3 (M^{+1}) ; 1H NMR($CDCl_3$) δ 10.41 (s, 1H), 8.30 (d, 1H), 8.08 (d, 1H), 7.67-7.55 (m, 3H), 7.46 (d, 1H), 7.42 (s, 1H), 7.03 (dd, 1H), 6.12 (s, 1H), 5.63 (q, 1H), 5.52-5.40 (m, 1H), 5.32 (d, 1H), 5.10-4.64 (m, 3H), 4.38-4.26 (m, 1H), 4.13-4.02 (m, 1H), 3.90 (s, 3H), 2.93-2.24 (m, 4H), 2.04-0.81 (m, 24H)。

[0149] 化合物 35 :MS :m/z830.3 (M^{+1})。

[0150] 化合物 36 :MS :m/z842.4 (M^{+1}) ; 1H NMR($CDCl_3$) δ 10.37 (s, 1H), 8.11 (s, 1H), 8.09 (d, 1H), 7.54-7.38 (m, 4H), 7.02 (d, 1H), 6.10 (s, 1H), 5.62 (q, 1H), 5.33 (d, 1H), 4.96-4.62 (m, 3H), 4.33 (dd, 1H), 4.06 (dd, 1H), 3.90 (s, 3H), 2.96-2.62 (m, 3H), 2.53 (s, 3H), 2.50-2.24 (m, 1H), 1.91-0.82 (m, 24H)。

[0151] 化合物 37 :MS :m/z846.4 (M^{+1}) ; 1H NMR($CDCl_3$) δ 10.35 (s, 1H), 8.15 (d, 1H), 8.07 (d, 1H), 7.43 (s, 1H), 7.11-6.96 (m, 4H), 6.09 (s, 1H), 5.68 (q, 1H), 5.10-5.00 (m, 1H), 4.96 (dd, 1H), 4.75 (d, 1H), 4.68-4.57 (m, 1H), 4.34-4.22 (m, 1H), 4.05 (d, 1H), 3.94 (s, 6H), 2.95-2.22 (m, 4H), 1.95-0.76 (m, 25H)。

[0152] 化合物 38 :MS :m/z858.3 (M^{+1})。

[0153] 化合物 39 :MS :m/z862.4 (M^{+1})。

[0154] 化合物 40 :MS :m/z874.4 (M^{+1}) ;

[0155] 化合物 41 :MS :m/z848.3 (M^{+1}) ; 1H NMR($CDCl_3$) δ 10.37 (s, 1H), 8.25 (dd, 1H), 7.75 (dd, 1H), 7.23 (d, 1H), 7.50 (d, 1H), 7.25-7.14 (m, 3H), 6.15 (s, 1H), 5.62 (q, 1H), 5.17 (d, 1H), 4.90 (dd, 1H), 4.76 (d, 1H), 4.68 (dd, 1H), 4.29-4.02 (m, 4H), 2.92-2.45 (m, 3H), 2.29 (q, 1H), 1.92-0.81 (m, 28H)。

[0156] 化合物 42 :MS :m/z818.3 (M^{+1}) ; 1H NMR($CDCl_3$) δ 10.34 (s, 1H), 8.26 (dd, 1H),

7.82-7.18(m, 3H), 7.51(d, 1H), 7.26-7.14(m, 2H), 6.18(s, 1H), 5.66(q, 1H), 5.21(d, 1H), 4.94(dd, 1H), 4.80-4.64(m, 2H), 4.34-4.02(m, 5H), 2.92-2.20(m, 4H), 1.96-0.78(m, 27H)。

[0157] 化合物 43 :MS :m/z834.3 (M^{+1}) ; ^1H NMR(CDCl_3) δ 10.40(s, 1H), 8.15(d, 1H), 8.09(dd, 1H), 7.77(dd, 1H), 7.43-7.32(m, 1H), 7.21(s, 1H), 7.10-7.01(m, 2H), 6.11(s, 1H), 5.68(q, 1H), 5.09(d, 1H), 4.96(dd, 1H), 4.76(d, 1H), 4.68(dd, 1H), 4.32-4.02(m, 2H), 3.95(s, 3H), 2.94-2.28(m, 4H), 1.96-0.79(m, 25H)。

[0158] 化合物 44 :MS :m/z846.3 (M^{+1}) ; ^1H NMR(CDCl_3) . 10.34(s, 1H), 8.18(d, 1H), 8.12(dd, 1H), 7.86(d, 1H), 7.46-7.35(m, 1H), 7.11(s, 1H), 7.05(dd, 1H), 6.98(s, 1H), 6.12(s, 1H), 5.71(q, 1H), 5.12(d, 1H), 4.02-4.93(m, 2H), 4.80(d, 1H), 4.65(dd, 1H), 4.36-4.24(m, 1H), 4.12-4.01(m, 1H), 3.97(s, 3H), 2.96-2.24(m, 4H), 1.96-0.79(m, 24H)。

[0159] 化合物 45 :MS :m/z862.3 (M^{+1})。

[0160] 化合物 46 :MS :m/z874.3 (M^{+1})。

[0161] 化合物 47 :MS :m/z834.3 (M^{+1}) ; ^1H NMR(CDCl_3) δ 10.45(s, 1H), 8.28(dd, 1H), 8.07-7.85(m, 2H), 7.39(dd, 1H), 7.23-7.13(m, 3H), 6.40(s, 1H), 5.66(q, 1H), 5.02(d, 1H), 4.93(dd, 1H), 4.82(d, 1H), 4.70(dd, 1H), 4.24-4.14(m, 1H), 4.09(dd, 1H), 4.03(s, 3H), 2.94-2.28(m, 4H), 1.96-0.79(m, 25H)。

[0162] 化合物 48 :MS :m/z804.3 (M^{+1}) ; ^1H NMR(CDCl_3) δ 10.39(s, 1H), 8.25(d, 1H), 8.14(d, 1H), 8.01(dd, 1H), 7.65(dd, 1H), 7.56(dd, 1H), 7.46-7.31(m, 3H), 6.14(s, 1H), 5.62(q, 1H), 5.21(d, 1H), 4.90(dd, 1H), 4.76(d, 1H), 4.70(dd, 1H), 4.34-4.23(m, 1H), 4.14-4.03(m, 1H), 2.91-2.24(m, 4H), 2.05-0.82(m, 25H)。

[0163] 化合物 49 :MS :m/z816.3 (M^{+1}) ; ^1H NMR(CDCl_3) δ 10.40(s, 1H), 8.22(d, 1H), 8.11(d, 1H), 7.98(dd, 1H), 7.62(dd, 1H), 7.58-7.50(m, 2H), 7.43-7.28(m, 2H), 6.10(s, 1H), 5.57(q, 1H), 5.36(d, 1H), 4.96-4.82(m, 1H), 4.80-4.64(m, 3H), 4.36-4.01(m, 2H), 2.91-2.22(m, 4H), 2.10-0.81(m, 24H)。

[0164] 化合物 50 :MS :m/z804.3 (M^{+1}) ; ^1H NMR(CDCl_3) δ 10.01(s, 1H), 8.20(d, 1H), 8.11(d, 1H), 8.01(dd, 1H), 7.75(dd, 1H), 7.58(d, 1H), 7.35-7.01(m, 3H), 6.11(s, 1H), 5.58-5.42(m, 2H), 4.68(dd, 1H), 4.19-4.03(m, 3H), 3.94(s, 3H), 2.91-2.24(m, 4H), 2.05-0.82(m, 25H)。

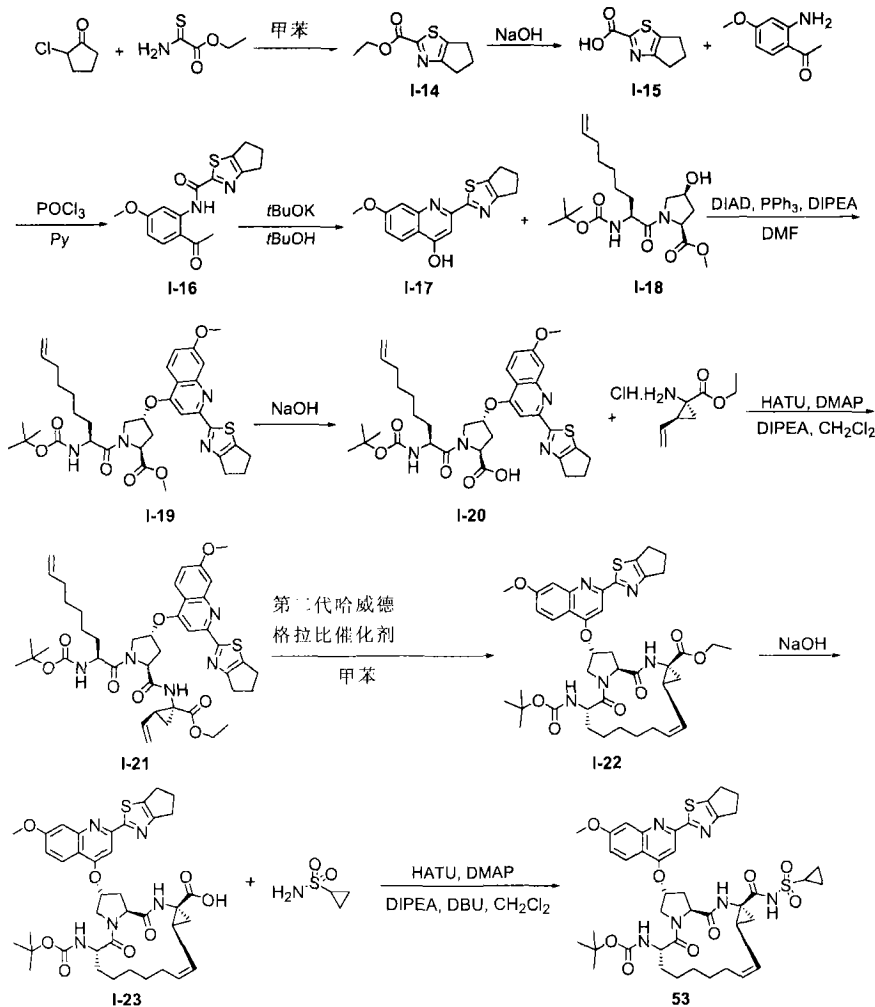
[0165] 化合物 51 :MS :m/z816.3 (M^{+1}) ; ^1H NMR(CDCl_3) δ 10.28(s, 1H), 8.25(d, 1H), 8.15(d, 1H), 8.01(dd, 1H), 7.67(dd, 1H), 7.58(dd, 1H), 7.45(dd, 1H), 7.35(ddd, 1H), 6.96(s, 1H), 6.18(s, 1H), 5.67(q, 1H), 5.16(d, 1H), 4.94(dd, 1H), 4.98-4.61(m, 2H), 4.35-4.24(m, 1H), 4.08(dd, 1H), 2.91-2.22(m, 4H), 2.10-0.81(m, 24H)。

[0166] 化合物 52 :MS :m/z846.3 (M^{+1})。

[0167] 实施例 53 : {4-环丙烷磺酰基氨基羰基-18-[2-(5,6-二氢-4H-环戊并噻唑-2-基)-7-甲氧基-喹啉-4-基氧基]-2,15-二氧代-3,16-二氮杂三环[14.3.0.04,6]十九碳-7-烯-14-基}-氨基甲酸叔丁基酯的合成

[0168] 通过以下流程制备化合物 53 :

[0169]



[0170] 氨基-硫代-乙酸乙酯 (6.00 克, 45.0 毫摩尔) 和 2-氯代-环戊酮 (5.60 克, 47.0 毫摩尔) 在甲苯中的混合物回流加热 4 小时。将这样制得的棕色溶液冷却至室温, 用 EtOAc (50 毫升) 稀释, 用 NaHCO₃ 饱和水溶液 (50 毫升) 和盐水 (50 毫升) 洗涤, 用无水 MgSO₄ 干燥, 过滤并真空浓缩。米黄色固体通过在硅胶柱上由快速色谱法纯化 (EtOAc 在己烷中的 10% 的溶液) 制得浅棕色粘性油状物 5,6-二氢-4H-环戊并噻唑-2-羧酸乙基酯 I-14 (7.60 克, 86%)。ESI-MS(M+H⁺) = 198.3。

[0171] 在室温下, 5,6-二氢-4H-环戊并噻唑-2-羧酸乙基酯 I-14 (2.00 克, 10.0 毫摩尔) 在 4:1:1 的 THF/MeOH/H₂O (30 毫升) 中的溶液用 2N 的 NaOH 水溶液 (7.5 毫升, 1.5 当量) 处理 5 小时。该混合物真空干燥, 制得 5,6-二氢-4H-环戊并噻唑-2-羧酸 I-15, 其不经进一步纯化, 直接用于以下的步骤。ESI-MS(M+H⁺) = 170.2。

[0172] 使用冷却浴将 4-甲氧基-2-氨基-苯乙酮 (1.67 克, 10.0 毫摩尔) 和 5,6-二氢-4H-环戊并噻唑-2-羧酸 I-15 (1.69 克, 10.0 毫摩尔) 在吡啶 (80 毫升) 中的溶液冷却至 -30℃。然后在 15 分钟的时间内滴加磷酰氯 (2.8 毫升, 30.0 毫摩尔)。该反应在 -30℃ 搅拌 0.5 小时, 移去冷却浴, 使得反应混合物升温至室温。反应混合物搅拌 2 小时之后, 将其倒入冰水中。用 2N 的 NaOH 水溶液将混合物的 pH 值调节到 11, 该混合物用 CH₂Cl₂ 萃取。有机层用无水 MgSO₄ 干燥, 过滤, 真空浓缩。粗产物在硅胶柱上通过快速色谱纯化 (EtOAc 在己烷中的 30% 的溶液), 制得米黄色固体酰胺化合物 I-16 (1.10 克, 35%)。ESI-MS(M+H⁺) = 317.3。

[0173] 将 *t*-BuOK (1.00 克, 8.8 毫摩尔) 加入酰胺化合物 I-16 (0.71 克, 2.2 毫摩尔) 在无水 *t*-BuOH (10 毫升) 中的悬浮液。该反应混合物回流加热 2 小时, 冷却至室温, 通过加入 HCl (在二噁烷中的浓度为 4N, 3 毫升) 酸化。该混合物真空浓缩, 将所得的残余物倒入 10% 的 KHSO₄ 溶液。过滤之后, 所述固体用醚和水洗涤, 真空干燥, 制得米黄色固体喹啉化合物 I-17 (0.41 克, 61%)。¹H NMR (CDCl₃-CD₃OD) δ 2.76-2.90 (m, 2H), 3.18 (t, J = 6.6Hz, 2H), 3.28 (t, J = 6.6Hz, 2H), 3.55 (s, 2H), 3.59 (s, 1H), 7.26-7.38 (m, 1H), 7.46-7.72 (m, 2H), 8.41 (d, J = 8.7Hz, 1H). ESI-MS (M+H⁺) = 299.4。

[0174] 将喹啉化合物 I-17 (0.66 克, 2.2 毫摩尔), 脯氨酸化合物 I-18 (0.89 克, 2.2 毫摩尔) 和三苯基膦 (1.2 克, 4.5 毫摩尔) 在 DMF (30 毫升) 中的溶液冷却至 0°C。在 15 分钟内滴加二异丙基偶氮二羧酸酯 (DIAD, 0.9 毫升, 4.5 毫摩尔)。然后该反应混合物缓慢地升温至室温, 连续搅拌过夜。真空除去溶剂, 然后该混合物用 CH₂Cl₂ (100 毫升) 稀释, 用水 (100 毫升) 和盐水 (50 毫升) 洗涤, 用无水 MgSO₄ 干燥, 过滤并真空浓缩。残余物在硅胶柱上通过快速色谱纯化 (EtOAc 在己烷中 50% 的溶液), 制得酯化合物 I-19 (1.23 克, 82%)。ESI-MS (M+H⁺) = 679.3。

[0175] 将 2N 的 NaOH 水溶液 (10 毫升) 加入酯化合物 I-19 (1.91 克, 被三苯基磷酸酯氧化物 (triphenylphosphate oxide) 污染) 在 THF (40 毫升) 中的溶液。另外加入 10 毫升 MeOH, 以得到均一的溶液, 所得的溶液在室温下搅拌 4 小时。该混合物用 1N 的 HCl 酸化至 pH = 3, 然后用 CH₂Cl₂ 萃取两次。有机层用无水 MgSO₄ 干燥, 过滤, 然后真空浓缩。在硅胶柱上通过快速色谱纯化 (MeOH 在 CH₂Cl₂ 中 10% 的溶液), 制得黄色固体状酸化合物 I-20 (0.94 克, 1.4 毫摩尔, 两步产率 64%)。ESI-MS (M+H⁺) = 665.3。

[0176] 酸化合物 I-20 (0.73 克, 1.1 毫摩尔), HATU (0.91 克, 2.2 毫摩尔) 和 DMAP (0.1 克, 1.1 毫摩尔) 在 CH₂Cl₂ (30 毫升) 中的溶液在室温下搅拌 0.5 小时, 然后加入 1-氨基-2-乙氧基环丙烷羧酸乙酯 (0.29 克, 1.1 毫摩尔) 和 DIPEA (1.2 毫升, 6.7 毫摩尔) 在 CH₂Cl₂ (20 毫升) 中的溶液。加完之后, 反应混合物在室温下再搅拌 6 小时, 用 CH₂Cl₂ (100 毫升) 稀释, 用水 (100 毫升) 和盐水 (50 毫升) 洗涤, 用无水 MgSO₄ 干燥, 过滤, 然后真空浓缩。残余物在硅胶柱上通过快速色谱纯化 (EtOAc 在己烷中 50% 的溶液), 得到黄色固体状酯化合物 I-21 (0.72 克, 82%)。ESI-MS (M+H⁺) = 802.3。

[0177] 用氮气对酯化合物 I-21 (0.68 克, 0.85 毫摩尔) 在甲苯 (70 毫升) 中的溶液进行脱气, 在室温下加入第二代哈威德格拉比催化剂 (0.05 克, 10 摩尔%)。该反应混合物加热至 50°C, 加热过夜。浓缩溶剂, 残余物在硅胶柱上通过快速色谱纯化 (MeOH 在醚中 1% 的溶液), 制得产物 I-22 (0.33 克, 50%)。ESI-MS (M+H⁺) = 774.3。

[0178] 将 2N 的 NaOH 水溶液 (6 毫升) 加入酯化合物 I-22 (0.33 克, 0.43 毫摩尔) 在 THF (30 毫升) 中的溶液中。再加入 6 毫升的 MeOH, 得到均一的溶液, 所得的溶液在室温下搅拌 2 小时。该混合物用 1N 的 HCl 酸化至 pH = 3, 然后用 CH₂Cl₂ 萃取两次。有机层用无水 MgSO₄ 干燥, 过滤, 真空浓缩。粗化合物 I-23 不经进一步纯化, 直接用于下一步。ESI-MS (M+H⁺) = 746.3。

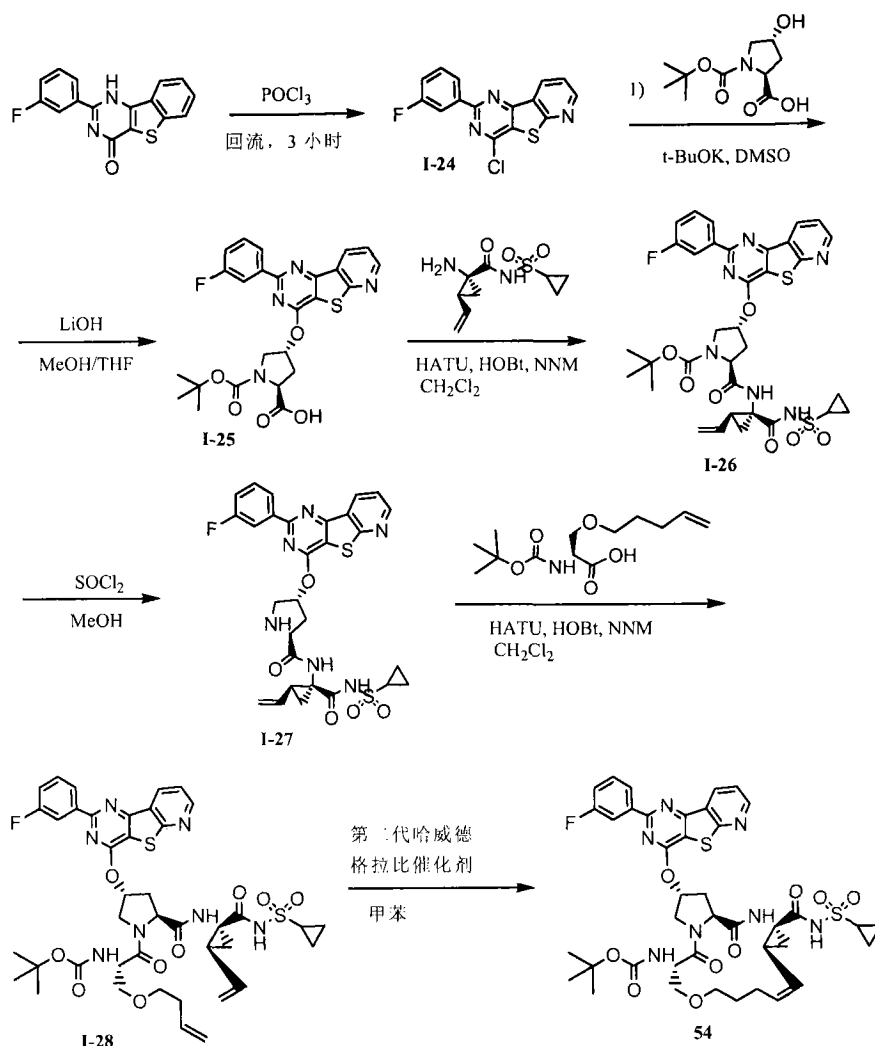
[0179] 酸化合物 I-23 (0.23 克, 0.3 毫摩尔), HATU (0.23 克, 0.6 毫摩尔) 和 DMAP (0.03 克, 0.3 毫摩尔) 在 THF (20 毫升) 中的溶液在室温下搅拌 0.5 小时, 然后加入环丙烷磺酰胺 (0.11 克, 0.9 毫摩尔), DIPEA (0.3 毫升, 2 毫摩尔) 和 DBU (0.3 毫升, 2 毫摩

尔)。加完之后,反应混合物加热至 50℃ 6 小时,用 CH_2Cl_2 稀释 (100 毫升),用水 (50 毫升) 和盐水 (50 毫升) 洗涤,用无水 MgSO_4 干燥,过滤并真空浓缩。残余物在硅胶柱上通过快速色谱纯化 (EtOAc 在己烷中 50% 的溶液), 制得黄色固体状化合物 53 (0.12 克, 47%)。MS: m/z 849.3 (M^+); $^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3)$ δ 10.24 (s, 1H), 8.00 (d, 1H), 7.45 (s, 1H), 7.34 (s, 1H), 7.13 (s, 1H), 7.00 (dd, 1H), 5.62 (q, 1H), 5.45–5.38 (m, 1H), 5.24 (d, 1H), 4.91 (dd, 1H), 4.70 (d, 1H), 4.55 (dd, 1H), 4.32–4.22 (m, 1H), 4.04–3.95 (m, 1H), 3.92 (s, 3H), 3.20–2.20 (m, 4H), 1.88–1.34 (m, 17H), 1.31 (s, 9H), 1.26–0.82 (m, 5H)。

[0180] **实施例 54**: {4-环丙烷磺酰基氨基羰基-18-[6-(3-氟-苯基)-9-硫代-1,5,7-三氮杂-芴-8-基氧基]-2,15-二氧化代-12-氧杂-3,16-二氮杂-三环[14.3.0.0_{4,6}]十九碳-7-烯-14-基}-氨基甲酸叔丁酯 (化合物 54) 的合成

[0181] 化合物 54 通过以下流程制备:

[0182]



[0183] 6-(3-氟-苯基)-7H-9-硫代-1,5,7-三氮杂-芴-8-酮 (1.83 克, 6.16 毫摩尔) 在 POCl_3 (5.66 毫升, 61.6 毫摩尔) 中的溶液加热回流 3 小时。真空除去 POCl_3 之后,将残余物倒入水中,加入饱和 NaHCO_3 至 $\text{pH} > 7$ 从而停止反应,搅拌 15 分钟,然后过滤制得粗制化合物 I-24 (1.82 克, 93%)。ESI-MS ($M+H^+$) = 316.0。

[0184] 在室温下向叔丁氧羰基-4R-羟基脯氨酸 (1.33 克, 5.76 毫摩尔) 在 DMSO (13.3 毫

升) 中的悬浮液加入 t-BuOK(1.94 克, 17.28 毫摩尔)。该反应混合物搅拌 1.5 小时之后, 将化合物 I-24(1.82 克, 5.76 毫摩尔) 溶解在 DMSO(18.2 毫升) 中, 在冰水浴条件下滴加入反应混合物中过夜。所得混合物倒入冷水中, 该水溶液用 1N 的 HCl 酸化至 pH<2, 过滤制得粗制化合物 I-25(2.77 克, 94%)。ESI-MS(M+H⁺) = 511.1。

[0185] 将 NMM(3.67 毫升, 33.4 毫摩尔) 加入化合物 I-25(3.41 克, 6.68 毫摩尔), HATU(5.08 克, 13.36 毫摩尔), HOBt(1.35 克, 10.02 毫摩尔) 和环丙烷磺酸(1-氨基-2-乙烯基-环丙烷羰基)-酰胺(1.69 克, 7.35 毫摩尔) 在 CH₂Cl₂(33.4 毫升) 中的溶液中。该反应混合物在室温下搅拌过夜。所得混合物用饱和 NH₄Cl 停止反应, 用 CH₂Cl₂ 萃取, 用饱和 NaHCO₃ 和盐水洗涤, 用 MgSO₄ 干燥。浓缩之后, 残余物通过硅胶柱色谱纯化(EtOAc 在己烷中 50% 的溶液), 制得化合物 I-26(3.20 克, 66%)。ESI-MS(M+H⁺) = 723.2。

[0186] 在室温下向 I-26(0.51 克, 0.69 毫摩尔) 在 CH₂Cl₂(3.45 毫升) 中的溶液加入 CF₃COOH(0.53 毫升, 6.9 毫摩尔)。反应混合物搅拌过夜, 然后浓缩溶液, 制得粗化合物 I-27, 其不经进一步纯化直接用于下一步。ESI-MS(M+H⁺) = 623.2。

[0187] 将 NMM(0.3 毫升, 2.76 毫摩尔) 加入化合物 I-27(0.43 克, 0.69 毫摩尔), HATU(0.34 克, 0.9 毫摩尔) 和 (s)-2-(叔丁氧基羰基氨基)-3-(戊-4-烯基氧基) 丙酸(0.25 克, 0.9 毫摩尔) 在 CH₂Cl₂(3.45 毫升) 中的溶液中。该反应混合物在室温下搅拌过夜。所得的混合物用饱和 NH₄Cl 停止反应, 用 CH₂Cl₂ 萃取, 用饱和 NaHCO₃ 和盐水洗涤, 用 MgSO₄ 干燥。浓缩之后, 残余物通过硅胶柱色谱纯化(EtOAc 在己烷中 50% 的溶液), 制得化合物 I-28(0.52 克, 85%)。ESI-MS(M+H⁺) = 877.7。

[0188] I-28(0.52 克, 0.59 毫摩尔) 在甲苯(59 毫升) 中的溶液用氮气脱气。在室温下加入第二代哈威德格拉比催化剂(0.04 克, 10 摩尔%)。该反应混合物加热至 50°C 过夜。浓缩溶剂, 残余物通过 TLC 纯化(MeOH 在醚中 1% 的溶液), 制得化合物 54(0.07 克, 14%)。ESI-MS(M+H⁺) = 850.2; ¹H NMR(CDCl₃) δ 10.16(s, 1H), 8.86-8.58(m, 2H), 8.38(d, 1H), 8.27(d, 1H), 7.57-7.46(m, 2H), 7.20(dd, 1H), 6.28-6.20(m, 1H), 5.64(q, 1H), 5.31(d, 1H), 5.21(dd, 1H), 4.93(dd, 1H), 4.68-4.58(m, 1H), 4.39(dd, 1H), 4.17-4.09(m, 1H), 3.68(dd, 1H), 3.50-3.32(m, 2H), 3.10-2.88(m, 2H), 2.61-2.46(m, 2H), 2.26-2.10(2H), 2.02-1.76(m, 2H), 1.55-1.38(m, 4H), 1.34(s, 9H), 1.31-0.82(m, 4H)。

[0189] 实施例 55-60: 化合物 55-60 的合成

[0190] 化合物 55-60 各自按照与实施例 54 所述类似的方式制备。

[0191] 化合物 55: MS:m/z 804.3(M⁺+1); ¹H NMR(CDCl₃) δ 10.19(s, 1H), 8.81(d, 1H), 8.37(d, 1H), 8.27(d, 1H), 7.60-7.16(m, 5H), 6.25(s, 1H), 5.65(q, 1H), 5.45(d, 1H), 5.21(dd, 1H), 4.93(brs, 1H), 4.74-4.61(m, 1H), 4.43-4.34(m, 1H), 4.13(d, 1H), 3.75-3.34(m, 4H), 3.08-2.88(m, 2H), 2.63-2.45(m, 2H), 2.27-0.81(m, 19H)。

[0192] 化合物 56: MS:m/z 804.3(M⁺+1); ¹H NMR(CDCl₃) δ 10.06(s, 1H), 8.21(dd, 1H), 7.91(d, 1H), 7.81(dd, 1H), 7.39(dd, 1H), 7.30-7.22(m, 1H), 7.16(d, 1H), 6.24(s, 1H), 5.63(q, 1H), 5.39(d, 1H), 5.18(dd, 1H), 4.89(dd, 1H), 4.68-4.58(m, 1H), 4.43(d, 1H), 4.13-4.06(m, 1H), 4.07(s, 3H), 3.72(dd, 1H), 3.52(dd, 1H), 3.45-3.38(m, 1H), 3.09-3.87(m, 2H), 2.68(dd, 1H), 2.53-1.91(m, 4H), 1.57-1.41(m, 6H), 1.37(s, 9H), 1.28-0.82(m, 3H)。

[0193] 化合物 57 :MS :m/z848. 2 (M^+ 1)。

[0194] 化合物 58 :MS :m/z804. 3 (M^+ 1) ; 1H NMR($CDCl_3$) δ 10. 20 (s, 1H), 8. 33 (d, 1H), 8. 16 (dd, 1H), 7. 77 (dd, 1H), 7. 68-7. 36 (m, 6H), 6. 22 (s, 1H), 5. 62 (q, 1H), 5. 42 (d, 1H), 5. 16 (dd, 1H), 4. 99 (brs, 1H), 4. 92 (dd, 1H), 4. 68-4. 60 (m, 1H), 4. 37 (d, 1H), 4. 16-4. 08 (m, 1H), 3. 73-3. 35 (m, 4H), 3. 08-2. 87 (m, 2H), 2. 69-2. 40 (m, 2H), 2. 32-0. 81 (m, 17H)。

[0195] 化合物 59 :MS :m/z804. 3 (M^+ 1) ; 1H NMR($CDCl_3$) δ 10. 18 (s, 1H), 8. 34 (d, 1H), 8. 17 (dd, 1H), 7. 82 (dd, 1H), 7. 73-7. 40 (m, 4H), 7. 35 (s, 1H), 6. 23 (s, 1H), 5. 63 (q, 1H), 5. 48 (d, 1H), 5. 17 (dd, 1H), 4. 99 (brs, 1H), 4. 91 (dd, 1H), 4. 74-4. 62 (m, 1H), 4. 40 (d, 1H), 4. 17-4. 08 (m, 1H), 3. 75-3. 35 (m, 4H), 3. 08-2. 87 (m, 2H), 2. 73-2. 40 (m, 2H), 2. 30-0. 81 (m, 18H)。

[0196] 化合物 60 :MS :m/z838. 4 (M^+ 1)。

[0197] 实施例 61 :NS3/4A 蛋白酶的抑制

[0198] 蛋白质的表达和纯化

[0199] 将含有 N-末端 His₆-标签 -NS4A₍₂₁₋₃₂₎-GSGS-NS3₍₃₋₁₈₁₎ 的编码基因的质粒转化入诺瓦金公司 (Novagen) 的大肠杆菌 (E. coli) 菌株 BL21 (DE3)pLysS 中来过度表达蛋白质。37°C, 在含有卡那霉素和氯霉素的 200mL Lauria-Bertani (LB) 培养基中过夜培养转化的 BL21 (DE3)pLysS 单菌落。将细菌培养液转移至迪菲科公司 (Difco) 的 6 升含抗生素的 LB 培养基中, 22°C 振荡培育。600nm 吸光度达到 0. 6 后, 在 22°C 用 1mM 异丙基 -1- 硫代 - β -D- 吡喃半乳糖苷 (IPTG) 诱导培养物 5 小时。然后离心 (4°C, 6, 000 \times g, 15 分钟) 收集培养物。将细胞沉淀重悬在 150mL 缓冲液 A (50mM HEPES, pH7. 4, 0. 3M NaCl, 0. 1% (w/v) CHAPS, 10mM 咪唑, 10% (v/v) 甘油) 中。使混物流过在 30psi 操作的微流化仪 (Microfluidizer) 四次使之分散, 然后离心 (4°C, 58, 250 \times g, 30 分钟) 除去细胞碎片。在有 10mM 咪唑存在下, 用法玛西亚公司 (Pharmacia) 的 gradiFrac 系统将含 His₆-标签的蛋白的细胞裂解液以 3mL/分钟加到 25mL 恰根公司 (Qiagen) 的 Ni-NTA 柱上。用 10 个柱体积的裂解缓冲液洗涤柱。用 8 个柱体积的补加了 300mM 咪唑的缓冲液 A 洗脱结合的 NS4A₍₂₁₋₃₂₎-GSGS-NS3₍₃₋₁₈₁₎。通过用缓冲液 B (50mM HEPES, pH7. 4, 0. 1% (w/v) CHAPS, 10% (v/v) 甘油, 5mM 二硫苏糖醇 (DTT) 和 1M NaCl) 平衡的 Q- 琼脂糖柱进一步纯化合并的诸组分。收集含 NS4A₍₂₁₋₃₂₎-GSGS-NS3₍₃₋₁₈₁₎ 的洗脱液, 利用聚丙烯酰胺葡聚糖 (sephacryl)-75 柱 (16 \times 100cm, 法玛西亚公司) 以流速 0. 5mL/分钟通过尺寸排阻层析进一步纯化, 该柱用缓冲液 C (50mM HEPES, pH7. 4, 0. 1% (w/v) CHAPS, 5mM DTT, 10% (v/v) 甘油) 预平衡。冷冻纯化的蛋白质, 保存于 -80°C 待用。

[0200] HPLC 微孔试验

[0201] 制备含 50mM Tris, pH7. 4, 100mM NaCl, 20% 甘油, 0. 012% CHAPS, 10mM DTT, 5 μ M 底物 Ac-Asp-Glu-Asp (EDANS)-Glu-Glu-Abu- ψ -[COOAla]-Ser-Lys (DABCYL)-NH₂ (RET S1, ANASPEC) 和 10 μ M 测试化合物的溶液。将 80 μ L 该溶液加入 96-孔板的各孔中。加入 20 μ L 缓冲液配制的 10nM NS3/4A 蛋白酶开始反应, 所述缓冲液含有 50mM Tris 缓冲液, pH7. 4, 100mM NaCl, 20% 甘油和 0. 012% CHAPS。NS3/4A 蛋白酶的终浓度是 2nM, 低于底物 RET S1 的 K_m。

[0202] 30°C 培育试验溶液 30 分钟。然后加入 100 μ L 1% TFA 终止反应。将 200 μ L 等份试样转移至安捷仑公司 (Agilent) 的 96-孔板的各孔中。

[0203] 采用下述的反相 HPLC 分析反应产物。HPLC 系统包括:Agilent1100,脱气器 G1379A,双泵 G1312A,自动进样器 G1367A,柱恒温室 G1316A,二极管阵列检测器 G1315B,柱:Agilent, ZORBAX Eclipse XDB-C18,4.6mm,5 μ m, P/N993967-902,柱恒温器:室温,注射体积:100 μ L,溶剂 A = HPLC 级水 +0.09% TFA,溶剂 B = HPLC 级乙腈 +0.09% TFA。HPLC 运行总时间为 7.6 分钟,其中 4 分钟内的线性梯度为 25-50%溶剂 B,然后以 50%溶剂 B 运行 30 秒,最后 30 秒的梯度为 50-25%溶剂 B。用 25%溶剂 B 再平衡柱 2.6 分钟,然后注射下一样品。根据 HPLC 结果计算各测试化合物的 IC₅₀ 值(50%的 NS3/4A 活性受到抑制时的浓度)。

[0204] 在上述抑制试验中测试了化合物 1-60。结果显示 54 种化合物表现出 IC₅₀ 值低于 20nM,而 4 种化合物表现出 IC₅₀ 值范围是 20-100nM。

[0205] 实施例 62:HCV 复制子细胞试验方案

[0206] 在含 10%胎牛血清(FBS)、1.0mg/ml G418 和适当添加物的 DMEM(培养基 A)中培养含 HCV 复制子的细胞。

[0207] 在第 1 天,用胰蛋白酶/EDTA 混合物处理复制子细胞单层,获取细胞,并用培养基 A 稀释至终浓度 48,000 细胞/ml。将该溶液(1ml)加入 24-孔组织培养平板的各孔,37 $^{\circ}$ C,5% CO₂ 气氛下,在组织培育箱中培养过夜。

[0208] 在第 2 天,用含 10% FBS 和适当添加物的 DMEM(培养基 B)连续稀释测试化合物(100% DMSO 配制)。在全部系列稀释中,DMSO 的终浓度维持在 0.2%。

[0209] 除去复制子细胞单层上的培养基,然后加入含各种浓度化合物的培养基 B。将不含任何化合物的培养基 B 加入其它孔作为无化合物的对照。

[0210] 37 $^{\circ}$ C,5% CO₂ 气氛下,在组织培育箱中将细胞与化合物或 0.2% DMSO 在培养基 B 中温育 72 小时。然后,除去培养基,用 PBS 洗涤复制子细胞单层一次。将 Rneasy 试剂盒的 RNA 提取试剂或 TRIZOL 试剂立即加入细胞以避免 RNA 降解。按照生产商的使用说明书的改进方法提取总 RNA 以改善提取效率和一致性。最后,洗脱包含 HCV 复制子 RNA 的细胞总 RNA,保存在 -80 $^{\circ}$ C 以待进一步加工。

[0211] 用两套特异性引物实施 TaqMan[®] 实时 RT-PCR 定量测定试验:一套引物用于 HCV,另一套用于 ACTB(β -肌动蛋白)。将总 RNA 加入 PCR 反应,从而在同一 PCR 孔中同时定量测定 HCV 和 ACTB RNA。根据各孔中 ACTB RNA 的水平对实验失败作标记并舍弃。根据同一 PCR 板中获得的标准曲线计算各孔中的 HCV RNA 水平。将 DMSO 或无化合物对照作为 0%抑制来计算化合物处理所致的 HCV RNA 水平的抑制百分比。根据任何给定化合物的滴定曲线计算 EC₅₀(HCV RNA 水平达到 50%抑制时的浓度)。

[0212] 采用 HCV 复制子细胞试验测试了化合物 1-60。结果显示 52 种化合物表现出 EC₅₀ 值低于 20nM,而 3 种化合物表现出 EC₅₀ 值范围是 20-100nM。

[0213] 其它实施方式

[0214] 说明书中所揭示的所有特征可以以任意的组合方式结合。该说明书中所揭示的各种特征可以通过提供相同、等价或类似目的的特征代替。因此,除非另外说明,所揭示的各种特征仅仅是一系列等价或类似特征中的一个例子。

[0215] 通过以上说明,本领域技术人员可以很容易地确定本发明的主要特征,同时可以在不背离本发明的精神和范围的前提下,对本发明进行各种改变和改良,以使其适用于各

种应用和条件。因此,其他的实施方式也在所附权利要求书的范围之内。