



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本 (11)證書號數：TW I543973 B

(45)公告日：中華民國 105 (2016) 年 08 月 01 日

(21)申請案號：103106847

(22)申請日：中華民國 103 (2014) 年 02 月 27 日

(51)Int. Cl. : C07D277/82 (2006.01)

A61K31/428 (2006.01)

A61P31/14 (2006.01)

(71)申請人：高雄醫學大學(中華民國) KAOHSIUNG MEDICAL UNIVERSITY (TW)

高雄市三民區十全一路 100 號

(72)發明人：楊世群(TW)；彭皇凱(TW)；李景欽(TW)；林盈廷(TW)；陳威均(TW)；曾誠齊(TW)

(74)代理人：高玉駿；楊祺雄

(56)參考文獻：

Antiviral Research 96 (2012) 245-255

審查人員：傅玉妃

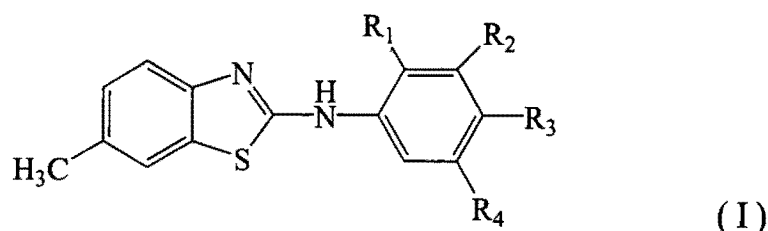
申請專利範圍項數：9 項 圖式數：3 共 74 頁

(54)名稱

2-苯胺基-6-甲基苯并噻唑衍生物及其製備方法與用途

(57)摘要

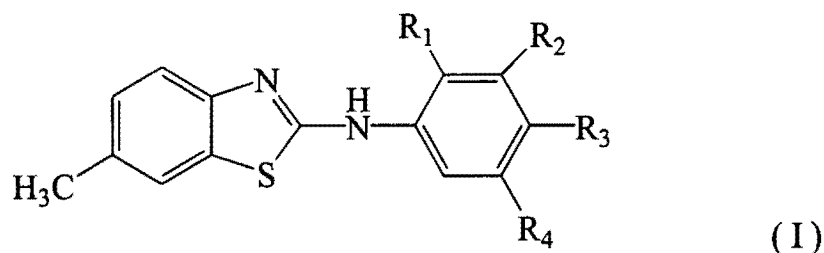
本發明揭示具有下列化學式(I)之新穎的 2-苯胺基-6-甲基苯并噻唑衍生物(2-anilino-6-methylbenzothiazole derivatives)：



或者它的一藥學上可接受的鹽類，其中各個取代基的定義是如說明書與申請專利範圍中所界定者。

本發明亦揭示此等衍生物的製備方法，以及它們在製備供用於治療 C 型肝炎的醫藥品上的用途。

特徵化學式：



公告本

發明摘要

※ 申請案號：103106847

C07D277/82 (2006.01)

A61K31/428 (2006.01)

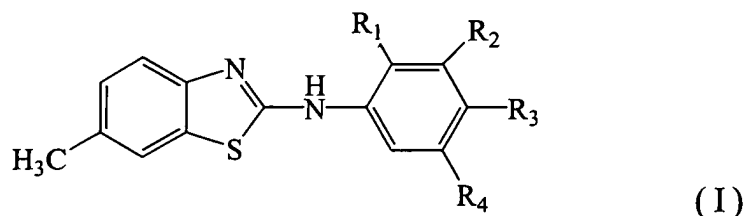
※ 申請日：103. 2. 27

※IPC 分類：A61P31/14 (2006.01)

【發明名稱】 2-苯胺基-6-甲基苯并噻唑衍生物及其製備方法
與用途

【中文】

本發明揭示具有下列化學式(I)之新穎的 2-苯胺基-6-甲基苯并噻唑衍生物 (2-anilino-6-methylbenzothiazole derivatives)：



或者它的一藥學上可接受的鹽類，其中各個取代基的定義是如說明書與申請專利範圍中所界定者。

本發明亦揭示此等衍生物的製備方法，以及它們在製備供用於治療 C 型肝炎的醫藥品上的用途。

【英文】

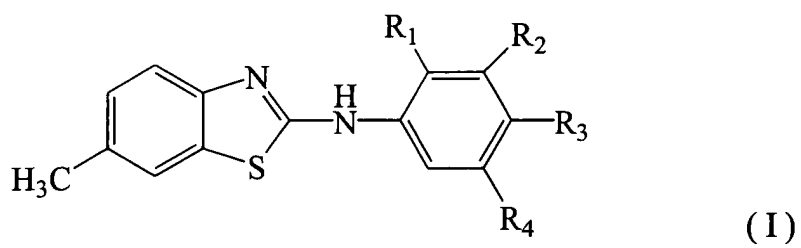
【代表圖】

【本案指定代表圖】：圖（ 3 ）。

【本代表圖之符號簡單說明】：

(無)

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：



發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】 2-苯胺基-6-甲基苯并噻唑衍生物及其製備方法與用途

【技術領域】

【0001】 本發明是有關於新穎的 2-苯胺基-6-甲基苯并噻唑衍生物 (2-anilino-6-methylbenzothiazole derivatives)，它們已被證實具有一有效的抗-C 型肝炎病毒活性 (anti-hepatitis C virus activity)。本發明亦有關於製備此等衍生物的方法，以及它們在製備供用於治療 C 型肝炎之醫藥品上的用途。

【先前技術】

【0002】 C 型肝炎 (hepatitis C) 是一種由 C 型肝炎病毒 (hepatitis C virus, HCV) 感染所造成的傳染性疾病 (infectious disease)，它的傳染途徑主要是血液感染。根據世界衛生組織 (World Health Organization, WHO) 的統計，全球約有 3 億人受到 HCV 的感染，而在這些受到 HCV 感染的患者當中，大約有 80% 的患者會轉變成慢性肝炎 (chronic hepatitis)，進而導致肝硬化 (liver cirrhosis) 以及肝癌 (liver cancer)。因此，C 型肝炎已成為一種全球性的健康問題。

【0003】 HCV 是一種屬於黃病毒科 (*Flaviviridae*) 肝病毒屬 (*Hepacivirus*) 的正向單股 RNA 病毒 (positive sense single-stranded RNA virus)，它的基因體 (genome) 編碼一多

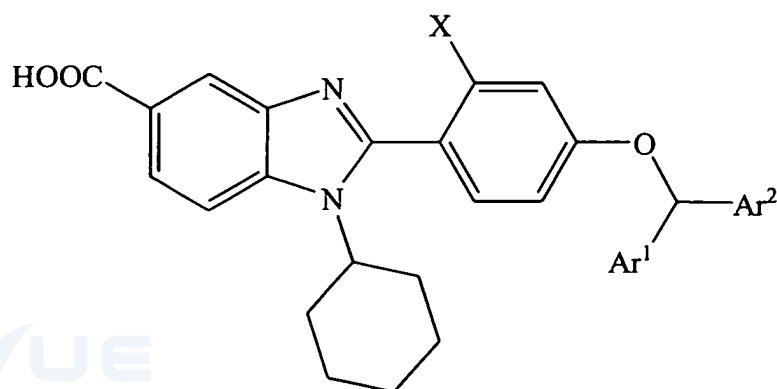
蛋白 (polyprotein)，該多蛋白可被宿主以及病毒蛋白酶 (virus protease) 進行後轉譯加工而形成多個成熟的蛋白質，其中包括：結構蛋白質 (structural proteins)[亦即核心蛋白質 (core protein)、E1、E2 以及 p7] 以及非結構蛋白質 (nonstructural proteins)(亦即 NS2、NS3、NS4A、NS4B、NS5A 以及 NS5B)。

【0004】 NS5B 是一種分子量大約為 65 kDa 的 RNA-依賴型 RNA 聚合酶 (RNA-dependent RNA polymerase, RdRp)，它的主要作用方式為藉由使用病毒的正 RNA 股 (viral positive RNA strand) 作為模版 (template) 來複製 HCV 的病毒 RNA (viral RNA)。有研究指出，NS5B 會與其他非結構蛋白質 (例如，NS3、NS4A、NS4B 以及 NS5A) 以及宿主因子 (host factors) 形成一複製酶複合物 (replicase complex)，而該複製酶複合物會在病毒 RNA 複製的過程中催化 RNA 的合成 (Vicky C. H. Lai *et al.* (2003), *Journal of Virology*, 77:2295-2300)。因此，對於治療 C 型肝炎的藥物設計而言，藉由抑制 RNA-依賴型 RNA 聚合酶 NS5B 的活性或表現來阻斷 HCV 的 RNA 複製是一重要的研發方向。

【0005】 目前用於治療 C 型肝炎的照護標準 (standard of care) 是聚乙二醇化的干擾素- α (pegylated interferon- α) 以及利巴韋林 (ribavirin) 的共-投藥 (co-administration)。此外，近年來已有研究致力於開發標靶 HCV 的非結構蛋白質 (例如 NS3、NS4A、NS5A 以及 NS5B) 之直接-作用的抗病毒劑 (direct-acting antivirals, DAAs)。常見的 DAAs 包括：特

拉匹韋 (telaprevir)(它標靶 NS3 以及 NS4A)、BMS-790052 (它標靶 NS5A)以及 PSI-7977 (它標靶 RNA-依賴型 RNA 聚合酶 NS5B)(Chatel-Chaix L. *et al.* (2012), *Curr. Opin. Virol.*, 2:588-598)。然而，聚乙二醇化的干擾素- α 以及利巴韋林的共-投藥不具有 HCV-專一性(HCV-specificity)並且會產生副作用[諸如溶血性貧血(hemolytic anemia)以及抑鬱(depression)]，而大多數的 DAAs 對於 C 型肝炎的治癒率(cure rate)亦相當有限。因此，本領域的相關研究人員仍致力於開發可以有效地治療 C 型肝炎並且不會產生非所欲的副作用的藥物。

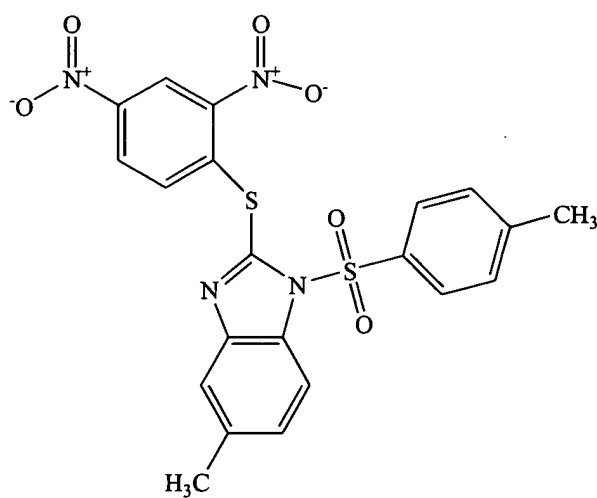
【0006】已有多種苯并咪唑(benzimidazole)以及苯胺基喹啉(anilinoquinoline)類化合物被合成出來並且被證實具有抑制 RNA-依賴型 RNA 聚合酶 NS5B 的效用。例如，在 Ishida T. *et al.* (2006), *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 16:1859-1863 中，Ishida T.等人揭示一種具有下列化學式(I)的 2-[(4-二芳基甲氧基)苯]-苯并咪唑 {2-[(4-diarylmethoxy)phenyl]-benzimidazoles}(亦即化合物 33 以及 34，其中化合物 33 的 X 是 H，而化合物 34 的 X 是 F)。



(I)

經由實驗結果發現，化合物 **33** 以及 **34** 對於 RNA-依賴型 RNA 聚合酶 NS5B 的 IC_{50} 最低可達 $0.096 \pm 0.04 \mu M$ ，因而被證實對於 RNA-依賴型 RNA 聚合酶 NS5B 具有抑制活性 (inhibitory activity)。

【0007】 在 Lee J.C. *et al.* (2010), *Analytical Biochemistry*, 403:52-62 中，Lee J.C.等人藉由結合結構-基礎的虛擬篩選 (structure-based virtual screening) 與細胞-基礎的分析系統 (cell-based assay system) 而篩選出一種具有下列化學式 (II) 的 2-(2,4-二硝基苯硫)-5-甲基-1-甲苯磺醯基-1*H*-苯并[d]咪唑 {2-(2,4-dinitrophenylthio)-5-methyl-1-tosyl-1*H*-benzo[d]imidazole} (亦即 MSC015)。

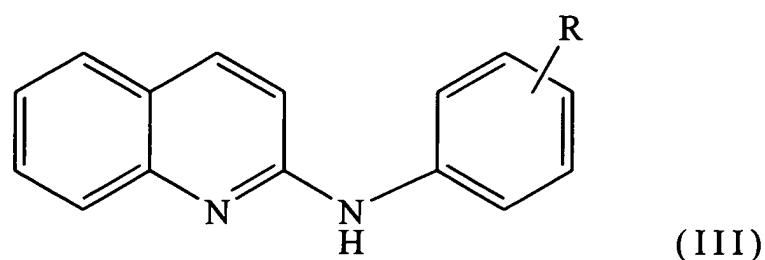


(II)

而 MSC015 經由實驗證實能夠有效地抑制 RNA-依賴型 RNA 聚合酶 NS5B 的酵素活性與表現 (包括 mRNA 以及蛋白質表現)，因此，MSC015 被認為是一種 HCV RdRp 抑制劑。

【0008】 在一先前的研究中，申請人合成出一系列具有下列化學式 (III) 之苯胺基喹啉衍生物 (anilinoquinoline

derivatives)(亦即化合物 6 至 23)。



經由實驗結果發現，在化合物 6 至 23 中，化合物 18 {亦即 2-(3'-硝基苯胺基)喹啉 [2-(3'-nitroanilino)quinoline]，其中 R 是 3'-NO₂} 能夠有效地抑制 RNA-依賴型 RNA 聚合酶 NS5B 的蛋白質表現以及 NS3 與 NS4A 的蛋白酶活性，因而被預期可供作為一種抗-HCV 抑制劑 (anti-HCV inhibitor) (Peng H.K. *et al.* (2012), *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 22:1107-1110)。

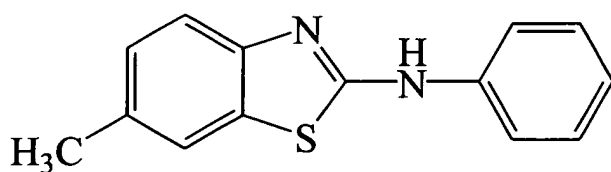
【0009】近年來，有研究顯示，2-胺基苯并噻唑衍生物 (2-aminobenzothiazole derivatives) 具有許多有利的生物活性，例如，在 Malleshappa N. Noolvi *et al.* (2012), *European Journal of Medicinal Chemistry*, 54:447-462 中，Malleshappa N. Noolvi 等人揭示 2-(2,6-二甲基苯胺基)-6-甲基苯并噻唑 [2-(2,6-dimethylanilino)-6-methylbenzothiazole] (亦即化合物 4a) 以及 2-(2,6-二氯苯胺基)-5-氯苯并噻唑 [2-(2,6-dichloroanilino)-5-chlorobenzothiazole] (亦即化合物 4i) 具有抗癌活性 (anticancer activity)。另外，在 Alessia Catalano *et al.* (2013), *European Journal of Medicinal Chemistry*, 64:357-364 中，Alessia Catalano 等人揭示 2-胺基-6-(4-氯苯甲氧基)-苯并噻唑

[2-amino-6-(4-chlorobenzyloxy)-benzothiazole](亦即化合物 **1n**) 以及 2-胺基-6-(4-氯苯氧基)-苯并噻唑 [2-amino-6-(4-chlorophenoxy)-benzothiazole](亦即化合物 **1o**)具有抗真菌活性(antifungal activity)。

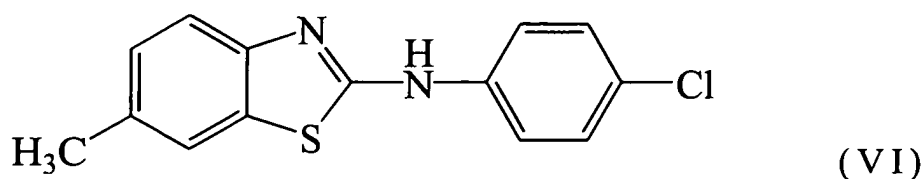
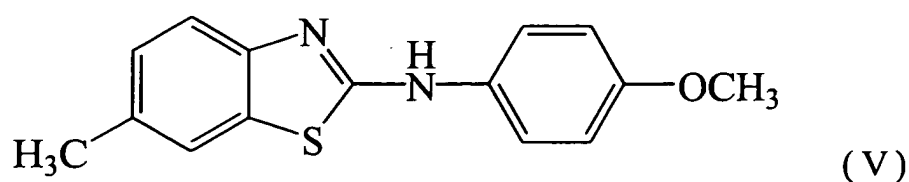
【0010】在 Ruiya Yao *et al.* (2013), *Applied Organometallic Chemistry*, 27:109-113 中, Ruiya Yao 等人揭示一種合成 2-胺基苯并噻唑衍生物的方法, 其主要是在硫酸銅(CuSO_4)(作為一種催化劑)的存在下令 2-鹵素苯胺(2-haloanilines)與異構硫氰酸鹽(isothiocyanates)進行聯繼反應(tandem reaction)。Ruiya Yao 等人於本篇文獻中合成出下列 3 種 2-苯胺基-6-甲基苯并噻唑衍生物(2-anilino-6-methylbenzothiazole derivatives), 其中包括: 一具有下列化學式(IV)的化合物 **3r** (亦即 2-苯胺基-6-甲基苯并噻唑)(2-anilino-6-methylbenzothiazole)、一具有下列化學式(V)的化合物 **3s** [亦即 2-(4-甲氧基苯胺基)-6-甲基苯并噻唑][2-(4-methoxyanilino)-6-methylbenzothiazole]以及一具有下列化學式(VI)的化合物 **3t** [亦即 2-(4-氯苯胺基)-6-甲

基 苯 并 噻

唑][2-(4-chloroanilino)-6-methylbenzothiazole]。



(IV)

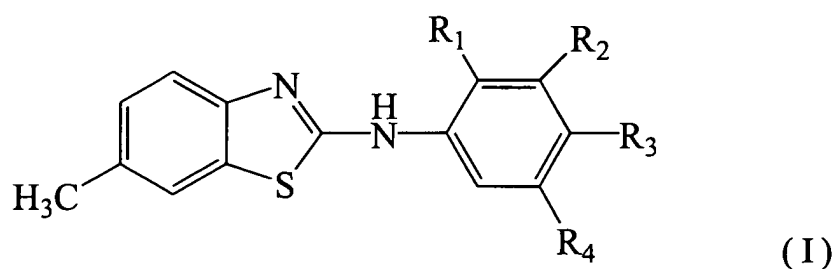


【0011】 雖然如上所述，對於藥學產業中的藥物化學家以及製造者而言，仍然存在有一需要去發展可被容易地製備並且適合供應用於治療 C 型肝炎的新穎化合物。經研究，申請人發現一系列新穎的 2-苯胺基-6-甲基苯并噻唑衍生物具有優異的抗-HCV 活性(anti-HCV activity)。

【發明內容】

發明概要

【0012】 於是，在第一個方面，本發明提供一種具有下列化學式(I)的化合物：

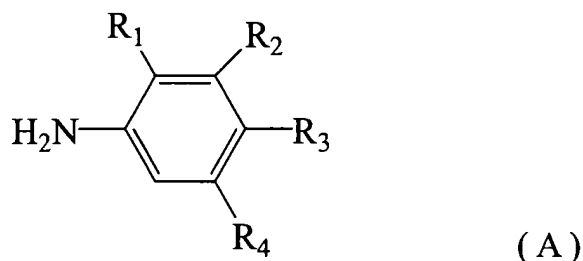


或者它的一藥學上可接受的鹽類，其中：

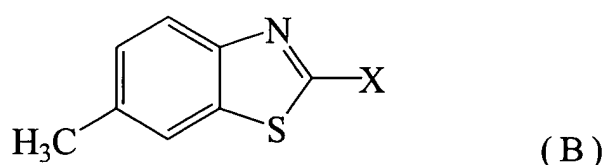
R_1 、 R_2 、 R_3 以及 R_4 是獨立地選自於由下列所構成的群組：氫、鹵素、 C_1 - C_6 烷基基團、 C_1 - C_6 烷氧基基團、苯基 C_1 - C_6 烷氧基基團、硝基、羥基以及羧基；

但有條件是： R_1 、 R_2 、 R_3 以及 R_4 不同時為氫；以及當 R_1 、 R_2 以及 R_4 為氫時， R_3 不為氫或者甲氧基。

【0013】 在第二個方面，本發明提供一種用於製備一如上所述的具有化學式(I)的化合物的方法，其包含有令一具有下列化學式(A)的化合物：



其中，該等 R_1 、 R_2 、 R_3 以及 R_4 基團具有相同於那些為上述具有化學式(I)的化合物所界定的定義，與一具有下列化學式(B)的化合物相反應：



其中，X 選自於 Cl、Br 或 I。

【0014】 在第三個方面，本發明提供一種用於治療 C 型肝炎的藥學組成物，其包含有一如上所述的具有化學式(I)的化合物或者它的一藥學上可接受的鹽類。

【0015】 在第四個方面，本發明提供一種用於治療一具有或被懷疑具有 C 型肝炎之個體的方法，其包含有對該個體投藥以一如上所述的具有下列化學式(I)的化合物或者它的一藥學上可接受的鹽類。

【0016】 本發明的上述以及其它目的、特徵與優點，在參照以下的詳細說明與較佳實施例和隨文檢附的圖式後，將變得明顯。

發明的詳細說明

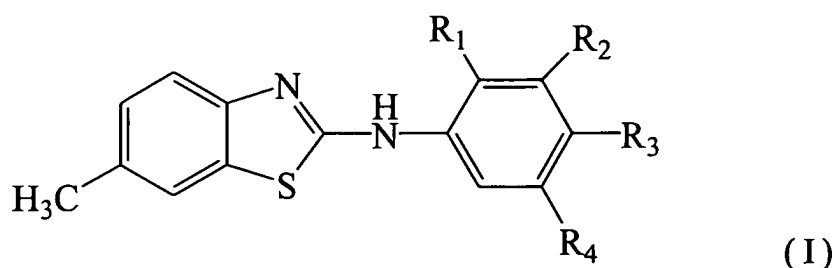
【0017】 爲了這本說明書之目的，將被清楚地瞭解的是：文字“包含有(comprising)”意指“包含但不限於”，以及文字“包括(comprises)”具有一對應的意義。

【0018】 要被瞭解的是：若有任何一件前案刊物在此被引述，該前案刊物不構成一個下述承認：在台灣或任何其他國家之中，該前案刊物形成本技藝中的常見一般知識之一部分。

【0019】 除非另外有所定義，在本文中所使用的所有技術性與科學術語具有熟悉本發明所屬技藝的人士所共同瞭解的意義。一熟悉本技藝者會認知到許多與那些被描述於本文中者相似或等效的方法和材料，它們可被用於實施本發明。當然，本發明決不受到所描述的方法和材料之限制。

【0020】 爲了開發可被容易地製備並且適合供應用於治療 C 型肝炎的新穎化合物，申請人經多方研究之後發現：一系列新穎的 2-苯胺基-6-甲基苯并噻唑衍生物(2-anilino-6-methylbenzothiazole derivatives)具有抗-HCV 活性。

【0021】 於是，本發明提供一種具有下列化學式(I)的化合物：



或者它的一藥學上可接受的鹽類，其中：

R_1 、 R_2 、 R_3 以及 R_4 是獨立地選自於由下列所構成的群組：氫、鹵素、 C_1 - C_6 烷基基團、 C_1 - C_6 烷氧基基團、苯基 C_1 - C_6 烷氧基基團、硝基、羥基以及羧基；

但有條件是： R_1 、 R_2 、 R_3 以及 R_4 不同時為氫；以及當 R_1 、 R_2 以及 R_4 為氫時， R_3 不為氫或者甲氧基。

【0022】如本文中所用的，術語“鹵素(halogen)”意指氟、氯、溴以及碘。較佳地，該鹵素是氯或溴。

【0023】如本文中所用的，術語“ C_1 - C_6 烷基基團(C_1 - C_6 alkyl group)”意指具有直鏈(straight chain)或支鏈部分(branched chain moieties)並且含有 1 至 6 個碳原子(carbon atom)之飽和的單價烴基團(saturated monovalent hydrocarbon groups)。一般而言， C_1 - C_6 烷基基團，本身或作為另一個基團的一部分，包括，但不限於：甲基、乙基、丙基、異丙基、正丁基、異丁基、二級-丁基(*sec*-butyl)、三級-丁基(*tert*-butyl)、*n*-戊基、異戊基、新戊基(neopentyl)、正己基、異己基，以及它們的各種支鏈異構物(branched chain isomers)等。在本發明的一個較佳具體例中，該 C_1 - C_6 烷基基團是甲基。

【0024】如本文中所用的，術語“ C_1 - C_6 烷氧基基團(C_1 - C_6 alkoxy group)”意指一具有化學式-OR'的基團，其中 R'是一如上所述的 C_1 - C_6 烷基基團。一般而言， C_1 - C_6 烷氧基基團包括，但不限於：甲氧基、乙氧基、正丙氧基、異丙氧基、正丁氧基、異丁氧基、二級-丁氧基、三級-丁氧基、*n*-戊氧基、異戊氧基、新戊氧基、正己氧基、異己氧基等。在本

發明的一個較佳具體例中，該 C_1-C_6 烷氧基基團是甲氧基。

【0025】 如本文中所用的，術語“苯基 C_1-C_6 烷氧基基團”意指一被取代以一苯基的 C_1-C_6 烷氧基基團，而該 C_1-C_6 烷氧基基團具有一如上所述的定義。在本發明的一個較佳具體例中，該苯基 C_1-C_6 烷氧基基團是具有一化學式為 $-OCH_2Ph$ 的苯基甲氧基。

【0026】 依據本發明，該等具有化學式(I)的化合物的代表例包括，但不限於：

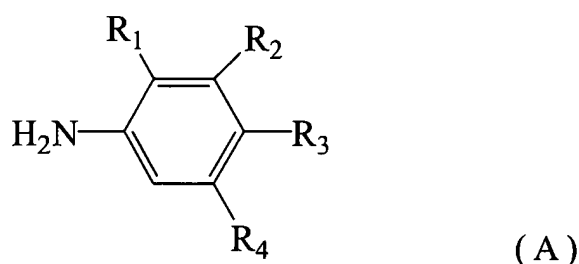
- 2-(4-甲基苯胺基)-6-甲基苯并噻唑；
- 2-(2,4-二甲基苯胺基)-6-甲基苯并噻唑；
- 2-(3,5-二甲基苯胺基)-6-甲基苯并噻唑；
- 2-(3,5-二甲氧基苯胺基)-6-甲基苯并噻唑；
- 2-(3,4,5-三甲氧基苯胺基)-6-甲基苯并噻唑；
- 2-(2-苯甲氧基苯胺基)-6-甲基苯并噻唑；
- 2-(3-苯甲氧基苯胺基)-6-甲基苯并噻唑；
- 2-(4-苯甲氧基苯胺基)-6-甲基苯并噻唑；
- 2-(4-溴-2-氯苯胺基)-6-甲基苯并噻唑；
- 2-(3-硝基苯胺基)-6-甲基苯并噻唑；
- 2-(4-硝基苯胺基)-6-甲基苯并噻唑；
- 2-(2-羥基-4-硝基苯胺基)-6-甲基苯并噻唑；以及
- 2-(4-羧基-2-羥基苯胺基)-6-甲基苯并噻唑。

【0027】 依據本發明，該等具有化學式(I)的化合物可呈其自由形式(free form)或其一藥學上可接受的鹽類的形式。此外，依據本發明的具有化學式(I)的化合物亦可有如

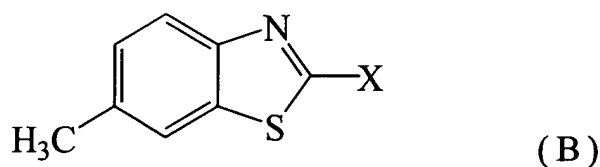
一立體異構物 (stereoisomer) 或者呈以水合物來代表的溶劑合物 (solvate) 的形式而存在。因此，被預期的是：此等立體異構物和溶劑合物會落在本發明的技術概念之中。

【0028】 例示性之藥學上可接受的鹽類包括，但不限於：帶有無機酸 (諸如氯化氫、溴化氫、硫酸以及磷酸) 之鹽類；帶有有機酸 [諸如醋酸、馬來酸 (maleate)、酒石酸 (tartrate)、甲磺酸 (methanesulfonate)] 之鹽類；以及帶有胺基酸 (諸如精胺酸、天冬胺酸以及麩胺酸) 之鹽類。

【0029】 本發明亦提供一種用於製備一如上所述的具有化學式 (I) 的化合物的方法，其包含有令一具有下列化學式 (A) 的化合物：



其中，該等 R_1 、 R_2 、 R_3 以及 R_4 基團具有相同於那些為上述具有化學式 (I) 的化合物所界定的定義，與一具有下列化學式 (B) 的化合物相反應：



其中，X 選自於 Cl、Br 或 I。

【0030】 依據本發明的具有化學式 (I) 的化合物經由活體外試驗而被證實可以有效地抑制 RNA-依賴型 RNA 聚合酶 (RNA-dependent RNA polymerase, RdRp) NS5B 的酵素活性

與表現(包括 mRNA 以及蛋白質的表現)。因此，被預期的是，依據本發明的具有化學式(I)的化合物或者它的一藥學上可接受的鹽類可供用於治療 C 型肝炎。

【0031】於是，本發明提供一種用於治療 C 型肝炎的藥學組成物，其包含有一如上所述的具有化學式(I)的化合物或者它的一藥學上可接受的鹽類。

【0032】如本文中所用的，“治療(treating)”或“治療(treatment)”意指預防(preventing)、減少(reducing)、減輕(alleviating)、改善(ameliorating)、緩解(relieving)、或控制(controlling)一疾病(disease)或障礙(disorder)的一或多個臨床徵兆(clinical sign)，以及降低(lowering)、停止(stopping)或逆轉(reversing)一正在被治療中的病況(condition)或症狀(symptom)之嚴重性(severity)的進展(progression)。

【0033】依據本發明的藥學組成物可利用熟習此技藝者所詳知的技術而被製造成一適合於非經腸道地(parenterally)、口服地(orally)或局部地(topically)投藥的劑型，這包括，但不限於：注射品(injection)[例如，無菌的水性溶液(sterile aqueous solution)或分散液(dispersion)]、無菌的粉末(sterile powder)、錠劑(tablet)、片劑(troche)、丸劑(pill)、膠囊(capsule)、外部製劑(external preparation)以及類似之物。

【0034】依據本發明的藥學組成物可以一選自於由下列所構成的群組中的非經腸道途徑(parenteral routes)來投

藥：腹膜內注射 (intraperitoneal injection)、皮下注射 (subcutaneous injection)、肌肉內注射 (intramuscular injection) 以及靜脈內注射 (intravenous injection)。在本發明的一個較佳具體例中，該藥學組成物被製成適於以靜脈內注射而被投藥的劑型。

【0035】 依據本發明的藥學組成物可進一步包含有一被廣泛地使用於藥物製造技術之藥學上可接受的載劑 (pharmaceutically acceptable carrier)。例如，該藥學上可接受的載劑可包含一或多種選自於下列的試劑：溶劑 (solvent)、緩衝液 (buffer)、乳化劑 (emulsifier)、懸浮劑 (suspending agent)、分解劑 (decomposer)、崩解劑 (disintegrating agent)、分散劑 (dispersing agent)、黏結劑 (binding agent)、賦形劑 (excipient)、安定劑 (stabilizing agent)、螯合劑 (chelating agent)、稀釋劑 (diluent)、膠凝劑 (gelling agent)、防腐劑 (preservative)、潤濕劑 (wetting agent)、潤滑劑 (lubricant)、吸收延遲劑 (absorption delaying agent)、脂質體 (liposome) 以及類似之物。有關這些試劑的選用與數量是落在熟習此項技術之人士的專業素養與例行技術範疇內。

【0036】 依據本發明，該藥學上可接受的載劑包含有一選自於由下列所構成之群組中的溶劑：水、生理鹽水 (normal saline)、磷酸鹽緩衝生理鹽水 (phosphate buffered saline, PBS)、含糖溶液、含有醇的水性溶液 (aqueous solution containing alcohol)，以及它們的組合。

【0037】 本發明亦提供一種用於治療一具有或被懷疑具有 C 型肝炎之個體的方法，其包含有對該個體投藥以一如上所述的具有化學式(I)的化合物或者它的一藥學上可接受的鹽類。

【0038】 另一方面，申請人將 Ruiya Yao 等人(Ruiya Yao *et al.* (2013)，同上述)所揭示的 2-(4-甲氧基苯胺基)-6-甲基苯并噻唑(亦即本發明的化合物 4)以及 2-(4-氯苯胺基)-6-甲基苯并噻唑(亦即本發明的化合物 10)拿來進行 RNA-依賴型 RNA 聚合酶 NS5B mRNA 表現量的分析，而實驗結果發現：這 2 種已知的 2-苯胺基-6-甲基苯并噻唑衍生物可以抑制 RNA-依賴型 RNA 聚合酶 NS5B 的 mRNA 表現。

【0039】 因此，被預期的是，2-(4-甲氧基苯胺基)-6-甲基苯并噻唑、2-(4-氯苯胺基)-6-甲基苯并噻唑或者它們的一藥學上可接受的鹽類供應用於製備一用來治療 C 型肝炎之醫藥品的用途。

【0040】 本發明亦提供一種用於治療一具有或被懷疑具有 C 型肝炎之個體的方法，其包含有對該個體投藥以 2-(4-甲氧基苯胺基)-6-甲基苯并噻唑、2-(4-氯苯胺基)-6-甲基苯并噻唑或者它們的一藥學上可接受的鹽類。

【圖式簡單說明】

【0041】 本發明之其他的特徵及功效，將於參照圖式的實施方式中清楚地呈現，其中：

圖 1 顯示會表現 RNA-依賴型 RNA 聚合酶 NS5B 的 Huh 7 細胞在以不同濃度的化合物 13 予以處理後所測得的 RNA-

依賴型 RNA 聚合酶 NS5B 的相對活性百分比，其中“*”表示：當與對照組作比較， $p < 0.05$ ；以及“**”表示：當與對照組作比較， $p < 0.01$ ；

圖 2 是一西方墨點分析圖，其顯示 Ava 5 細胞在以不同濃度的化合物 13 予以處理後所測得的 RNA-依賴型 RNA 聚合酶 NS5B 的表現情形；以及

圖 3 顯示 Ava 5 細胞在以不同濃度的化合物 13 予以處理後所測得的 RNA-依賴型 RNA 聚合酶 NS5B 的 mRNA 表現量，其中“*”表示：當與對照組作比較， $p < 0.05$ ；以及“**”表示：當與對照組作比較， $p < 0.01$ 。

【實施方式】

較佳實施例之詳細說明

【0042】 本發明將就下面的實施例來做進一步說明，但應瞭解的是，該等實施例僅是供例示說明用，而不應被解釋為本發明的實施上的限制。

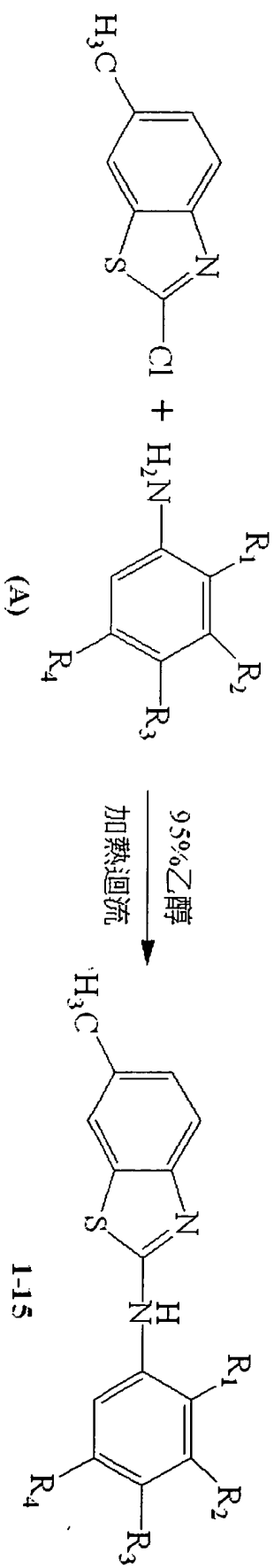
實施例

【0043】 依據本發明的具有化學式(I)之化合物可以依據下面的反應途徑與操作程序而被製得。

【0044】 如反應途徑 1 所示，令 2-氯-6-甲基苯并噻唑(2-chloro-6-methylbenzothiazole)與一具有如下面化學式 A 所示之經取代的苯胺(substituted aniline)(其中 R_1 至 R_4 基團具有相同於那些為化合物 1-15 所界定的定義)相反應，藉此可得到對應的 2-(經取代的-苯胺基)-6-甲基苯并噻唑[2-(substituted-anilino)-6-methylbenzothiazole](化合物

1-15) °

反應途徑 1



- | | | | |
|---|------------------------------|----|-------------------------------|
| 1 | $R_1=R_2=R_4=H, R_3=CH_3$ | 8 | $R_1=R_3=R_4=H, R_2=OCH_2Ph$ |
| 2 | $R_1=R_3=CH_3, R_2=R_4=H$ | 9 | $R_1=R_2=R_4=H, R_3=OCH_2Ph$ |
| 3 | $R_1=R_3=H, R_2=R_4=CH_3$ | 10 | $R_1=R_2=R_4=H, R_3=Cl$ |
| 4 | $R_1=R_2=R_4=H, R_3=OCH_3$ | 11 | $R_1=Cl, R_3=Br, R_2=R_4=H$ |
| 5 | $R_1=R_3=H, R_2=R_4=OCH_3$ | 12 | $R_1=R_3=R_4=H, R_2=NO_2$ |
| 6 | $R_1=H, R_2=R_3=R_4=OCH_3$ | 13 | $R_1=R_2=R_4=H, R_3=NO_2$ |
| 7 | $R_1=OCH_2Ph, R_2=R_3=R_4=H$ | 14 | $R_1=OH, R_3=NO_2, R_2=R_4=H$ |
| | | 15 | $R_1=OH, R_3=COOH, R_2=R_4=H$ |

【0045】 依據本發明的具有化學式(I)之代表性化合物被顯示於下面的表 1 中。

表 1. 依據本發明的具有化學式(I)之代表性化合物

化合物	IUPAC 命名	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
1	2-(4-甲基苯胺基)-6-甲基苯并噻唑 [2-(4-methylanilino)-6-methylbenzothiazole]	H	H	CH ₃	H
2	2-(2,4-二甲基苯胺基)-6-甲基苯并噻唑 [2-(2,4-dimethylanilino)-6-methylbenzothiazole]	CH ₃	H	CH ₃	H
3	2-(3,5-二甲基苯胺基)-6-甲基苯并噻唑 [2-(3,5-dimethylanilino)-6-methylbenzothiazole]	H	CH ₃	H	CH ₃
4	2-(4-甲氧基苯胺基)-6-甲基苯并噻唑 [2-(4-methoxyanilino)-6-methylbenzothiazole]	H	H	OCH ₃	H
5	2-(3,5-二甲氧基苯胺基)-6-甲基苯并噻唑 [2-(3,5-dimethoxyanilino)-6-methylbenzothiazole]	H	OCH ₃	H	OCH ₃
6	2-(3,4,5-三甲氧基苯胺基)-6-甲基苯并噻唑 [2-(3,4,5-trimethoxyanilino)-6-methylbenzothiazole]	H	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃
7	2-(2-苯甲氧基苯胺基)-6-甲基苯并噻唑	OCH ₂ Ph	H	H	H

	[2-(2-benzyloxyanilino)-6-methylbenzothiazole]				
8	2-(3-苯甲氧基苯胺基)-6-甲基苯并噻唑 [2-(3-benzyloxyanilino)-6-methylbenzothiazole]	H	OCH ₂ Ph	H	H
9	2-(4-苯甲氧基苯胺基)-6-甲基苯并噻唑 [2-(4-benzyloxyanilino)-6-methylbenzothiazole]	H	H	OCH ₂ Ph	H
10	2-(4-氯苯胺基)-6-甲基苯并噻唑 [2-(4-chloroanilino)-6-methylbenzothiazole]	H	H	Cl	H
11	2-(4-溴-2-氯苯胺基)-6-甲基苯并噻唑 [2-(4-bromo-2-chloroanilino)-6-methylbenzothiazole]	Cl	H	Br	H
12	2-(3-硝基苯胺基)-6-甲基苯并噻唑 [2-(3-nitroanilino)-6-methylbenzothiazole]	H	NO ₂	H	H
13	2-(4-硝基苯胺基)-6-甲基苯并噻唑 [2-(4-nitroanilino)-6-methylbenzothiazole]	H	H	NO ₂	H
14	2-(2-羟基-4-硝基苯胺基)-6-甲基苯并噻唑 [2-(2-hydroxy-4-nitroanilino)-6-methylbenzothiazole]	OH	H	NO ₂	H
15	2-(4-羧基-2-羟基苯胺基)-6-甲基苯并噻唑 [2-(4-carboxyl-2-hydroxyanilino)-6-methylbenzothiazole]	OH	H	COOH	H

一般操作程序：

【0046】 一般的薄層層析法 (thin layer chromatography, TLC) 藉由使用 DC-fertig folien ALUGRM® Xtra SIL G/UV254 層析片 (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG) 而被執行，並且藉由使用一 UV 光 (254 nm) 而被檢測。

【0047】 矽膠管柱層析法 (silica gel column chromatography) 是使用 Ultrapure Neutral SiliaFlash® Silica gel (60-200 μm) (SiliCycle) 作為固相 (solid phase) 並以正己烷 (n-hexane)/乙酸乙酯 (ethyl acetate, EtOAc) (3 : 1) 作為洗提液 (eluent) 而被執行。

【0048】 於下面實施例中所合成的各個化合物的熔點 (melting point) 是藉由一 Mel-Temp II 熔點測定器 (Mel-Temp II melting point apparatus) (華夏科學有限公司) 而被檢測。

【0049】 IR 光譜是使用一傅立葉轉換紅外線光譜儀 (Fourier Transform Infrared Spectrometer, FT-IR) (Perkin Elmer System-2000, Perkin Elmer) 而被檢測。

【0050】 ^1H -NMR 以及 ^{13}C -NMR 光譜是使用一核磁共振光譜儀 (nuclear magnetic resonance spectrometer) (Mercury Plus-400, Agilent) 而被檢測。以 δ (以 ppm 為單位) 來表示的 ^1H -NMR 以及 ^{13}C -NMR 的化學位移是分別使用 CDCl_3 ($\delta=7.24$ ppm) 以及 CDCl_3 ($\delta=77.23$ ppm) 作為一內部標準 (internal standard)，而偶合常數 (coupling constant) 是以 J (以 Hz 為單位) 來表示。

【0051】 電子衝擊質譜 (electron impact mass

spectrometry, EIMS)以及電子衝擊高解析質譜 (electron impact high-resolution mass spectrometry, EI-HRMS)是使用一高解析質譜儀 (high-resolution mass spectrometry, HRMS)(SHIMADZU QP2010, Thermo Finnigan)而被偵測。

**合成例 1. 2-(4-甲基苯胺基)-6-甲基苯并噻唑
[2-(4-methylanilino)-6-methylbenzothiazole](
化合物 1)**

【0052】 將 2-氯-6-甲基苯并噻唑 (2-chloro-6-methylbenzothiazole)(183 mg, 購自於 Aldrich) 以及 4-甲基苯胺 (4-methylaniline)(107 mg, 購自於 TCI)添加至 95%乙醇 (30 mL)中, 所形成的混合物在 90℃ 下進行加熱迴流歷時 10 小時, 在實驗的過程中以薄層層析法來確認反應是否已完成。之後, 將反應物冷卻至室溫, 繼而進行減壓濃縮來移除溶劑, 接著將 50 μ L 的二氯甲烷 (dichloromethane)以及 50 μ L 的水加入至所形成的殘餘物中並進行萃取歷時 1 小時。之後, 收集二氯甲烷層並藉由矽膠管柱層析法 (正己烷/乙酸乙酯=3:1)予以純化, 而得到有如一白色固體的標題化合物 1 (218 mg, 產率 86%)。

標題化合物被測得之性質：

【0053】 Mp: 160-162℃。IR (KBr): ν =3438 (NH), 2080 (C=C), 1627 (C=C), 1450 (C=C) cm^{-1} 。 ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ =2.35 (s, 6H, CH_3), 2.39 (s, 3H, CH_3), 7.09 (dd, J =1.2, 8.0 Hz, 1H, ArH), 7.19 (d, J =8.0 Hz, 2H, ArH), 7.35 (d, J =8.0 Hz, 2H, ArH), 7.38 (d, J =8.0 Hz, 1H, ArH), 7.39

(d, $J = 1.2$ Hz, 1H, ArH), 9.42 (bs, 1H, NH)。 ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ =20.9 (CH_3), 21.2 (CH_3), 118.6 (CH), 120.8 (CH), 121.0 (CH), 127.2 (CH), 129.8 (C), 130.0 (CH), 131.8 (C), 134.2 (C), 137.6 (C), 149.2 (C), 165.3 (C)。EIMS: m/z 254 [M^+], 238, 212, 194, 148, 126, 121, 77, 65。關於 $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{S}$ 的 EI-HRMS 計算值: 254.0878; 發現值: 254.0878。關於 $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{S}$ 的分析計算值: C, 70.83; H, 5.55; N, 11.01; 發現值: C, 70.80; H, 5.57; N, 11.01。

● **合成例 2. 2-(2,4-二甲基苯胺基)-6-甲基苯并噻唑**
[2-(2,4-dimethylanilino)-6-methylbenzothiazol
e](化合物 2)

【0054】 2-(2,4-二甲基苯胺基)-6-甲基苯并噻唑(化合物 2)大體上是依據上面合成例 1 中所述的操作程序而被製得，不同之處在於：使用 121 mg 的 2,4-二甲基苯胺(2,4-dimethylaniline)(購自於 TCI)來替代 4-甲基苯胺，並且在 90°C 下進行加熱迴流歷時 13 小時。標題化合物 2 藉由矽膠管柱層析法(正己烷/乙酸乙酯=3:1)被純化而有如一淡黃色固體(214 mg, 產率 80%)。

● **標題化合物被測得之性質：**

【0055】 Mp: $178-180^\circ\text{C}$ 。IR (KBr): ν =3448 (NH), 2071 (C=C), 1628 (C=C), 1455 (C=C) cm^{-1} 。 ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ =2.30 (s, 3H, CH_3), 2.35 (s, 3H, CH_3), 2.38 (s, 3H, CH_3), 7.07–7.11 (m, 3H, ArH), 7.35–7.37 (m, 2H, ArH), 7.46 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, ArH), 7.85 (bs, 1H, NH)。 ^{13}C NMR (100

MHz, CDCl_3) : δ =17.8 (CH_3), 21.0 (CH_3), 21.2 (CH_3), 118.6 (CH), 120.8 (CH), 124.4 (CH), 127.2 (CH), 127.8 (CH), 130.4 (C), 131.7 (C), 131.9 (CH), 132.4 (C), 135.6 (C), 136.2 (C), 149.7 (C), 166.6 (C)。EIMS : m/z 268 [M^+], 253, 235, 220, 208, 193, 162, 131, 107, 77, 51。關於 $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{S}$ 的 EI-HRMS 計算值 : 268.1034 ; 發現值 : 268.1034。關於 $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{S}$ 的分析計算值 : C, 71.61; H, 6.01; N, 10.44 ; 發現值 : C, 71.78; H, 6.00; N, 10.45。

合成例 3. 2-(3,5-二甲基苯胺基)-6-甲基苯并噻唑
[2-(3,5-dimethylanilino)-6-methylbenzothiazole](化合物 3)

【0056】 2-(3,5-二甲基苯胺基)-6-甲基苯并噻唑(化合物 3)大體上是依據上面合成例 1 中所述的操作程序而被製得，不同之處在於：使用 121 mg 的 3,5-二甲基苯胺(3,5-dimethylaniline)(購自於 Alfa Aesar)來替代 4-甲基苯胺，並且在 90°C 下進行加熱迴流歷時 10 小時。標題化合物 3 藉由矽膠管柱層析法(正己烷/乙酸乙酯=3 : 1)被純化而有如一黃褐色固體(241 mg，產率 85%)。

標題化合物被測得之性質：

【0057】 Mp : $142-144^\circ\text{C}$ 。IR (KBr) : ν =3439 (NH), 2900 (CH), 2077 ($\text{C}=\text{C}$), 1630($\text{C}=\text{C}$), 1466 ($\text{C}=\text{C}$) cm^{-1} 。 ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) : δ =2.33 (s, 6H, $\text{CH}_3\times 2$), 2.40 (s, 3H, CH_3), 6.79 (t, J = 0.8 Hz, 1H, ArH), 7.08 (d, J = 0.8 Hz, 2H, ArH), 7.11 (dd, J = 1.2, 8.4 Hz, 1H, ArH), 7.41 (d, J = 1.2 Hz, 1H,

ArH), 7.45 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, ArH), 9.00 (bs, 1H, NH)。 ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ =21.3 (CH_3), 21.4 (CH_3), 117.9 (CH), 118.8 (CH), 120.6 (CH), 127.2 (CH), 129.9 (C), 132.0 (C), 139.3 (C), 139.9 (C), 149.1 (C), 164.4 (C)。 EIMS: m/z 268 [M^+], 267, 253, 252, 226, 133, 91, 77。關於 $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{S}$ 的 EI-HRMS 計算值: 268.1034; 發現值: 268.1034。關於 $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{S}$ 的分析計算值: C, 71.61; H, 6.01; N, 10.44; 發現值: C, 71.74; H, 5.97; N, 10.47。

● **合成例 4. 2-(4-甲氧基苯胺基)-6-甲基苯并噻唑**
[2-(4-methoxyanilino)-6-methylbenzothiazole]
(化合物 4)

【0058】 2-(4-甲氧基苯胺基)-6-甲基苯并噻唑(化合物 4) 大體上是依據上面合成例 1 中所述的操作程序而被製得，不同之處在於：使用 123 mg 的 4-甲氧基苯胺 (4-methoxyaniline)(購自於 TCI)來替代 4-甲基苯胺，並且在 90°C 下進行加熱迴流歷時 8 小時。標題化合物 4 藉由矽膠管柱層析法(正己烷/乙酸乙酯=3:1)被純化而有如一乳白色固體(248 mg, 產率 92%)。

● **標題化合物被測得之性質：**

【0059】 Mp: $154-156^\circ\text{C}$ 。 IR (KBr): ν =3444 (NH), 2066 (C=C), 1636 (C=C), 1511 (C=C), 1455 (C=C) cm^{-1} 。 ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ =2.38 (s, 3H, CH_3), 2.83 (s, 3H, OCH_3), 6.94 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H, ArH), 7.08 (dd, $J = 1.2, 8.4$ Hz, 1H, ArH), 7.34 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, ArH), 7.37 (d, $J = 1.2$ Hz, 1H,

ArH), 7.39 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H, ArH), 9.18 (bs, 1H, NH)。 ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 21.2$ (CH_3), 55.5 (CH_3), 114.7 (CH), 118.4 (CH), 120.8 (CH), 123.9 (CH), 127.2 (CH), 129.8 (C), 131.7 (C), 133.2 (C), 149.5 (C), 157.2 (C), 166.4 (C)。 EIMS : m/z 270 [M^+], 255, 229, 227, 200, 168, 121, 104, 77。關於 $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{OS}$ 的 EI-HRMS 計算值: 270.0827; 發現值: 270.0830。關於 $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{OS}$ 的分析計算值: C, 66.64; H, 5.22; N, 10.36; 發現值: C, 66.78; H, 5.31; N, 10.30。

合成例 5. 2-(3,5-二甲氧基苯胺基)-6-甲基苯并噻唑
[2-(3,5-dimethoxyanilino)-6-methylbenzothiazole](化合物 5)

【0060】 2-(3,5-二甲氧基苯胺基)-6-甲基苯并噻唑(化合物 5)大體上是依據上面合成例 1 中所述的操作程序而被製得，不同之處在於：使用 153 mg 的 3,5-二甲氧基苯胺(3,5-dimethoxyaniline)(購自於 Lancaster)來替代 4-甲基苯胺，並且在 90°C 下進行加熱迴流歷時 8 小時。標題化合物 5 藉由矽膠管柱層析法(正己烷/乙酸乙酯=3:1)被純化而有如一乳白色固體(276 mg, 產率 92%)。

標題化合物被測得之性質：

【0061】 Mp : $127-129^\circ\text{C}$ 。 IR (KBr): $\nu = 3349$ (NH), 2941 (CH), 2351 (C=C), 1594 (C=C), 1463 (C=C) cm^{-1} 。 ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 2.41$ (s, 3H, CH_3), 3.77 (s, 6H, $\text{OCH}_3 \times 2$), 6.25 (t, $J = 2.4$ Hz, 1H, ArH), 6.64 (d, $J = 2.4$ Hz, 2H, ArH), 7.13 (dd, $J = 1.6, 8.4$ Hz, 1H, ArH), 7.43 (d, $J =$

1.6 Hz, 1H, ArH), 7.49 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, ArH), 9.31 (bs, 1H, NH)。 ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ =21.3 (CH_3), 55.4 (CH_3), 96.2 (CH), 98.0 (CH), 118.8 (CH), 120.9 (CH), 127.3 (CH), 129.9 (C), 132.2 (C), 141.8 (C), 148.7 (C), 161.5 (2C), 163.9 (C)。EIMS: m/z 300 [M^+], 285, 271, 242, 214, 200, 150, 138, 121, 107, 77。關於 $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$ 的 EI-HRMS 計算值: 300.0932; 發現值: 300.0930。關於 $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$ 的分析計算值: C, 63.98; H, 5.37; N, 9.33; 發現值: C, 63.95; H, 5.39; N, 9.31。

合成例 6. 2-(3,4,5-三甲氧基苯胺基)-6-甲基苯并噻唑
[2-(3,4,5-trimethoxyanilino)-6-methylbenzothiazole](化合物 6)

【0062】 2-(3,4,5-三甲氧基苯胺基)-6-甲基苯并噻唑(化合物 6)大體上是依據上面合成例 1 中所述的操作程序而被製得，不同之處在於：使用 183 mg 的 3,4,5-三甲氧基苯胺(3,4,5-trimethoxyaniline)(購自於 Lancaster)來替代 4-甲基苯胺，並且在 90°C 下進行加熱迴流歷時 8 小時。標題化合物 6 藉由矽膠管柱層析法(正己烷/乙酸乙酯=3:1)被純化而有如一淡紫色固體(314 mg, 產率 95%)。

標題化合物被測得之性質：

【0063】 Mp: $204-206^\circ\text{C}$ 。IR (KBr): ν =3301 (NH), 2928 (CH), 2356 (C=C), 1612 (C=C), 1541 (C=C), 1505 (C=C), 1450 (C=C) cm^{-1} 。 ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ =2.41 (s, 3H, CH_3), 3.83 (s, 6H, $\text{OCH}_3 \times 2$), 3.86 (s, 3H, OCH_3), 6.71 (s, 2H,

ArH), 7.12 (dd, $J = 1.2, 8.4$ Hz, 1H, ArH), 7.43 (d, $J = 1.2$ Hz, 1H, ArH), 7.44 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, ArH), 9.61 (bs, 1H, NH)。 ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ =21.2 (CH_3), 56.1 ($2\times\text{OCH}_3$), 61.0 (OCH_3), 98.3 (CH), 118.7 (CH), 120.9 (CH), 127.3 (CH), 129.7 (C), 132.2 (C), 134.8 (C), 136.3 (C), 148.9 (C), 153.8 (2C), 164.9 (C)。EIMS: m/z 330 [M^+], 315, 287, 272, 257, 229, 201, 191, 150, 138, 93, 77, 45。關於 $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$ 的 EI-HRMS 計算值: 330.1038; 發現值: 330.1039。關於 $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$ 的分析計算值: C, 61.80; H, 5.49; N, 8.48; 發現值: C, 61.83; H, 5.51; N, 8.48。

合成例 7. 2-(2-苯甲氧基苯胺基)-6-甲基苯并噻唑
[2-(2-benzyloxyanilino)-6-methylbenzothiazol
e](化合物 7)

【0064】 2-(2-苯甲氧基苯胺基)-6-甲基苯并噻唑(化合物 7)大體上是依據上面合成例 1 中所述的操作程序而被製得，不同之處在於：使用 199 mg 的 2-苯甲氧基苯胺(2-benzyloxyaniline)(購自於 Acros)來替代 4-甲基苯胺，並且在 90°C 下進行加熱迴流歷時 16 小時。標題化合物 7 藉由矽膠管柱層析法(正己烷/乙酸乙酯=3:1)被純化而有如一褐色液體(218 mg, 產率 63%)。

標題化合物被測得之性質：

【0065】 IR (KBr): ν =3411 (NH), 2069 (C=C), 1637 (C=C), 1542 (C=C), 1457 (C=C) cm^{-1} 。 ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ =2.41 (s, 3H, CH_3), 5.13 (s, 2H, CH_2), 6.95-7.07 (m, 3H,

ArH), 7.15 (dd, $J = 1.6, 8.0$ Hz, 1H, ArH), 7.33-7.43 (m, 6H, ArH), 7.56 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, ArH), 7.73 (bs, 1H, NH), 8.28 (dd, $J = 1.6, 8.0$ Hz, 1H, ArH)。 ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ =21.3 (CH_3), 70.9 (CH_2), 111.8 (CH), 117.7 (CH), 119.5 (CH), 120.7 (CH), 121.5 (CH), 122.6 (CH), 127.3 (CH), 128.3 (CH), 128.7 (CH), 129.8 (C), 130.4 (C), 132.4 (C), 136.2 (C), 146.9 (C), 149.8 (C), 161.3 (C)。EIMS: m/z 346 [M^+], 313, 277, 165, 268, 255, 238, 197, 181, 163, 90, 84。

● 關於 $\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{OS}$ 的 EI-HRMS 計算值: 346.1140; 發現值: 346.1141。關於 $\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{OS}$ 的分析計算值: C, 72.80; H, 5.24; N, 8.09; 發現值: C, 72.67; H, 5.29; N, 8.14。

合成例 8. 2-(3-苯甲氧基苯胺基)-6-甲基苯并噻唑
[2-(3-benzyloxyanilino)-6-methylbenzothiazol
e](化合物 8)

● 【0066】 2-(3-苯甲氧基苯胺基)-6-甲基苯并噻唑(化合物 8)大體上是依據上面合成例 1 中所述的操作程序而被製得，不同之處在於：使用 199 mg 的 3-苯甲氧基苯胺(3-benzyloxyaniline)(購自於 Acros)來替代 4-甲基苯胺，並且在 90°C 下進行加熱迴流歷時 10 小時。標題化合物 8 藉由矽膠管柱層析法(正己烷/乙酸乙酯=3:1)被純化而有如一乳白色固體(270 mg, 產率 78%)。

標題化合物被測得之性質：

【0067】 Mp: $121-123^\circ\text{C}$ 。IR (KBr): ν =3467 (NH), 2076 ($\text{C}=\text{C}$), 1614 ($\text{C}=\text{C}$), 1491 ($\text{C}=\text{C}$), 1460 ($\text{C}=\text{C}$) cm^{-1} 。 ^1H NMR

(400 MHz, CDCl_3) : δ =2.39 (s, 3H, CH_3), 5.01 (s, 2H, CH_2), 6.74 (dd, J = 2.4, 8.0 Hz, 1H, ArH), 7.01 (dd, J = 2.4, 8.0 Hz, 1H, ArH), 7.11 (dd, J = 1.2, 8.0 Hz, 1H, ArH), 7.13 (t, J = 2.4 Hz, 1H, ArH), 7.25 (t, J = 8.0 Hz, 1H, ArH), 7.30 - 7.42 (m, 6H, ArH), 7.48 (d, J = 8.0 Hz, 1H, ArH), 9.45 (bs, 1H, NH). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) : δ =21.2 (CH_3), 70.0 (CH_2), 106.3 (CH), 110.6 (CH), 112.2 (CH), 118.9 (CH), 120.8 (CH), 127.3 (CH), 127.4 (CH), 127.9 (CH), 128.5 (CH), 129.9 (C), 130.2 (CH), 132.2 (C), 136.7 (C), 141.3 (C), 148.9 (C), 160.0 (C), 164.0 (C). EIMS: m/z 346 [M^+], 317, 313, 255, 238, 227, 209, 200, 164, 121, 107, 91, 77, 65。關於 $\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{OS}$ 的 EI-HRMS 計算值 : 346.1140 ; 發現值 : 346.1137。關於 $\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{OS}$ 的分析計算值 : C, 72.80; H, 5.24; N, 8.09 ; 發現值 : C, 72.72; H, 5.26; N, 8.08。

合成例 9. 2-(4-苯甲氧基苯胺基)-6-甲基苯并噻唑
[2-(4-benzyloxyanilino)-6-methylbenzothiazol
e](化合物 9)

【0068】 2-(4-苯甲氧基苯胺基)-6-甲基苯并噻唑(化合物 9)大體上是依據上面合成例 1 中所述的操作程序而被製得，不同之處在於：使用 199 mg 的 4-苯甲氧基苯胺(4-benzyloxyaniline)(購自於 Alfa Aesar)來替代 4-甲基苯胺，並且在 90℃ 下進行加熱迴流歷時 10 小時。標題化合物 9 藉由矽膠管柱層析法(正己烷/乙酸乙酯=3 : 1)被純化而有如乳白色固體(284 mg，產率 82%)。

標題化合物被測得之性質：

【0069】 Mp : 188-190°C。 IR (KBr) : ν =3440 (NH), 2363 (C=C), 1621 (C=C), 1577 (C=C), 1507 (C=C), 1457 (C=C) cm^{-1} 。 ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) : δ =2.40 (s, 3H, CH_3), 5.08 (s, 2H, CH_2), 7.01 (d, J = 8.8 Hz, 2H, ArH), 7.11 (dd, J = 1.6, 8.4 Hz, 1H, ArH), 7.32 - 7.46 (m, 9H, ArH)。 ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) : δ =21.3 (CH_3), 70.4 (CH_2), 115.8 (CH), 118.8 (CH), 120.8 (CH), 123.3 (CH), 127.3 (CH), 127.5 (CH), 128.0 (CH), 128.6 (CH), 130.2 (C), 131.9 (C), 133.2 (C), 136.8 (C), 149.7 (C), 156.2 (C), 165.2 (C)。 EIMS : m/z 346 [M^+], 255, 227, 200, 168, 148, 121, 91, 65。關於 $\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{OS}$ 的 EI-HRMS 計算值 : 346.1140 ; 發現值 : 346.1141。關於 $\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{OS}$ 的分析計算值 : C, 72.80; H, 5.24; N, 8.09 ; 發現值 : C, 72.54; H, 5.29; N, 8.06。

合成例 10. 2-(4- 氯 苯 胺 基)-6- 甲 基 苯 并 噻 唑

[2-(4-chloroanilino)-6-methylbenzothiazole](化合物 10)

【0070】 2-(4-氯苯胺基)-6-甲基苯并噻唑(化合物 10)大體上是依據上面合成例 1 中所述的操作程序而被製得，不同之處在於：使用 127 mg 的 4-氯苯胺(4-chloroaniline)(購自於 TCI)來替代 4-甲基苯胺，並且在 90°C 下進行加熱迴流歷時 13 小時。標題化合物 10 藉由矽膠管柱層析法(正己烷/乙酸乙酯=3:1)被純化而有如一淡紫色固體(206 mg，產率 75%)。

標題化合物被測得之性質：

【0071】 Mp : 198-200°C。 IR (KBr) : $\nu=3405$ (NH), 2967 (CH), 1758 (C=C), 1602 (C=C), 1543 (C=C), 1447 (C=C), 806 (C-Cl) cm^{-1} 。 ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) : $\delta=2.37$ (s, 3H, CH₃), 7.15 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, ArH), 7.42 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H, ArH), 7.51 (dd, $J = 8.0$ Hz, 1H, ArH), 7.62 (s, 1H, ArH), 7.82 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H, ArH), 10.54 (bs, 1H, NH)。 ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) : $\delta=20.8$ (CH₃), 119.0 (CH), 119.0 (CH), 120.9 (CH), 125.2 (C), 127.0 (CH), 128.8 (CH), 130.0 (C), 131.8 (C), 139.6 (C), 149.8 (C), 160.5 (C)。 EIMS : m/z 276 [M^++2], 274 (M^+), 238, 212, 136, 120, 110, 76。關於 C₁₄H₁₁ClN₂S 的 EI-HRMS 計算值 : 274.0331 ; 發現值 : 274.0328。關於 C₁₄H₁₁ClN₂S 的分析計算值 : C, 61.20; H, 4.04; N, 10.20 ; 發現值 : C, 61.24; H, 4.09; N, 10.18。

合成例 11. 2-(4-溴-2-氯苯胺基)-6-甲基苯并噻唑 [2-(4-bromo-2-chloroanilino)-6-methylbenzothiazole](化合物 11)

【0072】 2-(4-溴-2-氯苯胺基)-6-甲基苯并噻唑(化合物 11)大體上是依據上面合成例 1 中所述的操作程序而被製得，不同之處在於：使用 206 mg 的 4-溴-2-氯苯胺(4-bromo-2-chloroaniline)(購自於 ACROS)來替代 4-甲基苯胺，並且在 90°C 下進行加熱迴流歷時 15 小時。標題化合物 11 藉由矽膠管柱層析法(正己烷/乙酸乙酯=3:1)被純化而有如一乳白色固體(246 mg，產率 70%)。

標題化合物被測得之性質：

【0073】 Mp : 176-178°C。 IR (KBr) : ν =3437 (NH), 2352 (C=C), 1639 (C=C), 1520 (C=C), 1464 (C=C), 819 (C-Cl), 545 (C-Br) cm^{-1} 。 ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) : δ =2.43 (s, 3H, CH_3), 7.19 (dd, J = 1.2, 8.4 Hz, 1H, ArH), 7.44 (dd, J = 2.0, 8.8 Hz, 1H, ArH), 7.47 (d, J = 1.2 Hz, 1H, ArH), 7.54 (d, J = 2.0 Hz, 1H, ArH), 7.60 (d, J = 8.4 Hz, 1H, ArH), 8.44 (d, J = 8.8 Hz, 1H, ArH)。 ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) : δ =21.4 (CH_3), 114.5 (C), 120.1 (CH), 120.5 (CH), 120.8 (CH), 122.5 (C), 127.6 (CH), 130.5 (C), 130.9 (CH), 131.6 (CH), 133.3 (C), 135.7 (C), 149.5 (C), 160.2 (C)。 EIMS : m/z 355 [M^++4], 353 [M^++2], 351 [M^+], 319, 317, 272, 238, 205, 180, 136, 118, 110, 77, 51。關於 $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{BrClN}_2\text{S}$ 的 EI-HRMS 計算值 : 351.9437 ; 發現值 : 351.9433。關於 $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{BrClN}_2\text{S}$ 的分析計算值 : C, 47.54; H, 2.85; N, 7.92 ; 發現值 : C, 47.45; H, 2.96; N, 7.90。

**合成例 12. 2-(3- 硝基苯胺基)-6- 甲基苯并噻唑
[2-(3-nitroanilino)-6-methylbenzothiazole](化
合物 12)**

【0074】 2-(3-硝基苯胺基)-6-甲基苯并噻唑(化合物 12)
大體上是依據上面合成例 1 中所述的操作程序而被製得，
不同之處在於：使用 138 mg 的 3-硝基苯胺
(3-nitroaniline)(購自於 TCI)來替代 4-甲基苯胺，並且在 90
°C 下進行加熱迴流歷時 14 小時。標題化合物 12 藉由矽膠

管柱層析法(正己烷/乙酸乙酯=3:1)被純化而有如一黃色固體(208 mg, 產率 73%)。

標題化合物被測得之性質：

【0075】 Mp : 195-197°C。IR (KBr) : ν =3443 (NH), 2083 (C=C), 1636 (C=C), 1531 (NO₂), 1460 (C=C), 1340 (NO₂) cm⁻¹。 ¹H NMR (400 MHz, acetone-*d*₆) : δ =2.40 (s, 3H, CH₃), 7.21 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, ArH), 7.59 - 7.63 (m, 3H, ArH), 7.87 (dd, *J* = 1.2, 8.4 Hz, 1H, ArH), 8.13 (dd, *J* = 2.0, 8.4 Hz, 1H, ArH), 8.98 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, ArH), 9.91 (bs, 1H, NH)。 ¹³C NMR (100 MHz, acetone-*d*₆) : δ =21.9 (CH₃), 113.5 (CH), 117.8 (CH), 121.3 (CH), 122.3 (CH), 124.9 (CH), 128.8 (CH), 131.5 (CH), 132.1 (C), 134.4 (C), 143.6 (C), 150.4 (C), 151.6 (C), 161.9 (C)。 EIMS : *m/z* 285 [M⁺], 268, 238, 224, 212, 205, 180, 168, 121, 77, 63。關於 C₁₄H₁₁N₃O₂S 的 EI-HRMS 計算值 : 285.0572 ; 發現值 : 285.0573。關於 C₁₄H₁₁N₃O₂S 的分析計算值 : C, 58.93; H, 3.89; N, 14.73 ; 發現值 : C, 58.98; H, 3.93; N, 14.65。

**合成例 13. 2-(4-硝基苯胺基)-6-甲基苯并噻唑
[2-(4-nitroanilino)-6-methylbenzothiazole](化合物 13)**

【0076】 2-(4-硝基苯胺基)-6-甲基苯并噻唑(化合物 13)大體上是依據上面合成例 1 中所述的操作程序而被製得，不同之處在於：使用 138 mg 的 4-硝基苯胺(4-nitroaniline)(購自於 TCI)來替代 4-甲基苯胺，並且在 90

℃ 下進行加熱迴流歷時 14 小時。標題化合物 **13** 藉由矽膠管柱層析法(正己烷/乙酸乙酯=3:1)被純化而有如一橘色固體(211 mg, 產率 74%)。

標題化合物被測得之性質：

【0077】 Mp : 264-266°C。IR (KBr) : ν =3441 (NH), 2082 (C=C), 1637 (C=C), 1538 (C=C), 1481 (C=C) cm^{-1} 。 ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) : δ =2.39 (s, 3H, CH₃), 7.21 (dd, J = 1.6, 8.4 Hz, 1H, ArH), 7.60 (d, J = 8.4 Hz, 1H, ArH), 7.69 (d, J = 1.6 Hz, 1H, ArH), 7.99 (d, J = 9.2 Hz, 1H, ArH), 8.27 (d, J = 9.2 Hz, 1H, ArH), 11.16 (bs, 1H, NH)。 ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) : δ =20.9 (CH₃), 117.0 (CH), 119.7 (CH), 121.2 (CH), 125.5 (CH), 127.4 (CH), 130.4 (C), 132.7 (C), 140.8 (C), 146.5 (C), 149.4 (C), 159.9 (C)。EIMS : m/z 285 [M^+], 255, 238, 224, 212, 180, 168, 148, 121, 77, 63。關於 C₁₄H₁₁N₃O₂S 的 EI-HRMS 計算值 : 285.0572 ; 發現值 : 285.0571。關於 C₁₄H₁₁N₃O₂S 的分析計算值 : C, 58.93; H, 3.89; N, 14.73 ; 發現值 : C, 58.78; H, 3.88; N, 14.57。

合成例 14. 2-(2-羥基-4-硝基苯胺基)-6-甲基苯并噻唑

[2-(2-hydroxy-4-nitroanilino)-6-methylbenzothiazole](化合物 14)

【0078】 2-(2-羥基-4-硝基苯胺基)-6-甲基苯并噻唑(化合物 **14**)大體上是依據上面合成例 1 中所述的操作程序而被製得, 不同之處在於: 使用 154 mg 的 2-羥基-4-硝基苯胺(2-hydroxy-4-nitroaniline)(購自於 Aldrich)來替代 4-甲基苯

胺，並且在 90℃ 下進行加熱迴流歷時 16 小時。標題化合物 14 藉由矽膠管柱層析法(正己烷/乙酸乙酯=3:1)被純化而有如一黃色固體(205 mg, 產率 68%)。

標題化合物被測得之性質：

【0079】 Mp: 247-249°C。IR (KBr): ν =3438 (NH and OH), 2075 (C=C), 1633 (C=C), 1517 (NO₂), 1326 (NO₂) cm⁻¹。 ¹H NMR (400 MHz, acetone-*d*₆): δ =2.41 (s, 3H, CH₃), 7.23 (dd, *J* = 1.6, 8.4 Hz, 1H, ArH), 7.61 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H, ArH), 7.62 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, ArH), 7.78 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, ArH), 7.88 (dd, *J* = 2.4, 9.2 Hz, 1H, ArH), 8.86 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H, ArH), 9.55 (bs, 1H, NH), 10.19 (bs, 1H, OH)。 ¹³C NMR (100 MHz, acetone-*d*₆): δ =22.0 (CH₃), 110.8 (CH), 117.9 (CH), 118.9 (CH), 121.4 (CH), 122.3 (CH), 128.8 (CH), 132.7 (C), 134.6 (C), 137.2 (C), 143.3 (C), 146.8 (C), 151.1 (C), 162.0 (C)。 EIMS: *m/z* 301 [M⁺], 284, 255, 238, 226, 148, 137, 84, 70。關於 C₁₄H₁₁N₃O₃S 的 EI-HRMS 計算值: 301.0521; 發現值: 301.0523。關於 C₁₄H₁₁N₃O₃S · 0.15 H₂O 的分析計算值: C, 55.29; H, 3.75; N, 13.82; 發現值: C, 55.04; H, 3.80; N, 13.51。

合成例 15. 2-(4-羧基-2-羥基苯胺基)-6-甲基苯并噻唑

[2-(4-carboxyl-2-hydroxyanilino)-6-methylbenzothiazole](化合物 15)

【0080】 2-(4-羧基-2-羥基苯胺基)-6-甲基苯并噻唑(化合物 15)大體上是依據上面合成例 1 中所述的操作程序而被

製得，不同之處在於：使用 153 mg 的 4-羧基-2-羥基苯胺 (4-carboxyl-2-hydroxyaniline)(購自於 Lancaster)來替代 4-甲基苯胺，並且在 90°C 下進行加熱迴流歷時 16 小時。標題化合物 **15** 藉由矽膠管柱層析法(正己烷/乙酸乙酯=3:1)被純化而有如一深褐色固體(195 mg，產率 65%)。

標題化合物被測得之性質：

【0081】 Mp: 292-294°C. IR (KBr): ν =3435 (NH and OH), 2923 (CH), 2369 (C=C), 1690(COOH), 1581 (C=C), 1434 (C=C) cm^{-1} . ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ =2.37 (s, 3H, CH₃), 7.16 (dd, J = 1.2, 8.4 Hz, 1H, ArH), 7.49 (dd, J = 2.0, 8.4 Hz, 1H, ArH), 7.51 (d, J = 8.4 Hz, 1H, ArH), 7.52 (d, J = 2.0 Hz, 1H, ArH), 7.64 (d, J = 1.2 Hz, 1H, ArH), 8.50 (d, J = 8.4 Hz, 1H, ArH), 10.35 (bs, 1H, NH). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6): δ =20.9 (CH₃), 115.4 (CH), 118.5 (CH), 118.8 (CH), 121.1 (CH), 121.2 (CH), 124.8 (C), 127.1 (CH), 130.0 (C), 132.1 (C), 132.4 (C), 146.2 (C), 147.9 (C), 161.6 (C), 167.1 (C). EIMS: m/z 300 [M^+], 283, 278, 256, 239, 163, 137, 92. 關於 C₁₅H₁₂N₂O₃S 的 EI-HRMS 計算值: 300.0569; 發現值: 300.0566. 關於 C₁₅H₁₂N₂O₃S · 0.15 H₂O 的分析計算值: C, 59.44; H, 4.09; N, 9.24; 發現值: C, 59.24; H, 4.03; N, 9.16.

藥理實施例 (Pharmacological Examples):

【0082】 爲了決定本發明的化合物 **1-15** 的生物活性，下面的分析被執行。

一般實驗材料：

1. HCV 次基因體 - 複製體細胞株 (HCV subgenomic-replicon cell line)(亦即 Ava 5 細胞株)以及人類肝癌細胞株 (human hepatoma cell line)(亦即 Huh 7 細胞株)的來源與培養：

【0083】 在下面的實施例中所使用的 Ava 5 細胞株以及 Huh 7 細胞株皆是由美國洛克斐勒大學 (Rockefeller University, USA)的 Dr. Charles. Rice 所提供。

【0084】 這 2 種細胞分別依照下面表 2 所示的培養基以及培養條件而被培養於 10-cm 培養皿 (10-cm petri dish)中，並在培養箱中進行培養。之後，大約每隔 3 天更換新鮮的培養基。當細胞密度達到約 80%匯聚 (confluence)時，移除培養基並以磷酸鹽緩衝生理鹽水 (Phosphate Buffered Saline, PBS)來清洗細胞共計 2 次，接著加入胰蛋白酶-EDTA (trypsin-EDTA)(15400-054, Life Technologies)以使細胞自培養皿的底部脫離。之後，加入新鮮的培養基來中和胰蛋白酶的活性並以量吸管 (pipette)反覆地吸沖培養基以充分打散細胞，然後將所形成的細胞懸浮液分配到新的培養瓶中，並在培養箱中進行培養。

表 2. 2 種細胞所使用的培養基以及培養條件

細胞	培養基種類	培養條件
Ava 5 細胞株	杜貝可氏改良的依格氏培養基 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, DMEM)(12100-046, Life Technologies) [添加有 10% 熱去活化的胎牛血清 (Fetal Bovine Serum, FBS)(10437-028, Life Technologies)、5% 抗生素-抗黴劑 (antibiotic-antimycotic)(15240-062, Life Technologies)、5% 非必須胺基酸 (non-essential amino acids)(11140-050, Life Technologies)以及 1 mg/ml G418 (GDJ958, Bio Basic, Inc)]。	37°C 、 5% CO ₂
Huh 7 細胞株	杜貝可氏改良的依格氏培養基 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, DMEM)(12100-046, Life Technologies) [添加有 10% 熱去活化的胎牛血清 (10437-028, Life Technologies)、5% 抗 生素 - 抗黴劑 (15240-062, Life Technologies)、5% 非必須胺基酸 (11140-050, Life Technologies)。	37°C 、 5% CO ₂

2. 製備會表現 RNA-依賴型 RNA 聚合酶 (RNA-dependent RNA polymerase, RdRp) NS5B 的 Huh 7 細胞：

【0085】 有關會表現 RNA-依賴型 RNA 聚合酶 NS5B 的 Huh 7 細胞之製備是依據 Lee, J.C. *et al.* (2010), *Analytical biochemistry*, 403:52-62 當中所述的方法來進行。簡言之，將依據上面“一般實驗材料”的第 1 項「HCV 次基因體-複製體細胞株以及人類肝癌細胞株的來源與培養」來進行繼代

培養的 Huh 7 細胞以一為 5×10^4 細胞/井的數量培養於含有 1000 μL 的 DMEM (添加有 10% 熱去活化的 FBS、5% 抗生素-抗黴劑、5% 非必須胺基酸以及 1 mg/mL G418) 的 24-井培養盤 (24-well plate) 中，接著以 T-Pro 試劑 (T-Pro reagent)(Ji-Feng Biotechnology Co., Ltd. Taiwan) 來進行 pCMV-NS5B 質體 (pCMV-NS5B plasmid)(1 μg) 以及 p(+)Fluc-(-)UTR-Rluc 報導子質體 [p(+)Fluc-(-)UTR-Rluc reporter plasmid](1 μg) 的轉染 (transfection)，藉此而得到該會表現 RNA-依賴型 RNA 聚合酶 NS5B 的 Huh 7 細胞。

一般實驗方法：

1. 統計學分析 (statistical analysis)：

【0086】 在下面的實施例中，各組的實驗被重複 3 次，所得到的實驗數據是採用 GraphPad Prism (Version 5.0, SmartDrawNet) 統計軟體來進行統計分析，並以平均值 $\pm$ 標準偏差 (Standard Deviation, S.D.) 來表示。所有的數據是藉由史徒登氏 t-試驗 (Student's t-test) 來作分析，俾以評估各組之間的差異性。若所得到的統計分析結果是 $p < 0.05$ ，這表示有統計學顯著性 (statistical significance)。

藥理實驗 1. 本發明的化合物 1-15 在抗-HCV RNA 複製活性 (anti-HCV RNA replication activity) 上的效用評估

【0087】 爲了瞭解本發明的化合物 1-15 是否具有抗-HCV RNA 複製活性，本發明的化合物 1-15 被拿來進行 RNA-依賴型 RNA 聚合酶 (RNA-dependent RNA polymerase,

RdRp) NS5B mRNA 表現量的分析、細胞可活性分析 (cell viability analysis) 以及選擇指數 (selectivity index, SI) 的測定。

實驗方法：

A、RNA-依賴型 RNA 聚合酶 NS5B mRNA 表現量的分析：

【0088】 首先，將化合物 1-15 分別配於 100% DMSO，而得到化合物溶液 1-15 備用。接著，將依據上面“一般實驗材料”的第 1 項「HCV 次基因體-複製體細胞株以及人類肝癌細胞株的來源與培養」來進行繼代培養的 Ava 5 細胞以一為 5×10^4 細胞/井的數量培養於含有 1000 μL 的 DMEM (添加有 10% 熱去活化的 FBS、5% 抗生素-抗黴劑、5% 非必須胺基酸以及 1 mg/mL G418) 的 24-井培養盤中，之後分別加入 1 μL 的化合物溶液 1-15。另外，對照組是以 0.1% DMSO 來取代化合物溶液。

【0089】 所得到的細胞培養物在 37°C 下培養歷時 3 天之後，使用「定量即時聚合酶鏈反應 (quantitative real-time polymerase chain reaction) (以下簡稱“定量即時 PCR”)」來分析待測細胞的 RNA-依賴型 RNA 聚合酶 NS5B mRNA 的表現位準。有關定量即時 PCR 是依據下面所述方式來進行：首先，取 350 μL 的待測細胞培養物，接而使用 Trizol 試劑 (Trizol reagent) (Invitrogen, Carlsbad, CA) 並依據製造商所提供的操作指引來進行總 RNAs (total RNAs) 的萃取。由此所得到的總 RNAs 分別被拿來進行下面的反轉錄反應 (reverse transcription reaction) 以合成第一股 cDNA

(first-strand cDNA)。

【0090】 有關第一股 cDNA 的合成是使用 M-MLV 反轉錄酶套組 (M-MLV Reverse Transcriptase kit)(9PIM710, Promega)並且依據製造商所提供的操作指引來進行。簡言之,取 0.3 μg 的總 RNAs 並加入 2 μL 的寡(dT)引子 [oligo(dT) primer](10 μM), 之後加入 5 μL 的 M-MLV 5X 反應緩衝溶液、1 μL 的 dNTP (10 mM)以及 0.2 μL 的 M-MLV 反轉錄 (200 U/ μL), 繼而以焦碳酸二乙酯 (diethylpyrocarbonate, DEPC) 水將體積補足至 25 μL 並予以混合均勻。接著, 將所形成的混合物置於 42°C 水浴槽中作用歷時 60 分鐘, 繼而轉移至 72°C 下作用歷時 15 分鐘以終止酵素反應, 藉此而得到第一股 cDNA。

【0091】 接著, 以所得到的第一股 cDNA 作為模版 (template), 並且使用一組針對 NS5B 基因 (NCBI 登錄編號 AJ238799.1) 的核苷酸殘基位置 7649 至 7857 處所設計出的專一性引子對 (specific primer pair) NS5B-F 引子 (序列辨識編號: 1) 與 NS5B-R 引子 (序列辨識編號: 2) 來進行定量即時 PCR。另外, 甘油醛-3-磷酸去氫酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 的基因表現被使用作為內部對照組 (internal control)。有關該等引子對的相關資訊 (包括: 核苷酸序列、所擴增出的 PCR 產物大小、對應於標的基因的所在位置等) 已被整合於下面表 3 中。

【0092】 定量即時 PCR 是使用一 ABI StepOne™ 即時

PCR 系統 (ABI StepOne™ Real-Time PCR-System)(ABI Warrington, UK)並依據製造商的操作指引來執行，而有關定量即時 PCR 的操作條件與反應條件被顯示於下面的表 4 中。

表 3. 被用來進行定量即時 PCR 的引子

標的基因 (NCBI 登錄編號)	對應於標的基因內的核苷酸 殘基位置	引子	核苷酸序列 (5'→3')	PCR 產物 大小(bp)
NS5B (對應於 NCBI 登錄 編號 AJ238799.1)	7649-7668	前向引子 NS5B-F	ggaaaccaagctgcccatca (序列辨識編號：1)	209
	7857-7838	反向引子 NS5B-R	cctccacggatagaagtta (序列辨識編號：2)	
GAPDH (對應於 NCBI 登錄 編號 NM_002046.4)	475-494	前向引子 GAPDH-F	gtcttcaccacatggagaa (序列辨識編號：3)	242
	716-697	反向引子 GAPDH-R	atggcatggactgtggtcat (序列辨識編號：4)	

表 4. 定量即時 PCR 的反應條件

內 容 物	體 積 (μL)
第一股 cDNA (0.012 μg/μL)	2
前向引子 (10 μM)	0.75
反向引子 (10 μM)	0.75
2X Fast SYBR® Green Master Mix 預混合試劑 (Applied Biosystems)	5
DEPC 水	1.5
操作條件：在 98℃ 下進行變性反應(denaturation)歷時 10 分鐘； 接而進行 40 個循環如下：在 98℃ 下進行變性反應歷時 15 秒、在 60℃ 下進行引子黏合(primer annealing)以及延伸反應(extension) 歷時 60 秒。	

【0093】 由此所得到的 PCR 產物藉由 SYBR Green (雙股 DNA 結合染料)的螢光(fluorescence)來進行偵測，而分別得到各個 PCR 產物的循環閾值[cycle threshold (C_t) value]。相對的 mRNA 表現位準(relative mRNA expression level)是從各個 PCR 產物的循環閾值被計算出，並且使用比較性 C_t 方法(comparative C_t method)而以 GAPDH 基因所得到的 PCR 產物的循環閾值來予以標準化。接著，待測細胞的 RNA-依賴型 RNA 聚合酶 NS5B mRNA 的表現位準是以相對於對照組所具者的倍數而被計算出。

【0094】 化合物 1-15 抑制 50%的 RNA-依賴型 RNA 聚合酶 NS5B mRNA 的表現位準的濃度(EC_{50})是藉由計算待測化合物會降低 RNA-依賴型 RNA 聚合酶 NS5B mRNA 的表現位準達 50% (與對照組的細胞相較之下)的濃度而從曲線的線性部份被測定出。

B、細胞可活性分析：

【0095】 首先，將化合物 1-15 分別配於 100% DMSO，而得到化合物溶液 1-15 備用。接著，將依據上面“一般實驗材料”的第 1 項「HCV 次基因體-複製體細胞株以及人類肝癌細胞株的來源與培養」來進行繼代培養的 Ava 5 細胞以一為 5×10^3 細胞/井的數量培養於含有 100 μ L 的 DMEM (添加有 10%熱去活化的 FBS、5%抗生素-抗黴劑、5%非必須胺基酸以及 1 mg/mL G418)的 96-井培養盤(96-well plate)中，之後分別加入 1 μ L 的化合物溶液 1-15。另外，對照組是以 0.1% DMSO 來取代化合物溶液。

【0096】 所得到的細胞培養物在 37℃ 下培養歷時 3 天之後，使用「CellTiter 96® AQueous One Solution 細胞增生分析 (CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay)(Promega, WI, USA)」來評估化合物 1-15 對於 Ava 5 細胞的細胞毒性 (cytotoxicity)。有關 CellTiter 96® AQueous One Solution 細胞增生分析是依據製造商所提供的操作指引來進行，並略作修改。簡言之，移除各井的細胞培養物中的液體，之後加入 100 μL 的 DMEM 以及 20 μL 的 CellTiter 96® AQueous One Solution 試劑 (CellTiter 96® AQueous One Solution Reagent) {包含有 3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-5-(3-羧基甲氧基)-2-(4-磺基)-2H-四唑 [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulphophenyl)-2H-tetrazolium](MTS)，商品型號為 G3582，購自於 Promega} 並於 37℃ 下進行反應歷時 4 小時，繼而於 490 nm 的波長下以一分光光譜儀 (51118307, Thermo) 來讀取各井的吸光值 (OD₄₉₀)。

【0097】 細胞可活性百分比 (%) 是藉由將所測得的吸光值 (OD₄₉₀) 代入下列公式 (1) 而被計算出：

$$\text{公式 (1): } A = (B/C) \times 100$$

其中：A = 細胞可活性百分比 (%)

B = 待測細胞所測得的 OD₄₉₀ 吸光值

C = 對照組所測得的 OD₄₉₀ 吸光值

【0098】 化合物 1-15 抑制 50% 的細胞可活性的濃度 (CC₅₀) 是藉由計算待測化合物會降低細胞可活性達 50% (與

對照組的細胞相較之下)的濃度而從曲線的線性部份被測定出。

C、選擇指數(SI)的測定：

【0099】 選擇指數是藉由將化合物 **1-15** 抑制 50%的細胞可活性的濃度(CC₅₀)分別除以相對應的化合物 **1-15** 抑制 50%的 RNA-依賴型 RNA 聚合酶 NS5B mRNA 的表現位準的濃度(EC₅₀)而被計算出。選擇指數越高，代表該化合物具有越高的開發潛力。

結果：

【0100】 所得到的結果被顯示於下面的表 5 中。

表 5. 本發明的化合物 1-15 的抗-HCV RNA 複製活性之評估

化合物	EC ₅₀ (μM)	CC ₅₀ (μM)	選擇指數 (SI)
1	>200	160	<1
2	5	60	12
3	>200	140	<1
4	>200	321	<2
5	28	28	1
6	50	200	4
7	>200	145	<1
8	50	50	1
9	80	141	1.8
10	60	80	1.3
11	>200	168	<1
12	25	31	1.2
13	8	303	37.8
14	10	52	5.2
15	>200	400	<2

【0101】 從表 5 所示的結果可知，就 RNA-依賴型 RNA 聚合酶 NS5B mRNA 表現量而言，本發明的化合物 1-15 可以有效地抑制 RNA-依賴型 RNA 聚合酶 NS5B mRNA 的表現，其中又以化合物 2、12、13 以及 14 較佳(它們的 EC₅₀ 分別為 5、25、8 以及 10 μM)。就細胞可活性而言，本發明的化合物 4、6、13 以及 15 具有較低的細胞毒性(它們的 CC₅₀ 分別為 321、200、303 以及 400 μM)。就選擇指數而言，本

發明的化合物 2、6、13 以及 14 具有較高的 SI 值(分別為 12、4、37.8 以及 5.2)，其中又以化合物 13 的選擇指數最高。這個實驗結果顯示：本發明的具有化學式(I)的化合物具有優異的抗-HCV RNA 複製活性。而依據本實驗的結果，申請人進一步挑選出化合物 2、12、13 以及 14 並將它們拿來進行下面的實驗。

藥理實驗 2. 本發明的化合物 2、12、13 以及 14 在抑制 RNA-依賴型 RNA 聚合酶 NS5B 酵素活性 (enzyme activity) 上的效用評估

【0102】 爲了進一步瞭解本發明的化合物 2、12、13 以及 14 對於 RNA-依賴型 RNA 聚合酶 NS5B 的酵素活性的作用以及該作用與細胞毒性的關聯性，下面的實驗被進行。

實驗方法：

A、RNA-依賴型 RNA 聚合酶 NS5B 酵素活性的分析：

【0103】 首先，將化合物 2、12、13 以及 14 分別配於 100% DMSO，而得到化合物溶液 2、12、13 以及 14 備用。接著，將依據上面“一般實驗材料”的第 2 項「製備會表現 RNA-依賴型 RNA 聚合酶 NS5B 的 Huh 7 細胞」所得到的會表現 RNA-依賴型 RNA 聚合酶 NS5B 的 Huh 7 細胞以一爲 5×10^4 細胞/井的數量培養於含有 1000 μ L 的 DMEM (添加有 10% 熱去活化的 FBS、5% 抗生素-抗黴劑、5% 非必須胺基酸以及 1 mg/mL G418) 的 24-井培養盤中，之後分別加入適量的化合物溶液 2、12、13 以及 14，而使得所形成的細胞培養物分別具有一最終濃度爲 5 μ M 以及 20 μ M 的化合物 2、12、

13 以及 14。另外，對照組是以 0.1% DMSO 來取代化合物溶液。

【0104】 所得到的細胞培養物在 37℃ 下培養歷時 4 天之後，使用「Dual-Glo[®] 螢光酵素分析系統 (Dual-Glo[®] Luciferase Assay System)(Promega, WI, USA)」來分析 RNA-依賴型 RNA 聚合酶 NS5B 的酵素活性。有關 Dual-Glo[®] 螢光酵素分析系統是依據製造商所提供的操作指引來進行，並略作修改。簡言之，將 75 μL 的 Dual-Glo[®] 螢光酵素試劑 (Dual-Glo[®] luciferase reagent)(Promega, WI, USA) 分別加入各個待測細胞培養物中並於 37℃ 下進行反應歷時 5 分鐘，繼而以一冷光光亮度計 (luminometer)(LB962, BERTHOLD/Germany) 來測量螢火蟲冷光 (firefly luminescence)。之後，將 75 μL 的 Dual-Glo[®] Stop & Glo[®] 試劑 (Dual-Glo[®] Stop & Glo[®] reagent)(Promega, WI, USA) 分別加入各個已被添加 Dual-Glo[®] 螢光酵素試劑的待測細胞培養物中並於 37℃ 下進行反應歷時 5 分鐘，接而以該冷光光亮度計來測量水母冷光 (*Renilla* luminescence)。各個待測細胞所測得的水母冷光是藉由將之除以相對應的螢火蟲冷光來予以標準化。

【0105】 RNA-依賴型 RNA 聚合酶 NS5B 的相對活性百分比 (%) 是藉由將經標準化的水母冷光代入下列公式 (2) 而被計算出：

$$\text{公式 (2): } D = (E/F) \times 100$$

其中：D=RNA-依賴型 RNA 聚合酶 NS5B 的相對

活性百分比(%)

E=待測細胞的經標準化的水母冷光

F=對照組的經標準化的水母冷光

【0106】 RNA-依賴型 RNA 聚合酶 NS5B 的抑制百分比(%)
是藉由將所測得的 RNA-依賴型 RNA 聚合酶 NS5B 的相對活性百分比代入下列公式(3)而被計算出：

$$\text{公式(3): } G = (1 - H) \times 100$$

其中：G=RNA-依賴型 RNA 聚合酶 NS5B 的抑制百分比(%)

H=RNA-依賴型 RNA 聚合酶 NS5B 的相對活性百分比

B、細胞可活性分析：

【0107】 首先，將化合物 2、12、13 以及 14 分別配於 100% DMSO，而得到化合物溶液 2、12、13 以及 14 備用。接著，將依據上面“一般實驗材料”的第 2 項「製備會表現 RNA-依賴型 RNA 聚合酶 NS5B 的 Huh 7 細胞」所得到的會表現 RNA-依賴型 RNA 聚合酶 NS5B 的 Huh 7 細胞以一為 5×10^3 細胞/井的數量培養於含有 100 μ L 的 DMEM (添加有 10%熱去活化的 FBS、5%抗生素-抗黴劑、5%非必須胺基酸以及 1 mg/mL G418)的 96-井培養盤中，之後分別加入 1 μ L 的化合物溶液 2、12、13 以及 14。另外，對照組是以 0.1% DMSO 來取代化合物溶液。

【0108】 所得到的細胞培養物在 37℃ 下培養歷時 3 天之後，依據上面“藥理實驗 1”的第 B 項「細胞可活性分析」當

中所述的「CellTiter 96® AQueous One Solution 細胞增生分析」來評估化合物 2、12、13 以及 14 對於會表現 RNA-依賴型 RNA 聚合酶 NS5B 的 Huh 7 細胞的細胞毒性。

【0109】 化合物 2、12、13 以及 14 抑制 50%的細胞可活性的濃度(CC₅₀)是藉由計算待測化合物會降低細胞可活性達 50% (與對照組的細胞相較之下)的濃度而從曲線的線性部份被測定出。

結果：

【0110】 所得到的結果被顯示於下面的表 6 中。

表 6. 化合物 2、12、13 以及 14 在抑制 RNA-依賴型 RNA 聚合酶 NS5B 酵素活性上的評估

化合物	RNA-依賴型 RNA 聚合酶 NS5B 的抑制百分比 (%)		CC ₅₀ (μM)
	5 μM	20 μM	
2	45	85	65
12	12	38	40
13	32	76	>200
14	23	66	60

【0111】 從表 6 所示的結果可知，本發明的化合物 2、12、13 以及 14 皆可以抑制 RNA-依賴型 RNA 聚合酶 NS5B 的酵素活性。特別地，化合物 2 以及 13 在一為 20 μM 的濃度下對於 RNA-依賴型 RNA 聚合酶 NS5B 會展現出一優異的抑制活性(這 2 個化合物的抑制百分比皆大於 75%)。此外，本發明的化合物 13 在一為 20 μM 的濃度下對於會表現

RNA-依賴型 RNA 聚合酶 NS5B 的 Huh 7 細胞具有一最低的細胞毒性(它的 CC_{50} 是大於 $200\ \mu\text{M}$)。這個實驗結果顯示：本發明的具有化學式(I)之化合物會藉由抑制 RNA-依賴型 RNA 聚合酶 NS5B 的酵素活性來達到抗-HCV 的效用，並且不會有明顯毒殺細胞的現象。而依據本實驗的結果，申請人進一步挑選出化合物 13 並將它拿來進行下面的實驗。

藥理實驗 3. 本發明的化合物 13 在不同濃度下對於 RNA-依賴型 RNA 聚合酶 NS5B 的酵素活性與表現的影響

【0112】 爲了瞭解本發明的化合物 13 在不同濃度下對於 RNA-依賴型 RNA 聚合酶 NS5B 的酵素活性與表現(包括 mRNA 以及蛋白質表現)的影響，下面的實驗被進行。

實驗方法：

A、RNA-依賴型 RNA 聚合酶 NS5B 的酵素活性的分析：

【0113】 首先，將化合物 13 配於 100% DMSO，而得到化合物溶液 13 備用。接著，將依據上面“一般實驗材料”的第 2 項「製備會表現 RNA-依賴型 RNA 聚合酶 NS5B 的 Huh 7 細胞」所得到的會表現 RNA-依賴型 RNA 聚合酶 NS5B 的 Huh 7 細胞分成 6 組，其中包括 1 個對照組(control)、1 個正對照組(positive control)以及 4 個實驗組(亦即實驗組 1 至 4)。將各組細胞分別以一爲 5×10^4 細胞/井的數量培養於含有 $1000\ \mu\text{L}$ 的 DMEM (添加有 10%熱去活化的 FBS、5% 抗生素-抗黴劑、5%非必須胺基酸以及 $1\ \text{mg/mL}$ G418)的 24-井培養盤中，之後將適量的化合物溶液 13 分別添加至實驗

組 1 至 4 的細胞培養物中，而使得實驗組 1 至 4 分別具有一最終濃度為 2.5、5、10 以及 20 μM 的化合物 13。另外，正對照組的細胞培養物被添加以已知的 RNA-依賴型 RNA 聚合酶 NS5B 抑制劑--VX-222 (Selleck, USA)至一最終濃度為 10 μM ，而對照組的細胞培養物被添加以 1 μL 的 DMSO 至一最終濃度為 0.1%。

【0114】 各組細胞培養物在 37°C 下培養歷時 4 天之後，使用上面“藥理實驗 2”的第 A 項「RNA-依賴型 RNA 聚合酶 NS5B 酵素活性的分析」當中所述的「Dual-Glo®螢光酵素分析系統」來分析 RNA-依賴型 RNA 聚合酶 NS5B 的酵素活性並計算出各組的 RNA-依賴型 RNA 聚合酶 NS5B 的相對活性百分比。

B、RNA-依賴型 RNA 聚合酶 NS5B 蛋白質表現量的分析：

【0115】 首先，將依據上面“一般實驗材料”的第 1 項「HCV 次基因體-複製體細胞株以及人類肝癌細胞株的來源與培養」來進行繼代培養的 Ava 5 細胞分成 6 組，其中包括 1 個對照組、1 個 IFN- α 組以及 4 個實驗組(亦即實驗組 1 至 4)。將各組細胞分別以一為 5×10^4 細胞/井的數量培養於含有 1000 μL 的 DMEM (添加有 10%熱去活化的 FBS、5%抗生素-抗黴劑、5%非必須胺基酸以及 1 mg/mL G418) 的 24-井培養盤中。之後，將適量之依據上面第 A 項所得到的化合物溶液 13 分別添加至實驗組 1 至 4 的細胞培養物中，而使得實驗組 1 至 4 分別具有一最終濃度為 2.5、5、10 以及 20 μM 的化合物 13。另外，IFN- α 組的細胞培養物

被添加以干擾素- α (interferon- α , IFN- α)(Roche)至一最終濃度為 100 U/mL，而對照組的細胞培養物被添加以 1 μ L 的 DMSO 至一最終濃度為 0.1%。

【0116】 接著，各組細胞在 37°C 下培養歷時 3 天之後，收取細胞培養物並分別加入 55 μ L 的 RIPA 緩衝液(含有 50 mM Tris-HCl、5 mM EDTA、150 mM NaCl、2% SDS 以及 1% NP-40，pH=7.5)，繼而予以混合均勻。將所形成的細胞混合物置於微量離心管中，然後置於冰上靜置歷時 10 分鐘。接著，於 4°C 下以 13200 rpm 進行離心歷時 60 分鐘後，收集上澄液並以此作為一蛋白質樣品。

【0117】 之後，各組細胞的蛋白質樣品是採用熟習此項技藝者所詳知且慣用的技術來進行 SDS-聚丙稀醯胺凝膠電泳 (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)分析以及 RNA-依賴型 RNA 聚合酶 NS5B 的西方墨點分析(Western Blotting)。另外，甘油醛 -3- 磷酸 去 氫 酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)被用來作為內部對照組(internal control)。

【0118】 有關 SDS-聚丙稀醯胺凝膠電泳分析以及西方墨點分析所使用的儀器與試劑分別如下所述：

(1) SDS-PAGE 分析是使用蛋白質電泳裝置 (Mini-PROTEAN[®] Tetra Cell#165-8001, Bio-Rad)來進行。

(2) 蛋白質轉印 (protein transfer)是使用轉漬電泳槽

(Trans-Blot)(TANON VE-186) 以及 聚 二 氟 乙 烯 (PVDF) 膜 [polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane]來進行。

- (3) 在西方墨點分析中，針對 RNA-依賴型 RNA 聚合酶 NS5B 蛋白質所使用的一次抗體(primary antibody)以及二次抗體(secondary antibody)被顯示於下面表 7 中。

表 7. 用於進行西方墨點分析的一次抗體與二次抗體

蛋白質	一次抗體	二次抗體
RNA- 依 賴 型 RNA 聚 合 酶 NS5B	兔子抗 RNA-依 賴 型 RNA 聚 合 酶 NS5B 多 株 抗 體 (rabbit anti RNA-dependent RNA polymerase NS5B polyclonal antibody)(Abcam, Cat. No. ab35586)	山羊抗 兔子 IgG- 辣 根 過 氧 化 氫 酶 (HRP) 抗 體 [Goat anti rabbit IgG-horseradish peroxidase (HRP) antibody](Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., Cat. No. 111-035-003)
GAPDH	兔子抗 GAPDH 多株 抗 體 (rabbit anti GAPDH polyclonal antibody)(GeneTex, Cat. No. GTX100118)	山羊抗 兔子 IgG- 辣 根 過 氧 化 氫 酶 抗 體 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., Cat. No. 111-035-003)

(4) 化學發光染色(chemiluminescence staining)是使用
一 ECL 偵測套組(ECL detection kit)(PerkinElmer,
CT, USA)來偵測訊號。

C、RNA-依賴型 RNA 聚合酶 NS5B mRNA 表現量的分析：

【0119】 首先，將依據上面“一般實驗材料”的第 1 項
「HCV 次基因體-複製體細胞株以及人類肝癌細胞株的來
源與培養」來進行繼代培養的 Ava 5 細胞分成 5 組，其中
包括 1 個對照組以及 4 個實驗組(亦即實驗組 1 至 4)。將各
組細胞分別以一為 5×10^4 細胞/井的數量培養於含有 1000
 μL 的 DMEM (添加有 10%熱去活化的 FBS、5%抗生素-抗黴

劑、5%非必須胺基酸以及 1 mg/mL G418)的 24-井培養盤中。之後，將適量之依據上面第 A 項所得到的化合物溶液 13 分別添加至實驗組 1 至 4 的細胞培養物中，而使得實驗組 1 至 4 分別具有一最終濃度為 2.5、5、10 以及 20 μ M 的化合物 13。另外，對照組的細胞培養物被添加以 1 μ L 的 DMSO 至一最終濃度為 0.1%。

【0120】各組細胞培養物在 37°C 下培養歷時 3 天之後，使用上面“藥理實驗 1”的第 A 項「RNA-依賴型 RNA 聚合酶 NS5B mRNA 表現量的分析」當中所述的「定量即時 PCR」來分析 RNA-依賴型 RNA 聚合酶 NS5B mRNA 的表現位準。

結果：

A、RNA-依賴型 RNA 聚合酶 NS5B 的酵素活性的分析：

【0121】圖 1 顯示會表現 RNA-依賴型 RNA 聚合酶 NS5B 的 Huh 7 細胞在以不同濃度的化合物 13 予以處理後所測得的 RNA-依賴型 RNA 聚合酶 NS5B 的相對活性百分比。由圖 1 可見，正對照組的 RNA-依賴型 RNA 聚合酶 NS5B 的相對活性百分比是顯著地低於對照組所具者，這表示 VX-222 會有效地抑制 NS5B 的酵素活性。而與對照組相較之下，實驗組 1 至 4 的 RNA-依賴型 RNA 聚合酶 NS5B 的相對活性百分比皆有呈現下降的情形，並且會隨著化合物 13 之濃度的增加而更趨於明顯。特別地，實驗組 4 的 RNA-依賴型 RNA 聚合酶 NS5B 的相對活性百分比是近似於正對照組所具者。這個實驗結果顯示：本發明的化合物 13 能夠有效地降低上述 Huh 7 細胞的 RNA-依賴型 RNA 聚合酶 NS5B 的酵素

活性。

B、 RNA-依賴型 RNA 聚合酶 NS5B 蛋白質表現量的分析：

【0122】 圖 2 是一西方墨點分析圖，其顯示 Ava 5 細胞在以不同濃度的化合物 13 予以處理後所測得的 RNA-依賴型 RNA 聚合酶 NS5B 的表現情形。由圖 2 可見，與對照組相較之下，實驗組 1 至 4 的 RNA-依賴型 RNA 聚合酶 NS5B 的表現量皆呈現下降的情形，同時會隨著化合物 13 之濃度的增加而更趨於明顯。這個實驗結果顯示：本發明的化合物 13 能夠有效地降低 Ava 5 細胞的 RNA-依賴型 RNA 聚合酶 NS5B 的蛋白質表現量。

C、 RNA-依賴型 RNA 聚合酶 NS5B mRNA 表現量的分析：

【0123】 圖 3 顯示 Ava 5 細胞在以不同濃度的化合物 13 予以處理後所測得的 RNA-依賴型 RNA 聚合酶 NS5B 的 mRNA 表現量。由圖 3 可見，與對照組相較之下，實驗組 1 至 4 的 RNA-依賴型 RNA 聚合酶 NS5B 的 mRNA 表現量皆呈現下降的情形，同時會隨著化合物 13 之濃度的增加而更趨於明顯。這個實驗結果顯示：本發明的化合物 13 能夠有效地降低 Ava 5 細胞的 RNA-依賴型 RNA 聚合酶 NS5B 的 mRNA 表現量。

【0124】 綜合以上的實驗結果，申請人推論：本發明的化合物 13 能夠藉由抑制 RNA-依賴型 RNA 聚合酶 NS5B 的 mRNA 表現來減少其蛋白質的轉譯生成，並且會抑制 RNA-依賴型 RNA 聚合酶 NS5B 的酵素活性，因而能有效地抑制 HCV 的複製。

藥理實驗 4. 本發明的化合物 13 與抗-HCV 藥物的組合在抑制 RNA-依賴型 RNA 聚合酶 NS5B 的 mRNA 表現量上的效用評估

【0125】 爲了瞭解本發明的化合物 13 與已知的抗-HCV 藥物[亦即 IFN- α 、特拉匹韋(telaprevir)、PSI-7977 (亦即 sofosbuvir)(Sovaldi™, Gilead Sciences)以及 BMS790052]的組合是否能夠抑制 RNA-依賴型 RNA 聚合酶 NS5B 的 mRNA 表現量，下面的實驗被進行。

實驗方法：

【0126】 首先，將化合物 13、IFN- α 、特拉匹韋、PSI-7977、BMS790052 以及化合物 13 與上述 4 種已知的抗-HCV 藥物中任一者的組合依據下面表 8 所示者來配製成 5 種單一藥物溶液(亦即單一藥物溶液 1 至 5)以及 4 種組合藥物溶液(亦即組合藥物溶液 1 至 4)。

表 8. 單一藥物溶液 1 至 5 以及組合藥物溶液 1 至 4 所含有的化合物

藥物溶液	所含有的化合物
單一藥物溶液 1	化合物 13
單一藥物溶液 2	IFN- α
單一藥物溶液 3	特拉匹韋
單一藥物溶液 4	PSI-7977
單一藥物溶液 5	BMS790052
組合藥物溶液 1	化合物 13 + IFN- α
組合藥物溶液 2	化合物 13 + 特拉匹韋
組合藥物溶液 3	化合物 13 + PSI-7977
組合藥物溶液 4	化合物 13 + BMS790052

【0127】 接著，將依據上面“一般實驗材料”的第 1 項「HCV 次基因體-複製體細胞株以及人類肝癌細胞株的來源與培養」來進行繼代培養的 Ava 5 細胞以一為 5×10^4 細胞/井的數量培養於含有 100 μL 的 DMEM (添加有 10% 熱去活化的 FBS、5% 抗生素-抗黴劑、5% 非必須胺基酸以及 1 mg/mL G418) 的 24-井培養盤中，之後分別加入 1 μL 的如上面表 8 中所示的藥物溶液。另外，對照組是以 0.1% DMSO 來取代藥物溶液。

【0128】 所得到的細胞培養物在 37°C 下培養歷時 3 天之後，使用上面“藥理實驗 1”的第 A 項「RNA-依賴型 RNA 聚合酶 NS5B mRNA 表現量的分析」當中所述的「定量即時 PCR」來分析 RNA-依賴型 RNA 聚合酶 NS5B mRNA 的表現位準。之後，單一藥物溶液 1 至 5 分別抑制 50%、75% 以及 90% RNA-依賴型 RNA 聚合酶 NS5B mRNA 的表現位準的有效劑量 (分別以 ED_{50} 、 ED_{75} 以及 ED_{90} 來表示) 以及組合藥物溶液 1 至 4 當中的化合物 13 與上述 4 種已知的抗-HCV 藥物中任一者的 ED_{50} 、 ED_{75} 以及 ED_{90} 分別被計算出。

【0129】 Ava 5 細胞在以組合藥物溶液 1 至 4 中任一者予以處理後在 ED_{50} 、 ED_{75} 以及 ED_{90} 下所測得的組合指數數值 (CI 數值) (combination index values, CI values) 是藉由使用 CalcuSyn 軟體 (Biosoft, Cambridge, UK) 來將單一藥物溶液 1 至 5 的 ED_{50} 、 ED_{75} 與 ED_{90} 以及組合藥物溶液 1 至 4 當中的化合物 13 與上述 4 種已知的抗-HCV 藥物中任一者的 ED_{50} 、 ED_{75} 與 ED_{90} 進行運算而被計算出。

【0130】 當 CI 數值 < 1 時，代表化合物 13 與已知的抗-HCV 藥物的組合具有一協同效應(synergistic effect)；當 CI 數值 $= 1$ 時，代表化合物 13 與已知的抗-HCV 藥物的組合具有一加成效應(additive effect)；當 CI 數值 > 1 時，代表化合物 13 與已知的抗-HCV 藥物的組合具有一拮抗效應(antagonistic effect)。

結果：

【0131】 下面表 9 顯示 Ava 5 細胞在以組合藥物溶液 1 至 4 中任一者予以處理後在 ED₅₀、ED₇₅ 以及 ED₉₀ 下所測得的 CI 數值。由表 9 可見，被處理以組合藥物溶液 1 至 4 中任一者的 Ava 5 細胞在 ED₅₀、ED₇₅ 以及 ED₉₀ 下所測得的 CI 數值皆小於 1。這個實驗結果顯示：本發明的化合物 13 與已知的抗-HCV 藥物的組合在抑制 RNA-依賴型 RNA 聚合酶 NS5B 的 mRNA 表現量上皆具有一協同效應。

表 9. Ava 5 細胞在以組合藥物溶液 1 至 4 中任一者予以處理後在 ED₅₀、ED₇₅ 以及 ED₉₀ 下所測得的 CI 數值

被用來處理細胞的組合藥物溶液	CI 數值		
	ED ₅₀	ED ₇₅	ED ₉₀
組合藥物溶液 1	0.7	0.6	0.5
組合藥物溶液 2	0.7	0.5	0.4
組合藥物溶液 3	0.9	0.8	0.7
組合藥物溶液 4	0.5	0.4	0.3

【0132】 於本說明書中被引述之所有專利和文獻以其整

體被併入本案作為參考資料。若有所衝突時，本案詳細說明(包含界定在內)將佔上風。

【0133】雖然本發明已參考上述特定的具體例被描述，明顯地在不背離本發明之範圍和精神之下可作出很多的修改和變化。因此意欲的是，本發明僅受如隨文檢附之申請專利範圍所示者之限制。

【符號說明】

(無)

【生物材料寄存】

國內寄存資訊【請依：寄存機構、日期、號碼順序註記】

(無)

國外寄存資訊【請依：寄存國家、機構、日期、號碼順序註記】

(無)

【序列表】

<110> 高雄醫學大學
<120> 2-苯胺基-6-甲基苯并噻唑衍生物及其製備方法與用途
<130> 用於定量即時 PCR 的引子
<160> 4
<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工的序列
<220>
<223> 用於定量即時 PCR 的 NS5B 基因的前向引子 NS5B-F
<400> 1
ggaaaccaag ctgcccattca

20

<210> 2
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工的序列
<220>
<223> 用於定量即時 PCR 的 NS5B 基因的反向引子 NS5B-R
<400> 2
cctccacgga tagaagttta

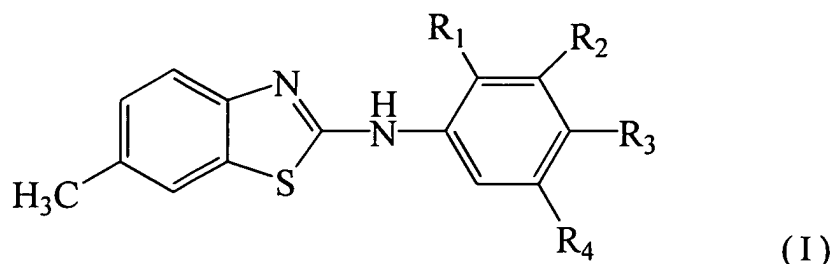
20

<210> 3
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工的序列
<220>
<223> 用於定量即時 PCR 的 GAPDH 基因的前向引子 GAPDH-F
<400> 3
gtcttcacca ccatggagaa 20

<210> 4
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工的序列
<220>
<223> 用於定量即時 PCR 的 GAPDH 基因的反向引子 GAPDH-R
<400> 4
atggcatgga ctgtggtcat 20

申請專利範圍

1. 一種具有下列化學式 (I) 的化合物：



或者它的一藥學上可接受的鹽類，其中：

R_1 、 R_2 、 R_3 以及 R_4 是獨立地選自於由下列所構成的群組：氫、鹵素、 C_1 - C_6 烷基基團、 C_1 - C_6 烷氧基基團、苯基 C_1 - C_6 烷氧基基團、硝基、羥基以及羧基；

但有條件是： R_1 、 R_2 、 R_3 以及 R_4 不同時為氫；

當 R_1 、 R_2 以及 R_4 為氫時， R_3 不為氫、溴、硝基或者甲氧基；

當 R_1 、 R_3 以及 R_4 為氫時， R_2 不為硝基；以及

當 R_1 為甲氧基，以及 R_2 與 R_4 為氫時， R_3 不為氫或者溴。

2. 如請求項 1 的化合物，其中：

R_1 、 R_2 以及 R_3 是獨立地選自於由下列所構成的群組：氫、氯、溴、甲基、甲氧基、苯基甲氧基、硝基、羥基以及羧基；以及

R_4 是選自於由下列所構成的群組：氫、甲基以及甲氧基。

3. 如請求項 1 的化合物，它是選自於由下列所構成的群組：

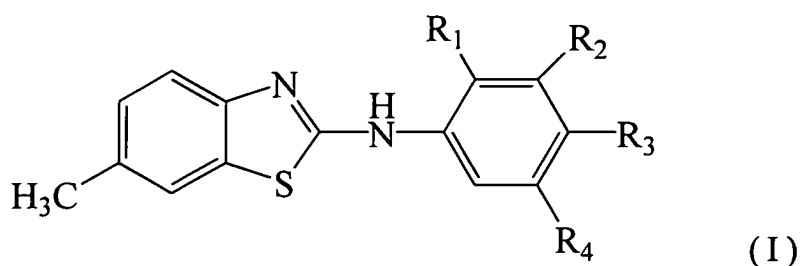
2-(4-甲基苯胺基)-6-甲基苯并噻唑；

2-(2,4-二甲基苯胺基)-6-甲基苯并噻唑；

- 2-(3,5-二甲基苯胺基)-6-甲基苯并噻唑；
- 2-(3,5-二甲氧基苯胺基)-6-甲基苯并噻唑；
- 2-(3,4,5-三甲氧基苯胺基)-6-甲基苯并噻唑；
- 2-(2-苯甲氧基苯胺基)-6-甲基苯并噻唑；
- 2-(3-苯甲氧基苯胺基)-6-甲基苯并噻唑；
- 2-(4-苯甲氧基苯胺基)-6-甲基苯并噻唑；
- 2-(4-溴-2-氯苯胺基)-6-甲基苯并噻唑；
- 2-(2-羥基-4-硝基苯胺基)-6-甲基苯并噻唑；以及
- 2-(4-羧基-2-羥基苯胺基)-6-甲基苯并噻唑。
4. 一種用於治療 C 型肝炎的藥學組成物，其包含有一如請求項 1 中所界定的具有化學式(I)的化合物或者它的一藥學上可接受的鹽類。
5. 如請求項 4 的藥學組成物，其中該具有化學式(I)的化合物是選自於由下列所構成的群組：
- 2-(4-甲基苯胺基)-6-甲基苯并噻唑；
- 2-(2,4-二甲基苯胺基)-6-甲基苯并噻唑；
- 2-(3,5-二甲基苯胺基)-6-甲基苯并噻唑；
- 2-(3,5-二甲氧基苯胺基)-6-甲基苯并噻唑；
- 2-(3,4,5-三甲氧基苯胺基)-6-甲基苯并噻唑；
- 2-(2-苯甲氧基苯胺基)-6-甲基苯并噻唑；
- 2-(3-苯甲氧基苯胺基)-6-甲基苯并噻唑；
- 2-(4-苯甲氧基苯胺基)-6-甲基苯并噻唑；
- 2-(4-溴-2-氯苯胺基)-6-甲基苯并噻唑；
- 2-(2-羥基-4-硝基苯胺基)-6-甲基苯并噻唑；以及

2-(4-羧基-2-羥基苯胺基)-6-甲基苯并噻唑。

6. 一種具有下列化學式(I)的化合物或者它的一藥學上可接受的鹽類供應用於製備一用來治療 C 型肝炎之醫藥品的用途：

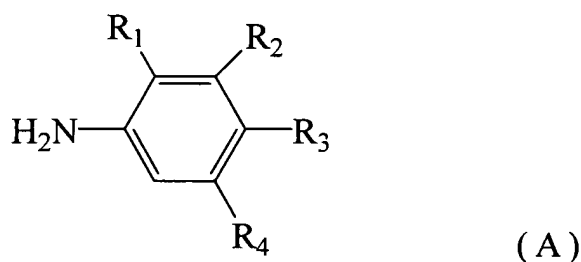


其中， R_1 、 R_2 、 R_3 以及 R_4 是獨立地選自於由下列所構成的群組：氫、鹵素、 C_1 - C_6 烷基基團、 C_1 - C_6 烷氧基基團、苯基 C_1 - C_6 烷氧基基團、硝基、羥基以及羧基。

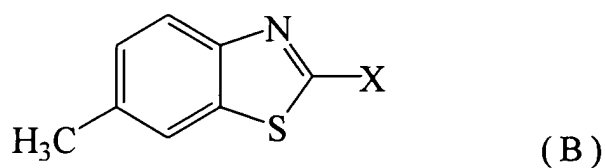
7. 如請求項 6 的用途，其中該具有化學式(I)的化合物是選自於由下列所構成的群組：

2-(4-甲基苯胺基)-6-甲基苯并噻唑；
 2-(2,4-二甲基苯胺基)-6-甲基苯并噻唑；
 2-(3,5-二甲基苯胺基)-6-甲基苯并噻唑；
 2-(4-甲氧基苯胺基)-6-甲基苯并噻唑；
 2-(3,5-二甲氧基苯胺基)-6-甲基苯并噻唑；
 2-(3,4,5-三甲氧基苯胺基)-6-甲基苯并噻唑；
 2-(2-苯甲氧基苯胺基)-6-甲基苯并噻唑；
 2-(3-苯甲氧基苯胺基)-6-甲基苯并噻唑；
 2-(4-苯甲氧基苯胺基)-6-甲基苯并噻唑；
 2-(4-氯苯胺基)-6-甲基苯并噻唑；
 2-(4-溴-2-氯苯胺基)-6-甲基苯并噻唑；

- 2-(3-硝基苯胺基)-6-甲基苯并噻唑；
 2-(4-硝基苯胺基)-6-甲基苯并噻唑；
 2-(2-羥基-4-硝基苯胺基)-6-甲基苯并噻唑；以及
 2-(4-羧基-2-羥基苯胺基)-6-甲基苯并噻唑。
8. 如請求項 7 的用途，其中該具有化學式(I)的化合物是
 2-(4-硝基苯胺基)-6-甲基苯并噻唑。
9. 一種用於製備一如請求項 1 中所界定的具有化學式(I)
 的化合物的方法，其包含有令一具有下列化學式(A)的
 化合物：



其中，該等 R_1 、 R_2 、 R_3 以及 R_4 基團具有相同於那些在請求項 1 中所界定的定義，
 與一具有下列化學式(B)的化合物相反應：



其中，X 選自於 Cl、Br 或 I。

圖式

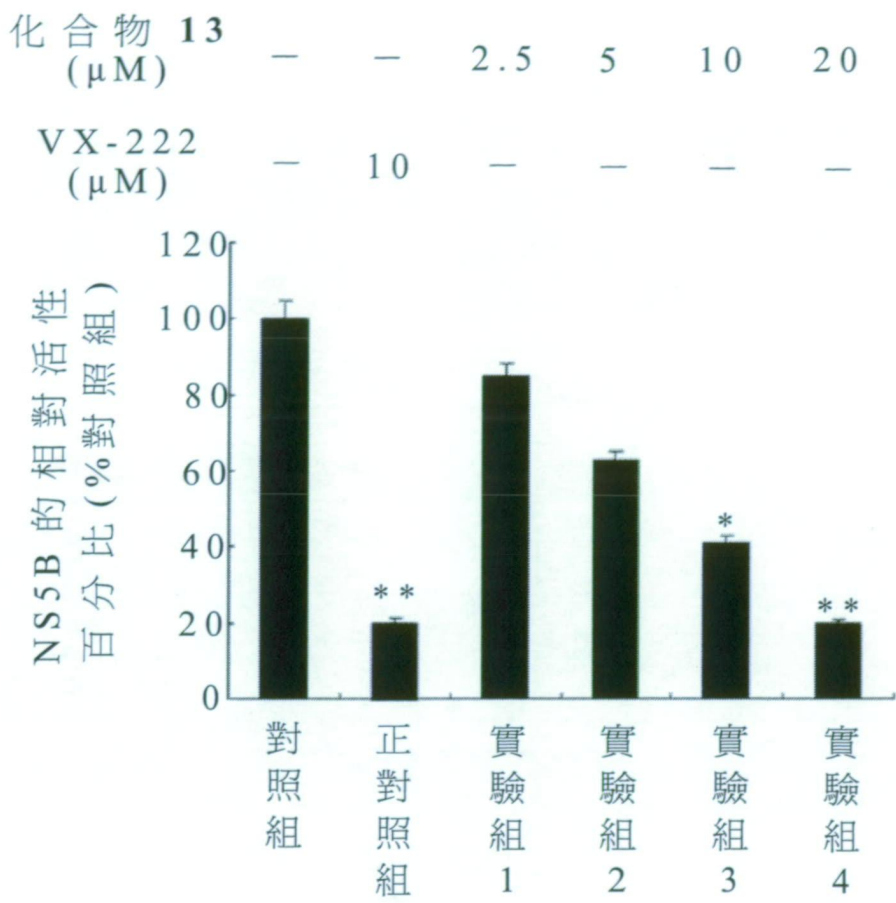


圖 1

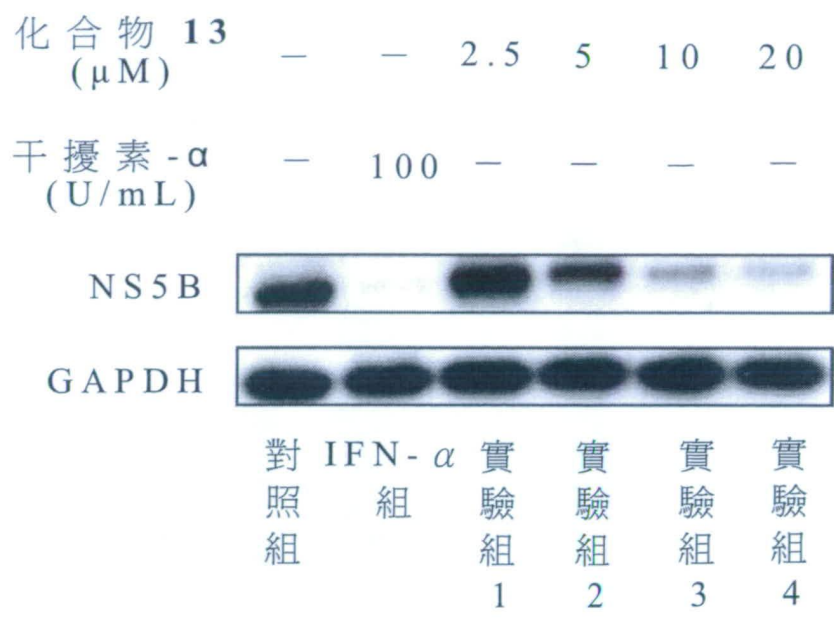


圖 2

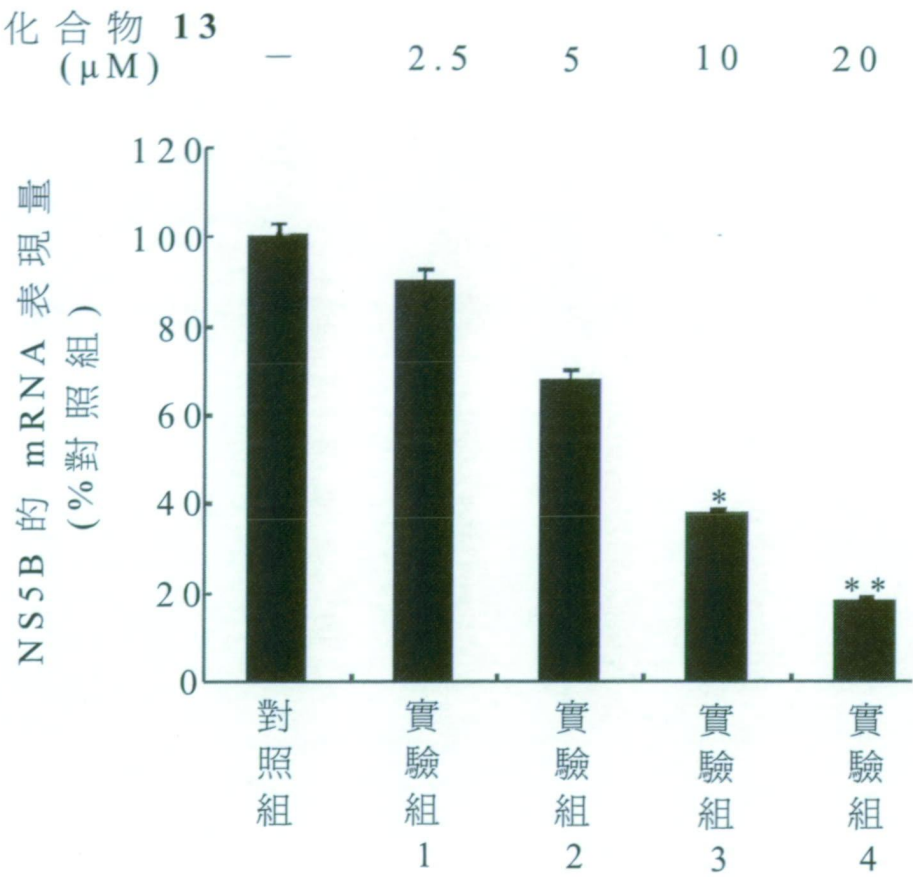


圖 3