



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102596946 B

(45) 授权公告日 2015.06.17

(21) 申请号 201080044361.6 *A61K 31/497*(2006.01)
(22) 申请日 2010.08.05 *A61K 31/44*(2006.01)
(30) 优先权数据 *A61K 31/42*(2006.01)
61/231,431 2009.08.05 US *A61K 31/00*(2006.01)
(85) PCT国际申请进入国家阶段日 *A61P 31/16*(2006.01)
2012.03.31 *A61P 31/12*(2006.01)
(86) PCT国际申请的申请数据 (56) 对比文件
PCT/CN2010/001187 2010.08.05 W0 2003089177 A2, 2003.08.24, 全部.
(87) PCT国际申请的公布数据 W0 2004017971 A1, 2004.03.04, 全部.
W02011/015037 EN 2011.02.10 审查员 王晶晶
(73) 专利权人 港大科桥有限公司
地址 中国香港数码港道 100 号数码港 4 座
405A 室
(72) 发明人 高一村 杨丹 袁国勇
(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001
代理人 梁谋
(51) Int. Cl.
C07D 413/12(2006.01)
C07D 295/00(2006.01)

权利要求书2页 说明书31页 附图10页

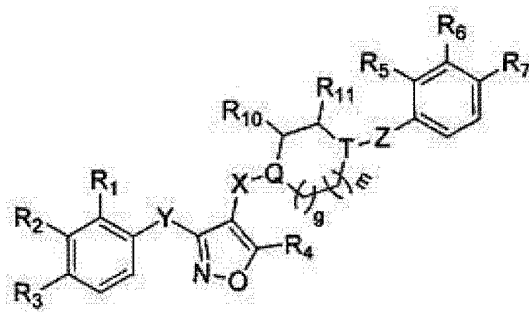
(54) 发明名称

抗病毒化合物及其制备和使用方法

(57) 摘要

本文所述的是显示抗病毒活性,尤其是抗流感病毒活性的化合物及其制备和使用方法。在一实施方案中,该化合物是包含哌嗪和异噻唑环的杂环酰胺且被一个或多个取代基任选地取代。该化合物可与一种或多种药学上可接受的赋形剂配制成适于肠内和胃肠外给药的组合物。所述的化合物优选用于治疗或预防流感病毒感染,诸如 H1N1、H2N2、H3N2、H5N1、H7N7、H1N2、H9N2、H7N2、H7N3 和 H10N7。

1. 下述通式(VI)化合物在制备用于治疗病毒感染的药物中的用途：



(通式 VI)

其中 Y 和 Z 缺失和 X 为 $-C(=O)-$ ；

g 和 m 为独立地 0 至 6；

Q 和 T 是氮；并且

R_1-R_7 和 $R_{10}-R_{11}$ 独立地选自氢、卤素、羟基、直链或支链的 C_1-C_6 烷基、直链或支链的 C_1-C_6 烯基、直链或支链的 C_1-C_6 炔基、或直链和支链的 C_1-C_6 烷氧基、氨基、叠氮化物、氰基、硝基、腈、异腈、酰胺、羧酸酯、尿素、胍、异氰酸酯和异硫氰酸酯。

2. 如权利要求 1 所述的用途，其中 R_{10} 为甲基基团和 / 或 R_{11} 为氢。

3. 如权利要求 1 所述的用途，其中 g 和 m 为 1。

4. 如权利要求 1 所述的用途，其中 R_1-R_3 和 R_5-R_7 独立地选自卤代基、硝基、或卤代基与硝基的组合。

5. 如权利要求 1-4 中任一项所述的用途，其中所述病毒感染是流感感染。

6. 如权利要求 5 所述的用途，其中所述流感选自 H1N1、H3N2 和 H5N1。

7. 如权利要求 1-6 中任一项所述的用途，其中所述的化合物选自：

[4-(2-氯-4-硝基-苯基)-哌嗪-1-基]-[3-(4-羟基-苯基)-5-甲基异噁唑-4-基]-甲酮；

[4-(2-氯-4-硝基-苯基)-哌嗪-1-基]-[3-苯基-5-甲基-异噁唑-4-基]-甲酮；

[4-(2-氯-4-硝基-苯基)-哌嗪-1-基]-[3-(4-氨基-苯基)-甲基异噁唑-4-基]-甲酮；

[4-(2-氯-4-硝基-苯基)-哌嗪-1-基]-[3-(4-叠氮基-苯基)-5-甲基异噁唑-4-基]-甲酮；

[4-(2-氯-4-硝基-苯基)-哌嗪-1-基]-[3-(2-氯-苯基)-5-甲基异噁唑-4-基]-甲酮；

[4-(2-氯-4-硝基-苯基)-2-甲基-哌嗪-1-基]-[3-(2-氯-苯基)-5-甲基-异噁唑-4-基]-甲酮；

[4-(2-氯-4-硝基-苯基)-2-甲基-哌嗪-1-基]-[3-苯基-5-甲基异噁唑-4-基]-甲酮；

[4-(4-硝基-苯基)-哌嗪-1-基]-[3-(2-氯-苯基)-5-甲基-异噁唑-4-基]-甲酮；

以及 [4-(4-硝基-苯基)-哌嗪-1-基]-[3-(2,6-二氯-苯基)-5-甲基-异噁

唑-4-基]-甲酮。

8. 化合物,其选自:

[4-(2-氯-4-硝基-苯基)-哌嗪-1-基]-[3-(4-羟基-苯基)-5-甲基异噁唑-4-基]-甲酮;

[4-(2-氯-4-硝基-苯基)-哌嗪-1-基]-[3-苯基-5-甲基-异噁唑-4-基]-甲酮;

[4-(2-氯-4-硝基-苯基)-哌嗪-1-基]-[3-(4-氨基-苯基)-甲基异噁唑-4-基]-甲酮;

[4-(2-氯-4-硝基-苯基)-哌嗪-1-基]-[3-(4-叠氮基-苯基)-5-甲基异噁唑-4-基]-甲酮;

[4-(2-氯-4-硝基-苯基)-哌嗪-1-基]-[3-(2-氯-苯基)-5-甲基异噁唑-4-基]-甲酮;

[4-(2-氯-4-硝基-苯基)-2-甲基-哌嗪-1-基]-[3-(2-氯-苯基)-5-甲基-异噁唑-4-基]-甲酮;

[4-(2-氯-4-硝基-苯基)-2-甲基-哌嗪-1-基]-[3-苯基-5-甲基异噁唑-4-基]-甲酮;

[4-(4-硝基-苯基)-哌嗪-1-基]-[3-(2-氯-苯基)-5-甲基-异噁唑-4-基]-甲酮;

以及 [4-(4-硝基-苯基)-哌嗪-1-基]-[3-(2,6-二氯-苯基)-5-甲基-异噁唑-4-基]-甲酮。

9. 如权利要求 8 所述的化合物,其用作药物。

10. 如权利要求 8 所述的化合物在制备用于治疗病毒感染的药物中的用途。

11. 包含权利要求 8 的化合物以及一种或多种药学上可接受的赋形剂的药物组合物,其中所述化合物以有效治疗或预防病毒感染的量存在。

12. 如权利要求 11 所述的组合物,其包含有效量的抑制病毒核蛋白的核积聚的化合物。

13. 如权利要求 11 或 12 所述的组合物,其用作药物。

14. 如权利要求 11 或 12 所述的组合物,其用于治疗病毒感染。

15. 如权利要求 14 所述的组合物,其中所述病毒感染是流感感染。

16. 如权利要求 15 所述的组合物,其中所述流感选自 H1N1、H3N2 和 H5N1。

17. 如权利要求 13-16 中任一项的组合物,其中所述组合物提供 0.1-250 mg/kg 体重/日的剂量给成人。

抗病毒化合物及其制备和使用方法

[0001] 引用的相关申请

[0002] 本申请要求 2009 年 8 月 5 日提交的名称为“抗病毒化合物”的美国专利申请 61/231,431 号；2010 年 5 月 28 日提交的名称为“用于病毒感染治疗的化合物和方法”的美国专利申请 61/349,525 号；及 2010 年 5 月 28 日提交的名称为“用于增生性疾病治疗的化合物和方法”的美国专利申请 61/349,565 号的优先权，在此通过引用将所有这些申请全文并入。

发明领域

[0003] 本发明属于具有抗病毒活性，尤其是抗流感病毒的小分子及其制备和使用方法的领域。

[0004] 发明背景

[0005] 流感由正粘病毒 (orthomyxoviridae) 科的 RNA 病毒所引起。存在三种类型的流感病毒：甲型、乙型和丙型。甲型流感病毒感染哺乳动物（例如人类、猪、雪貂、马）和鸟类。甲型流感病毒是全球性的健康关注，自 1900 年以来在世界范围内已引起了三次主要的大流行，导致 5000 多万人丧生。例如，1918 年毁灭性的“西班牙流感” (H1N1 甲型流感病毒) 在世界范围内杀死了超过 2000 万人。随后的大流行，包括 1957 年亚洲流感大流行 (H2N2)、1968 年香港流感大流行 (H3N2)、1970 年 H1N1 (俄罗斯流感) 的再度出现，连同 1997 年和 2003 年禽流感病毒 H5N1 一起，表明大流行性流感或可能的流感病毒生物恐怖袭击仍然是全球健康和主要威胁。纵观历史，尽管流感病毒对公共卫生影响深远，但是对流感病毒感染标准疗法仍然不足。

[0006] 基于小分子疗法对抗流感病毒毒力的最常见的靶标包括质子选择性 M2 离子通道和蛋白神经酰胺酶 (NA)。M2 离子通道是维护甲型流感病毒病毒包膜所必不可少的，而 NA 则促进初生的病毒颗粒自宿主细胞内出芽。在针对这两种靶标的抑制剂中，耐药性是很常见的，而且已在临床分离中变得普遍。几乎 100% 的 2008 年流感 H1N1 病毒 (猪流感) 样品对神经酰胺酶抑制剂奥司他韦 (达菲) (oseltamivir (Tamiflu)) 耐药，而超过 90% 的 H3N2 病毒对 M2 通道阻断剂金刚烷耐药。

[0007] 除了耐药性以外，包括给药途径和环境冲击的因素也会影响有效的流感病毒治疗的研究。例如，扎那米韦 (瑞乐沙) (Zanamivir (Relenza)) 只能吸入性给药，因此可能到达不了受感染的通气不良的肺组织。而且，广泛使用和储备的药物奥司他韦在正常的污水处理过程中不被降解，就此造成环境问题。

[0008] 存在着对抑制流感病毒复制、减少流感病毒感染的毒力，和 / 或预防流感病毒感染的抗病毒化合物的需求。

[0009] 因此，本发明的目标是提供有效治疗或预防病毒感染，尤其是流感病毒感染的抗病毒化合物，该化合物的制备方法以及使用该化合物的方法。

[0010] 发明概述

[0011] 本文描述了有抗病毒活性，尤其是抗流感病毒的化合物以及制备和使用该化合物

的方法。在一实施方案中,所述的化合物具有通式 I-VI 或其药学上可接受的盐。

[0012] 在一优选的实施方案中, NP 抑制剂具有通式 I 的结构:

[0013] $Ar^1-Y-Ar^2-X-W-Z-Ar^3$

[0014] (通式 I)

[0015] 其中, Ar^1 、 Ar^2 和 Ar^3 各自为独立地取代或未取代的芳基或杂环芳基基团;

[0016] X、Y 和 Z 独立地缺失(即直接连接)或选自 $-C(=O)-$ 、 $-S(=O)-$ 、 $-SO_2-$ 、 $-N(R_1)-$ 、 $-C(R_2)=C(R_3)-$ 和 $-C(R_4R_5)_n-$,

[0017] 其中 n 为 0 至 6, R_1-R_5 为各自独立地选自氢、直链或支链的 C_1-C_6 烷基、直链或支链的 C_1-C_6 烯基、直链或支链的 C_1-C_6 炔基或直链和支链的 C_1-C_6 烷氧基;并且

[0018] W 为直链基团或 5-7 元取代或未取代的环状或杂环基团(Cy)。

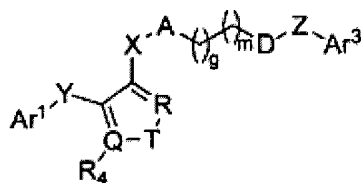
[0019] 在一些实施方案中, Ar^1 被氢、羟基、硝基、氨基或叠氮化物取代; Ar^2 被甲基基团取代; X 为 $C=O$; Y 和 Z 缺失; Cy 为哌嗪; 和 / 或 Ar^3 被卤代基、硝基、或卤代基与硝基的组合取代。

[0020] 在一些实施方案中, Cy 为包含 2 个氮原子的取代的 5-7 元不饱和环, 其中一个氮原子与 X 结合而另一个氮原子与 Z 结合。

[0021] 在一优选的实施方案中, Cy 为一取代的哌嗪, 其中 N1(1 位的 N) 与 X 结合而 N4(4 位的 N) 与 Z 结合。

[0022] 在一些实施方案中, NP 抑制剂具有通式 II 的结构

[0023]



(通式 II)

[0024] 其中 Ar^1 和 Ar^3 各自为独立地取代或未取代的芳基或杂环芳基基团;

[0025] X、Y 和 Z 独立地缺失或选自 $-C(=O)-$ 、 $-S(=O)-$ 、 $-SO_2-$ 、 $-N(R_{10})-$ 、 $-C(R_{11})=C(R_{12})-$ 和 $-C(R_{13}R_{14})_n-$;

[0026] n、g 和 m 为独立地 0 至 6;

[0027] T、Q 和 R 为独立地选自 $C(R_8R_9)$ 、氮、氧、磷、硅、硫和砷;

[0028] A 和 D 独立地各自为 $CR_{15}R_{16}$ 或 NR_{17} ;

[0029] 其中 R_4 和 R_8-R_{17} 独立地选自氢、卤素、羟基、直链或支链的 C_1-C_6 烷基、直链或支链的 C_1-C_6 烯基、直链或支链的 C_1-C_6 炔基、或直链和支链的 C_1-C_6 烷氧基、氨基、叠氮化物、氰基、硝基、腈、异腈、酰胺、羧酸酯、尿素、胍、异氰酸酯、异硫氰酸酯和硫醚, 或其中 $-CR_{15}R_{16}-$ 、 $-NR_{17}$ 或其组合当与任选地桥接亚甲基在一起时形成 5-8 元环状结构。

[0030] 在一些实施方案中, Ar^1 被氢、羟基、硝基、氨基或叠氮化物取代; X 为 $-C=O$; Y 和 Z 缺失, 且 Ar^3 被卤代基、硝基、或卤代基与硝基的组合取代。

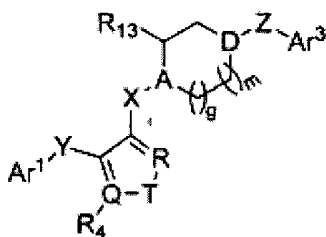
[0031] 在一优选的实施方案中, R_4 为甲基。

[0032] 在一些实施方案中, Q 为碳, T 为氧, R 为氮。

[0033] 在一些实施方案中, g 和 m 为 1 而 A 和 D 为 NR_{17} , 其中所述的 A-D 定义为哌嗪。

[0034] 在一些实施方案中, NP 抑制剂具有通式 III 的结构:

[0035]



(通式 III)

[0036] 其中 Ar¹和 Ar³各自为独立地取代或未取代的芳基或杂环芳基基团;

[0037] X、Y 和 Z 独立地缺失或选自 -C(=O)-、-S(=O)-、-SO₂-、-N(R₁₀)-、-C(R₁₁)=C(R₁₂)- 和 -C(R₁₄R₁₅)_n-;

[0038] n、g 和 m 为独立地 0 至 6;

[0039] A、D、T、Q 和 R 独立地选自 C(R₈R₉)、氮、氧、磷、硫、硅和砷;

[0040] 其中 R₄和 R₈-R₁₅独立地选自氢、卤素、羟基、直链或支链的 C₁-C₆烷基、直链或支链的 C₁-C₆烯基、直链或支链的 C₁-C₆炔基、或直链和支链的 C₁-C₆烷氧基、氨基、叠氮化物、氰基、硝基、腈、异腈、酰胺、羧酸酯、尿素、胍、异氰酸酯、异硫氰酸酯和硫醚。

[0041] 在一些实施方案中, Ar¹被氢、羟基、硝基、氨基或叠氮化物取代; X 为 -C=O; Y 和 Z 缺失, 且 Ar³被卤代基、硝基、或卤代基与硝基的组合取代。

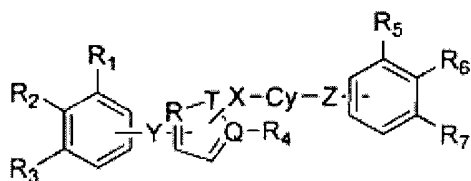
[0042] 在一优选实施方案中, Q 为碳, T 为氧, R 为氮。

[0043] 在一些实施方案中, A 和 D 为氮。

[0044] 在一些实施方案中, R₄和 R₁₃为独立地氢或甲基。在优选实施方案中, R₄为甲基而 R₁₃为氢。

[0045] 在一些实施方案中, NP 抑制剂组合物具有通式 IV 的结构:

[0046]



(通式 IV)

[0047] 其中 X、Y 和 Z 独立地缺失或选自 -C(=O)-、-S(=O)-、-SO₂-、-N(R₁₀)-、-C(R₁₁)=C(R₁₂)- 和 -C(R₁₃R₁₄)_n-;

[0048] 其中 n 为 0 至 6。

[0049] T、Q 和 R 独立地选自 C(R₈R₉)、氮、氧、磷、硫、硅和砷; 并且

[0050] Cy 为 4-7 元取代的或未取代的环状或杂环基团; 并且

[0051] 其中 R₁-R₁₄独立地选自氢、卤素、羟基、直链或支链的 C₁-C₆烷基、直链或支链的 C₁-C₆烯基、直链或支链的 C₁-C₆炔基、或直链和支链的 C₁-C₆烷氧基、氨基、叠氮化物、氰基、硝基、腈、异腈、酰胺、羧酸酯、尿素、胍、异氰酸酯、异硫氰酸酯和硫醚。

[0052] 在一些实施方案中, Cy 为包含 2 个氮原子的取代的 5-7 元不饱和环, 其中一个氮

原子与 X 结合而另一个氮原子与 Z 结合。

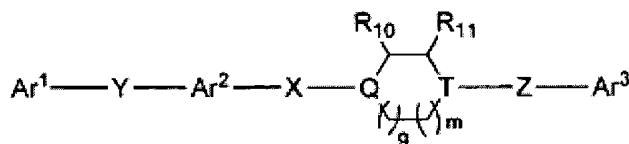
[0053] 在一优选的实施方案中, Cy 为取代的哌嗪, 其中 N1 与 X 结合而 N4 与 Z 结合, Y 和 Z 缺失, X 为 C=O, T 为氧, Q 为碳以及 R 为氮。

[0054] 在一些实施方案中, R₁-R₃和 R₅-R₇独立地选自卤代基, 硝基、或卤代基与硝基的组合。

[0055] 在一优选的实施方案中, R₄为甲基基团。

[0056] 在一些实施方案中, NP 抑制剂具有通式 V 的结构:

[0057]



(通式 V)

[0058] 其中 Ar¹、Ar²和 Ar³各自为独立地取代或未取代的芳基或杂环芳基基团;

[0059] X、Y 和 Z 独立地缺失或选自 -C(=O)-、-S(=O)-、-SO₂-、-N(R₁)=O、-C=C 和 -C(R₂R₃)_n-;

[0060] n、g 和 m 为独立地 0 至 6;

[0061] Q 和 T 独立地选自氮或 CR₄;并且

[0062] R₁-R₄、R₁₀和 R₁₁独立地选自氢、卤素、羟基、直链或支链的 C₁-C₆烷基、直链或支链的 C₁-C₆烯基、直链或支链的 C₁-C₆炔基、或直链和支链的 C₁-C₆烷氧基、氨基、叠氮化物、氰基、硝基、腈、异腈、酰胺、羧酸酯、尿素、胍、异氰酸酯、异硫氰酸酯和硫醚。

[0063] 在一些实施方案中, Q 和 T 都是氮。

[0064] 在一些实施方案中, R₁₀为甲基而 R₁₁为氢。在另一实施方案中, R₁₀和 R₁₁都是氢。

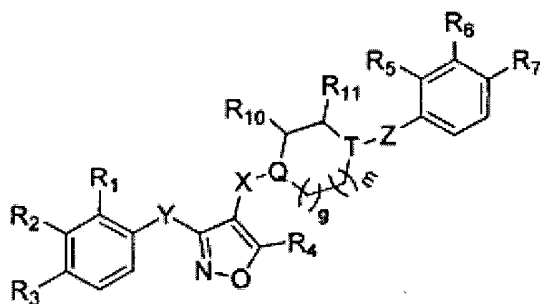
[0065] 在一些实施方案中, Y 和 Z 缺失而且 X 为 C=O。

[0066] 在一些实施方案中, g 和 m 为 1。

[0067] 在一优选的实施方案中, Ar¹和 Ar³为取代的苯基, Ar²为取代的异噁唑, Y 和 Z 缺失, X 为 C=O, Q 和 T 为氮, g 和 m 是 1, R₁₀为甲基而 R₁₁为氢。

[0068] 在一些实施方案中, NP 抑制剂具有通式 VI 的结构:

[0069]



(通式 VI)

[0070] 其中 X、Y 和 Z 独立地缺失或选自 -C(=O)-、-S(=O)-、-SO₂-、-N(R₁₂)-、-C(R₁₃)=C(R₁₄)- 和 -C(R₁₅R₁₆)_n-,

[0071] n、g 和 m 为独立地 0 至 6;

- [0072] Q 和 T 独立地选自氮或 CR_{17} ; 并且
- [0073] R_1 - R_{17} 独立地选自氢、卤代基、羟基、直链或支链的 C_1 - C_6 烷基、直链或支链的 C_1 - C_6 烯基、直链或支链的 C_1 - C_6 炔基、或直链和支链的 C_1 - C_6 烷氧基、氨基、叠氮化物、氰基、硝基、腈、异腈、酰胺、羧酸酯、尿素、胍、异氰酸酯、异硫氰酸酯和硫醚。
- [0074] 在一些实施方案中, Q 和 T 都是氮。
- [0075] 在一些实施方案中, R_{10} 为甲基基团而 R_{11} 为氢。在另一实施方案中, R_{10} 和 R_{11} 都是氢。
- [0076] 在一些实施方案中, Y 和 Z 缺失而且 X 为 $C=O$ 。
- [0077] 在一些实施方案中, g 和 m 是 1。
- [0078] 在一些实施方案中, R_1 - R_3 和 R_5 - R_7 独立地选自卤代基, 硝基、或卤代基与硝基的组合。
- [0079] 在本文所述的一些实施方案中, Ar^2 为在 1, 2 或 1, 3 位具有两个杂原子的 5 元杂环芳基, 包括碳和所述的杂原子 (例如氮) 之间的双键。
- [0080] 在本文所述的一些实施方案中, Ar^2 为在 1, 2 或 1, 3 位具有氮原子和氧原子的 5 元杂环芳基, 其中碳和所述的氮之间有双键。
- [0081] 在本文所述的一些实施方案中, Ar^1 和 Ar^3 为被 1、2、3、4 或 5 个取代基取代的苯基, 优选被 2, 4 或 2, 6 位上的 2 个取代基取代, 和 / 或优选被 2 位上的 1 个取代基取代。
- [0082] 给予所述的化合物能够预防和 / 或治疗病毒感染, 诸如流感病毒。所述的化合物可经胃肠外给药, 诸如以溶液或悬浮液的形式, 或经肠内给药, 诸如以片剂或胶囊的形式。
- [0083] 药物组合物包含有效量的本文所述的一种或多种化合物。有效量的范围因人而异; 然而最佳剂量易于由诸如处方医师的本领域技术人员确定。剂量可通过给予的总量 (例如每剂量或每日) 或浓度来测量。在一实施方案中, 0.01、0.05、0.1、0.2、0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、40、50、100、250、500 和 1000mg/kg/ 日的剂量可适用于治疗。在另一实施方案中, 每日剂量为 0.2-250mg/kg。
- [0084] 附图简要说明
- [0085] 图 1a 为化合物 1 的化学结构。
- [0086] 图 1b 为显示空斑形成单位 (PFU) 减少率与化合物 1 的浓度的函数的图。
- [0087] 图 2a 为化合物 2 的化学结构。
- [0088] 图 2b 为显示空斑形成单位 (PFU) 减少率与化合物 2 的浓度的函数的图。
- [0089] 图 3a 为化合物 3 的化学结构。
- [0090] 图 3b 为显示空斑形成单位 (PFU) 减少率与化合物 3 的浓度的函数的图。
- [0091] 图 4a 为化合物 4 的化学结构。
- [0092] 图 4b 为显示空斑形成单位 (PFU) 减少率与化合物 4 的浓度的函数的图。
- [0093] 图 5a 为化合物 5 的化学结构。
- [0094] 图 5b 为显示空斑形成单位 (PFU) 减少率与化合物 5 的浓度的函数的图。
- [0095] 图 6a 为化合物 6 的化学结构。
- [0096] 图 6b 为显示空斑形成单位 (PFU) 减少率与化合物 6 的浓度的函数的图。
- [0097] 图 7a 为化合物 7 的化学结构。
- [0098] 图 7b 为显示空斑形成单位 (PFU) 减少率与化合物 7 的浓度的函数的图。

[0099] 图 8a 为化合物 8 的化学结构。

[0100] 图 8b 为显示空斑形成单位 (PFU) 减少率与化合物 8 的浓度的函数的图。

[0101] 图 9a 为化合物 9 的化学结构。

[0102] 图 9b 为显示空斑形成单位 (PFU) 减少率与化合物 9 的浓度的函数的图。

[0103] 图 10a 为化合物 10 的化学结构。

[0104] 图 10b 为显示空斑形成单位 (PFU) 减少率与化合物 10 的浓度的函数的图。

[0105] 发明的详细描述

[0106] 1. 定义

[0107] 本文所用的“烷基”或其部分通常包括直链的烷基、支链的烷基、环烷基、烷基取代的环烷基和环烷基取代的烷基。除非另有说明,所述的烷基通常具有 1-30 个碳原子、1-20 个碳原子、1-10 个碳原子、1-6 个碳原子、1-5 个碳原子,优选甲基、乙基或丙基。直链或支链的烷基在其主链中通常具有 30 个或更少的碳原子(例如对直链而言 C_1-C_{30} ,对支链而言 C_3-C_{30}),优选 20 个或更少,优选 10 个或更少,更优选 6 个或更少,最优选 5 个或更少。同样地,环烷基在它们的环结构中具有 3-20 个碳原子,优选它们的环结构中具有 3-10 个碳原子,最优选环结构中具有 5、6 或 7 个碳原子。烷基的实例包括但不限于甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、叔丁基、异丁基、仲丁基、环己基、(环己基)甲基、环丙甲基以及例如正戊基、正己基、正庚基、正辛基的同系物和同分异构体。

[0108] 术语“烷基”在烃基及杂环烷基的一个或多个碳原子上包含一个或多个取代。合适的取代基包括但不限于卤素,诸如氟、氯、溴或碘;羟基; $-NR_1R_2$,其中 R_1 和 R_2 为独立地氢、烷基或芳基,而且其中的氮原子任选地季胺化; $-SR$,其中 R 为氢、烷基或芳基; $-CN$; $-NO_2$; $-COOH$; 羧酸酯; $-COR$ 、 $-COOR$ 或 $-CONR_2$,其中 R 为氢、烷基或芳基;叠氮化物、芳烷基、烷氧基、亚氨基、膦酸酯、亚磷酸酯、甲硅烷基、乙醚、磺酰、磺酰胺基、杂环、芳族或杂环芳族部分、 $-CF_3$; $-NCOCOCH_2CH_2$; $-NCOCOCHCH$; $-NCS$ 及其组合。

[0109] 本文所用的“烯基”或其部分包括直链或支链的烯基、环烯基、烷基取代的环烯基并且本文所用的“炔基”或其部分包括直链或支链的炔基基团或环炔基(脂环族的)基团、烷基取代的环炔基、环炔基基团或环烷基取代的炔基基团。除非另有说明,烯基和炔基通常具有 2-30 个碳原子,2-20 个碳原子,2-10 个碳原子,2-6 个碳原子,2-5 个碳原子。直链或支链的烯基或炔基在其主链中通常具有 30 个或更少的碳原子(例如对直链而言 C_1-C_{30} ,对支链而言 C_3-C_{30}),优选 20 个或更少,优选 10 个或更少,更优选 6 个或更少,最优选 5 个或更少。烯基或炔基在其链中通常具有 2-30 个碳,优选 2-20 个碳,优选 2-10 个碳,更优选 2-6 个碳,最优选 2-5 个碳。同样地,环烯基或环炔基在其环结构中具有 3-20 个碳原子,优选 3-10 个碳原子,最优选 5、6 或 7 个碳。环烯基或环炔基基团的实例包括但不限于乙烯基、2-丙烯基、巴豆基、2-异戊烯基、2-(丁间二烯基)、2,4-烯丙基、3-(1,4-烯丙基)、乙炔基、1-丙炔基和 3-丙炔基以及 3-丁炔基。

[0110] 术语“烯基”和“炔基”在烃基的一个或多个碳原子上包括一个或多个取代。合适的取代基包括但不限于卤素,诸如氟、氯、溴或碘;羟基; $-NR_1R_2$,其中 R_1 和 R_2 为独立地氢、烷基或芳基,而且其中的氮原子任选地季胺化; $-SR$,其中 R 为氢、烷基或芳基; $-CN$; $-NO_2$; $-COOH$; 羧酸酯; $-COR$ 、 $-COOR$ 或 $-CONR_2$,其中 R 为氢、烷基或芳基;叠氮化物、芳烷基、烷氧基、亚氨基、膦酸酯、亚磷酸酯、甲硅烷基、乙醚、磺酰、磺酰胺基、杂环、芳族或杂环芳族部分、 $-CF_3$;-

NCOCOCH₂CH₂; -NCOCOCHCH; -NCS 及其组合。

[0111] 本文所用的“芳基”或其部分通常指的是具有 6-30 个碳原子, 优选 6-18 个碳原子的碳基芳香环, 而且由一个芳香环或多个融合的芳香环组成, 例如其包括苯基、联苯基、萘基、蒽基、蒽烯、蒽基、茛基、phenaleny1、菲基。芳基基团能够任选地被一个或多个部分取代, 所述的部分选自以下组成的基团: 烷基、-NR₁R₂, 其中其中 R₁ 和 R₂ 为独立地氢、烷基或芳基, 而且其中的氮原子任选地季胺化; 叠氮化物、羟基、酰基、氨基、卤素、烷氨基、烷氧基、芳氧基、硝基、氰基、磺酸、硫酸酯、磷酸、磷酸酯以及未保护或必要时保护的膦酸酯, 其为本领域中技术人员已知的, 例如在 Greene 等 Protective Groups in Organic Synthesis (有机合成中的保护性基团), John Wiley and Sons, 第三版, 2002 中所教导的。在一些实施方案中, 所述的烷基包括 C₁-C₁₀ 烷基、C₁-C₆ 烷基、C₁-C₃ 烷基、甲基、乙基和 / 或丙基等。术语“芳基”在烃基的一个或多个碳原子包括一个或多个取代。合适的取代基包括但不限于卤素, 诸如氟、氯、溴或碘; 羟基; -NR₁R₂, 其中 R₁ 和 R₂ 为独立地氢、烷基或芳基, 而且其中的氮原子任选地季胺化; -SR, 其中 R 为氢、烷基或芳基; -CN; -NO₂; -COOH; 羧酸酯; -COR, -COOR 或 -CONR₂, 其中 R 为氢、烷基或芳基; 叠氮化物、芳烷基、烷氧基、亚氨基、膦酸酯、亚磷酸酯、甲硅烷基、乙醚、磺酰、磺酰胺基、杂环、芳族或杂环芳族部分、-CF₃、-NCOCOCH₂CH₂; -NCOCOCHCH; -NCS 及其组合。

[0112] 本文所用的“结合袋”或“结合位点”通常指的是分子或分子复合体的区域, 该区域由于其构型而利于相同分子或分子复合体的区域或部分, 或不同分子、分子复合体和 / 或化合物的区域或部分与其关联或占位。本领域中技术人员应当理解, 结合袋内空腔的性质因分子不同而有所差异。

[0113] 本文所用的“Nucleozin 结合位点”通常指的是在甲型流感病毒 NP 背面位于主体结构域内的甲型流感病毒核蛋白 (NP) 上的位点。在这种构象中, nucleozin 位于凹槽内残基 280-311 间。本领域中的技术人员应当理解 nucleozin 结合位点因其中所结合的化合物的不同而稍微有所不同而且能够合并其他接触物, 所述的接触物为代替和 / 或除了本文所公开的这些以外其他的化合物。

[0114] 本文所用的“杂环”或“其部分”或“杂环的”通常指的是一个或多个 5-12 个原子的环, 优选 5-7 个原子, 带有或不带有不饱和性或芳香族的特征而且具有至少一个不是碳的环原子。优选的杂原子包括硫、氧和氮。多个环可以融合, 如在喹啉或苯并咪唑中。特别优选的杂环基团为具有 1-3 个选自 O、S、P、Si、As 和 N 的杂原子的 5-10 元环。所述的杂环化合物包括但不限于吡咯烷、吡咯、四氢咪唑、咪唑、四氢噻吩、噻吩、磷杂环戊烷、磷杂环戊二烯、硅烷、硅杂环戊二烯、砷酰烷、砷唑、咪唑啉、吡唑烷、咪唑、咪唑啉、吡唑、吡唑啉、噁唑烷、异噁唑烷、噁唑、噁唑啉、异噁唑、异噁唑啉、噻唑烷、异噻唑烷、噻唑、噻唑啉、异噻唑、异噻唑啉、二氧杂环戊烷、氧硫杂环戊烷、二噻茂烷、噻唑、二噻唑、呋喃、噁唑、噻二唑、四唑、哌啶、嘧啶、吡喃、四氢吡喃、噻烷、噻喃、哌嗪、二嗪、吗啉、噁嗪、噻嗪、二噻烷、二噁烷、二噁英、三嗪、三氧杂环己烷、四嗪、氧杂环庚、吡庚因、氧杂环庚、庚英、噻烷、噻庚英、偶氮烷、吡辛因、氧杂环丁烷和硫代烷。杂环或杂环的也指取代环, 如“芳基”或“烷基”中所定义的。在一些实施方案中, “杂环”或“杂环的”包括碳与诸如氮的所述杂原子之间的双键。

[0115] 术语“杂环”在一个或多个碳或杂原子上包括一个或多个取代。合适的取代基包括但不限于卤素, 诸如氟、氯、溴或碘; 羟基; -NR₁R₂, 其中 R₁ 和 R₂ 为独立地氢、烷基或芳基,

而且其中的氮原子任选地季胺化；-SR，其中 R 为氢、烷基或芳基；-CN；-NO₂；-COOH；羧酸酯；-COR，-COOR 或 -CONR₂，其中 R 为氢、烷基或芳基；叠氮化物、芳烷基、烷氧基、亚氨基、膦酸酯、亚磷酸酯、甲硅烷基、乙醚、磺酰、磺酰胺基、杂环、芳族或杂环芳族部分、-CF₃、-NCOCOCH₂CH₂；-NCOCOCHCH；-NCS 及其组合。

[0116] 本文所用的“杂环芳基”或其部分通常指的是包含 1-4 个选自 N、O、P、Si、As 或 S 原子或其组合的杂原子的芳香族基团，其杂环芳基基团在碳或氮原子上任选地被取代。杂环芳基环也可与一个或多个环状烃、环状芳基或杂环芳基环融合。杂环芳基包括但不限于具有 1 个杂原子的 5 元杂环芳基（例如噻吩、吡咯、呋喃）；具有在 1,2 或 1,3 位上两个杂原子的 5 元杂环芳基（例如噁唑、吡唑、咪唑、噻唑、嘌呤）；具有 3 个杂原子的 5 元杂环芳基（例如三唑、噻二唑）；具有 3 个杂原子的 5 元杂环芳基；带有 1 个杂原子的 6 元杂环芳基（例如吡啶、喹啉、异喹啉、菲、5,6-环庚烯吡啶）；带有 2 个杂原子的 6 元杂环芳基（例如哒嗪、噌啉、酞嗪、吡嗪、嘧啶、喹唑啉）；带有 3 个杂原子的 6 元杂环芳基（例如 1,3,5-三嗪）和带有 4 个杂原子的 6 元杂环芳基。特别优选的杂环芳基基团为带有 1-3 个选自 O、S 和 N 的杂原子的 5-10 元环。在一些实施方案中，“杂环芳基”包括包括碳与诸如氮的所述杂原子之间的双键。

[0117] 术语“杂环芳基”在一个或多个碳或杂原子上包括一个或多个取代。合适的取代基包括但不限于卤素，诸如氟、氯、溴或碘；羟基；-NR₁R₂，其中 R₁和 R₂为独立地氢、烷基或芳基，而且其中的氮原子任选地季胺化；-SR，其中 R 为氢、烷基或芳基；-CN；-NO₂；-COOH；羧酸酯；-COR，-COOR 或 -CONR₂，其中 R 为氢、烷基或芳基；叠氮化物、芳烷基、烷氧基、亚氨基、膦酸酯、亚磷酸酯、甲硅烷基、乙醚、磺酰、磺酰胺基、杂环、芳族或杂环芳族部分、-CF₃、-NCOCOCH₂CH₂；-NCOCOCHCH；-NCS 及其组合。

[0118] 本文所用的“甲型流感病毒”通常指的是哺乳动物的甲型流感病毒，例如 H3N2、H1N1、H2N2、H7N7 和 H5N1（家禽流感病毒）病毒株及其变种。

[0119] 本文所用的“低能稳定的复合体”通常指的是一种复合体，药物在其中通过由弱到强的分子间作用力结合在核蛋白的结合位点中，所述的分子间作用力包括但不限于共价键、氢键、二硫键、盐桥、离子键、金属配位、疏水作用力、范德华相互作用、阳离子- π 相互作用、 π - π 堆叠及其组合。

[0120] 本文所用的“核蛋白”或“NP”通常指的是结构上与核酸相关的任一蛋白。在某些流感病毒株中鉴定和测序了示例性核蛋白。许多核蛋白的序列能够在 NCBI（美国国家生物技术信息中心）数据库中找到。一些来源于甲型流感病毒的示例性 NP 序列的 GenBank 登录号对 H1N1 亚型而言为 NP040982 (AAA43467)，对 H3N2 亚型而言为 AAZ38620 (YP308843)，对 H5N1 亚型而言为 AY856864 和 AAF02400。

[0121] NP_040982 (AAA43467) [SEQ ID NO :5] :

[0122] MASQGTRKRSYEQMETDGERQNATEIRASVGMIGGIGRFYIQMCTELKLSDYEGRLIQNSLTIERMVLS
AFDERRNKYLEEHPSAGKDPKK TGGPIYRRVNG

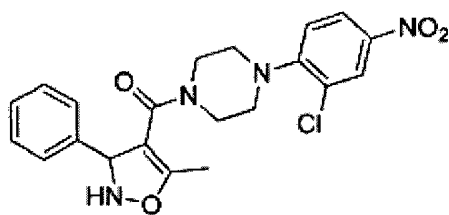
[0123] KWMRELILYDKKEIRRIWRQANNGDDATAGLTHMMIWHSNLNDATYQRTRALVRTGMD

[0124] PRMCSLMQGSTLPRRSGAAGAA VKGVGTMVMEIVRMIKRGINDRNFWRGENGRKTRIA

[0125] YERMCNLIKGFQTAAQKAMMDQVRESRDPGNAEFEDLTFLARSALILRGSVAHKSCSL

[0126] PACVYGPVAVASGYDFEREGYSLVGIIDPFRLQLNSQVYSLIRPNENPAHKSQLVWMACH

- [0127] SAAFEDLRVLSFIKGTKVPRGKLSTRGVQIASNENMETMES STELELRSRYWAIRTRS
- [0128] GGNTNQQRASAGQISIQPTFSVQRNLPFDRTTVMAAFTGNTGRTSDMRTEIIRMMES
- [0129] ARPEDVSFQGRGVFELSDEKAASPIVPSFDMSNEGSYFFGDNAEEYDN
- [0130] AAZ38620 (YP308843) [SEQ ID NO :6] :
- [0131] MASQGTKRSYEQMETDGRQNATEIRASVGMIDGIGRFYIQMCTELKLSDHEGRLIQNSLTIEKMVLS
AFDERRNKYLEEHPSAGKDPKKTGGPIYRRVDG
- [0132] KWMRELVLVDKEEIRRIWRQANNGEDATAGLTHIMIWHSNLNDATYQRTRALVRTGMD
- [0133] PRMCSLMQGSTLPRRSGAAGAAVKGIGTMVMELIRMVKRGINDRNFWRGNGRKRTRSA
- [0134] YERMCNILKGFQTAAQRAMVDQVRESRNPNGAEIEDLIFLARSALILRGSVAHKSCSCL
- [0135] PACAYGPAVSSGYDFEKEGYSLVGIDPFKLLQNSQIYSLIRPNENPAHKSQLVWMACH
- [0136] SAAFEDLRLLSFIKGTKVSPRGKLSTRGVQIASNENMDNMGSSSTLELRSYWAIRTRS
- [0137] GGNTNQQRASAGQTSVQPTFSVQRNLPFEKSTIMAAFTGNTGRTSDMRAEIRMMEG
- [0138] AKPEEVSRFRGRGVFELSDEKATNPVPSFDMSNEGSYFFGDNAEEYDN
- [0139] AY856864 [SEQ ID NO :7] :
- [0140] MASQGTKRSYEQMETGGERQNATEIRASVGRMVSGIGRFYIQMCTELKLSDYEGRLIQNSITIERMVL
SAFDERRNRYLEEHPSAGKDPKKTGGPIYRRRDG
- [0141] KVVRELILYDKEEIRRIWRQANNGEDATAGLTHLMIWHSNLNDATYQRTRALVRTGMD
- [0142] PRMCSLMQGSTLPRRS GAAGAAVKGVGTMMELIRMIKRGINDRNFWRGNGRRTRIA
- [0143] YERMCNILKGFQTAAQRAMMDQVRESRNPNGAEIEDLIFLARSALILRGSVAHKSCSCL
- [0144] PACVYGLAVASGYDFEREGYSLVGIDPFRLQNSQVFSLIIRPNENPAHKSQLVWMACH
- [0145] SAAFEDLRVSSFIKGTKVPRGQLSTRGVQIASNENMEAMDSNTLELRSRYWAIRTRS
- [0146] GGNTNQRRASAGQISVQPTFSVQRNLPFERATIMAAFTGNTGRTSDMRTEIIGMMES
- [0147] ARPEDVSFQGRGVFELSDEKATNPVPSFDMNNEGSYFFGDNAEEYDN
- [0148] AAF02400 [SEQ ID NO :8] :
- [0149] MASQGTKRSYEQMETGGERQNATEIRASVGRMVGIGRFYIQMCTELKLSDQEGRLIQNSITVERMVLS
AFDERRNRYLEEHPSAGKDPKKTGGPIYRRRNG
- [0150] KVVRELILYDKEEIRRIWRQANNGEDATAGLTHMMIWHSNLNDATYQRTRALVRTGMD
- [0151] PRMCSLMQGSTLPRRSGAAGAAIKGVGTMMELIRMIKRGINDRNFWRGNGRRTRIA
- [0152] YERMCNILKGFQTAAQKAMMDQVRESRNPNGAEIEDLIFLARSALILRGSVAHKSCSCL
- [0153] PACVYGLAVASGYDFEREGYSLVGIDPFRLQNSQVFSLIIRPKENPAHKSQLVWMACH
- [0154] SAAFEDLRVSSFIKGTKVPRGQLSTRGVQIASNENVEAMDSSTLELRSRYWAIRTRS
- [0155] GGNTNQQRASAGQISVQPTFSVQRNLPFERVTIMAAFKGNTGRTSDMRTEIIRMMES
- [0156] ARPEDVSFQGRGVFELSDEKATNPVPSFDMSNEGSYFFGDNAEEYDN
- [0157] 本文提及的“Nucleozin”通常具有如下的化学结构：
- [0158]



[0159] 本文所用的“药学上可接受的”通常指的是那些化合物、材料、组合物和 / 或剂型, 其在充分的医疗判断范围内适用于接触人和动物的组织而没有过多的毒性、刺激、过敏反应或其他的问题或并发症, 具有合理的效益 / 风险比。

[0160] 本文所用的“药学上可接受的盐”通常指的是所公开的化合物的衍生物, 其中母体化合物通过形成其酸性或碱性盐而被修饰。所述的药学上可接受的盐的实例包括但不限于诸如胺类的碱性残基的无机酸盐或有机酸盐; 诸如羧酸的酸性残基的碱金属盐或有机盐。药学上可接受的盐包括例如自无毒性无机或有机酸中所形成的母体化合物的常规无毒性盐或季铵盐。例如, 此类常规的无毒性盐包括衍生自诸如盐酸、氢溴酸、硫酸、氨磺酰基、磷酸、硝酸等无机酸的那些盐, 以及自诸如乙酸、丙酸、琥珀酸、乙醇酸、硬脂酸、乳酸、苹果酸、酒石酸、柠檬酸、抗坏血酸、双羟萘酸、马来酸、丙醇二酸、苯乙酸、谷氨酸、苯甲酸、水杨酸、磺胺吡啶、2-乙酰基苯甲酸、反丁烯二酸、甲苯磺酸、萘磺酸、甲基磺酸、乙烷二磺酸、草酸和羟乙磺酸的有机酸制备的盐。

[0161] 本文所用的“取代的”通常指的是被一个或多个取代基所取代的一部分 (例如烷基基团), 所述的取代基包括但不限于: 烷基、烯基、炔基、 C_3-C_8 环烷基、卤素, 例如氟、氯、溴和碘; 氰基; 烷氧基; 羟基、苯基; 以及取代的苯基。

[0162] 本文所用的“取代的芳基”通常指的是具有一个或多个互不干扰的基团作为取代基的芳基基团。对苯环上的取代而言, 取代基可在任何方向上 (即邻位、间位和 / 或对位的)。在一些实施方案中, 所述的取代的芳基包括 2,6-双取代的苯基, 其中这两个取代基如所定义的, 优选其中一个为卤素, 尤其是氯 (Cl), 而另一个为硝基 (NO_2) 或它们两个都为卤素, 尤其是氯 (Cl)。

[0163] II 化合物

[0164] 本文所述的为具有抗病毒活性, 尤其是抗流感病毒的化合物。

[0165] 在一些实施方案中, 化合物具有以下的通式 I-VI 或其药学上可接受的盐。

[0166] 在优选的实施方案中, NP 抑制剂具有通式 I 的结构:

[0167] $Ar^1-Y-Ar^2-X-W-Z-Ar^3$

[0168] (通式 I)

[0169] 其中, Ar^1 、 Ar^2 和 Ar^3 各自为独立地取代或未取代的芳基或杂环芳基基团;

[0170] X、Y 和 Z 独立地缺失 (即直接连接) 或选自 $-C(=O)-$ 、 $-S(=O)-$ 、 $-SO_2-$ 、 $-N(R_1)-$ 、 $-C(R_2)=C(R_3)-$ 和 $-C(R_4R_5)_n-$,

[0171] 其中 n 为 0 至 6, R_1-R_5 为各自独立地选自氢、直链或支链的 C_1-C_6 烷基、直链或支链的 C_1-C_6 烯基、直链或支链的 C_1-C_6 炔基或直链和支链的 C_1-C_6 烷氧基; 并且

[0172] W 为直链基团或 5-7 元取代或未取代的环状或杂环基团 (Cy)。

[0173] 在一些实施方案中, Ar^1 被氢、羟基、硝基、氨基或叠氮化物取代; Ar^2 被甲基基团取代; X 为 $C=O$; Y 和 Z 缺失; Cy 为哌嗪; 和 / 或 Ar^3 被卤代基、硝基、或卤代基与硝基的组

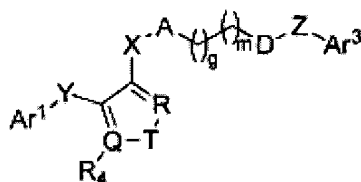
合取代。

[0174] 在一些实施方案中, Cy 为包含 2 个氮原子的取代的 5-7 元不饱和环, 其中一个氮原子与 X 结合而另一个氮原子与 Z 结合。

[0175] 在一优选的实施方案中, Cy 为一取代的哌嗪, 其中 N1 (1 位的 N) 与 X 结合而 N4 (4 位的 N) 与 Z 结合。

[0176] 在一些实施方案中, NP 抑制剂具有通式 II 的结构

[0177]



(通式 II)

[0178] 其中 Ar^1 和 Ar^3 各自为独立地取代或未取代的芳基或杂环芳基基团；

[0179] X、Y 和 Z 独立地缺失或选自 $-C(=O)-$ 、 $-S(=O)-$ 、 $-SO_2-$ 、 $-N(R_{10})-$ 、 $-C(R_{11})=$ 、 $C(R_{12})-$ 和 $-C(R_{13}R_{14})_n-$ ；

[0180] n、g 和 m 为独立地 0 至 6；

[0181] T、Q 和 R 为独立地选自 $C(R_8R_9)$ 、氮、氧、磷、硅、硫和砷；

[0182] A 和 D 独立地各自为 $CR_{15}R_{16}$ 或 NR_{17} ；

[0183] 其中 R_4 和 R_8-R_{17} 独立地选自氢、卤素、羟基、直链或支链的 C_1-C_6 烷基、直链或支链的 C_1-C_6 烯基、直链或支链的 C_1-C_6 炔基、或直链和支链的 C_1-C_6 烷氧基、氨基、叠氮化物、氰基、硝基、腈、异腈、酰胺、羧酸酯、尿素、胍、异氰酸酯、异硫氰酸酯和硫醚, 或其中 $-CR_{15}R_{16}$ 、 $-NR_{17}$ 或其组合当与任选地桥接亚甲基在一起时形成 5-8 元环状结构。

[0184] 在一些实施方案中, Ar^1 被氢、羟基、硝基、氨基或叠氮化物取代; X 为 $-C=O$; Y 和 Z 缺失, 且 Ar^3 被卤代基、硝基、或卤代基与硝基的组合取代。

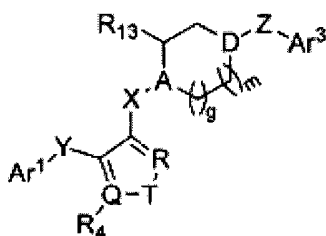
[0185] 在一优选的实施方案中, R_4 为甲基。

[0186] 在一些实施方案中, Q 为碳, T 为氧, R 为氮。

[0187] 在一些实施方案中, g 和 m 为 1 而 A 和 D 为 NR_{17} , 其中所述的 A-D 定义为哌嗪。

[0188] 在一些实施方案中, NP 抑制剂具有通式 III 的结构:

[0189]



(通式 III)

[0190] 其中 Ar^1 和 Ar^3 各自为独立地取代或未取代的芳基或杂环芳基基团；

[0191] X、Y 和 Z 独立地缺失或选自 $-C(=O)-$ 、 $-S(=O)-$ 、 $-SO_2-$ 、 $-N(R_{10})-$ 、 $-C(R_{11})=$ 、 $C(R_{12})-$ 和 $-C(R_{14}R_{15})_n-$ ；

[0192] n、g 和 m 为独立地 0 至 6；

[0193] A、D、T、Q 和 R 独立地选自 C(R₈R₉)、氮、氧、磷、硫、硅和砷；

[0194] 其中 R₄和 R₈-R₁₅独立地选自氢、卤素、羟基、直链或支链的 C₁-C₆烷基、直链或支链的 C₁-C₆烯基、直链或支链的 C₁-C₆炔基、或直链和支链的 C₁-C₆烷氧基、氨基、叠氮化物、氰基、硝基、腈、异腈、酰胺、羧酸酯、尿素、胍、异氰酸酯、异硫氰酸酯和硫醚。

[0195] 在一些实施方案中，Ar¹被氢、羟基、硝基、氨基或叠氮化物取代；X 为 -C=O；Y 和 Z 缺失，且 Ar³被卤代基、硝基、或卤代基与硝基的组合取代。

[0196] 在一优选实施方案中，Q 为碳，T 为氧，R 为氮。

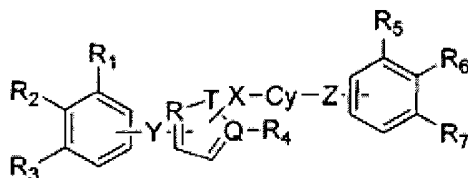
[0197] 在一些实施方案中，A 和 D 为氮。

[0198] 在一些实施方案中，R₄和 R₁₃为独立地氢或甲基。

[0199] 在优选实施方案中，R₄为甲基而 R₁₃为氢。

[0200] 在一些实施方案中，NP 抑制剂组合物具有通式 IV 的结构：

[0201]



(通式 IV)

[0202] 其中 X、Y 和 Z 独立地缺失或选自 -C(=O)-、-S(=O)-、-SO₂-、-N(R₁₀)-、-C(R₁₁)=C(R₁₂)- 和 -C(R₁₃R₁₄)_n-；

[0203] 其中 n 为 0 至 6。

[0204] T、Q 和 R 独立地选自 C(R₈R₉)、氮、氧、磷、硫、硅和砷；并且

[0205] Cy 为 4-7 元取代的或未取代的环状或杂环基团；并且

[0206] 其中 R₁-R₁₄独立地选自氢、卤素、羟基、直链或支链的 C₁-C₆烷基、直链或支链的 C₁-C₆烯基、直链或支链的 C₁-C₆炔基、或直链和支链的 C₁-C₆烷氧基、氨基、叠氮化物、氰基、硝基、腈、异腈、酰胺、羧酸酯、尿素、胍、异氰酸酯、异硫氰酸酯和硫醚。

[0207] 在一些实施方案中，Cy 为包含 2 个氮原子的取代的 5-7 元不饱和环，其中一个氮原子与 X 结合而另一个氮原子与 Z 结合。

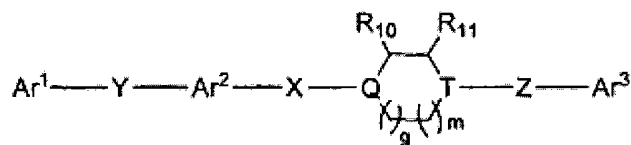
[0208] 在一优选的实施方案中，Cy 为取代的哌嗪，其中 N1 与 X 结合而 N4 与 Z 结合，Y 和 Z 缺失，X 为 C=O，T 为氧，Q 为碳以及 R 为氮。

[0209] 在一些实施方案中，R₁-R₃和 R₅-R₇独立地选自卤代基，硝基、或卤代基与硝基的组合。

[0210] 在一优选的实施方案中，R₄为甲基基团。

[0211] 在一些实施方案中，NP 抑制剂具有通式 V 的结构：

[0212]



(通式 V)

[0213] 其中 Ar^1 、 Ar^2 和 Ar^3 各自为独立地取代或未取代的芳基或杂环芳基基团；

[0214] X、Y 和 Z 独立地缺失或选自 $-C(=O)-$ 、 $-S(=O)-$ 、 $-SO_2-$ 、 $-N(R_1)=O$ 、 $-C=C$ 和 $-C(R_2R_3)_n-$ ；

[0215] n、g 和 m 为独立地 0 至 6；

[0216] Q 和 T 独立地选自氮或 CR_4 ；并且

[0217] R_1 - R_4 、 R_{10} 和 R_{11} 独立地选自氢、卤素、羟基、直链或支链的 C_1 - C_6 烷基、直链或支链的 C_1 - C_6 烯基、直链或支链的 C_1 - C_6 炔基、或直链和支链的 C_1 - C_6 烷氧基、氨基、叠氮化物、氰基、硝基、腈、异腈、酰胺、羧酸酯、尿素、胍、异氰酸酯、异硫氰酸酯和硫醚。

[0218] 在一些实施方案中，Q 和 T 都是氮。

[0219] 在一些实施方案中， R_{10} 为甲基而 R_{11} 为氢。在另一实施方案中， R_{10} 和 R_{11} 都是氢。

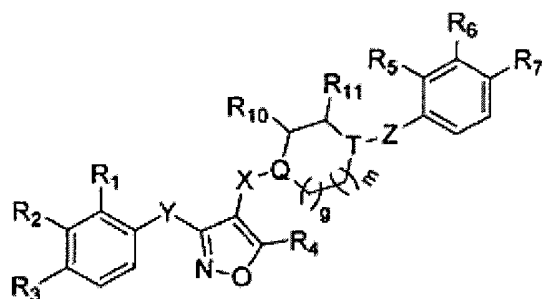
[0220] 在一些实施方案中，Y 和 Z 缺失而且 X 为 $C=O$ 。

[0221] 在一些实施方案中，g 和 m 为 1。

[0222] 在一优选的实施方案中， Ar^1 和 Ar^3 为取代的苯基， Ar^2 为取代的异噻唑，Y 和 Z 缺失，X 为 $C=O$ ，Q 和 T 为氮，g 和 m 是 1， R_{10} 为甲基而 R_{11} 为氢。

[0223] 在一些实施方案中，NP 抑制剂具有通式 VI 的结构：

[0224]



(通式 VI)

[0225] 其中 X、Y 和 Z 独立地缺失或选自 $-C(=O)-$ 、 $-S(=O)-$ 、 $-SO_2-$ 、 $-N(R_{12})-$ 、 $-C(R_{13})=C(R_{14})-$ 和 $-C(R_{15}R_{16})_n-$ ，

[0226] n、g 和 m 为独立地 0 至 6；

[0227] Q 和 T 独立地选自氮或 CR_{17} ；并且

[0228] R_1 - R_{17} 独立地选自氢、卤代基、羟基、直链或支链的 C_1 - C_6 烷基、直链或支链的 C_1 - C_6 烯基、直链或支链的 C_1 - C_6 炔基、或直链和支链的 C_1 - C_6 烷氧基、氨基、叠氮化物、氰基、硝基、腈、异腈、酰胺、羧酸酯、尿素、胍、异氰酸酯、异硫氰酸酯和硫醚。

[0229] 在一些实施方案中，Q 和 T 都是氮。

[0230] 在一些实施方案中， R_{10} 为甲基基团而 R_{11} 为氢。在另一实施方案中， R_{10} 和 R_{11} 都是氢。

- [0231] 在一些实施方案中, Y 和 Z 缺失而且 X 为 C = O。
- [0232] 在一些实施方案中, g 和 m 是 1。
- [0233] 在一些实施方案中, R₁-R₃ 和 R₅-R₇ 独立地选自卤代基, 硝基、或卤代基与硝基的组合。
- [0234] 在一优选的实施方案中, R₄ 为甲基基团。
- [0235] 本文所述的引用的示例化合物为:
- [0236] [4-(2-氯-4-硝基-苯基)-哌嗪-1-基]-[3-(4-羟基-苯基-甲基异噁唑-4-基)]-甲酮(化合物 1, 结构通式显示于图 1a 中);
- [0237] [4-(2-氯-4-硝基-苯基)-哌嗪-1-基]-[3-苯基-5-甲基-异噁唑-4-基]-甲酮(化合物 2, 结构通式显示于图 2a 中);
- [0238] [4-(2-氯-4-硝基-苯基)-哌嗪-1-基]-[3-(4-氨基-苯基)-甲基异噁唑-4-基]-甲酮(化合物 3, 结构通式显示于图 3a 中);
- [0239] [4-(2-氯-4-硝基-苯基)-哌嗪-1-基]-[3-(4-叠氨基-苯基)-5-甲基异噁唑-4-基]-甲酮(化合物 4, 结构通式显示于图 4a 中);
- [0240] [4-(2-氯-4-硝基-苯基)-哌嗪-1-基]-[3-(2-氯-苯基)-5-甲基异噁唑-4-基]-甲酮(化合物 5, 结构通式显示于图 5a 中);
- [0241] [4-(2-氯-4-硝基-苯基)-2-甲基-哌嗪-1-基]-[3-(2-氯-苯基)-5-甲基-异噁唑-4-基]-甲酮(化合物 6, 结构通式显示于图 6a 中);
- [0242] [4-(2-氯-4-硝基-苯基)-2-甲基-哌嗪-1-基]-[3-苯基-5-甲基异噁唑-4-基]-甲酮(化合物 7, 结构通式显示于图 7a 中);
- [0243] [4-(4-硝基-苯基)-哌嗪-1-基]-[3-(2-氯-苯基)-5-甲基-异噁唑-4-基]-甲酮(化合物 8, 结构通式显示于图 8a 中); 以及
- [0244] [4-(4-硝基-苯基)-哌嗪-1-基]-[3-(2,6-二氯-苯基)-5-甲基-异噁唑-4-基]-甲酮(化合物 9, 结构通式显示于图 9a 中);
- [0245] [4-(2-硝基-6-氯-苯基)-哌嗪-1-基]-[3-(2-二氯-苯基)-5-甲基-异噁唑-4-基]-甲酮(化合物 10, 结构通式显示于图 10a 中)。
- [0246] 本文所述的化合物能够作为游离酸或游离碱或药学上可接受的盐给药。可通过常规化学方法自包含碱性或酸性部分的母体化合物中合成化合物的药学上可接受的盐。通常, 可通过将游离酸或碱形式的这些化合物与适当的碱或酸在水或有机溶剂或这两者的混合物中起反应来制备此类盐, 通常优选非水性介质如乙醚、乙酸乙酯、乙醇、异丙醇或乙腈。合适的盐的名单可在 Remington's Pharmaceutical Sciences, 20th ed., Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 2000, p. 704 (雷明顿的药物科学, 20 版, 利平科特·威廉斯 & 威尔金斯, 巴尔的摩, 医学博士, 2000, p. 704) 中找到。
- [0247] B. 药物组合物
- [0248] 利用本领域中已知的技术, 本文所述的化合物和 / 或它们药学上可接受的盐可配制成适于肠内及胃肠外给药的剂型。
- [0249] 药物组合物包含有效量的一种或多种本文所述的化合物。本文所用的“有效量”通常指的是一种在常规给予或开具处方的范围内的数量或剂量以显示如体外或体内的抗病毒活性。有效量的范围因人而异; 然而最佳剂量易于由诸如处方医师的本领域技术人员

所确定。在常规的临床实践中此类范围被很好地确立下来,因而易于为本领域技术人员所确定。剂量可通过给定的总量(例如每剂量或每日)或浓度来测定。0.01、0.05、0.1、0.2、0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、40、50、100、250、500 和 1000mg/kg/日的剂量适合于治疗。在一实施方案中,每日剂量为 0.2-250mg/kg。

[0250] 本文所述的化合物可与一种或多种药学上可接受的载体和/或赋形剂结合,所述的载体和赋形剂被认为是安全有效的而且可给药于个体而不会引起不良的生物学副作用或不需要的相互作用。载体是存在于药物制剂中除了活性成分以外所有的组分。

[0251] 1. 胃肠外制剂

[0252] 可配制本文所述的化合物用于胃肠外给药。本文所用的“胃肠外给药”意指通过除了经由消化道以外的任一方法或非侵袭性局部或区域性的途径给药。例如,胃肠外给药可包括通过注射或输液对患者进行静脉内、皮内、腹膜内、胸膜内、气管内、肌肉内、皮下给药。

[0253] 利用本领域已知的技术可将胃肠外制剂制备成水性组合物。通常此类组合物可制备成可注射的制剂,例如溶液或悬浮液;用于制备溶液或悬浮液的固体形态取决于注射前重组介质的添加,诸如微或纳米颗粒;乳剂,诸如油包水(w/o)乳剂、水包油(o/w)乳剂以及其微乳剂、脂质体或乳脂体。

[0254] 载体可以是溶剂或分散介质,例如其包含水、乙醇、一种或多种多元醇(例如丙三醇、丙烯、乙二醇和液态聚乙二醇)、油类,诸如植物油(例如花生油、玉米油、芝麻油等)以及其组合。例如可通过使用诸如卵磷脂的包被,通过维持分散液情况下所需要的颗粒大小和/或通过表面活性剂的使用,维持适当的流动性。在许多情况下,将优选包含等渗剂,例如糖或盐,诸如氯化钠。

[0255] 可在水或其他的溶剂或适于与一种或多种药学上可接受的赋形剂混合的分散介质中制备作为游离酸或碱或其药学上可接受的盐的活性化合物的溶液和分散液。所述的赋形剂包括但不限于表面活性剂、分散剂、乳化剂、pH 改性剂以及其组合。

[0256] 合适的表面活性剂可以是阴离子的、阳离子的、两性的或非离子的表面活性剂。合适的阴离子表面活性剂包括但不限于那些包含羧酸盐、磺酸盐和硫酸根离子的表面活性剂。阴离子表面活性剂的实例包括长链烷基磺酸和烷基芳基磺酸的钠、钾、铵盐,例如十二烷基苯磺酸钠;二烷基磺基丁二酸钠,诸如十二烷基苯磺酸钠;二烷基磺基丁二酸钠,例如双(2-乙基硫氧基)磺化琥珀酸钠;以及烷基硫酸盐,诸如十二烷基硫酸钠。阳离子表面活性剂包括但不限于季铵化合物,诸如苯扎氯铵、苄索氯铵、西曲溴铵、硬脂酰二甲苯基氯化铵、聚乙二醇和椰油胺。所述的非离子表面活性剂的实例包括乙二醇单硬脂酸酯、丙二醇肉豆蔻酸酯、单硬脂酸甘油酯、甘油硬脂酸酯、聚甘油-4-油酸酯、酰化山梨糖醇酐、酰化蔗糖、聚乙二醇(150)月桂酸酯、聚乙二醇(400)单月桂酸酯、聚氧乙烯单月桂酸酯、聚山梨醇酯、聚氧乙烯辛基苯基醚、聚乙二醇(1000)十六醚、聚氧乙烯十三基醚、聚丙二醇丁基醚、泊洛沙姆(Poloxamer®)401、硬脂酰单异丙胺以及聚氧乙烯氢化油脂胺。两性表面活性剂的实例包括N-十二烷基丙氨酸钠、N-月桂酰-亚胺二丙酸钠、肉豆蔻酰两性醋酸盐、月桂基甜菜碱以及月桂基硫代甜菜碱。

[0257] 所述制剂可包含防腐剂以防止微生物生长。合适的防腐剂包括但不限于苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、山梨酸和硫柳汞。这一制剂也可包含抗氧化剂以防止活性剂降解。

[0258] 组合物通常被缓冲至 pH 3-8 以用于重组后胃肠外给药。合适的缓冲液包括但不

限于磷酸盐缓冲液、醋酸盐缓冲液和柠檬酸盐缓冲液。

[0259] 经常在制剂中使用水溶性聚合物以用于胃肠外给药。合适的水溶性聚合物包括但不限于聚乙烯吡咯烷酮、右旋糖酐、羧甲基纤维素和聚乙二醇。

[0260] 通过将所需数量的活性化合物掺入到带有一种或多种以上所列举的赋形剂的适当的溶剂或分散介质中来制备无菌的可注射的溶液,根据需要,随后过滤灭菌。通常通过将各种已灭菌的活性成分掺入到包含基础分散介质和以上列举的那些中所需要的其他成分的无菌媒介中来制备,分散液。就用于制备无菌可注射溶液的无菌粉末而言,优选的制备方法为真空干燥和冷冻干燥技术,这可产生活性成分加上任一额外期望的来自早前已消毒过滤的溶液的成分的粉末。以如此方式制备粉末可使得颗粒本质上是多孔的,这可以促进颗粒的溶解。制造多孔颗粒的方法是本领域所熟知的。

[0261] 本文所述的胃肠外制剂可配制用于控释,所述的控释包括即刻释放、延迟释放、延长释放、脉冲式释放以及其组合。

[0262] 对胃肠外给药而言,一种或多种 NP 抑制剂以及任选地一种或多种额外的活性剂可掺入到微粒、纳米粒子或其提供控释的组合物中。在其中制剂包含两种或多种药物的实施方案中,所述的药物可配制用于相同类型的控释(例如延迟的、延长的、即刻的或脉冲的)或所述的药物可独立地配制用于不同类型的释放(例如即刻和延迟的、即刻和延长的、延迟和延长的、延迟和脉冲的等)。

[0263] 例如,化合物和/或一种或多种额外的活性剂可掺入到提供药物控释的聚合微粒中。药物释放受药物从微粒里向外的扩散和/或聚合微粒通过水解作用和/或酶促降解的降解所控制。合适的聚合物包括乙基纤维素和其他天然或合成的纤维素衍生物。

[0264] 缓慢可溶的并且可在水性环境中形成凝胶的聚合物,诸如羟丙甲纤维素或聚乙烯氧化物也可适用作包含微粒的药物的材料。其他聚合物包括但不限于聚酸酐、聚(酯酐)、多羟酸,诸如聚交酯(PLA)、聚乙二醇(PGA)、聚(丙交酯-和-乙交酯)(PLGA)、聚-3-羟基丁酸(PHB)及其共聚物、聚-4-羟基丁酸(P4HB)及其共聚物、聚己酸内酯及其共聚物以及其组合。

[0265] 可选择地,药物可掺入到由以下物质制备的微粒中:在水溶液中不可溶的或在水溶液中缓慢可溶但是能够在胃肠消化道中经由包括酶促降解、胆汁酸的表面活性剂作用和/或机械侵蚀被降解。如本文所用的,术语“在水中缓慢可溶的”指的是在30分钟时间段内不溶解于水中的物质。优选的实例包括脂类、脂质、蜡类、蜡样物质及其混合物。合适的脂类及脂质包括脂肪醇(诸如月桂基、肉豆蔻基硬脂酰、十六烷基或十八醇十六醇混合物)、脂肪酸及衍生物,其包括但不限于脂肪酸酯、脂肪酸甘油酯(单、双和三-甘油酯)和氢化脂肪。具体实例包括但不限于氢化植物油、氢化棉籽油、氢化蓖麻油、可获得的商标名为 Sterotex® 的氢化油、硬脂酸、可可油以及硬脂醇。合适的蜡类和蜡样物质包括天然或合成的蜡、碳氢化合物和常规的蜡。所述的蜡类的具体实例包括蜂蜡、糖蜡、蓖麻蜡、巴西棕榈蜡、石蜡和小烛树蜡。如本文所用的,蜡样物质被定义为在室温下通常是固态的,具有约30-300°C熔点的任一物质。

[0266] 在某些情况下,可能需要改变水渗入到微粒中的速率。为此,速率控制(毛细作用)剂可随以上所列举的脂类或蜡类一同配制。所述的速率控制物质的实例包括某些淀粉衍生物(例如蜡状麦芽糖糊精和鼓干玉米淀粉)、纤维素衍生物(例如羟丙基甲基纤维素、

羟基丙基纤维素、甲基纤维素和羧甲基纤维素)、褐藻酸、乳糖和滑石。额外地,可添加药学上可接受的表面活性剂(例如卵磷脂)以促进此类微粒的降解。

[0267] 非水溶性的蛋白,诸如玉米蛋白,也可用作合成包含药物的微粒的物质。额外地,水溶性的蛋白、多糖及其组合物可与药物一同配制于微粒中并且随后交联以形成非水溶性网络。例如,环糊精可与单个药物分子复合并随后交联。

[0268] 通过已知的药物配制技术可实现药物胶囊化或将药物掺入到载体物质中以产生包含微粒的药物。在制剂含脂类、蜡类或蜡样物质的情况下,通常将载体物质加热至它的溶解温度以上并添加药物以形成混合物,其包含悬浮在载体物质中的药物颗粒、溶解在载体物质中的药物或其混合物。随后通过以下的几种方法配制微粒:其包括但不限于凝结、挤压、喷雾冷冻或水分散体过程。在一优选的过程中,加热蜡类至其溶解温度以上,添加药物并在不断搅拌下随着混合物冷却而凝结炽热的蜡-药物混合物。可选择地,挤压并将炽热的蜡-药物混合物团成球状以形成丸或珠。这些过程的详细描述可在“Remington-The science and practice of pharmacy”(雷明顿-药物科学与实践),20th Edition(第20版),Jennaro et. al., (Phila, Lippencott, Williams, and Wilkens, 2000) 中找到。

[0269] 对一些载体物质而言,使用溶剂蒸发技术以产生包含微粒的药物可能是可期望的。在这种情况下,将药物和载体物质共同溶解于互溶剂中,随后通过几种技术产生微粒,所述的技术包括但不限于形成水或其他适当的介质中的乳剂,喷雾干燥或通过蒸发除去本体溶液中的溶剂并研磨由此得到的物质。

[0270] 在一些实施方案中,颗粒形式的药物均匀地分散在非水溶性或缓慢水溶性的物质中。为使组合物中的药物颗粒大小最小化,可在配制之前研磨药物粉末其自身以产生细小的颗粒。为此可使用药学领域中已知的喷射研磨过程。在一些实施方案中,通过加热蜡类或蜡样物质至其熔点以上,添加药物颗粒同时搅拌混合物,使颗粒形式的药物均匀地分散在蜡类或蜡样物质中。在这种情况下,可添加药学上可接受的表面活性剂至混合物以促进药物颗粒的分散。

[0271] 颗粒也可以裹上一种或多种缓释包衣。被脂酶水解的脂肪酸的固态酯可喷裹在微粒或药物颗粒上。玉米蛋白是一天然非水溶性的蛋白的实例。通过喷裹或湿法制粒技术可将其裹在包含微粒的药物或药物颗粒上。除了天然的非水溶性的物质以外,一些消化酶的底物可用交联方法处理,由此导致非水溶性网络的产生。已报道了许多由化学和物理的方式开启的交联蛋白的方法。获得交联的最常规的办法之一就是使用化学交联剂。所述的化学交联剂的实例包括醛类(戊二醛和甲醛)、环氧化合物、碳二亚胺、京尼平(genipin)。除了这些交联剂以外,氧化的和天然的糖已用于交联明胶((Cortesi, R., et al., Biomaterials 19(1998) 1641-1649)。也可利用酶促方式实现交联;例如转谷酰胺酶已被认可为是一种可用于交联海产品的公认安全的(GRAS)物质。最后,可通过物理方式诸如热处理、紫外线(UV)照射和伽马射线照射开启交联。

[0272] 为产生一围绕包含药物的微粒或药物颗粒的交联蛋白的包衣层,可将水溶性蛋白喷裹在微粒上并随后通过以上所述的方法之一进行交联。可选择地,可通过凝聚相分离法(例如通过盐的添加)及随后交联将包含药物的微粒微封入蛋白内。一些合适的用于这一目的的蛋白包括明胶、白蛋白、酪蛋白和谷蛋白。

[0273] 多糖也可被交联以形成非水溶性的网络。对许多多糖而言,可通过与钙盐或交联

聚合物主链的多价阳离子起反应实现这一目的。在多价阳离子存在的情况下,果胶、藻朊酸盐、右旋糖酐、直链淀粉和瓜尔豆胶易于交联。在电性相反的多糖间也可形成复合体;例如果胶和壳聚糖可经由静电相互作用复合在一起。

[0274] 2. 肠内制剂

[0275] 合适的口服剂型包括片剂、胶囊、溶液、悬浮液、糖浆和含片。使用本领域中熟知的压缩或成型技术制造片剂。利用本领域中熟知的技术,明胶或非明胶胶囊可被制备为硬或软的胶囊壳,其可封装液体、固体和半固体填料。

[0276] 可使用药学上可接受的载体制备制剂。如本文通常所用的“载体”包括但不限于稀释剂、防腐剂、粘合剂、润滑剂、崩解剂、膨胀剂、填充剂、稳定剂及其组合。

[0277] 载体也包括包衣组合物的所有组分,其可包括增塑剂、染料、着色剂稳定剂和助流剂。延迟释放剂量制剂可如以下标准参考文献中所述的制备,诸如“Pharmaceutical dosage form tablets”, eds. Liberman et al. (New York, Marcel Dekker, Inc., 1989), “Remington—The science and practice of pharmacy”, 20th ed., Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 2000 和 “Pharmaceutical dosage forms and drug delivery systems”, 6th Edition, Ansel et al., (Media, PA: Williams and Wilkins, 1995)。这些参考文献提供了用于制备片剂、胶囊以及片剂、胶囊和颗粒剂的延迟释放剂型的载体、材料、设备和过程的信息。

[0278] 合适的包衣物质的实例包括但不限于纤维素聚合物,诸如醋酸纤维素酞酸酯、羟丙纤维素、羟丙甲纤维素、羟丙甲纤维素酞酸酯和醋酸羟丙甲纤维素琥珀酸酯;聚醋酸乙烯酞酸酯、丙烯酸聚合物及共聚物、可商购获得的商标名为 EUDRAGIT® (罗氏制药, Westerstadt, 德国) 的甲基丙烯酸树脂、玉米蛋白、紫胶和多糖。

[0279] 额外地,包衣物质可包含常规的载体,诸如增塑剂、染料、着色剂、助流剂、稳定剂、造孔剂和表面活性剂。

[0280] 可选择药学上可接受的赋形剂包括但不限于稀释剂、粘合剂、润滑剂、崩解剂、着色剂、稳定剂和表面活性剂。稀释剂,也称为“填充剂”通常为增加固体剂型体积所必需的,从而可提供有实用性的大小用于片剂的压缩或珠或颗粒的形成。合适的稀释剂包括但不限于碳酸氢钙二水合物、硫酸钙、乳糖、蔗糖、甘露醇、山梨醇、纤维素、微晶纤维素、高岭土、氯化钠、干淀粉、水解淀粉、预胶凝淀粉、有机硅二氧化碳、氧化钛、镁铝硅酸盐和糖粉。

[0281] 粘合剂被用于给予固体剂型粘聚性,从而确保在剂型形成后片剂或珠剂或颗粒剂仍保持完好。合适的粘合剂物质包括但不限于淀粉、预胶凝淀粉、明胶、糖类(包括蔗糖、葡萄糖、右旋糖、乳糖和山梨醇)、聚乙二醇、蜡类、天然的及合成的树胶诸如阿拉伯树胶、黄芪胶、褐藻酸钠、纤维素、其包括羟丙甲纤维素、羟丙纤维素、乙基纤维素和硅酸镁铝、合成聚合物诸如丙烯酸和甲基丙烯酸共聚物、甲基丙烯酸共聚物、甲基丙烯酸甲酯共聚物、氨基甲基丙烯酸甲酯共聚物、聚丙烯酸/聚甲基丙烯酸以及聚乙烯吡咯烷酮。

[0282] 润滑剂被用于促进片剂生产。合适的润滑剂的实例包括但不限于硬脂酸镁、硬脂酸钙、硬脂酸、甘油山萘酸酯、聚乙二醇、滑石和矿物油。

[0283] 崩解剂被用于促进剂型在给药后崩解或“解体”,其通常包括但不限于淀粉、羧基乙酸淀粉钠、羧甲基淀粉钠、羧甲基纤维素钠、羟丙基纤维素、预胶凝淀粉、黏土、纤维素、藻蛋白碱、树胶或交联的聚合物、诸如交联的 PVP (Polypylasdone® XL 来自于 GAF 化工有限公

司)。

[0284] 稳定剂被用于抑制或延迟药物分解反应,所述的药物分解反应其包括,举例来说,氧化反应。合适的稳定剂包括但不限于抗氧化剂、丁基羟基甲苯(BHT)、抗坏血酸、其盐及酯类、维生素E、生育酚及其盐、亚硫酸盐诸如焦亚硫酸钠、半胱氨酸及其衍生物、柠檬酸、没食子酸丙酯以及丁基羟基茴香醚(BHA)。

[0285] 口服剂型,诸如胶囊、片剂、溶液和悬浮液,可被配制用于控制释放。例如,一种或多种化合物与可选择的一种或多种额外的活性剂可被配制到纳米微粒、微粒及其组合物中,并被封入到软或硬的明胶胶囊或非明胶胶囊或分散在分散介质中以形成口服的悬浮液或糖浆。颗粒可形成药物和控释的聚合物或基质。可选择地,在掺入到最终剂型之前,药物颗粒可裹上一层或多层控释的包衣。

[0286] 在另一实施方案中,一种或多种化合物与可选择的一种或多种额外的活性剂被分散在基质物质中,所述的基质物质一旦与诸如生理体液的水性介质接触就会胶化或乳化。在胶化情况下,夹住活性剂的基质膨胀,所述的活性剂随着时间的流逝通过扩散和/或基质物质的降解而被缓慢释放出来。此类基质可被配制为片剂或填料用于硬或软的胶囊。

[0287] 还在另一实施方案中,一种或多种化合物与任选地一种或多种额外的活性剂被配制到固体口服剂型中,诸如片剂或胶囊,而且固体剂型被一层或多层诸如延迟释放的包衣或延长释放的包衣的控释的包衣裹上。包衣或包衣们也可包含化合物和/或额外的活性剂。

[0288] 延长释放制剂通常被制备成扩散或渗透系统,例如如“Remington-The science and practice of pharmacy”(20th ed.,Lippincott Williams & Wilkins,Baltimore,MD, 2000)中所述。通常扩散系统由两种装置类型,储存器和基质组成,本领域中对其熟知且有所描述。通常通过将带有缓慢溶解的聚合物载体的药物压缩成片剂形式制备基质装置。三种主要的用于基质装置制备的物质类型为不溶性塑料、亲水聚合物和脂肪族化合物。塑料基质包括但不限于丙烯酸甲酯甲基丙烯酸甲酯、聚氯乙烯和聚乙烯。亲水聚合物包括但不限于纤维素聚合物例如甲基和乙基纤维素,羟烷基纤维素例如羟丙基纤维素,羟丙甲基纤维素,羧甲基纤维素钠和 Carbopol[®] 934,聚氧化乙烯及其混合物。脂肪族化合物包括但不限于各种蜡类,例如巴西棕榈蜡和三硬脂酸甘油酯,以及蜡型物质,包括氢化蓖麻油或氢化植物油或其混合物。

[0289] 在某些优选的实施方案中,塑性材料为药学上可接受的丙烯酸聚合物,其包括但不限于丙烯酸和甲基丙烯酸共聚物、甲基丙烯酸甲酯、甲基丙烯酸甲酯共聚物、甲基丙烯酸乙氧基乙酯、氰乙基甲基丙烯酸酯、氮烷基甲基丙烯酸酯共聚物、聚(丙烯酸)、聚(甲基丙烯酸)、甲基丙烯酸烷基胺共聚物、聚(甲基丙烯酸甲酯)、聚(甲基丙烯酸)(酸酐)、聚甲基丙烯酸酯、聚丙烯酰胺、聚(甲基丙烯酸酸酐)以及甲基丙烯酸缩水甘油酯共聚物。

[0290] 在某些优选的实施方案中,丙烯酸聚合物由一种或多种异丁烯酸铵共聚物组成。异丁烯酸铵共聚物为本领域中所熟知的,且在NF XVII被描述为丙烯酸和带有低含量季铵基团的甲基丙烯酸酯的完全聚合的共聚物。

[0291] 在一优选的实施方案中,丙烯酸聚合物为丙烯酸树脂漆诸如那些可自Rohm Pharma商购获得的,商标名为Eudragit[®]。在另外优选的实施方案中,丙烯酸聚合物由两种丙烯酸树脂漆的混合物组成,所述的丙烯酸树脂漆可自Rohm Pharma商购获得的,商标分

别为 Eudragit® RL30D 和 Eudragit® RS30D。Eudragit® RL30D 和 Eudragit® RS30D 为丙烯酸和带有低含量季铵基团的甲基丙烯酸酯的聚合物, 铵基基团与剩余的中性(甲基)丙烯酸酯的摩尔比率在 Eudragit® RL30D 为 1 : 20, 在 Eudragit® RS30D 中为 1 : 40。平均分子量约为 150,000。也优选 Eudragit® S-100 和 Eudragit® L-100。代码命名 RL(高渗透性)和 RS(低渗透性)指的是这些试剂的渗透特性。Eudragit® RL/RS 混合物在水和消化液中是不可溶的。然而, 所形成的包括相同物质的多微粒系统在水性溶液和消化液中是可膨胀的且可渗透的。

[0292] 以上所述的聚合物诸如 Eudragit® RL/RS 可以任一所需的比例混合在一起以最终获得具有理想的溶解属性的持续释放制剂。例如理想的持续释放多微粒系统可自 100% Eudragit® RL、50% Eudragit® RL 和 50% Eudragit® RS 和 10% Eudragit® RL 和 90% Eudragit® RS 获得。本领域中技术人员应当理解, 也可使用其他的丙烯酸聚合物, 例如诸如 Eudragit® L。

[0293] 可选择地, 可利用渗透系统或通过将半渗透性的包衣应用到剂型中来制备延长释放制剂。对于后一种情况, 所需的药物释放属性可通过将低渗透性的与高渗透性的包衣物质以合适的比例组合来获得。

[0294] 以上所述的带有不同药物释放机制的装置可在包含单一的或多重的单元的最终剂型中进行组合。所述的多重单元的实例包括但不限于包含片剂、珠或颗粒的多层片剂和胶囊。可借助于使用包被或压缩过程在延长释放核心顶部应用即刻释放层或在多元系统诸如包含延长和即刻释放珠的胶囊中, 添加即刻释放部分至延长释放系统。

[0295] 通过本领域中常规已知的技术, 诸如直接压缩、湿法制粒或干法制粒制备包含亲水聚合物的延长释放片剂。它们的制剂通常掺入聚合物、稀释剂、粘合剂、润滑剂以及活性药物成分。通常所述的稀释剂包括惰 性粉状物质诸如淀粉、粉状纤维素、尤其是结晶和微晶纤维素、糖类诸如果糖、甘露醇和蔗糖、预拌粉以及相似的可食用粉末。典型的稀释剂包括, 例如各种类型的淀粉、乳糖、甘露醇、高岭土、磷酸钙或硫酸钙、无机盐诸如氯化钠和糖粉。粉状纤维素衍生物也是可用的。典型的片剂粘合剂包括诸如淀粉、明胶以及诸如乳糖、果糖和葡萄糖的糖类物质。天然的和合成的树胶, 包括阿拉伯树胶、褐藻酸酯、甲基纤维素和聚乙烯吡咯烷酮也是可用的。聚乙二醇、亲水聚合物、乙基纤维素和蜡类也可用作粘合剂。润滑剂在片剂制剂中是必需的以防止片剂和打孔器粘附模具上。从此类湿滑的固体如滑石、硬脂酸镁和硬脂酸钙、硬脂酸以及氢化植物油中选取润滑剂。

[0296] 通常利用本领域中已知的方法, 诸如直接混合方法、凝结方法和水分散体方法制备包含蜡类物质的延长释放片剂。在凝结方法中, 药物与蜡类物质混合且或被喷射凝结或被凝结、筛选及处理。

[0297] 可通过用聚合物膜包被固体剂型来制造延迟释放制剂, 所述的聚合物膜在胃的酸性环境中是不可溶的而在小肠的中性环境中是可溶的。

[0298] 例如可通过用挑选出来的包被物质包被药物或包含药物的组合物来制备延迟释放剂量单位。例如包含药物的组合物可为用于掺入到胶囊的片剂, 用作“包被核心”剂型中内核的片剂或多个用于掺入到片剂或胶囊的包含药物的珠、微粒或颗粒。优选的包被物质包括可生物消化的、可逐渐水解的、可逐渐溶于水的和 / 或可酶促降解的聚合物, 而且可为常规的“肠溶的”聚合物。如本领域中技术人员应当理解, 肠溶的聚合物随着剂型穿过胃

肠道,在下胃肠道较高的 pH 环境中变得可溶或缓慢地侵蚀,同时可酶促降解的聚合物被存在于下胃肠道尤其是结肠内的细菌性酶降解。合适的用于影响延迟释放的包衣物质包括但不限于纤维素聚合物,诸如羟丙基纤维素、羟乙基纤维素、羟甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素醋酸琥珀酸酯、羟丙基甲基纤维素酞酸酯、甲基纤维素、乙基纤维素、纤维素醋酸酯、醋酸纤维素酞酸酯、醋酸纤维素偏苯三甲酸酯和羧甲基纤维素钠、丙烯酸聚合物和共聚物、优选形成于丙烯酸、甲基丙烯酸、丙烯酸甲酯、丙烯酸乙酯、甲基丙烯酸甲酯和 / 或乙基丙烯酸甲酯以及其他的可商购获得的商标为 Eudragit® (Rohm Pharma; Westerstadt, Germany) 的甲基丙烯酸树脂,其包括 Eudragit® L30D-55 和 L100-55 (pH 5.5 及以上可溶)、Eudragit® L-100 (pH 6.0 及以上可溶)、Eudragit® S (pH 7.0 及以上,高度酯化的结果) 以及 Eudragits® NE、RL 和 RS (具有不同程度渗透性和膨胀性的非水溶性聚合物); 乙烯基聚合物和共聚物诸如聚乙烯吡咯烷酮、醋酸乙烯酯、醋酸乙烯酯酞酸酯、醋酸乙烯酯巴豆酸共聚物和乙烯-醋酸乙烯酯共聚物; 酶促降解的聚合物诸如偶氮聚合物、果胶、壳聚糖、直链淀粉和瓜尔豆胶; 玉米蛋白以及紫胶。也可使用不同包衣物质的组合。也可应用使用不同聚合物的多层包衣。

[0299] 对具体的包衣物质而言,优选的包衣重量易于由本领域中技术人员通过评估用各种不同数量的包衣物质制备的片剂、珠和颗粒的个体释放属性而确定。产生所需释放特征的材料、方法和应用形式的组合,只能由技术人员通过临床研究确定。

[0300] 包衣组合物可包括常规的添加剂,诸如增塑剂、染料、着色剂、稳定剂、助流剂等。增塑剂正常存在以减少包衣的脆性,通常占相对于聚合物干重的约 10-50wt. %。典型的增塑剂的实例包括聚乙二醇、丙二醇、三醋精、酞酸二甲酯、酞酸二乙酯、酞酸二丁酯、癸二酸二丁酯、柠檬酸三乙酯、柠檬酸三丁酯、乙酰柠檬酸三乙酯、蓖麻油以及乙酰甘油单酯。稳定剂优选用于稳定分散中的微粒。典型的稳定剂为非离子乳化剂诸如山梨醇酞酯、聚山梨醇酯和聚乙烯吡咯烷酮。助流剂被推荐用于减少膜形成和干燥期间的粘附效应,通常占大约包衣溶液中聚合物重量的 25-100wt. %。一种有效的助流剂是滑石。也可使用其他的助流剂诸如硬脂酸镁和单硬脂酸甘油酯。也可使用染料诸如二氧化钛。也可添加少量的消泡剂诸如硅酮(例如二甲基硅油)至包衣组合物。

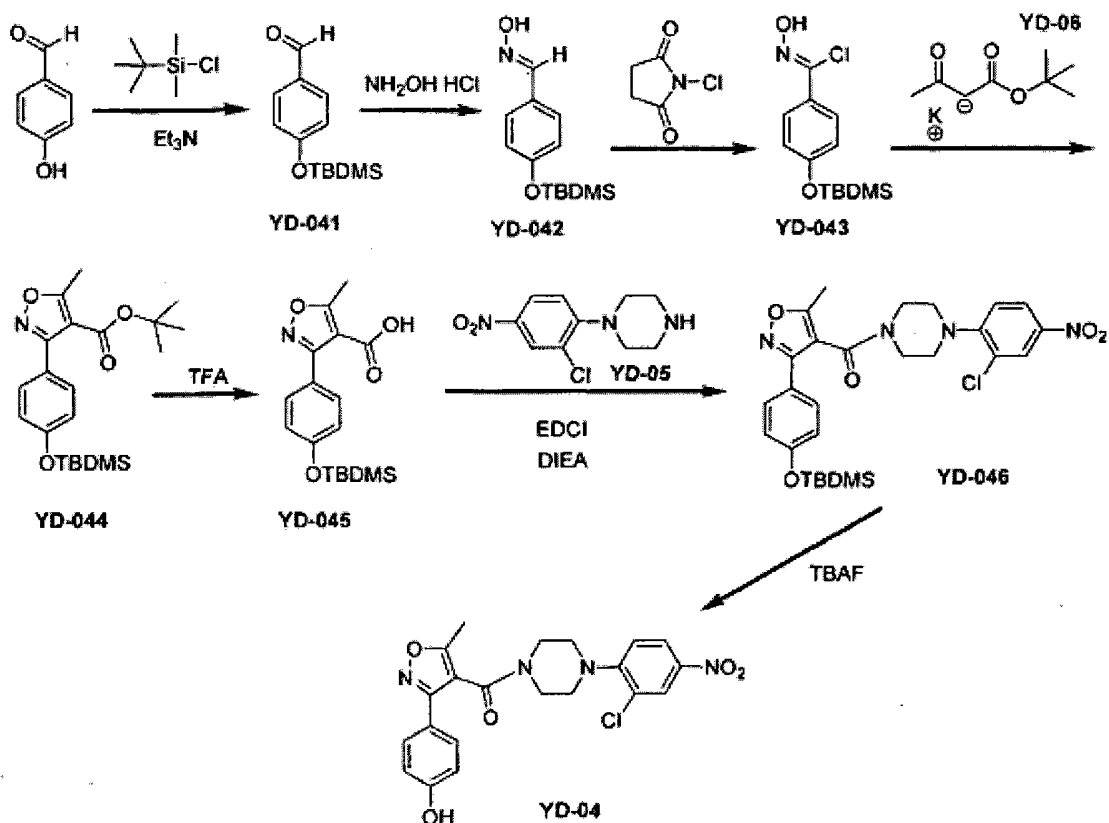
[0301] III. 制备化合物的方法

[0302] 本文所述的化合物合成的实施例显示于附加的方案 1-3。在所有情况下,起始物质为 1,2-二氯-4-硝基苯和哌嗪,其起反应而形成适用于制备本文所述的化合物的 1-(4-硝基-1-氯苯基)哌嗪。

[0303] 苯反应物上的取代基是不同的,相应地与待被制备的终产物相一致。如此形成的取代哌嗪与 3-苯基-4-羧基-异噁唑化合物起反应,根据待形成的终产物适当地被取代。通过受保护的 1,4-二羟苯与盐酸羟胺起反应及随后通过示例的方案 1-3 中的化学反应步骤制备 3-苯基-4-羧基-异噁唑化合物。实施例中描述了制备化合物 1-10 的方法。

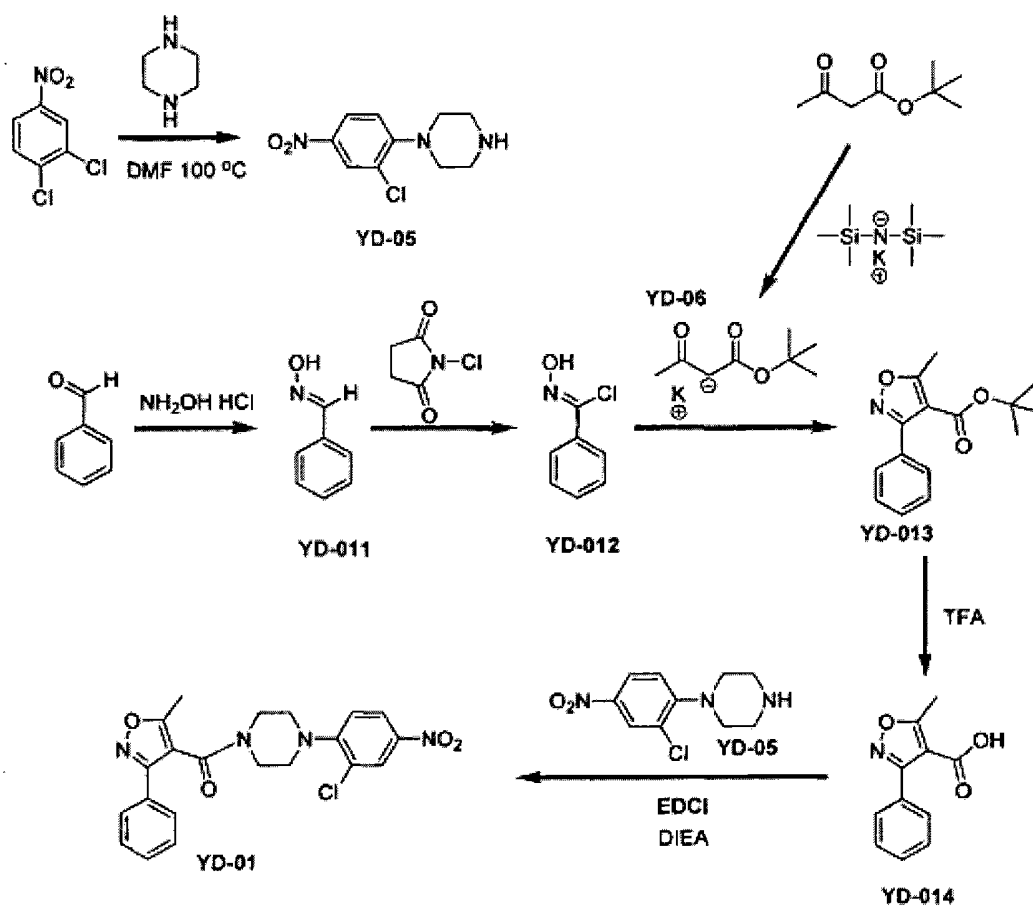
[0304] 方案 1. 化合物 1 (YD-04) 的合成

[0305]



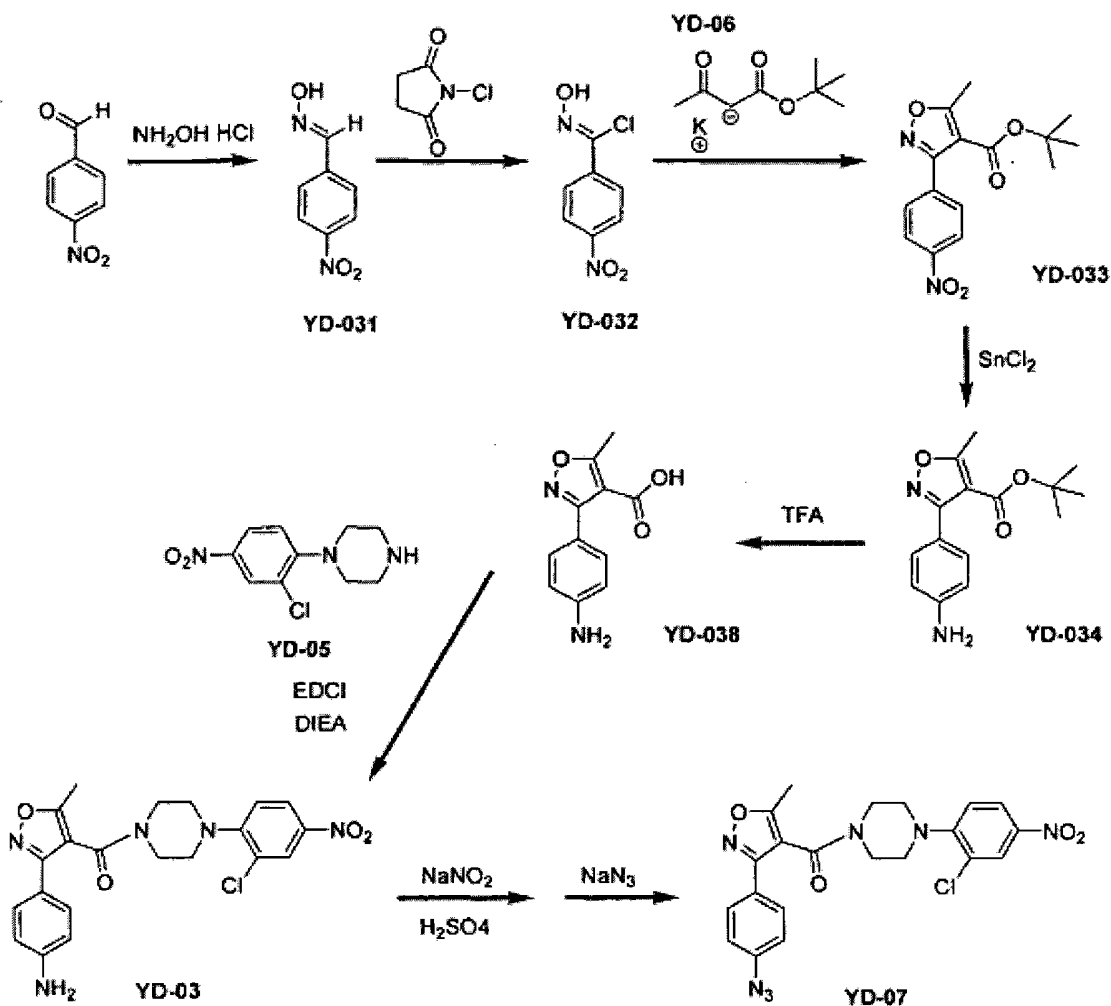
[0306] 方案 2. 化合物 2 (YD-01) 的合成):

[0307]



[0308] 方案 3. 化合物 3 (YD-03) 和化合物 4 (YD-07) 的合成

[0309]



[0310] IV. 使用方法

[0311] 本文所述的抗病毒剂可用于减少病毒生长、感染性、负担、散发、抗病毒耐药性的发展和 / 或增强传统的抗病毒治疗的功效。

[0312] 所有的带有反义 RNA 基因组的病毒都编码单链 RNA 结合核蛋白 (NP)。核蛋白是结构上与核酸 (DNA 或 RNA) 有关系的蛋白。流感病毒核蛋白是感染期间表达最丰富的蛋白, 其带有多重功能, 包括在细胞核和细胞质间梭动以及壳体化病毒基因组用于 RNA 转录、复制和包装。NP 与各种各样的病毒和宿主的细胞大分子相互作用, 所述的细胞大分子包括它本身、RNA、病毒 RNA 依赖性 RNA 聚合酶以及病毒基质蛋白。NP 也与宿主多肽 (诸如肌动蛋白)、核输入和输出装置组分以及核 RNA 解旋酶相互作用。三个潜在的甲型流感病毒 NP 上的结合新的结合位点包括小槽、RNA 结合袋槽和尾部环形槽。

[0313] 不受任何特定的理论约束, 假设本文所述的化合物作用机制涉及结合病毒的核蛋白 (NP), 诸如流感病毒, 以干扰病毒在体内复制。

[0314] 在一实施方案中, 本文所述的抗病毒剂与甲型流感病毒体背面的小槽 (nucleozin 结合槽) 结合并涉及残基 280-311 (VYGSVASGYDFEREGYS LVGIDPFRLQNSQ) (SEQ ID NO:1)。

这些残基的二级结构包括三个短的螺旋 (280-287、291 ~ 294 和 301-309), 其通过螺旋间残基所形成的环相连接。

[0315] NP 抑制剂可位于体背面的小槽并通过氢键与残基 N309, 通过疏水作用与 Y289 相互作用, 其中化合物的苯环可与 Y289 的苯环平行, 而且这两个环间的距离为约 3.2-4.3 Å 之间。

[0316] 在一具体的实施方案中, NP 抑制剂结合在小槽内, 而且化合物与残基 S287 形成氢键。在一些实施方案中, 抗病毒剂可产生结合接触, 单独地或与以上所列举的接触组合。尤其是抗病毒剂可与残基 465-470 (序列: ELSDEK) (SEQ ID NO :2)、残基 22-26 (序列: ATEIR) (SEQ ID NO :3)、残基 A22-47L (序列: ATEIRASVGKMGIDGIGRFYIQMCTEL) (SEQ ID NO :4)、R55 或其组合接触。

[0317] 在另一实施方案中, NP 抑制剂与甲型流感病毒核蛋白的 RNA 结合槽结合。在这一实施方案中, NP 抑制剂位于 RNA 结合结构域内, 并与残基 Q364 和 V363 形成氢键, 从而阻止 RNA 进入富含精氨酸的凹槽, 所述结合结构域贯穿了核蛋白体和头之间的内部槽。Y148 被认为其功能是固定 RNA 的第一个碱基。

[0318] 在另一实施方案中, 示例性的 NP 抑制剂与流感病毒的尾部环形槽结合。在这一实施方案中, NP 抑制剂位于靠近残基 E339 的尾部环形槽结合域内, 并与残基 V186、R267 和 G268 形成氢键。在这一结合袋内的 NP 抑制剂破坏了来自于另一单体的 E339 和 R416 间所形成的盐桥。

[0319] B. 待被治疗的病症

[0320] 可利用本文所述的化合物或组合物预防或治疗由包膜和无包膜的病毒所引起的病毒感染, 包括感染动物、脊椎动物、哺乳动物和人类患者的那些病毒。所述的化合物适用于治疗感染脊椎动物, 尤其是人类的所 有病毒, 尤其是动物和人类病原的病毒。可治疗的病毒感染和由此产生的相关疾病包括但不限于 CMV、RSV、沙粒病毒和 HIV 感染, 以及肝炎、流感、肺炎、拉萨热和 AIDS 疾病。国际病毒分类委员会包含本领域中已知的病毒株的完整列表, 在此通过引用将其全部并入。

[0321] 在一些实施方案中, 待预防或治疗的疾病包括病毒感染。在优选的实施方案中, 所述的化合物和制剂被用于治疗或预防甲型流感病毒感染。可用本发明方法的制剂预防或治疗的甲型流感病毒包括 H1N1、H2N2、H3N2、H5N1、H7N7、H1N2、H9N2、H7N2、H7N3 和 H10N7。在优选的实施方案中, 本发明的制剂对由 H1N1 或 H3N2 所引起的甲型流感病毒株的治疗是有作用的。

[0322] C. 剂量

[0323] 抗病毒制剂阻止病毒生长和增殖所需的剂量取决于许多因素, 包括可能存在的病毒类型、制剂所被引入的环境以及设想制剂停留在给定区域内的时间。

[0324] 优选的化合物是被虚拟筛选所鉴定的那些化合物。示例性化合物属于通式 I-VI。病毒感染治疗的典型剂量为大约 0.1-250mg/kg/ 日, 优选 0.2-250mg/kg/ 日。

[0325] 化合物通过口服或胃肠外途径给予人类用于病毒感染的治疗而且可以以大约 0.1- 大约 500mg/kg 的剂量水平口服给药, 优选大约 0.5-250mg/kg/ 日, 每日给予一次或两次。

[0326] 基于被治疗患者的体重和状况以及如本领域中技术人员已知的所选择的特定给

药途径将产生剂量和制剂的差异。

实施例

[0327] 材料和方法

[0328] 病毒

[0329] 在 Madin-Darby 犬肾 (MDCK) 细胞中增殖 A\WSN\33 流感病毒。在感染的 MDCK 细胞培养中形成完全的细胞病变效应后,收获病毒颗粒并储存在 -70°C 冰箱里直到使用为止。甲型流感病毒株 A/越南/1194/04 生长于鸡胚中生长,收获的包含病毒的尿囊液等分储存于 -70°C 直到使用为止。

[0330] 空斑减少测定

[0331] 使用空斑减少测定确定化合物在 MDCK 细胞上抗流感病毒 AH1N1YWSNY33 的保护效应。

[0332] 在 24 孔组织培养板上一式三份地进行 PRA 测定。病毒添加前一天使用带有 10% 胎牛血清 (FBS) 的伊格尔氏最低必需培养基 (EMEM) 以 1×10^5 个细胞 / 孔接种 MDCK 细胞。16-24 小时后,将 100-200 个流感 A/WSN/33 病毒的空斑形成单位 (PFU) 添加到带有或不带有化合物的单层细胞。不同实验中化合物 1-10 每个的浓度都是不同的。吸引除去未结合的病毒颗粒前,在 37°C , 5% CO_2 下允许病毒感染细胞 1.5-2 小时。用 EMEM 洗涤单层细胞一次然后用含 1% 低熔点琼脂糖的包含 1% FBS 的 EMEM 和 $1 \mu\text{g/ml}$ TPCK 胰蛋白酶覆盖。当需要时化合物也存在于琼脂糖覆盖层中。

[0333] 在 37°C 、5% CO_2 下,平板孵育 72 小时。在感染后 72 小时,用 10% 甲醛固定细胞 3 小时并将平板浸在 1% 卫可 (Virkon) 消毒剂中 5 分钟。然后除去琼脂糖塞并用 0.7% 结晶紫将单层细胞染色。计数病毒感染所形成的空斑。对每个化合物浓度而言,确定相对于对照 (未添加化合物) 空斑抑制的百分比。对于每个化合物,绘制相对于抑制剂不存在时对照的空斑形成单位 (PFU) (PFU 减少%) 与测试化合物的浓度的函数的曲线图。通过绘制的图计算半数有效浓度 EC_{50} ,其代表减少 50% 的病毒 PFU 所需要的药物浓度。结果表示为化合物不存在时对照的百分比并显示于图中。显示带有标准差的平均值。

[0334] 细胞毒性测定

[0335] 通过 3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基四唑溴 (MTT, Sigma-Aldrich, USA) 测定测量化合物 1-10 的细胞毒性。通过在平底 96 孔微滴定平板上将 Vero 细胞或 MDCK 细胞以 20,000 个细胞 / 孔接种于总体积为 $100 \mu\text{l}$ 带有 10% 胎牛血清的 EMEM 进行该测定。孵育 24 小时后,用 PBS 洗涤细胞两次,然后在添加化合物前用新鲜的 EMEM 重新装满。添加化合物后,在 37°C 、5% CO_2 下再孵育细胞 24 小时。向每孔添加 MTT 达到 0.5mg/ml 的最终浓度。在 37°C 、5% CO_2 下再孵育平板 4 小时。孵育期最后,向每一孔添加含 10% 月桂烷硫酸酯的 0.01M 盐酸 (HCl) $100 \mu\text{l}$ 以使细胞溶解。孵育过夜后,640nm 作为参考波长,在 570nm 处读取平板。自 MTT 数据中估算半数中毒浓度 TC_{50} ,其代表减少 50% 的 MTT 读取所需要的化合物浓度。

[0336] 实施例 1. 化合物 1 (YD-04) 的合成

[0337] 根据方案 1 显示的合成方案合成化合物 1。化合物 2、3 和 4 合成的合成方案的变化实施例显示于方案 2 和 3 以解释在合成其他的化合物 1 的类似物中的轻微不同。

[0338] YD-041 合成

[0339] 逐滴添加含叔丁基二甲基氯硅烷 (6.8g, 45.0mmol) 的无水二氯甲烷 (50ml) 溶液至含对羟基苯甲醛 (3.7g, 30.0mmol) 和三乙胺 (6.3ml, 45.0mmol) 的无水二氯甲烷 (50ml) 溶液。室温下搅拌由此得到的混合物 2 小时然后添加水 (100ml)。分离有机层, 用二氯甲烷萃取水层。用水及饱和盐水洗涤合并的有机层并用硫酸镁干燥。过滤浓缩后, 通过柱层析法 (石油醚: 乙酸乙酯 = 9 : 1) 进一步纯化所获得的残余物, 从而产生黄色油状粗产物 YD-041 (7.29g)。

[0340] 化合物 YD-042 的合成

[0341] 室温下将 YD-041 (1.18g, 5mmol) 与盐酸羟胺 (1.15g, 16.5mmol) 溶解于无水乙醇 (10mL) 中, 然后逐滴添加嘧啶 (20mL) 并同时搅拌。室温下搅拌由此得到的混合物 30 分钟然后加热至回流 40 分钟。完成后就将反应混合物冷却至室温并添加 37% 盐酸溶液 (2mL) 和水 (7.5mL) 的混合物。将由此得到的混合物浓缩至剩余总体积的三分之一。二氯甲烷萃取后, 用饱和盐水洗涤有机层并用硫酸镁干燥。除去溶剂后, 通过柱层析法 (石油醚: 乙酸乙酯 = 11 : 1) 纯化剩下的残余物, 从而产生黄色油状 YD-042 (0.862g, 78%)。¹H NMR (400MHz, CDCl₃), δ 8.48 (br s, 1H, -OH), 8.10 (s, 1H, N = CH), 7.45 (d, J = 8.6Hz, 2H, Ar-H), 6.84 (d, J = 8.6Hz, 2H, Ar-H), 0.98 (s, 9H, -C(CH₃)₃), 0.21 (s, 6H, 2SiCH₃)。

[0342] 化合物 YD-043 的合成

[0343] 将 YD-042 (810mg, 3.2mmol) 溶解于无水二甲基甲酰胺 (4mL) 然后冷却至 0°C。逐份添加 N-氯代琥珀酰亚胺 (NCS, 452mg, 3.2mmol) 并搅拌。移除冷水浴并在室温下搅拌反应混合物 1 小时。完成后即添加数量为反应混合物体积 4 倍的水并用乙醚萃取由此得到的混合物。用水洗涤有机层 3 次并用硫酸镁干燥。过滤浓缩后获得黄色油状粗制 YD-043 (884mg, 96%)。

[0344] 化合物 YD-044 的合成

[0345] 0°C 下逐滴添加含粗制 YD-043 (884mg, 3.1mmol) 的乙腈 (8mL) 溶液至 YD-06 (737mg, 3.8mmol) 的乙腈 (40mL) 溶液。0°C 下搅拌由此得到的混合物 2 小时。完成后, 即添加冰水 (4mL) 并在减压下除去绝大多数的溶剂。添加水并用乙醚萃取由此得到的混合物。用水洗涤有机层 3 次, 饱和盐水洗涤 1 次并用硫酸镁干燥。过滤浓缩后, 减压下通过柱层析法 (石油醚: 乙酸乙酯 = 15 : 1) 纯化残余物, 从而产生黄色油状 YD-044 (627mg, 52%)。¹H NMR (400MHz, CDCl₃), δ 7.48 (d, J = 8.6Hz, 2H, Ar-H), 6.89 (d, J = 8.6Hz, 2H, Ar-H), 2.69 (s, 3H, -CH₃), 1.44 (s, 9H, O-C(CH₃)₃), 0.99 (s, 9H, Si-C(CH₃)₃), 0.21 (s, 6H, 2SiCH₃)。

[0346] 化合物 YD-045 的合成

[0347] 将 YD-044 (3.23g, 8.3mmol) 溶解于三氟乙酸 (10mL) 并在室温下搅拌由此得到的溶液 30 分钟。减压下除去三氟乙酸并将残余物溶解于乙醚中。添加石油醚以使产物结晶。过滤及真空干燥后, 获得白色片状结晶 YD-045 (1.327g, 48%), 熔点 146-148°C; ¹H NMR (400MHz, CDCl₃), δ 7.54 (d, J = 8.6Hz, 2H, Ar-H), 6.89 (d, J = 8.6Hz, 2H, Ar-H), 2.75 (s, 3H, -CH₃), 1.00 (s, 9H, Si-C(CH₃)₃), 0.23 (s, 6H, 2SiCH₃)。

[0348] 化合物 YD-046 的合成

[0349] 依次添加 N, N-二异丙基乙胺 (DIEA, 103mg, 0.80mmol)、YD-05 (128mg, 0.53mmol) 及 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基) 碳二亚胺 (EDCI, 406mg, 2.13mmol) 至含 YD-045 (177mg,

0.53mmol) 的无水二氯甲烷 (8mL) 的溶液。室温下搅拌由此得到的混合物 3 小时然后用二氯甲烷稀释。分离有机层,用 2M 氢氧化钠溶液、水、和饱和盐水洗涤,硫酸镁干燥、过滤及浓缩。通过柱层析法 (石油醚:乙酸乙酯=3:1) 进一步纯化由此得到的残余物,从而产生淡黄色针状晶体 YD-046 (141mg, 48%)。¹H NMR (400MHz, CD₃COCD₃), δ 8.19 (d, J = 2.7Hz, 1H, Ar-H), 8.12 (dd, J = 9, 2.7Hz, 1H, Ar-H), 7.61 (d, J = 8.7Hz, 2H, Ar-H), 7.19 (d, J = 9Hz, 1H, Ar-H), 7.02 (d, J = 8.7Hz, 2H, Ar-H), 3.91 (br s, 2H, CH₂), 3.44 (br s, 2H, CH₂), 3.27 (br s, 2H, CH₂), 2.86 (br s, 2H, CH₂), 2.50 (s, 3H, -CH₃), 0.97 (s, 9H, Si-C(CH₃)₃), 0.23 (s, 6H, 2SiCH₃)。

[0350] 化合物 1 (YD-04) 的合成

[0351] 将 YD-046 (67mg, 0.12mmol) 溶解于无水四氢呋喃 (4mL) 并添加四正丁基氟化铵 (TBAF, 63mg, 0.24mmol)。室温下搅拌由此得到的混合物 30 分钟。浓缩后,通过柱层析法 (石油醚:乙酸乙酯=1:1) 纯化残余物,从而产生亮黄色粉末 YD-04 (31mg, 58%)。235-240°C 分解。

[0352] ¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆), δ 9.96 (br s, 1H, -OH), 8.23 (d, J = 2.6Hz, 1H, 1'-H), 8.14 (dd, J = 9, 2.6Hz, 1H, 2'-H), 7.44 (d, J = 8.7Hz, 2H, 2-H, 3-H), 7.21 (d, J = 9Hz, 1H, 3'-H), 6.89 (d, J = 8.3Hz, 2H, 1-H, 4-H), 3.82 (br s, 2H, CH₂), 3.36 (br s, 2H, CH₂), 3.21 (br s, 2H, CH₂), 2.89 (br s, 2H, CH₂), 2.46 (s, 3H, -CH₃)。

[0353] ¹³C NMR (100MHz, DMSO-d₆) δ 168.3, 161.5, 159.3, 159.2, 154.0, 141.8, 128.7, 126.3, 125.9, 123.6, 120.6, 118.5, 115.8, 110.4, 50.1, 49.7, 46.2, 41.2, 11.3; LRMS (API-ES): 443 (M⁺+H)。

[0354] 实施例 2: 化合物 2 (YD-01) 的合成

[0355] 方案 2 中显示了化合物 2 (YD-01) 在结构上的合成。

[0356] 化合物 YD-011 的合成

[0357] 将苯甲醛 (10.60g, 0.10mol) 和盐酸羟胺 (22.94g, 0.33mol) 溶解于 90% 乙醇 (330mL)。通过添加氢氧化钠粉末将该溶液的 pH 调至 5。室温下搅拌由此得到的溶液 30 分钟并再加热至回流 30 分钟。将反应混合物冷却至室温,添加浓缩的盐酸 (40mL) 和水 (50mL) 的混合物,并将其浓缩至原体积的三分之一。用二氯甲烷萃取浓缩的混合物并用饱和盐水洗涤有机层,无水硫酸镁干燥,真空蒸发,产生黄色的粗制油。通过真空蒸馏 (40mmHg, 150-155°C) 纯化粗制油,从而产生淡黄色油状 YD-011 (9.87g, 82% 产率), 其一旦凝固就会形成灰白色晶体。顺式和反式的同分异构体都可被 TLC 检测到。

[0358] ¹H-NMR (400MHz, CDCl₃) δ 9.01 (br s, 1H, -OH), 8.17 (s, 1H, =CH), 7.59-7.56 (m, 2H, Ar-H), 7.40-7.35 (m, 3H, Ar-H)。

[0359] 化合物 YD-012 的合成

[0360] 0°C 下按份添加 N-氯琥珀酰亚胺 (NCS, 8.79g, 66mmol) 至含 YD-011 (2g, 16.53mmol) 的无水二氯甲烷溶液并搅拌。将混合物加热至室温并搅拌 2 小时。添加水 (50mL) 至反应混合物并分层。用二氯甲烷 (20mL*3) 萃取水层,用饱和盐水洗涤合并的有机层,无水硫酸镁干燥、过滤及真空浓缩。粗产物通过柱层析法,用梯度递减的石油醚 (100:150:1) 的乙酸乙酯洗脱,从而产生 YD-012 (1.02g, 40% 产率)。顺式和反式的同分异构体都可被 TLC 检测到。由于 YD-012 的不稳定性它被直接用于下一步骤而不进一步

纯化。

[0361] 化合物 YD-06 的合成

[0362] 逐滴添加含六甲基二硅钾 (1M, 28.64mL) 的四氢呋喃 (THF) 溶液至乙酰乙酸叔丁酯 (5.2mL) 的乙醚 (100mL) 溶液。通过添加正己烷浓缩及沉淀反应混合物。过滤沉淀物并干燥产生粗产物 YD-06。

[0363] 化合物 YD-013 的合成

[0364] 将粗制 YD-06 (1.0g, 5.1mmol) 溶解于乙腈 (50mL) 并将混合物冷却至 0°C。逐滴添加含化合物 YD-012 (0.65g, 4.2mmol) 的乙腈 (10mL) 溶液至 YD-06 溶液并搅拌。0°C 下搅拌反应混合物 2 小时并添加冰水 (4mL)。真空蒸发混合物。将残余物再溶解于水中并用二氯甲烷萃取。用饱和盐水洗涤有机层、无水硫酸钠干燥、过滤及真空浓缩以产生粗制的残余物, 其通过石油醚 (60-90°C) 作为洗脱液的柱层析法产生灰白色的固体 YD-013 (510mg, 47% 产率)。¹H-NMR (400MHz, CDCl₃) δ 7.59-7.56 (m, 2H, Ar-H), 7.47-7.40 (m, 3H, Ar-H), 2.71 (s, 3H, -CH₃), 1.41 (s, 9H, -C(CH₃)₃)。

[0365] 化合物 YD-014 的合成

[0366] 将化合物 YD-013 (186mg, 0.718mmol) 溶解于三氟乙酸 (5mL) 并在室温下搅拌溶液 4 小时。真空蒸发由此得到的溶液以除去三氟乙酸。添加二氯甲烷并将溶液再蒸馏两次。将残余物溶解于乙醚, 并通过添加石油醚进行再结晶。通过过滤及真空干燥分离白色晶体化合物 YD-014。浓缩母液, 通过柱层析法, 用含 1% 体积的冰醋酸的石油醚 - 乙酸乙酯 (3 : 1) 洗脱, 从而产生白色固体 YD-014。晶体化合物的结合重量为 115mg (79% 产率)。¹H-NMR (400MHz, CDCl₃) δ 7.65-7.62 (m, 2H, Ar-H), 7.51-7.42 (m, 3H, Ar-H), 2.77 (s, 3H, -CH₃)。

[0367] 化合物 YD-05 的合成

[0368] 逐滴添加含 3,4-二氯硝基苯 (1.64g, 8.6mmol) 的 N,N-二甲基甲酰胺 (15mL) 溶液至含哌嗪 (3.73g, 43.4mmol) 的 N,N-二甲基甲酰胺 (11mL) 溶液并在室温下搅拌。将由此得到的混合物加热至 100°C 并维持在此温度 5 小时。将反应混合物冷却至室温并真空浓缩以除去 N,N-二甲基甲酰胺。用二氯甲烷 (25mL) 稀释由此得到的残余物。用饱和的碳酸氢钠溶液洗涤有机层, 无水硫酸钠干燥, 过滤及浓缩。残余物在氯仿和甲醇 (3 : 1) 中再结晶, 产生黄色晶体化合物 YD-05 (1.77g, 85% 产率)。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 8.24 (d, J = 2.6Hz, 1H, Ar-H), 8.09 (dd, J = 9, 2.6Hz, 1H, Ar-H), 7.04 (d, J = 9Hz, 1H, Ar-H), 3.20-3.18 (m, 4H, 2CH₂), 3.08-3.06 (m, 4H, 2CH₂), 1.93 (br s, 1H, NH)。

[0369] 化合物 2 (YD-01) 的合成

[0370] 依次添加二异丙基乙胺 (DIEA, 305mg, 2.36mmol)、YD-05 (380mg, 1.58mmol) 和 1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺 (EDCI, 1.2g, 6.30mmol) 至含 YD-014 (320mg, 1.58mmol) 的无水二氯甲烷 (10mL) 溶液。室温下搅拌由此得到的混合物 2 小时。用二氯甲烷稀释反应混合物, 依次用氢氧化钠水溶液 (2M)、水和饱和盐水洗涤。有机层用无水硫酸钠干燥、过滤及浓缩。残余物通过柱层析法, 用石油醚的乙酸乙酯 (3 : 1) 洗脱, 从而产生淡黄色固体 YD-01 (290mg, 43% 产率)。

[0371] ¹H-NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ 8.23 (d, 1H, J = 2.6Hz, 1' -H), 8.15 (dd, 1H, J = 9, 2.6Hz, 2' -H), 7.63-7.60 (m, 2H, 1-H, 5-H), 7.55-7.52 (m, 3H, 2-H, 3-H, 4-H), 7.20 (d, 1H, J

= 9Hz, 3' -H), 3.81 (br s, 2H, CH₂), 3.39 (br s, 2H, CH₂), 3.20 (br s, 2H, CH₂), 2.85 (br s, 2H, CH₂), 2.50 (s, 3H, -CH₃);

[0372] ¹³C-NMR (100MHz, DMSO-d₆) δ 168.8, 161.2, 159.6, 153.9, 141.9, 130.2, 129.1, 127.9, 127.3, 126.3, 125.9, 123.7, 120.6, 110.7, 50.1, 49.7, 46.3, 41.3, 11.4; LRMS (API-ES): 427 (M⁺H)。

[0373] 实施例 3. 化合物 3 (YD-07) 的合成

[0374] 方案 3 中显示了化合物 3 (YD-07) 在结构上的合成。

[0375] 化合物 YD-031 的合成

[0376] 室温下将对硝基苯甲醛 (4.53g, 0.03mol) 和盐酸羟胺 (6.87g, 0.099 mol) 溶解于 90% 乙醇 (100ml)。通过添加氢氧化钠粉末将反应混合物的 pH 调至 5, 室温下搅拌由此得到的溶液 30 分钟, 然后加热至回流 4 小时。完成后, 就将反应混合物冷却至室温并在减压下除去乙醇。添加水并用二氯甲烷萃取由此得到的混合物。用饱和盐水洗涤合并的有机层并用硫酸镁干燥。除去溶剂后, 获得光谱纯的黄色非晶体粉末 YD-031。熔点 127-129°C; ¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 8.26 (d, J = 8.8Hz, 2H, Ar-H), 8.21 (s, 1H, N = CH), 7.98 (s, 1H, -OH), 7.75 (d, J = 8.8Hz, 2H, Ar-H)。

[0377] 化合物 YD-032 的合成

[0378] 将 YD-031 (887mg, 5.3mmol) 溶解于无水二甲基甲酰胺 (4.6mL) 并将溶液冷却至 0°C。逐份添加 N-氯琥珀酰亚胺 (800mg, 6.0mmol) 并搅拌。移除冷水浴并在室温下搅拌由此得到的混合物 4 小时。完成后, 即添加冰水 (20mL) 并用乙醚萃取由此得到的混合物。用水洗涤有机层 3 次, 用饱和盐水洗涤 1 次, 用硫酸镁干燥。过滤后除去溶剂从而产生白色固体 YD-032 (1.064g, 100%)。 ¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 8.37 (s, 1H, -OH), 8.27 (d, J = 8.8Hz, 2H, Ar-H), 8.04 (d, J = 8.8Hz, 2H, Ar-H)。

[0379] 化合物 YD-033 的合成

[0380] 0°C 下添加含粗制 YD-032 (1g, 5.0mmol) 的乙腈 (25ml) 溶液至含粗制 YD-06 (1.213g, 6.2mmol) 的乙腈 (60ml) 溶液并同时搅拌。0°C 下搅拌由此得到的溶液 2 小时。完成后, 即添加冰水 (4ml) 并在减压下除去绝大多数的溶剂。用水稀释剩余的液体并用二氯甲烷萃取。用饱和盐水洗涤有机层并用硫酸镁干燥。过滤和除去溶剂后, 通过柱层析法 (石油醚: 乙酸乙酯 = 10 : 1) 纯化残余物, 从而产生淡黄色立方晶体 YD-033 (1.239g, 78%)。熔点 86-87°C; ¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 8.31 (d, J = 8.8Hz, 2H, Ar-H), 7.81 (d, J = 8.8Hz, 2H, Ar-H), 2.75 (s, 3H, -CH₃), 1.46 (s, 9H, O-C(CH₃)₃)。

[0381] 化合物 YD-034 的合成

[0382] 将 YD-033 (100mg, 0.33mmol) 和氯化亚锡二水合物 (371mg, 1.64mmol) 溶解于无水乙醇 (7mL) 并将由此得到的溶液加热至回流 1.5 小时。将反应混合物冷却至室温并添加适量的冰水。通过添加 20% 无水碳酸钠溶液将由此得到的混合物的 pH 调至 8。用乙酸乙酯萃取后, 用盐水洗涤有机层并用硫酸钠干燥。过滤浓缩后使用硅胶柱 (石油醚: 乙酸乙酯 = 5 : 1) 将所获得的残余物纯化, 从而产生白色针状晶体 YD-034 (72mg, 80%)。 ¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 7.42 (d, J = 8.6Hz, 2H, Ar-H), 6.69 (d, J = 8.6Hz, 2H, Ar-H), 3.78 (br s, 2H, NH₂), 2.66 (s, 3H, -CH₃), 1.47 (s, 9H, O-C(CH₃)₃)。

[0383] 化合物 YD-038 的合成

[0384] 将 YD-034(1.0g, 3.65mmol) 溶解于三氟乙酸 (5mL) 并在室温下搅拌 1 小时。减压下除去三氟乙酸并将残余物与二氯甲烷共沸两次, 从而产生粗制的白色固体 YD-038(810mg)。

[0385] 化合物 3(YD-03) 的合成

[0386] 依次添加 N, N-二异丙基乙胺 (DIEA, 138mg, 1.08mmol)、YD-05(207mg, 0.86mmol) 和 EDCI(550mg, 2.88mmol) 至含粗制 YD-038(157mg, 0.72mmol) 的无水二氯甲烷 (8mL) 溶液。在室温下将由此得到的混合物搅拌 4 小时然后用二氯甲烷稀释。用 2M 氢氧化钠溶液、水和饱和盐水洗涤该混合物。有机层用硫酸钠干燥、过滤及浓缩。通过柱层析法 (石油醚: 乙酸乙酯 = 2 : 1) 纯化所获得的残余物, 从而产生亮黄色粉末 YD-03(173mg, 49%)。

[0387] ^1H NMR(400MHz, DMSO-d₆), δ 8.24(d, J = 2.7Hz, 1H, 1'-H), 8.15(dd, J = 9, 2.7Hz, 1H, 2'-H), 7.28(d, J = 8.6Hz, 2H, 2-H, 3-H), 7.19(d, J = 9Hz, 1H, 3'-H), 6.63(d, J = 8.6Hz, 2H, 1-H, 4-H), 5.60(br s, 2H, NH₂), 3.81(br s, 2H, CH₂), 3.34(br s, 2H, CH₂), 3.20(br s, 2H, CH₂), 2.86(br s, 2H, CH₂), 2.42(s, 3H, -CH₃);

[0388] ^{13}C NMR(100MHz, DMSO-d₆), δ 167.9, 161.8, 159.5, 154.0, 150.7, 141.9, 128.2, 126.4, 125.9, 123.7, 120.6, 114.5, 113.7, 110.2, 50.0, 49.8, 46.3, 41.2, 11.4; LRMS(API-ES): 442(M⁺⁺H)。

[0389] 实施例 4. 化合物 4(YD-07) 的合成

[0390] 将化合物 YD-03(50mg, 0.1134mmol) 溶解于 6M 硫酸 (1ml) 并将由此得到的溶液冷却至 0°C。逐滴添加亚硝酸钠 (7.2mg, 0.136mmol) 的水溶液 (0.5mL) 并同时搅拌。将由此得到的混合物再搅拌 30 分钟同时维持温度在 5°C 以下。添加叠氮化钠 (125mg, 1.923mmol) 的水溶液 (1mL) 并将温度升高至室温。在用水稀释前将混合物再搅拌 2 小时。乙酸乙酯萃取后, 用饱和盐水洗涤合并的有机层并用硫酸镁干燥。浓缩后, 通过柱层析法 (石油醚: 乙酸乙酯 = 4:1) 纯化所获得的残余物, 从而产生亮黄色粉末 YD-07(38mg, 72%)。 ^1H NMR(400 MHz, DMSO-d₆), δ 8.24(d, J=2.7Hz, 1H, 1'-H), 8.16(dd, J=9, 2.7Hz, 1H, 2'-H), 7.66(d, J=8.6Hz, 2H, 2-H, 3-H), 7.28(d, J=8.6Hz, 2H, 1-H, 4-H), 7.24(d, J=9Hz, 1H, 3'-H), 3.83(brs, 2H, CH₂), 3.44(brs, 2H, CH₂), 3.24(brs, 2H, CH₂), 2.95(brs, 2H, CH₂), 2.49(s, 3H, -CH₃);

[0391] ^{13}C NMR(100MHz, DMSO-d₆) δ 168.7, 161.1, 158.9, 154.0, 141.8, 141.4, 128.9, 126.3, 125.9, 124.5, 123.7, 120.7, 119.9, 110.5, 50.3, 49.7, 46.3, 41.3, 11.4; LRMS(API-ES): 468(M⁺⁺H)。

[0392] 实施例 5. 化合物 5-10 的合成

[0393] 根据方案 2 制备化合物 5, 但是用邻氯苯甲醛代替苯甲醛作为起始。

[0394] 根据用于化合物 5 的方案 2 制备化合物 6, 但是使用制备自 2-甲基哌嗪的 YD-05 的 2-甲基衍生物代替哌嗪。

[0395] 根据用于使用方案 2 的化合物 6 的方案 2 制备化合物 7, 但是用苯甲醛代替邻氯苯甲醛作为起始

[0396] 根据用于化合物 2 的方案 2 制备化合物 8, 但是使用 4-硝基氯苯代替 3,4-二氯硝基苯。

[0397] 根据用于化合物 2 的方案 2 制备化合物 9, 但是使用 2,6-二氯苯甲醛代替苯甲醛作为起始物质。

[0398] 根据用于化合物 8 的方案 2 制备化合物 10,但是使用 2,3-二氯硝基苯代替 3,4-二氯硝基苯作为起始物质。

[0399] 实施例 6. 化合物 1-10 的抗病毒活性

[0400] 为量化测量化合物 1-10 所给予的保护作用,进行空斑减少测定。这些化合物抑制 MDCK 细胞中流感病毒 A病毒空斑的形成,对于化合物 1-10, EC_{50} 分别为 0.05、0.06、0.56、0.25、0.04、0.21、0.8、5.1、12 和 25 μM (见图 1b、2b、3b、4b、5b、6b、7b、8b、9b 和 10b)。

[0401] 测定化合物 1-10 对 MDCK 和 Vero 细胞的细胞毒性。测试的化合物浓度范围为 0-250 μM ,且结果显示于表 1 中。所述的结果表明化合物 1-10 在 MDCK 和 Vero 细胞中的 TC_{50} 都在 250 μM 以上。对于化合物 1-10,由 MDCK 细胞中 TC_{50}/EC_{50} 的比率所定义的选择性指数 (SI) 显示于表 1 中。结果表明这一酰胺类家族通常对于哺乳动物细胞是无毒的。

[0402] 表 1. 化合物 1-10 的抗病毒活性

[0403]

化合物	PRA的 EC_{50} (μM)	MDCK细胞 中的 TC_{50} (μM)	Vero 细胞 中的 TC_{50} (μM)	选择性指 数(SI)
1	0.05	>250	>250	>5000
2	0.06	>250	>250	>4167
3	0.056	>250	>250	>4464
4	0.25	>250	>250	>1000
5	0.04	>250	>250	>6250
6	0.21	>250	>250	>1190
7	0.8	>250	>250	>313
8	5.1	>250	>250	>49
9	12	>250	>250	>21
10	25	>250	>250	>10

[0404] 除非另有定义,本文所使用的所有技术和科学术语都具有属于所公开发明领域的技术人员通常理解的含义。本文所引用的出版物及它们所被引用的材料根据参考特异地合并。

[0405] 本领域技术人员应当理解或能够确定本文所述的仅仅使用了常规实验,许多相当于本发明的具体实施方案。意欲在以下的权利要求中包含此类等同物。

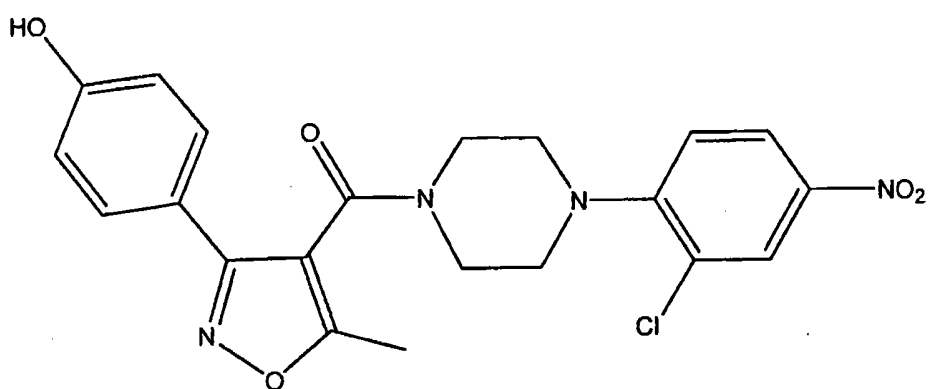


图 1a

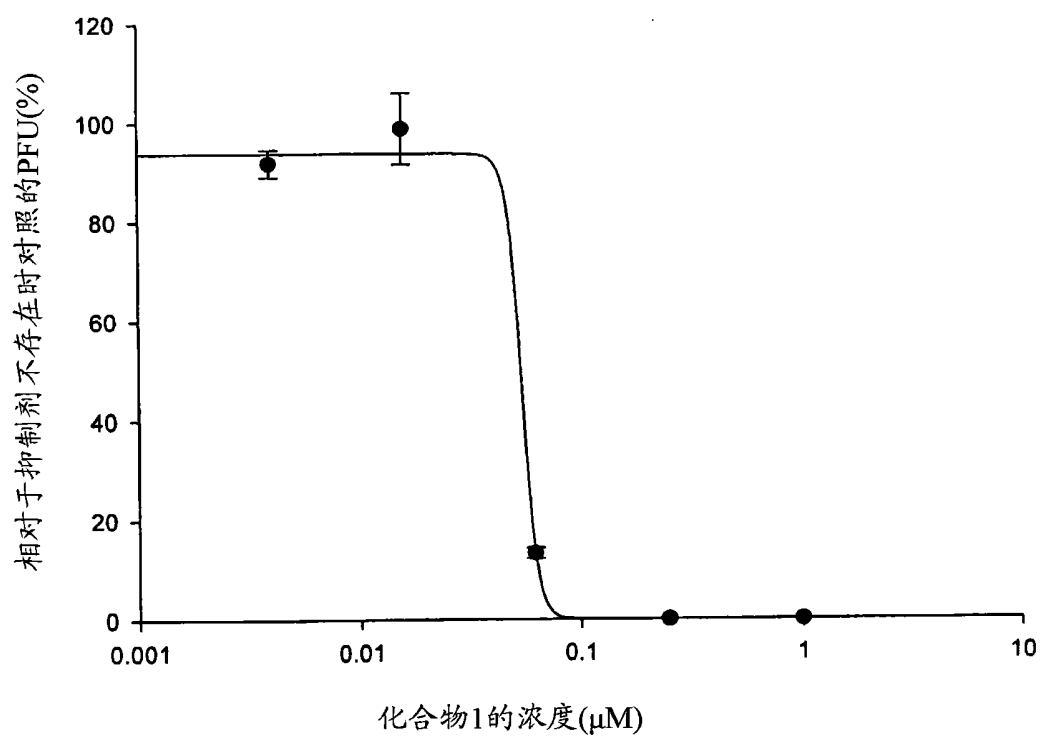


图 1b

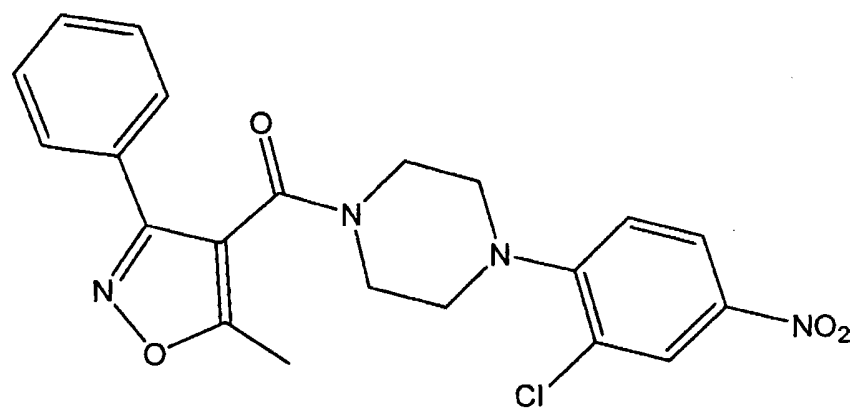


图 2a

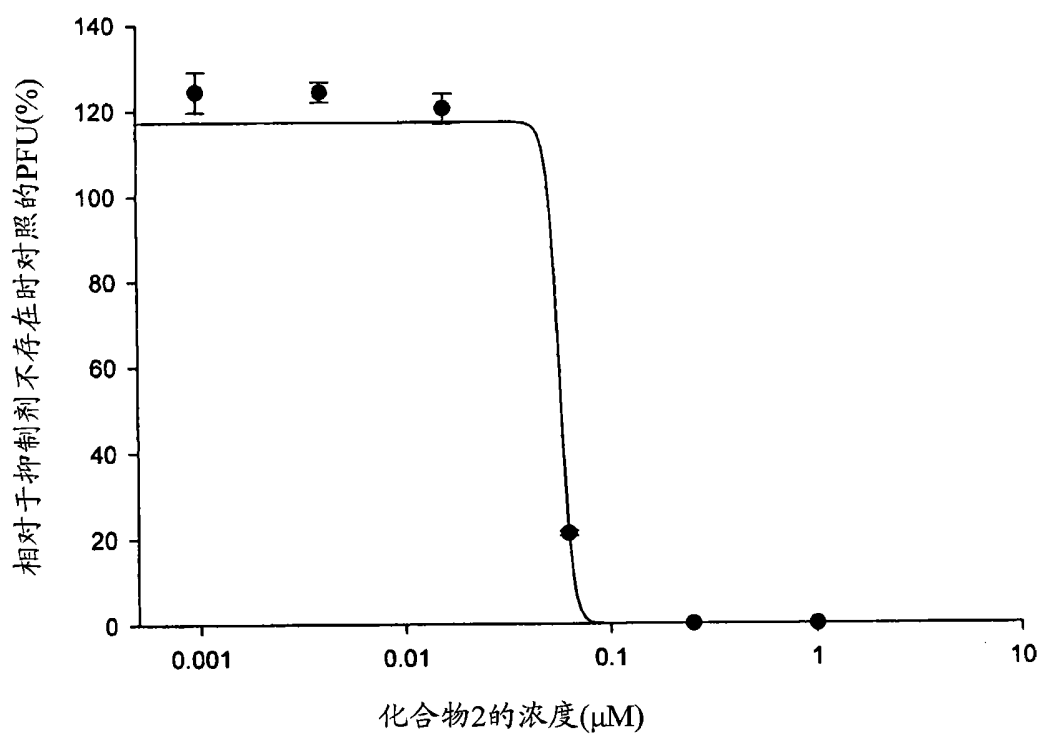


图 2b

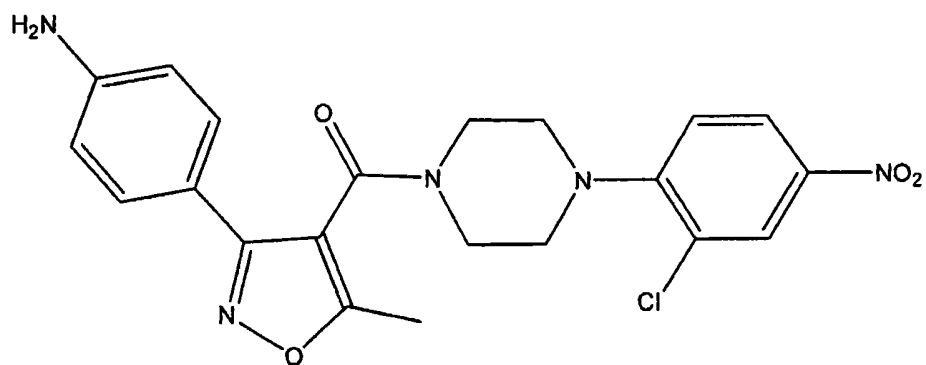


图 3a

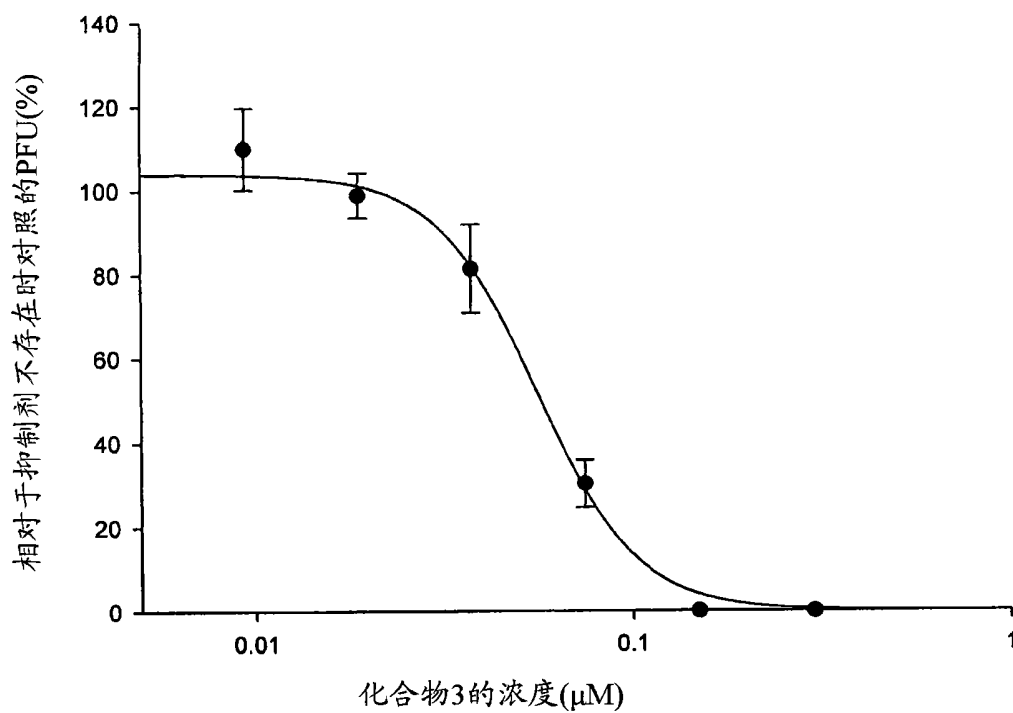


图 3b

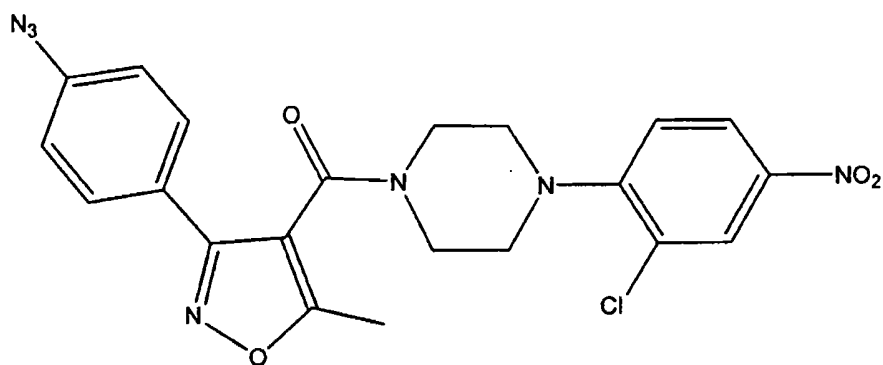


图 4a

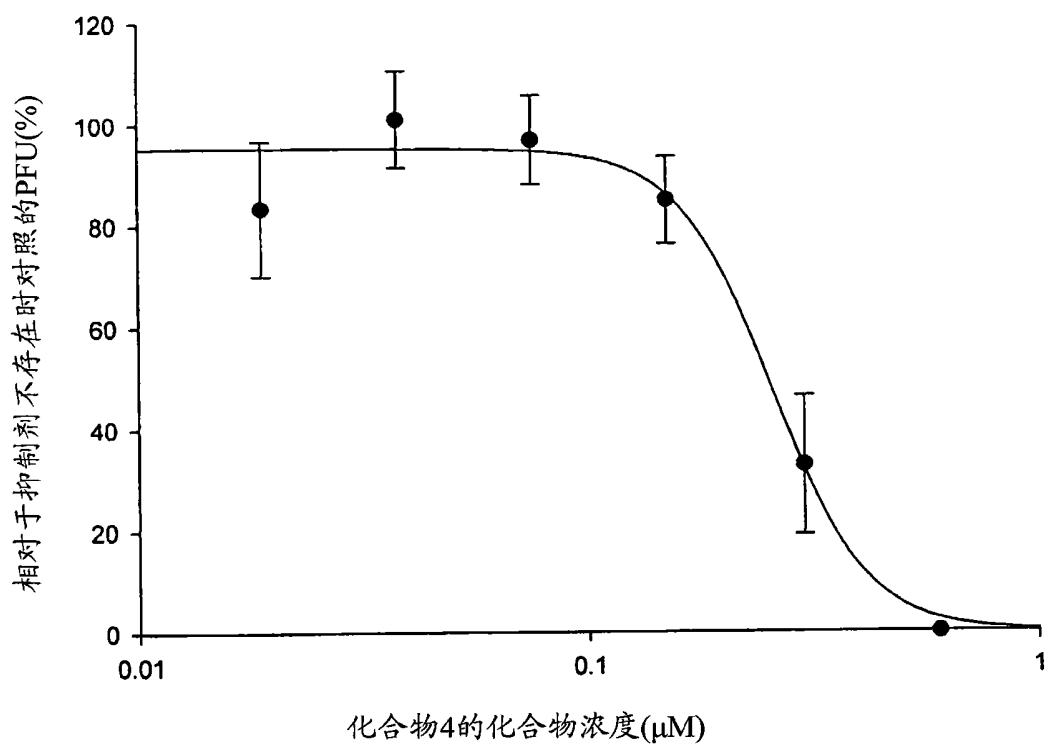


图 4b

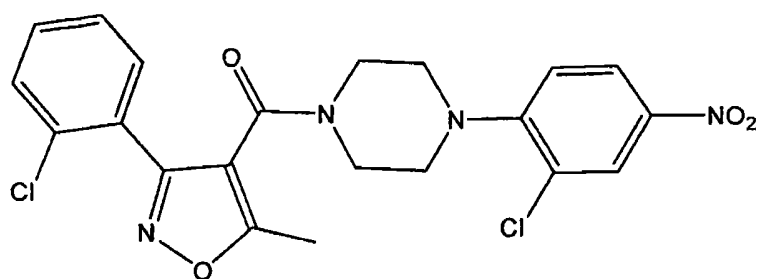


图 5a

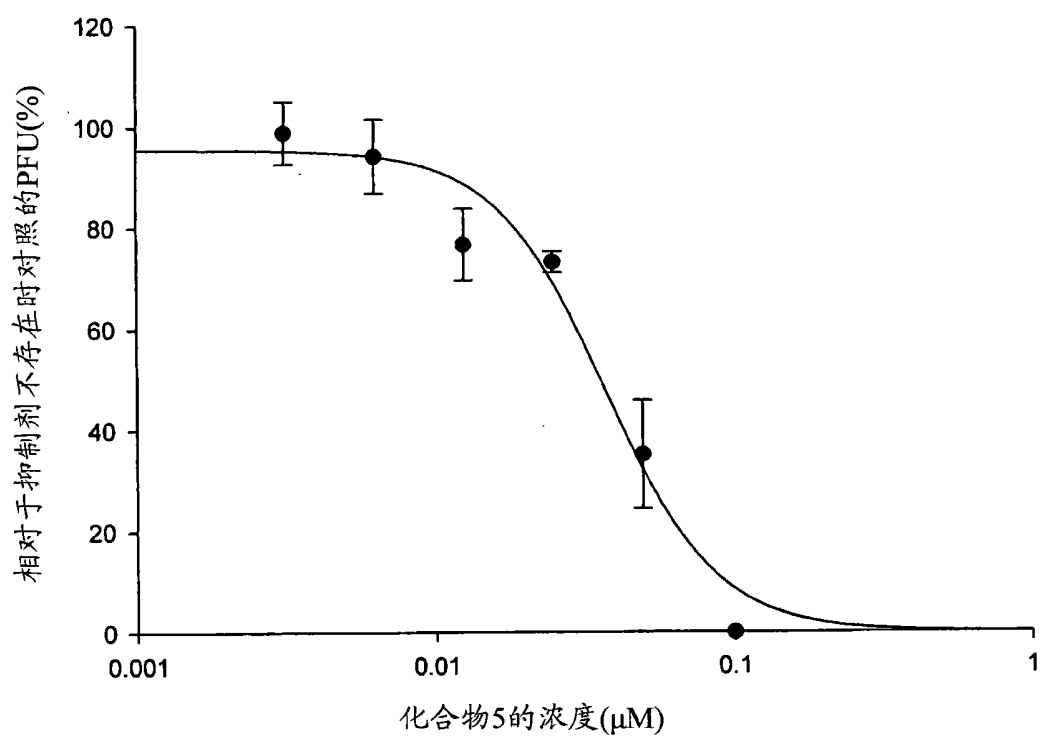


图 5b

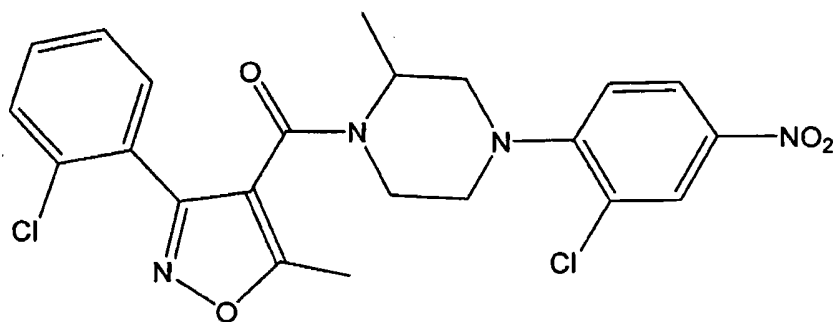


图 6a

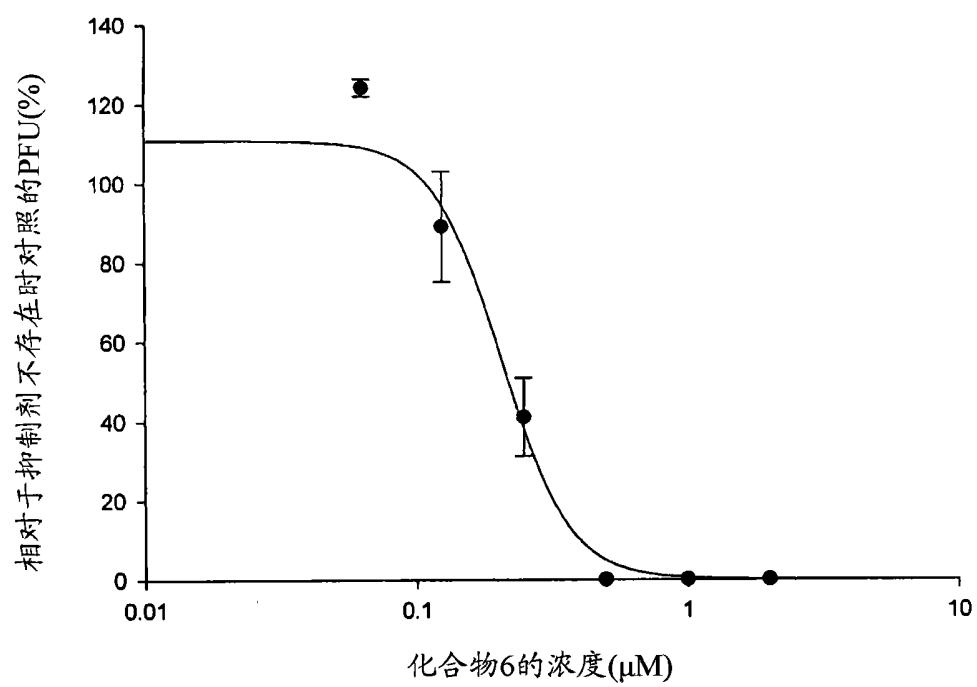


图 6b

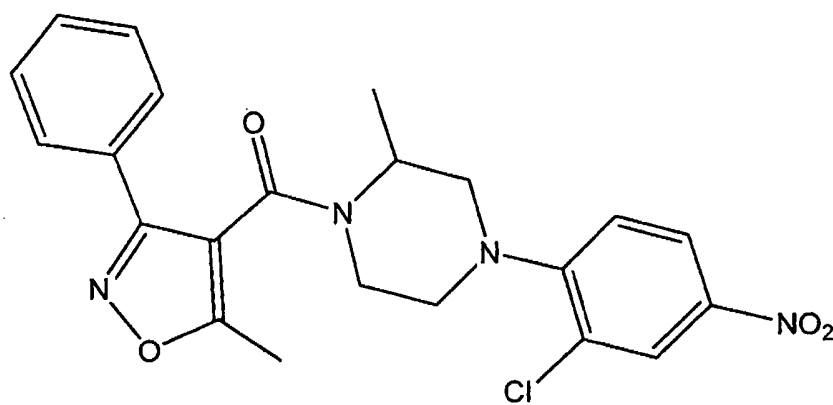


图 7a

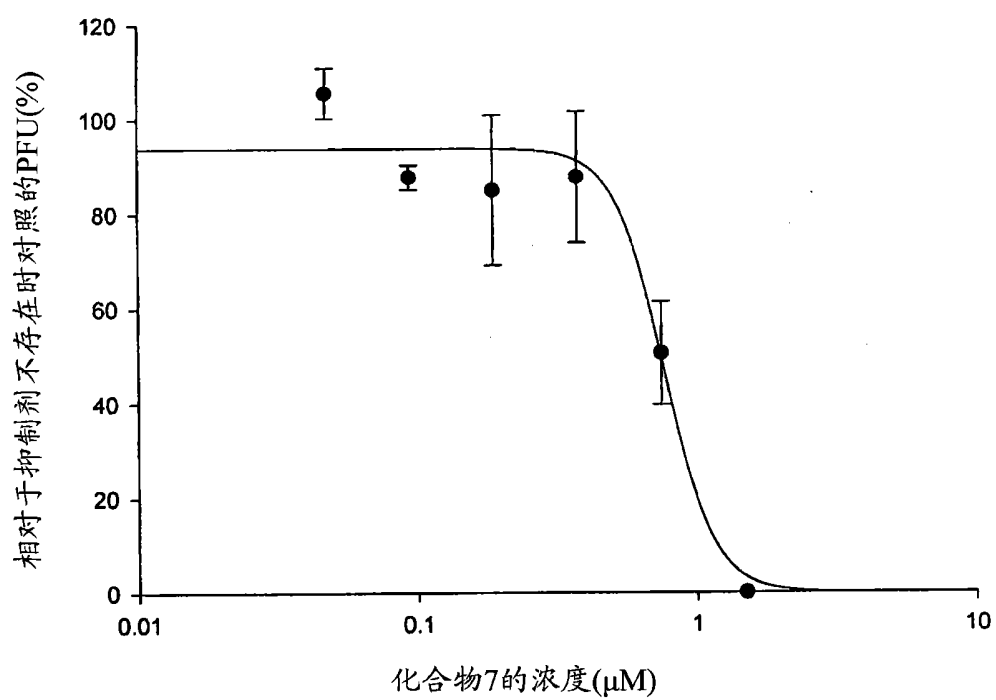


图 7b

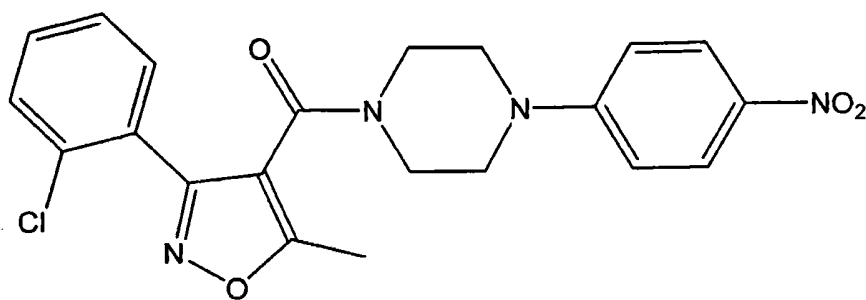


图 8a

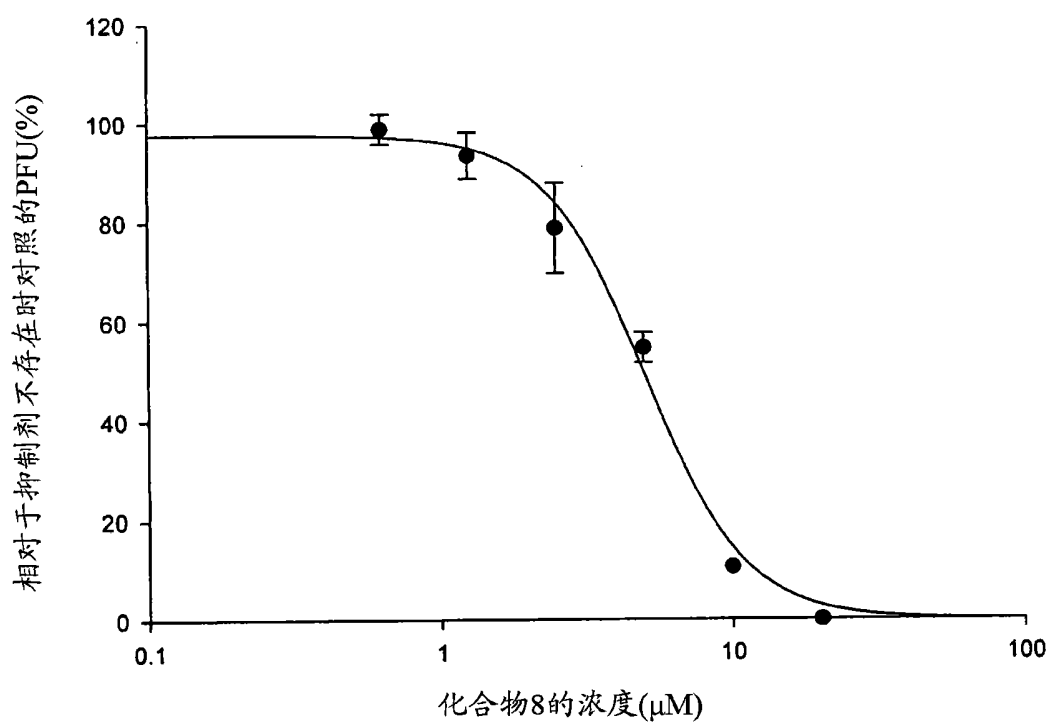


图 8b

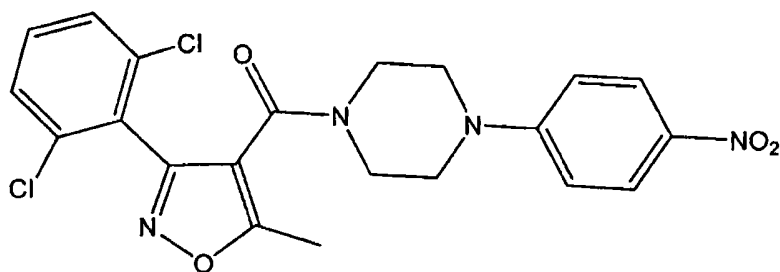


图 9a

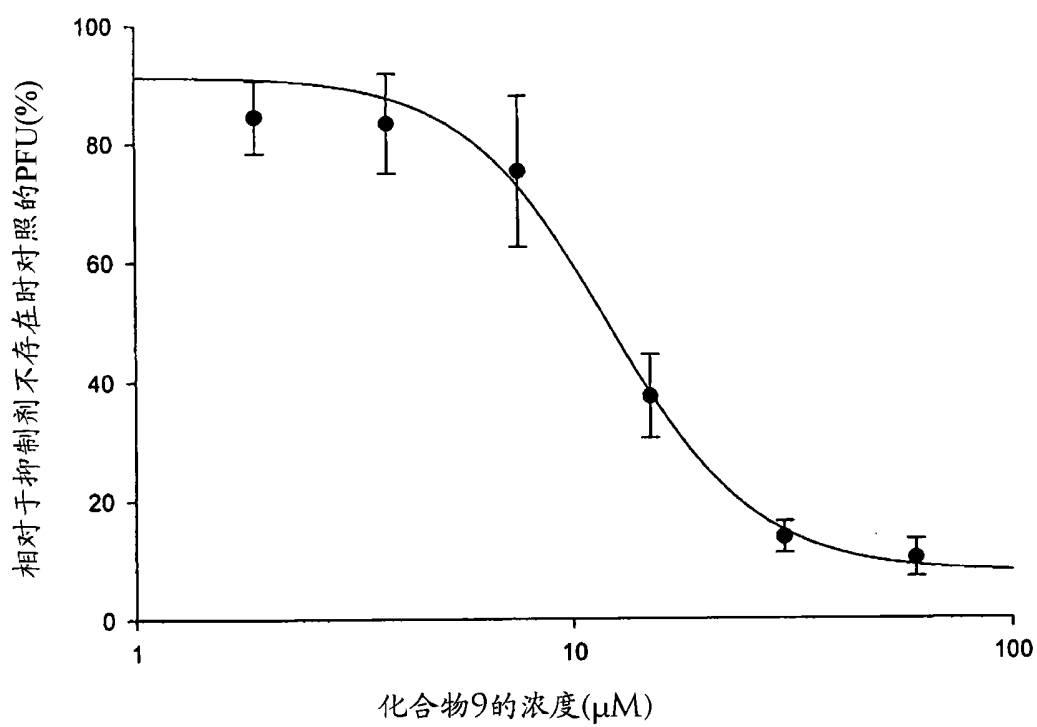


图 9b

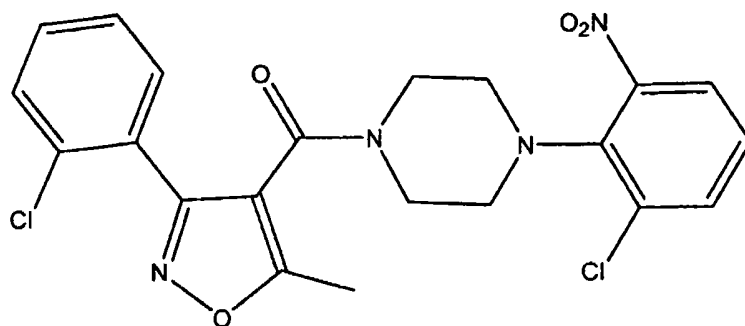


图 10a

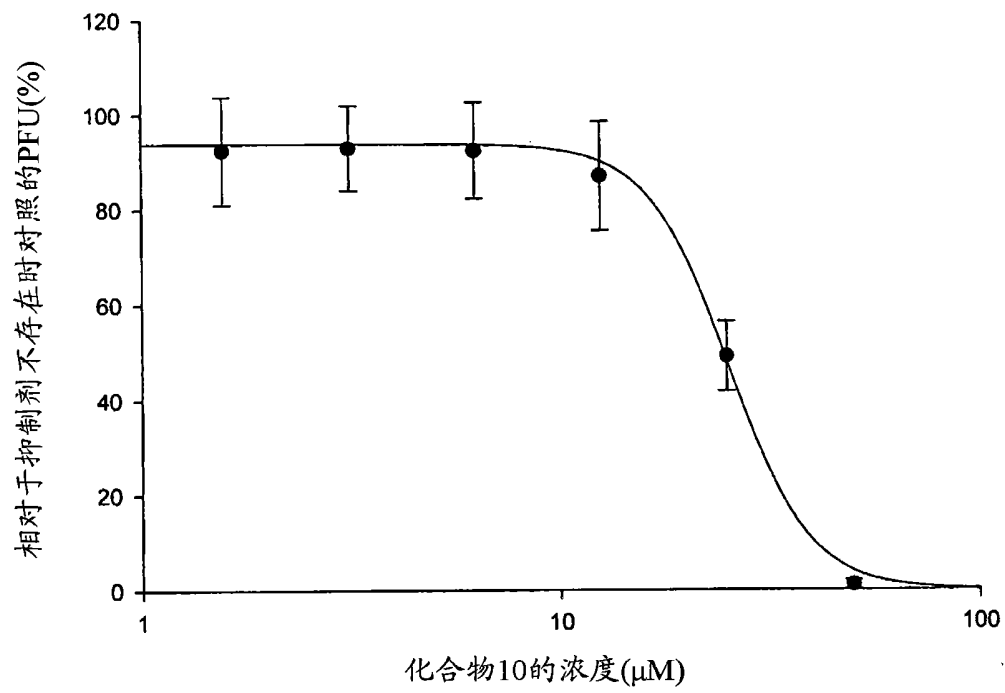


图 10b