

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200580045889.4

[51] Int. Cl.

C07D 241/04 (2006.01)

C07D 403/12 (2006.01)

C07D 401/06 (2006.01)

C07K 16/36 (2006.01)

C07D 401/14 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

[43] 公开日 2007年12月26日

[11] 公开号 CN 101094841A

[22] 申请日 2005.11.11

[21] 申请号 200580045889.4

[30] 优先权

[32] 2004.11.12 [33] US [31] 10/988,477

[86] 国际申请 PCT/EP2005/012085 2005.11.11

[87] 国际公布 WO2006/050964 英 2006.5.18

[85] 进入国家阶段日期 2007.7.4

[71] 申请人 霍夫曼-拉罗奇有限公司

地址 瑞士巴塞尔

[72] 发明人 M·戈沙尔 G·西格勒

A·P·帕特沃德汉

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 刘冬 李连涛

权利要求书9页 说明书35页 附图12页

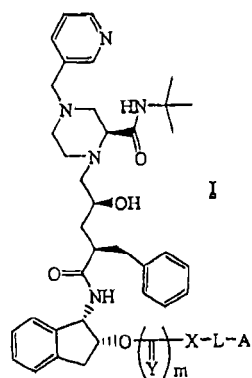
[54] 发明名称

用于免疫测定的茛地那韦衍生物

[57] 摘要

公开了用于产生抗体的茛地那韦衍生物和缀合物以及用于检测生物样品中的茛地那韦的标记缀合物。所述衍生物从茛地那韦的茛满环羟基或吡啶环氮出发合成。还公开了用钯催化剂和氢气从茛地那韦一步合成茛地那韦主要代谢物(M6)。茛地那韦M6用合适的官能团延伸以合成各种茛地那韦类似物。这些衍生物用于开发茛地那韦免疫原、抗体和标记缀合物,以开发茛地那韦免疫测定法。

1. 一种下式的化合物:

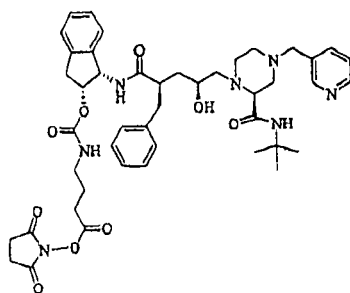


其中  $Y = O$  或  $S$ ,  $m = 0$  或  $1$ ,  $X = CH_2$  或  $NH$ ,  $L$  为包含 0-40 个以饱和或不饱和直链或支链排列的碳原子和含有最多两个环结构和 0-20 个杂原子的连接基团, 条件是不超过两个杂原子可依次连接在一起,  $A$  为选自活性酯、异氰酸酯、异硫氰酸酯、硫醇、亚氨基酯、酸酐、马来酰亚胺、硫内酯、重氮基团和醛的活化官能度。

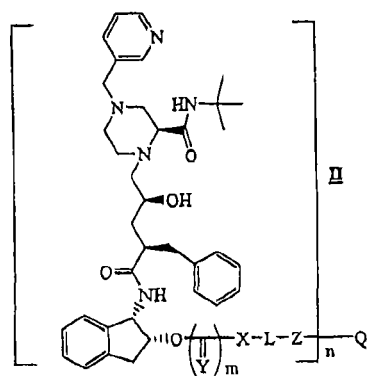
2. 权利要求 1 的化合物, 其中  $A$  为活性酯。

3. 权利要求 1 的化合物, 其中  $Y = O$ ,  $m = 1$ ,  $L$  包含 3 个碳原子,  $X$  为  $NH$ ,  $A$  为活性酯。

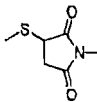
4. 一种化合物:



5. 一种下式的化合物:



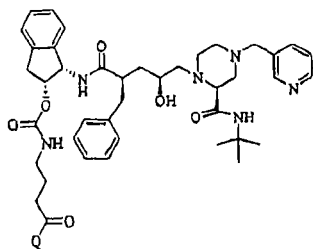
其中  $Y = O$  或  $S$ ,  $m = 0$  或  $1$ ,  $X = CH_2$  或  $NH$ ,  $L$  为包含 0-40 个以饱和或不饱和直链或支链排列的碳原子和还包含最多两个环结构和 0-20 个杂原子的连接基团, 条件是不超过两个杂原子可依次连接在一起,  $Z$  为选自  $-CONH-$ 、 $-NHCO-$ 、 $-NHCONH-$ 、 $-NHCSNH-$ 、 $-OCONH-$ 、

$-NHOCO-$ 、 $-S-$ 、 $-NH(C=NH)-$ 、 $-N=N-$ 、 $-NH-$  和  的部分,  $Q$  选自多肽、多糖、合成聚合物和非同位素标记, 对于每 50 千道尔顿分子量的  $Q$ ,  $n$  为 1-50 的数字。

6. 权利要求 5 的化合物, 其中  $Q$  为选自牛血清白蛋白、匙孔血蓝蛋白、美洲鲎血蓝蛋白、牛甲状腺球蛋白和氨基葡聚糖的多肽或多糖。

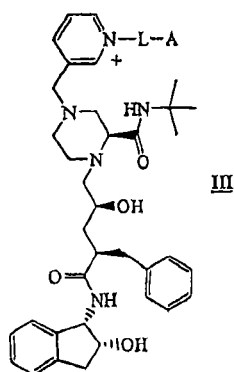
7. 权利要求 5 的化合物, 其中  $Y = O$ ,  $m = 1$ ,  $X$  为  $NH$ ,  $L$  包含 4 个碳原子,  $Q$  选自牛血清白蛋白、匙孔血蓝蛋白和氨基葡聚糖。

8. 一种化合物:



其中  $Q$  选自牛血清白蛋白、匙孔血蓝蛋白和氨基葡聚糖。

9. 一种下式的化合物:

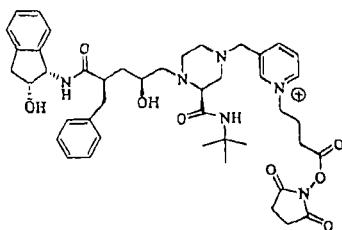


其中 L 为包含 0-40 个以饱和或不饱和直链或支链排列的碳原子和含有最多两个环结构和 0-20 个杂原子的连接基团，条件是不超过两个杂原子可依次连接在一起，A 为选自活性酯、异氰酸酯、异硫氰酸酯、硫醇、亚氨基酯、酸酐、马来酰亚胺、硫内酯、重氮基团和醛的活化官能度。

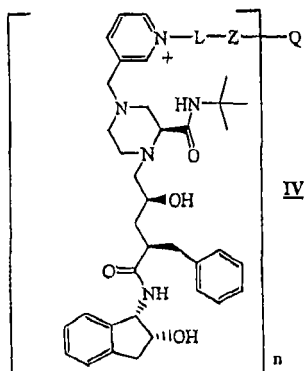
10. 权利要求 9 的化合物，其中 A 为活性酯。

11. 权利要求 10 的化合物，其中 L 包含 3 个碳原子。

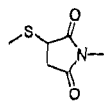
12. 一种化合物：



13. 一种下式的化合物：



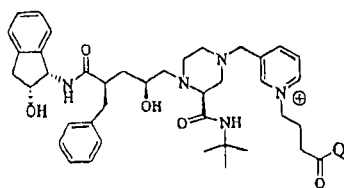
其中 L 为包含 0-40 个以饱和或不饱和直链或支链排列的碳原子和还包含最多两个环结构和 0-20 个杂原子的连接基团, 条件是不超过两个杂原子可依次连接在一起, Z 为选自 -CONH-、-NHCO-、-NHCONH-、-NHCSNH-、-OCONH-、-NHOCO-、-S-、-NH(C=NH)-、

-N=N-、-NH-和  的部分, Q 选自多肽、多糖、合成聚合物和非同位素标记, 对于每 50 千道尔顿分子量的 Q, n 为 1-50 的数字。

14. 权利要求 13 的化合物, 其中 Q 为选自牛血清白蛋白、匙孔血蓝蛋白、美洲鲎血蓝蛋白、牛甲状腺球蛋白和氨基葡聚糖的多肽或多糖。

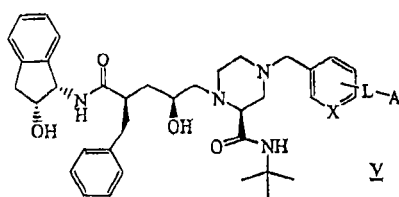
15. 权利要求 13 的化合物, 其中 L 包含 4 个碳原子。

16. 一种化合物:



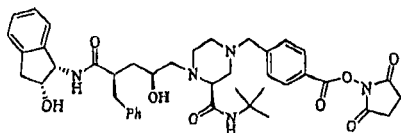
其中 Q 选自牛血清白蛋白、匙孔血蓝蛋白和氨基葡聚糖。

17. 一种下式的化合物:

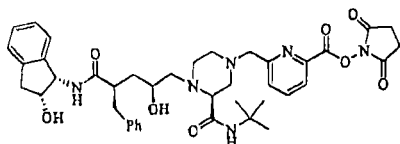


其中 X 为 N 或 C, L 为包含 0-40 个以饱和或不饱和直链或支链排列的碳原子和含有最多两个环结构和 0-20 个杂原子的连接基团, 条件是不超过两个杂原子可依次连接在一起, A 为选自活性酯、异氰酸酯、异硫氰酸酯、硫醇、亚氨基酯、酸酐、马来酰亚胺、硫内酯、重氮基团和醛的活化官能度。

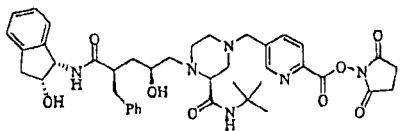
18. 一种下式的化合物:



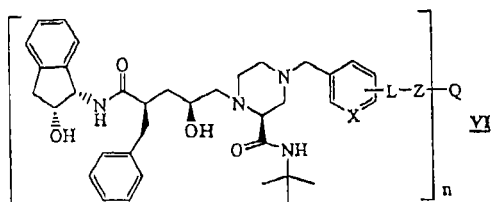
19. 一种下式的化合物:



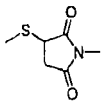
20. 一种下式的化合物:



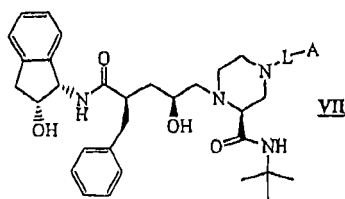
21. 一种下式的化合物:



其中 X 为 N 或 C, L 为包含 0-40 个以饱和或不饱和直链或支链排列的碳原子和还包含最多两个环结构和 0-20 个杂原子的连接基团, 条件是不超过两个杂原子可依次连接在一起, Z 为选自 -CONH-、-NHCO-、-NHCONH-、-NHCSNH-、-OCONH-、-NHOCO-、-S-、-

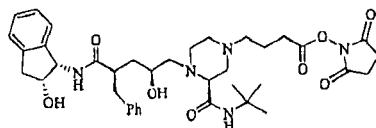
NH(C=NH)-、-N=N-、-NH-和  的部分, Q 选自多肽、多糖、合成聚合物和非同位素标记, 对于每 50 千道尔顿分子量的 Q, n 为 1-50 的数字。

22. 一种下式的化合物:

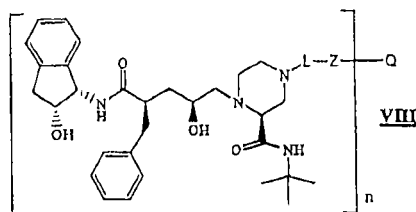


其中 L 为包含 0-40 个以饱和或不饱和直链或支链排列的碳原子和 0-20 个杂原子的脂族连接基团，条件是不超过两个杂原子可依次连接在一起，A 为选自活性酯、异氰酸酯、异硫氰酸酯、硫醇、亚氨基酯、酸酐、马来酰亚胺、硫内酯、重氮基团和醛的活化官能度。

23. 一种下式的化合物：

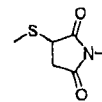


24. 一种下式的化合物：



其中 L 为包含 0-40 个以饱和或不饱和直链或支链排列的碳原子和还包含 0-20 个杂原子的脂族连接基团，条件是不超过两个杂原子可依次连接在一起，Z 为选自 -CONH-、-NHCO-、-NHCONH-、-NHCSNH-、

-OCONH-、-NHOCO-、-S-、-NH(C=NH)-、-N=N-、-NH-和



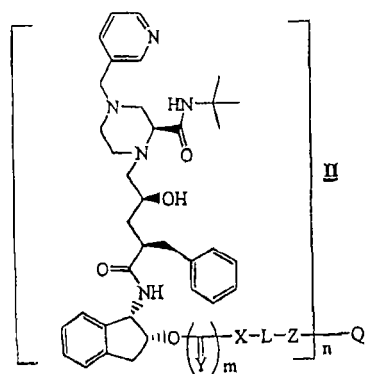
的部分，Q 选自多肽、多糖、合成聚合物和非同位素标记，对于每 50 千道尔顿分子量的 Q，n 为 1-50 的数字。

25. 一种合成茚地那韦 M6 的方法，所述方法包括使硫酸茚地那韦在氢气和钨催化剂存在下反应从而形成茚地那韦 M6 的步骤。

26. 一种测定样品中的茚地那韦的测定方法，所述方法包括以

下步骤:

使怀疑含有茚地那韦的样品与茚地那韦特异性抗体和包含茚地那韦类似物和非同位素信号产生部分的缀合物混合在一起, 其中当所述抗体结合样品中的茚地那韦时有信号产生, 所述缀合物具有下式:



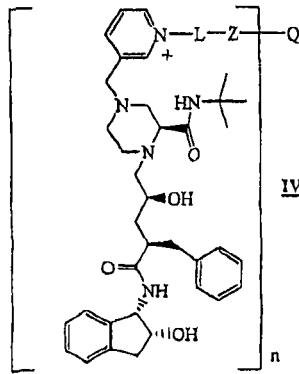
其中  $Y = O$  或  $S$ ,  $m = 0$  或  $1$ ,  $X = CH_2$  或  $NH$ ,  $L$  为包含 0-20 个以饱和或不饱和直链或支链排列的碳原子和含有最多两个环结构和 0-20 个杂原子的连接基团,  $Z$  为选自  $XX$ 、 $XX$  和  $XX$  的部分,

测量所产生的信号量,

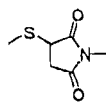
将所测量到的信号与样品中茚地那韦的存在或数量建立关联。

27. 一种测定样品中的茚地那韦的测定方法, 所述方法包括以下步骤:

使怀疑含有茚地那韦的样品与茚地那韦特异性抗体和包含茚地那韦类似物和非同位素信号产生部分的缀合物混合在一起, 其中当所述抗体结合样品中的茚地那韦时有信号产生, 所述缀合物具有下式:



其中 L 为包含 0-20 个以饱和或不饱和直链或支链排列的碳原子和含有最多两个环结构和 0-20 个杂原子的连接基团, Z 为选自 -CONH-、-NHCO-、-NHCONH-、-NHCSNH-、-OCONH-、-NHOCO-、-S-、-

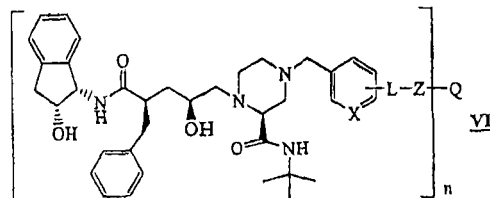
NH(C=NH)-、-N=N-、-NH-和  的部分, Q 选自多肽、多糖和合成聚合物, 对于每 50 千道尔顿分子量的 Q, n 为 1-50 的数字,

测量所产生的信号量,

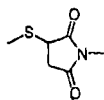
将所测量到的信号与样品中茚地那韦的存在或数量建立关联。

28. 一种测定样品中的茚地那韦的测定方法, 所述方法包括以下步骤:

使怀疑含有茚地那韦的样品与茚地那韦特异性抗体和包含茚地那韦类似物和非同位素信号产生部分的缀合物混合在一起, 其中当所述抗体结合样品中的茚地那韦时有信号产生, 所述缀合物具有下式:



其中 L 为包含 0-20 个以饱和或不饱和直链或支链排列的碳原子和含有最多两个环结构和 0-20 个杂原子的连接基团, Z 为选自 -CONH-、-NHCO-、-NHCONH-、-NHCSNH-、-OCONH-、-NHOCO-、-S-、-



NH(C=NH)-、-N=N-、-NH-和 的部分，Q 选自多肽、多糖和合成聚合物，对于每 50 千道尔顿分子量的 Q，n 为 1-50 的数字，测量所产生的信号量，

将所测量到的信号与样品中茚地那韦的存在或数量建立关联。

29. 一种抗体，所述抗体响应具有权利要求 5、13、21 和 24 中任一项的式的化合物而产生。

30. 免疫原用于产生权利要求 29 的抗茚地那韦抗体的用途。

31. 一种产生权利要求 29 的抗体的方法，所述抗体用于测定生物样品中的茚地那韦。

## 用于免疫测定的茚地那韦衍生物

### 发明领域

本发明涉及用于免疫测定的蛋白酶抑制剂衍生物。更具体的说，本发明涉及用于产生免疫原的活化茚地那韦半抗原，还涉及可用作免疫原以产生抗茚地那韦抗体和用于在免疫测定中测定生物样品中的茚地那韦的缀合衍生物。

### 发明背景

HIV 蛋白酶抑制剂是重要的一类新药物，自从第一个药物沙奎那韦在 1995 年上市以来，这类药物已对艾滋病患者的健康护理产生显著的效果。其它蛋白酶抑制剂的实例包括氨普那韦、奈非那韦、洛匹那韦、利托那韦、茚地那韦、阿扎那韦。它们与其它抗 HIV 药物如逆转录酶抑制剂或与其它 HIV 蛋白酶抑制剂联合用药特别有效。虽然这些新的治疗方案获得的显著的成功，但有强烈的迹象表明，如果有治疗药物试验方法可供监测蛋白酶抑制剂的浓度，则结果会变得更好。并不是所有的患者都对蛋白酶抑制剂联合疗法有最佳的反应。即使那些有反应的患者后来也会发展出药物抗性，这是由于 HIV 病毒众所周知的高突变率所致。但是，已证实蛋白酶抑制剂的血浆水平与基于病毒负荷减少和 CD4 细胞计数增加的治疗功效之间存在着明确关系。有一个问题在于这个事实，即药物被大量代谢并受到复杂的药物-药物相互作用。其结果是，药物动力学极其复杂，任何具体患者在任何具体时间下剂量和所致药物水平之间存在强烈的不可预测性因素。如能进行治疗药物监测，就能针对患者个别地考虑药物剂量，且病毒受到监视的机会大大提高。但是，蛋白酶抑制剂的常规治疗药物监测要求有适应于高通量临床分析仪的简

单自动试验可使用。目前,大多数有关蛋白酶抑制剂的治疗药物监测的报告都使用慢速、费力和昂贵的 HPLC 方法。最近有一份关于沙奎那韦放射免疫测定(RIA)方法的报告(Wiltshire 等, *Analytical Biochemistry* 281, 105-114, 2000)。但是,这种方法不能适用于高通量治疗药物监测,且和所有的 RIA 方法一样都遭受这样的缺点,即存在与测定中使用的放射性同位素标记有关的法规、安全和废物处理的问题。最可取的治疗药物监测用测定模式(assay format)是非同位素免疫测定,迄今为止未知有这种方法用于监测 HIV 蛋白酶抑制剂。

茚地那韦(CRIXIVAN, Merck & Co., Inc.)是人类免疫缺陷病毒蛋白酶的有效和特异性抑制剂之一。茚地那韦被代谢成低水平的季吡啶 N-葡糖苷酸(M1)类似物、2',3'-反式-二羟基茚满基吡啶-N-氧化物(M2)类似物、2',3'-反式-二羟基茚满(M3)类似物和吡啶-N-氧化物(M4a)类似物,以及 M3 和茚地那韦的去吡啶基甲基类似物(分别为 M5 和 M6)。M6 是尿液及血浆中的主要代谢物之一(*Drug Metabolism and Disposition* 24, 1389-94, 1996)。

前文提到, HPLC 已经是监测 HIV 蛋白酶抑制剂的可选方法。最近文献中的两份报告描述了用于同时测定人血浆中几种蛋白酶抑制剂的 HPLC 测定法, Poirier 等, *Therapeutic Drug Monitoring* 22, 465-473, 2000 和 Remmel 等, *Clinical Chemistry* 46, 73-81, 2000。

化学和生物测定法通常涉及使目的分析物与预定量的一种或多种测定试剂接触,测量所产生的产物(检测产物)的一种或多种性质,并将测量值与原始样品中存在的分析物的量建立关联,通常是使用从含已知量(在待测样品的预期范围内)的目的分析物标准或校准样品所测定的关系来建立关联。通常,检测产物掺入了一种或多种由一种或多种测定试剂提供的可检测标记。常用标记的实例包括官能化微颗粒、放射性同位素标记如  $^{125}\text{I}$  和  $^{32}\text{P}$ 、酶如过氧化物酶和  $\beta$ -半乳糖苷酶及酶底物标记、荧光标记如荧光素和罗丹明、电子自旋共振标记如硝基氧自由基、免疫应答性标记如抗体和抗原、作为结合

对如生物素-亲和素和生物素-链霉亲和素的一个成员的标记以及电化学发光标记如含有联吡啶钌部分的标记。夹心测定法通常涉及形成目的分析物夹在两种测定试剂中间的复合物，其中一种测定试剂最终用于进行分离，例如抗体、抗原或结合对的一个成员，另一种测定试剂提供可检测标记。竞争测定法通常涉及这样的系统，在该系统中目的分析物和分析物的类似物竞争另一试剂例如抗体上的结合位点，其中分析物、类似物或结合试剂之一者具有可检测标记。

2000年11月14日提交的共同待审美国专利申请系列号09/712,525(其受让人与本申请相同,2002年5月22日以EP 1 207 394公布)描述了HIV蛋白酶抑制剂的非同位素免疫测定法,该法包括将含有抑制剂的样品与对所述抑制剂或所述抑制剂的代谢物有特异性的受体以及与包含所述抑制剂类似物和非同位素信号产生部分的缀合物一起温育。测量因受体结合抑制剂所产生的信号,并将该信号与原始样品中蛋白酶抑制剂的存在或数量建立关联。本发明的蛋白酶抑制剂缀合物特别适用于这种测定法。

2002年7月10日提交的共同待审美国专利申请系列号10/192,052(其受让人与本申请相同,2003年1月23日以WO 03/006506公布)描述了用于产生针对HIV蛋白酶抑制剂的免疫原的活化半抗原。具体公开的是从茚地那韦分子的中心羟基出发合成的茚地那韦衍生物和免疫原。

除了其它问题以外,另外还需要有HIV蛋白酶抑制剂茚地那韦的改进的活化半抗原、衍生物和缀合物以及用以测定生物样品中的茚地那韦的免疫测定方法,该方法适合于进行自动高通量药物监测。本发明解决了这些和其它的问题。

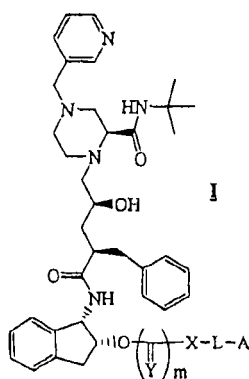
### 发明概述

本发明正是在上述背景下提供一些优于现有技术的非显而易见的优点和进步。具体的说,本发明人已认识到用于免疫测定的茚地

那韦衍生物和缀合物需要改进。

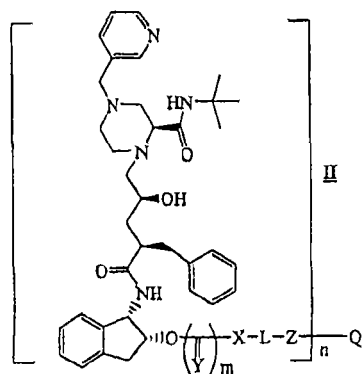
本发明涉及用于产生针对 HIV 蛋白酶抑制剂茚地那韦的免疫原的活化半抗原，涉及用于产生抗茚地那韦抗体的免疫原，和涉及用于用以测定生物样品中茚地那韦的免疫测定法的标记缀合物。这些化合物是从茚地那韦的吡啶环氮的茚满环羟基出发和从茚地那韦的吡啶氮出发合成的。本发明还涉及在氢气和钯催化剂存在下从茚地那韦一步合成茚地那韦代谢物 M6 的方法，和涉及从茚地那韦 M6 代谢物衍生的活化半抗原和缀合物。

在本发明的一个实施方案中，提供具有以下结构的活化半抗原：

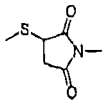


其中  $Y = O$  或  $S$ ， $m = 0$  或  $1$ ， $X = CH_2$  或  $NH$ ， $L$  为包含 0-40 个以饱和或不饱和直链或支链排列的碳原子和含有最多两个环结构和 0-20 个杂原子的连接基团，条件是不超过两个杂原子可依次连接在一起， $A$  为选自活性酯、异氰酸酯、异硫氰酸酯、硫醇、亚氨基酯、酸酐、马来酰亚胺、硫内酯、重氮基团和醛的活化官能度。

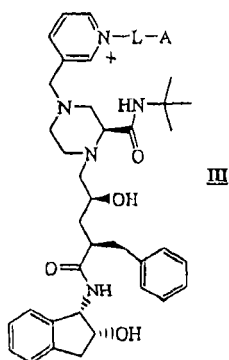
在本发明的另一个实施方案中，提供具有以下结构的缀合衍生物：



其中  $Y = O$  或  $S$ ,  $m = 0$  或  $1$ ,  $X = CH_2$  或  $NH$ ,  $L$  为包含 0-40 个以饱和或不饱和直链或支链排列的碳原子和还包含最多两个环结构和 0-20 个杂原子的连接基团, 条件是不超过两个杂原子可依次连接在一起,  $Z$  为选自  $-CONH-$ 、 $-NHCO-$ 、 $-NHCONH-$ 、 $-NHCSNH-$ 、 $-OCONH-$ 、

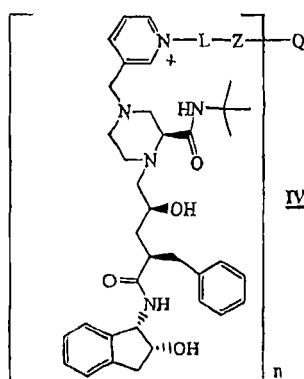
$-NHOCO-$ 、 $-S-$ 、 $-NH(C=NH)-$ 、 $-N=N-$ 、 $-NH-$  和  的部分,  $Q$  选自多肽、多糖、合成聚合物和非同位素标记, 对于每 50 千道尔顿分子量的  $Q$ ,  $n$  为 1-50 的数字。

在本发明的另一个实施方案中, 提供具有以下结构的活化半抗原:

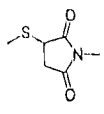


其中  $L$  为包含 0-40 个以饱和或不饱和直链或支链排列的碳原子和含有最多两个环结构和 0-20 个杂原子的连接基团, 条件是不超过两个杂原子可依次连接在一起,  $A$  为选自活性酯、异氰酸酯、异硫氰酸酯、硫醇、亚氨基酯、酸酐、马来酰亚胺、硫内酯、重氮基团和醛的活化官能度。

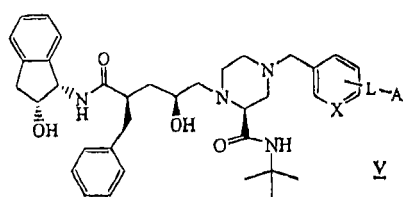
在本发明的另一个实施方案中，提供具有以下结构的缀合衍生物：



其中 L 为包含 0-40 个以饱和或不饱和直链或支链排列的碳原子和还含有最多两个环结构和 0-20 个杂原子的连接基团，条件是不超过两个杂原子可依次连接在一起，Z 为选自 -CONH-、-NHCO-、-NHCONH-、-NHCSNH-、-OCONH-、-NHOCO-、-S-、-NH(C=NH)-、

-N=N-、-NH-和  的部分，Q 选自多肽、多糖、合成聚合物和非同位素标记，对于每 50 千道尔顿分子量的 Q，n 为 1-50 的数字。

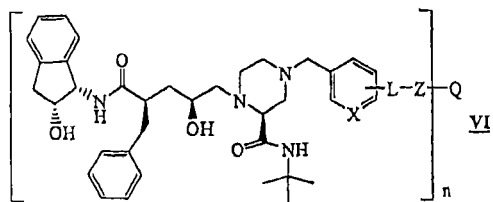
在本发明的又一个实施方案中，提供具有以下结构的活化半抗原：



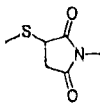
其中 X 为 N 或 C，L 为包含 0-40 个以饱和或不饱和直链或支链排列的碳原子和含有最多两个环结构和 0-20 个杂原子的连接基团，条件是不超过两个杂原子可依次连接在一起，A 为选自活性酯、异氰酸酯、异硫氰酸酯、硫醇、亚氨基酯、酸酐、马来酰亚胺、硫内酯、重氮基团和醛的活化官能度。

在本发明的又一个实施方案中，提供具有以下结构的缀合衍生物

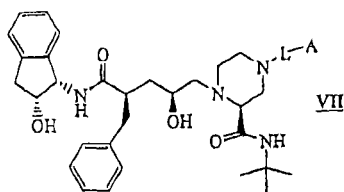
物:



其中 X 为 N 或 C, L 为包含 0-40 个以饱和或不饱和直链或支链排列的碳原子和还包含最多两个环结构和 0-20 个杂原子的连接基团, 条件是不超过两个杂原子可依次连接在一起, Z 为选自 -CONH-、-NHCO-、-NHCONH-、-NHCSNH-、-OCONH-、-NHOCO-、-S-、-

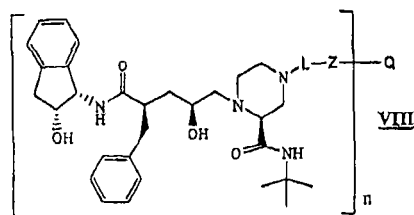
NH(C=NH)-、-N=N-、-NH-和  的部分, Q 选自多肽、多糖、合成聚合物和非同位素标记, 对于每 50 千道尔顿分子量的 Q, n 为 1-50 的数字。

在本发明的再一个实施方案中, 提供具有以下结构的活化半抗原:

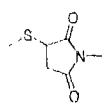


其中 L 为包含 0-40 个以饱和或不饱和直链或支链排列的碳原子和 0-20 个杂原子的脂族连接基团, 条件是不超过两个杂原子可依次连接在一起, A 为选自活性酯、异氰酸酯、异硫氰酸酯、硫醇、亚氨基酯、酸酐、马来酰亚胺、硫内酯、重氮基团和醛的活化官能度。

在本发明的再一个实施方案中, 提供具有以下结构的缀合衍生物:



其中 L 为包含 0-40 个以饱和或不饱和直链或支链排列的碳原子和还包含 0-20 个杂原子的脂族连接基团，条件是不超过两个杂原子可依次连接在一起，Z 为选自 -CONH-、-NHCO-、-NHCONH-、-NHCSNH-、-OCONH-、-NHOCO-、-S-、-NH(C=NH)-、-N=N-、-NH- 和



的部分，Q 选自多肽、多糖、合成聚合物和非同位素标记，对于每 50 千道尔顿分子量的 Q，n 为 1-50 的数字。

在本发明的另一个实施方案中，提供在氢气和钯催化剂存在下从茛地那韦一步合成茛地那韦代谢物 M6 的方法。合成的 M6 用于从 M6 的哌嗪氮出发合成具有连接基团的茛地那韦衍生物。这些连接基团包括脂族基团、取代的芳族基团和吡啶基。

从下文对本发明的详细描述并结合所附的权利要求书，将更能完整地理解本发明的这些和其它特征和优点。应注意，权利要求的范围由权利要求书的叙述来确定，而不是由本描述中所提出的对各特征和优点的具体讨论来确定。

### 附图简述

结合以下附图进行阅读，能最好地理解下文对本发明实施方案的详细描述。

图 1 是按实施例 29 的描述用高组校准血清用缀合物 **6C** 制作的校准曲线。

图 2 是按实施例 29 的描述用低组校准血清用缀合物 **6C** 制作的校准曲线。

图 3 是按实施例 29 的描述用高组校准血清用缀合物 **13C** 制作的

校准曲线。

图 4 是按实施例 29 的描述用低组校准血清用缀合物 **13C** 制作的校准曲线。

图 5 说明按实施例 1-6 的描述从茛地那韦的茛满环羟基出发合成活化茛地那韦半抗原 **12** 的方案。

图 6 说明分别按实施例 7、8 和 26 的描述合成活化半抗原 **12** 的 BSA、KLH 和氨基葡聚糖衍生物的方案。

图 7 说明按实施例 9-11 的描述从茛地那韦的吡啶环氮出发合成活化茛地那韦半抗原 **5** 的方案和分别按实施例 12、13 和 27 的描述合成 KLH、BSA 和氨基葡聚糖衍生物的方案。

图 8 说明按实施例 14 的描述在氢气和钨催化剂存在下从茛地那韦一步合成茛地那韦代谢物 M6 (**2**) 的方案。

图 9 说明按实施例 15 和 16 的描述从 M6 的哌嗪氮出发合成具有取代芳族连接基团的茛地那韦衍生物的方案。

图 10 说明按实施例 17 和 18 的描述从 M6 的哌嗪氮出发合成具有脂族连接基团的茛地那韦衍生物的方案。

图 11 说明按实施例 19-21 的描述从 M6 的哌嗪氮出发合成具有吡啶基连接基团的茛地那韦衍生物的方案。

图 12 说明按实施例 22-24 的描述从 M6 的哌嗪氮出发合成具有吡啶基连接基团的茛地那韦衍生物的方案。

### 发明详述

为使本发明可更容易地理解，提到了以下实施例，这些实施例旨在说明本发明而不是限制其范围。

应注意，诸如“优选”、“常常”、“通常”的术语在本文中并不用来限制要求保护的发明范围，或者用来暗示某些特征对于要求保护的发明的结构或功能是关键性的、必需的乃至重要的。更确切地，这些术语仅仅旨在强调可或可不用于本发明具体实施方案的替

代型特征或附加特征。

出于描述和定义本发明的目的，应注意的是术语“基本上”在本文中用来代表可归结于任何定量比较、数值、测量和其它表示法的固有不确定程度。术语“基本上”在本文中还用来代表某定量表示在不导致所讨论主题的基本功能发生变化下可偏离规定基准的程度。

参考本发明的具体实施方案对本发明作详细描述后，显而易见的是在不偏离所述权利要求书所定义的本发明范围下，有可能对本发明作出修改和变化。更具体的说，虽然本发明的一些方面在本文中确认为是优选的或特别有利的，但还设想到本发明未必限于本发明的这些优选方面。

在整个说明书中，黑体字数字用来指附图中所示的化学结构。

本文所用的分析物指其存在或数量待测定的物质或一组物质。

抗体是指分析物的特异性结合伴侣，是对分析物具有特异性结合亲和力而基本上排除其它非相关物质的任何物质或一组物质。该术语包括多克隆抗体、单克隆抗体和抗体片断。

半抗原是部分抗原或不完全抗原。它们是不能够刺激抗体形成、但的确能与抗体反应的无蛋白质物质，主要是低分子量物质。将半抗原偶联到高分子量载体并将此偶联产物注射入人体或动物体中，就形成抗体。半抗原的实例包括治疗药物如地高辛和茶碱、蛋白酶抑制剂如沙奎那韦和茚地那韦、滥用药物如吗啡和 LSD、抗生素如庆大霉素和万古霉素、激素如雌激素和孕酮、维生素如维生素 B<sub>12</sub> 和叶酸、甲状腺素、组胺、5-羟色胺、肾上腺素等。

活化半抗原指提供了可供反应的位点的半抗原，如通过附着或供应活化基团而用于合成衍生缀合物。

术语接头指将半抗原连接到载体、免疫原、标记、示踪物或另一接头的化学部分。接头可以是直链或支链的、饱和或不饱和的碳链。接头在链当中或在链末端还可包括一个或多个杂原子。所谓杂

原子是指选自氧、氮和硫的碳以外原子。取决于具体的半抗原和载体对，使用接头可能是或可能不是有利或需要的。

本文所用的术语“载体”是能与半抗原连接从而使半抗原能够刺激免疫应答的免疫原性物质，通常是蛋白质。载体物质包括蛋白质、糖蛋白、复合多糖和核酸，它们被宿主识别为外来物质，从而引发宿主的免疫应答。

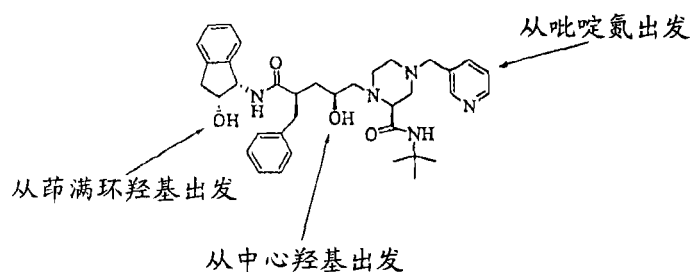
本文所用的术语“免疫原”和“免疫原性”指能够在生物体中引起或产生免疫应答的物质。

术语缀合物和衍生物指从母体化合物或分子通过一个或多个化学反应制成的化学化合物或分子。

本文所用的检测分子、标记或示踪物是当连接到载体物质或分子试剂时能用来检测分析物的可识别标志。标记可直接或间接通过连接或桥接部分附着到其载体物质。标记的实例包括酶如  $\beta$ -半乳糖苷酶和过氧化物酶、荧光化合物如罗丹明和异硫氰酸荧光素(FITC)、发光化合物如二氧杂环丁烷和萤光素以及放射性同位素如  $^{125}\text{I}$ 。

本发明意义下的术语活性酯涵括活化酯基团，其在不能有效地与携亲核体物质的其它反应性基团发生干扰性副反应的情况下，能与亲核体(例如但不限于肽的游离氨基、聚氨基酸、多糖或标记)发生反应。

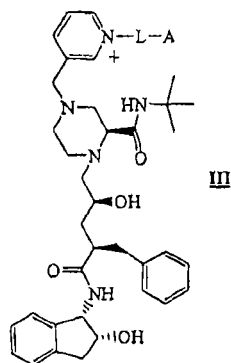
以下结构说明用于进行本文所提到的衍生化的各个位置，其中  $\text{X} = \text{CH}_2$  或  $\text{N}$ ：



从茚地那韦分子的中心羟基出发合成的茚地那韦衍生物和缀合物在 WO 03/006506 中描述。

本发明的一个实施方案涉及从茛地那韦的吡啶氮出发引出的茛地那韦半抗原结构。

调节反应条件就可选定一个反应位点而不是另一个反应位点。这个方法的一个实例涉及在叔胺优选三乙胺存在下进行的硫酸茛地那韦的烷基化反应。如图 7 所示，这种烷基化反应选择性地将茛地那韦吡啶氮官能化：



其中 L 为包含 0-40 个以饱和或不饱和直链或支链排列的碳原子和含有最多两个环结构和 0-20 个杂原子的连接基团，条件是不超过两个杂原子可依次连接在一起。A 为选自活性酯、异氰酸酯、异硫氰酸酯、硫醇、亚氨基酯、酸酐、马来酰亚胺和硫内酯的活化官能度。

烷基化试剂优选是带有受保护的羧酸或适当保护的官能度(如被保护成邻苯二甲酰亚胺基团的氨基)的卤代烷化剂。受保护的羧基基团优选是酯，其在附着到茛地那韦例如图 7 的化合物 4 后在酸性或碱性条件下被除去。游离羧酸基团可加以活化以产生活性酯，供随后缀合到多肽、多糖和标记基团。游离氨基基团在脱保护后，也可用带活化羧酸基团的双官能接头延伸，或者可通过脲连接或类似基团偶联到多肽。

也可用异双功能试剂如马来酰亚胺链烷酸 N-羟基琥珀酰亚胺酯来实现接头延伸，以产生末端马来酰亚胺基团，供随后缀合到多肽和标记上的巯基基团。或者，可用异双功能硫醇化剂来延伸以氨基为末端的接头，该异双功能硫醇化剂能在一端形成酰胺键，在另一端形成游离或保护的硫醇。本领域公知的这种类型硫醇化剂的一些

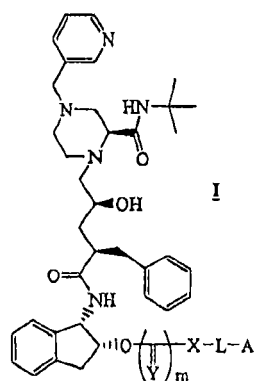
实例是2-亚氨基四氢噻吩(2-IT)、琥珀酰亚胺基乙酰硫代丙酸酯(SATP)和琥珀酰亚胺基(2-吡啶基二硫)丙酸酯(SPDP)。初始巯基基团在脱保护后就可供与马来酰亚胺或溴乙酰化的修饰免疫原或标记形成硫醇酯。

本发明的活性酯能与亲核体尤其是伯胺在多种含水或非水溶剂混合物中在相对较低的温度下发生反应。活性酯与伯胺或仲胺偶联产生酰胺的典型条件是，在偶极非质子溶剂如 N,N-二甲基甲酰胺(DMF)或二甲亚砜(DMSO)中加水或不加水在室温下发生反应。

往往加入缓冲剂或叔胺，以维持将伯胺反应物保持在脱质子状态所需的碱性 pH。常用的活性酯是对硝基苯酯、N-羟基磺基琥珀酰亚胺酯、N-羟基琥珀酰亚胺酯、1-羟基苯并三唑酯和五氟苯酯。优选的活性酯是 N-羟基琥珀酰亚胺酯，因为它们在稳定性、反应性和副产物 N-羟基琥珀酰亚胺的易除去性方面达到平衡。其它活性酯是本领域技术人员公知的，同样可以使用。

或者，具有携酯接头或亚胺基团作为活化基团的茚地那韦衍生物可例如使用携带合适的前体基团如末端脘基团的接头来获得。举例说，可按类似上述的方式合成携带末端脘的茚地那韦衍生物，然后通过本领域公知的方法，例如通过用氯化氢的醇溶液处理，将脘转化成亚氨酸酯部分(亚酰胺基亚氨酸酯基团)。另参见：Hermanson, 出处同上；和 Jerry March, *Advanced Organic Chemistry*, 第3版, John Wiley & Sons, 1985。本领域技术人员会想到其它获得亚胺基酯的方法。

本发明的另一个实施方案涉及从茚满羟基出发引出的茚地那韦衍生物。这些活化半抗原具有以下结构：



其中 Y 为 O、S 或 NH，m 为 0 或 1，L 为包含 0-40 个以饱和或不饱和直链或支链排列的碳原子和含有最多两个环结构和 0-20 个杂原子的连接基团，条件是不超过两个杂原子可依次连接在一起。A 为选自活性酯、异氰酸酯、异硫氰酸酯、硫醇、亚氨基酯、酸酐、马来酰亚胺、硫内酯和醛的活化官能度。

茚地那韦含有两个仲羟基——茚满羟基和中心羟基，先保护茚满环的羟基可能是有必要的。选择性修饰要求在对茚地那韦的中心羟基进行保护后，用亚异丙基环状系统将茚地那韦茚满环的羟基桥接到邻近的酰胺氮而对该羟基进行保护。许多合适的保护基是本领域公知的。参见例如“Protective Groups in Organic Synthesis”，第 2 版，T. Greene 和 P. Wuts, Wiley-Interscience, 1991。

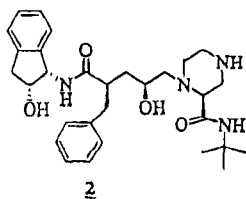
中心羟基可被保护成甲硅烷基保护基，例如 TBDMS (叔丁基二甲基甲硅烷基) 或 TBDPS (叔丁基二苯基甲硅烷基)。也可用酯基团来保护亚异丙基保护的茚地那韦的中心羟基官能度，优选为碱尤其是三乙胺存在下的苯甲酸酯基团。见实施例 2 和图 5 的化合物 8。通过酰化反应对中心羟基的保护是在合适的溶剂如 DMF 优选 THF 中进行通常 0.5 小时至 7 天的时间。在亚异丙基基团脱保护后，可对茚满羟基进行修饰，以在附着点产生尿烷键。茚地那韦的茚满羟基也可修饰成在附着点产生醚键，而中心羟基则被保护成甲硅烷基。例如，在中心羟基位置有 TBDMS 保护的茚地那韦衍生物的亚异丙基可在酸性条件下脱保护，所释放出的茚满羟基可用卤烷基化剂使其经历烷

基化条件形成醚键，所述卤烷基化剂携有受保护的羧酸或适当保护的官能度，如被保护成邻苯二甲酰亚胺的氨基。在羧基上有或没有保护基的羧基烷基异氰酸酯可直接与茚地那韦的目标羟基反应，产生受保护的羧基尿烷或羧基芳基尿烷。受保护的羧基优选是在碱性或酸性条件下被除去的酯。可将羧基转化成活性酯以便随后进行缀合，或者可将其直接缀合到多肽、多糖和标记。或者，可使预活化的羧基烷基异氰酸酯或羧基芳基异氰酸酯如异氰酸基苯甲酸 N-羧基琥珀酰亚胺酯直接与茚地那韦羟基反应。

替代性的羧酸活化是通过酸酐形成来进行。一般地，使羧酸与氯甲酸烷基酯如氯甲酸异丁酯在通常 $-30^{\circ}\text{C}$ 至 $+30^{\circ}\text{C}$ 、常常 $-20^{\circ}\text{C}$ 至 $0^{\circ}\text{C}$ 的温度下，在叔胺如三乙胺或 N-甲基吗啉存在下，在溶剂如 DMF 或 THF 中反应。然后使混合的酸酐与标记、蛋白质或肽上的氨基反应，产生稳定的酰胺缀合物。

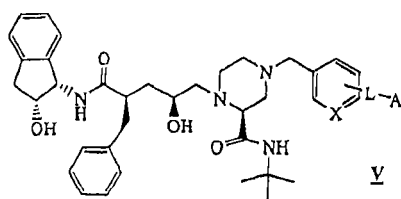
连接有羧酸的蛋白酶抑制剂的另一种活化方法是，通过用诸如同型半胱氨酸硫内酯的物质将羧基基团偶联，转化成掩蔽的巯基基团如硫内酯(美国专利第 5,302,715 号)。所得的接头-硫内酯然后可用温和的碱脱掩蔽，产生的末端巯醇接着与诸如马来酰亚胺基团或溴乙酰基团或碘乙酰基团(这些基团如在马来酰亚胺基或卤乙酰基修饰的肽、多糖、聚氨基酸和标记上)的部分反应，产生巯醇-马来酰亚胺或巯醇-乙酰加合物。

本发明的另一个实施方案涉及产生茚地那韦 M6 的方法。这个一步还原反应可在如下氢化条件下进行：使用例如 10% Pd-C、5% Pd-C、甲酸铵/Pd-C 和 20%氢氧化钨-C 的催化剂，在例如甲醇、乙醇、乙酸或 THF 尤其是甲醇的溶剂中，在室温下和 1 atm 至 60 psi 的压力下。



所得的茛地那韦 M6 可用来如下所述制备新的茛地那韦半抗原衍生物。

在本发明的另一个实施方案中，茛地那韦衍生物从下式所示的吡啶环或苯环出发引出：

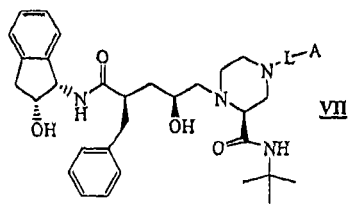


其中 Y 为 O、S 或 NH，m 为 0 或 1，L 为包含 0-40 个以饱和或不饱和直链或支链排列的碳原子和含有最多两个环结构和 0-20 个杂原子的连接基团，条件是不超过两个杂原子可依次连接在一起。A 为选自活性酯、异氰酸酯、异硫氰酸酯、硫醇、亚氨基酯、酸酐和马来酰亚胺的活化官能度。

可将适当官能化和保护的烷基卤代吡啶衍生物在碱性条件下与茛地那韦 M6 偶联。茛地那韦 M6 的哌嗪部分的环状仲胺基团与适当官能化和保护的甲酰吡啶衍生物的偶联反应也可在还原性胺化条件下进行，产生相同的产物。

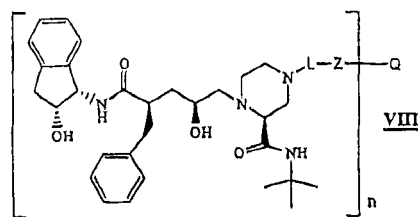
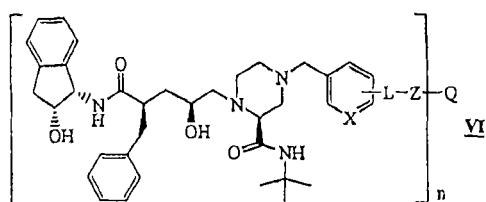
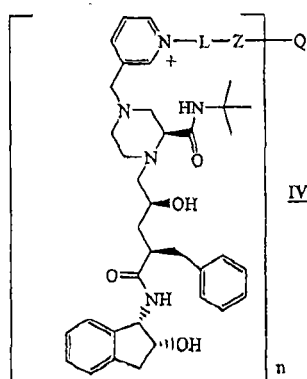
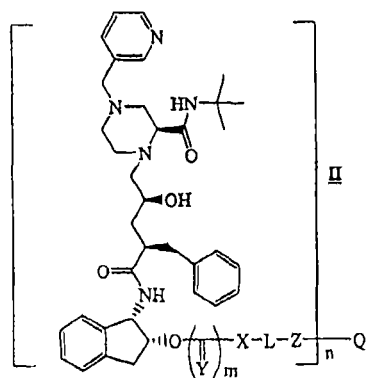
适当保护的烷基卤代苯衍生物和芳族醛衍生物也可按类似的方式使用以偶联到茛地那韦 M6 (见实施例 21 和图 12)。也可使用适当官能化的脂族卤代烷基接头在碱性条件下，或者使用适当官能化的脂族醛或市售的琥珀醛在还原性胺化条件下，用类似上述的化学方式将脂族接头附着到茛地那韦 M6 的哌嗪部分。例如，化合物 **16** (图 10) 可用琥珀半醛在氰基硼氢化钠存在下制备。

这些活化半抗原具有以下结构：

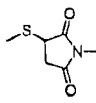


其中 Y 为 O、S 或 NH，m 为 0 或 1，L 为由 0-40 个以饱和或不饱和直链或支链排列的碳原子和 0-20 个杂原子组成的脂族连接基团，条件是不超过两个杂原子可依次连接在一起。A 为选自活性酯、异氰酸酯、异硫氰酸酯、硫醇、亚氨基酯、酸酐和马来酰亚胺的活化官能度。

本发明的另一个实施方案涉及具有选自以下的结构的免疫原：



其中 X 为 N 或 C, L 为包含 0-40 个以饱和或不饱和直链或支链排列的碳原子和还包含最多两个环结构和 0-20 个杂原子的连接基团, 条件是不超过两个杂原子可依次连接在一起, Z 为选自 -CONH-、-NHCO-、-NHCONH-、-NHCSNH-、-OCONH-、-NHOCO-、-S-、-

NH(C=NH)-、-N=N-、-NH-和  的部分, Q 选自多肽、多糖、

合成聚合物和非同位素标记，对于每 50 千道尔顿分子量的 Q，n 为 1-50 的数字，另外的条件是在结构 VIII 中，L 为包含 0-40 个以饱和或不饱和直链或支链排列的碳原子和还包含 0-20 个杂原子的脂族连接基团。

免疫原性载体通常是分子量大于 10 kD 的多肽或多糖。优选的载体物质的实例包括匙孔血蓝蛋白(KLH)、美洲鲎血蓝蛋白(LPH)和牛甲状腺球蛋白(BTG)。如前所述的活化半抗原衍生物和载体上的氨基之间的反应，通常在水和水混溶性有机溶剂如 DMSO 的缓冲混合物中在室温下进行 0.5-5 天。缓冲液的 pH 通常对于活性酯、异氰酸酯和异硫氰酸酯为 6-8，或者对于亚氨基酯为 7-10，并根据载体氨基和活化官能度的已知反应性加以调整。在末端基团 A 为马来酰亚胺的情况下，载体上的反应基团为巯基。这些巯基基团为载体本来所有，或者可用硫醇化试剂如 2-IT 或 SATP 引入。马来酰亚胺缀合到巯基基团以产生硫醚的最佳 pH 通常为 5-7。反应后，将免疫原透析或进行尺寸排阻层析，以除去未缀合的半抗原和有机溶剂。

获得免疫原的替代性方法是，使其中活化基团为醛的活化半抗原与载体蛋白质或多肽的氨基反应形成席夫碱，然后用温和的还原剂如硼氢化氰还原形成稳定的胺键。这后一方法的变化方案也是本发明所属领域的技术人员会想到的。

为产生抗体，可通过再水化冻干免疫原形成免疫原溶液或混悬液，制备供注射到宿主动物中的免疫原。或者，免疫原可作为预先制备好的液体溶液或作为缓冲液中的混悬液来使用。然后再将免疫原溶液与佐剂如弗氏佐剂组合形成免疫原混合物。免疫原可在多个部位，以数个剂量，一次或多次，在许多星期时间里给予。

用本发明的免疫原进行的多克隆抗体制备可遵循本领域技术人员公知的任何常规技术。通常，给宿主动物如兔、山羊、小鼠、豚鼠或马注射免疫原混合物。再进行更多的注射，同时测定血清的抗体滴度，直到确定已达到最佳滴度。然后将宿主动物放血，产出合

适体积的特异性抗血清。如有需要，可进行纯化步骤以除去不需要的材料如非特异性抗体，直到抗血清被认为适合用于进行测定。

单克隆抗体可通过用聚乙二醇方法如 *Methods in Enzymology* 73 (Part B), 第 3-46 页, 1981 中描述的技术, 使来自如上所述进行免疫的小鼠的小鼠淋巴细胞与骨髓瘤细胞杂交来获得。

在 ELISA 测定的情况下, 优选偶联到牛血清白蛋白(BSA)的茚地那韦衍生物来包覆微量滴定板。

对于茚地那韦和非放射性标记的缀合物的合成, 采用与免疫原制备类似的程序。

或者, 可将活化半抗原缀合到酶上的氨基或巯基基团, 以制备供 ELISA 应用的标记。其缀合物为本领域公知的用于 ELISA 的酶实例是辣根过氧化物酶(HRP)、碱性磷酸酶和  $\beta$ -半乳糖苷酶。蛋白质(包括酶)的缀合物通常是在水和水混溶性有机溶剂的缓冲混合物中制备, 然后按与免疫原制备类似的条件进行透析。在乳胶凝集试验的情况下, 与分子量在 10 kD 至 300 kD 之间、优选 40 kD 的胺化葡聚糖载体所成的缀合物尤其有用。这些缀合物如上所述在缓冲溶剂混合物中制备, 或者在含有用以促进反应的叔胺如三乙胺的无水有机溶剂如 DMSO 中制备。在小分子量(即小于 1 kD)标记的情况下, 根据该标记的性质调整反应条件。一种特别优选的标记是与标记亲和素或链霉亲和素组合的生物素。(链霉)亲和素/生物素系统对非同位素检测的多功能性是生物缀合物化学领域公知的(参见 Hermanson, 出处同上)。有多种亲和素和链霉亲和素的酶和荧光团标记缀合物市售, 供以高亲和力相互作用来检测生物素标记的物质。此外, 有多种生物素酰化剂市售, 供与活化官能度 A 反应。例如, 生物素-胺衍生物可与本发明的其中 A 为活性酯、异氰酸酯或异硫氰酸酯的活化半抗原反应, 分别产生生物素酰胺、生物素脲和生物素硫脲缀合物。这些偶联反应通常在含有有机碱如三乙胺的偶极非质子溶剂如 DMF 或 DMSO 中室温下进行 0.5-5 天。生物素缀合物优选通过色谱方法如反

相 HPLC 分离。

其它的优选标记是荧光团如荧光素、罗丹明、德克萨斯红、丹磺酰和花菁染料(例如 Cy-5)，它们的许多活化衍生物可市售获得。一般地，这些缀合物可如同生物素缀合物在含有叔胺的偶极非质子溶剂制备，然后进行色谱分离。

还有可能使用间接偶联到检测系统的报道基团作为标记。一个实例是如上所述的生物素。另一个实例是如 2001 年 1 月 4 日公布的 PCT 出版物 WO 200101135 所描述的用以抑制肌苷一磷酸脱氢酶的霉酚酸衍生物。

本领域技术人员显然知道可能还有其它非放射性标记，包括电化学发光标记如联吡啶钌衍生物、化学发光标记如吡啶酯、电化学介体和多种微颗粒和纳米颗粒，它们在其上适当引入合适的亲核基团如胺或硫醇后用于本发明，供与 HIV 蛋白酶抑制剂活化半抗原上的活化基团 A 进行反应。

在下文的实施例中，黑体字数字指附图中所示的对应结构。这些实施例只为说明而提出，并不意图限制本发明。

### 具体实施方案

所有溶剂均获自 J.T. Baker，除非另有规定。分析型反相 RP-HPLC 分析在配置有二极管阵列检测器和四元泵的 Agilent HP1100 LC/MS 系统上进行。LC/MS 分析用装备有带 AJO-4287 (C-180DS)筒的 Phenomenex KJO-4282 guard kit 的 Vydac 218TP54 柱(300A, 5 $\mu$ ; C18, 4.6 mm x 250 mm)进行。色谱流在柱后流出到 MS 检测器中。所采用的 MSD 以电喷雾正离子模式“ES (+)模式”运行。

HPLC 级分的冻干，除另有规定外，如下进行：减压蒸发乙腈，接着用例如干冰/丙酮浴冷冻含水残余物，然后用冷冻干燥器冷冻干燥。

制备型 HPLC 使用了以下 Varian DYNAMAX (Rainin)径向压缩

柱柱之一。HPLC 工作用含 0.1%三氟乙酸的水-乙腈梯度系统进行。

R00083221C (Microsorb 60-8, C-18; 250 mm x 21.4 mm), 带 Varian DYNAMAX (Rainin) guard module R00083221G (C-18, 8 $\mu$ )。

R00083241C (Microsorb 60-8, C-18; 250 mm x 41.4 mm), 带 Varian DYNAMAX (Rainin) guard module R00083241G (C-18, 8  $\mu$ )。

### 实施例 1

#### N-(1(S),2(R)-2,2-二甲基茛满基噁唑)-2(R)-(苯基甲基)-4(S)-羟基-5-[1-[4-(3-吡啶基甲基)-2(S)-(N-叔丁基氨基甲酰基)哌嗪基]]戊酰胺(7)

给烧瓶装配上磁力搅拌棒、回流冷凝器和连接有氩气入口的隔板。在室温下,给该反应烧瓶一并装入 1 g (1.4 mmol)硫酸茛地那韦(1)、33 ml (28.7 mmol)乙酸异丙酯、10 ml 无水 DMF、2.0 ml (52.5 mmol) 2-甲氧基丙烯接着是 1.8 gm (15.5 mmol)对甲苯磺酸吡啶盐。然后在 40°C 下搅拌加热反应 1.5 小时。通过 LC/MS 监测反应进程,指示反应的结束。然后将反应混合物冷却至室温,加入 1.0 g 氢氧化锂,让反应混合物搅拌约 5 分钟。在旋转蒸发仪上减压除去溶剂。然后将所得的物料再溶于水中,用乙酸乙酯萃取。合并有机相,用无水 MgSO<sub>4</sub> 干燥,过滤,在旋转蒸发仪上除去溶剂。然后将粗油在硅胶柱上以 20:1 CHCl<sub>3</sub>:MeOH 洗脱进行纯化。收集 Rf 0.43 的含产物级分,在旋转蒸发仪上除去溶剂,真空干燥,得乳白色粉末产物,收率 86% (0.72 g), MS (m/z) 654.4 (M+H)。见图 5。

### 实施例 2

#### N-(1(S),2(R)-2,2-二甲基茛满基噁唑)-2(R)-(苯基甲基)-4(S)-苯甲酰基-5-[1-[4-(3-吡啶基甲基)-2(S)-(N-叔丁基氨基甲酰基)哌嗪基]]戊酰胺(8)

给烧瓶装配上磁力搅拌棒和连接有氩气入口的隔板。给该烧瓶装入 0.67 g (0.44 mmol) 7、10 ml 无水 DMF、738  $\mu$ L (5.3 mmol) Et<sub>3</sub>N。将混合物加热直至 65°C,并在该温度下滴加 1.0 g (4.4 mmol)溶于 5 ml

无水 DMF 中的苯甲酸酐。然后将反应混合物加热至 80°C 保持 3 天，通过 LC/MS 监测反应进程。将反应混合物冷却至室温，减压除去溶剂。然后通过制备型 HPLC 梯度运行含 0.1% 三氟乙酸的乙腈-水溶剂系统对粗油进行纯化。收集含产物的级分，冻干，得 0.30 g 所需产物，收率 89%。MS (EI): 758.4 (M+H)。见图 5。

### 实施例 3

#### N-(2R-羟基-1(S)-茛满基)-2R-(苯基甲基)-4(S)-苯甲酰基-5-[1-[4-(3-吡啶基甲基)-2(S)-(N-叔丁基氨基甲酰基)哌嗪基]]戊酰胺(9)

给烧瓶装配上磁力搅拌棒和连接有氩气入口的隔板。给该烧瓶装入受保护的茛地那韦衍生物 **8**，然后是 10 ml 的三氟乙酸:二氯甲烷的 1:1 混合物。在室温下搅拌反应 2 小时。粗物料的 LC/MS 证实反应已完成。然后在高真空旋转蒸发仪上除去溶剂，通过制备型 HPLC 梯度运行含 0.1% 三氟乙酸的乙腈-水溶剂系统对粗物料进行纯化。收集含产物的级分，冻干，得 77% (0.22 g) 所需产物 **9**。MS (EI): 741.3 [(M+H)+Na], 718.3 (M+H), 586.3, 359.7, 298.7, 133.1, HRMS: C<sub>43</sub>H<sub>51</sub>N<sub>5</sub>O<sub>5</sub> 计算值: 718.3963; 实测值: 718.3967,  $[\alpha]_{20D} = -28.42^\circ$  (C = 1.034, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)。见图 5。

### 实施例 4

#### N-(2(R)-(4-甲酰氨基丁酸乙酯)-1(S)-茛满基)-2(R)-(苯基甲基)-4(S)-苯甲酰基-5-[1-[4-(3-吡啶基甲基)-2(S)-(N-叔丁基氨基甲酰基)哌嗪基]]戊酰胺(10)

给烧瓶装配上磁力搅拌棒和连接有氩气入口的隔板。给烧瓶装入 220 mg (0.30 mmol) 茛地那韦衍生物 **9** 和 1.2 ml (9.2 mmol) Et<sub>3</sub>N 的无水 THF 溶液。向反应混合物中加入 0.90 ml (11.5 mmol) 4-异氰酸基丁酸乙酯，然后在 80°C 下加热反应 2 天。LC/MS 证实产物的形成。将反应冷却至室温，在旋转蒸发仪上除去溶剂，通过制备型 HPLC 梯度运行含 0.1% 三氟乙酸的乙腈-水溶剂系统对残余物进行纯化。收

集合产物的级分,冻干,得87% (235 g)所需产物。MS (EI): 875.4 (M+H), 438.3, 359.7, 158.1。见图5。

### 实施例5

#### N-(2(R)-(4-甲酰氨基丁酸)-1(S)-茛满基)-2(R)-(苯基甲基)-4(S)-羟基-5-[1-[4-(3-吡啶基甲基)-2(S)-(N-叔丁基氨基甲酰基)哌嗪基]]戊酰胺(11)

向含有 235 mg (0.268 mmol) **10** 的烧瓶中加入 10 mL 甲醇和 10 ml 1N NaOH 水溶液。在室温下搅拌反应 1 天。通过 LC/MS 监测反应进程,指示产物形成的完成。减压浓缩反应混合物,通过制备型 HPLC 梯度运行含 0.1%三氟乙酸的乙腈-水溶剂系统对残余物进行纯化。收集含产物的级分,冻干,得 96% (190 g)产物 **11**。MS (EI): 766.3 (M+Na), 743.3 (M+H), 372.1, 307.7, 60.1。见图5。

### 实施例6

#### N-(2(R)-[4-甲酰氨基丁酸-N-琥珀酰亚胺酯]-1(S)-茛满基)-2(R)-(苯基甲基)-4(S)-羟基-5-[1-[4-(3-吡啶基甲基)-2(S)-(N-叔丁基氨基甲酰基)哌嗪基]]戊酰胺(12)

给 50-ml 圆底烧瓶装配上磁力搅拌棒和连接有氩气入口的隔板。在 0°C 下,给烧瓶装入 190 mg (0.25 mmol) **11**、5 ml 无水 THF、0.133 ml (0.74 mmol)的无水二异丙基乙胺和 207 mg (0.69 mmol)四氟硼酸 O-(N-琥珀酰亚胺基)-N,N,N',N'-四甲基脲鎓。让反应混合物升温至室温,在该温度下搅拌 24 小时,减压浓缩。残余物在制备型 HPLC 上用含 0.1%三氟乙酸的水-乙腈梯度系统进行纯化。合并含产物的级分,冻干,得 57g (27%)白色固体产物 **12**。MS (m/z): 840.4 (M+H), 725.4, 482.3, 420.7, 298.7, 130.2。见图5。

### 实施例7

#### 从茛满环出发的茛地那韦-BSA 缀合物(13A)

将 0.34 g 牛血清白蛋白(BSA)于 5.8 mL 50 mM 磷酸钾(pH 7.5)中

的溶液在冰浴中冷却。向该溶液中滴加 8.5 mL DMSO, 使反应混合物维持在低于室温。向该蛋白质溶液滴加 15 mg (0.017 mmol) 茛地那韦衍生物(**12**)于 1.5 mL 无水 DMF 中的溶液。让反应混合物在室温下搅拌 24 小时。将所产生的缀合物放入透析管(截留分子量 10,000), 室温下在 1 L 的 70% DMSO 的 50 mM 磷酸钾溶液(pH 7.5, 3 次换液, 每次至少 3 小时)、1 L 的 50% DMSO 的 50 mM 磷酸钾溶液(至少 3 小时)、1 L 的 30% DMSO 的 50 mM 磷酸钾溶液(至少 3 小时)、1 L 的 10% DMSO 的 50 mM 磷酸钾溶液(至少 3 小时)中透析, 然后在 4°C 下用 50 mM 磷酸钾(pH 7.5)换液 6 次(每次 1 L, 每次至少 6 小时)。蛋白质浓度用 Biorad 考马斯蓝蛋白质测定法(Bradford, M., Anal. Biochem. 72, 248, 1976)测出为 14 mg/mL。共获得 21.5 mL 缀合物。见图 6。

## 实施例 8

### 从茛满环出发的茛地那韦-KLH 缀合物(**13B**)

将 72 mg 匙孔血蓝蛋白(KLH)于 2 mL 50 mM 磷酸钾(pH 7.5)中的溶液在冰浴中冷却。向反应混合物溶液中滴加 4.7 mL DMSO, 并使反应温度维持在低于室温。然后向该蛋白质溶液滴加 16.7 mg (0.018 mmol) **5**于 670  $\mu$ L DMF 中的溶液。让混合物在室温下搅拌 18 小时。将所产生的缀合物放入透析管(截留分子量 10,000), 室温下在 1 L 的 70% DMSO 的 50 mM 磷酸钾溶液(pH 7.5, 3 次换液, 每次至少 3 小时)、1 L 的 50% DMSO 的 50 mM 磷酸钾溶液(至少 3 小时)、1 L 的 30% DMSO 的 50 mM 磷酸钾溶液(至少 3 小时)、1 L 的 10% DMSO 的 50 mM 磷酸钾溶液(至少 3 小时)中透析。蛋白质浓度用 Biorad 考马斯蓝蛋白质测定法测出为 11 mg/mL。可利用的赖氨酸修饰程度通过 TNBS 方法(Habeeb AFSA, Anal. Biochem. 14, 328-34, 1988)测出为 46%。见图 6。

### 实施例 9

三氟乙酸 N-(2(R)-羟基-1(S)-茛满基)-2(R)-(苯基甲基)-4(S)-羟基-5-[1-[4-(3-{1-(3-叔丁氧基羰基丙基)}吡啶基甲基)-2(S)-(N-叔丁基氨基甲酰基)哌嗪基]]戊酰胺(3)

向装配上磁力搅拌棒和连接有氩气入口的隔板的烧瓶加入 0.2 g (0.28 mmol)硫酸茛地那韦、5-ml 无水 DMF 接着是 72  $\mu$ l (0.56 mmol) Et<sub>3</sub>N。通过注射器向此搅拌下的溶液加入 0.43 g (1.96 mmol) 4-溴丁酸叔丁酯。然后将烧瓶中的内容物在 80°C 下加热 16 小时。粗物料的 LC/MS 证实产物的形成，将反应混合物冷却至室温，在旋转蒸发器上除去溶剂。然后将残余物在制备型 HPLC 上用含 0.1%三氟乙酸的水-乙腈梯度系统进行纯化。合并含产物的级分，冻干，得 71% (0.174 gm)单烷基化产物。此时产物的结构未知，因为可能发生烷基化的位点有多个。

偶然发现的是，亲电体的烷基化发生在吡啶环的氮上，产生相应的吡啶鎓阳离子。其结构用 <sup>1</sup>H NMR 和 NOE 实验进行解析。邻近吡啶鎓氮的亚甲基质子显示为 4.70 ppm 处的三重峰。被照射时这些亚甲基质子(4.70 ppm 处)在邻近吡啶基氮原子的两个 H $\alpha$  次甲基质子上于 8.9 ppm 和 9.02 ppm 处显示 NOE 效应，该效应确切地指示了烷基化吡啶环，从而确定了产物 **3** 的结构。MS (EI): 756.4 (M+H), 378.7, 330.2, 133.1, HRMS: C<sub>44</sub>H<sub>62</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub> 计算值: 756.4695, 实测值: 756.4693。见图 7。

### 实施例 10

三氟乙酸 N-(2(R)-羟基-1(S)-茛满基)-2(R)-(苯基甲基)-4(S)-羟基-5-[1-[4-(3-{1-(3-丁酸)}吡啶基甲基)-2(S)-(N-叔丁基氨基甲酰基)哌嗪基]]戊酰胺(4)

向 0.165 g (0.19 mmol) **3** 加入 10 ml 1:1 三氟乙酸:二氯甲烷。在室温下搅拌反应 30 分钟。粗反应混合物的 LC/MS 显示只有产物峰。

将反应混合物在旋转蒸发仪上浓缩。残余物在制备型 HPLC 上用含 0.1 三氟乙酸的水-乙腈梯度系统进行纯化。合并含产物的级分, 冻干, 得 38% (0.059 gm) 产物 **4**。MS (EI): 700.3 (M+H), 568.3, 551.3, 350.8, 341.7, 133.1., HRMS: C<sub>40</sub>H<sub>54</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub> 计算值: 700.4069, 实测值: 700.4075,  $[\alpha]_{20D} = +30.5^\circ$  (C = 1.0, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)。见图 7。

### 实施例 11

三氟乙酸 N-(2(R)-羟基-1(S)-茛满基)-2(R)-(苯基甲基)-4(S)-羟基-5-[1-[4-(3-{1-(4-N-丁酸琥珀酰亚胺酯)}吡啶基甲基)-2(S)-(N-叔丁基氨基甲酰基)哌嗪基]]戊酰胺(**5**)

给 50-ml 圆底烧瓶(之前在真空下用空气加热枪干燥过)装配上磁力搅拌棒和连接有氩气入口的隔板。给烧瓶一并装入 20 mg (0.024 mmol) **4**、5 ml 无水 THF、12  $\mu$ l Et<sub>3</sub>N 接着是 19.9 mg (0.066 mmol) 四氟硼酸[O-(N-琥珀酰亚胺基)-N,N,N',N'-四甲基脲。在 0°C 下搅拌反应, 在 6 小时的时间内升温至室温。粗反应混合物的 LC/MS 表明有产物形成, 将反应混合物在旋转蒸发仪上浓缩。残余物在制备型 HPLC 上用含 0.1% 三氟乙酸的水-乙腈梯度系统进行纯化。合并含产物的级分, 冻干, 得 94.14% (21.0 mg) 产物。MS (EI): 797.3 (M+H), 648.3, 399.2, 324.7, HRMS: C<sub>44</sub>H<sub>57</sub>N<sub>6</sub>O<sub>8</sub> 计算值: 797.4233, 实测值: 797.4237.,  $[\alpha]_{D}^{20} = +44.06^\circ$  (C = 1.0, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)。见图 7。

### 实施例 12

从吡啶基环出发的茛地那韦-BSA 缀合物(**6A**)

将 0.23 g 牛血清白蛋白(BSA)于 2.4 mL 50 mM 磷酸钾(pH 7.5)中的溶液在冰浴中冷却。向溶液中滴加 4.25 mL mL DMSO, 使反应混合物维持在低于室温。向此蛋白质溶液滴加 15 mg (0.016 mmol) 茛地那韦衍生物(**5**)的 1.5 mL 无水 DMF 溶液。让反应混合物在室温下搅拌 24 小时。将所产生的缀合物放入透析管(截留分子量 10,000), 室

温下在 1 L 的 70% DMSO 的 50 mM 磷酸钾溶液(pH 7.5, 3 次换液, 每次至少 3 小时)、1 L 的 50% DMSO 的 50 mM 磷酸钾溶液(至少 3 小时)、1 L 的 30% DMSO 的 50 mM 磷酸钾溶液(至少 3 小时)、1 L 的 10% DMSO 的 50 mM 磷酸钾溶液(至少 3 小时)中透析, 然后在 40°C 下用 50 mM 磷酸钾(pH 7.5)换液 6 次(每次 1 L, 每次至少 6 小时)。蛋白质浓度用 Biorad 考马斯蓝蛋白质测定法测出为 12 mg/mL。共获得 18 mL 缀合物。见图 7。

### 实施例 13

#### 从吡啶基环出发的茚地那韦-KLH 缀合物(6B)

将 54 mg 匙孔血蓝蛋白(KLH)于 1.5 mL 50 mM 磷酸钾(pH 7.5)中的溶液在冰浴中冷却。向反应混合物溶液中滴加 4.7 mL DMSO, 并使反应温度维持在低于室温。然后向该蛋白质溶液滴加 16.7 mg (0.018 mmol) **5** 的 670  $\mu$ L DMF 溶液。让混合物在室温下搅拌 18 小时。将所产生的缀合物放入透析管(截留分子量 10,000), 室温下在 1 L 的 70% DMSO 的 50 mM 磷酸钾溶液(pH 7.5, 3 次换液, 每次至少 3 小时)、1 L 的 50% DMSO 的 50 mM 磷酸钾溶液(至少 3 小时)、1 L 的 30% DMSO 的 50 mM 磷酸钾溶液(至少 3 小时)、1 L 的 10% DMSO 的 50 mM 磷酸钾溶液(至少 3 小时)中透析。蛋白质浓度用 Biorad 考马斯蓝蛋白质测定法测出为 11 mg/mL。可利用的赖氨酸修饰程度通过 TNBS 方法测出为 46%。见图 7。

### 实施例 14

#### M6-茚地那韦代谢物(2)

向装配上磁力搅拌棒的烧瓶加入 0.30 g (0.4214 mmol)硫酸茚地那韦(1)、30 ml 甲醇接着是 40 mg 20 wt% Pd(OH)<sub>2</sub>/C 催化剂。真空除去反应容器中的空气, 并引入 1 atm 氢气。然后在室温下搅拌反应 16 小时。届时粗物料的 LC/MS 证实反应完成。然后将粗物料滤过 CELITE

垫，在旋转蒸发仪上除去溶剂，真空干燥，得 99% (0.2187 g) 产物。  
MP = 147°C, TLC (硅胶) R<sub>f</sub> = 0.35 (MeOH), MS (EI): 523.3 (M+H),  
HRMS: 计算值 C<sub>30</sub>H<sub>42</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>: 523.3279, 实测值: 523.3282, [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = +  
13.32° (C = 1.036, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)。

### 实施例 15

#### N-(2(R)-羟基-1(S)-茛满基)-2(R)-(苯基甲基)-4(S)-羟基-5-[1-[4-(4-苯甲酸甲基)-2(S)-(N-叔丁基氨基甲酰基)哌嗪基]]戊酰胺(14)

向装配上磁力搅拌棒的烧瓶加入无水 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 中的 70 mg (0.1346 mmol) 茛地那韦 M6 (2)，接着加入 24 mg (0.16 mmol) 4-羧基苯甲醛和 16.8 mg (0.26 mmol) 氰基硼氢化钠。接着将反应混合物在室温下搅拌 1 天。然后用水将其猝灭，用 3 x 20 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 萃取。合并有机相，用无水 MgSO<sub>4</sub> 干燥，过滤，在旋转蒸发仪上除去溶剂。然后将粗混合物在硅胶柱上用 1:1 己烷:乙酸乙酯洗脱进行纯化，得 80% (71 mg)。MS (m/z) = 657.3 (M+H)。见图 9。

### 实施例 16

#### 4-{3-叔丁基氨基甲酰基-4-[2-羟基-4-(2-羟基-茛满-1-基氨基甲酰基)-5-苯基戊基]-哌嗪-1-基甲基}苯甲酸 2,5-二氧化-吡咯烷-1-基酯(15)

给 50-ml 圆底烧瓶(之前在真空下用空气加热枪干燥过)装配上磁力搅拌棒和连接有氩气入口的隔板。给烧瓶一并装入 20 mg (0.03 mmol) 14、5 ml 无水 THF、12 μl Et<sub>3</sub>N 接着是 19.9 mg (0.06 mmol) 四氟硼酸[O-(N-琥珀酰亚胺基-N,N,N',N'-四甲基脲)鎓。将反应在 0°C 下搅拌升温至室温，让反应在该温度下搅拌 6 小时。将反应混合物在旋转蒸发仪上浓缩，在制备型 HPLC 上纯化，得到所需产物。见图 9。

### 实施例 17

#### N-(2(R)-羟基-1(S)-茛满基)-2(R)-(苯基甲基)-4(S)-羟基-5-[1-[4-丁酸]]-2(S)-(N-叔丁基氨基甲酰基)哌嗪基]]戊酰胺(16)

向装配上磁力搅拌棒和隔板的烧瓶加入 0.1 g (0.19 mmol) 茚地那韦 M6 (**2**)、10 ml 无水 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 接着是 0.012 g (0.19 mmol) 氰基硼氢化钠和 0.025 g (0.23 mmol) 琥珀半醛(15%重量水溶液)。在室温下搅拌反应过夜。然后将反应用 20 ml 去离子水猝灭, 用 3 N HCl 酸化, 用 3 x 20 ml 二乙醚萃取。合并有机相, 用无水 MgSO<sub>4</sub> 干燥, 过滤, 在旋转蒸发仪上除去溶剂。然后将其在制备型 HPLC 上用含 0.1% 三氟乙酸的水-乙腈梯度系统进行纯化。合并含产物的级分, 冻干, 得 68 mg (42%) 收率。MS (m/z) = 609.3 (M+H), 477.3, 133.1。见图 10。

### 实施例 18

#### 4-{3-叔丁基氨基甲酰基-4-[2-羟基-4-(2-羟基-茚满-1-基氨基甲酰基)-5-苯基戊基]-哌嗪-1-基}-丁酸 2,5-二氧化-吡咯烷-1-基酯(**17**)

给 50 ml 无水圆底烧瓶装配上磁力搅拌棒和连接有氩气入口的隔膜。给烧瓶一并装入 0.032 mmol (20 mg) **16**、5 ml 无水 THF、12 μl Et<sub>3</sub>N 接着是 0.06 mmol (19.9 mg) 四氟硼酸[O-(N-琥珀酰亚胺基-N,N,N',N'-四甲基脲鎓。在 0°C 下搅拌反应, 在 6 小时的时间内逐渐升温至室温。将反应混合物在旋转蒸发仪上浓缩, 在制备型 HPLC 上纯化, 得到所需的活性酯 **17**。见图 10。

### 实施例 19

#### N-(2(R)-羟基-1(S)-茚满基)-2(R)-(苯基甲基)-4(S)-羟基-5-[1-[4-(2-吡啶甲酸甲酯基甲基)]-2(S)-(N-叔丁基氨基甲酰基)哌嗪基]]戊酰胺(**18**)

向装配上磁力搅拌棒和隔板的烧瓶加入 50 mg (0.095 mmol) 茚地那韦 M6 (**2**)、4-ml 无水 DMF、15 μl 无水 Et<sub>3</sub>N 接着是 0.024 g (0.10 mmol) 2-溴甲基吡啶-6-甲酸甲酯。在室温下搅拌反应 3 小时, 通过 LC/MS 监测反应进程。然后在高真空上除去溶剂, 在制备型 HPLC 上纯化物料。合并含产物的级分, 冻干, 得 24.7 mg (38%) 产物。MS (m/z) = 694.3 (M+Na), 672.3 (M+H), 540.3, 336.7, 133.1。见图 11。

### 实施例 20

#### 6-{3-叔丁基氨基甲酰基-4-[2-羟基-4-(2-羟基-茛满-1-基氨基甲酰基)-5-苯基戊基]-哌嗪-1-基甲基}-吡啶-2-甲酸(19)

向含有 25 mg (0.037 mmol) **18** 的烧瓶中加入 3 mL 甲醇和 3 ml 1N NaOH 水溶液。在室温下搅拌反应 1 天。LC/MS 证实产物形成完全。将反应混合物减压浓缩，通过制备型 HPLC 梯度运行含 0.1% 三氟乙酸的乙腈-水溶剂系统对残余物进行纯化。合并含产物的级分，冻干，得所需的产物 **19**。见图 11。

### 实施例 21

#### 6-{3-叔丁基氨基甲酰基-4-[2-羟基-4-(2-羟基-茛满-1-基氨基甲酰基)-5-苯基戊基]-哌嗪-1-基甲基}-吡啶-2-甲酸 2,5-二氧代-吡咯烷-1-基酯(20)

给 50-ml 无水圆底烧瓶装配上磁力搅拌棒和连接有氩气入口的隔膜。给烧瓶一并装入 20 mg (0.030 mmol) 茛地那韦酸 **19**、5 ml 无水 THF、12  $\mu$ l Et<sub>3</sub>N 接着是 19.9 mg (0.06 mmol) 四氟硼酸[O-(N-琥珀酰亚胺基-N,N,N',N'-四甲基脲)]。在 0°C 下搅拌反应，逐渐升温至室温。将反应混合物在室温下搅拌 6 小时，在旋转蒸发仪上浓缩。残余物在制备型 HPLC 上用含 0.1% 三氟乙酸的乙腈-水溶剂系统以梯度运行进行纯化。合并含产物的级分，冻干，得所需的产物 **20**。见图 11。

### 实施例 22

#### 5-{3-叔丁基氨基甲酰基-4-[2-羟基-4-(2-羟基-茛满-1-基氨基甲酰基)-5-苯基戊基]-哌嗪-1-甲基}-吡啶-2-甲酸乙酯(21)

向装配上磁力搅拌棒和隔板的圆底烧瓶加入无水 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 中 70 mg (0.13 mmol) 茛地那韦 M6 (**2**)，接着加入 0.16 mmol (26 mg) 5-甲酰-2-吡啶甲酸乙酯(US 4,526,787)和 16.8 mg (0.26 mmol) 氰基硼氢化钠。将反应混合物在室温下搅拌 1 天。将反应混合物用是猝灭，用 3 x 20 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 萃取。合并有机相，用无水 MgSO<sub>4</sub> 干燥，过滤，在旋转蒸发

仪上除去溶剂。然后将粗混合物在硅胶柱上进行纯化，得到所需产物。见图 12。

### 实施例 23

#### 5-{3-叔丁基氨基甲酰基-4-[2-羟基-4-(2-羟基-茛满-1-基氨基甲酰基)-5-苯基戊基]-哌嗪-1-基甲基}-吡啶-2-甲酸(22)

向含有 25 mg (0.037 mmol) **21** 的烧瓶中加入 3 mL 甲醇和 3 ml 1N NaOH 水溶液。在室温下搅拌反应 1 天。LC/MS 证实产物形成完全。将反应混合物减压浓缩，通过制备型 HPLC 梯度运行含 0.1%三氟乙酸的乙腈-水溶剂系统对残余物进行纯化。收集含产物的级分，在旋转蒸发仪上除去溶剂，冻干，得到所需的产物。见图 12。

### 实施例 24

#### 5-{3-叔丁基氨基甲酰基-4-[2-羟基-4-(2-羟基-茛满-1-基氨基甲酰基)-5-苯基戊基]-哌嗪-1-基甲基}-吡啶-2-甲酸 2,5-二氧化-吡咯烷-1-基酯(23)

向 20 mg (0.030 mmol) **22** 的 5 ml 无水 THF 溶液中加入 12  $\mu$ l Et<sub>3</sub>N 接着是 19.9 mg (0.06 mmol) 四氟硼酸[O-(N-琥珀酰亚胺基-N,N,N',N'-四甲基脒)。在 0°C 下搅拌反应，升温至室温。将反应混合物在室温下搅拌 6 小时，在旋转蒸发仪上浓缩。残余物在制备型 HPLC 上梯度运行含 0.1%三氟乙酸的乙腈-水溶剂系统进行纯化。合并含产物的级分，冻干，得到所需的产物。见图 12。

### 实施例 25

#### 免疫测定模式的原理

本文描述的茛地那韦测定模式是均匀微颗粒免疫测定。它是用以检测血清中的茛地那韦的两试剂系统。微颗粒在溶液(KTMS)中的动力学相互作用已用 Roche Diagnostics/Hitachi 系列的自动分析仪测量。在这个技术中，已将茛地那韦抗体共价偶联到微颗粒上，药物衍生物连接到大分子(氨基葡聚糖)。药物缀合物和血清样品中的任何

茛地那韦之间发生与微颗粒上的有限数量特异性茛地那韦抗体结合的竞争性反应。微颗粒在溶液中的动力学相互作用由药物缀合物与微颗粒上的抗体的结合引起，受样品中茛地那韦的存在所抑制。

茛地那韦抗体按 US 2004/40127689 描述从茛地那韦免疫原制备。

## 实施例 26

### 从茛满环出发的茛地那韦-氨基葡聚糖缀合物(13C)

氨基葡聚糖(分子量 40,000)按照 US 6,653,456 描述的方法制备。用 TNBS 测定发现产物每摩尔氨基葡聚糖含有 5.7 摩尔氨基。

用此氨基葡聚糖制备茛地那韦-氨基葡聚糖缀合物(从茛满环出发)。在室温下向 20 mg 氨基葡聚糖加入 1 mL DMSO。让混合物在室温下搅拌至所有的氨基葡聚糖都溶于溶液中。向反应混合物加入 13  $\mu$ L (0.092 mmol)三乙胺。将 8.87 mg (0.010 mmol)茛地那韦衍生物 **12** 溶于 0.44 mL 无水 DMSO 中，滴加到搅拌下的氨基葡聚糖溶液中。让混合物在室温下搅拌 48 小时，转移到 SPECTRA/POR 透析管(截留分子量 3500)中，在室温下按照以下程序(1 L 体积，每次至少 8 小时)进行透析(每次透析用 1 L 体积): 80% DMSO、60% DMSO、40% DMSO 和 20% DMSO 于去离子水中，接着是去离子水。

从透析管取出溶液，冻干，得 15 mg 茛地那韦-葡聚糖缀合物，为白色粉末。见图 6。

## 实施例 27

### 从吡啶环出发的茛地那韦-氨基葡聚糖缀合物(6C)

用此氨基葡聚糖制备茛地那韦-氨基葡聚糖缀合物(从吡啶环出发)。在室温下向 20 mg 氨基葡聚糖加入 1 mL DMSO。让混合物在室温下搅拌至所有的氨基葡聚糖都溶于溶液中。向反应混合物加入 13  $\mu$ L (0.092 mmol)三乙胺。将 9.86 mg (0.011 mmol)茛地那韦衍生物 **5**

溶于 0.44 mL 无水 DMSO 中，滴加到搅拌下的氨基葡聚糖溶液中。让混合物在室温下搅拌 48 小时，转移到 SPECTRA/POR 透析管(截留分子量 3500)中，在室温下按照以下程序(1 L 体积，每次至少 8 小时)进行透析(每次透析用 1 L 体积): 80% DMSO、60% DMSO、40% DMSO 和 20% DMSO 于去离子水中，接着是去离子水。从透析管取出溶液，冻干，得 15 mg 茚地那韦-葡聚糖缀合物，为白色粉末。见图 7。

## 实施例 28

### 茚地那韦乳胶试剂的制备

将 10% (w/v) 固体羧酸酯修饰的乳胶微颗粒(Seradyn)用去离子水稀释成 1% (w/v) 固体。在 4°C、32,600 x g 下离心悬浮液 1 小时。保留沉淀，通过超声处理重新悬浮。将 1% 乳胶悬浮液如上所述用 5 体积当量的去离子水接着是 5 体积当量的洗涤缓冲液(50 mM 2-(N-吗啉代)-乙磺酸(MES), pH 5.5)进行离心洗涤。将乳胶微颗粒在 4°C 下保存。在 Roche Cobas Mira 上测定乳胶浓度，用 50 mM MES 缓冲液(pH 5.5)调至 1% (w/v)。

将洗涤过的 1% (w/v) 乳胶用 10 当量的 N-乙基-N'-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺(EDC)和 10 当量的 Sulpho NHS (于 50mM MES, pH 5.5 中)和 50 mg/mL EDC 溶液(于去离子水中)进行活化。将反应混合物在室温下搅拌 2 小时。

在 4°C 下以 3200 x g 离心反应混合物，将乳胶沉淀重新悬浮于 50 mM MOPS (pH 6.4) 中。在 Roche Cobas Mira 上测定乳胶浓度，将乳胶悬浮液调至 1% (w/v)。

将每一抗体负荷下的所需量的茚地那韦单克隆抗体(0.2mg 单克隆抗体/1% 乳胶(分别为 M2.35.2 和 M1.158.8) (参考 US 200440127689) 加入到 1% (w/v) 乳胶中，室温下搅拌乳胶混合物 2 小时。

通过加入 50mg/mL BSA (于 50 mM MOPS, pH 6.4 中)并在室温下搅拌过夜，将乳胶混合物进行后封闭。

在 4°C 下以 32,600 x g 离心反应混合物，将乳胶沉淀重新悬浮于储存缓冲液(50 mM MOPS, 0.1% BSA, 0.09% NaN<sub>3</sub>, pH 7.2)中。此为试剂 R2。

如上所述用乳胶储存缓冲液将乳胶离心洗涤三次。在 Roche Cobas Mira 上测量乳胶悬浮液的单分散性。将乳胶悬浮液浓度调至 1.5%，于 4°C 下保存。

## 实施例 29

### 茚地那韦校准曲线

将硫酸茚地那韦溶于 50%乙醇中，制成 1 mg/mL 储备溶液。准备两组校准血清和对照。低组校准血清在 Roche TDM 血清中从茚地那韦储备溶液制备，浓度为 0.25、0.325、0.75、1.5 和 3 µg/mL 茚地那韦。高组校准血清掺入茚地那韦，浓度为 0、0.75、1.5、3 和 12 µg/mL 茚地那韦。

将 0.2mg/mL 茚地那韦氨基葡聚糖缀合物(13C 或 6C)溶于 180 mM PIPES 缓冲液(pH 7.2，含 0.1%聚丙烯酸和 0.1% TWEEN 20)中制备缀合物试剂(试剂 R1)。乳胶试剂 R2 的制备已如上所述。

用 Hitachi 917 自动分析仪(Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis), 用 120 µL 第一工作试剂(R1)和 160 µL 第二工作试剂(R2)及 15 µL 样品体积，测量波长 600 nm 处的吸光度变化，来进行测定。

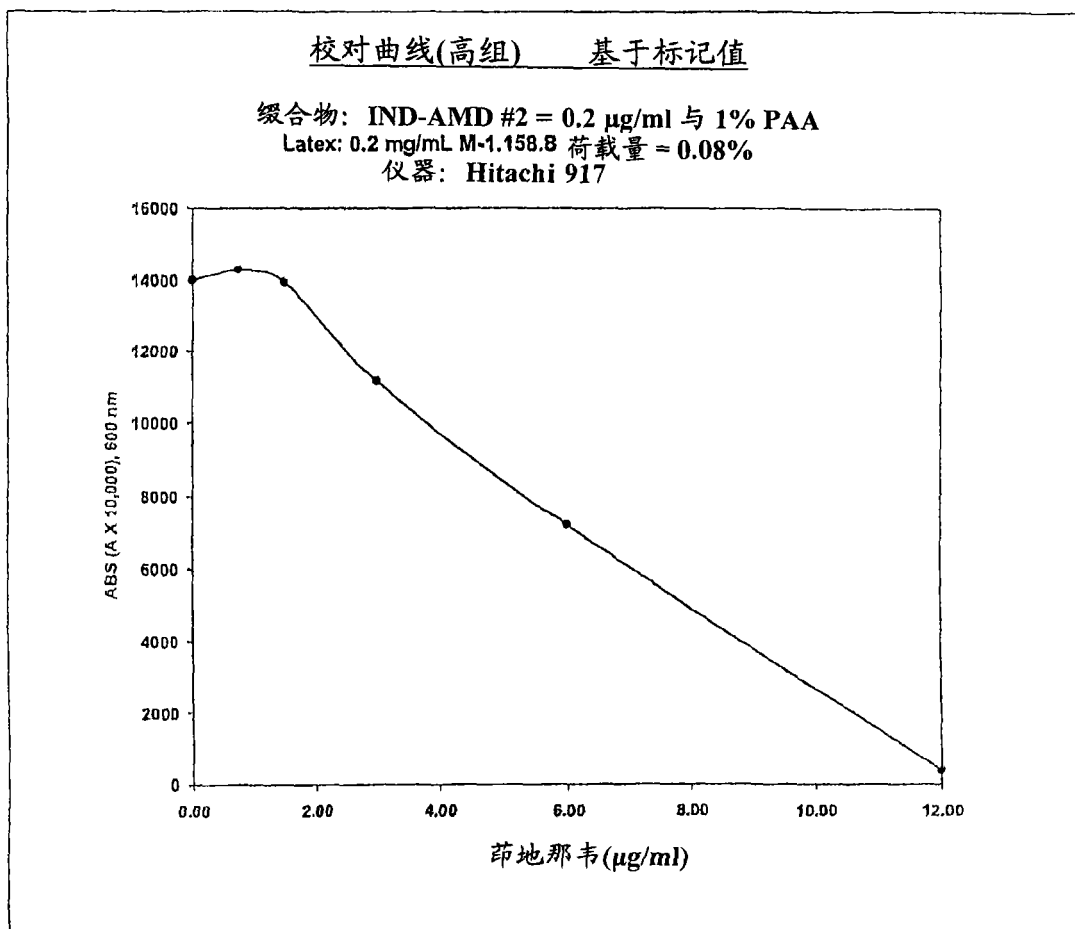


图 1

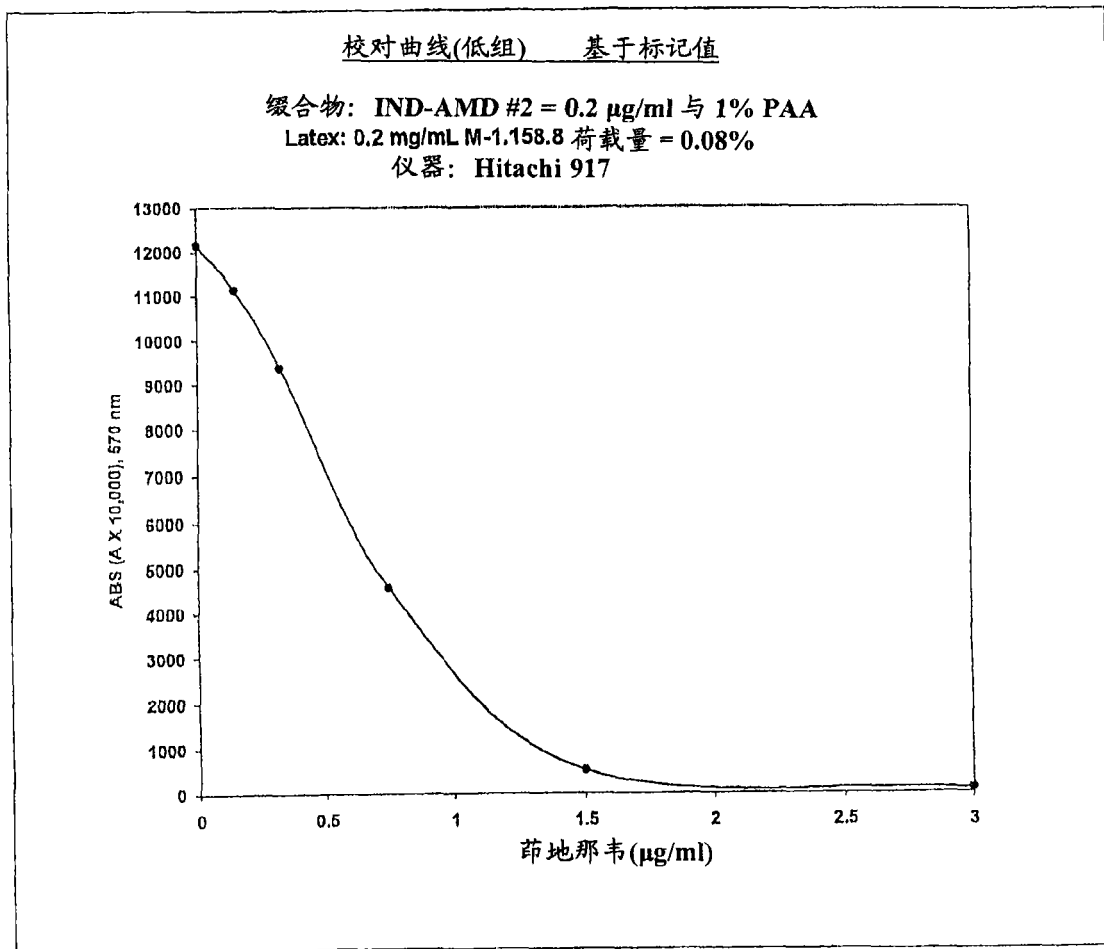


图 2

校对曲线(高组) 基于标记值

缀合物: IND-AMD #3 = 0.2  $\mu\text{g/ml}$  与 0.6% PAA

Latex: 0.2 mg/mL M-2.35.2 荷载量 = 0.07%

仪器: Hitachi 917

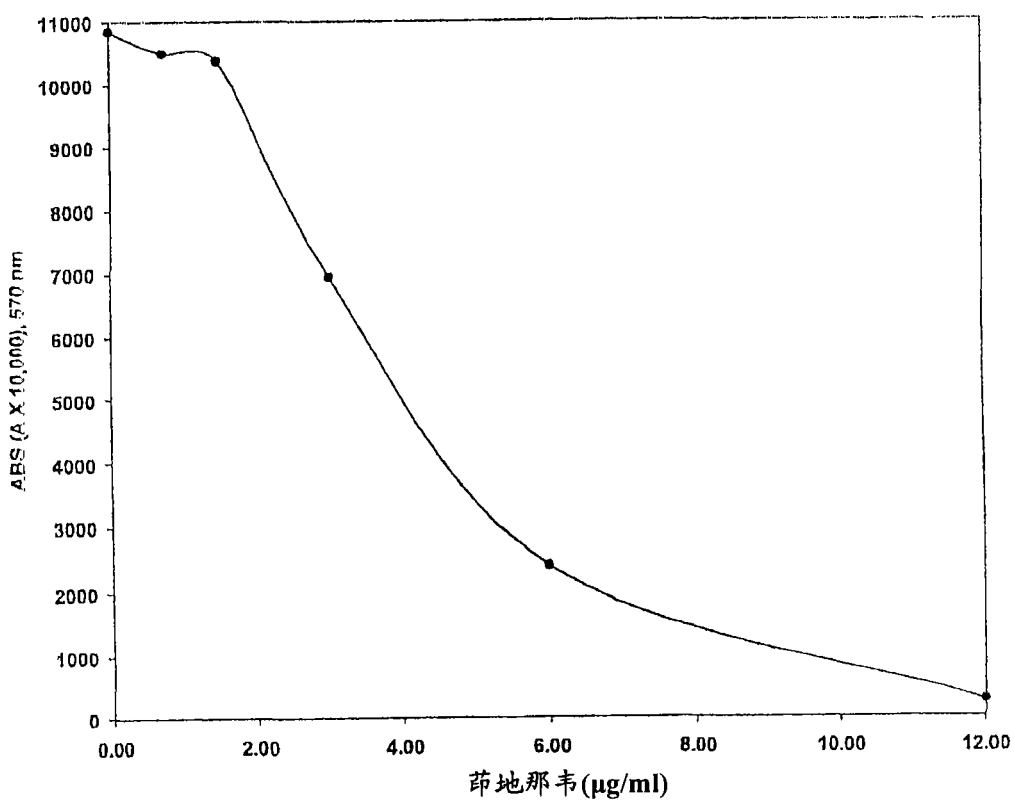


图 3

校对曲线(低组) 基于标记值

缀合物: IND-AMD #3 = 0.2  $\mu\text{g/ml}$  与 0.6% PAA

Latex: 0.2 mg/mL M-2.35.2 荷载量 = 0.07%

仪器: Hitachi 917

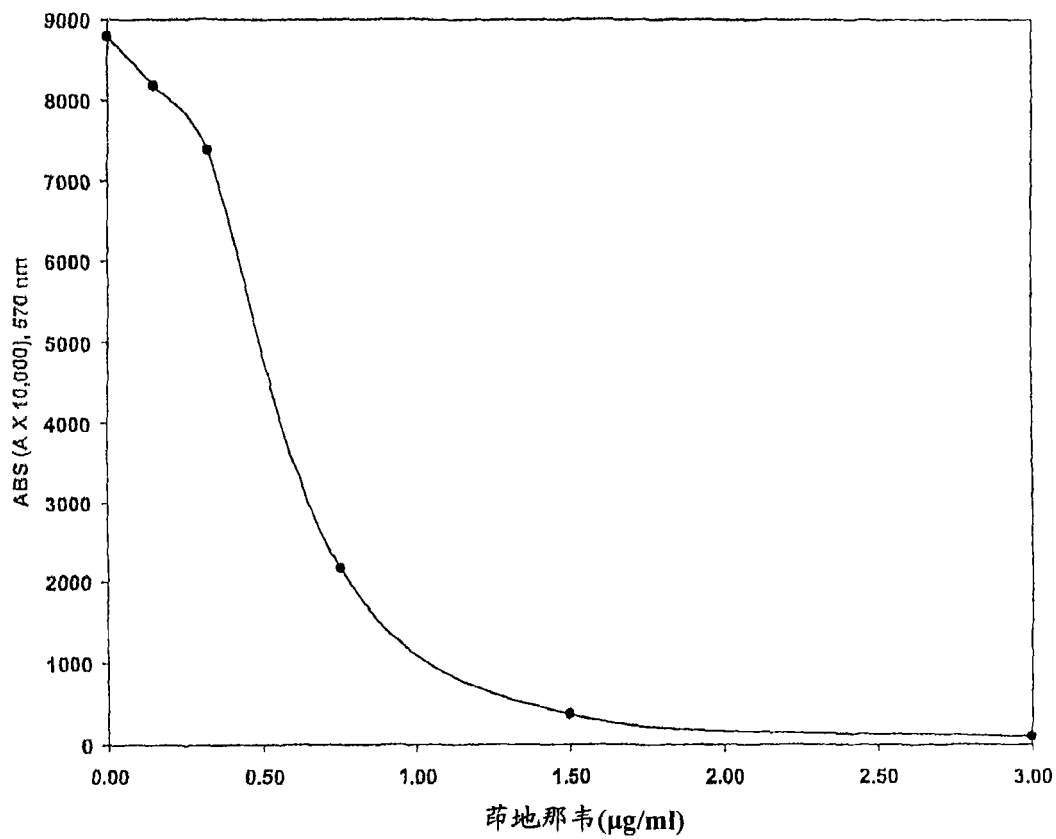


图 4

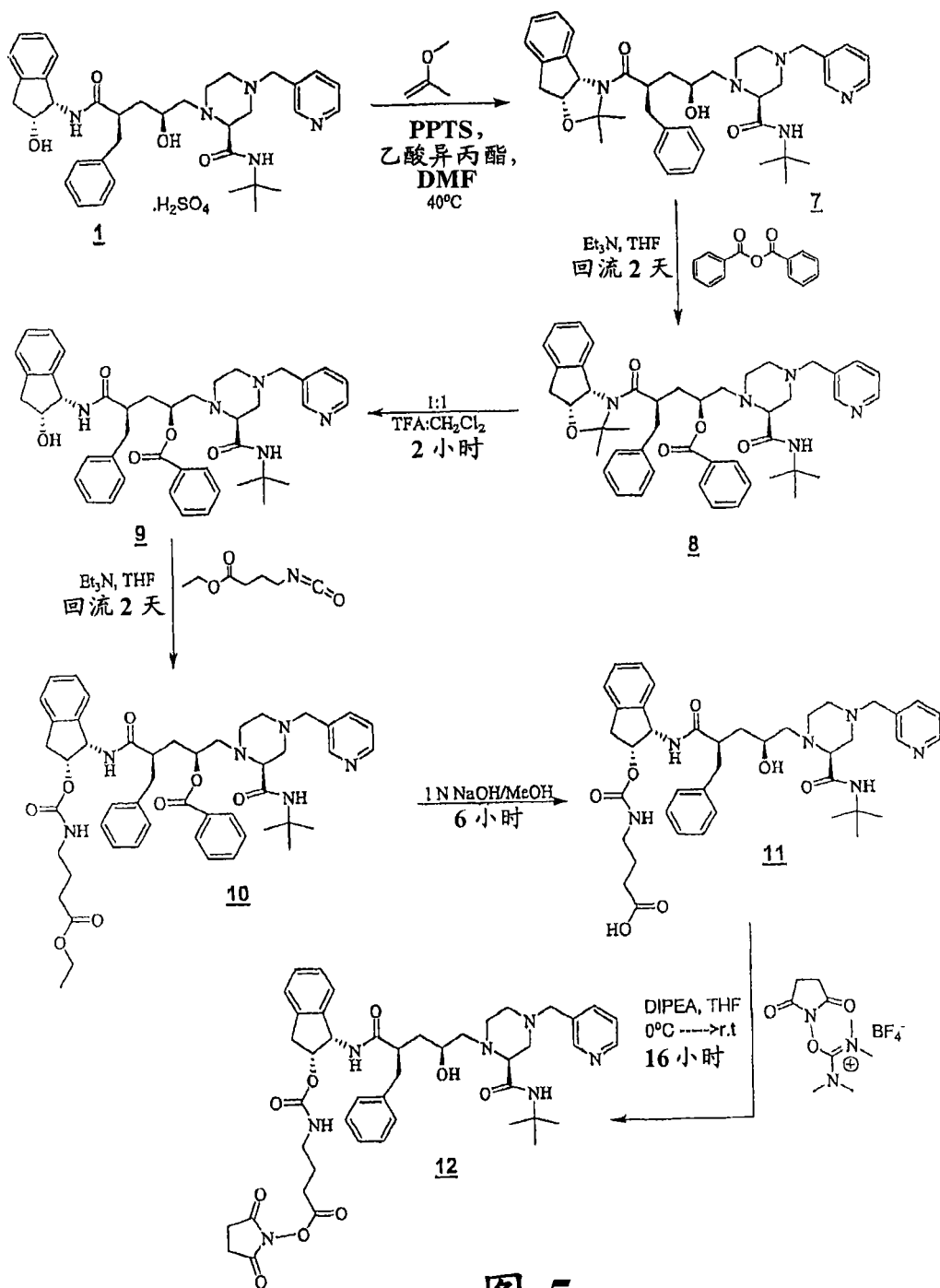


图 5

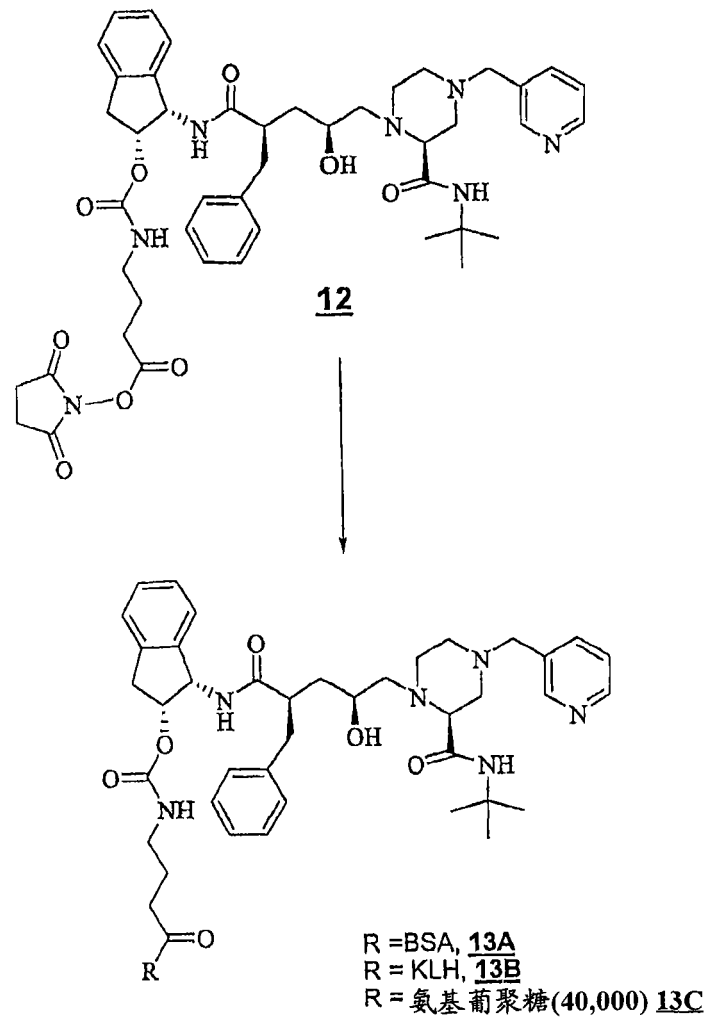


图 6

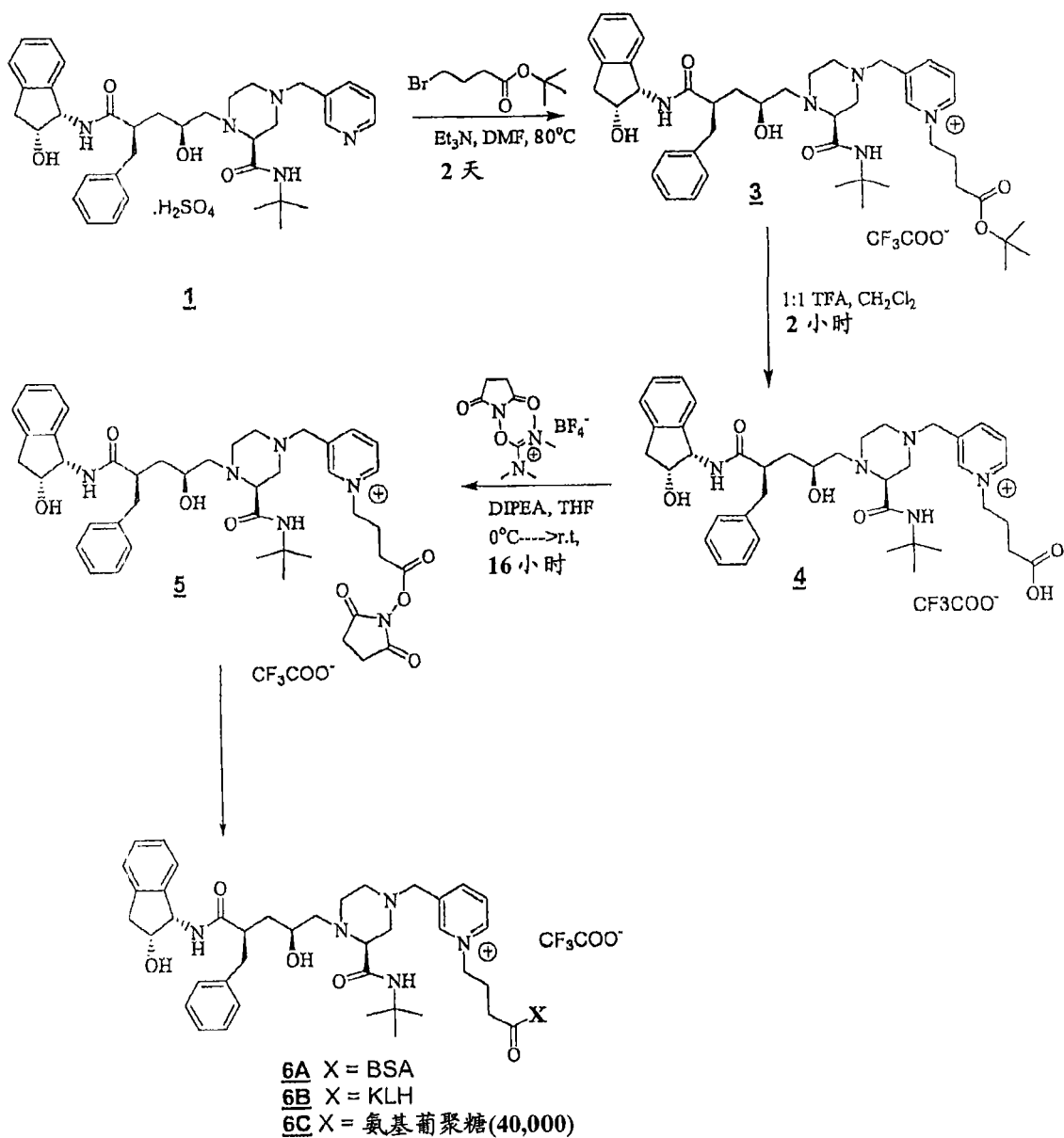


图 7

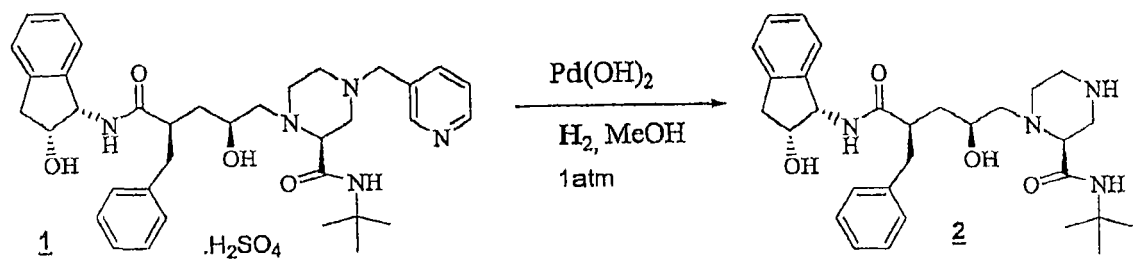


图 8

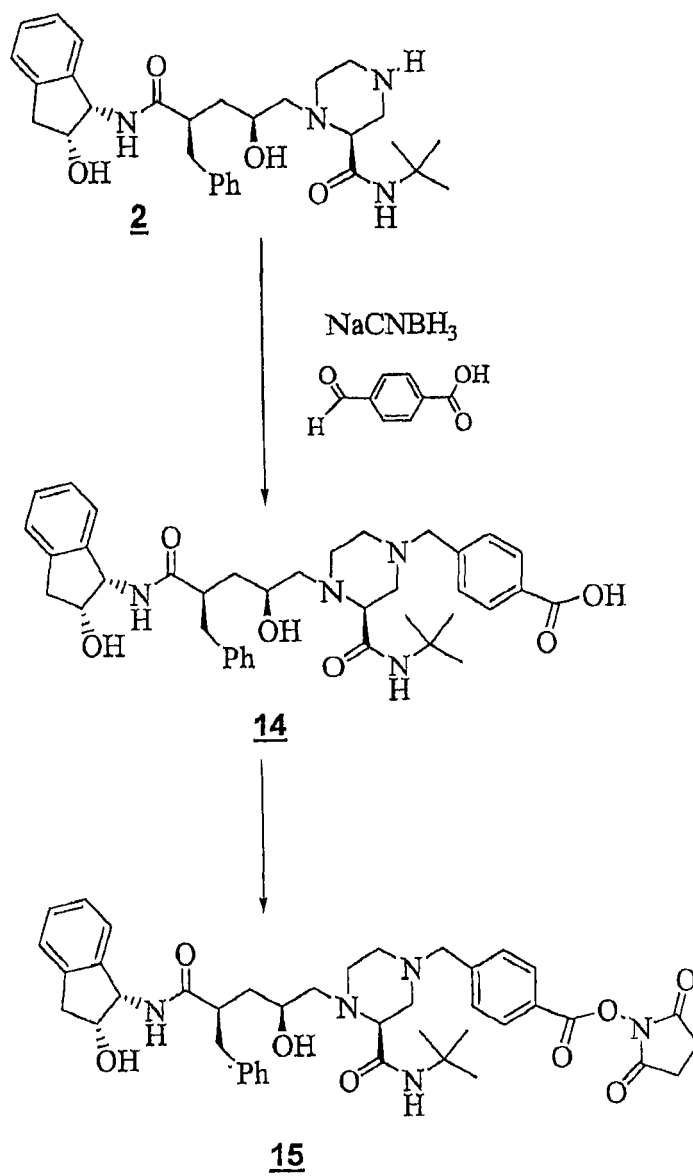


图 9

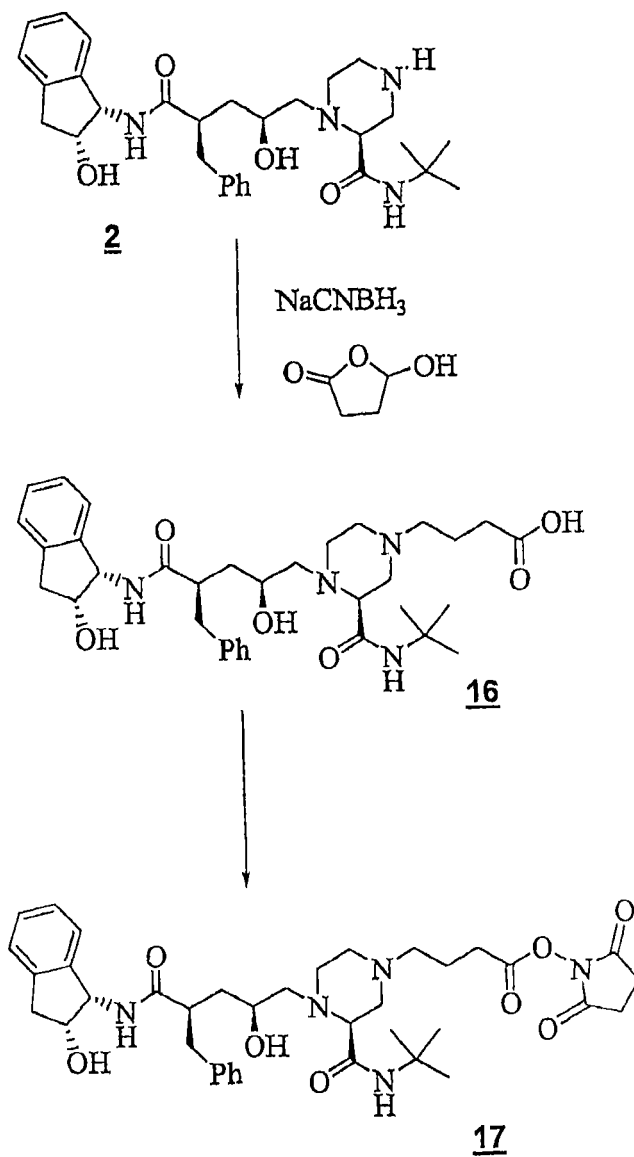


图 10

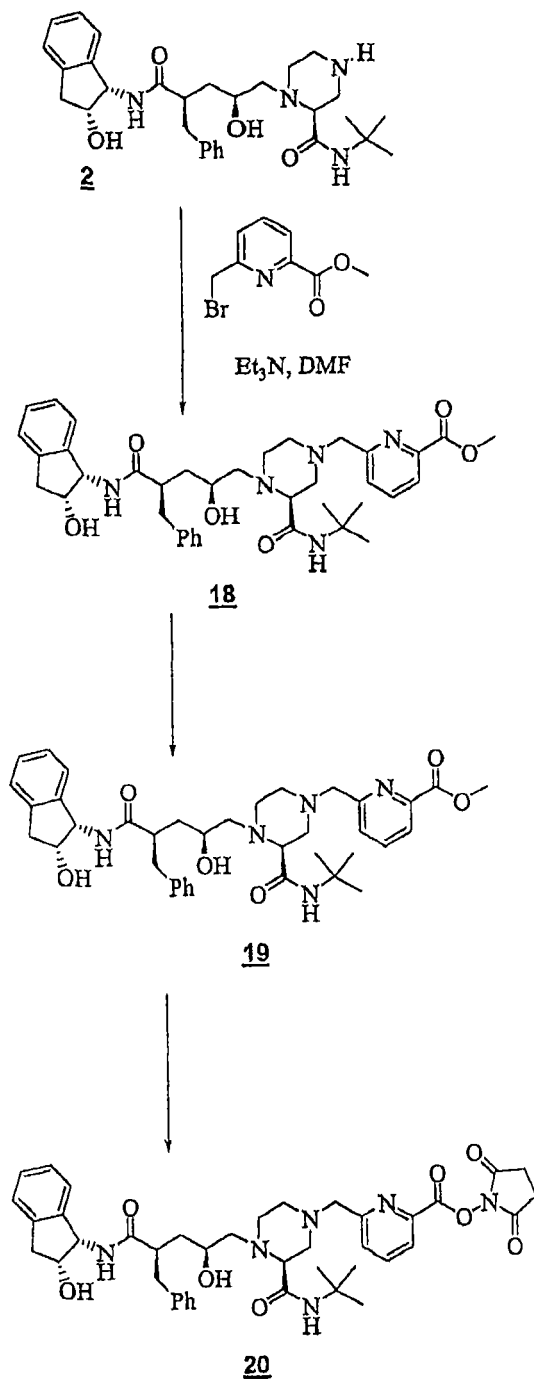


图 11

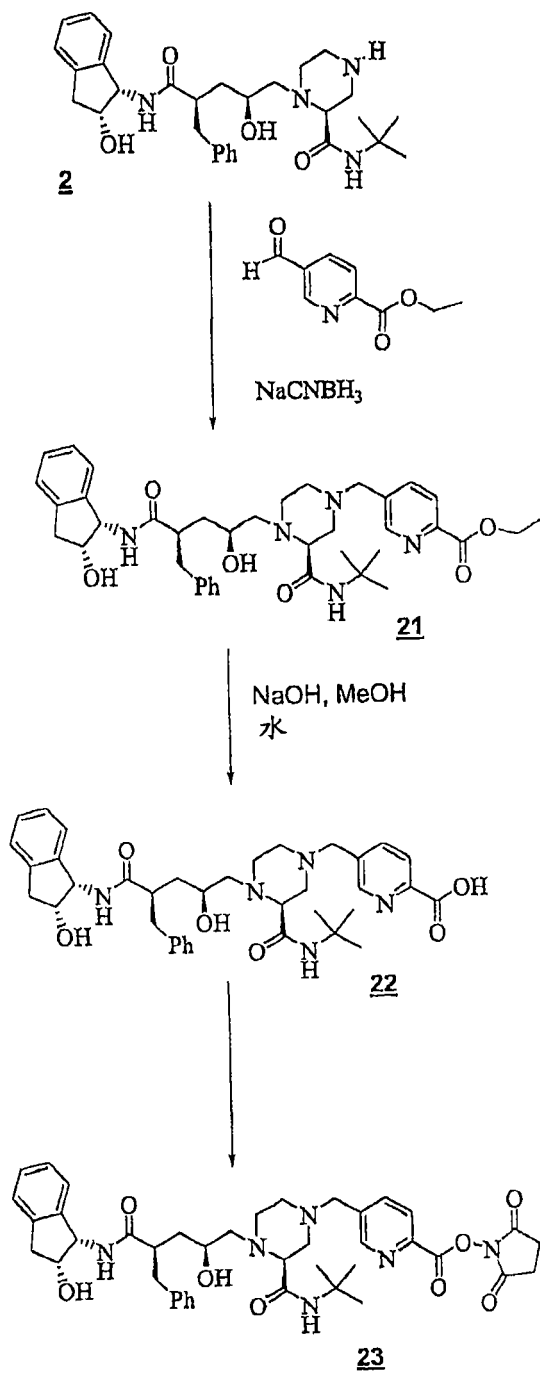


图 12

专利名称(译)	用于免疫测定的茚地那韦衍生物		
公开(公告)号	<a href="#">CN101094841A</a>	公开(公告)日	2007-12-26
申请号	CN200580045889.4	申请日	2005-11-11
申请(专利权)人(译)	霍夫曼-拉罗奇有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	霍夫曼-拉罗奇有限公司		
[标]发明人	M戈沙尔 G西格勒 AP帕特沃德汉		
发明人	M· 戈沙尔 G· 西格勒 A· P· 帕特沃德汉		
IPC分类号	C07D241/04 C07D403/12 C07D401/06 C07K16/36 C07D401/14 G01N33/53 C07K16/38 C07K16/44		
CPC分类号	C07D401/14 C07D403/12 C07D401/06 C07K16/38 C07K16/44 G01N33/94 C07D241/04		
代理人(译)	刘冬 李连涛		
优先权	10/988477 2004-11-12 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

公开了用于产生抗体的茚地那韦衍生物和缀合物以及用于检测生物样品中的茚地那韦的标记缀合物。所述衍生物从茚地那韦的茚满环羟基或吡啶环氮出发合成。还公开了用钯催化剂和氢气从茚地那韦一步合成茚地那韦主要代谢物(M6)。茚地那韦M6用合适的官能团延伸以合成各种茚地那韦类似物。这些衍生物用于开发茚地那韦免疫原、抗体和标记缀合物，以开发茚地那韦免疫测定法。

