



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106166160 A

(43)申请公布日 2016. 11. 30

(21)申请号 201610585970.1

(74)专利代理机构 北京市金杜律师事务所
11256

(22)申请日 2012.09.14

代理人 陈文平 马慧

(30)优先权数据

61/535,885 2011.09.16 US

61/561,753 2011.11.18 US

(51)Int.Cl.

A61K 31/7072(2006.01)

A61K 31/381(2006.01)

A61K 31/4196(2006.01)

A61P 31/14(2006.01)

(62)分案原申请数据

201280053492.X 2012.09.14

(71)申请人 吉利德制药有限责任公司

地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 艾德里安·S·雷

威廉·J·沃特金斯

约翰·O·林克

大卫·W·奥尔达赫

威廉·E·德莱尼四世

权利要求书1页 说明书109页

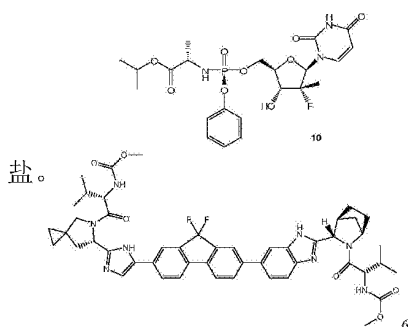
(54)发明名称

用于治疗HCV的组合物

(57)摘要

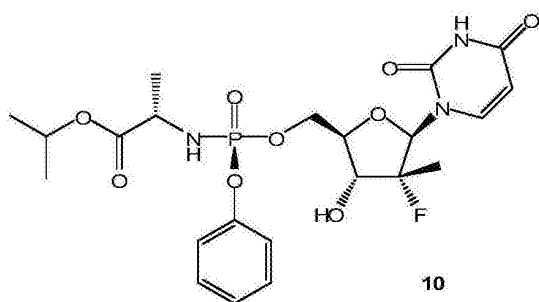
本申请涉及一种组合物,所述组合物包含:

1)具有如下结构的化合物10,或其药物学上可接受的盐,和2)化合物6,或其药物学上可接受的

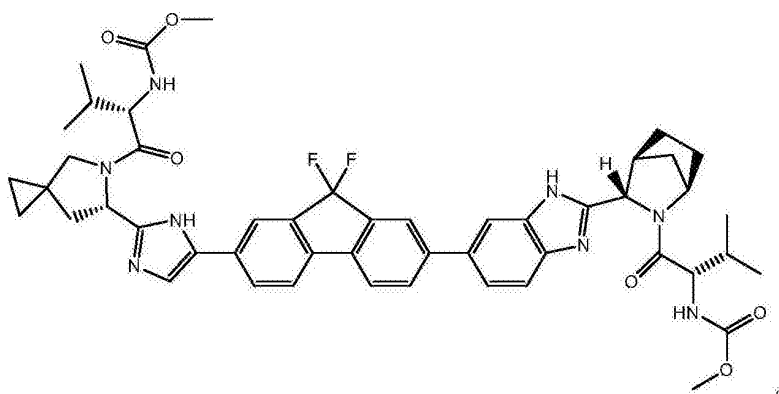


1. 一种组合物, 所述组合物包含:

1) 具有如下结构的化合物10, 或其药物学上可接受的盐



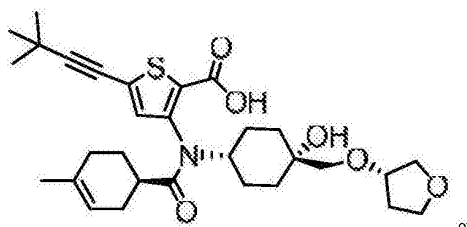
和2) 化合物6, 或其药物学上可接受的盐



2. 根据权利要求1所述的组合物, 所述组合物不含干扰素。

3. 根据权利要求2所述的组合物, 所述组合物不含利巴韦林。

4. 根据权利要求3所述的组合物, 所述组合物进一步包含化合物5, 或其药物学上可接受的盐



用于治疗HCV的组合物

[0001] 本申请是申请日为2012年9月14日、申请号为201280053492.X、发明名称为“用于治疗HCV的方法”的中国发明专利申请的分案申请。

[0002] 本发明的优先权

[0003] 本申请要求2011年9月16日提交的美国临时申请号61/535,885;和2011年11月18日提交的美国临时申请号61/561,753的优先权。将这些临时申请每一篇的全部内容通过引用并入本申请中。

技术领域

[0004] 本发明涉及用于治疗丙肝病毒(HCV)感染的治疗分子的组合。本发明涉及方法、用途、给药方案和组合物。

背景技术

[0005] 肝炎是全世界广泛发生的疾病。肝炎通常是病毒性质的,尽管,如果考虑肝脏慢性炎症的状况,存在其他已知的非传染性诱因。病毒性肝炎是迄今为止最常见的肝炎形式。美国疾控中心已经估算至少1.8%的美国人群具有HCV感染的血清学证据,大部分病例与慢性活性感染相关。HCV是属于黄病毒(Flaviviridae)科的正链RNA病毒并且与包括猪瘟病毒和牛病毒性腹泻病毒的瘟病毒(pestivirus)具有密切关联。

[0006] HCV基因组是编码3009-3030个氨基酸的聚蛋白的约9,600bp的单链、正义RNA,并且其通过细胞和两个病毒蛋白酶在翻译时和翻译后分裂成成熟病毒蛋白(核、E1、E2、p7、NS2、NS3、NS4A、NS4B、NS5A、NS5B)。认为结构蛋白E1和E2包埋在病毒脂质包膜中并且形成稳定的异二聚体。认为结构核蛋白与病毒RNA基因组相互作用,以形成核衣壳。称为NS2至NS5的非结构蛋白包括具有涉及病毒复制和蛋白加工的酶功能的蛋白,所述酶包括聚合酶、蛋白酶和解螺旋酶。HCV通过产生互补负链RNA模板来复制。

[0007] HCV是遗传上变化多的病毒。在单个感染病人内,可以鉴定出许多变体病毒,导致描述“病毒蜂群(viral swarm)”或病毒准种(viral quasispecies)。在全球人群中,HCV在遗传上也是多种多样的,鉴定出了至少6种主要的“基因型”(基因型1-6)和各种亚型(即,HCV基因型1a和1b)。HCV基因型通过基因组系统发育分析来限定,并且通过基于HCV RNA序列的诊断试验来诊断(在指定的病人中)。

[0008] 感染HCV的主要途径是血液暴露。通过高风险组中的发病率来说明作为健康问题的HCV感染规模。例如,在一些调查中,西方国家的60%至90%的血友病患者和超过80%的静脉内药物滥用者带有慢性HCV感染。对于静脉内药物滥用者,根据研究的群体,发病率从约28%至80%。由于药物发展和广泛使用的灵敏血清学及用于筛选捐血者的RNA检测试验,与血液或血液制品输入相关的新HCV感染比例已经显著下降,然而,已经确定了老龄化、慢性感染人员的大群体。

[0009] 一种可利用的HCV感染治疗是PEG化的干扰素- α (PEG-IFN α 1a或PEG-IFN α 1b),即,在目前的治疗指导下,每周通过皮下注射给药,持续24至48周,这取决于待治疗的HCV病毒

基因型。尽管可以预期超过50%的患有基因型1HCV感染的患者在完成48周治疗时具有抑制HCV病毒血症,但这些病人中的很大一部分将具有病毒复发。因此,仅在用单独的PEG-IFN治疗的基因型1HCV感染的30-40%中获得了持续病毒学应答(SVR,限定为治疗停止后24周的HCV RNA阴性,并且认为等于“治愈”)。此外,用PEG-IFN+RBV的治疗不是非常耐受,具有包括流感样症状、血小板减少、贫血和严重的精神病副作用的不良事件谱。尽管使用目前医疗标准的治疗是次佳的,但由于HCV感染群体的共存病(comorbidity)普遍性,许多病人从开始治疗就被排除在外,所述共存病包括精神疾病、晚期肝病和药品滥用。

[0010] 病毒唑是何干类似物抗病毒药物。病毒唑通常每日口服(通过嘴)两次。病毒唑的确切机理是未知的。染色,认为当病毒唑进入细胞时,其被磷酸化;然后其作为肌肝5'-单磷酸脱氢酶(IMPDH)的抑制剂。IMPDH抑制剂(如病毒唑)降低了鸟嘌呤的胞内合成和存储,鸟嘌呤是DNA和RNA产生必需的核苷“构建块”,因此抑制病毒复制。IMPDH抑制剂还干扰快速增殖细胞和具有高蛋白质翻转率(turnover)的细胞的繁殖。使用病毒唑单一疗法的治疗对HCV RNA水平很少起到作用,但与血清丙氨酸转移酶(ALT)的下降有关。这一观察结果表明病毒唑不是作为抗病毒剂,而是作为免疫系统功能的调节剂。病毒唑只批准结合IFN使用,用于HCV感染。

[0011] 使用PEG-ICF加上病毒唑的联合治疗提高了高于单独的PEG-IFN观察到的那些的SVR率,大部分是由于治疗停止时病毒复发频率降低引起的。对于PEG-IFN/病毒唑治疗的患有HCV基因型1感染的病人的大临床试验SVR率为40-55%。目前,认为PEG-IFN/病毒唑疗法是用于慢性HCV感染的“医疗标准”治疗。然而,预期医疗标准在近期快速改变,批准直接作用的抗病毒剂,其最初将结合PEG-IFN/病毒唑使用。

[0012] 不幸地,不同基因型的HCV对PEG-IFN/病毒唑疗法的应答不同;例如,HCV基因型1比型2和3对疗法的抵抗性更大。另外,许多目前用于HCV的治疗产生不希望的副作用。因此,目前对新的抗病毒疗法存在需求。特别地,对产生较少不希望的副作用的、对抗各种HCV基因型更有效的或具有不太复杂的给药时间表(即,在一天过程中需要给药较少次的药剂)的新抗病毒疗法存在需求。

发明内容

[0013] 本发明提供了用于治疗病毒感染(例如,HCV)的组合物和治疗方法。本发明的特定组合物和方法与目前可用疗法相比,产生了较少不希望的副作用、对抗各种HCV基因型更有效、减少由于抗性选择引起的病毒反弹的可能和具有缩短的不太复杂的给药时间表。

[0014] 因此,在一个实施方案中,本发明提供了包含两种或多种选自化合物1、化合物2、化合物3、化合物4、化合物5、化合物6、化合物7、化合物9、化合物10、化合物11、化合物12、化合物13、化合物14、化合物15和化合物16及其药物学上可接受盐的化合物的组合物。

[0015] 在另一个实施方案中,本发明提供了治疗人HCV感染的方法,其包括将选自化合物1、化合物2、化合物3、化合物4、化合物5、化合物6、化合物7、化合物9、化合物10、化合物11、化合物12、化合物13、化合物14、化合物15和化合物16及其药物学上可接受盐的两种或多种化合物给药于人。

[0016] 在另一个实施方案中,本发明提供了用于改善人HCV感染的一种或多种症状的方法,其包括将选自化合物1、化合物2、化合物3、化合物4、化合物5、化合物6、化合物7、化合物

9、化合物10、化合物11、化合物12、化合物13、化合物14、化合物15和化合物16及其药物学上可接受盐的两种或多种化合物给药于人。

[0017] 在另一个实施方案中,本发明提供了用于降低患有HCV的人的病毒载量的方法,其包括将选自化合物1、化合物2、化合物3、化合物4、化合物5、化合物6、化合物7、化合物9、化合物10、化合物11、化合物12、化合物13、化合物14、化合物15和化合物16及其药物学上可接受盐的两种或多种化合物给药于人。

[0018] 在另一个实施方案中,本发明提供了用于降低人体中具有共同给药的口服抗病剂抗性的HCV准种出现的方法,其包括将选自化合物1、化合物2、化合物3、化合物4、化合物5、化合物6、化合物7、化合物9、化合物10、化合物11、化合物12、化合物13、化合物14、化合物15和化合物16及其药物学上可接受盐的两种或多种化合物给药于人。

[0019] 在另一个实施方案中,本发明提供了选自化合物1、化合物2、化合物3、化合物4、化合物5、化合物6、化合物7、化合物9、化合物10、化合物11、化合物12、化合物13、化合物14、化合物15和化合物16及其药物学上可接受盐的两种或多种化合物在医学治疗中的用途。

[0020] 在另一个实施方案中,本发明提供了选自化合物1、化合物2、化合物3、化合物4、化合物5、化合物6、化合物7、化合物9、化合物10、化合物11、化合物12、化合物13、化合物14、化合物15和化合物16及其药物学上可接受盐的两种或多种化合物用于病毒感染(例如,HCV)的预防性或治疗性治疗的用途。

[0021] 在另一个实施方案中,本发明提供了本发明的组合物用于病毒感染(例如,HCV)的预防性或治疗性治疗的用途。

[0022] 在另一个实施方案中,本发明提供了选自化合物1、化合物2、化合物3、化合物4、化合物5、化合物6、化合物7、化合物9、化合物10、化合物11、化合物12、化合物13、化合物14、化合物15和化合物16及其药物学上可接受盐的两种或多种化合物用于制备治疗人病毒(例如,HCV)感染的药物的用途。

[0023] 在另一个实施方案中,本发明提供了本发明的组合物用于制备治疗人病毒(例如,HCV)感染的药物的用途。

[0024] 在另一个实施方案中,本发明提供了选自化合物1、化合物2、化合物3、化合物4、化合物5、化合物6、化合物7、化合物9、化合物10、化合物11、化合物12、化合物13、化合物14、化合物15和化合物16及其药物学上可接受盐的两种或多种化合物用于制备改善人病毒(例如,HCV)感染的一种或多种症状的药物的用途。

[0025] 在另一个实施方案中,本发明提供了本发明的组合物用于制备改善人病毒(例如,HCV)感染的一种或多种症状的药物的用途。

[0026] 在另一个实施方案中,本发明提供了选自化合物1、化合物2、化合物3、化合物4、化合物5、化合物6、化合物7、化合物9、化合物10、化合物11、化合物12、化合物13、化合物14、化合物15和化合物16及其药物学上可接受盐的两种或多种化合物用于制备减少人体中病毒载量的药物的用途。

[0027] 在另一个实施方案中,本发明提供了本发明的组合物用于制备减少人体中病毒载量的药物的用途。

[0028] 在另一个实施方案中,本发明提供了选自化合物1、化合物2、化合物3、化合物4、化合物5、化合物6、化合物7、化合物9、化合物10、化合物11、化合物12、化合物13、化合物14、化

合物15和化合物16及其药物学上可接受盐的两种或多种化合物用于制备减少人体中具有共同给药的口服抗病剂抗性的HCV准种出现的药物的用途。

[0029] 在另一个实施方案中,本发明提供了本发明的组合物用于制备用于减少人体中具有抵抗共同给药口服抗病剂的HCV准种出现的药物的用途。

[0030] 本发明的组合物和方法可以提供“协同作用”和“协同效果”,即活性成分(包括两种或多种组合化合物)一起使用时获得的效果大于分开使用化合物得到的效果的总和。

[0031] 本发明的化合物和组合物是有益的,因为与目前的HCV疗法(例如,包括给药干扰素的治疗)相比,它们提供了用于多种HCV基因型的治疗并且因为它们引起较少或不太严重的副作用。因此,特定的化合物组合(例如,化合物10和5,化合物10和6,以及化合物10、5和6)可以提供显著高于目前的疗法(例如,HCV疗法)获得的持续病毒学应答(SVR)。例如,一些化合物组合可以提供至少约70%或至少约80%的SVR。

[0032] 本发明涉及如下方案:

[0033] 方案1.一种组合物,该组合物包括:1)化合物10或其药物学上可接受的盐和2)化合物5或其药物学上可接受的盐,或化合物6或其药物学上可接受的盐。

[0034] 方案2.根据方案1所述的组合物,所述组合物包括:1)化合物10或其药物学上可接受的盐,和2)化合物5或其药物学上可接受的盐。

[0035] 方案3.根据方案1所述的组合物,所述组合物包括:1)化合物10或其药物学上可接受的盐,和2)化合物6或其药物学上可接受的盐。

[0036] 方案4.根据方案1所述的组合物,所述组合物包括:1)化合物10或其药物学上可接受的盐,2)化合物5或其药物学上可接受的盐,和3)化合物6或其药物学上可接受的盐。

[0037] 方案5.根据方案1-4中任一项所述的组合物,所述组合物进一步包含一种或多种药物学上可接受的稀释剂或载体。

[0038] 方案6.根据方案5所述的组合物,所述组合物被配制用于每日给药一次的单位剂型。

[0039] 方案7.根据方案5-6中任一项所述的组合物,所述组合物被配制用于口服给药。

[0040] 方案8.根据方案5-7中任一项所述的组合物,所述组合物被配制成片剂。

[0041] 方案9.根据方案1-8中任一项所述的组合物,所述组合物进一步包含病毒唑。

[0042] 方案10.一种治疗人HCV感染的方法,该方法包括将以下组合物给药于人:1)化合物10或其药物学上可接受的盐,和2)化合物5或其药物学上可接受的盐,或化合物6或其药物学上可接受的盐。

[0043] 方案11.根据方案10所述的方法,其中,给药:1)化合物10或其药物学上可接受的盐,和2)化合物5或其药物学上可接受的盐。

[0044] 方案12.根据方案10所述的方法,其中,给药:1)化合物10或其药物学上可接受的盐,和2)化合物6或其药物学上可接受的盐。

[0045] 方案13.根据方案10所述的方法,其中,给药:1)化合物10或其药物学上可接受的盐,2)化合物5或其药物学上可接受的盐,和3)化合物6或其药物学上可接受的盐。

[0046] 方案14.根据方案10所述的方法,其中将方案1-8中任一项所述的组合物给药于人。

[0047] 方案15.一种改善人HCV感染的一种或多种症状的方法,该方法包括将以下组合物

给药于人：1)化合物10或其药物学上可接受的盐，和2)化合物5或其药物学上可接受的盐，或化合物6或其药物学上可接受的盐。

[0048] 方案16.根据方案15所述的方法，其中，给药：1)化合物10或其药物学上可接受的盐，和2)化合物5或其药物学上可接受的盐。

[0049] 方案17.根据方案15所述的方法，其中，给药：1)化合物10或其药物学上可接受的盐，和2)化合物6或其药物学上可接受的盐。

[0050] 方案18.根据方案15所述的方法，其中，给药：1)化合物10或其药物学上可接受的盐，2)化合物5或其药物学上可接受的盐，和3)化合物6或其药物学上可接受的盐。

[0051] 方案19.根据方案15所述的方法，其中将方案1-8中任一项所述的组合物给药于人。

[0052] 方案20.一种降低患有HCV的人体内病毒载量的方法，该方法包括将以下组合物给药于人：1)化合物10或其药物学上可接受的盐，和2)化合物5或其药物学上可接受的盐，或化合物6或其药物学上可接受的盐。

[0053] 方案21.根据方案20所述的方法，其中，给药：1)化合物10或其药物学上可接受的盐，和2)化合物5或其药物学上可接受的盐。

[0054] 方案22.根据方案20所述的方法，其中，给药：1)化合物10或其药物学上可接受的盐，和2)化合物6或其药物学上可接受的盐。

[0055] 方案23.根据方案20所述的方法，其中，给药：1)化合物10或其药物学上可接受的盐，2)化合物5或其药物学上可接受的盐，和3)化合物6或其药物学上可接受的盐。

[0056] 方案24.根据方案20所述的方法，其中将方案1-8中任一项所述的组合物给药于人。

[0057] 方案25.一种用于降低人体中具有共同给药的口服抗病剂抗性的HCV准种出现的方法，该方法包括将以下组合物给药于人：1)化合物10或其药物学上可接受的盐，和2)化合物5或其药物学上可接受的盐，或化合物6或其药物学上可接受的盐。

[0058] 方案26.根据方案25所述的方法，其中，给药：1)化合物10或其药物学上可接受的盐，和2)化合物5或其药物学上可接受的盐。

[0059] 方案27.根据方案25所述的方法，其中，给药：1)化合物10或其药物学上可接受的盐，和2)化合物6或其药物学上可接受的盐。

[0060] 方案28.根据方案25所述的方法，其中，给药：1)化合物10或其药物学上可接受的盐，2)化合物5或其药物学上可接受的盐，和3)化合物6或其药物学上可接受的盐。

[0061] 方案29.根据方案25所述的方法，其中将方案1-8中任一项所述的组合物给药于人。

[0062] 方案30.根据方案10-29中任一项所述的方法，其中没有将干扰素给药于人。

[0063] 方案31.根据方案10-29中任一项所述的方法，所述方法进一步包括将干扰素给药于人。

[0064] 方案32.根据方案10-29中任一项所述的方法，所述方法进一步包括将一种或多种选自病毒唑、干扰素、 α -葡糖苷酶1抑制剂、保肝药、TLR-7激动剂、亲环蛋白抑制剂、HCV病毒进入抑制剂、HCV成熟抑制剂和HCV IRES抑制剂的其他药剂给药于人。

[0065] 方案33.根据方案1-9中任一项所述的组合物，所述组合物用于医学治疗中。

- [0066] 方案34.根据方案1-9中任一项所述的组合物,所述组合物用于HCV感染的预防性或治疗性治疗中。
- [0067] 方案35.方案1-9中任一项所述的组合物用于制备治疗人HCV感染的药物的用途。
- [0068] 方案36.方案1-9中任一项所述的组合物用于制备改善人HCV感染的一种或多种症状的药物的用途。
- [0069] 方案37.根据方案1-9中任一项所述的组合物,所述组合物用于降低病毒载量。
- [0070] 方案38.方案1-9中任一项所述的组合物用于制备降低人体中病毒载量的药物的用途。
- [0071] 方案39.根据方案1-9中任一项所述的组合物,所述组合物用于降低具有共同给药的口服抗病剂抗性的HCV准种的出现。
- [0072] 方案40.方案1-9中任一项所述的组合物用于制备降低人体中具有共同给药的口服抗病剂抗性的HCV准种出现的药物的用途。
- [0073] 方案41.根据方案34、37或39所述的组合物,所述组合物没有与干扰素一起给药。
- [0074] 方案42.根据方案34、37或39所述的组合物,所述组合物与干扰素一起给药。
- [0075] 方案43.根据方案34、37或39所述的组合物,所述组合物与一种或多种选自病毒唑、干扰素、 α -葡糖苷酶1抑制剂、保肝药、TLR-7激动剂、亲环蛋白抑制剂、HCV病毒进入抑制剂、HCV成熟抑制剂和HCV IRES抑制剂的其他药剂一起给药。
- [0076] 方案44.根据方案35、36、38或40中任一项所述的用途,其中所述药物没有与干扰素一起给药。
- [0077] 方案45.根据方案35、36、38或40中任一项所述的用途,其中所述药物与干扰素一起给药。
- [0078] 方案46.根据方案35、36、38或40中任一项的用途,其中所述药物与一种或多种选自病毒唑、干扰素、 α -葡糖苷酶1抑制剂、保肝药、TLR-7激动剂、亲环蛋白抑制剂、HCV病毒进入抑制剂、HCV成熟抑制剂和HCV IRES抑制剂的其他药剂一起给药。

具体实施方式

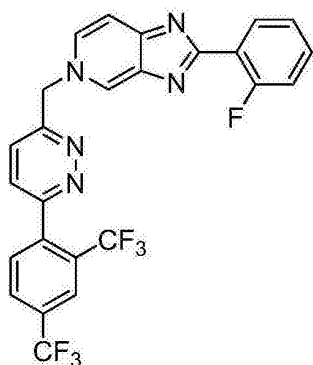
[0079] 定义

[0080] 除非另外指出,本文中使用的以下术语和短语确定具有以下含义。事实是没有具体限定的特定术语或短语不应当与不明确或不清楚相关联,而是本文中的术语在其普通含义内使用。当本文中使用的商品名时,申请人打算独立地包括商品名产品和商品名产品的活性药物成分。

[0081] 如本文中所用的,术语“组合化合物”是指化合物1、化合物2、化合物3、化合物4、化合物5、化合物6、化合物7、化合物9、化合物10、化合物11、化合物12、化合物13、化合物14、化合物15和化合物16。

[0082] 如本文中所用的,化合物1是:

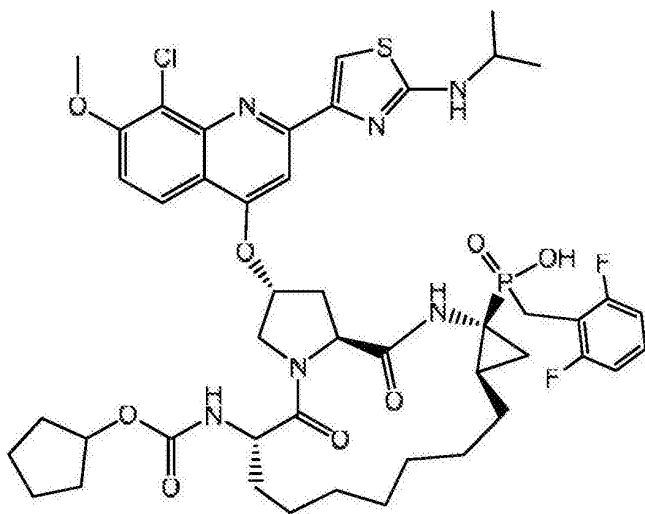
[0083]



[0084] 化合物1还可以称为5-((6-(2,4-双(三氟甲基)苯基)吡嗪-3-基)甲基)-2-(2-氟苯基)-5H-咪唑并[4,5-c]吡啶或5H-咪唑并[4,5-c]吡啶,5-[[6-[2,4-双(三氟甲基)苯基]吡嗪-3-基]甲基]2-(2-氟苯基)。

[0085] 如本文中所用的,化合物2是:

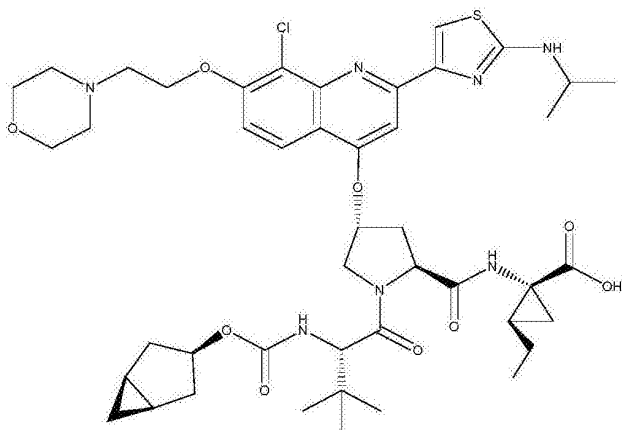
[0086]



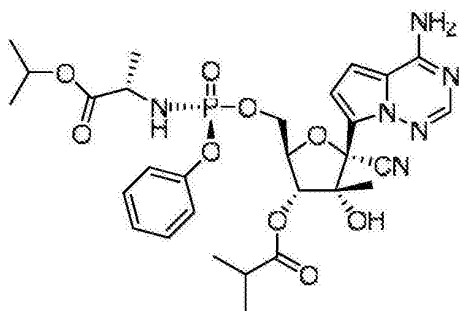
[0087] 化合物2还可以称为(2R,6S,13aR,14aS,16aS)-2-(8-氯-2-(2-(异丙基氨基)噻唑-4-基)-7-甲氧基喹啉-4-基氧)-6-(环丙基氧羰基氨基)-5,16-二氧十八氢环丙烷并[e]吡咯并[1,2-a][1,4]二氮杂环戊癸炔-14a-基(2,6-二氟苄基)次膦酸。

[0088] 如本文中所用的,化合物3是:

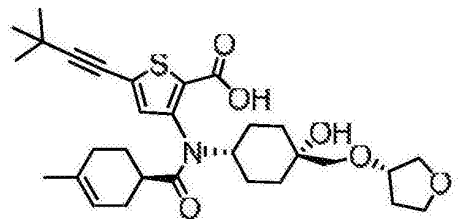
[0089]



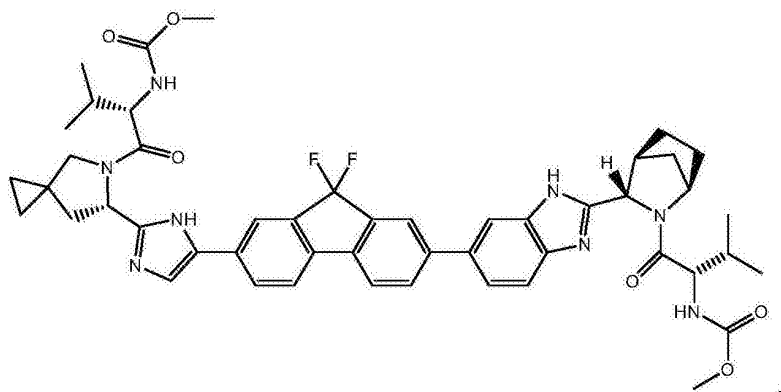
[0090] 如本文中所用的,化合物4是:



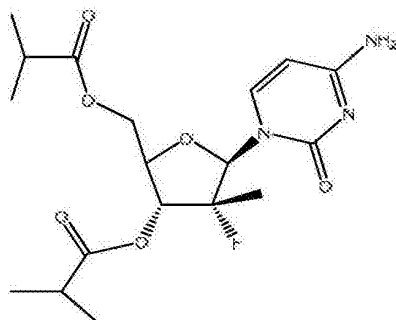
[0092] 如本文中所用的, 化合物5是:



[0094] 如本文中所用的, 化合物6是:

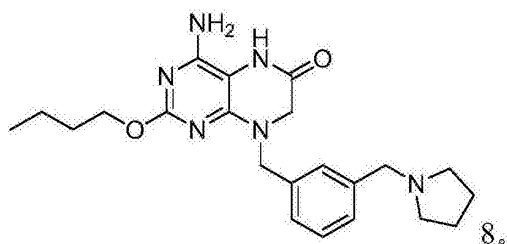


[0096] 如本文中所用的, 化合物7是:



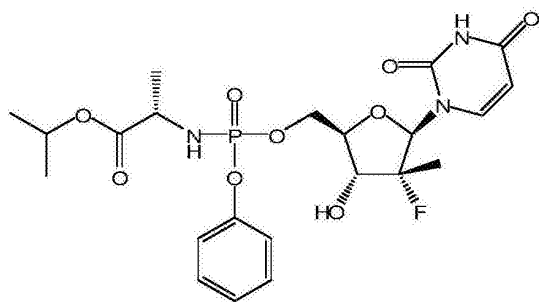
[0098] 如本文中所用的,化合物8是:

[0099]



[0100] 如本文中所用的,化合物9(在P处的非对映异构体)是:

[0101]

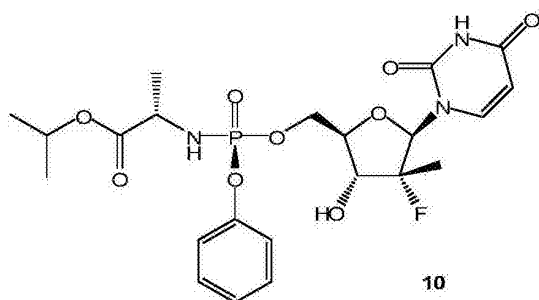


9。

[0102] 关于化合物9,关于化合物9的制造和纯化,参考US 7,964,580和US 2010/0298257(将两篇都通过引用并入)。

[0103] 如本文中所用的,化合物10(化合物9的S-异构体)是:

[0104]

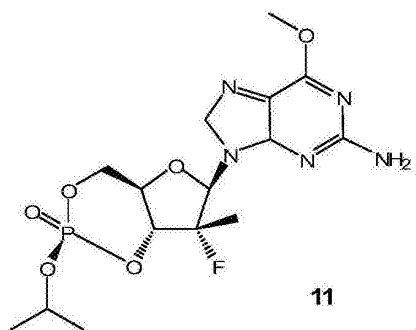


10

[0105] 关于化合物10,关于化合物10的制造和纯化,参考US 7,964,580和US 2010/0298257(将两篇都通过引用并入)。

[0106] 如本文中所用的,化合物11是:

[0107]

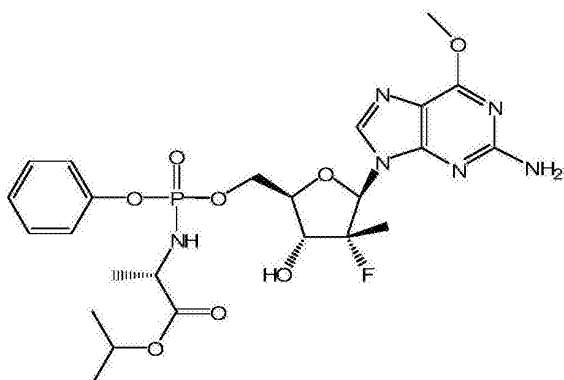


11

[0108] 关于化合物11,关于化合物11的制造和纯化,参考US 2010/0081628(将其通过引用并入)。

[0109] 如本文中所用的,化合物12(在P处的非对映异构体)是:

[0110]

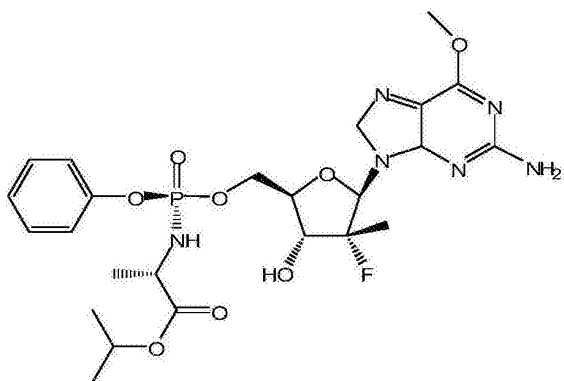


12。

[0111] 关于化合物12,关于化合物12的制造和纯化,参考US 20110015146(将其通过引用并入)。

[0112] 如本文中所用的,化合物13(化合物12在P处的S-非对映异构体):

[0113]

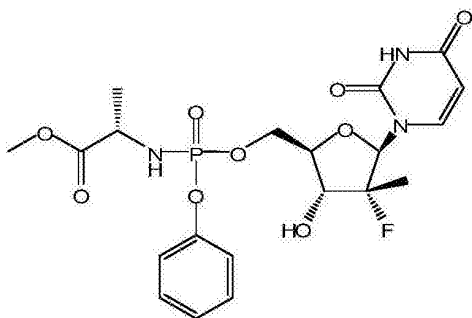


13。

[0114] 关于化合物13,关于化合物13的制造和纯化,参考US 20110015146(将其通过引用并入)。

[0115] 如本文中所用的,化合物14是:

[0116]

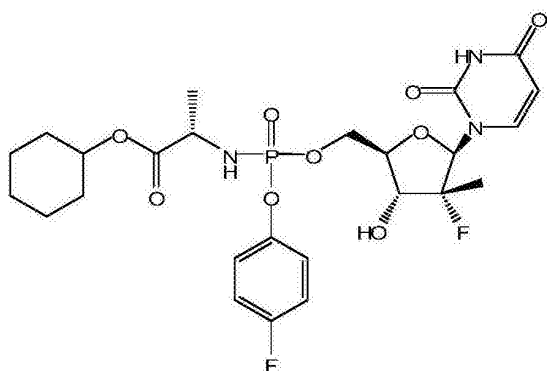


14。

[0117] 关于化合物14,关于化合物14的制造和纯化,参考US 7,964,580(将其通过引用并入)。

[0118] 如本文中所用的,化合物15是:

[0119]

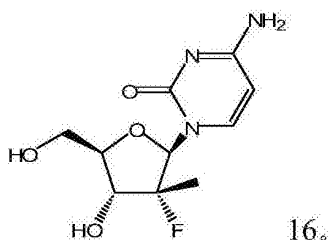


15。

[0120] 关于化合物15,关于化合物15的制造和纯化,参考US 7,964,580(将其通过引用并入)。

[0121] 如本文中所用的,化合物16是:

[0122]

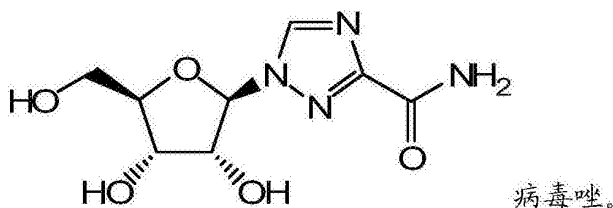


16。

[0123] 关于化合物16,关于化合物16的制造和纯化,参考US 7,429,572(将其通过引用并入)。

[0124] 关于病毒唑,关于涉及病毒唑的制造方法以及命名,参考EP 0 093 401B1,通过引用并入本文中。如本文中所用的,病毒唑是指:

[0125]



病毒唑。

[0126] 病毒唑也称为1-β-D-呋喃核昔(ribofuranosyl)-1H-1,2,4-噁唑-3-甲酰胺、1-β-D-呋喃核昔-1,2,4-噁唑-3-甲酰胺;1-β-D-呋喃核昔-1,2,4-噁唑-3-甲酰胺;利巴韦林(罗氏);DRG-0028;HSDB 6513;ICN 1229;Mega病毒唑(例如,在100mg病毒唑/mL的制剂中);NSC 163039;RAVANEX(BioPartners);REBETOL(先灵葆雅;Aesca;拜耳先灵医药;埃塞克斯;辉瑞;Trading Pharma;永裕医药);Ribamide;RIBAMIDIL(Biopharma,俄国);RIBASPHERE(三河制药);三氮唑核昔;噁唑核昔;三氮唑核昔;VILONA(Valeant Pharmaceuticals;ICN Pharmaceuticals);VIRAMID(ICN Pharmaceuticals;阿尔法韦士曼);VIRAZOLE(Valeant Pharmaceuticals);和VIRIZADOLE(Uci-farma,Sao Bernardo do Campo,Sao Paulo,Brazil)。此外,如本文中所用的,病毒唑包括病毒唑的类似物,包括taribavirin(VIRAMIDINE,ICN 3142)。

[0127] 术语“干扰素”包括1)干扰素类,例如,PEG化的rIFN-α2b(PEG-Intron,Merck&Co., Inc.),PEG化的rIFN-α2a(PEGASYS,Hoffmann-La Roche Inc.),rIFN-α2b(INTRON®A, Merck&Co., Inc.),rIFN-α2a(Roferon®-A,Hoffmann-La Roche Inc.),干扰素α(

MULTIFERON®Viranative AB Corporation, OPC-18, Alfaferone, Alfa native, subalin), 复合干扰素(interferon alfacon-1)(Valeant), 干扰素 α -n1(Wellferon™, Glaxo Wellcome), 干扰素 α -n3(ALFERON®-Hemispherx Biopharma, Inc.), 干扰素- β -1a(AVONEX®Biogen Idec, DL-8234 Daiichi Pharmaceutical Co. Ltd), 干扰素- ω (omega DUROS®, Alza Corporation, Intarcia Therapeutics, Inc.; Biomed 510, Intarcia Therapeutics, Inc.), albinferon α -2b(ALBUFERON®, Human Genome Sciences, INC.), IFN α -2b XL, BLX-883(LOCTERON®, Bioplex Therapeutics, INC.), DA-3021, 糖基化干扰素 α -2b(AVI-005), PEG-INFERGEN®, Amgen, Inc., PEG化干扰素 λ -1(III型)(PEG化 IL-29)和BELEROFON®, Nautilus Biotech.

[0128] 术语“联合疗法”意思是结合两种或多种组合化合物的组合物或方法或用途等。联合疗法除了两种或多种组合化合物以外,还可以结合其他活性成分,包括但不限于,病毒唑、干扰素、 α -葡萄糖苷酶1抑制剂、保肝药、Toll-样受体(TLR)-7激动剂、亲环蛋白(cyclophilin)抑制剂、HCV病毒进入抑制剂、HCV成熟抑制剂和HCV IRES抑制剂。

[0129] 术语“活性成分”意思是发挥或能够发挥药物作用的联合疗法的成分,包括组合物化合物、病毒唑、干扰素、 α -葡萄糖苷酶1抑制剂、保肝药、TLR-7激动剂、亲环蛋白抑制剂、HCV病毒进入抑制剂、HCV成熟抑制剂和HCV IRES抑制剂中的任何一种。

[0130] 术语“治疗”及其语法等价体,当在治疗疾病的背景中使用,表示减缓或停止疾病进展,或改善至少一种疾病症状,更优选改善超过一种疾病的症状。例如,HCV病人可以经历与HCV感染相关的以下症状的一种或全部的改善:丙氨酸氨基转移酶(ALT)水平的提高、发烧、头痛、肌肉痛、黄疸、疲劳、失去食欲、恶心、呕吐和腹泻。丙肝病毒感染的治疗可以包括降低HCV感染人体中的HCV病毒载量。

[0131] 本文中公开的特定化合物含有一个或多个手性中心,或可以另外能够作为多种立体异构体存在。本发明的范围包括立体异构体的混合物以及纯化的对映异构体或对映异构/非对映异构富集的混合物。本发明范围内还包括的是本文中所示通式表示的化合物的单独异构体,及其任何完全或部分平衡的混合物。本发明还包括本文中所示通式表示的化合物的单独异构体作为与其其中一个或多个手性中心颠倒的异构体的混合物。本文中所用的立体异构化学定义和通常地遵循S.P. Parker编辑, McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms(1984) McGraw-Hill Book Company, New York; 以及 Eliel, E. 和 Wilen, S., Stereochemistry of Organic Compounds(1994) John Wiley & Sons, Inc., New York, 将其全部通过引用合并入本文中。

[0132] 许多有机化合物以光学活性形式存在,即,它们具有旋转平面偏振光的平面的能力。在描述光学活性化合物中,前缀D和L或R和S用于表示关于手性中心的分子的绝对构型。前缀d和l或(+)和(-)用于表示平面偏振光被化合物旋转的标记,(-)或l表示化合物是左旋的。具有前缀(+)或d的化合物是右旋的。

[0133] 特定的立体异构体也可以称为对映异构体,并且这样的异构体的混合物常常称为对映异构体混合物。50:50的对映异构体混合物称为外消旋混合或外消旋物,在化学反应或过程中没有立体选择或立体特异性的情况中可以产生。术语“外消旋混合物”和“外消旋物”是指两种对映异构体物质的等摩尔混合物,无光学活性。

[0134] 组合

[0135] 本发明包括两种或多种组合化合物的组合。以下提供了显示了本发明的化合物1、化合物2、化合物3、化合物4、化合物5、化合物6、化合物7、化合物9、化合物10、化合物11、化合物12、化合物13、化合物14、化合物15和化合物16的可能的双向(组合1-21)、三向(组合22-56)、四向(组合57-92)和五向(组合93-113)组合的表I。化合物4、化合物9、化合物10、化合物11、化合物12、化合物13、化合物14、化合物15和化合物16是HCV NS5b聚合酶的核苷抑制剂,并且组合化合物的组合最常见是只包括化合物4、化合物9、化合物10、化合物11、化合物12、化合物13、化合物14、化合物15和化合物16中的一种(参见表I的第6栏)。

[0136] 表I

[0137]

		化合物 1	化合物 2	化合物 3	化合物 4 或 化合物 9 或 化合物 10 或 化合物 11 或化合物 12 或 化合物 13 或化合物 14 或化合物 15 或 化合物 16	化合物 5	化合物 6	化合物 7
组合	1	X	X					
组合	2	X		X				
组合	3	X			X			
组合	4	X				X		
组合	5	X					X	
组合	6	X						X
组合	7		X	X				
组合	8		X		X			
组合	9		X			X		
组合	10		X				X	
组合	11		X					X
组合	12			X	X			
组合	13			X		X		
组合	14			X			X	
组合	15			X				X
组合	16				X	X		

[0138]

组合	17				X		X	
组合	18				X			X
组合	19					X	X	
组合	20					X		X
组合	21						X	X
组合	22	X	X	X				
组合	23	X	X		X			
组合	24	X	X			X		
组合	25	X	X				X	
组合	26	X	X					X
组合	27	X		X	X			
组合	28	X		X		X		
组合	29	X		X			X	
组合	30	X		X				X
组合	31	X			X	X		
组合	32	X			X		X	
组合	33	X			X			X
组合	34	X				X	X	
组合	35	X				X		X
组合	36	X					X	X
组合	37		X	X	X			
组合	38		X	X		X		
组合	39		X	X			X	
组合	40		X	X				X
组合	41		X		X	X		
组合	42		X		X		X	
组合	43		X		X			X
组合	44		X			X	X	
组合	45		X			X		X
组合	46		X				X	X
组合	47			X	X	X		
组合	48			X	X		X	
组合	49			X	X			X
组合	50			X		X	X	
组合	51			X		X		X
组合	52			X			X	X
组合	53				X	X	X	

[0139]

组合	54				X	X		X
组合	55				X		X	X
组合	56					X	X	X
组合	57	X	X	X	X			
组合	58	X	X	X		X		
组合	59	X	X	X			X	
组合	60	X	X	X				X
组合	61	X	X		X	X		
组合	62	X	X		X		X	
组合	63	X	X		X			X
组合	64	X	X			X	X	
组合	65	X	X			X		X
组合	66	X	X				X	X
组合	67	X		X	X	X		
组合	68	X		X	X		X	
组合	69	X		X	X			X
组合	70	X		X		X	X	
组合	71	X		X		X		X
组合	72	X		X			X	X
组合	73	X			X	X	X	
组合	74	X			X	X		X
组合	75	X			X		X	X
组合	76	X				X	X	X
组合	77		X	X	X	X		
组合	78		X	X	X		X	
组合	79		X	X	X			X
组合	80		X	X		X	X	
组合	81		X	X		X		X
组合	82		X	X			X	X
组合	83		X		X	X	X	
组合	84		X		X	X		X
组合	85		X		X		X	X
组合	86		X			X	X	X
组合	87			X	X	X	X	
组合	88			X	X	X		X
组合	89			X	X		X	X
组合	90			X		X	X	X

[0140]

组合	91				X	X	X	X
组合	92							
组合	93	X	X	X	X	X		
组合	94	X	X	X	X		X	
组合	95	X	X	X	X			X
组合	96	X	X	X		X	X	
组合	97	X	X	X		X		X
组合	98	X	X	X			X	X
组合	99	X	X		X	X	X	
组合	100	X	X		X	X		X
组合	101	X	X		X		X	X
组合	102	X	X			X	X	X
组合	103	X		X	X	X	X	
组合	104	X		X	X	X		X
组合	105	X		X	X		X	X
组合	106	X		X		X	X	X
组合	107	X			X	X	X	X
组合	108		X	X	X	X	X	
组合	109		X	X	X	X		X
组合	110		X	X	X		X	X
组合	111		X	X		X	X	X
组合	112		X		X	X	X	X
组合	113			X	X	X	X	X

[0141] 组合物

[0142] 本发明的一个方面包括一种组合物,例如,药物组合物,该组合物包含化合物1,并且进一步包含选自由化合物2、化合物3、化合物4、化合物5、化合物6、化合物7、化合物9、化合物10、化合物11、化合物12、化合物13、化合物14、化合物15和化合物16组成的组的第二种化合物。在本发明的一个特定实施方案中,第二种化合物可以是化合物2、化合物3、化合物4、化合物5或化合物6。

[0143] 本发明的另一个方面包括一种组合物,例如,药物组合物,该组合物包含化合物2,并且进一步包含选自由化合物1、化合物3、化合物4、化合物5、化合物6、化合物7、化合物9、化合物10、化合物11、化合物12、化合物13、化合物14、化合物15和化合物16组成的组的第二种化合物。在本发明的一个特定实施方案中,第二种化合物可以是化合物4。在本发明的一个特定实施方案中,第二种化合物可以是化合物3。在本发明的一个特定实施方案中,第二种化合物可以是化合物5。

[0144] 本发明的另一个方面包括一种组合物,例如,药物组合物,该组合物包含化合物3,并且进一步包含选自由化合物1、化合物2、化合物4、化合物5、化合物6、化合物7、化合物9、化合物10、化合物11、化合物12、化合物13、化合物14、化合物15和化合物16组成的组的第二种化合物。在本发明的一个特定实施方案中,第二种化合物可以是化合物1。在本发明的一个特定实施方案中,第二种化合物可以是化合物4。在本发明的一个特定实施方案中,第二

种化合物可以是化合物5。在本发明的一个特定实施方案中,第二种化合物可以是化合物6。

[0145] 本发明的另一个方面包括一种组合物,例如,药物组合物,该组合物包含选自化合物4的第一种组合物,并且进一步包含选自由化合物1、化合物2、化合物3、化合物5、化合物6、化合物7组成的组的第二种化合物。在本发明的一个特定实施方案中,第二种化合物可以是化合物1或化合物2或化合物3或化合物6。在本发明的一个特定实施方案中,第二种化合物可以是化合物1。在本发明的一个特定实施方案中,第二种化合物可以是化合物2。在本发明的一个特定实施方案中,第二种化合物可以是化合物3。在本发明的一个特定实施方案中,第二种化合物可以是化合物5。在本发明的一个特定实施方案中,第二种化合物可以是化合物6。

[0146] 本发明的另一个方面包括一种组合物,例如,药物组合物,该组合物包含化合物5,并且进一步包含选自由化合物1、化合物2、化合物3、化合物4、化合物6、化合物7、化合物9、化合物10、化合物11、化合物12、化合物13、化合物14、化合物15和化合物16组成的组的第二种化合物。在本发明的一个特定实施方案中,第二种化合物可以是化合物1。在本发明的一个特定实施方案中,第二种化合物可以是化合物6。

[0147] 本发明的另一个方面包括一种组合物,例如,药物组合物,该组合物包含化合物6,并且进一步包含选自由化合物1、化合物2、化合物3、化合物4、化合物5、化合物7、化合物9、化合物10、化合物11、化合物12、化合物13、化合物14、化合物15和化合物16组成的组的第二种化合物。在本发明的一个特定实施方案中,第二种化合物可以是化合物1。在本发明的一个特定实施方案中,第二种化合物可以是化合物2。在本发明的一个特定实施方案中,第二种化合物可以是化合物3。在本发明的一个特定实施方案中,第二种化合物可以是化合物4。

[0148] 本发明的另一个方面包括一种组合物,例如,药物组合物,该组合物包含化合物7,并且进一步包含选自由化合物1、化合物2、化合物3、化合物4、化合物5、化合物6、化合物9、化合物10、化合物11、化合物12、化合物13、化合物14、化合物15和化合物16组成的组的第二种化合物。

[0149] 本发明的另一个方面包括一种组合物,例如,药物组合物,该组合物包含选自由化合物9、化合物10、化合物11、化合物12、化合物13、化合物14、化合物15和化合物16组成的组的第一种化合物,并且进一步包含选自由化合物1、化合物2、化合物3、化合物5、化合物6和化合物7组成的组的第二种化合物。

[0150] 本发明的另一个方面包括一种组合物,例如,药物组合物,该组合物包含化合物1,并且进一步包含各自选自由化合物2、化合物3、化合物4、化合物5、化合物6、化合物7、化合物9、化合物10、化合物11、化合物12、化合物13、化合物14、化合物15和化合物16组成的组的第二种化合物和第三种化合物。第二种化合物可以是化合物3或化合物4或化合物5或化合物6。第二种化合物可以是化合物2,并且第三种化合物可以是化合物4。第二种化合物可以是化合物3,并且第三种化合物可以是化合物4。第二种化合物可以是化合物2,并且第三种化合物可以是化合物6。第二种化合物可以是化合物3,并且第三种化合物可以是化合物6。第二种化合物可以是化合物4,并且第三种化合物可以是化合物6。第二种化合物可以是化合物2,并且第三种化合物可以是化合物3。第二种化合物可以是化合物2,并且第三种化合物可以是化合物5。第二种化合物可以是化合物3,并且第三种化合物可以是化合物5。

[0151] 本发明的另一个方面包括一种组合物,例如,药物组合物,该组合物包含化合物2,

并且进一步包含各自选自由化合物1、化合物3、化合物4、化合物5、化合物6、化合物7、化合物9、化合物10、化合物11、化合物12、化合物13、化合物14、化合物15和化合物16组成的组的第二种化合物和第三种化合物。第二种化合物可以是化合物4。第二种化合物可以是化合物1,并且第三种化合物可以是化合物4。第二种化合物可以是化合物1,并且第三种化合物可以是化合物6。第二种化合物可以是化合物4,并且第三种化合物可以是化合物6。第二种化合物可以是化合物3,并且第三种化合物可以是化合物4。第二种化合物可以是化合物3,并且第三种化合物可以是化合物5。第二种化合物可以是化合物3,并且第三种化合物可以是化合物6。

[0152] 本发明的另一个方面包括一种组合物,例如,药物组合物,该组合物包含化合物3,并且进一步包含各自选自由化合物1、化合物2、化合物4、化合物5、化合物6、化合物7、化合物9、化合物10、化合物11、化合物12、化合物13、化合物14、化合物15和化合物16组成的组的第二种化合物和第三种化合物。第二种化合物可以是化合物1或化合物6。第二种化合物可以是化合物1,并且第三种化合物可以是化合物4。第二种化合物可以是化合物1,并且第三种化合物可以是化合物6。第二种化合物可以是化合物4,并且第三种化合物可以是化合物6。第二种化合物可以是化合物4,并且第三种化合物可以是化合物5。

[0153] 本发明的另一个方面包括一种组合物,例如,药物组合物,该组合物包含选自化合物4的第一种化合物,并且进一步包含各自选自由化合物1、化合物2、化合物3、化合物5、化合物6、化合物7组成的组的第二种化合物和第三种化合物。第二种化合物可以是化合物1、化合物2、化合物3或化合物6。第二种化合物可以是化合物1,并且第三种化合物可以是化合物2。第二种化合物可以是化合物1,并且第三种化合物可以是化合物3。第二种化合物可以是化合物1,并且第三种化合物可以是化合物6。第二种化合物可以是化合物2,并且第三种化合物可以是化合物6。第二种化合物可以是化合物3,并且第三种化合物可以是化合物6。第二种化合物可以是化合物1,并且第三种化合物可以是化合物5。第二种化合物可以是化合物2,并且第三种化合物可以是化合物5。

[0154] 本发明的另一个方面包括一种组合物,例如,药物组合物,该组合物包含化合物5,并且进一步包含各自选自由化合物1、化合物2、化合物3、化合物4、化合物6、化合物7、化合物9、化合物10、化合物11、化合物12、化合物13、化合物14、化合物15和化合物16组成的组的第二种化合物和第三种化合物。第二种化合物可以是化合物1。

[0155] 本发明的另一个方面包括一种组合物,例如,药物组合物,该组合物包含化合物6,并且进一步包含各自选自由化合物1、化合物2、化合物3、化合物4、化合物5、化合物7、化合物9、化合物10、化合物11、化合物12、化合物13、化合物14、化合物15和化合物16组成的组的第二种化合物和第三种化合物。第二种化合物可以是化合物1、化合物2、化合物3或化合物4。第二种化合物可以是化合物1,并且第三种化合物可以是化合物2。第二种化合物可以是化合物4,并且第三种化合物可以是化合物6。第二种化合物可以是化合物2,并且第三种化合物可以是化合物4。第二种化合物可以是化合物3,并且第三种化合物可以是化合物4。第二种化合物可以是化合物1,并且第三种化合物可以是化合物5。第二种化合物可以是化合物2,并且第三种化合物可以是化合物5。第二种化合物可以是化合物3,并且第三种化合物可以是化合物5。

[0156] 本发明的另一个方面包括一种组合物,例如,药物组合物,该组合物包含化合物7,

并且进一步包含各自选自由化合物1、化合物2、化合物3、化合物4、化合物5、化合物6、化合物9、化合物10、化合物11、化合物12、化合物13、化合物14、化合物15和化合物16组成的组的第二种化合物和第三种化合物。

[0157] 本发明的另一个方面包括一种组合物,例如,药物组合物,该组合物包含选自由化合物9、化合物10、化合物11、化合物12、化合物13、化合物14、化合物15和化合物16组成的组的第一种化合物,并且进一步包含各自选自由化合物1、化合物2、化合物3、化合物5、化合物6和化合物7组成的组的第二种化合物和第三种化合物。

[0158] 本发明的另一个方面包括一种组合物,例如,药物组合物,该组合物包含化合物1,并且进一步包含各自选自由化合物2、化合物3、化合物4、化合物5、化合物6、化合物7、化合物9、化合物10、化合物11、化合物12、化合物13、化合物14、化合物15和化合物16组成的组的第二种化合物、第三种化合物和第四种化合物。第二种化合物可以是化合物3、化合物4、化合物5或化合物6。第二种化合物可以是化合物2,并且第三种化合物可以是化合物4。第二种化合物可以是化合物3,并且第三种化合物可以是化合物4。第二种化合物可以是化合物2,并且第三种化合物可以是化合物6。第二种化合物可以是化合物3,并且第三种化合物可以是化合物6。第二种化合物可以是化合物4,并且第三种化合物可以是化合物6。第二种化合物可以是化合物2,第三种化合物可以是化合物4,并且第四种化合物可以是化合物6。第二种化合物可以是化合物3,第三种化合物可以是化合物4,并且第四种化合物可以是化合物6。

[0159] 本发明的另一个方面包括一种组合物,例如,药物组合物,该组合物包含化合物2,并且进一步包含各自选自由化合物1、化合物3、化合物4、化合物5、化合物6、化合物7、化合物9、化合物10、化合物11、化合物12、化合物13、化合物14、化合物15和化合物16组成的组的第二种化合物、第三种化合物和第四种化合物。第二种化合物可以是化合物4。第二种化合物可以是化合物1,并且第三种化合物可以是化合物4。第二种化合物可以是化合物1,并且第三种化合物可以是化合物4。第二种化合物可以是化合物1,并且第三种化合物可以是化合物6。第二种化合物可以是化合物4,并且第三种化合物可以是化合物6。

[0160] 本发明的另一个方面包括一种组合物,例如,药物组合物,该组合物包含化合物3,并且进一步包含各自选自由化合物1、化合物2、化合物4、化合物5、化合物6、化合物7、化合物9、化合物10、化合物11、化合物12、化合物13、化合物14、化合物15和化合物16组成的组的第二种化合物、第三种化合物和第四种化合物。第二种化合物可以是化合物1或化合物6。第二种化合物可以是化合物1,并且第三种化合物可以是化合物4。第二种化合物可以是化合物1,并且第三种化合物可以是化合物6。第二种化合物可以是化合物4,并且第三种化合物可以是化合物6。第二种化合物可以是化合物4,第三种化合物可以是化合物5,并且第四种化合物可以是化合物6。

[0161] 本发明的另一个方面包括一种组合物,例如,药物组合物,该组合物包含化合物4,并且进一步包含各自选自由化合物1、化合物2、化合物3、化合物5、化合物6和化合物7组成的组的第二种化合物、第三种化合物和第四种化合物。第二种化合物可以是化合物1、化合物2、化合物3或化合物6。第二种化合物可以是化合物1,并且第三种化合物可以是化合物2。第二种化合物可以是化合物1,并且第三种化合物可以是化合物3。第二种化合物可以是化合物1,并且第三种化合物可以是化合物6。第二种化合物可以是化合物2,并且第三种化合

物可以是化合物6。第二种化合物可以是化合物3,并且第三种化合物可以是化合物6。

[0162] 本发明的另一个方面包括一种组合物,例如,药物组合物,该组合物包含化合物5,并且进一步包含各自选自由化合物1、化合物2、化合物3、化合物4、化合物6、化合物7、化合物9、化合物10、化合物11、化合物12、化合物13、化合物14、化合物15和化合物16组成的组的第二种化合物、第三种化合物和第四种化合物。第二种化合物可以是化合物1

[0163] 本发明的另一个方面包括一种组合物,例如,药物组合物,该组合物包含化合物6,并且进一步包含各自选自由化合物1、化合物2、化合物3、化合物4、化合物5、化合物7、化合物9、化合物10、化合物11、化合物12、化合物13、化合物14、化合物15和化合物16组成的组的第二种化合物、第三种化合物和第四种化合物。第二种化合物可以是化合物1、化合物2、化合物3或化合物4。第二种化合物可以是化合物1,并且第三种化合物可以是化合物2。第二种化合物可以是化合物1,并且第三种化合物可以是化合物3。第二种化合物可以是化合物4,并且第三种化合物可以是化合物6。第二种化合物可以是化合物2,并且第三种化合物可以是化合物4。第二种化合物可以是化合物3,并且第三种化合物可以是化合物4。

[0164] 本发明的另一个方面包括一种组合物,例如,药物组合物,该组合物包含化合物7,并且进一步包含各自选自由化合物1、化合物2、化合物3、化合物4、化合物5、化合物6、化合物9、化合物10、化合物11、化合物12、化合物13、化合物14、化合物15和化合物16组成的组的第二种化合物、第三种化合物和第四种化合物。

[0165] 本发明的另一个方面包括一种组合物,例如,药物组合物,该组合物包含选自由化合物9、化合物10、化合物11、化合物12、化合物13、化合物14、化合物15和化合物16组成的组的第一种化合物,并且进一步包含各自选自由化合物1、化合物2、化合物3、化合物5、化合物6和化合物7组成的组的第二种化合物、第三种化合物和第四种化合物。

[0166] 本发明的另一个方面包括一种组合物,例如,药物组合物,该组合物包含化合物1,并且进一步包含各自选自由化合物2、化合物3、化合物4、化合物5、化合物6、化合物7、化合物9、化合物10、化合物11、化合物12、化合物13、化合物14、化合物15和化合物16组成的组的第二种化合物、第三种化合物、第四种化合物和第五种化合物。第二种化合物可以是化合物3、化合物4、化合物5或化合物6。第二种化合物可以是化合物2,并且第三种化合物可以是化合物4。第二种化合物可以是化合物3,并且第三种化合物可以是化合物4。第二种化合物可以是化合物2,并且第三种化合物可以是化合物6。第二种化合物可以是化合物3,并且第三种化合物可以是化合物6。第二种化合物可以是化合物4,并且第三种化合物可以是化合物6。

[0167] 本发明的另一个方面包括一种组合物,例如,药物组合物,该组合物包含化合物2,并且进一步包含各自选自由化合物1、化合物3、化合物4、化合物5、化合物6、化合物7、化合物9、化合物10、化合物11、化合物12、化合物13、化合物14、化合物15和化合物16组成的组的第二种化合物、第三种化合物、第四种化合物和第五种化合物。第二种化合物可以是化合物4。第二种化合物可以是化合物1,并且第三种化合物可以是化合物4。第二种化合物可以是化合物1,并且第三种化合物可以是化合物6。第二种化合物可以是化合物4,并且第三种化合物可以是化合物6。

[0168] 本发明的另一个方面包括一种组合物,例如,药物组合物,该组合物包含化合物3,并且进一步包含各自选自由化合物1、化合物2、化合物4、化合物5、化合物6、化合物7、化合

物9、化合物10、化合物11、化合物12、化合物13、化合物14、化合物15和化合物16组成的组的第二种化合物、第三种化合物、第四种化合物和第五种化合物。第二种化合物可以是化合物1或化合物6。第二种化合物可以是化合物1,并且第三种化合物可以是化合物4。第二种化合物可以是化合物1,并且第三种化合物可以是化合物6。第二种化合物可以是化合物4,并且第三种化合物可以是化合物6。

[0169] 本发明的另一个方面包括一种组合物,例如,药物组合物,该组合物包含选自化合物4的第一种化合物,并且进一步包含各自选自由化合物1、化合物2、化合物3、化合物5、化合物6和化合物7组成的组的第二种化合物、第三种化合物、第四种化合物和第五种化合物。第二种化合物可以是化合物1、化合物2、化合物3或化合物6。第二种化合物可以是化合物1,并且第三种化合物可以是化合物2。第二种化合物可以是化合物1,并且第三种化合物可以是化合物3。第二种化合物可以是化合物1,并且第三种化合物可以是化合物6。第二种化合物可以是化合物2,并且第三种化合物可以是化合物6。第二种化合物可以是化合物3,并且第三种化合物可以是化合物6。

[0170] 本发明的另一个方面包括一种组合物,例如,药物组合物,该组合物包含化合物5,并且进一步包含各自选自由化合物1、化合物2、化合物3、化合物4、化合物6、化合物7、化合物9、化合物10、化合物11、化合物12、化合物13、化合物14、化合物15和化合物16组成的组的第二种化合物、第三种化合物、第四种化合物和第五种化合物。第二种化合物可以是化合物1。

[0171] 本发明的另一个方面包括一种组合物,例如,药物组合物,该组合物包含化合物6,并且进一步包含各自选自由化合物1、化合物2、化合物3、化合物4、化合物5、化合物7、化合物9、化合物10、化合物11、化合物12、化合物13、化合物14、化合物15和化合物16组成的组的第二种化合物、第三种化合物、第四种化合物和第五种化合物。第二种化合物可以是化合物1、化合物2、化合物3和化合物4。第二种化合物可以是化合物1,并且第三种化合物可以是化合物2。第二种化合物可以是化合物1,并且第三种化合物可以是化合物3。第二种化合物可以是化合物4,并且第三种化合物可以是化合物6。第二种化合物可以是化合物2,并且第三种化合物可以是化合物4。第二种化合物可以是化合物3,并且第三种化合物可以是化合物4。

[0172] 本发明的另一个方面包括一种组合物,例如,药物组合物,该组合物包含化合物7,并且进一步包含各自选自由化合物1、化合物2、化合物3、化合物4、化合物5、化合物6、化合物9、化合物10、化合物11、化合物12、化合物13、化合物14、化合物15和化合物16组成的组的第二种化合物、第三种化合物、第四种化合物和第五种化合物。

[0173] 本发明的另一个方面包括一种组合物,例如,药物组合物,该组合物包含选自由化合物9、化合物10、化合物11、化合物12、化合物13、化合物14、化合物15和化合物16组成的组的第一种化合物,并且进一步包含各自选自由化合物1、化合物2、化合物3、化合物5、化合物6和化合物7组成的组的第二种化合物、第三种化合物、第四种化合物和第五种化合物。

[0174] 盐

[0175] 组合化合物和其他活性成分可以是盐的形式。通常,但不是绝对的,组合化合物和其他活性成分的盐是药物学上可接受的盐。术语“药物学上可接受的盐”内包括的盐指的是组合化合物和/或其他活性成分的无毒盐。合适的药物学上可接受的盐的实例包括无机酸

式加成盐,如氯化物、溴化物、硫酸盐、磷酸盐和硝酸盐;有机酸式加成盐,如醋酸盐、半乳糖酸盐(galactarate)、丙酸盐、琥珀酸盐、乳酸盐、乙醇酸盐、苹果酸盐、酒石酸盐、柠檬酸盐、马来酸盐、延胡索酸盐、甲烷磺酸盐、p-甲苯磺酸盐和抗坏血酸盐;与酸性氨基酸形成的盐,如天冬氨酸盐和谷氨酸盐;碱金属盐,如钠盐和钾盐;碱土金属盐,如镁盐和钙盐;铵盐;有机碱性盐,如三甲胺盐、三乙胺盐、吡啶盐、皮考啉盐、二环己胺盐和N,N'-二苯甲基乙烯二胺盐;以及与碱性氨基酸形成的盐,如赖氨酸盐和精氨酸盐。在一些情况中,盐可以是水合物或乙醇溶剂化物。

[0176] 药物制剂

[0177] 组合化合物和/或其他活性成分可以与常规载体或赋形剂一起配制,根据常规实践来选择所述常规载体或赋形剂。片剂通常含有赋形剂、助流剂、填充剂、粘合剂等。含水制剂可以以无菌形式来制备,并且当打算通过口服以外的途径传送时,通常将是等渗的。所有制剂将可选含有赋形剂,如药物赋形剂手册(Hanbook of Pharmaceutical Excipients)(1986)中列出的那些,在此将其全部通过引用并入本文中。赋形剂包括抗坏血酸和其他抗氧化剂,螯合剂,如EDTA,碳水化合物,如糊精,羟基烷基纤维素,羟基烷基甲基纤维素,硬脂酸等。

[0178] 制剂的pH范围为约3至约11,但通常为约7至10。

[0179] 尽管活性成分单独给药是可能的,但优选提出一种或多种活性成分作为药物制剂。本发明的制剂,用于兽医和用于人使用,都包括至少一种活性成分,以及一种或多种可接受的载体,和可选其他治疗性成分。载体必须是“可接受的”,意思是与制剂的其他成分相容,并且在生理上对其接受者无害。

[0180] 制剂包括适用于以下列出的给药途径的那些。制剂可以方便地以单位剂型呈现,或可以通过制药领域公知的任一种方法来制备。技术和制剂通常可以在Remington's Pharmaceutical Sciences(Mack Publishing Co.,Easton,Pa.)中找到,将其全部通过引用并入本文中。这样的方法包括将活性成分加入载体中的步骤,所述载体包含一种或多种辅助成分。通常,可以通过将一种或多种活性成分与液体载体或细碎固体载体或两者均匀且彻底地混合,并且随后如果需要,将产品成型,从而制得制剂。

[0181] 适用于口服给药的本发明的制剂可以呈现为离散的单位,如胶囊、扁囊剂或片剂,其各自含有预定含量的活性成分;作为粉末或颗粒;作为水性或非水性液体中的溶液或悬浮液;作为水包油型液体乳剂或油包水型液体乳剂。活性成分还可以作为药丸(bolus)、药糖剂或糊剂来给药。

[0182] 可以通过可选与一种或多种辅助成分一起压制或模制来制得片剂。可以通过在合适的机器中压制自由流动形式(如,粉末或颗粒)的活性成分来制备压制的片剂,所述活性成分可选与粘合剂、润滑剂、惰性稀释剂、防腐剂、表面活性剂或分散剂混合。可以通过在合适的机器中模制用惰性液体稀释剂润湿的粉末状活性成分来制得模制的片剂。片剂可以可选是包衣的或有划痕的,并且可选可以配制成提供活性成分的缓慢或受控释放。

[0183] 对于给药于眼睛或其他外部组织,例如,嘴巴和皮肤,制剂可以优选作为含有活性成分的局部膏剂或霜剂以一定含量给药,例如0.075至20%w/w(包括0.1%至20%范围中的活性成分,其中增量为0.1%w/w,如0.6%w/w,0.7%w/w等),优选0.2至15%w/w,并且最优选0.5至10%w/w。当配制在膏剂中时,活性成分可以与石蜡或水混溶性膏剂基料一起使用。

或者,活性成分可以配制在使用水包油型膏剂基料的膏剂中。

[0184] 如果需要,膏剂基料的水相可以包括,例如,至少30%w/w多元醇,即,具有两个或多个羟基的醇,如丙二醇、丁烷1,3-二醇、甘露糖醇、山梨糖醇、甘油和聚乙二醇(包括PEG 400)及其混合物。局部制剂可以理想地包括增强活性成分通过皮肤或其他受影响区域的吸收或渗透的化合物。这样的皮肤渗透增强剂的实例包括二甲基亚砷和相关的类似物。

[0185] 组合化合物和/或其他活性成分的乳液的油相可以以已知方式从已知成分构成。尽管所述相可以只含有乳化剂(另外称为乳化剂(emulgent)),但理想地包括至少一种乳化剂与脂肪或油或与脂肪和油两者的混合物。优选,包括亲水性乳化剂与作为稳定剂的亲脂性乳化剂。还优选包括油和脂肪两者。共同地,含有或不含稳定剂的乳化剂构成所谓的乳化蜡,并且所述蜡与油和脂肪一起构成所谓的乳化膏剂基料,其形成霜剂制剂的油分散相。

[0186] 适用于本发明制剂的乳化剂和乳液稳定剂包括Tween®60(ICI Americas Inc.)、Span 80、鲸蜡硬脂醇、苧醇、肉豆蔻醇、甘油基单硬酯酸酯和十二烷基硫酸钠。

[0187] 用于制剂的合适的油或脂肪的选择是基于实现所需的化妆品特性。霜剂应当优选是不油腻、不着色和可清洗产品,并具有合适的稠度以避免从管子或其他容器中泄漏。可以使用直链或支链、单或二元烷基酯,如,二-异己二酸酯、异鲸蜡醇硬脂酸酯、椰子脂肪酸的丙二醇二酯、肉豆蔻酸异丙酯、油酸癸酯、棕榈酸异丙酯、硬脂酸丁酯、2-棕榈酸乙基己酯或称为Crodamol CAP的支链酯的混合物,最后三种是优选的酯。根据所需的特性,这些可以单独使用或组合使用。或者,可以使用高熔点脂质,如白软石蜡和/或液体石蜡或其他矿物油。

[0188] 根据本发明的药物制剂包括一种或多种活性成分以及一种或多种药物学上可接受的载体或赋形剂,和可选的其他治疗剂。含有活性成分的药物制剂可以是适用于所打算的给药方法的任何形式。当用于口服使用时,例如,可以制成片剂、锭剂、糖锭、水或油悬浮液、可分散粉剂或颗粒、乳液、硬或软胶囊、糖浆或酏剂。可以根据本领域已知的用于制造药物组合物的任何方法来制备打算用于口服使用的组合物,并且这样的组合物可以含有一种或多种试剂,包括甜味剂、调味剂、着色剂和防腐剂,以提供适口的制剂。在适用于制造片剂的无毒药物学上可接受的赋形剂的混合物中含有活性成分的片剂是可接受的。这些赋形剂可以是,例如,惰性稀释剂,如碳酸钙或碳酸钠、乳糖、乳糖单水合物、交联羧甲基纤维素钠、聚烯吡酮、磷酸钙或磷酸钠;造粒剂和崩解剂,如玉米淀粉,或海藻酸;粘合剂,如纤维素、微晶纤维素、淀粉、明胶或阿拉伯树胶;和润滑剂,如硬脂酸镁、硬脂酸或滑石。片剂可以是未包衣的,或可以通过已知技术包衣,所述技术包括用于延迟崩解和胃肠道吸收的微包胶,并且由此提供在较长时间段内的持续作用。例如,可以使用延时材料,如单独的单硬脂酸甘油酯或二硬脂酸甘油酯,或与蜡一起使用。

[0189] 用于口服使用的制剂还可以呈现为硬明胶胶囊,其中将活性成分与惰性固体稀释剂混合,例如磷酸钙或高岭土,或呈现为软明胶胶囊,其中将活性成分与水或油介质混合,所述油如花生油、液体石蜡或橄榄油。

[0190] 本发明的含水悬浮液含有在适用于制造含水悬浮液的赋形剂混合物中的活性材料。这样的赋形剂包括悬浮剂,如羧甲基纤维素钠、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、海藻酸钠、聚乙烯吡咯烷酮、黄芪胶和阿拉伯树胶,以及分散剂或润湿剂,如天然产生的磷脂(例如,卵磷脂)、烯化氧与脂肪酸的缩合产物(例如,聚氧乙烯硬脂酸酯)、环氧乙烷与长链脂肪醇的缩合产物(例如,十七烷基乙烯氧鲸蜡醇)、环氧乙烷与源自脂肪酸和己糖醇酐的偏酯

的缩合产物(例如,聚氧乙烯山梨聚糖单油酸酯)。含水悬浮液还可以含有一种或多种防腐剂,如 p -羟基苯甲酸乙酯或 p -羟基苯甲酸正丙酯,一种或多种着色剂,一种或多种调味剂和一种或多种甜味剂,如蔗糖或糖精。

[0191] 可以通过将活性成分悬浮于植物油(如,花生油、橄榄油、芝麻油或椰子油)中或矿物油(如,液体石蜡)中来配制油悬浮液。口服悬浮液可以含有增稠剂,如蜂蜡、硬石蜡或鲸蜡醇。可以加入甜味剂,如本文中所列的那些,以及调味剂,以提供适口的口服制剂。可以通过添加抗氧化剂,如抗坏血酸,来使这些组合物防腐。

[0192] 本发明的可分散粉剂和颗粒适用于制备含水悬浮液,通过加入水,以提供使活性成分与分散剂或润湿剂、悬浮剂和一种或多种防腐剂混合。合适的分散剂或润湿剂和悬浮剂通过以上公开的那些来举例说明。其他赋形剂,例如,甜味剂、调味剂和着色剂,也可以存在。

[0193] 本发明的药物组合物也可以是水包油型乳剂形式。油相可以是植物油,如橄榄油或花生油,矿物油,如液体石蜡,或这些的混合物。合适的乳化剂包括天然产生的树胶,如阿拉伯树胶和黄芪胶,天然产生的磷脂,如大豆卵磷脂,源自脂肪酸和己糖醇酐的酯或偏酯,如山梨聚糖单油酸酯,以及这些偏酯和环氧乙烷的缩合产物,如聚氧乙烯山梨聚糖单油酸酯。乳剂还可以含有甜味剂和调味剂。可以用甜味剂,如甘油、山梨糖醇或蔗糖,来配制糖浆和酏剂。这样的制剂还可以含有缓和剂、防腐剂、调味剂或着色剂。

[0194] 本发明的药物组合物可以是无菌注射制剂形式,如无菌注射含水或油质悬浮液。可以使用那些本领域已知的本文中已经提及的合适的分散剂或润湿剂和悬浮剂来配制该悬浮液。无菌注射制剂还可以是无毒的非肠道可接受的稀释剂或溶剂中的无菌注射溶液或悬浮液,如1,3-丁烷-二醇中的溶液,或制成冻干粉。可以使用的可接受的载体和溶剂是水、Ringer's溶液和等渗氯化钠溶液。此外,无菌不挥发性油可以常规地用作溶剂或悬浮介质。为此,可以使用任何温和的不挥发性油,包括合成的甘油一酯或甘油二酯。此外,脂肪酸,如油酸,同样可以用于注射剂的制备中。

[0195] 可以与载体材料混合来产生单剂型的活性成分的含量将根据待治疗的宿主和特定的给药方式而改变。例如,打算用于人口服给药的定时-释放制剂可以含有大约1至1000mg活性材料化合物以及合适和常规含量的载体材料,其可以为总组合物的约5至约95%(重量:重量)。可以制备药物组合物,以提供容易测量的用于给药的含量。例如,打算用于静脉内灌输的水溶液可以含有约3至500 μ g活性成分/毫升溶液,使得可以以约30mL/hr的速率灌输合适的体积。

[0196] 适用于给药于眼睛的制剂可以包括滴眼剂,其中活性成分溶解或悬浮于合适的载体中,尤其是用于活性成分的含水溶剂。活性成分优选以0.5至20%,有利地0.5至10%,特别地约1.5%w/w的浓度存在于这样的制剂中。

[0197] 适用于嘴局部给药的制剂包括在调味基料中含有活性成分的糖锭,所述调味基料通常是蔗糖和阿拉伯树胶或黄芪胶;在惰性基料中含有活性成分的软锭剂,其中所述惰性基料如明胶和甘油,或蔗糖和阿拉伯树胶;以及在合适的液体载体中含有活性成分的漱口水。

[0198] 适用于直肠给药的制剂可以呈现为含有合适基料的栓剂,所述合适基料包括例如可可脂或水杨酸酯。

[0199] 适用于肺内或鼻给药的制剂具有例如0.1至500 μm 范围的颗粒大小(包括0.1至500 μm 范围中以如0.5 μm 、1 μm 、30 μm 、35 μm 等增量的颗粒大小),其通过鼻通道的快速吸入或通过嘴的吸入来给药,使得到达肺泡囊。合适的制剂包括活性成分的水或油溶液。可以根据常规方法制备适用于气雾剂或干粉给药的制剂,并且与其他治疗剂一起传送,如治疗或预防本文中所述感染中使用的上述化合物。

[0200] 适用于阴道给药的制剂可以呈现为含有除活性成分外的本领域已知合适的载体的阴道栓、卫生棉条、霜剂、凝胶、糊剂、泡沫或喷雾制剂。

[0201] 适用于非肠道给药的制剂包括水性和非水性无菌注射液,其可以含有抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂和溶质,其使得制剂与计划接受者的血液等渗;以及水性和非水性无菌悬浮液,其可以包括悬浮剂和增稠剂。制剂可以存在于单位剂量或多剂量容器中,例如密封的安瓿瓶和小瓶中,并且可以储存在冷冻干燥(冻干)条件下,只需要在使用前理解加入无菌液体载体,例如注射用水。可以从之前所述种类的无菌粉末、颗粒和片剂制备临时注射溶液和悬浮液。优选的单位剂型可以是如上文所述的,或其合适的级分的含有日剂量或单位日亚剂量那些的活性成分。

[0202] 应当理解,除了以上特别提及的成分,组合化合物和/或其他活性成分的制剂可以包括鉴于所讨论的制剂类型本领域常规的其他试剂,例如,适用于口服给药的那些可以包括调味剂。

[0203] 组合化合物或其他活性成分还可以配制成提供受控释放的活性成分,以允许较少频率的给药或提高活性成分的药物动力学或毒性谱。因此,本发明还提供了为了持续或受控释放配制的包含两种或多种组合物化合物的组合物。

[0204] 剂量

[0205] 活性成分的有效剂量至少部分取决于待治疗病症的性质、毒性(不管化合物是预防性(较低剂量)的或对抗活性疾病或病症地使用)、传送方法和药物制剂,并且使用常规剂量增加研究可以由医师来决定。

[0206] 例如,可以配制本发明的组合物(例如,片剂)以提供有效剂量。例如,关于化合物1,或其药物学上可接受的盐,组合物可以包含1.0mg至100mg,5mg至40mg,30mg至50mg,或20mg或40mg,并且适于结合化合物2、化合物3、化合物6、化合物4、化合物5、化合物7、化合物9、化合物10、化合物11、化合物12、化合物13、化合物14、化合物15和化合物16中的任一种或多种每天给药于需要的人一次或多次。关于化合物2,或其药物学上可接受的盐,组合物可以包含25mg至800mg,50mg至400mg,或60mg至300mg,或70mg至200mg,或可以为150mg,并且适于结合化合物1、化合物3、化合物6、化合物4、化合物5、化合物7、化合物9、化合物10、化合物11、化合物12、化合物13、化合物14、化合物15和化合物16中的任一种或多种每天给药于需要的人一次或多次。关于化合物3,或其药物学上可接受的盐,组合物可以包含10mg至1000mg,或50至400mg,或100mg至400mg或200mg至400mg,并且适于结合化合物1、化合物2、化合物6、化合物4、化合物5、化合物7、化合物9、化合物10、化合物11、化合物12、化合物13、化合物14、化合物15和化合物16中的任一种或多种每天给药于需要的人一次或多次。关于化合物4,或其药物学上可接受的盐,组合物可以包含25mg至400mg或25mg至200mg,并且适于结合化合物1、化合物2、化合物3、化合物6、化合物5、化合物7中的任一种或多种每天给药于需要的人一次或多次。关于化合物5,或其药物学上可接受的盐,组合物可以包含50mg至

1000mg或100mg至750mg,并且适于结合化合物1、化合物2、化合物3、化合物6、化合物4、化合物7、化合物9、化合物10、化合物11、化合物12、化合物13、化合物14、化合物15和化合物16中的任一种或多种每天给药于需要的人一次或多次。关于化合物6,或其药物学上可接受的盐,组合物可以包含1mg至500mg或3mg至300mg或3mg至200mg或3mg至100mg或10mg至90mg或30mg至90mg,并且适于结合化合物1、化合物2、化合物3、化合物4、化合物5、化合物7、化合物9、化合物10、化合物11、化合物12、化合物13、化合物14、化合物15和化合物16中的任一种或多种每天给药于需要的人一次或多次。关于化合物7,或其药物学上可接受的盐,组合物可以包含100微克直至3000mg,25mg直至2000mg,或50mg直至1000mg,并且适于结合化合物1、化合物2、化合物3、化合物4、化合物5、化合物6、化合物9、化合物10、化合物11、化合物12、化合物13、化合物14、化合物15和化合物16中的任一种或多种每天给药于需要的人一次或多次(例如,每天四次)。关于化合物9和10,或其药物学上可接受的盐,组合物可以包含10mg至1000mg/天(根据US 2010/0298257)。关于化合物11,或其药物学上可接受的盐,组合物可以包含1mg至1000mg/天(根据US 2010/0081628)。对于共同给药的化合物1-7的剂量需要调整,以解决可能的药物-药物相互作用。例如,尽管没有显示出化合物1影响药物代谢系统,化合物2显示出具有增加化合物1的暴露大约2-3X的作用。因此,当化合物1结合化合物2时,预期化合物的剂量降低(例如,2x-3x)。结合化合物16,化合物2显示出具有增加化合物6的暴露大约5x的作用,因此化合物16与化合物2一起给药时,将预期化合物16的剂量降低(例如,3x-5x)。因此,与化合物2共同给药时,10mg剂量的化合物6近似于30mg剂量。

[0207] 两种或多种组合化合物可以结合约800mg、1000mg或1200mg/天含量的病毒唑来给药,以单剂量或多剂量(例如,约400mg、500mg或600mg,每天两次)。

[0208] 本发明组合物的用途

[0209] 在本发明这个方面的实践中,组合化合物可以以上述所示剂量来使用。

[0210] 本发明的一个方面包括化合物1用于治疗HCV感染的方法中,其中化合物1结合选自化合物2、化合物3、化合物4、化合物5、化合物6、化合物7、化合物9、化合物10、化合物11、化合物12、化合物13、化合物14、化合物15和化合物16组成的组的第二种化合物一起使用。第二种化合物可以是化合物3、化合物4、化合物5或化合物6。

[0211] 本发明的另一个方面包括化合物2用于治疗HCV感染的方法中,其中化合物2结合选自化合物1、化合物3、化合物4、化合物5、化合物6、化合物7、化合物9、化合物10、化合物11、化合物12、化合物13、化合物14、化合物15和化合物16组成的组的第二种化合物一起使用。第二种化合物可以是化合物4。

[0212] 本发明的另一个方面包括化合物3用于治疗HCV感染的方法中,其中化合物3结合选自化合物1、化合物2、化合物4、化合物5、化合物6、化合物7、化合物9、化合物10、化合物11、化合物12、化合物13、化合物14、化合物15和化合物16组成的组的第二种化合物一起使用。第二种化合物可以是化合物1或化合物6。

[0213] 本发明的另一个方面包括化合物4用于治疗HCV感染的方法中,其中化合物4结合选自化合物1、化合物2、化合物3、化合物5、化合物6和化合物7组成的组的第二种化合物一起使用。第二种化合物可以是化合物1或化合物2或化合物3或化合物6。

[0214] 本发明的另一个方面包括化合物5用于治疗HCV感染的方法中,其中化合物5结合选自化合物1、化合物2、化合物3、化合物4、化合物6、化合物7、化合物9、化合物10、化合物

11、化合物12、化合物13、化合物14、化合物15和化合物16组成的组的第二种化合物一起使用。第二种化合物可以是化合物1。

[0215] 本发明的另一个方面包括化合物6用于治疗HCV感染的方法中,其中化合物6结合选自由化合物1、化合物2、化合物3、化合物4、化合物5、化合物7、化合物9、化合物10、化合物11、化合物12、化合物13、化合物14、化合物15和化合物16组成的组的第二种化合物一起使用。第二种化合物可以是化合物1、化合物2、化合物3或化合物4。

[0216] 本发明的另一个方面包括化合物7用于治疗HCV感染的方法中,其中化合物7结合选自由化合物1、化合物2、化合物3、化合物4、化合物5、化合物6、化合物9、化合物10、化合物11、化合物12、化合物13、化合物14、化合物15和化合物16组成的组的第二种化合物一起使用。

[0217] 本发明的另一个方面包括化合物9用于治疗HCV感染的方法中,其中化合物9结合选自由化合物1、化合物2、化合物3、化合物5、化合物6和化合物7组成的组的第二种化合物一起使用。

[0218] 本发明的另一个方面包括化合物10用于治疗HCV感染的方法中,其中化合物10结合选自由化合物1、化合物2、化合物3、化合物5、化合物6和化合物7组成的组的第二种化合物一起使用。

[0219] 本发明的另一个方面包括化合物11用于治疗HCV感染的方法中,其中化合物11结合选自由化合物1、化合物2、化合物3、化合物5、化合物6和化合物7组成的组的第二种化合物一起使用。

[0220] 本发明的另一个方面包括化合物12用于治疗HCV感染的方法中,其中化合物12结合选自由化合物1、化合物2、化合物3、化合物5、化合物6和化合物7组成的组的第二种化合物一起使用。

[0221] 本发明的另一个方面包括化合物13用于治疗HCV感染的方法中,其中化合物13结合选自由化合物1、化合物2、化合物3、化合物5、化合物6和化合物7组成的组的第二种化合物一起使用。

[0222] 本发明的另一个方面包括化合物14用于治疗HCV感染的方法中,其中化合物14结合选自由化合物1、化合物2、化合物3、化合物5、化合物6和化合物7组成的组的第二种化合物一起使用。

[0223] 本发明的另一个方面包括化合物15用于治疗HCV感染的方法中,其中化合物15结合选自由化合物1、化合物2、化合物3、化合物5、化合物6和化合物7组成的组的第二种化合物一起使用。

[0224] 本发明的另一个方面包括化合物16用于治疗HCV感染的方法中,其中化合物16结合选自由化合物1、化合物2、化合物3、化合物5、化合物6和化合物7组成的组的第二种化合物一起使用。

[0225] 本发明的另一个方面包括化合物1用于治疗HCV感染的方法中,其中化合物1结合各自选自由化合物2、化合物3、化合物4、化合物5、化合物6、化合物7、化合物9、化合物10、化合物11、化合物12、化合物13、化合物14、化合物15和化合物16组成的组的第二种化合物和第三种化合物一起使用。第二种化合物可以是化合物3,或化合物4,或化合物5或化合物6。第二种化合物可以是化合物2,并且第三种化合物可以是化合物4。第二种化合物可以是化

合物3,并且第三种化合物可以是化合物4。第二种化合物可以是化合物2,并且第三种化合物可以是化合物6。第二种化合物可以是化合物3,并且第三种化合物可以是化合物6。第二种化合物可以是化合物4,并且第三种化合物可以是化合物6。

[0226] 本发明的另一个方面包括化合物2用于治疗HCV感染的方法中,其中化合物2结合各自选自由化合物1、化合物3、化合物4、化合物5、化合物6、化合物7、化合物9、化合物10、化合物11、化合物12、化合物13、化合物14、化合物15和化合物16组成的组的第二种化合物和第三种化合物一起使用。第二种化合物可以是化合物4。第二种化合物可以是化合物1,并且第三种化合物可以是化合物4。第二种化合物可以是化合物1,并且第三种化合物可以是化合物6。第二种化合物可以是化合物4,并且第三种化合物可以是化合物6。

[0227] 本发明的另一个方面包括化合物3用于治疗HCV感染的方法中,其中化合物3结合各自选自由化合物1、化合物2、化合物4、化合物5、化合物6、化合物7、化合物9、化合物10、化合物11、化合物12、化合物13、化合物14、化合物15和化合物16组成的组的第二种化合物和第三种化合物一起使用。第二种化合物可以是化合物1或化合物6。第二种化合物可以是化合物1,并且第三种化合物可以是化合物4。第二种化合物可以是化合物1,并且第三种化合物可以是化合物6。第二种化合物可以是化合物4,并且第三种化合物可以是化合物6。

[0228] 本发明的另一个方面包括化合物4用于治疗HCV感染的方法中,其中化合物4结合各自选自由化合物1、化合物2、化合物3、化合物5、化合物6和化合物7组成的组的第二种化合物和第三种化合物一起使用。第二种化合物可以是化合物1、化合物2、化合物3或化合物6。第二种化合物可以是化合物1,并且第三种化合物可以是化合物2。第二种化合物可以是化合物1,并且第三种化合物可以是化合物3。第二种化合物可以是化合物1,并且第三种化合物可以是化合物6。第二种化合物可以是化合物2,并且第三种化合物可以是化合物6。第二种化合物可以是化合物3,并且第三种化合物可以是化合物6。

[0229] 本发明的另一个方面包括化合物5用于治疗HCV感染的方法中,其中化合物5结合各自选自由化合物1、化合物2、化合物3、化合物4、化合物6、化合物7、化合物9、化合物10、化合物11、化合物12、化合物13、化合物14、化合物15和化合物16组成的组的第二种化合物和第三种化合物一起使用。第二种化合物可以是化合物1。

[0230] 本发明的另一个方面包括化合物6用于治疗HCV感染的方法中,其中化合物6结合各自选自由化合物1、化合物2、化合物3、化合物4、化合物5、化合物7、化合物9、化合物10、化合物11、化合物12、化合物13、化合物14、化合物15和化合物16组成的组的第二种化合物和第三种化合物一起使用。第二种化合物可以是化合物1、化合物2、化合物3或化合物4。第二种化合物可以是化合物1,并且第三种化合物可以是化合物2。第二种化合物可以是化合物1,并且第三种化合物可以是化合物3。第二种化合物可以是化合物4,并且第三种化合物可以是化合物6。第二种化合物可以是化合物2,并且第三种化合物可以是化合物4。第二种化合物可以是化合物3,并且第三种化合物可以是化合物4。

[0231] 本发明的另一个方面包括化合物7用于治疗HCV感染的方法中,其中化合物7结合各自选自由化合物1、化合物2、化合物3、化合物4、化合物5、化合物6、化合物9、化合物10、化合物11、化合物12、化合物13、化合物14、化合物15和化合物16组成的组的第二种化合物和第三种化合物一起使用。

[0232] 本发明的另一个方面包括化合物9用于治疗HCV感染的方法中,其中化合物9结合

各自选自化合物1、化合物2、化合物3、化合物5、化合物6和化合物7组成的组的第二种化合物和第三种化合物一起使用。

[0233] 本发明的另一个方面包括化合物10用于治疗HCV感染的方法中,其中化合物10结合各自选自化合物1、化合物2、化合物3、化合物5、化合物6和化合物7组成的组的第二种化合物和第三种化合物一起使用。

[0234] 本发明的另一个方面包括化合物11用于治疗HCV感染的方法中,其中化合物11结合各自选自化合物1、化合物2、化合物3、化合物5、化合物6和化合物7组成的组的第二种化合物和第三种化合物一起使用。

[0235] 本发明的另一个方面包括化合物1用于治疗HCV感染的方法中,其中化合物1结合各自选自化合物2、化合物3、化合物4、化合物5、化合物6、化合物7、化合物9、化合物10、化合物11、化合物12、化合物13、化合物14、化合物15和化合物16组成的组的第二种化合物、第三种化合物和第四种化合物一起使用。第二种化合物可以是化合物3、化合物4、化合物5或化合物6。第二种化合物可以是化合物2,并且第三种化合物可以是化合物4。第二种化合物可以是化合物3,并且第三种化合物可以是化合物4。第二种化合物可以是化合物2,并且第三种化合物可以是化合物6。第二种化合物可以是化合物3,并且第三种化合物可以是化合物6。第二种化合物可以是化合物4,并且第三种化合物可以是化合物6。

[0236] 本发明的另一个方面包括化合物2用于治疗HCV感染的方法中,其中化合物2结合各自选自化合物1、化合物3、化合物4、化合物5、化合物6、化合物7、化合物9、化合物10、化合物11、化合物12、化合物13、化合物14、化合物15和化合物16组成的组的第二种化合物、第三种化合物和第四种化合物一起使用。第二种化合物可以是化合物4。第二种化合物可以是化合物1,并且第三种化合物可以是化合物4。第二种化合物可以是化合物1,并且第三种化合物可以是化合物6。第二种化合物可以是化合物4,并且第三种化合物可以是化合物6。

[0237] 本发明的另一个方面包括化合物3用于治疗HCV感染的方法中,其中化合物3结合各自选自化合物1、化合物2、化合物4、化合物5、化合物6、化合物7、化合物9、化合物10、化合物11、化合物12、化合物13、化合物14、化合物15和化合物16组成的组的第二种化合物、第三种化合物和第四种化合物一起使用。第二种化合物可以是化合物1或化合物6。第二种化合物可以是化合物1,并且第三种化合物可以是化合物4。第二种化合物可以是化合物1,并且第三种化合物可以是化合物6。第二种化合物可以是化合物4,并且第三种化合物可以是化合物6。

[0238] 本发明的另一个方面包括化合物4用于治疗HCV感染的方法中,其中化合物4结合各自选自化合物1、化合物2、化合物3、化合物5、化合物6和化合物7组成的组的第二种化合物、第三种化合物和第四种化合物一起使用。第二种化合物可以是化合物1、化合物2、化合物3或化合物6。第二种化合物可以是化合物1,并且第三种化合物可以是化合物2。第二种化合物可以是化合物1,并且第三种化合物可以是化合物3。第二种化合物可以是化合物1,并且第三种化合物可以是化合物6。第二种化合物可以是化合物2,并且第三种化合物可以是化合物6。第二种化合物可以是化合物3,并且第三种化合物可以是化合物6。

[0239] 本发明的另一个方面包括化合物5用于治疗HCV感染的方法中,其中化合物5结合各自选自化合物1、化合物2、化合物3、化合物4、化合物6、化合物7、化合物9、化合物10、化合物11、化合物12、化合物13、化合物14、化合物15和化合物16组成的组的第二种化合物、第

三种化合物和第四种化合物一起使用。第二种化合物可以是化合物1。

[0240] 本发明的另一个方面包括化合物6用于治疗HCV感染的方法中,其中化合物6结合各自选自由化合物1、化合物2、化合物3、化合物4、化合物5、化合物7、化合物9、化合物10、化合物11、化合物12、化合物13、化合物14、化合物15和化合物16组成的组的第二种化合物、第三种化合物和第四种化合物一起使用。第二种化合物可以是化合物1、化合物2、化合物3或化合物4。第二种化合物可以是化合物1,并且第三种化合物可以是化合物2。第二种化合物可以是化合物1,并且第三种化合物可以是化合物3。第二种化合物可以是化合物4,并且第三种化合物可以是化合物6。第二种化合物可以是化合物2,并且第三种化合物可以是化合物4。第二种化合物可以是化合物3,并且第三种化合物可以是化合物4。

[0241] 本发明的另一个方面包括化合物7用于治疗HCV感染的方法中,其中化合物7结合各自选自由化合物1、化合物2、化合物3、化合物4、化合物5、化合物6、化合物9、化合物10、化合物11、化合物12、化合物13、化合物14、化合物15和化合物16组成的组的第二种化合物、第三种化合物和第四种化合物一起使用。

[0242] 本发明的另一个方面包括化合物9用于治疗HCV感染的方法中,其中化合物9结合各自选自由化合物1、化合物2、化合物3、化合物5、化合物6和化合物7组成的组的第二种化合物、第三种化合物和第四种化合物一起使用。

[0243] 本发明的另一个方面包括化合物10用于治疗HCV感染的方法中,其中化合物10结合各自选自由化合物1、化合物2、化合物3、化合物5、化合物6和化合物7组成的组的第二种化合物、第三种化合物和第四种化合物一起使用。

[0244] 本发明的另一个方面包括化合物11用于治疗HCV感染的方法中,其中化合物11结合各自选自由化合物1、化合物2、化合物3、化合物5、化合物6和化合物7组成的组的第二种化合物、第三种化合物和第四种化合物一起使用。

[0245] 本发明的另一个方面包括化合物1用于治疗HCV感染的方法中,其中化合物1结合各自选自由化合物2、化合物3、化合物4、化合物5、化合物6、化合物7、化合物9、化合物10、化合物11、化合物12、化合物13、化合物14、化合物15和化合物16组成的组的第二种化合物、第三种化合物、第四种化合物和第五种化合物一起使用。第二种化合物可以是化合物3、化合物4、化合物5或化合物6。第二种化合物可以是化合物2,并且第三种化合物可以是化合物4。第二种化合物可以是化合物3,并且第三种化合物可以是化合物4。第二种化合物可以是化合物2,并且第三种化合物可以是化合物6。第二种化合物可以是化合物3,并且第三种化合物可以是化合物6。第二种化合物可以是化合物4,并且第三种化合物可以是化合物6。

[0246] 本发明的另一个方面包括化合物2用于治疗HCV感染的方法中,其中化合物2结合各自选自由化合物1、化合物3、化合物4、化合物5、化合物6、化合物7、化合物9、化合物10、化合物11、化合物12、化合物13、化合物14、化合物15和化合物16组成的组的第二种化合物、第三种化合物、第四种化合物和第五种化合物一起使用。第二种化合物可以是化合物4。第二种化合物可以是化合物1,并且第三种化合物可以是化合物4。第二种化合物可以是化合物1,并且第三种化合物可以是化合物6。第二种化合物可以是化合物4,并且第三种化合物可以是化合物6。

[0247] 本发明的另一个方面包括化合物3用于治疗HCV感染的方法中,其中化合物3结合各自选自由化合物1、化合物2、化合物4、化合物5、化合物6、化合物7、化合物9、化合物10、化

合物11、化合物12、化合物13、化合物14、化合物15和化合物16组成的组的第二种化合物、第三种化合物、第四种化合物和第五种化合物一起使用。第二种化合物可以是化合物1或化合物6。第二种化合物可以是化合物1,并且第三种化合物可以是化合物4。第二种化合物可以是化合物1,并且第三种化合物可以是化合物6。第二种化合物可以是化合物4,并且第三种化合物可以是化合物6。

[0248] 本发明的另一个方面包括化合物4用于治疗HCV感染的方法中,其中化合物4结合各自选自由化合物1、化合物2、化合物3、化合物5、化合物6和化合物7组成的组的第二种化合物、第三种化合物、第四种化合物和第五种化合物一起使用。第二种化合物可以是化合物1、化合物2、化合物3或化合物6。第二种化合物可以是化合物1,并且第三种化合物可以是化合物2。第二种化合物可以是化合物1,并且第三种化合物可以是化合物3。第二种化合物可以是化合物1,并且第三种化合物可以是化合物6。第二种化合物可以是化合物2,并且第三种化合物可以是化合物6。第二种化合物可以是化合物3,并且第三种化合物可以是化合物6。

[0249] 本发明的另一个方面包括化合物5用于治疗HCV感染的方法中,其中化合物5结合各自选自由化合物1、化合物2、化合物3、化合物4、化合物6、化合物7、化合物9、化合物10、化合物11、化合物12、化合物13、化合物14、化合物15和化合物16组成的组的第二种化合物、第三种化合物、第四种化合物和第五种化合物一起使用。第二种化合物可以是化合物1。

[0250] 本发明的另一个方面包括化合物6用于治疗HCV感染的方法中,其中化合物6结合各自选自由化合物1、化合物2、化合物3、化合物4、化合物5、化合物7、化合物9、化合物10、化合物11、化合物12、化合物13、化合物14、化合物15和化合物16组成的组的第二种化合物、第三种化合物、第四种化合物和第五种化合物一起使用。第二种化合物可以是化合物1、化合物2、化合物3或化合物4。第二种化合物可以是化合物1,并且第三种化合物可以是化合物2。第二种化合物可以是化合物1,并且第三种化合物可以是化合物3。第二种化合物可以是化合物4,并且第三种化合物可以是化合物6。第二种化合物可以是化合物2,并且第三种化合物可以是化合物4。第二种化合物可以是化合物3,并且第三种化合物可以是化合物4。

[0251] 本发明的另一个方面包括化合物7用于治疗HCV感染的方法中,其中化合物7结合各自选自由化合物1、化合物2、化合物3、化合物4、化合物5、化合物6、化合物9、化合物10、化合物11、化合物12、化合物13、化合物14、化合物15和化合物16组成的组的第二种化合物、第三种化合物、第四种化合物和第五种化合物一起使用。

[0252] 本发明的另一个方面包括化合物9用于治疗HCV感染的方法中,其中化合物9结合各自选自由化合物1、化合物2、化合物3、化合物5、化合物6和化合物7组成的组的第二种化合物、第三种化合物、第四种化合物和第五种化合物一起使用。

[0253] 本发明的另一个方面包括化合物10用于治疗HCV感染的方法中,其中化合物10结合各自选自由化合物1、化合物2、化合物3、化合物5、化合物6和化合物7组成的组的第二种化合物、第三种化合物、第四种化合物和第五种化合物一起使用。

[0254] 本发明的另一个方面包括化合物11用于治疗HCV感染的方法中,其中化合物11结合各自选自由化合物1、化合物2、化合物3、化合物5、化合物6和化合物7组成的组的第二种化合物、第三种化合物、第四种化合物和第五种化合物一起使用。

[0255] 本发明的一个方面包括用于改善人HCV感染的一种或多种症状的方法、用于降低

诊断为HCV的人体中病毒载量的方法、治疗人患者HCV的方法和用于降低具有共同给药的口服抗病剂抗性的HCV准种出现的方法,每种方法包括给药化合物1并且进一步包括给药选自自由化合物2、化合物3、化合物4、化合物5、化合物6、化合物7、化合物9、化合物10、化合物11、化合物12、化合物13、化合物14、化合物15和化合物16组成的组的第二种化合物。第二种化合物可以是化合物3、化合物4、化合物5或化合物6。

[0256] 本发明的另一个方面包括用于改善人HCV感染的一种或多种症状的方法、用于降低诊断为HCV的人体中病毒载量的方法、治疗人患者HCV的方法和用于降低具有共同给药的口服抗病剂抗性的HCV准种出现的方法,每种方法包括给药化合物2并且进一步包括给药选自自由化合物1、化合物3、化合物4、化合物5、化合物6、化合物7、化合物9、化合物10、化合物11、化合物12、化合物13、化合物14、化合物15和化合物16组成的组的第二种化合物。第二种化合物可以是化合物4。

[0257] 本发明的另一个方面包括用于改善人HCV感染的一种或多种症状的方法、用于降低诊断为HCV的人体中病毒载量的方法、治疗人患者HCV的方法和用于降低具有共同给药的口服抗病剂抗性的HCV准种出现的方法,每种方法包括给药化合物3并且进一步包括给药选自自由化合物1、化合物2、化合物4、化合物5、化合物6、化合物7、化合物9、化合物10、化合物11、化合物12、化合物13、化合物14、化合物15和化合物16组成的组的第二种化合物。第二种化合物可以是化合物1或化合物6。

[0258] 本发明的另一个方面包括用于改善人HCV感染的一种或多种症状的方法、用于降低诊断为HCV的人体中病毒载量的方法、治疗人患者HCV的方法和用于降低具有共同给药的口服抗病剂抗性的HCV准种出现的方法,每种方法包括给药化合物4并且进一步包括给药选自自由化合物1、化合物2、化合物3、化合物5、化合物6和化合物7组成的组的第二种化合物。第二种化合物可以是化合物1或化合物2或化合物3或化合物6。

[0259] 本发明的另一个方面包括用于改善人HCV感染的一种或多种症状的方法、用于降低诊断为HCV的人体中病毒载量的方法、治疗人患者HCV的方法和用于降低具有共同给药的口服抗病剂抗性的HCV准种出现的方法,每种方法包括给药化合物5并且进一步包括给药选自自由化合物1、化合物2、化合物3、化合物4、化合物6、化合物7、化合物9、化合物10、化合物11、化合物12、化合物13、化合物14、化合物15和化合物16组成的组的第二种化合物。第二种化合物可以是化合物1。

[0260] 本发明的另一个方面包括用于改善人HCV感染的一种或多种症状的方法、用于降低诊断为HCV的人体中病毒载量的方法、治疗人患者HCV的方法和用于降低具有共同给药的口服抗病剂抗性的HCV准种出现的方法,每种方法包括给药化合物6并且进一步包括给药选自自由化合物1、化合物2、化合物3、化合物4、化合物5、化合物7、化合物9、化合物10、化合物11、化合物12、化合物13、化合物14、化合物15和化合物16组成的组的第二种化合物。第二种化合物可以是化合物1、化合物2、化合物3或化合物4。

[0261] 本发明的另一个方面包括用于改善人HCV感染的一种或多种症状的方法、用于降低诊断为HCV的人体中病毒载量的方法、治疗人患者HCV的方法和用于降低具有共同给药的口服抗病剂抗性的HCV准种出现的方法,每种方法包括给药化合物7并且进一步包括给药选自自由化合物1、化合物2、化合物3、化合物4、化合物5、化合物6、化合物9、化合物10、化合物11、化合物12、化合物13、化合物14、化合物15和化合物16组成的组的第二种化合物。

[0262] 本发明的另一个方面包括用于改善人HCV感染的一种或多种症状的方法、用于降低诊断为HCV的人体中病毒载量的方法、治疗人患者HCV的方法和用于降低具有共同给药的口服抗病剂抗性的HCV准种出现的方法,每种方法包括给药化合物9并且进一步包括给药选自自由化合物1、化合物2、化合物3、化合物5、化合物6和化合物7组成的组的第二种化合物。

[0263] 本发明的另一个方面包括用于改善人HCV感染的一种或多种症状的方法、用于降低诊断为HCV的人体中病毒载量的方法、治疗人患者HCV的方法和用于降低具有共同给药的口服抗病剂抗性的HCV准种出现的方法,每种方法包括给药化合物10并且进一步包括给药选自自由化合物1、化合物2、化合物3、化合物5、化合物6和化合物7组成的组的第二种化合物。

[0264] 本发明的另一个方面包括用于改善人HCV感染的一种或多种症状的方法、用于降低诊断为HCV的人体中病毒载量的方法、治疗人患者HCV的方法和用于降低具有共同给药的口服抗病剂抗性的HCV准种出现的方法,每种方法包括给药化合物11并且进一步包括给药选自自由化合物1、化合物2、化合物3、化合物5、化合物6和化合物7组成的组的第二种化合物。

[0265] 本发明的另一个方面包括用于改善人HCV感染的一种或多种症状的方法、用于降低诊断为HCV的人体中病毒载量的方法、治疗人患者HCV的方法和用于降低具有共同给药的口服抗病剂抗性的HCV准种出现的方法,每种方法包括给药化合物1并且进一步包括给药各自选自自由化合物2、化合物3、化合物4、化合物5、化合物6、化合物7、化合物9、化合物10、化合物11、化合物12、化合物13、化合物14、化合物15和化合物16组成的组的第二种化合物和第三种化合物。第二种化合物可以是化合物3,或化合物4,或化合物5或化合物6。第二种化合物可以是化合物2,并且第三种化合物可以是化合物4。第二种化合物可以是化合物3,并且第三种化合物可以是化合物4。第二种化合物可以是化合物2,并且第三种化合物可以是化合物6。第二种化合物可以是化合物3,并且第三种化合物可以是化合物6。第二种化合物可以是化合物4,并且第三种化合物可以是化合物6。

[0266] 本发明的另一个方面包括用于改善人HCV感染的一种或多种症状的方法、用于降低诊断为HCV的人体中病毒载量的方法、治疗人患者HCV的方法和用于降低具有共同给药的口服抗病剂抗性的HCV准种出现的方法,每种方法包括给药化合物2并且进一步包括给药各自选自自由化合物1、化合物3、化合物4、化合物5、化合物6、化合物7、化合物9、化合物10、化合物11、化合物12、化合物13、化合物14、化合物15和化合物16组成的组的第二种化合物和第三种化合物。第二种化合物可以是化合物4。第二种化合物可以是化合物1,并且第三种化合物可以是化合物4。第二种化合物可以是化合物1,并且第三种化合物可以是化合物6。第二种化合物可以是化合物4,并且第三种化合物可以是化合物6。

[0267] 本发明的另一个方面包括用于改善人HCV感染的一种或多种症状的方法、用于降低诊断为HCV的人体中病毒载量的方法、治疗人患者HCV的方法和用于降低具有共同给药的口服抗病剂抗性的HCV准种出现的方法,每种方法包括给药化合物3并且进一步包括给药各自选自自由化合物1、化合物2、化合物4、化合物5、化合物6、化合物7、化合物9、化合物10、化合物11、化合物12、化合物13、化合物14、化合物15和化合物16组成的组的第二种化合物和第三种化合物。第二种化合物可以是化合物1或化合物6。第二种化合物可以是化合物1,并且第三种化合物可以是化合物4。第二种化合物可以是化合物1,并且第三种化合物可以是化合物6。第二种化合物可以是化合物4,并且第三种化合物可以是化合物6。

[0268] 本发明的另一个方面包括用于改善人HCV感染的一种或多种症状的方法、用于降

低诊断为HCV的人体中病毒载量的方法、治疗人患者HCV的方法和用于降低具有共同给药的口服抗病剂抗性的HCV准种出现的方法,每种方法包括给药化合物4并且进一步包括给药各自选自由化合物1、化合物2、化合物3、化合物5、化合物6和化合物7组成的组的第二种化合物和第三种化合物。第二种化合物可以是化合物1、化合物2、化合物3或化合物6。第二种化合物可以是化合物1,并且第三种化合物可以是化合物2。第二种化合物可以是化合物1,并且第三种化合物可以是化合物3。第二种化合物可以是化合物1,并且第三种化合物可以是化合物6。第二种化合物可以是化合物2,并且第三种化合物可以是化合物6。第二种化合物可以是化合物3,并且第三种化合物可以是化合物6。

[0269] 本发明的另一个方面包括用于改善人HCV感染的一种或多种症状的方法、用于降低诊断为HCV的人体中病毒载量的方法、治疗人患者HCV的方法和用于降低具有共同给药的口服抗病剂抗性的HCV准种出现的方法,每种方法包括给药化合物5并且进一步包括给药各自选自由化合物1、化合物2、化合物3、化合物4、化合物6、化合物7、化合物9、化合物10、化合物11、化合物12、化合物13、化合物14、化合物15和化合物16组成的组的第二种化合物和第三种化合物。第二种化合物可以是化合物1。

[0270] 本发明的另一个方面包括用于改善人HCV感染的一种或多种症状的方法、用于降低诊断为HCV的人体中病毒载量的方法、治疗人患者HCV的方法和用于降低具有共同给药的口服抗病剂抗性的HCV准种出现的方法,每种方法包括给药化合物6并且进一步包括给药各自选自由化合物1、化合物2、化合物3、化合物4、化合物5、化合物7、化合物9、化合物10、化合物11、化合物12、化合物13、化合物14、化合物15和化合物16组成的组的第二种化合物和第三种化合物。第二种化合物可以是化合物1,化合物2、化合物3或化合物4。第二种化合物可以是化合物1,并且第三种化合物可以是化合物2。第二种化合物可以是化合物1,并且第三种化合物可以是化合物3。第二种化合物可以是化合物4,并且第三种化合物可以是化合物6。第二种化合物可以是化合物2,并且第三种化合物可以是化合物4。第二种化合物可以是化合物3,并且第三种化合物可以是化合物4。

[0271] 本发明的另一个方面包括用于改善人HCV感染的一种或多种症状的方法、用于降低诊断为HCV的人体中病毒载量的方法、治疗人患者HCV的方法和用于降低具有共同给药的口服抗病剂抗性的HCV准种出现的方法,每种方法包括给药化合物7并且进一步包括给药各自选自由化合物1、化合物2、化合物3、化合物4、化合物5、化合物6、化合物9、化合物10、化合物11、化合物12、化合物13、化合物14、化合物15和化合物16组成的组的第二种化合物和第三种化合物。

[0272] 本发明的另一个方面包括用于改善人HCV感染的一种或多种症状的方法、用于降低诊断为HCV的人体中病毒载量的方法、治疗人患者HCV的方法和用于降低具有共同给药的口服抗病剂抗性的HCV准种出现的方法,每种方法包括给药化合物9并且进一步包括给药各自选自由化合物1、化合物2、化合物3、化合物5、化合物6和化合物7组成的组的第二种化合物和第三种化合物。

[0273] 本发明的另一个方面包括用于改善人HCV感染的一种或多种症状的方法、用于降低诊断为HCV的人体中病毒载量的方法、治疗人患者HCV的方法和用于降低具有共同给药的口服抗病剂抗性的HCV准种出现的方法,每种方法包括给药化合物10并且进一步包括给药各自选自由化合物1、化合物2、化合物3、化合物5、化合物6和化合物7组成的组的第二种化

合物和第三种化合物。

[0274] 本发明的另一个方面包括用于改善人HCV感染的一种或多种症状的方法、用于降低诊断为HCV的人体中病毒载量的方法、治疗人患者HCV的方法和用于降低具有共同给药的口服抗病剂抗性的HCV准种出现的方法,每种方法包括给药化合物11并且进一步包括给药各自选自由化合物1、化合物2、化合物3、化合物5、化合物6和化合物7组成的组的第二种化合物和第三种化合物。

[0275] 本发明的另一个方面包括用于改善人HCV感染的一种或多种症状的方法、用于降低诊断为HCV的人体中病毒载量的方法、治疗人患者HCV的方法和用于降低具有共同给药的口服抗病剂抗性的HCV准种出现的方法,每种方法包括给药化合物1并且进一步包括给药各自选自由化合物2、化合物3、化合物4、化合物5、化合物6、化合物7、化合物9、化合物10、化合物11、化合物12、化合物13、化合物14、化合物15和化合物16组成的组的第二种化合物、第三种化合物和第四种化合物。第二种化合物可以是化合物3、化合物4、化合物5或化合物6。第二种化合物可以是化合物2,并且第三种化合物可以是化合物4。第二种化合物可以是化合物3,并且第三种化合物可以是化合物4。第二种化合物可以是化合物2,并且第三种化合物可以是化合物6。第二种化合物可以是化合物3,并且第三种化合物可以是化合物6。第二种化合物可以是化合物4,并且第三种化合物可以是化合物6。

[0276] 本发明的另一个方面包括用于改善人HCV感染的一种或多种症状的方法、用于降低诊断为HCV的人体中病毒载量的方法、治疗人患者HCV的方法和用于降低具有共同给药的口服抗病剂抗性的HCV准种出现的方法,每种方法包括给药化合物2并且进一步包括给药各自选自由化合物1、化合物3、化合物4、化合物5、化合物6、化合物7、化合物9、化合物10、化合物11、化合物12、化合物13、化合物14、化合物15和化合物16组成的组的第二种化合物、第三种化合物和第四种化合物。第二种化合物可以是化合物4。第二种化合物可以是化合物1,并且第三种化合物可以是化合物4。第二种化合物可以是化合物1,并且第三种化合物可以是化合物6。第二种化合物可以是化合物4,并且第三种化合物可以是化合物6。

[0277] 本发明的另一个方面包括用于改善人HCV感染的一种或多种症状的方法、用于降低诊断为HCV的人体中病毒载量的方法、治疗人患者HCV的方法和用于降低具有共同给药的口服抗病剂抗性的HCV准种出现的方法,每种方法包括给药化合物3并且进一步包括给药各自选自由化合物1、化合物2、化合物4、化合物5、化合物6、化合物7、化合物9、化合物10、化合物11、化合物12、化合物13、化合物14、化合物15和化合物16组成的组的第二种化合物、第三种化合物和第四种化合物。第二种化合物可以是化合物1或化合物6。第二种化合物可以是化合物1,并且第三种化合物可以是化合物4。第二种化合物可以是化合物1,并且第三种化合物可以是化合物6。第二种化合物可以是化合物4,并且第三种化合物可以是化合物6。

[0278] 本发明的另一个方面包括用于改善人HCV感染的一种或多种症状的方法、用于降低诊断为HCV的人体中病毒载量的方法、治疗人患者HCV的方法和用于降低具有共同给药的口服抗病剂抗性的HCV准种出现的方法,每种方法包括给药化合物4并且进一步包括给药各自选自由化合物1、化合物2、化合物3、化合物5、化合物6和化合物7组成的组的第二种化合物、第三种化合物和第四种化合物。第二种化合物可以是化合物1、化合物2、化合物3或化合物6。第二种化合物可以是化合物1,并且第三种化合物可以是化合物2。第二种化合物可以是化合物1,并且第三种化合物可以是化合物3。第二种化合物可以是化合物1,并且第三种

化合物可以是化合物6。第二种化合物可以是化合物2,并且第三种化合物可以是化合物6。第二种化合物可以是化合物3,并且第三种化合物可以是化合物6。

[0279] 本发明的另一个方面包括用于改善人HCV感染的一种或多种症状的方法、用于降低诊断为HCV的人体中病毒载量的方法、治疗人患者HCV的方法和用于降低具有共同给药的口服抗病剂抗性的HCV准种出现的方法,每种方法包括给药化合物5并且进一步包括给药各自选自由化合物1、化合物2、化合物3、化合物4、化合物6、化合物7、化合物9、化合物10、化合物11、化合物12、化合物13、化合物14、化合物15和化合物16组成的组的第二种化合物、第三种化合物和第四种化合物。第二种化合物可以是化合物1。

[0280] 本发明的另一个方面包括用于改善人HCV感染的一种或多种症状的方法、用于降低诊断为HCV的人体中病毒载量的方法、治疗人患者HCV的方法和用于降低具有共同给药的口服抗病剂抗性的HCV准种出现的方法,每种方法包括给药化合物6并且进一步包括给药各自选自由化合物1、化合物2、化合物3、化合物4、化合物5、化合物7、化合物9、化合物10、化合物11、化合物12、化合物13、化合物14、化合物15和化合物16组成的组的第二种化合物、第三种化合物和第四种化合物。第二种化合物可以是化合物1,化合物2、化合物3或化合物4。第二种化合物可以是化合物1,并且第三种化合物可以是化合物2。第二种化合物可以是化合物2,并且第三种化合物可以是化合物3。第二种化合物可以是化合物4,并且第三种化合物可以是化合物6。第二种化合物可以是化合物2,并且第三种化合物可以是化合物4。第二种化合物可以是化合物3,并且第三种化合物可以是化合物4。

[0281] 本发明的另一个方面包括用于改善人HCV感染的一种或多种症状的方法、用于降低诊断为HCV的人体中病毒载量的方法、治疗人患者HCV的方法和用于降低具有共同给药的口服抗病剂抗性的HCV准种出现的方法,每种方法包括给药化合物7并且进一步包括给药各自选自由化合物1、化合物2、化合物3、化合物4、化合物5、化合物6、化合物9、化合物10、化合物11、化合物12、化合物13、化合物14、化合物15和化合物16组成的组的第二种化合物、第三种化合物和第四种化合物。

[0282] 本发明的另一个方面包括用于改善人HCV感染的一种或多种症状的方法、用于降低诊断为HCV的人体中病毒载量的方法、治疗人患者HCV的方法和用于降低具有共同给药的口服抗病剂抗性的HCV准种出现的方法,每种方法包括给药化合物9并且进一步包括给药各自选自由化合物1、化合物2、化合物3、化合物5、化合物6和化合物7组成的组的第二种化合物、第三种化合物和第四种化合物。

[0283] 本发明的另一个方面包括用于改善人HCV感染的一种或多种症状的方法、用于降低诊断为HCV的人体中病毒载量的方法、治疗人患者HCV的方法和用于降低具有共同给药的口服抗病剂抗性的HCV准种出现的方法,每种方法包括给药化合物10并且进一步包括给药各自选自由化合物1、化合物2、化合物3、化合物5、化合物6和化合物7组成的组的第二种化合物、第三种化合物和第四种化合物。

[0284] 本发明的另一个方面包括用于改善人HCV感染的一种或多种症状的方法、用于降低诊断为HCV的人体中病毒载量的方法、治疗人患者HCV的方法和用于降低具有共同给药的口服抗病剂抗性的HCV准种出现的方法,每种方法包括给药化合物11并且进一步包括给药各自选自由化合物1、化合物2、化合物3、化合物5、化合物6和化合物7组成的组的第二种化合物、第三种化合物和第四种化合物。

[0285] 本发明的另一个方面包括用于改善人HCV感染的一种或多种症状的方法、用于降低诊断为HCV的人体中病毒载量的方法、治疗人患者HCV的方法和用于降低具有共同给药的口服抗病剂抗性的HCV准种出现的方法,每种方法包括给药化合物1并且进一步包括给药各自选自由化合物2、化合物3、化合物4、化合物5、化合物6、化合物7、化合物9、化合物10、化合物11、化合物12、化合物13、化合物14、化合物15和化合物16组成的组的第二种化合物、第三种化合物、第四种化合物和第五种化合物。第二种化合物可以是化合物3、化合物4、化合物5或化合物6。第二种化合物可以是化合物2,并且第三种化合物可以是化合物4。第二种化合物可以是化合物3,并且第三种化合物可以是化合物4。第二种化合物可以是化合物2,并且第三种化合物可以是化合物6。第二种化合物可以是化合物3,并且第三种化合物可以是化合物6。第二种化合物可以是化合物4,并且第三种化合物可以是化合物6。

[0286] 本发明的另一个方面包括用于改善人HCV感染的一种或多种症状的方法、用于降低诊断为HCV的人体中病毒载量的方法、治疗人患者HCV的方法和用于降低具有共同给药的口服抗病剂抗性的HCV准种出现的方法,每种方法包括给药化合物2并且进一步包括给药各自选自由化合物1、化合物3、化合物4、化合物5、化合物6、化合物7、化合物9、化合物10、化合物11、化合物12、化合物13、化合物14、化合物15和化合物16组成的组的第二种化合物、第三种化合物、第四种化合物和第五种化合物。第二种化合物可以是化合物4。第二种化合物可以是化合物1,并且第三种化合物可以是化合物4。第二种化合物可以是化合物1,并且第三种化合物可以是化合物6。第二种化合物可以是化合物4,并且第三种化合物可以是化合物6。

[0287] 本发明的另一个方面包括用于改善人HCV感染的一种或多种症状的方法、用于降低诊断为HCV的人体中病毒载量的方法、治疗人患者HCV的方法和用于降低具有共同给药的口服抗病剂抗性的HCV准种出现的方法,每种方法包括给药化合物3并且进一步包括给药各自选自由化合物1、化合物2、化合物4、化合物5、化合物6、化合物7、化合物9、化合物10、化合物11、化合物12、化合物13、化合物14、化合物15和化合物16组成的组的第二种化合物、第三种化合物、第四种化合物和第五种化合物。第二种化合物可以是化合物1或化合物6。第二种化合物可以是化合物1,并且第三种化合物可以是化合物4。第二种化合物可以是化合物1,并且第三种化合物可以是化合物6。第二种化合物可以是化合物4,并且第三种化合物可以是化合物6。

[0288] 本发明的另一个方面包括用于改善人HCV感染的一种或多种症状的方法、用于降低诊断为HCV的人体中病毒载量的方法、治疗人患者HCV的方法和用于降低具有共同给药的口服抗病剂抗性的HCV准种出现的方法,每种方法包括给药化合物4并且进一步包括给药各自选自由化合物1、化合物2、化合物3、化合物5、化合物6和化合物7组成的组的第二种化合物、第三种化合物、第四种化合物和第五种化合物。第二种化合物可以是化合物1、化合物2、化合物3或化合物6。第二种化合物可以是化合物1,并且第三种化合物可以是化合物2。第二种化合物可以是化合物1,并且第三种化合物可以是化合物3。第二种化合物可以是化合物1,并且第三种化合物可以是化合物6。第二种化合物可以是化合物2,并且第三种化合物可以是化合物6。第二种化合物可以是化合物3,并且第三种化合物可以是化合物6。

[0289] 本发明的另一个方面包括用于改善人HCV感染的一种或多种症状的方法、用于降低诊断为HCV的人体中病毒载量的方法、治疗人患者HCV的方法和用于降低具有共同给药的

口服抗病剂抗性的HCV准种出现的方法,每种方法包括给药化合物5并且进一步包括给药各自选自由化合物1、化合物2、化合物3、化合物4、化合物6、化合物7、化合物9、化合物10、化合物11、化合物12、化合物13、化合物14、化合物15和化合物16组成的组的第二种化合物、第三种化合物、第四种化合物和第五种化合物。第二种化合物可以是化合物1。

[0290] 本发明的另一个方面包括用于改善人HCV感染的一种或多种症状的方法、用于降低诊断为HCV的人体中病毒载量的方法、治疗人患者HCV的方法和用于降低具有共同给药的口服抗病剂抗性的HCV准种出现的方法,每种方法包括给药化合物6并且进一步包括给药各自选自由化合物1、化合物2、化合物3、化合物4、化合物5、化合物7、化合物9、化合物10、化合物11、化合物12、化合物13、化合物14、化合物15和化合物16组成的组的第二种化合物、第三种化合物、第四种化合物和第五种化合物。第二种化合物可以是化合物1,化合物2、化合物3或化合物4。第二种化合物可以是化合物1,并且第三种化合物可以是化合物2。第二种化合物可以是化合物1,并且第三种化合物可以是化合物3。第二种化合物可以是化合物4,并且第三种化合物可以是化合物6。第二种化合物可以是化合物2,并且第三种化合物可以是化合物4。第二种化合物可以是化合物3,并且第三种化合物可以是化合物4。

[0291] 本发明的另一个方面包括用于改善人HCV感染的一种或多种症状的方法、用于降低诊断为HCV的人体中病毒载量的方法、治疗人患者HCV的方法和用于降低具有共同给药的口服抗病剂抗性的HCV准种出现的方法,每种方法包括给药化合物7并且进一步包括给药各自选自由化合物1、化合物2、化合物3、化合物4、化合物5、化合物6、化合物9、化合物10、化合物11、化合物12、化合物13、化合物14、化合物15和化合物16组成的组的第二种化合物、第三种化合物、第四种化合物和第五种化合物。

[0292] 本发明的另一个方面包括用于改善人HCV感染的一种或多种症状的方法、用于降低诊断为HCV的人体中病毒载量的方法、治疗人患者HCV的方法和用于降低具有共同给药的口服抗病剂抗性的HCV准种出现的方法,每种方法包括给药化合物9并且进一步包括给药各自选自由化合物1、化合物2、化合物3、化合物5、化合物6和化合物7组成的组的第二种化合物、第三种化合物、第四种化合物和第五种化合物。

[0293] 本发明的另一个方面包括用于改善人HCV感染的一种或多种症状的方法、用于降低诊断为HCV的人体中病毒载量的方法、治疗人患者HCV的方法和用于降低具有共同给药的口服抗病剂抗性的HCV准种出现的方法,每种方法包括给药化合物10并且进一步包括给药各自选自由化合物1、化合物2、化合物3、化合物5、化合物6和化合物7组成的组的第二种化合物、第三种化合物、第四种化合物和第五种化合物。

[0294] 本发明的另一个方面包括用于改善人HCV感染的一种或多种症状的方法、用于降低诊断为HCV的人体中病毒载量的方法、治疗人患者HCV的方法和用于降低具有共同给药的口服抗病剂抗性的HCV准种出现的方法,每种方法包括给药化合物11并且进一步包括给药各自选自由化合物1、化合物2、化合物3、化合物5、化合物6和化合物7组成的组的第二种化合物、第三种化合物、第四种化合物和第五种化合物。

[0295] 给药途径和给药方式

[0296] 化合物1、化合物2、化合物3、化合物4、化合物5、化合物6、化合物7、化合物9、化合物10、化合物11、化合物12、化合物13、化合物14、化合物15和化合物16中的两种或多种以及联合疗法的任何其他成分适于通过待治疗病症合适的任何途径来给药。合适的途径包括口

服、直肠、鼻、局部(包括颊和舌下)、阴道和非肠道(包括皮下、肌内、静脉内、皮内、鞘内和硬膜外)等。将认识到优选的途径将根据例如接受者的病症而改变。

[0297] 当活性成分如下时,将获得协同作用:(1)共同配制(例如,在单一剂型中)并且在组合制剂中同时给药或传送;(2)作为分开制剂交替或平行传送;或(3)通过一些其他方案。在交替疗法中传送时,当化合物按序给药或传送时,例如,在分开的片剂、丸剂或胶囊中,或通过分开注射器中的不同注射,可以获得协同作用。通常,在交替疗法过程中,按序,即,连续给药有效剂量的每种活性成分,而在联合疗法中,将有效剂量的两种或多种活性成分一起给药。

[0298] 组合化合物与一种或多种组合化合物的共同给药通常是指一种或多种组合化合物的同时或按序给药,使得在病人体内存在治疗有效量的两种或多种组合化合物。在一些情况中,组合化合物(例如,两种、三种或四种组合化合物)将共同配制,以允许同时给药。在一些情况中,共同配制的组合化合物可以与一种或多种其他组合化合物共同给药。

[0299] 共同给药还包括在给药单位剂量的一种或多种其他活性成分之前或之后,给药单位剂量的组合化合物,例如,在给药一种或多种其他活性成分的几秒、几分钟或几小时内给药两种或多种组合化合物。例如,可以首先给药单位剂量的组合化合物,接着在几秒或几分钟内给药单位剂量的第二种组合化合物,接着在几秒或几分钟内给药单位剂量的一种或多种其他活性成分。或者,可以首先给药单位剂量的一种或多种其他活性成分,接着在几秒或几分钟内给药单位剂量的组合化合物,接着在几秒或几分钟内给药单位剂量的第二种组合化合物。在一些情况中,希望首先给药单位剂量的组合化合物,接着,在几小时的时间段(例如,1-12小时)后,给药单位剂量的第二种组合化合物,接着,在几小时的时间段(例如,1-12小时)后,给药单位剂量的一种或多种其他活性成分。在其他情况中,希望首先给药单位剂量的一种或多种其他活性成分,接着,在几小时的时间段(例如,1-12小时)后,给药单位剂量的组合化合物,接着,在几小时的时间段(例如,1-12小时)后,给药单位剂量的第二种组合化合物。在三种或多种组合化合物与一种或多种其他活性成分一起给药的情况中,组合化合物可以在彼此的几秒、几分钟或几小时(例如,1-12小时)内接连给药,并且可以在组合化合物给药之前、之中或之后,给药一种或多种其他活性化合物。在组合化合物共同配制的情况中,它们可以在一种或多种其他活性成分给药的同时、之前或之后给药。

[0300] 除非另外指出,联合疗法可以作为每种活性成分的分开剂型给药、一起或分开、按序或同时给药,并且彼此时间接近或时间遥远。

[0301] 治疗过程可以持续例如约12周至约48周,或更长,例如,约12周至约24周。

[0302] 本发明包括改善人HCV感染的至少一种症状的治疗有效成分的组合物,所述症状包括但不限于恶心、呕吐、失去食欲、疲劳、黄疸、呕吐、腹泻、脱水、腹痛、肝硬化。此外,在一些HCV感染个体中,联合疗法的使用能有效地将受感染人体内存在的HCV病毒颗粒的病毒载量降低统计学显著量。例如,可以使用例如COBAS TaqMan HCV试验(罗氏分子系统(Roche Molecular Systems)),通过测量血浆HCV RNA水平来测量病毒载量。通常,用根据本发明的组合化合物治疗的HCV感染人员经历与HCV感染相关的一种或多种症状的改善。

[0303] 两种或多种组合化合物与病毒唑而不是干扰素的组合

[0304] 如以上所讨论的,一些目前的HCV治疗包括给药干扰素,但这种治疗通常产生不希望的副作用。因此,希望发现不需要给药干扰素的有效HCV治疗。

[0305] 本发明的一个方面提供了用于治疗HCV的组合物、方法、用途等,包括给药两种或多种组合化合物或其药物学上可接受的盐和病毒唑,没有给药一种或多种干扰素。本发明的这个方面特别有用,因为其可以有效治疗HCV,而没有与给药一种或多种干扰素相关的副作用。

[0306] 在本发明的一个实施方案中,病毒唑和组合化合物或其药物学上可接受的盐,可选与一种或多种其他药剂的组合含量能有效治疗HCV感染。

[0307] 本发明的另一个方面包括用于改善人HCV感染的一种或多种症状的方法,包括:给药两种或多种组合化合物或其药物学上可接受的盐和病毒唑,没有给药一种或多种干扰素。在这个方面中,本发明没有排除给药一种或多种干扰素的可能。相反,本发明可以结合另一种疗法一起使用,所述另一种疗法实际上包括一种或多种干扰素。本发明的一个方面包括用病毒唑的HCV的有效治疗,而不需要一种或多种干扰素。

[0308] 本发明的另一个方面包括用于降低诊断为HCV的人体中病毒载量的方法,包括:给药两种或多种组合化合物或其药物学上可接受的盐和病毒唑,但没有一种或多种干扰素。

[0309] 本发明的另一个方面包括用于治疗人患者的HCV的方法,基本上由给药病毒唑并结合两种或多种组合化合物或其药物学上可接受的盐组成。

[0310] 本发明的另一个方面包括用于降低具有共同给药的口服抗病剂抗性的HCV准种出现的方法,包括:给药两种或多种组合化合物或其药物学上可接受的盐和病毒唑,没有同时给药一种或多种干扰素。

[0311] 相似地,本发明的另一个方面包括一种组合物,例如一种用于改善人HCV感染的一种或多种症状的组合物,其包含两种或多种组合化合物或其药物学上可接受的盐和病毒唑,没有一种或多种干扰素。本发明的另一个方面包括一种用于降低诊断为HCV的人体内病毒载量的组合物,其包含两种或多种组合化合物或其药物学上可接受的盐和病毒唑,但没有一种或多种干扰素。本发明的另一个方面包括一种用于治疗人患者的HCV的组合物,其基本上由病毒唑结合两种或多种组合化合物或其药物学上可接受的盐组成。本发明的另一个方面包括一种用于基于病毒唑的HCV疗法的组合物,其包括两种或多种组合化合物或其药物学上可接受的盐,附带条件是所述组合物不包括一种或多种干扰素。本发明的另一个方面包括一种用于降低人体中具有共同给药的口服抗病剂抗性的HCV准种出现的组合物,其包含两种或多种组合化合物或其药物学上可接受的盐和病毒唑,没有一种或多种干扰素。

[0312] 相似地,本发明的另一个方面包括两种或多种组合化合物或其药物学上可接受的盐和病毒唑在制造用于改善人HCV感染的一种或多种症状的药物中的用途,没有一种或多种干扰素;以及两种或多种组合化合物或其药物学上可接受的盐和病毒唑在制造用于降低诊断为HCV的人体内病毒载量的药物中的用途,但没有一种或多种干扰素;以及病毒唑结合两种或多种组合化合物或其药物学上可接受的盐在制造用于治疗人患者HCV的药物中的用途,其中所述用途没有包括使用一种或多种干扰素;以及两种或多种组合化合物或其药物学上可接受的盐在制造用于基于病毒唑的HCV疗法的药物中的用途,其中所述用途避免给药一种或多种干扰素;以及两种或多种组合化合物或其药物学上可接受的盐和病毒唑在制造用于降低具有共同给药的口服抗病剂抗性的HCV准种出现的药物中的用途,没有一种或多种干扰素。

[0313] 本发明的另一个方面包括包含病毒唑和两种或多种组合化合物或其药物学上可

接受的盐的组合物,所述组合物基本上不含一种或多种干扰素。在一个实施方案中,所述组合物可以作为具有每种活性成分的分开的剂型出现,一起或分开给药,按序或同时给药,以及彼此时间接近或时间遥远地进行给药。

[0314] 本发明的另一个方面包括药盒,其包含:病毒唑,两种或多种组合物化合物以及关于治疗、降低病毒载量或延迟HCV发作或进展的治疗方案的说明书,其中治疗方案包括给药两种或多种组合物和病毒唑,没有给药一种或多种干扰素。在一个实施方案中,这样的药盒还可以包括包装,如吸塑包装。或者,这样的药盒可以提供个体处方,并且作为分开包装的药物给药每种成分,但结合关于治疗、降低病毒载量或延迟HCV发作或进展的治疗方案的说明书时,确定这种药盒在本发明的范围之内。

[0315] 本发明的另一个方面包括一种药物组合物,其包含:病毒唑;两种或多种组合化合物或其药物学上可接受的盐以及一种或多种药物学上可接受的载体。在一个实施方案中,所述药物组合物可以是单一剂型。

[0316] 除非另外指出,与病毒唑的联合疗法可以作为具有给药的每种活性成分的分开的剂型给药(包括组合化合物),可以一起(例如,以单位剂型的形式,如片剂)或分开给药,按序或同时给药,以及彼此时间接近或时间遥远地进行给药。如果分开给药,每种化合物可以与其他的同时给药,或在其他的给药之前或之后。活性成分可以每日给药。在一个实施方案中,以分开的亚剂量,如每天一次、两个、三次或四次,来给药活性成分的日剂量。有利地,组合化合物或其药物学上可接受的盐和病毒唑的日剂量可以每天给药一次。

[0317] 尽管本发明包括用于治疗HCV的组合物、方法、用途等,包括给药两种或多种组合化合物或其药物学上可接受的盐;和病毒唑,但没有一种或多种干扰素,但本发明没有排除给药一种或多种干扰素于人的可能。相反,本发明可以结合用于另一种适应症的另一种疗法来使用,所述另一种疗法实际上包括一种或多种干扰素。

[0318] 两种或多种组合化合物与病毒唑和干扰素的组合

[0319] 本发明的另一个方面提供了组合物、方法、用途等,包括给药两种或多种组合化合物或其药物学上可接受的盐和病毒唑,以及一种或多种干扰素,用于HCV的治疗。更多干扰素的给药在时间上与组合化合物和病毒唑的给药相关。

[0320] 本发明的另一个方面包括用于改善人HCV感染的一种或多种症状的方法,包括给药两种或多种组合化合物或其药物学上可接受的盐,病毒唑和一种或多种干扰素。本发明的另一个方面包括一种用于降低诊断为HCV的人体内病毒载量的方法,包括给药两种或多种组合化合物或其药物学上可接受的盐,连同病毒唑和一种或多种干扰素。

[0321] 本发明的另一个方面包括一种基于病毒唑的HCV治疗方法,包括给药两种或多种组合化合物或其药物学上可接受的盐,连同病毒唑和一种或多种干扰素。

[0322] 本发明的另一个方面包括一种用于降低人体中具有共同给药的口服抗病剂抗性的HCV准种出现的方法,包括给药两种或多种组合化合物或其药物学上可接受的盐,连同病毒唑和一种或多种干扰素。

[0323] 本发明的另一个方面包括两种或多种组合化合物或其药物学上可接受的盐、病毒唑和一种或多种干扰素在制造用于改善人HCV感染的一种或多种症状的药物中的用途。本发明的另一个方面包括两种或多种组合化合物或其药物学上可接受的盐,连同病毒唑和一种或多种干扰素在制造用于降低诊断为HCV的人体内病毒载量的药物中的用途。本发明的

另一个方面包括病毒唑结合两种或多种组合化合物或其药物学上可接受的盐在制造用于治疗人患者HCV的药物中的用途,其中所述用途包括使用一种或多种干扰素。本发明的另一个方面包括两种或多种组合化合物或其药物学上可接受的盐在制造用于基于病毒唑的HCV治疗的药物中的用途,其中所述用途包括给药一种或多种干扰素。本发明的另一个方面包括两种或多种组合化合物或其药物学上可接受的盐、病毒唑和一种或多种干扰素在制造用于降低具有共同给药的口服抗病剂抗性的HCV准种出现的药物中的用途。

[0324] 本发明的另一个方面包括包含病毒唑和两种或多种组合化合物或其药物学上可接受的盐的组合物,该组合物包括一种或多种病毒唑。

[0325] 本发明的另一个方面包括一种药盒,其包括:病毒唑、两种或多种组合物化合物和一种或多种干扰素;以及关于治疗、降低病毒载量或延迟HCV发作或进展的治疗方案的说明书,其中治疗方案包括给药两种或多种组合物和病毒唑,并且给药一种或多种干扰素。在一个实施方案中,这样的药盒还可以包括包装,如吸塑包装。或者,这样的药盒可以提供个体处方,并且作为分开包装的药物给药每种成分,但结合关于治疗、降低病毒载量或延迟HCV发作或进展的治疗方案的说明书时,确定这种药盒在本发明的范围之内。

[0326] 本发明的另一个方面包括一种药物组合物,其包含:两种或多种组合化合物或其药物学上可接受的盐、病毒唑和一种或多种干扰素;以及一种或多种药物学上可接受的载体。在一个实施方案中,所述药物组合物可以是单一剂型。

[0327] 除非另外指出,与病毒唑和一种或多种干扰素的联合疗法可以作为具有给药的一种或多种干扰素的分开剂型给药于患者,以及用于联合疗法中(包括组合化合物)的剩余的每一种活性成分,可以一起(例如,以单位剂型的形式,如片剂)或分开给药,按序或同时给药,以及彼此时间接近或时间遥远地进行给药。如果分开给药,每种活性成分可以与其他的同时给药,或在其他的给药之前或之后。活性成分可以每日给药。在一个实施方案中,以分开的亚剂量,如每天一次、两个、三次或四次,来给药活性成分的日剂量。

[0328] 联合疗法,包括其他治疗剂

[0329] 在另一个实施方案中,合适组合的非限制性实例包括化合物1、化合物2、化合物3、化合物4、化合物5、化合物6、化合物7、化合物9、化合物10、化合物11、化合物12、化合物13、化合物14、化合物15和化合物16中的两种或多种与一种或所中其他活性成分的组合,所述其他活性成分包括HCV NS3蛋白酶抑制剂、 α -葡萄糖苷酶1抑制剂、保肝药、HCV NS5B聚合酶的核苷或核苷酸抑制剂、HCV NS5B聚合酶的非核苷抑制剂、HCV NS5A抑制剂、TLR-7激动剂、亲环蛋白抑制剂、HCV IRES抑制剂、HCV进入抑制剂、HCV成熟抑制剂、HCV装配抑制剂、HCV传染性抑制剂和药物动力学增强剂,以及用于治疗HCV的其他药物。更具体地,本发明的一种或多种可以结合选自以下组成的组的一种或多种化合物:

[0330] (i)HCV NS3蛋白酶抑制剂,例如,boceprevir(SCH-503034、SCH-7)、替拉瑞韦(telaprevir)(VX-950)、TM-435(IUPAC N-[(2R,3aR,10Z,11aS,12aR,14aR)-2-[2-(4-异丙基噻唑-2-基)-7-甲氧基-8-甲基喹啉-4-基氧]-5-甲基-4,14-二氧-1,2,3,3a,4,5,6,7,8,9,11a,12,12a,13,14,14a-十六氢环戊[c]环丙[g][1,6]二氮杂环四癸炔-12a-基羰基]环丙烷磺酰胺]、ABT-450、ACH-1625、ACH-2684、BI-201335、BI-1230、MK-5172、MK-7009、SCH-900518、VBY-376、VX-500、GS-9256、GS-9451、BMS-605339、PHX-1766、AS-101、YH-5258、YH5530、YH5531、和ITMN-191(R-7227);

[0331] (ii) α -葡萄糖苷酶1抑制剂,例如,西戈斯韦(celgosivir)(MX-3253)、UT-231B、米格列醇;

[0332] (iii)保肝药,例如,emericasan(IDN-6556)、ME-3738、silibilin和MitoQ;

[0333] (iv)HCV NS5B聚合酶的核苷或核苷酸抑制剂,例如,R1626、R7128(R4048)、IDX184、IDX-102、PSI-661、PSI-938、PSI-7851、PSI-7977、BCX-4678、伐洛他滨(valopicitabine)(NM-283)、MK-0608和TMC649128;

[0334] (v)HCV NS5B聚合酶的非核苷抑制剂,例如,filibuvir(PF-868554)、ABT-333、ABT-072、BI-207127、VCH-759、VCH-916、JTK-652、MK-3281、VBY-708、VCH-222、A848837、ANA-598、GL60667、GL59728、A-63890、A-48773、A-48547、BC-2329、VCH-796(nesbuvir)、GSK625433、BILN-1941和XTL-2125;

[0335] (vi)HCV NS5A抑制剂,例如,ACH-2928、AZD-2836(A-831)、AZD-7295(A-689)、BMS-766、BMS-790052、BMS-824393和PSI-461;

[0336] (vii)TLR-7激动剂,例如,咪喹莫特、852A、ANA-773、ANA-975、AZD-8848(DSP-3025)、PF-04878691和SM-360320,以及化合物8;

[0337] (viii)亲环蛋白抑制剂,例如,DEBIO-025、SCY-635和NIM811;

[0338] (ix)HCV IRES抑制剂,例如,MCI-067;

[0339] (x)药物动力学增强剂,例如,罗红霉素、BAS-100、SPI-452、PF-4194477、TMC-41629;

[0340] (xi)HCV进入抑制剂;

[0341] (xii)HCV装配抑制剂;

[0342] (xiii)HCV成熟抑制剂;

[0343] (xiv)HCV传染性抑制剂;和

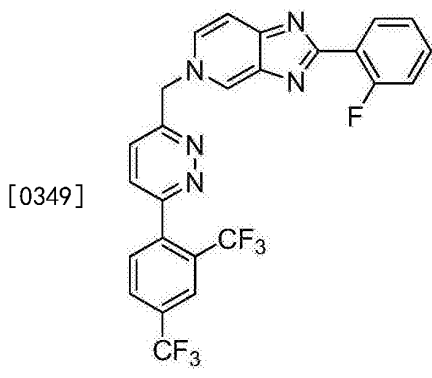
[0344] (xv)用于治疗HCV的其他药物,例如,胸腺肽 $\alpha 1$ (日达仙(Zadaxin))、硝唑尼特(nitazoxanide)(Alinea、NTZ)、BIVN-401(virostat)、PYN-17(altirex)、KPE02003002、actilon(CPG-10101)、KRN-7000、civacir、GI-5005、XTL-6865、BIT225、PTX-111、TX2865、TT-033i、ANA 971、NOV-205、tarvacin、EHC-18、VGX-410C、EMZ-702、AVI 4065、BMS-650032、BMS-791325、巴维昔单抗、MDX-1106(ONO-4538)、Oglufanide、FK-788和VX-497(merimepodib)。

[0345] 合成实施例

[0346] 用于制备化合物1、2、3、6、7和8的合成实验方案是文献中已知的。此外,以下实施例中提供了用于制备每一种组合化合物的合成实验方案。

[0347] 可以使用与US7,754,720中描述的那些相似的合成方法和中间体来制备化合物1。还可以按照以下实施例中描述的来制备化合物1。

[0348] 实施例1:5-({6-[2,4-双(三氟甲基)苯基]哒嗪-3-基}甲基)-2-(2-氟苯基)-5H-咪唑并[4,5-c]吡啶1。



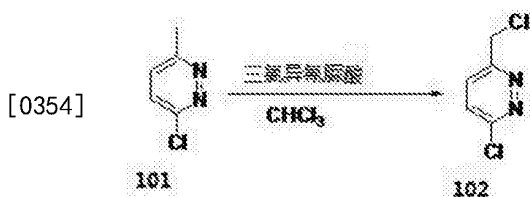
[0350]

化合物	MW	含量	摩尔	当量
104	453.79	95mg	0.209	1
DME	500μL			
2N aq. Na ₂ CO ₃		313μL	0.626	3
105	257.93	80.9mg	0.313	1.5
Pd(PPh ₃) ₄	1155	12mg	0.0104	0.05

[0351] 将化合物103溶解于二甲氧基乙烷(DME)中。向该溶液中加入2,4-双(三氟甲基)苯基硼酸105和2N aq. Na₂CO₃溶液中。向所得到的两相混合物中加入Pd(PPh₃)₄,并且然后将反应在80℃下加热72h。将反应冷却至室温,并且通过硅藻土过滤,并用EtOAc洗涤硅藻土。将滤液真空浓缩。将残余物在6g SiO₂上纯化,使用MeOH/CH₂Cl₂来洗脱化合物。由此获得的化合物受到PPh₃(O)的污染。将产物在1mm Chromatotron平板上再次纯化,在1%步骤中使用0至5% MeOH/CH₂Cl₂。合并纯的级分,并且真空浓缩,然后在高真空下干燥12h。获得11.8mg化合物1的游离碱,没有PPh₃污染。¹H NMR(300MHz, CD₃OD) δ6.20(s, 2), 7.32(m, 3), 7.52(m, 1), 7.78(d, 1), 7.89(d, 1), 7.95(s, 2), 8.15(m, 3), 8.35(d, 1), 9.12(s, 1); LC/MS M+H=518。

[0352] 如下制备中间体化合物104。

[0353] a. 化合物102的制备。

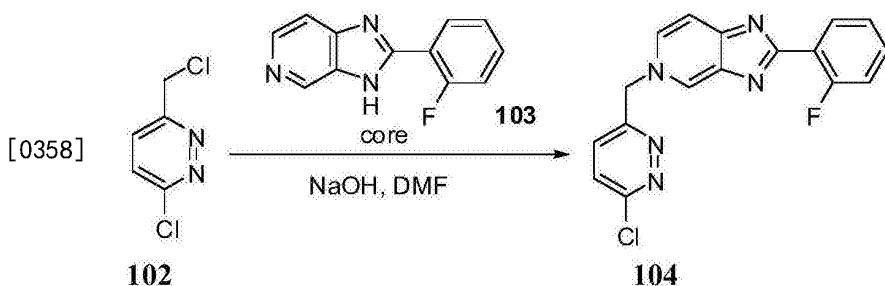


[0355]

化合物	MW	含量	mmoles	当量
101	128.56	5g	38.9	1
TCCA	232.41	3.62g	15.6	0.4
CHCl ₃		130mL		

[0356] 在60℃下,向CHCl₃中的商业购得起始材料101的溶液中,加入三氯异氰酸(TCCA)。然后将溶液搅拌1.5h,冷却,并且用HiFlo-硅藻土过滤。将滤液浓缩并且用真空干燥。产量为5.037g的化合物102。

[0357] b. 化合物104的制备。



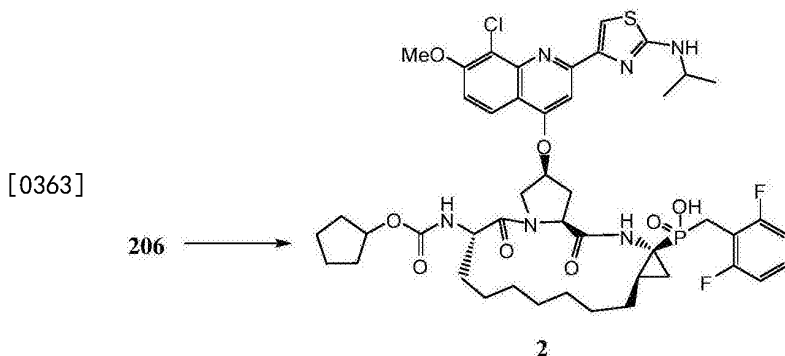
[0359]

化合物	MW	含量	mmoles	当量
102	163	5.073g	31.12	1
103	213.2	6.635g	31.12	1
NaOH(10%)	40	1.245g	31.12	1
DMF		320mL		

[0360] 向DMF(二甲基甲酰胺)中的化合物103的溶液中加入NaOH。将化合物102溶解于DMF(20mL)中并且缓慢加入所述溶液中。将反应搅拌3h,并用水稀释,用EtOAc萃取。用Na₂SO₄干燥有机层。除去溶剂,并且用二氯甲烷重结晶。产量为5.7g的化合物103。

[0361] 可以使用类似USSN 12/202319(US 20100051763A1)中所述那些的合成方法和中间体来制备化合物2。也可以按照以下实施例中所述的来制备化合物2。

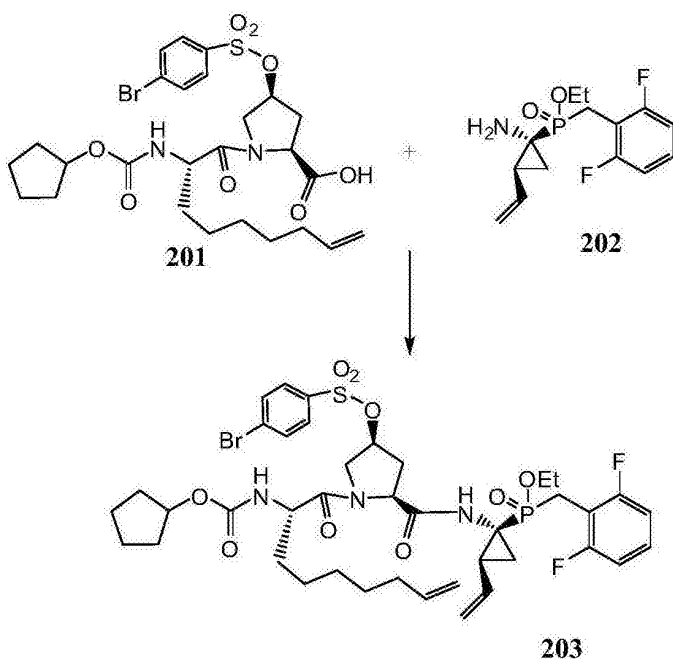
[0362] 实施例2:化合物2的制备。



[0364] 将亚磷酸酯206(23.7g, 24.05mmol)溶解于CH₃CN(240mL)中,并且冷却至0℃。以快速逐滴速度加入碘代三甲基硅烷(17.4mL, 122.3mmol),接着在10min后,加入2,6-卢剔啶(17.0mL, 146.4mmol)。将反应混合物缓慢温热至室温,并且然后搅拌1h,冷却回0℃,加入2,6-卢剔啶(11.1mL, 95.6mmol),接着加入MeOH(24mL)。将溶液真空浓缩,并且通过HPLC纯化粗制残余物,以55%产量获得12.68g化合物2。¹H NMR(300MHz, CDCl₃) δ8.35(d, J=9.3Hz, 1H), 8.28(s, 1H), 7.85(s, 1H), 7.64(d, J=9.6Hz, 1H), 7.35-7.22(m, 1H), 7.02-6.89(m, 2H), 5.85(bs, 1H), 4.82-4.71(m, 2H), 4.33(bs, 1H), 4.28-3.99(m, 3H), 4.16(s, 3H), 3.57-3.28(m, 2H), 2.90-2.78m, 1H), 2.63-2.50(m, 1H), 2.08-1.91(m, 1H), 1.91-1.70(m, 2H), 1.70-1.13(m, 22H), 1.37(d, J=6.9Hz, 6H); ³¹P NMR(121.4MHz, CD₃OD) δ42.4; LCMS(M+1): 957.35.g。

[0365] 如下制备中间体化合物206。

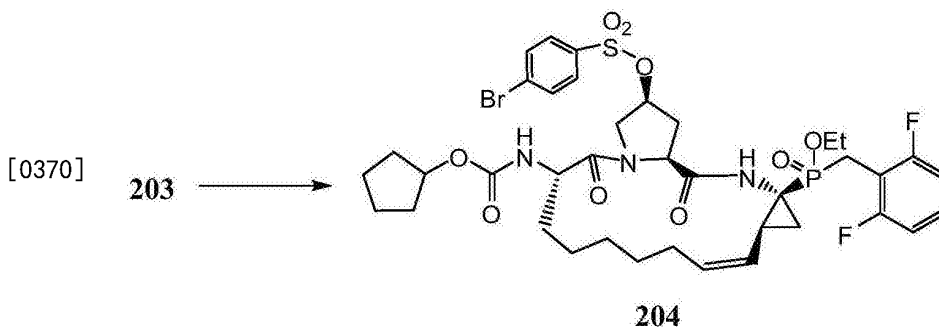
[0366] a. 化合物203的制备。



[0367]

[0368] 将化合物201(17.42g, 28.30mmol)溶解于THF(136mL)中,并且冷却至0℃。向溶液中加入N-甲基吗啉(4.7mL, 42.7mmol)。在0℃冷却10min后,逐滴加入*i*-丁基氯甲酸酯(4.05mL, 30.96mmol)。在额外1h后,作为THF(20mL)中的溶液,缓慢加入(1-氨基-2-乙烯基-环丙基)-(2,6-二氟-苄基)-磷酸乙酯202(8.94g, 29.79mmol)。将悬浮液温热至室温,并且在2h后,在H₂O(400mL)和乙酸乙酯(200mL)之间分离。用乙酸乙酯(200mL×2)萃取含水层,并且用HCl(1N, 225mL)和H₂O(200mL)洗涤合并的有机层。合并酸洗涤液和水洗涤液,并且用乙酸乙酯(175mL×2, 100mL×2)反萃取。用盐水(400mL)洗涤合并的有机层,通过Na₂SO₄干燥,并且真空浓缩,以98.5%粗制物产量提供了25.06g二烯203。LCMS(M+1): 898.06。

[0369] b. 化合物204的制备。

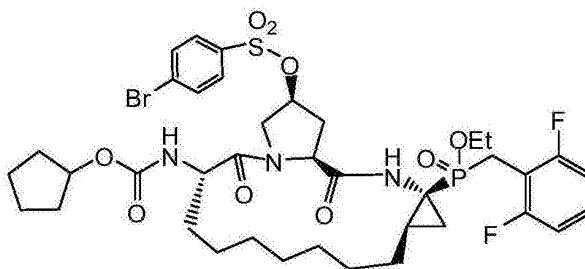


[0370]

[0371] 将化合物203(12.91g, 14.36mmol)溶解于CH₂Cl₂(1440mL)中,并且将溶液脱气30分钟。将溶液加热至40℃,并且加入Grubb's G1催化剂(2.95g, 3.59mmol)。将反应回流17h,在其上加入三-羟甲基磷化氢(22.3g, 18.0mmol)、TEA(50mL, 35.9mmol)和H₂O(400mL),并且将反应混合物加热至回流,再持续16h。将反应混合物冷却至室温,并且分离两个层。用H₂O(400mL)和盐水(300mL)洗涤有机层,通过MgSO₄干燥,并浓缩。通过硅胶色谱纯化粗制残余物,以66%产量获得8.30g大环烯204。LCMS(M+1): 870.09。

[0372] c. 化合物205的制备。

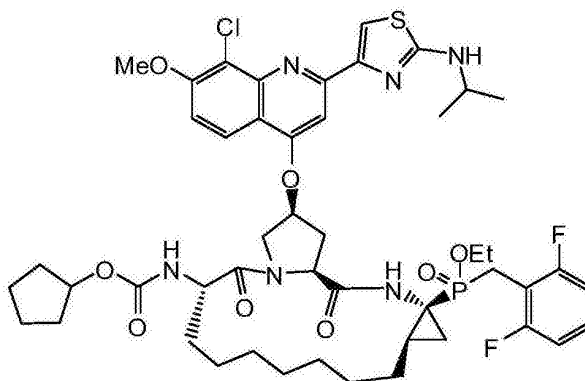
[0373]

204**205**

[0374] 将大环烯烃204(7.34g, 8.42mmol)溶解于乙酸乙酯(105mL)中, 并且加入铈氧化铝(5%wt, 2.945g, 0.40wt%)。将系统抽空, 并且用H₂(1atm, 3×)冲洗。3h后, 向系统中加入更多铈氧化铝(5%wt, 842mg, 0.10wt%), 抽空并用H₂(1atm, 3×)充满。再1h后, 将悬浮液过滤, 并且真空浓缩, 以88%粗制物产量提供6.49g还原大环205。LCMS(M+1): 872.04。

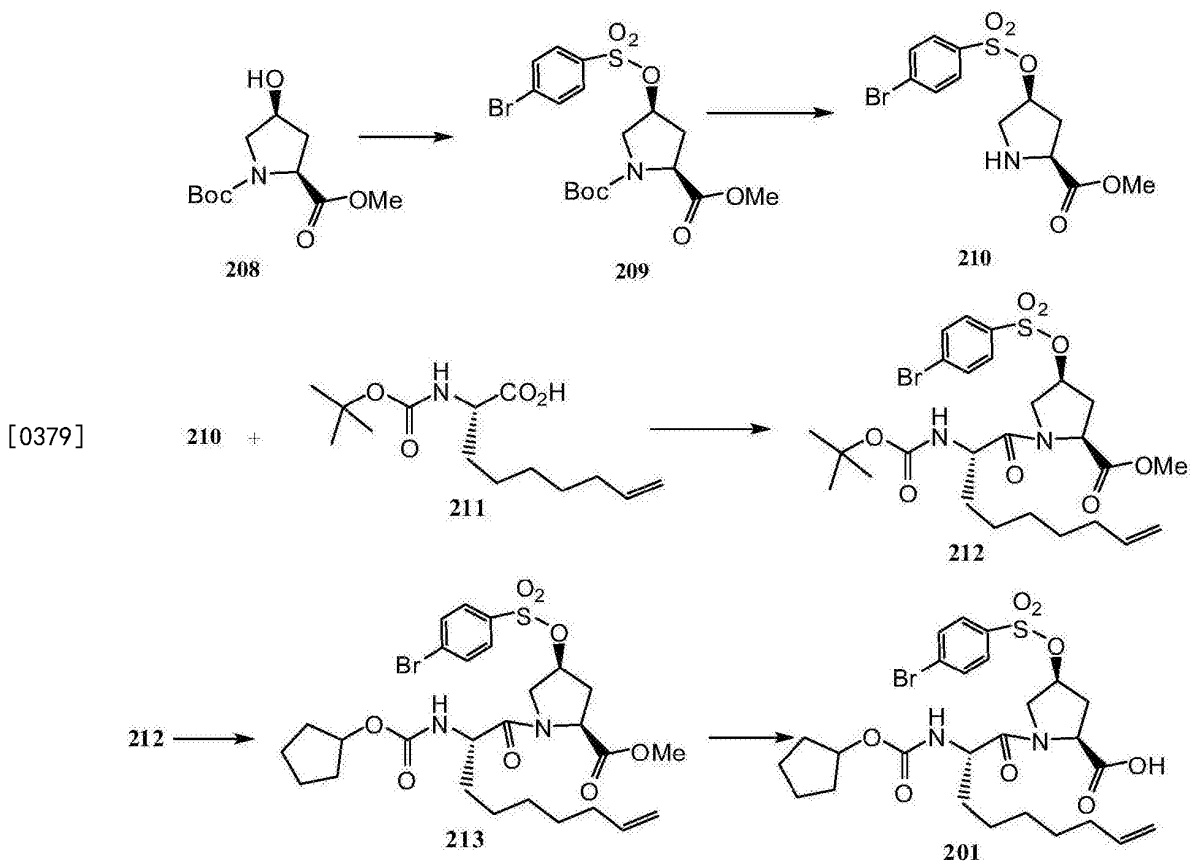
[0375] d. 化合物206的制备

[0376]

205**206**

[0377] 将对溴苯磺酸酯大环205(6.49g, 7.67mmol)溶解于N-甲基吡咯酮(25.0mL)和8-氯-2-(2-异丙基氨基-噻唑-4-基)-7-甲氧基-喹啉-4-醇207(2.564g, 7.33mmol)中, 接着加入Cs₂CO₃(4.40g, 13.50mmol)。将混合物加热至65℃, 持续6h, 然后用乙酸乙酯(200mL)稀释, 并且用LiCl(5%, 250mL)洗涤。用乙酸乙酯(100mL×2)萃取含水层, 并且用盐水(150mL)洗涤合并的有机层, 通过Na₂SO₄/MgSO₄干燥, 并真空浓缩。通过硅胶色谱(乙酸乙酯-甲醇)纯化粗制残余物, 以58%产量获得4.39g氨基噻唑206。LCMS(M+1): 985.28。

[0378] 如下制备中间体化合物201。



[0380] e. 化合物209的制备。

[0381] 将化合物208(7.00g, 28.55mmol)和DABCO(5.13g, 45.94mmol)溶解于甲苯中(30mL)。加入对溴苯磺酰氯化物(10.22g, 40.01mmol)的甲苯(11mL)溶液。将反应混合物在室温下搅拌过夜。分离两个层,并且用EtOAc(2×200mL)萃取含水层。用盐水(200mL)洗涤合并的有机层,用Na₂SO₄干燥,过滤,并浓缩。通过combi-flash纯化粗制产物,以92%产量获得12.23g化合物209。

[0382] f. 化合物210和212的制备。

[0383] 用4N HCl/1,4-二噁烷(60mL)处理化合物209(12.2g, 26.3mmol),并且搅拌1小时。将反应混合物在真空下浓缩并干燥20分钟。将粗制的化合物210的胺盐酸盐溶解于DMF(150mL)中,并且加入酸211(14.2g, 52.6mmol)。加入HATU(20.0g, 52.6mmol)和NMM(13.5g, 131.5mmol)。将反应混合物在室温下搅拌过夜。用EtOAc(300mL)稀释反应,用1N HCl(200mL)、饱和NaCO₃盐水洗涤,用Na₂SO₄干燥,并浓缩。通过combi-flash纯化粗制产物,以93%产量获得15.1g化合物212。

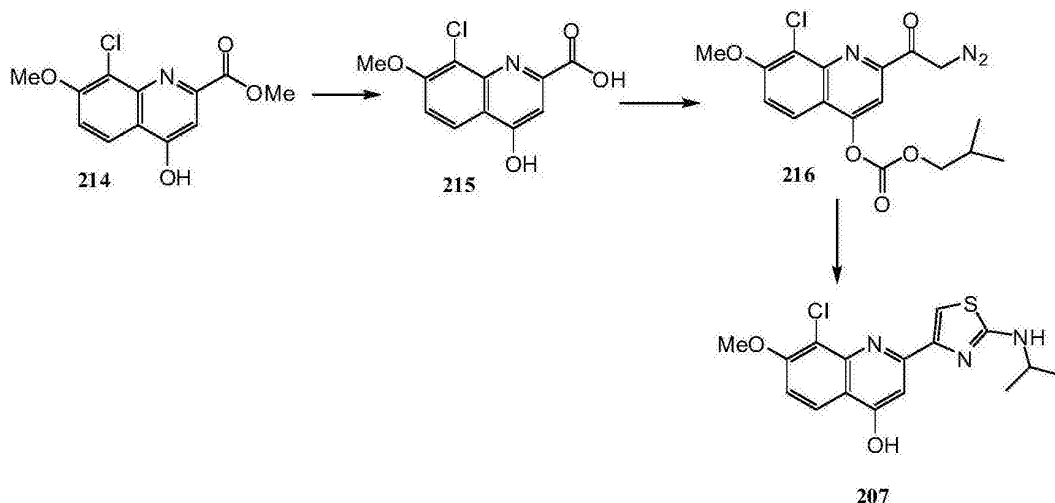
[0384] g. 化合物213的制备。

[0385] 向CH₂Cl₂中的212(12.8g, 20.7mmol)的(50mL)溶液中加入1,4-二噁烷(50mL, 200mmol)中的4N HCl。将反应混合物在室温下搅拌2小时,真空下浓缩、干燥20分钟,然后溶解于CH₃CN(50mL)中。加入H₂O(50mL)中的饱和NaHCO₃,并搅拌5分钟。加入新制备的THF(50mL)中的环戊基氯甲酸酯。反应在1h内完成。在减压下除去溶剂,并且用EtOAc稀释残余物。用1N HCl使混合物的pH=2,并且分离两个层。用盐水洗涤有机层,用Na₂SO₄干燥、过滤、并浓缩,产生粗制化合物213(3.18g)。

[0386] h. 化合物201的制备

[0387] 将粗制酯213(3.18g, 5.07mmol)溶解于THF(25mL)、H₂O(25mL)中, 然后加入MeOH(6mL)和LiOH(660mg, 25.4mmol)。将反应混合物在室温下搅拌1h, 并用EtOAc稀释。用1N HCl将反应混合物酸化至pH 2, 并且分离两个层。用EtOAc(2×)萃取含水层。用盐水洗涤合并的有机层, 用Na₂SO₄干燥, 在真空下浓缩并干燥, 获得3.09g的酸201。

[0388] 可以如下制备中间体8-氯-2-(2-异丙基氨基-噻唑-4-基)-7-甲氧基-喹啉-4-醇207。



[0389]

i. 8-氯-4-羟基-7-甲氧基喹啉-2-羧酸215的制备。

[0390] 向1:1的MeOH:THF(总共160mL)混合物中的甲基8-氯-4-羟基-7-甲氧基喹啉-2-羧酸酯214(36.5g, 0.145mol)的溶液中加入H₂O(80mL)中的LiOH(30.5g, 0.725mol)溶液。当LCMS分析显示出完全转化成羧酸时, 将混合物在室温下搅拌一小时。通过除去挥发物并使用含水6N HCl将溶液的pH调节至6来继续反应。将所得到的胶粘残余物过滤, 并在冻干机中干燥2天, 提供34.4g(99.6%)作为白色固体的化合物215。EI MS(m/z) 253.9[M+H]。

[0391] j. 2-(2-二偶氮-1-氧)-8-氯-7-甲氧基喹啉-4-基异丁基羧酸酯216的制备。

[0392] 在氩气氛下, 在0℃, 向THF(400mL)中的8-氯-4-羟基-7-甲氧基喹啉-2-羧酸215(10.2g, 0.04mmol)的溶液中加入三乙胺(12.3mL, 0.088mol)和i-丁氯甲酸酯(11.6mL, 0.088mol)。当LCMS分析证明反应完成时, 将混合物在0℃下搅拌1小时, 以提供所需的混合酐。EI MS(m/z) 454.0[M+H]。在0℃, 通过塑料漏斗向酐的反应混合物中加入二乙醚中的1M重氮甲烷(121mL, 0.121mol)溶液。将该混合物搅拌, 同时温热至室温, 并再持续2小时。通过LCMS分析混合物证明了反应的完成。除去隔膜, 将反应再搅拌20分钟, 接着除去溶剂。将残余物在高真空下进一步干燥, 以提供化合物216, 将其继续用于下一个步骤。EI MS(m/z) 377.9[M+H]

[0393] k. 8-氯-2-(2-(异丙基氨基)噻唑-4-基)-7-甲氧基喹啉-4-醇207的制备。

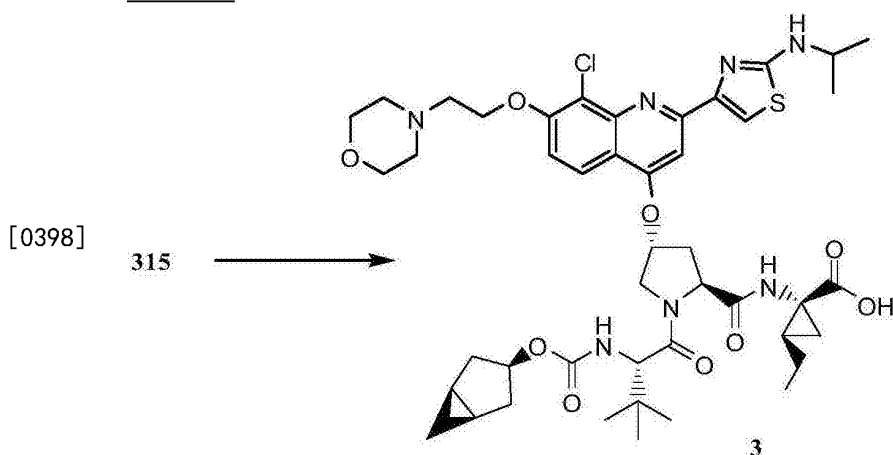
[0394] 在0℃, 向THF(268mL)中的2-(2-重氮-1-氧)-8-氯-7-甲氧基喹啉-4-基异丁基羧酸酯216(15.2g, 0.040mol)的冷却溶液中加入48% HBr(23mL, 0.201mol), 缓慢搅拌15分钟。当LCMS分析证明了反应完成时, 将溶液在0℃再搅拌40分钟。通过在0℃加入含水1N NaOH(180mL)将含水层的pH调节至9来继续反应。将层分离, 并且用EtOAc(2×200mL)洗涤含水层。用盐水洗涤合并的有机萃取物, 并通过MgSO₄干燥。在真空下除去溶剂, 以提供17.7g黄

色固体。EI MS(m/z) $4^{31}.9[M+H]$ 。

[0395] 将从之前的反应获得的溴酮的溶液悬浮于*i*-丙醇(270mL)和异丙基异脲(isopropylisourea)(9.4g, 0.080mol)中。将反应混合物在72℃下加热32小时。反应的LCMS分析证明了完全转化成所需产物。使反应冷却至室温,使产物从溶液中沉淀出来。将反应进一步冷却至0℃,持续12小时,接着过滤。用醚洗涤滤液并且在冻干机中干燥,提供8.03g作为橙色固体的化合物207。¹H NMR(500MHz, CDCl₃): δ8.21(d, *J*=9Hz, 1H), 7.74(s, 1H), 7.44(d, *J*=10Hz, 1H), 7.07(s, 1H), 4.05(s, 3H), 3.92(pentet, *J*=6Hz, 1H), 1.25(d, *J*=7Hz, 6H); EI MS(m/z) 350.0[M+H]。

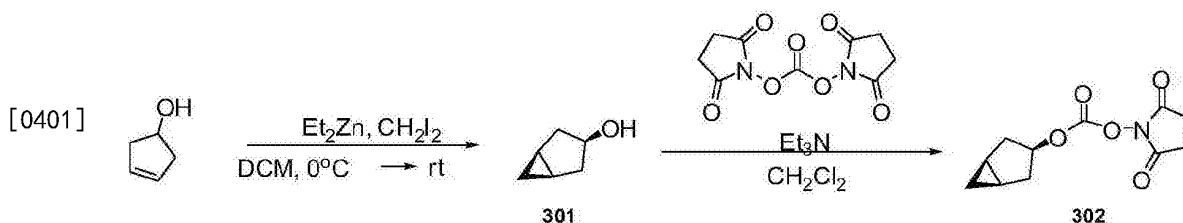
[0396] 可以类似USSN 12/215,605(US 20090257978A1)中所述那些的合成方法和中间体来制备化合物3。也可以按照以下实施例中所所述的来制备化合物3。

[0397] 实施例3: 化合物3的制备



[0399] 将化合物315(12g, 13mmol)溶解于THF(200mL)中,加入H₂O(200mL)中的LiOH(11g, 260mmol)。将混合物在室温下保持搅拌20小时。反应完成时,在0℃,加入4N的HCl水溶液,将pH调节至7。用EtOAc(2×400mL)萃取混合物。用盐水洗涤合并的有机层,在真空中干燥(Na₂SO₄)并浓缩,获得作为黄色固体的化合物3(11g, 93%)。LC/MS=911.52(M⁺+1)。¹H NMR(300MHz, CD₃OD) δ7.95(d, 1H), 7.90(s, 1H), 7.48(s, 1H), 7.31(d, 1H), 5.42(s, 1H), 4.37(dd, 1H), 4.20(m, 2H), 3.83-3.56(m, 7H), 3.50(m, 2H), 3.39(m, 2H), 2.45(m, 1H), 2.27(m, 1H), 1.62(m, 2H), 1.50(m, 1H), 1.33(m, 2H), 1.18(m, 1H), 1.05(m, 8H), 0.90(m, 3H), 0.76(m, 1H), 0.14-0.04(m, 2H)

[0400] 如下制备中间体化合物315。



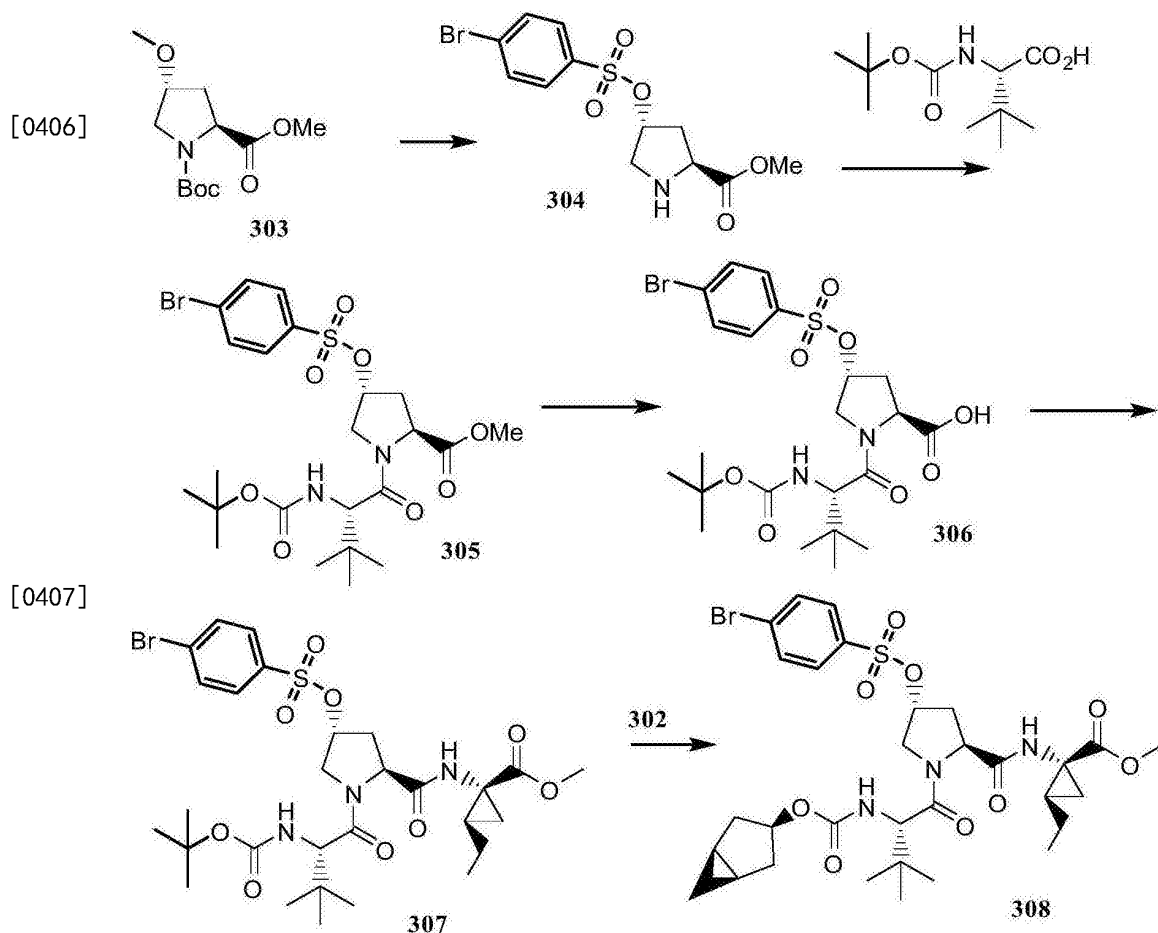
[0402] a. 化合物301的制备。

[0403] 在0℃,向干的、氩气吹洗的三颈圆底烧瓶(1000mL)中加入无水二氯甲烷(100mL)和Et₂Zn(28mL, 273mmol)。(注意:氩的来源不能来自针状物。只能使用合适的玻璃接管)。第二个鼓泡器(bubbler)也可以连接烧瓶,以防止过大的压力增加)然后将环戊烯-3-醇

(10.0mL, 119mmol)逐滴加入(产生大量乙烷气体)烧瓶中,并且搅拌反应混合物,直至停止产生气体。然后在30分钟的时间段内逐滴加入二碘甲烷。使反应温热至室温,并且在氩的积极流动下继续搅拌过夜,在该点,TLC分析已经表明起始醇完全消失。然后用CH₂Cl₂稀释反应,并用2M HCl淬灭(白色沉淀应答完全溶解)。将两相混合物倒入分液漏斗中并且收集有机层。在减压下除去溶剂直至保留100mL含有化合物301的材料。

[0404] b. 化合物302的制备。

[0405] 将无水二氯甲烷(525mL)加入烧瓶中,接着逐滴加入三乙胺(34mL, 245mmol)。在氮气的积极流动下,将反应在室温下继续搅拌,在该点,将二琥珀酰亚胺羧酸酯(40.7g, 159mmol)分部分加入烧瓶中。搅拌反应,直至TLC分析表明起始材料完全消失(2-3天)。完成时,用1M HCl(200mL×2)淬灭反应混合物,并用H₂O(200mL×2)洗涤。使用CH₂Cl₂萃取所需材料,并且使用无水MgSO₄干燥合并的有机层,并通过硅石塞。在减压下除去溶剂,并且使用快速色谱(R_f=0.33, 1:1Hex/EtOAc)纯化粗制材料,以提供化合物302(22g, 75%): ¹H NMR (300MHz, CDCl₃): δ5.24(t, 1H), 3.82(s, 4H), 2.24(m, 2H), 2.03(d, 2H), 1.38(m, 2H), 0.48(m, 1H), 0.40(m, 1H)。



[0408] c. 化合物304的制备。

[0409] 将N-t-叔丁氧羰基-顺-4-羟基-L-脯氨酸甲酯303(100.0g, 407.7mmol)和DABCO(1.5eq, 68.6g, 611.6mmol)溶解于带有机机械搅拌器和加样漏斗的2L三颈圆底烧瓶中的无水甲苯(200mL)中。在N₂下将溶液冷却至0℃后,在60分钟内通过加样漏斗加入300mL甲苯中的

4-溴-苯磺酰氯化物(1.3eq, 135.6g, 530.0mmol)溶液。搅拌反应混合物, 并且温热至室温过夜(16小时)。将混合缓慢倒入2L 1M Na₂CO₃(aq.)中, 并且用EtOAc(2L)萃取产物。通过0.5N HCl(2L)、H₂O(1L)和盐水(1L)洗涤有机相后, 将其干燥(MgSO₄), 浓缩, 产生195.45g黄色油状对溴苯磺酸酯产物。

[0410] 向以上二氯甲烷(300mL)中的对溴苯磺酸酯(407.7mmol)的溶液中缓慢加入二噁烷(500mL, 5eq)中的4.0M HCl, 并将所得到的溶液在室温下搅拌2小时。将醚(500mL)加入反应混合物中后, 将混合物搅拌15分钟, 并且通过过滤收集白色沉淀物。用醚和己烷洗涤固体, 然后在真空下干燥过夜, 用两个步骤, 以产量94%, 获得了153.0g化合物304的HCl胺盐, 381.8mmol。

[0411] d. 化合物305的制备。

[0412] 在室温下向DMF(200mL)和二氯甲烷(200mL)中的叔丁氧羰基-叔-丁基-甘氨酸(97.0g, 420.0mmol)溶液中加入HATU(217.76g, 572.7mmol)和Hunig's碱(126mL, 1145.4mmol)。将混合物在室温下搅拌20分钟后, 将之前的HCl盐(153.0g, 381.8mmol)和Hunig's碱(126mL, 1145.4mmol)在DMF(200mL)和二氯甲烷(200mL)中的溶液一次性加入以上的酸混合物中。将反应混合物在室温下搅拌3h, 并通过LCMS监控。将反应混合物在减压下浓缩, 以除去二氯甲烷, 并且滤掉形成的白色固体。用乙酸乙酯(1L)稀释剩余的DMF溶液, 用3%LiCl(aq)(3×650mL)、饱和NH₄Cl(2×500mL)、0.5N HCl(aq)(2×600mL)、盐水(500mL)、饱和NaHCO₃(3×500mL)和盐水(500mL)连续洗涤。将所得到的有机级分干燥(MgSO₄)并浓缩, 以获得化合物305(111g)。

[0413] e. 化合物306的制备。

[0414] 向THF(300mL)、MeOH(75mL)中的甲酯305(120g, 207.8mmol)溶液中, 加入H₂O(150mL)中的LiOH(26.18g, 623.4mmol)溶液。将溶液在室温下搅拌4小时。将混合物在冰浴中冷却, 同时用3N HCl酸化至pH约5.5, 搅拌10分钟, 并且通过过滤收集所得到的白色固体。用更多的水、醚和己烷洗涤固体。将固体在40℃在真空下干燥过夜, 产生95.78g(82%)酸306。

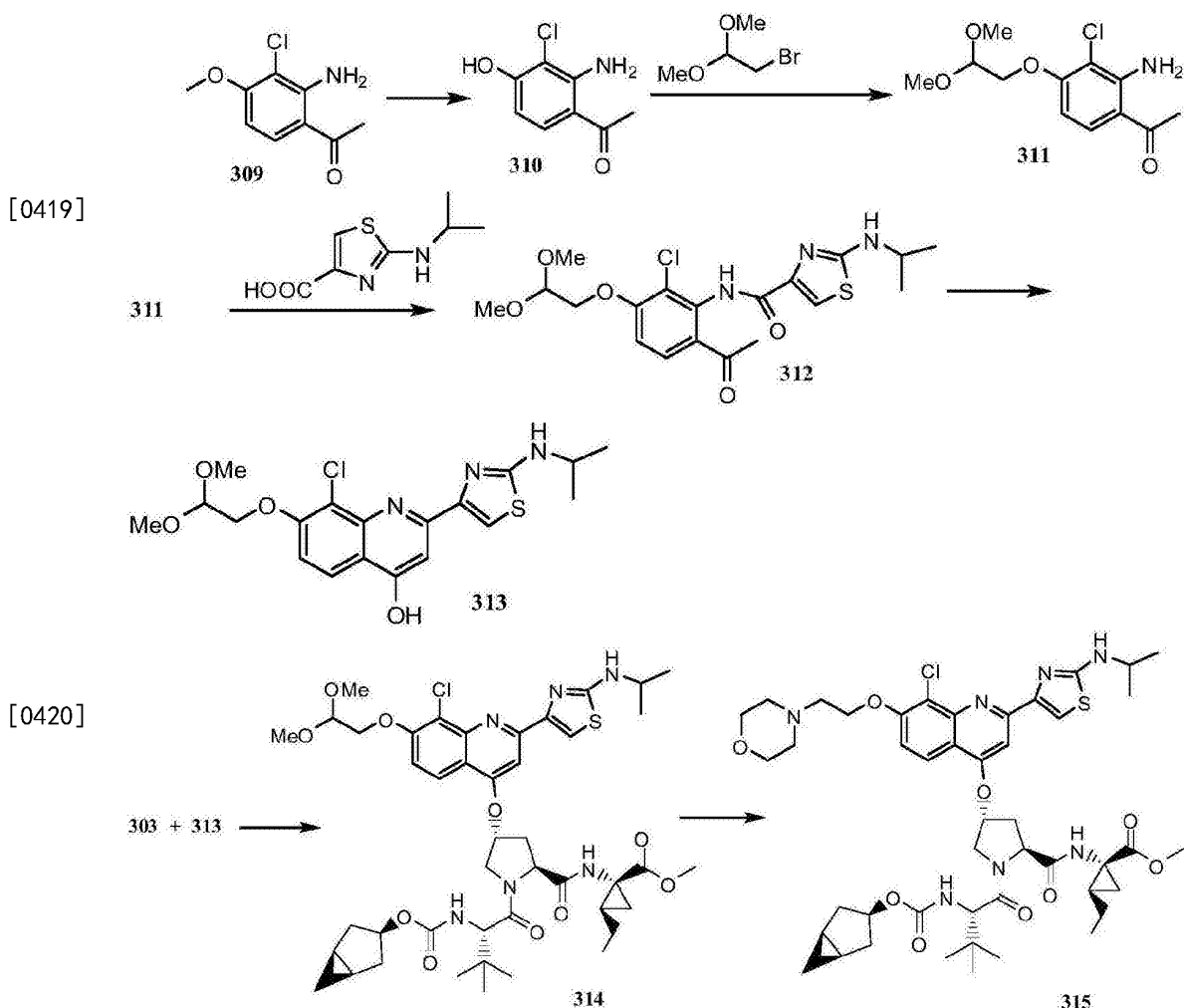
[0415] f. 化合物307的制备。

[0416] 在室温下, 向DMF(200mL)和二氯甲烷(200mL)中的羧酸306(81.4g, 144.27mmol)溶液中加入HATU(82.3g, 216.4mmol)和Hunig's碱(47.5mL, 432.8mmol)。将混合物在室温下搅拌20分钟后, 将DMF(200mL)和二氯甲烷(200mL)中的胺(158.7mmol)和Hunig's碱(47.5mL, 1145.4mmol)溶液一次性加入以上的酸混合物中。将反应混合物在室温下搅拌3小时, 并通过LCMS监控。将混合物在减压下浓缩, 以除去二氯甲烷, 滤掉形成的白色固体。用乙酸乙酯(600mL)稀释剩余的DMF溶液, 并用3%LiCl(aq)(2×550mL)、饱和NH₄Cl(500mL)、1N HCl(aq)(500mL)、饱和NaHCO₃(500mL)和盐水(300mL)连续洗涤。将所得到的有机级分干燥(Na₂SO₄), 并浓缩, 获得化合物307(111g)。

[0417] g. 化合物308的制备。

[0418] 在室温下, 将化合物307溶解于二噁烷(300mL)中的4N HCl中, 并且搅拌2小时。然后在真空下浓缩, 并且用二氯甲烷(2×200mL)共同蒸发至干。将残余物溶解于EtOAc(600mL)和饱和含水NaHCO₃(1L)中。将其强烈搅拌。10分钟后, 一次性加入碳酸双环[3.1.0]己-3-基酯2,5-二氧-吡咯烷-1-基酯302(41.4g, 173.1mmol)。将所得到的混合物再搅拌30

分钟后,收集有机层,并用盐水洗涤,干燥(Na_2SO_4)和浓缩。使用乙酸乙酯/己烷,通过硅胶上的快速色谱纯化粗制产物,获得94.44g(92%)化合物308。



[0421] h. 化合物310的制备。

[0422] 在110℃下,将1-(2-氨基-3-氯-4-羟基-苯基)-乙酮309(70.7g,354mmol)在48% aq. HBr(500mL)中搅拌72小时。边搅拌边将混合物冷却至0℃后,滤出固体,并且用水洗涤。用饱和 NaHCO_3 溶液(~350mL)研磨所得到的固体,过滤,用水洗涤,并在真空下干燥,以产生~40g作为深棕色固体的粗制310。LC/MS=186(M^+ +1)。

[0423] i. 化合物311的制备。

[0424] 将1-(2-氨基-3-氯-4-羟基-苯基)-乙酮310(40g,215mmol)溶解于DMF(360mL)中。加入碳酸铯(140g,430mmol),接着加入溴乙醛二甲基乙缩醛(54.5g,323mmol)。然后将混合物在65℃下搅拌24小时。冷却至室温时,将EtOAc(1L)和 H_2O (1L)加入混合物中。用EtOAc(1×400mL)萃取有机层。用含水3%LiCl溶液(2×1L)、盐水洗涤合并的有机层,真空干燥(Na_2SO_4)并浓缩。通过硅胶色谱纯化残余物,获得作为白色固体的化合物311(39g,67%)。

[0425] j. 化合物312的制备。

[0426] 在-40℃下,向吡啶(150mL)中的1-[2-氨基-3-氯-4-(2,2-二甲氧基-乙氧基)-苯基]-乙酮311(13g,47.5mmol)和异丙基氨基噻唑-4-羧酸氢溴化物(12.64g,47.5mmol)混合

物中缓慢加入磷酰氯(9.47g, 61.8mmol)。然后将混合物在0℃下搅拌4小时。反应完成时,将H₂O(30ml)逐滴加入混合物中。然后将混合物在0℃下再搅拌15分钟。将混合物在真空下浓缩。用EtOAc稀释残余物,用饱和NaHCO₃水溶液洗涤。将有机层干燥(Na₂SO₄)并在真空下浓缩。将残余物溶解于CH₂Cl₂中,将己烷缓慢加入溶液中,并且黄色固体开始逸出。加入更多己烷,直至母液中没有很多产物,以提供化合物312(18g, 85%)。

[0427] k. 化合物313的制备。

[0428] 将2-异丙基氨基-噻唑-4-羧酸[6-乙酰基-2-氯-3-(2,2-二甲氧基-乙氧基)-苯基]-酰胺312(18g, 40.7mmol)悬浮于甲苯(400ml)中。将NaH(2.4g, 61mmol)加入强烈搅拌的混合物中,同时监控H₂产生。在加热至回流的过程中,混合物变成清澈溶液。回流3小时后,反应完成。将混合物冷却至室温。将H₂O(3vol)中的醋酸(69.2mmol)溶液加入混合物中。在0℃强烈搅拌1小时后,通过过滤收集固体,用H₂O迅速冲洗。将湿饼在高真空下干燥至恒重,以提供化合物313(15g, 86%)。

[0429] l. 化合物314的制备。

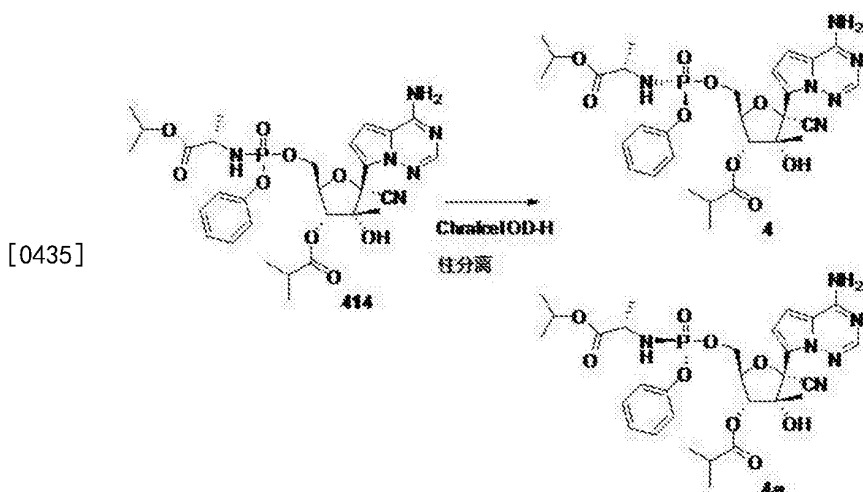
[0430] 向NMP(200ml)中的对溴苯磺酸酯中间体303(15g, 35mmol)和化合物313(27.5g, 38.5mmol)的混合物中,加入碳酸铯(25.1g, 77mmol)。将混合物在65℃下搅拌5小时。将反应冷却至室温,并且将EtOAc(600ml)和3%的LiCl(600ml)溶液加入混合物中。用含水3%LiCl(1×600ml)、盐水洗涤有机层,在真空下干燥(Na₂SO₄)并浓缩。通过硅胶色谱纯化残余物,获得作为黄色固体的所需甲酯(23.6g, 75%)。LC/MS=900.13(M⁺+1)。

[0431] m. 化合物315的制备。

[0432] 将甲酯314(23.6g, 26mmol)溶解于冰醋酸(200ml)中,将H₂O(75ml)中的1.4N HCl加入溶液中。将混合物在60℃下搅拌1小时。反应完成时,将混合物浓缩以除去溶剂,用甲苯(×2)共同蒸发,以除去残余的醋酸。然后将残余物溶解于EtOAc(500ml)和饱和NaHCO₃水溶液中(足以中和混合物),同时监控CO₂产生。用盐水洗涤有机层,在真空下干燥(Na₂SO₄)并浓缩。将残余物在高真空下进一步干燥1h,并用于下一个步骤中。将粗制物溶解于CH₂Cl₂(360ml)中,并在0℃,将吗啉(3.4g, 39mmol)和三乙酰氧基硼氢化钠(7.2g, 34mmol)加入混合物中。然后将冰醋酸(0.47g, 7.8mmol)逐滴加入混合物中。将反应在0℃下10分钟内完成。将饱和的NaHCO₃水溶液加入,以淬灭反应。再搅拌20分钟后,用盐水洗涤有机层,在真空下干燥(Na₂SO₄)并浓缩。通过硅胶色谱纯化残余物,以获得作为黄色固体的所需胺产物315(12g, 50%)。LC/MS=924.63(M⁺+1)。

[0433] 可以按照以下实施例所述的来制备化合物4。

[0434] 实施例4: 化合物4的制备。



[0436] 将非对映异构体混合物414溶解于庚烷和异丙醇(70%:30%, 4.5mL混合溶剂中239mg)中,并接受以下条件下的手性柱分离:

[0437] 柱:Chiralcel OD-H, 2×25cm

[0438] 溶剂体系:70%庚烷和30%异丙醇

[0439] 流速:6mL/min

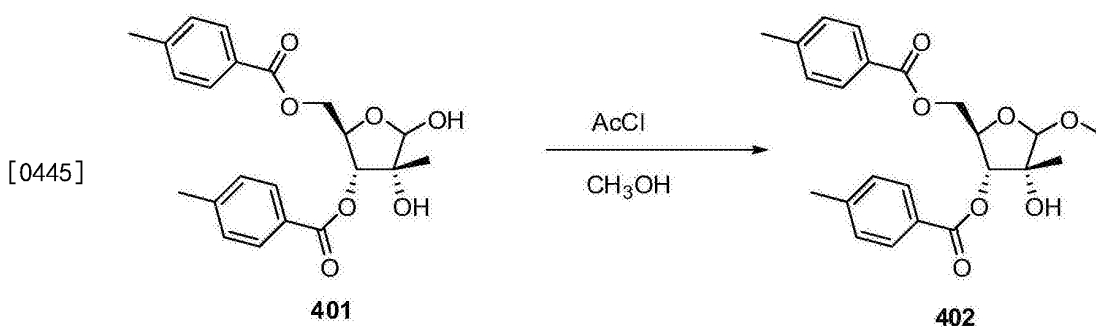
[0440] 每次运行加样体积:2.5mL

[0441] 化合物4具有20分钟的保留时间。¹H NMR(300MHz, CDCl₃): 8.00(s, 1H), 7.1–7.3(m, 5H), 6.83(d, 1H), 6.71(d, 1H), 6.09(brs, 2H), 5.95(s, 1H), 5.04(m, 2H), 4.67(q, 1H), 4.35–4.52(m, 2H), 4.00(m, 2H), 2.74(m, 1H), 1.40(d, 3H), 1.2–1.3(12H), 0.98(s, 3H). ³¹P NMR(121.4MHz, CDCl₃): 2.72(s). 随后从MTBE重结晶化合物4, 用于x-射线质量结晶。

[0442] 化合物4a具有50min的保留时间。¹H NMR(300MHz, CDCl₃): 7.98(s, 1H), 7.1–7.3(m, 5H), 6.83(d, 1H), 6.73(d, 1H), 6.02(brs, 2H), 5.95(s, 1H), 5.08(d, 1H), 5.00(m, 1H), 4.68(q, 1H), 4.38–4.56(m, 2H), 3.98(m, 2H), 2.74(m, 1H), 1.40(d, 3H), 1.2–1.3(12H), 0.99(s, 3H). ³¹P NMR(121.4MHz, CDCl₃): 2.61(s).

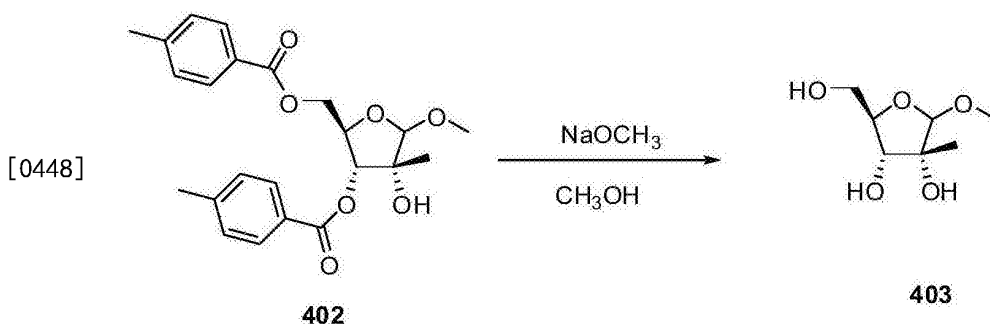
[0443] 如下制备中间体非对映异构体混合物414。

[0444] a. 化合物402的制备。



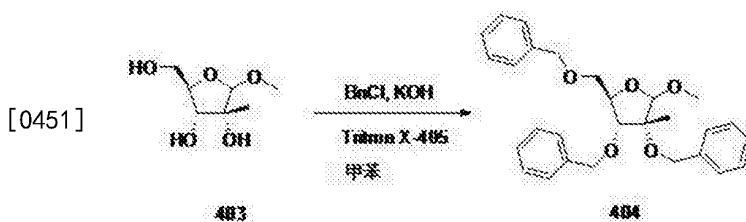
[0446] 在0℃, 在30分钟的时间段内, 使用滴液漏斗, 向甲醇(300mL)中的化合物401(22.0g, 54.9mmol, 根据J.O.C., 2004, 6257中所述的程序制备)溶液中逐滴加入乙酰氯, 然后在室温搅拌16小时。将混合物浓缩, 重新溶解于乙酸乙酯(400mL)中, 用冰冷2N NaOH洗涤, 并浓缩至干, 获得作为油的粗制甲醚402。MS=437.2(M+Na⁺)。

[0447] b. 化合物403的制备。



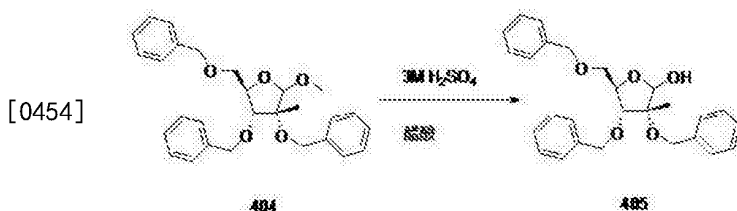
[0449] 向甲醇(300mL)中的化合物402溶液中加入甲醇(20mL, 10mmol)中的0.5M甲醇钠溶液,并在室温下搅拌16小时。用二噁烷(2.5mL, 10mmol)中的4.0N HCl溶液淬灭反应。然后将反应物浓缩,获得粗制化合物403。MS=201.0(M+Na⁺)。

[0450] c. 化合物404的制备。



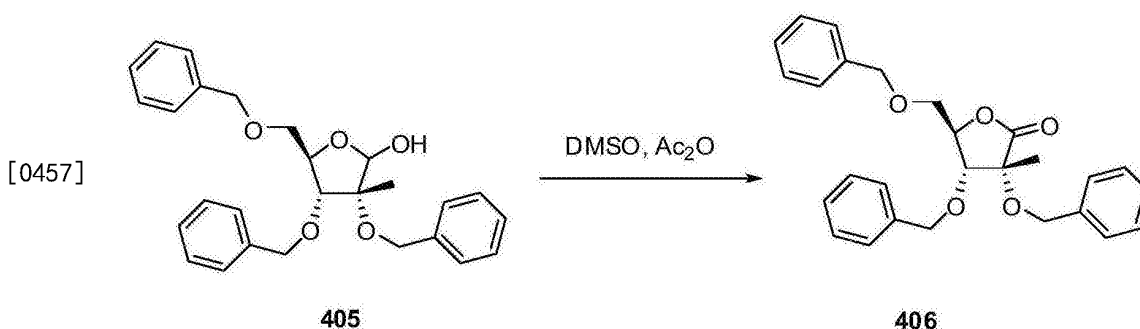
[0452] 使用连接的Dean-Stark收集器,将甲苯(500mL)中的化合物403、Triton X-405(水中70%, 6.0g)、50%KOH(水中, 85g)加热至回流。1小时后,收集25mL水,加入苄基氯(33g, 260mmol),并且边搅拌边继续回流16小时。然后将混合物冷却,并在乙酸乙酯(400mL)和水(300mL)之间分离。用水(300mL)洗涤有机层,并浓缩。通过硅胶柱色谱(20%EtOAc/己烷)纯化残余物,获得作为油的甲醚404(22.0g, 三步中89%)。¹H NMR(300MHz, CDCl₃): 7.3(m, 15H), 4.5-4.9(m, 7H), 4.37(m, 1H), 3.87(d, 1H), 3.56(m, 2H), 3.52(s, 3H), 1.40(s, 3H)。

[0453] d. 化合物405的制备。



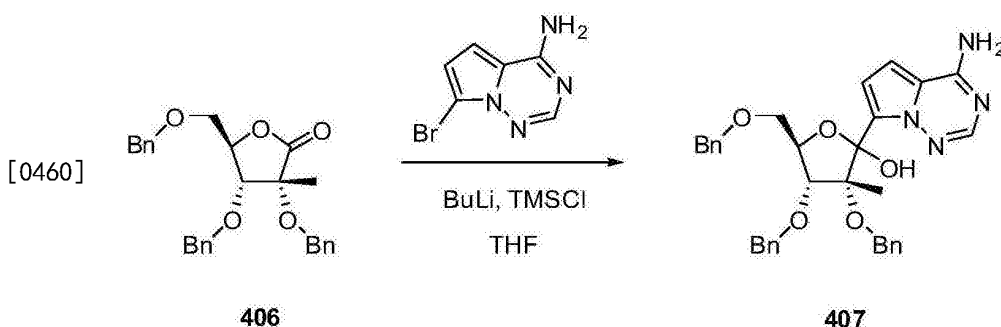
[0455] 向乙酸(110mL)中的404(22.0g, 49.0mmol)溶液中加入3M硫酸(通过混合4.8g浓硫酸和24mL水制得),并在70℃下搅拌8小时。将混合物浓缩至20mL的体积,并且在乙酸乙酯和冰冷2N NaOH之间分离。将乙酸乙酯层浓缩,并且通过硅胶色谱(~35%EtOAc/己烷)纯化,获得作为油的化合物405(17.0g, 80%)。MS=457.2(M+Na⁺)。

[0456] e. 化合物406的制备。



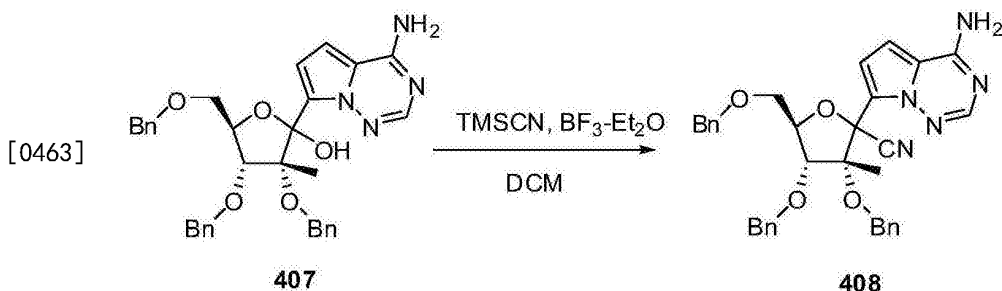
[0458] 在氩气、室温下,向DMSO(135mL)中的化合物405(45g,104mmol)溶液中逐滴加入醋酐(90mL,815mmol)。将混合物在室温下搅拌16小时,然后边搅拌边倒入冰水(1L)中。冰完全熔化后(30分钟),加入乙酸乙酯(500mL)。分离有机层。将该萃取过程重复三次(3×500mL)。将有机提取物合并并浓缩。通过硅胶柱色谱(20%EtOAc/己烷)纯化残余物,获得作为油的化合物406(39g,88%)。¹H NMR(300MHz,DMSO-d₆):7.3(m,15H),4.4-4.8(m,7H),4.08(d,J=7.5Hz,1H),3.75(dd,J=2,4,11.4Hz,1H),3.64(dd,J=5.4,11.4Hz,1H),1.51(s,3H)。

[0459] f. 化合物407的制备。



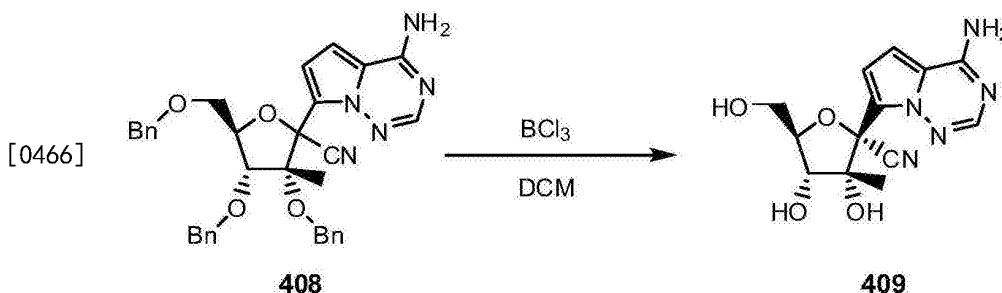
[0461] 向干的、氩气吹洗的圆底烧瓶(100mL)中加入7-溴-吡咯并[2,1-f][1,2,4]三嗪-4-基胺(234mg,1.10mmol)(根据W02007056170制备)和无水THF(1.5mL)。然后加入TMSCl(276μl,2.2mmol),并且将反应混合物搅拌2小时。将烧瓶放入干冰/丙酮浴(-78℃)中,并且逐滴加入BuLi(2.5mL,4.0mmol,己烷中1.6M)。1小时后,将THF中的化合物406(432.5mg,1.0mmol)溶液冷却至0℃,然后逐滴加入反应烧瓶中。在-78℃下搅拌1小时后,将烧瓶温热至0℃,并且加入饱和NH₄Cl(5mL),以淬灭反应。使用EtOAc(3×10mL)萃取有机物,并且使用MgSO₄干燥合并的有机层。在减压下除去溶剂,并且使用快速色谱(己烷/EtOAc)纯化粗制材料。作为两种异头物的混合物分离了560mg(90%)的化合物407。LC/MS=567.2(M+H⁺)。¹H NMR(300MHz,CDCl₃):δ7.85(m,1H),7.27(m,15H),7.01(m,1H),6.51(m,1H),4.66(m,8H),4.40(m,2H),3.79(m,3H),1.62(s,2'-CH₃,来自一种异头物),1.18(s,2'-CH₃,来自另一种异头物)。

[0462] g. 化合物408的制备。



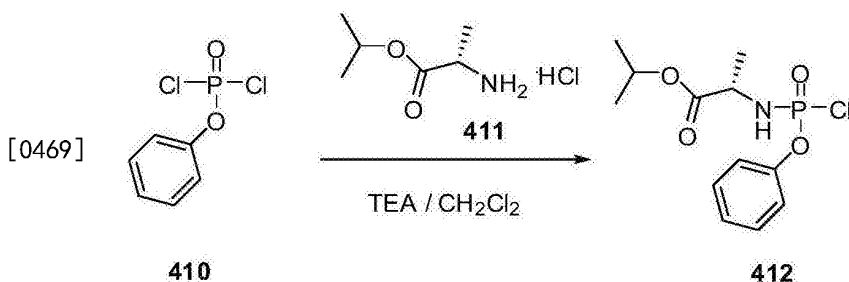
[0464] 在0℃,向CH₂Cl₂(20mL)中的化合物407(1g,1.77mmol)溶液中加入TMSCN(1.4mL,10.5mmol)和BF₃·Et₂O(1mL,8.1mmol)。将反应混合物在0℃搅拌0.5小时,然后在室温下再搅拌0.5小时。在0℃,用NaHCO₃淬灭反应,并用CH₃CO₂Et稀释。分离有机相,并用盐水洗涤,通过Na₂SO₄干燥,过滤并浓缩。通过硅胶上的色谱纯化残余物,用CH₃CO₂Et-己烷(1:1至2:1)洗脱,获得作为同分异构混合物的化合物408(620mg,61%)。MS=576.1(M+H⁺)。

[0465] h. 化合物409的制备。



[0467] 在-78℃下,向CH₂Cl₂(4mL)中的化合物408(150mg,0.26mmol)溶液中加入BCl₃(2mL,CH₂Cl₂中的1M)。将反应混合物在-78℃下搅拌1小时。在-78℃下,通过逐滴加入TEA(2mL)和MeOH(5mL)来淬灭反应。使混合物温热至室温,蒸发,并且用MeOH共同蒸发几次。用NaHCO₃处理残余物(10mL H₂O中1g),浓缩并通过HPLC纯化,获得所需的产物化合物409(48mg,60%)。¹H NMR(300MHz,D₂O):δ7.74(s,1H),6.76(d,J=5Hz,1H),6.73(d,J=5Hz,1H),4.1(m,1H),3.9(m,1H),3.8(m,2H),0.84(s,3H)。MS=305.9(M+H⁺)。还获得了其他α-异头物(9mg,11%):¹H NMR(300MHz,D₂O):δ7.70(s,1H),6.8(d,J=5Hz,1H),6.7(d,J=5Hz,1H),4.25(d,J=9Hz,1H),4.07(m,1H),3.85(m,1H),3.7(m,1H),1.6(s,3H)。MS=306.1(M+H⁺)。

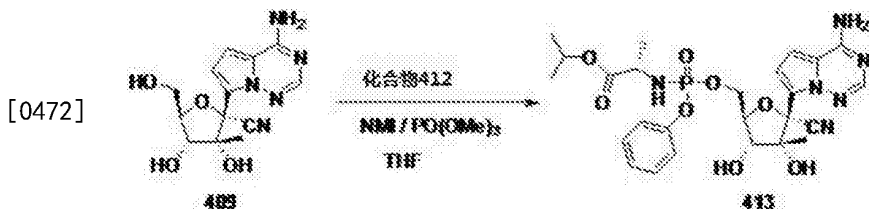
[0468] i. 化合物412的制备。



[0470] 将化合物410(商业购得,4.99g,23.8mmol)溶解于二氯甲烷(100mL)中,并且加入丙氨酸异丙酯盐酸盐411(3.98g,23.8mmol)。将所得到的清澈溶液在-78℃下冷却30min。在15分钟内逐滴加入三乙胺(6.63mL,47.5mmol)。然后使混合物温热至室温。16小时后,通过

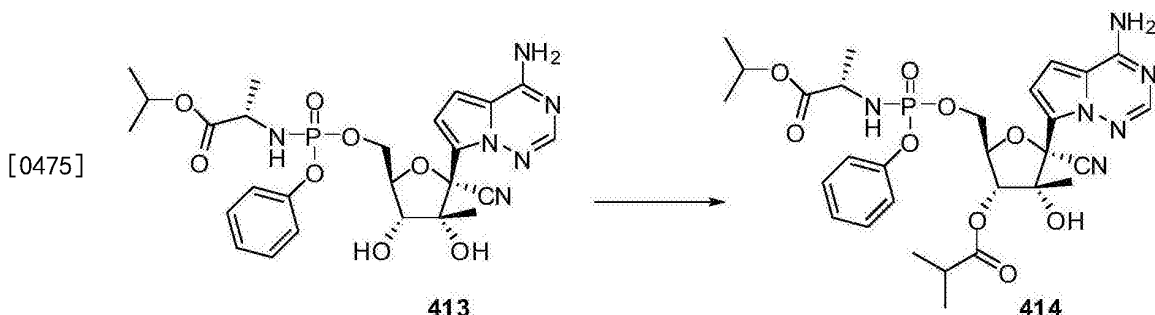
氩蒸汽除去溶剂。将残余物重新溶解于MTBE(25mL)中,并在氩气下通过过滤除去不溶物。通过氩蒸汽浓缩滤液,并且将粗制产物412没有进一步纯化就用于下一个反应中。¹H NMR(300MHz,CDCl₃):7.1-7.4(m,5H),5.1(m,1H),4.35(m,1H),4.15(m,1H),1.5(d,3H),1.2(m,6H).³¹P NMR(121.4MHz,CDCl₃):7.8和8.4(2s)。

[0471] j. 化合物413的制备。



[0473] 在0℃,向三甲基磷酸盐(2.0mL)和THF(20mL)中的化合物409(1.03g,3.37mmol)溶液中加入N-甲基咪唑(1.5g,18.3mmol)。逐滴加入THF(3mL)中的化合物412(2.5g,8.18mmol)溶液。在1.5小时内使所得到的混合物温热至室温。将混合物在乙酸乙酯和水之间分离。将乙酸乙酯层浓缩,并且在磷下通过硅胶色谱(乙酸乙酯至10%乙醇/乙酸乙酯)纯化残余物,获得作为1:1非对映异构体混合物的1.15g(59%)化合物413。¹H NMR(300MHz,CDCl₃):8.02(s,1H),7.1-7.4(m,5H),6.8(2d,1H),6.7(2d,1H),6.08(brs,2H),5.03(m,1H),4.6(m,1H),4.4(m,2H),3.9-4.1(m,3H),1.31(d,3H),1.2(m,6H),0.83(s,3H).³¹P NMR(121.4MHz,CDCl₃):2.78(s).MS=575.1(M+H⁺)。

[0474] k. 化合物414的制备。

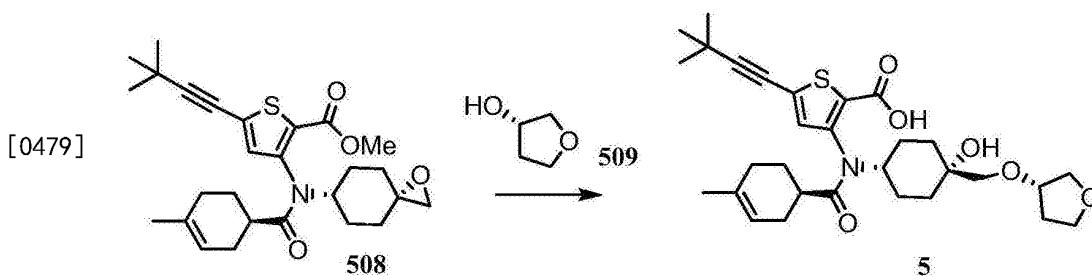


[0476] 向乙腈(2mL)中的化合物413(175mg,0.305mmol)溶液中加入N,N-二甲基甲酰胺二甲基乙缩醛(41μL,0.34mmol,1.1eq.),并且在室温下搅拌1小时。反应是完全的(通过LCMS测定)。然后将混合物浓缩至干。向残余物中加入DCC(250mg,1.21mmol,4eq.)、乙腈(5mL)和异丁酸(55mg,58μL,2eq.)。将混合物在室温下搅拌48小时。在0℃加入水(0.2mL)和三氟乙酸(0.1mL),并且在室温下搅拌64小时。在0℃下加入碳酸氢钠(500mg)。将混合物在室温下搅拌0.5小时,并过滤。将滤液浓缩,并且在磷下通过硅胶柱色谱(5%甲醇/二氯甲烷)纯化残余物,获得作为1:1非对映异构体混合物的144mg(73%)化合物414。¹H NMR(300MHz,CDCl₃):8.00(s,1H),7.1-7.4(m,5H),6.83(d,1H),6.71(2d,1H),5.97(brs,2H),5.94(d,1H),5.07(2d,1H),5.01(m,1H),4.68(m,1H),4.4(m,2H),4.0(m,2H),2.74(m,1H),1.4(2d,3H),1.2-1.3(12H),0.98和0.99(2s,3H).³¹P NMR(121.4MHz,CDCl₃):2.56和2.65(2s).MS=645.1(M+H⁺)。

[0477] 可以按照以下实施例中所述的来制备化合物5。

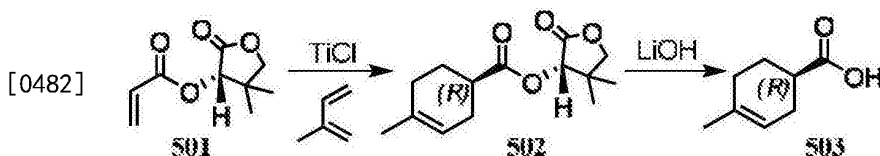
[0478] 实施例5:5的制备:5-(3,3-二甲基-1-炔-1-基)-3-[(顺-4-羟基-4-[(3S)-四氢

呋喃-3-基氧}甲基}环己基){[(1R)-4-甲基环己-3-烯-1-基]羰基}氨基}噻吩-2-羧酸5



[0480] 用叔-丁醇钾(251mg, 2.24mmol)处理1-甲基-吡咯烷-2-酮(3mL)中的5-(3,3-二甲基-丁-1-炔基)-3-[[[(1R)-4-甲基-环己-3-烯羰基)-(1-氧杂-螺环[2.5]辛-6-基)-氨基]-噻吩-2-羧酸甲酯508(132mg, 0.28mmol)和(S)-四氢-呋喃-3-醇509(247mg, 2.8mmol), 在40℃下密封加热16小时。冷却后, 用2M HCl处理混合物, 直至pH3, 在乙酸乙酯和水之间分层, 并分离。用5%氯化锂溶液、水、盐水洗涤有机层, 并通过硫酸钠干燥。过滤和浓缩后, 通过使用CH₃CN(0.1% TFA)/H₂O(0.1% TFA)的HPLC纯化残余物, 获得作为白色粉末的107mg(70%产量)的化合物5: MS(m/z): 544.0[M+H]⁺; HPLC保留时间4.22min(2-98%乙腈: 水, 含有0.05%三氟乙酸)。

[0481] 如下制备中间体化合物508。



[0483] a. 化合物502的制备

[0484] 将二氯甲烷(25mL)中的(S)-3-羟基-4,4-二甲基二氢呋喃-2(3H)-酮(2.60g, 20mmol)和二异丙基乙胺(5.2mL, 30mmol)冷却至-10℃, 并且用烯丙酰氯(2.03mL, 25mmol)逐滴处理, 并搅拌2h。加入1M HCl(20mL), 并且用碳酸氢钠和水洗涤有机层。将有机层通过硫酸钠干燥, 过滤并浓缩。快速色谱(10-40%EtOAc, 己烷)获得作为清澈油的2.09g(57%产量)的所需(S)-4,4-二甲基-2-氧四氢呋喃-3-基丙烯酸酯501。

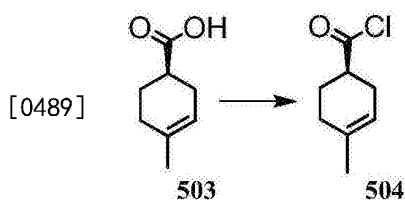
[0485] 将二氯甲烷(17.5mL)和己烷(2.5mL)中的(S)-4,4-二甲基-2-氧四氢呋喃-3-基丙烯酸酯501冷却至-10℃, 并且用四氯化钛(2.2mL, 二氯甲烷中1M, 2.2mmol)处理。将黄色溶液搅拌15分钟, 并在5分钟内用异戊二烯(1.67mL, 16.7mmol)逐滴处理。搅拌2小时后, 加入另一部分的异戊二烯(1.67mL, 16.7mmol), 并且将反应混合物在-10至0℃下搅拌3.5小时。用氯化铵(饱和含水)淬灭反应混合物。加入水和乙酸乙酯: 己烷(1:1)。分离有机层, 并用乙酸乙酯: 己烷(1:1)再次萃取含水层。将合并的有机层通过硫酸钠干燥, 过滤并浓缩。通过快速色谱(10-50%EtOAc: Hex, 80g柱)纯化残余物, 获得作为清澈油的1.30g(46%产量)的(R)-((S)-4,4-二甲基-2-氧四氢呋喃-3-基)4-甲基环己-3-烯羧酸酯502。

[0486] b. 化合物503的制备。

[0487] 用氢氧化锂单水合物(2.16g, 51.5mmol)处理THF(10mL)、水(1mL)和甲醇(1mL)中的(R)-((S)-4,4-二甲基-2-氧四氢呋喃-3-基)4-甲基环己-3-烯羧酸酯502(1.30g, 5.15mmol), 并且边搅拌边温热至50℃。1小时后, 用1M HCl处理反应混合物。用己烷: THF(10:1)萃取混合物, 通过硫酸钠干燥, 过滤, 并浓缩, 获得作为白色粉末的0.738g(定量产

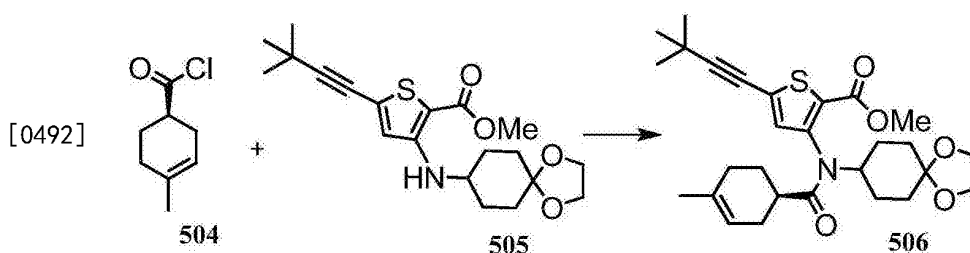
量)的(R)-4-甲基环己-3-烯羧酸503。

[0488] c. 化合物504的制备。



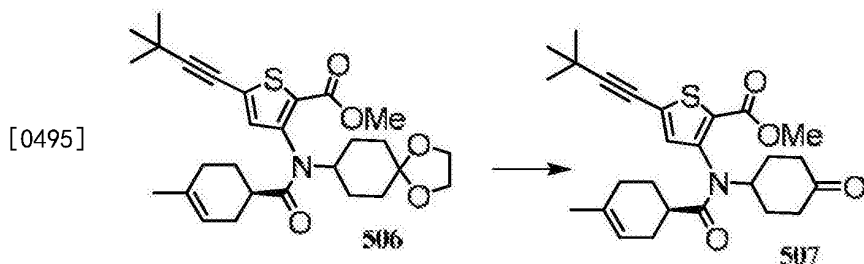
[0490] 用磷酸三钾(1.13g, 7.94mmol)处理从甲苯通过蒸发共沸干燥的(R)-4-甲基环己-3-烯羧酸503(371mg, 2.65mmol), 悬浮于二氯甲烷(7.6mL)中, 并用二甲基甲酰胺(4滴)处理。将反应混合物冷却至0℃, 并且用草酰氯(0.75mL, 7.9mmol)逐滴处理。使反应混合物温热至环境温度, 同时搅拌2小时。过滤固体后, 将溶液浓缩, 用己烷处理, 并再次浓缩, 以获得作为淡黄色油的(R)-4-甲基环己-3-烯碳酰氯504, 将其立即用于下一个步骤中。

[0491] d. 化合物506的制备。



[0493] 将(R)-4-甲基环己-3-烯碳酰氯504(2.65mmol)、5-(3,3-二甲基-丁-1-炔基)-3-[(1,4-二氧杂-螺环[4.5]癸-8-基氨基)-噻吩-2-羧酸甲酯]505(250mg, 0.66mmol)和磷酸三钾(562mg, 2.65mmol)悬浮于二氯甲烷(1.7mL)中, 用盖子密封, 并加热至90℃。16小时后, 将反应混合物冷却, 并且在乙酸乙酯和水之间分离。分离有机层, 并且用乙酸乙酯再次萃取含水层。将合并的有机层通过硫酸钠干燥, 过滤并浓缩。快速色谱(10-40%EtOAc:己烷)获得了220mg(67%产量)作为米色泡沫的所需5-(3,3-二甲基-丁-1-炔基)-3-[(1,4-二氧杂-螺环[4.5]癸-8-基)-((1R)-4-甲基-环己-3-烯羰基)-氨基]-噻吩-2-羧酸甲酯506。

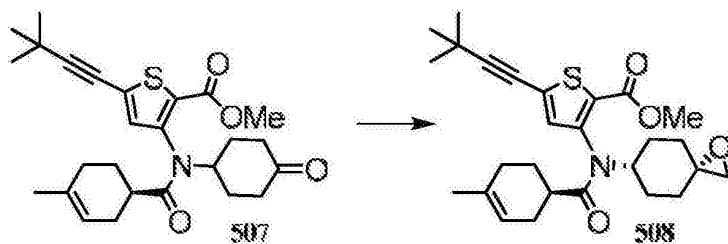
[0494] e. 化合物507的制备。



[0496] 将5-(3,3-二甲基-丁-1-炔基)-3-[(1,4-二氧杂-螺环[4.5]癸-8-基)-((1R)-4-甲基-环己-3-烯羰基)-氨基]-噻吩-2-羧酸甲酯506(219mg, 0.438mmol)溶解于THF(3.5mL)中, 并用4M HCl(1.75mL, 7.01mmol)处理。将反应混合物加热至45℃, 并且搅拌2h。加入乙酸乙酯, 并且分离有机层, 然后用水、碳酸氢钠(饱和含水)、水和盐水洗涤。将有机层通过硫酸钠干燥, 过滤并浓缩, 获得0.190g(95%)作为白色泡沫的所需5-(3,3-二甲基-丁-1-炔基)-3-[(1,4-二氧杂-螺环[4.5]癸-8-基)-((1R)-4-甲基-环己-3-烯羰基)-氨基]-噻吩-2-羧酸甲酯507。

[0497] f. 化合物508的制备。

[0498]

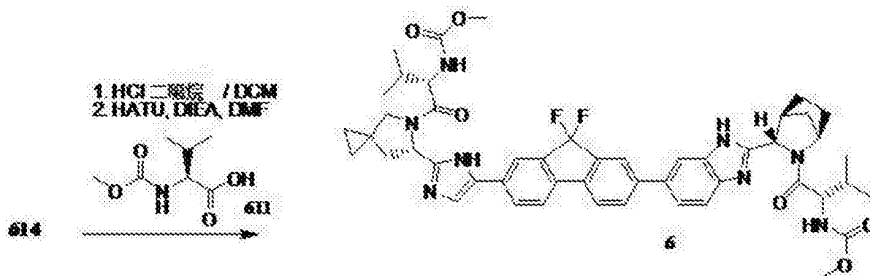


[0499] 用氢化钠(21mg, 60%油分散体, 0.53mmol)处理DMSO(1.5mL)中的三甲基氯化亚砷(79mg, 0.72mmol), 并且在环境温度下搅拌10min。逐滴加入THF(1mL+0.5mL)中的5-(3,3-二甲基-丁-1-炔基)-3-(((1R)-4-甲基-环己-3-烯羰基)-(4-氧-环己基)-氨基)-噻吩-2-羧酸甲酯507, 然后将反应混合物搅拌45min。用5%柠檬酸处理橙色溶液直至pH3, 并且在水和乙酸乙酯之间分离。分离有机层, 并用乙酸乙酯再次萃取含水层。用5%LiCl、水和盐水洗涤合并的有机物, 并且通过硫酸钠干燥。过滤和浓缩后, 通过快速色谱(20-75%EtOAc:己烷)纯化残余物, 获得0.134g(70%产量)作为白色粉末的5-(3,3-二甲基-丁-1-炔基)-3-(((1R)-4-甲基-环己-3-烯羰基)-(1-氧杂-螺环[2.5]辛-6-基)-氨基)-噻吩-2-羧酸甲酯508。

[0500] 可以使用类似USSN 12/779,023(US 20100310512A1)中所述那些的合成方法和中间体来制备化合物6。也可以按照以下实施例中所描述的来制备化合物6。

[0501] **实施例6:** (1-{3-[6-(9,9-二氟-7-{2-[5-(2-甲氧基羰基氨基-3-甲基-丁酰基)-5-氮杂-螺环[2.4]庚-6-基]-3H-咪唑-4-基}-9H-芴-2-基)-1H-苯并咪唑-2-基]-2-氮杂-二环[2.2.1]庚烷-2-羰基}-2-甲基-丙基)-羧酸甲酯6的制备。

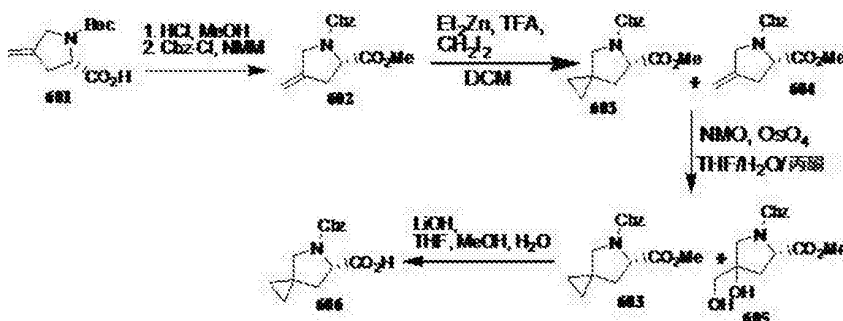
[0502]



[0503] 将3-[6-(9,9-二氟-7-{2-[5-(2-甲氧基羰基氨基-3-甲基-丁酰基)-5-氮杂-螺环[2.4]庚-6-基]-3H-咪唑-4-基}-9H-芴-2-基)-1H-苯并咪唑-2-yl]-2-氮杂-二环[2.2.1]庚烷-2-羧酸叔丁酯614(115mg, 0.138mmol)溶解于二氯甲烷(2mL)中, 并且加入二噁烷(4M, 2mL)中的HCl, 并且继续在室温下搅拌。20分钟后, 在真空下除去所有挥发物。将粗制材料用于下一个步骤中, 没有进一步纯化。将粗制材料溶解于DMF(1.5mL)中, 并加入DIEA(53.4mg, 0.414mmol)。加入DMF(1mL)中的2-(L)甲氧基羰基氨基-3-甲基-丁酸611(24.2mg, 0.138mmol)、HATU(52.4mg, 0.138mmol)和DIEA(17.8mg, 0.138mmol)溶液。将反应在室温下搅拌。20分钟后, 用EtOAc稀释反应, 并且用含水碳酸氢盐溶液、含水LiCl溶液(5%)、盐水洗涤, 并通过硫酸钠干燥。过滤并在真空下除去溶解产生了粗制材料, 将其通过RP-HPLC纯化(洗脱液: 水/MeCN w/0.1%TFA), 以产生化合物6(76mg)。LCMS-ESI⁺: C₄₉H₅₄F₂N₈O₆的分析计算值(calcd for): 888.9(M⁺); 实测值(Found): 890.0(M+H⁺)。 ¹H-NMR: 300MHz, (dmsO-d₆) δ: 8.20-7.99(m, 8H), 7.73(s, 2H), 7.37-7.27(m, 2H), 5.25(dd, J=7.2Hz, 1H), 4.78(s, 1H), 4.54(s, 1H), 4.16(m, 1H), 4.02(m, 1H), 3.87(m, 1H), 3.74(m, 1H), 3.55(s, 3H), 3.53(s, 3H),

2.75(m, 1H), 2.25(m, 2H), 2.09-2.04(m, 2H), 1.88-1.79(m, 2H), 1.54(m, 1H), 0.94-0.77(m, 15H) 0.63(m, 4H) ppm. ^{19}F -NMR: 282MHz, (dms o - d_6) δ : -109.1 ppm [-74.8 ppm TFA].

[0504] 如下制备中间体化合物614。



[0505]

[0506] a. 化合物4-亚甲基-吡咯烷-1,2-二羧酸1-苄酯2-甲酯602的制备。

[0507] 将4-亚甲基-吡咯烷-1,2-二羧酸1-叔-丁酯601(10.0g, 44mmol)在室温下溶解于MeOH(75mL)中,并且加入HCl(二噁烷中4M, 75mL)。在室温下搅拌持续4小时。在真空下除去所有挥发物,并且获得了米色固体。将粗制材料重悬浮于二氯甲烷(100mL)中,并且加入了N-甲基吗啉(13.3g, 132mmol)。将混合物冷却至0℃,并且边搅拌边加入苄基氯甲酸酯(8.26g, 48.4mmol)。30分钟后,将反应温热至室温,并且用水和含水HCl(1M)洗涤溶液。将溶液通过硫酸钠干燥。过滤并蒸发溶剂产生了粗制产物,通过硅胶色谱将其纯化(洗脱液: EtOAc/己烷),产生化合物602(10.2g)。LCMS-ESI $^{+}$: $\text{C}_{15}\text{H}_{17}\text{NO}_4$ 的分析计算值: 275.3(M^{+});实测值: 276.4($\text{M}+\text{H}^{+}$)。

[0508] b. 化合物603和604的制备。

[0509] 将烘干的3-颈圆底烧瓶装上氮进口接头和250mL加样漏斗。将第三个颈用隔膜密封。将烧瓶装入搅棒、二氯甲烷(120mL)和二乙锌(己烷中1.0M, 118mL, 118mmol),然后在冰浴中冷却至0℃。将加样漏斗装入二氯甲烷(40mL)和三氟乙酸(9.1mL, 118mmol)。二乙锌溶液冷却至0℃后(约25分钟),在20min内将三氟乙酸溶液逐滴加入搅拌的反应混合物中。在0℃再搅拌20min后,在4分钟内缓慢加入二碘甲烷(9.5mL, 118mmol)。再20min后,通过套管加入30mL二氯甲烷中的4-亚甲基-吡咯烷-1,2-二羧酸1-苄酯2-甲酯602(8.10g, 29.4mmol)。然后用另外10mL二氯甲烷冲洗含有4-亚甲基-吡咯烷-1,2-二羧酸1-苄酯2-甲酯的烧瓶,并且还将该溶液通过套管转移至反应混合物中。使反应混合物温热至RT,并且搅拌110h(约5天),此后用饱和含水氯化铵(~150mL)淬灭反应物。将烧瓶中的内容物缓慢倒入2L含有饱和含水碳酸氢钠(800mL)的分液漏斗中。用300mL乙酸乙酯萃取水相三次。将合并的有机物通过硫酸镁干燥,并且浓缩,以提供化合物603和604的混合物。

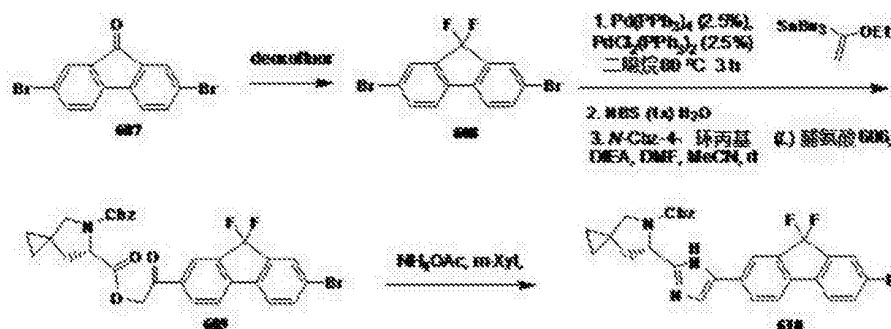
[0510] c. 化合物603的制备。

[0511] 将来自子部分b的粗制材料溶解于3:1:1THF/水/丙酮(165mL)中,然后用N-甲基吗啉-N-氧化物(3.45g, 29.4mmol)和四氧化锇(水中4wt%, 5mL, 0.818mmol)处理。在RT搅拌7h后,用1M含水硫代硫酸钠(~100mL)淬灭反应物。然后将烧瓶的内容物倒入含有水(~300mL)的分液漏斗中。用300mL二氯甲烷将水相萃取三次。将合并的有机物通过硫酸镁干燥,并且浓缩。通过硅柱色谱(5%至45%EtOAc/己烷)纯化粗制残余物,以提供作为清澈油的5-氮杂-螺环[2.4]庚烷-5,6-二羧酸5-苄酯6-甲酯603(5.54g, 19.15mmol, 65%),作为清澈油。 ^1H NMR(CDCl_3) δ 7.36-7.29(m, 5H), 5.21-5.04(m, 2H), 4.56-4.47(m, 1H), 3.75(s,

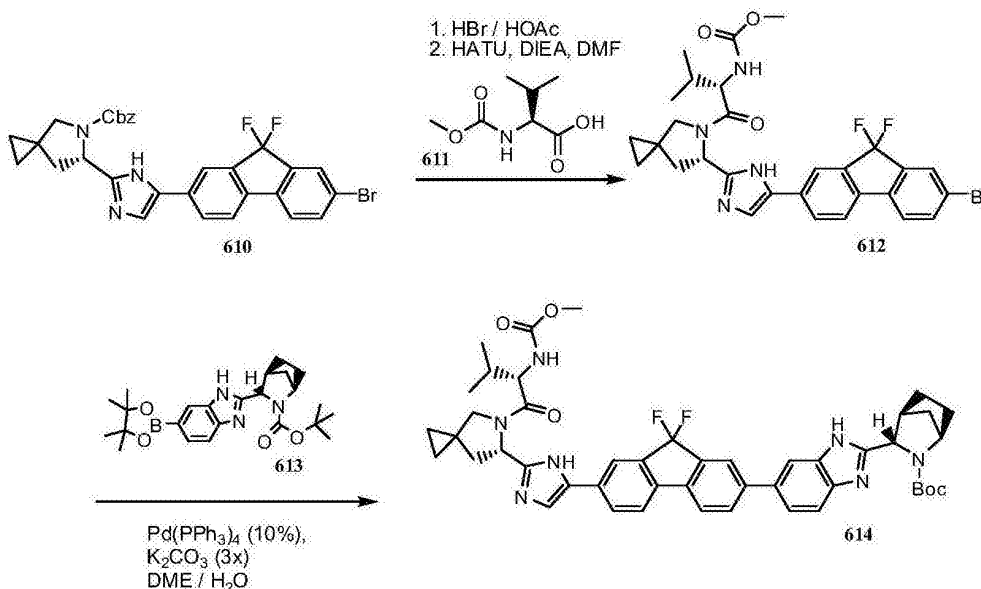
1.5H), 3.60(m, 1.5H), 0.51-3.37(m, 2H), 2.32-2.25(m, 1H), 1.87-1.80(m, 1H), 0.64-0.51(m, 4H)。

[0512] d. 5-氮杂-螺环[2.4]庚烷-5,6-二羧酸5-苄酯606的制备。

[0513] 将5-氮杂-螺环[2.4]庚烷-5,6-二羧酸5-苄酯6-甲酯603(244mg, 0.840mmol)溶解于THF(2.0mL)/MeOH(1.5mL)中。加入LiOH(35.5mg, 0.84mmol)的水溶液, 并且继续在室温下搅拌。3小时后, 用含水HCl(1M)中和反应, 并且在真空下除去有机溶剂。用水和EtOAc稀释粗制混合物, 并且收集有机层。在真空下除去所有挥发物, 并且使用粗制酸606, 而没有进一步纯化。LCMS-ESI⁺: C₁₅H₁₇N₂O₄的分析计算值: 275.3(M⁺); 实测值: 276.3(M+H⁺)。



[0514]



[0515] e. 2,7-二溴-9,9-二氟-9H-芴608的制备。

[0516] 在室温下, 将2,7-二溴-芴-9-酮607(4.0g, 11.8mmol)悬浮于deoxofluor(12mL)中, 并且加入EtOH(4滴)。将搅拌的悬浮液在T=90℃下加热24小时(注意: 按照以上所述的, 在升高温度下使用deoxofluor, 注意可能产生快速且强烈的放热)。将反应冷却至室温, 并且倒在含有碳酸氢钠的冰上。形成了固体, 并通过过滤收集。将粗制材料放入EtOAc中, 并且用含水HCl(1M)和盐水洗涤。将溶液通过硫酸钠干燥。过滤并蒸发溶剂产生了粗制产物, 将其通过硅胶色谱(洗脱液: EtOAc/己烷)来纯化, 以产生608(3.2g)。¹⁹F-NMR: 282MHz, (dms_o-d₆) δ: -111.6ppm。在下一个步骤中使用该材料之前, 将其作为EtOAc中的溶液暴露于木炭。

[0517] f. 5-氮杂-螺环[2.4]庚烷-5,6-二羧酸5-苄酯6-[2-(7-溴-9,9-二氟-9H-芴-2-基)-2-氧-乙基]酯609的制备。

[0518] 在氩气气氛下,将2,7-二溴-9,9-二氟-9H-芴608(372mg,1.04mmol)、Pd(PPh₃)₄(30.0mg,0.026mmol)、PdCl₂(PPh₃)₂(18.2mg,0.026mmol)、As(PPh₃)₃(5.0mg)溶解于二噁烷(10mL)中。加入乙氧基乙烯-三丁锡(376.4mg,1.04mmol)。将混合物在85℃下加热140分钟(油浴)。将反应冷却至室温。加入N-溴代琥珀酰亚胺(177mg,1.0mmol),接着加入水(2mL)。将反应在室温下搅拌3小时,此后在真空下除去大部分二噁烷。用EtOAc稀释粗制反应混合物,并且用水洗涤。在真空下除去所有挥发物。加入甲苯,并且在真空下第二次除去所有挥发物。在室温下将粗制材料溶解于DMF/MeCN(2mL,1:1)中。加入MeCN(2mL)中的N-Cbz-4-环丙基(L)脯氨酸606(0.84mmol)和DIEA(268mg,2.08mmol),并且在室温下继续搅拌。14小时后,在真空下除去大部分MeCN,并且用EtOAc稀释粗制反应混合物。用含水HCl(1M)、含水LiCl溶液(5%)、盐水洗涤混合物,并且通过硫酸钠干燥。过滤并且蒸发溶剂产生了粗制反应产物,将其通过硅胶色谱(洗脱液:EtOAc/己烷)纯化,以产生化合物609(176mg)。LCMS-ESI⁺:C₃₀H₂₄BrF₂NO₅的分析计算值:596.4(M⁺);实测值:595.2/597.2(M+H⁺)。

[0519] g.6-[5-(7-溴-9,9-二氟-9H-芴-2-基)-1H-咪唑-2-基]-5-氮杂-螺环[2.4]庚烷-5-羧酸苄酯610的制备。

[0520] 将5-氮杂-螺环[2.4]庚烷-5,6-二羧酸5-苄酯6-[2-(7-溴-9,9-二氟-9H-芴-2-基)-2-氧-乙基]酯609(172mg,0.293mmol)溶解于m-二甲苯(6.0mL)中。加入醋酸铵(226mg,2.93mmol),并且将反应在微波条件下在140℃下搅拌60分钟。将反应冷却至室温,并且在真空下除去所有挥发物。通过硅胶色谱(洗脱液:EtOAc/己烷)纯化,以产生化合物610(80.3mg)。LCMS-ESI⁺:C₃₀H₂₄BrF₂N₃O₂的分析计算值:576.4(M⁺);实测值:575.2/577.2(M+H⁺)。

[0521] h.(1-{6-[5-(7-溴-9,9-二氟-9H-芴-2-基)-1H-咪唑-2-基]-5-氮杂-螺环[2.4]庚烷-5-羧基}-2-甲基-丙基)-氨基甲酸甲酯612的制备。

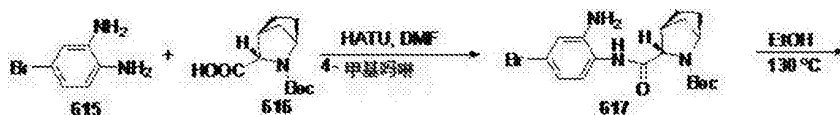
[0522] 将6-[5-(7-溴-9,9-二氟-9H-芴-2-基)-1H-咪唑-2-基]-5-氮杂-螺环[2.4]庚烷-5-羧酸苄酯610(880mg,1.38mmol)溶解于二氯甲烷(15mL)中,并且加入AcOH(37%,2mL)中的HBr,并在继续在室温下搅拌。180分钟后,用己烷稀释悬浮液,并且通过过滤收集固体,并用己烷洗涤,并接受真空。将粗制材料用于下一个步骤中,没有进一步纯化。将粗制材料溶解于DMF(4.0mL)中,并加入DIEA(356mg,2.76mmol)。加入DMF(1mL)中的2-(L)-甲氧基羰基氨基-3-甲基-丁酸611(242mg,1.38mmol)、HATU(524mg,1.38mmol)和DIEA(178mg,1.38mmol)。将反应在室温下搅拌。50分钟后,用EtOAc稀释反应,并且用含水碳酸氢钠溶液、含水LiCl溶液(5%)、盐水洗涤,并通过硫酸钠干燥。过滤并在真空下除去溶剂产生了粗制材料,将其通过硅胶色谱(洗脱液:EtOAc/己烷)纯化,以产生略有不纯的化合物612(878mg)。LCMS-ESI⁺:C₂₉H₂₉BrF₂N₄O₃的分析计算值:599.5(M⁺);实测值:598.5/600.5(M+H⁺)。

[0523] i.3-[6-(9,9-二氟-7-{2-[5-(2-甲氧基羰基氨基-3-甲基-丁酰基)-5-氮杂-螺环[2.4]庚-6-基]-3H-咪唑-4-基}-9H-芴-2-基)-1H-苯并咪唑-2-基]-2-氮杂-二环[2.2.1]庚烷-2-羧酸叔-丁酯614的制备。

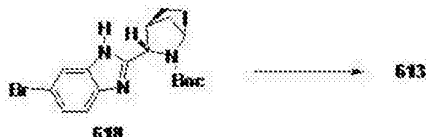
[0524] 在氩气气氛下,将(1-{6-[5-(7-溴-9,9-二氟-9H-芴-2-基)-1H-咪唑-2-基]-5-氮杂-螺环[2.4]庚烷-5-羧基}-2-甲基-丙基)-氨基甲酸甲酯612(840mg,1.4mmol)、3-[6-(4,4,5,5-四甲基-[1,3,2]二氧杂环戊硼烷-2-基)-1H-苯并咪唑-2-基]-2-氮杂-二环[2.2.1]庚烷-2-羧酸叔-丁酯613(615mg,1.4mmol)、Pd(PPh₃)₄(161mg,0.14mmol)、K₂CO₃(579mg,

4.2mmol)溶解于DME(15mL)/水(3mL)中。将混合物在85-90℃下加热120分钟(油浴)。120分钟后,加入另外的硼酸酯(61mg,0.14mmol),并继续加热。3小时后,将反应冷却至室温。在真空下除去大部分DME,并且用EtOAc稀释粗制反应混合物。用盐水洗涤混合物,并且通过硫酸钠干燥。过滤并蒸发溶剂产生了粗制产物,将其通过硅胶色谱(洗脱液:EtOAc/己烷)纯化,以产生化合物614(878mg)。LCMS-ESI⁺:C₄₇H₅₁F₂N₇O₅的分析计算值:831.9(M⁺);实测值:832.7(M+H⁺)。

[0525] 可以如下制备中间体化合物613



[0526]



[0527] j.3-(2-氨基-4-溴-苯基氨基甲酰)-2-氮杂-二环[2.2.1]庚烷-2-羧酸叔-丁酯617的制备。

[0528] 向10mL DMF中的2-氮杂-二环[2.2.1]庚烷-2,3-二羧酸2-叔-丁酯616(0.327g, 1.36mmol, 1eq.)、4-溴-苯-1,2-二胺615(0.507g, 2.71mmol, 2eq.)和4-甲基吗啉(0.299mL, 2eq.)溶液中加入HATU(0.543g, 1.05eq.)。将反应混合物在室温下搅拌1小时,然后浓缩。用乙酸乙酯稀释反应混合物,并且用稀释的NaHCO₃水溶液和盐水洗涤。将有机层浓缩,并且通过快速柱色谱(硅胶,20%至80%乙酸乙酯/己烷)纯化,以获得区域异构体(regioisomer)3-(2-氨基-4-溴-苯基氨基甲酰)-2-氮杂-二环[2.2.1]庚烷-2-羧酸叔-丁酯617的混合物。

[0529] k.3-(6-溴-1H-苯并咪唑-2-基)-2-氮杂-二环[2.2.1]庚烷-2-羧酸叔-丁酯618的制备。

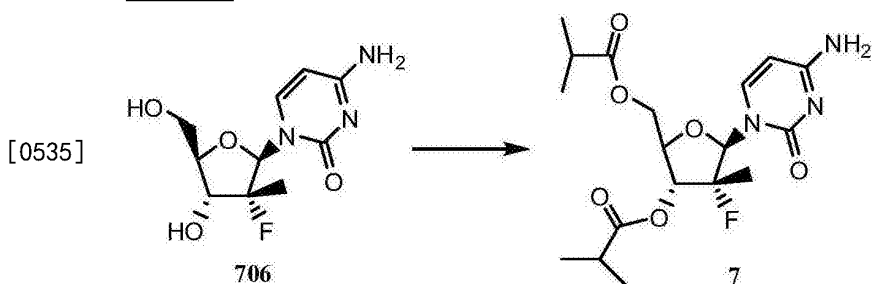
[0530] 将以上区域异构体3-(2-氨基-4-溴-苯基氨基甲酰)-2-氮杂-二环[2.2.1]庚烷-2-羧酸叔-丁酯617的混合物溶解于乙醇中,并在密封管中加热至130℃过夜,并且继续在170℃加热3天。LC-MS显示出所需产物和叔丁氧羰基分裂的产物(约1:1比例)。将混合物浓缩并且溶解HCL。加入二-叔-丁基二羧酸酯(0.6eq.),并且将反应在室温下搅拌过夜。将反应混合物浓缩,并且通过快速柱色谱(硅胶,20%至80%乙酸乙酯/己烷)纯化,以获得作为橙色泡沫的3-(6-溴-1H-苯并咪唑-2-基)-2-氮杂-二环[2.2.1]庚烷-2-羧酸叔-丁酯618(0.383g,72%)。

[0531] 1. 化合物613的制备。

[0532] 将3-(6-溴-1H-苯并咪唑-2-基)-2-氮杂-二环[2.2.1]庚烷-2-羧酸叔-丁酯618 (264mg, 0.673mmol)、苯-1,4-二硼酸二片呐醇酯(5eq., 3.36g, 6.95mmol)、四(三苯基磷)钯(5%, 39mg)和5mL DME中的2M碳酸钾水溶液(3eq., 1.01mL)混合物在Ar下加热至90℃, 持续4小时。将反应混合物冷却, 并在乙酸乙酯中稀释, 并用饱和碳酸氢钠溶液洗涤。将有机层干燥(MgSO₄), 浓缩, 并通过快速柱色谱(硅胶, 20%至60%乙酸乙酯/己烷)纯化, 以获得3-{6-[4-(4,4,5,5-四甲基-[1,3,2]二氧杂环戊硼烷-2-基)-苯基]-1H-苯并咪唑-2-基}-2-氮杂-二环[2.2.1]庚烷-2-羧酸叔-丁酯613(295mg, 产量85%)。LCMS-ESI⁺: C₃₀H₃₈BN₃O₄的分析计算值: 515.45; 实测值: 516.1(M+H⁺)。

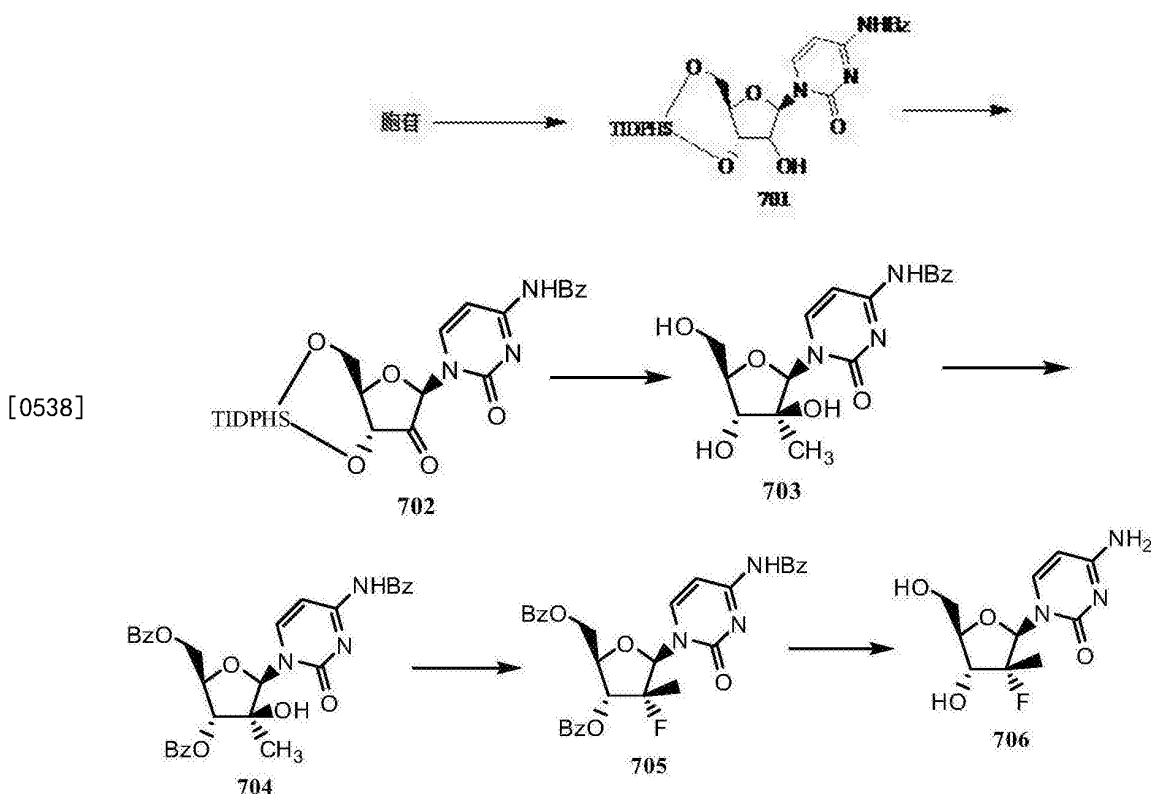
[0533] 可以使用类似US7,429,572中所述那些的合成方法和中间体来制备化合物7。也可以按照以下实施例中所述的来制备化合物7。

[0534] 实施例7: 化合物7的制备。



[0536] 向THF(10L)中的化合物701(970g, 3.74mmol)和DAMP(50g, 0.412mol)的冰冷悬浮液中加入TEA(2.3kg, 16.5mmol)和水(7L), 其产生清澈的溶液。将异丁酰氯(3当量)缓慢加入搅拌的混合物中, 同时将温度维持在0℃。加入另外的1.2, 接着0.7当量的异丁酰氯, 直至HPLC表明反应已经基本上进行完成(总共约1.95kg)。用浓HCl将反应混合物酸化至约6.4的pH, 并用EtOAc(2×10L)洗涤有机相。用水(1×15L)洗涤合并的萃取物。将有机相过滤, 并且真空浓缩。将残余物溶解于IPA(ca. 20kg)中, 并加入庚烷(14.2kg)。将溶液加热至74–75℃, 以产生清澈的溶液, 然后通过蒸馏除去约5L。将所得到的溶液缓慢冷却至室温。在约42–43℃形成沉淀。缓慢继续冷却至5℃, 然后搅拌过夜。滤出所得到的固体, 并用IPA/己烷(1:8)混合物(13.4kg)洗涤滤液, 并在真空下约60–70℃下干燥, 以获得1.295kg(86.65%)的化合物7, 通过HPLC分析纯度为99.45%。

[0537] 可以如下制备中间体化合物706。



[0539] a. 化合物701的制备。

[0540] 向DMF(2.06L)中的胞苷(100g, 0.411mol)悬浮液中加入苯甲酸酐(102.4g, 0.452mol)。将混合物在室温下搅拌20小时。在真空下除去DMF,并且用乙酸乙酯研磨残余物。通过抽滤收集所得到的固体,并且用乙酸乙酯洗涤(2×200mL)。在室温下进一步真空干燥,获得了N⁴苯甲酰胺(140.6g, 98.3%)。将该材料的一部分(139.3g, 0.401mol)溶解于无水吡啶(1.2L)中,并在室温下用1,3-二氯-1,1,3,3-四异丙基-二硅氧烷(141.4mL, 0.441mol)处理。将溶液在室温下搅拌过夜。将混合物真空浓缩至接近干燥,并且用甲苯共同蒸发(3×200mL)。用EtOAc(1.8L)处理残余物,并用HCl(2×200mL, 0.05N)、NaHCO₃(5%, 2×400mL)洗涤。将有机层洗涤,干燥(Na₂SO₄),过滤,并蒸发至干。作为白色泡沫分离化合物701(256.5g, >100%),并且没有进一步纯化就使用。

[0541] b. 化合物702的制备。

[0542] 将化合物701(236.5g, 0.40mol)溶解于干THF(1.22L)中。加入无水DMSO(180.8mL, 2.1mol),并且将所得到的溶液冷却至-20℃至-15℃之间。在45分钟内逐滴加入三氟乙酸酐(90.6mL, 0.64mol),并且将溶液在-20℃至-15℃之间搅拌2hr,此后在20分钟内加入无水三乙胺(223.5mL, 1.6mol)。将含有酮702的粗制反应物溶解于EtOAc(500mL)中,并且用H₂O(3×400mL)洗涤所得到的溶液,干燥(Na₂SO₄),并真空除去溶剂,以获得黄色固体,将其在硅胶柱上纯化,用己烷中逐步梯度的Et₂O(0-60%)洗脱,接着通过己烷中逐步梯度的EtOAc(50-100%)洗脱。从石油醚中结晶由此获得的粗制酮(~192g),以获得作为白色固体的酮702(138.91g, 来自胞苷的57.5%)和22g作为黄色固体的未反应起始材料701。

[0543] c. 化合物703的制备。

[0544] 将化合物702(48.57g, 8.26mmol)溶解于无水甲苯(~400mL)中,并且真空除去溶剂,并排除水分。然后将残余物在真空(油泵)进一步再干燥2小时。严格排除水分,在氩气下将残余物泡沫溶解于无水二乙醚(1.03L)中。在氩气下,将所得到的溶液冷却至-78℃,并且通过加样漏斗逐滴加入MeLi(1.6M, 258.0mL, 0.413mol)。添加完成后,将混合物在-78℃下搅拌2小时。缓慢加入含水1M NH₄Cl(500mL)。温热至室温后,用H₂O(2×500mL)洗涤混合物,干燥(Na₂SO₄),然后浓缩至干,以获得棕色泡沫(~60g, >100%)。

[0545] 使用37.62g和56.4g化合物702进行了两次反应。将合并的粗制产物(128.0g, 0.212mol)溶解于THF(1.28L)中,并用浓HOAc(23mL, 0.402mol)处理。向溶液中加入TBAF(384.0mL, THF中1M)。将溶液在室温下搅拌0.75小时,并且用硅胶(750g)处理混合物,并浓缩至干。将粉末放在在CH₂Cl₂中填充的硅胶柱上。用1:7EtOH-CH₂Cl₂洗脱获得了暗色蜡质固体,将其在硅胶(300g)上预吸收并且按照之前的进行色谱纯化。分离了作为灰白色固体的化合物703(46.4g, 53.0%来自702)。¹H NMR(DMSO-d₆): δ1.20(s, 3H, CH₃), 3.62-3.69(m, 2H,), 3.73-3.78(m, 2H,), 5.19(t, 1H, J=5.4Hz, OH-5'), 5.25(s, 1H, OH-2'), 5.52(d, 1H, J=5.0Hz, OH-3'), 5.99(s, 1H, H-1'), 7.32(d, 1H, J=5.8Hz), 7.50(Ψ t, 2H, J=7.7Hz), 7.62(Ψ, 1H, J=7.3Hz), 8.00(d, 2H, J=7.3Hz), 8.14(d, 1H, J=6.9Hz), 11.22(s, 1H, NH). C₁₇H₁₉N₃O₆ • 0.5H₂O的分析计算值:C, 55.13; H, 5.44; N, 11.35。实测值:C, 55.21; H, 5.47; N, 11.33。

[0546] d. 化合物704的制备。

[0547] 将化合物703(46.0g, 0.13mol)溶解于无水吡啶中,并且真空浓缩至干。在氩气下将所得到的浆液溶解于无水吡啶中,并且边搅拌边冷却至0℃。在10分钟内用苯甲酰氯

(30mL, 0.250mol)逐滴处理棕色溶液。除去冰浴,并且继续搅拌1.5小时,由此TLC显示出没有剩余起始材料。通过加入水(5mL)来淬灭反应物,并且浓缩至干。将残余物溶解于最少量的CH₂Cl₂中,并且用饱和NaHCO₃(1×500mL)和H₂O(1×500mL)洗涤。将有机相干燥(Na₂SO₄)并过滤,浓缩至干,并且在硅胶上色谱纯化,使用逐步梯度的EtOAc-己烷(25-60%)洗脱,以获得作为黄色泡沫的化合物704(48.5g, 67%)。¹H NMR(CDCl₃): δ1.64(s, 3H, CH₃), 4.50(m, 1H, H-4), 4.78-4.85(m, 2H, H-5', 5a'), 5.50(d, 1H, J=3.4Hz, H-3'), 6.42(s, 1H, H-1'), 7.44-7.54(m, 7H, Ar), 7.57-7.66(m, 3H, Ar), 7.94(d, 2H, J=7.8Hz), 8.05-8.09(m, 4H, Ar), 8.21(d, 1H, J=7.3Hz)。C₃₁H₂₇N₃O₈的分析计算值:C, 65.37; H, 4.78; N, 7.38。实测值:C, 65.59; H, 4.79; N, 7.16。

[0548] e. 化合物705的制备。

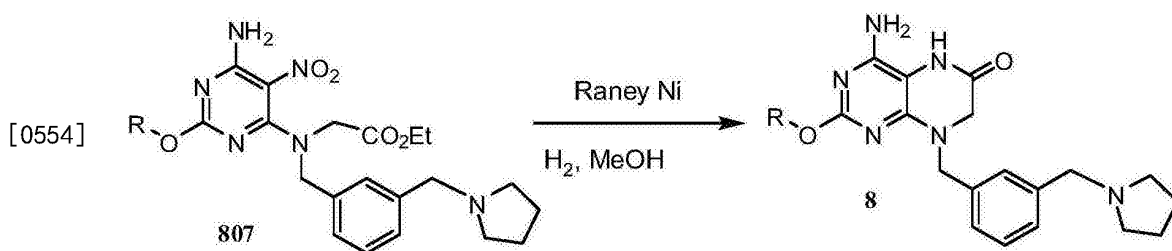
[0549] 将化合物704(7.50g, 0.013mol)在氩气下溶解于无水甲苯(150mL)中,并且冷却至-20℃。缓慢加入DAST(2.5mL, 18.9mmol),并且在添加完成后除去冷却浴。继续搅拌1小时,并且将混合物倒入饱和NaHCO₃(100mL)中,并且洗涤直至停止产生气体。将有机相干燥(Na₂SO₄),浓缩,并通过硅胶色谱纯化,使用1:1EtOAc-己烷洗脱。产量为1.22g(16.3%)的作为白色固体的纯705。mp 241℃(CH₂Cl₂-己烷);¹H NMR(CDCl₃): δ1.49(d, 3H, J=22.4Hz, CH₃), 4.64(dd, 1H, J=3.44, 12.9Hz, H-5'), 4.73(d, 1H, J=9.5Hz, H-4'), 4.90(dd, 1H, J=2.4, 12.7Hz, H-5a'), 5.56(dd, 1H, J=8.6, 20.7Hz, H-3'), 6.52(d, 1H, J=18.0Hz, H-1'), 7.47-7.57(m, 7H, Ar), 7.62-7.71(m, 3H, Ar), 7.89(d, 2H, J=6.9Hz), 8.07-8.11(m, 5H, Ar), 8.67(bs, 1H, NH)。¹⁹F NMR(CDCl₃): δ3.3(m)。C₃₁H₂₆FN₃O₇•0.7H₂O的分析计算值:C, 63.74; H, 4.72; N, 7.20。实测值:C, 63.71; H, 4.54; N, 7.20。

[0550] f. 化合物706的制备。

[0551] 将化合物705(6.30g, 0.011mol)悬浮于甲醇氨(ca 7N, 150mL)中,并且在室温下搅拌过夜。真空除去溶剂,用甲醇(1×20mL)共同蒸发,并且预吸附至硅胶上。将白色粉末置于硅胶柱上(在CHCl₃中填充的)并且用CHCl₃中的9%EtOH洗脱,然后17%EtOH,并且最后CHCl₃中的25%EtOH洗脱。将含有产物的级分浓缩,通过0.4μm盘过滤,并且从水中冻干,获得了化合物706, 2.18g(76%)。¹H NMR(DMSO-d₆): δ1.17(d, 3H, J=22.3Hz, CH₃), 3.63(dd, 1H, J=2.7, 13.7Hz, H-5'), 3.70-3.84(m, 3H, H-3', H-4', H-5a'), 5.24(app s, 1H, OH-3'), 5.60(d, 1H, J=5.4Hz, H-5'), 5.74(d, 1H, J=7.71Hz, H-5), 6.07(d, 1H, J=18.9Hz, H-1'), 7.31(s, 1H, NH₂), 7.42(s, 1H, NH₂), 7.90(d, 1H, J=7.3Hz, H-6)。¹⁹F NMR(DMSO-d₆): δ2.60(m)。C₁₀H₁₄FN₃O₄•1.4H₂O的分析计算值:C, 44.22; H, 5.95; N, 14.77。实测值:C, 42.24; H, 5.63; N, 14.54。通过溶解于水(2mL)中并且用1M HCl将pH调节至大约3.0,将化合物706(0.10g, 0.386mol)转化成盐酸盐。真空除去水,并且从含水EtOH中结晶残余物,以获得作为盐酸盐的化合物706(71.0mg)。mp 243℃(dec);¹H NMR(DMSO-d₆): δ1.29(d, 3H, J=22.6Hz, CH₃), 3.65(dd, 1H, J=2.3, 12.7Hz, H-5'), 3.76-3.90(m, 3H, H-3', H-4', H-5a'), 5.96(d, 1H, J=17.3Hz, H-1'), 6.15(d, 1H, J=7.9Hz, H-5), 8.33(d, 1H, J=7.9Hz, H-6), 8.69(s, 1.5H, NH), 9.78(s, 1.5H, NH)。¹⁹F NMR(DMSO-d₆): δ1.69(m)。C₁₀H₁₄FN₃O₄•HCl的分析计算值:C, 40.62; H, 5.11; N, 14.21。实测值:C, 40.80; H, 5.09; N, 14.23。

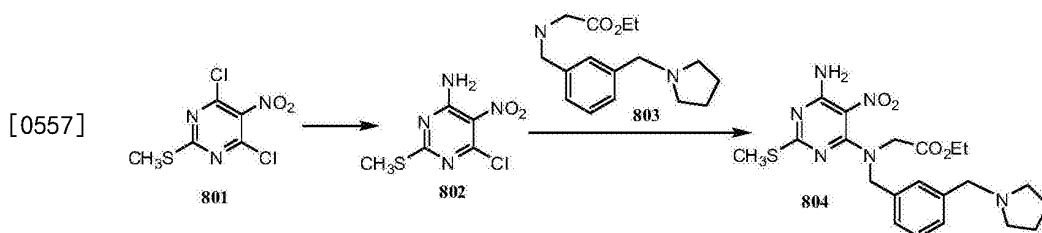
[0552] 可以使用类似USSN 12/632,194中所述那些的合成方法和中间体来制备化合物8。也可以按照以下实施例中所述的来制备化合物8。

[0553] 实施例8: 4-氨基-2-n-丁氧基-8-[3'-(吡咯烷基-1"-亚甲基)-苄基]-5,6,7,8-四氢蝶啶-6-酮8的制备。(R=n-丁基)



[0555] 向MeOH(10mL)中的硝基化合物807(730mg, 1.5mmol)溶液中加入雷尼镍(~200μL, H₂O中的浆液)。用H₂充满反应容器,然后在H₂气氛下搅拌1.5小时。将混合物通过使用CH₂Cl₂和MeOH(1:1)的硅藻土过滤,将滤液在真空下浓缩,并且留在冻干机中过夜。获得了作为白色固体的化合物8的游离碱。为了获得8的HCl盐,将以上滤液样品用1.0M HCl强化至pH=1-2,并冻干。¹H NMR(CD₃OD, 300MHz): δ7.65(s, 1H), 7.50(m, 3H), 4.96(s, 2H), 4.44(t, J=7Hz, 2H), 4.40(s, 2H), 4.16(s, 2H), 3.48(m, 2H), 3.19(m, 2H), 2.02-2.17(m, 4H), 1.74(m, 2H), 1.45(m, 2H), 0.94(t, J=7Hz, 3H)-[HCl盐]。LCMS-ESI⁺: C₂₂H₃₁N₆O₂的分析计算值: 411.5(M+H⁺); 实测值: 411.3(M+H⁺)。

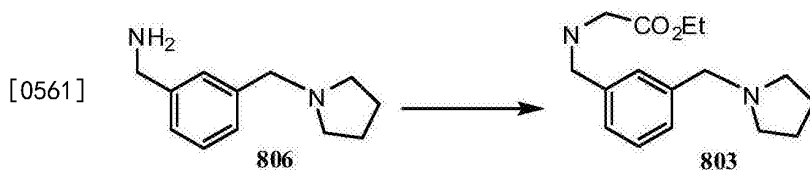
[0556] 如下制备中间体化合物807。



[0558] a. 化合物802的制备。

[0559] 在-20℃下向THF(34mL)中的化合物801(2.46g, 10.2mmol)溶液中加入Et₃N(3.14mL, 22.5mmol),接着加入NH₃的溶液(MeOH中2.0M, 5.4mL, 11mmol)。搅拌混合物,同时温热至0℃,持续1.5h(LC/MS显示起始材料的消耗)。含有化合物802的反应混合物进一步进行,没有分离纯化。

[0560] b. 化合物803的制备。



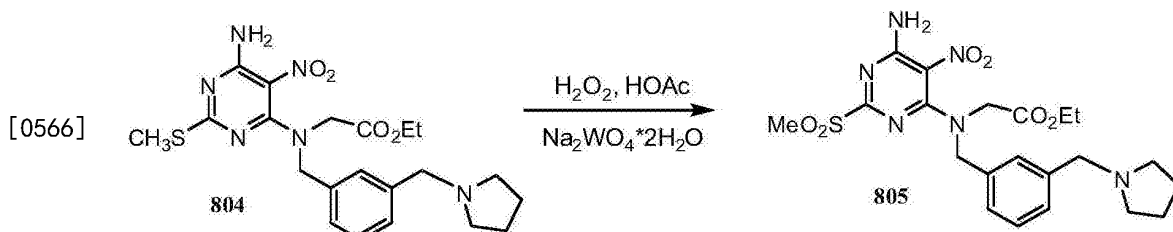
[0562] 在0℃,向THF(34mL)中的3-((1-吡咯烷基甲基)苯基)甲烷胺806(1.95g, 10.2mmol)溶液中加入Et₃N(3.14mmol, 22.5mmol),接着逐滴加入甲基溴乙酸乙酯(1.04mL, 22.3mmol)。搅拌反应混合物直至LC/MC表示起始材料的消耗,大约2小时。含有化合物803的反应混合物进一步进行,没有分离纯化。

[0563] c. 化合物804的制备

[0564] 在0℃,将含有化合物803的反应混合物加入含有化合物802的反应混合物中。搅拌反应混合物,直至LC/MS表示化合物802的消耗,大约45分钟。加入NH₄Cl的饱和溶液(50mL)。

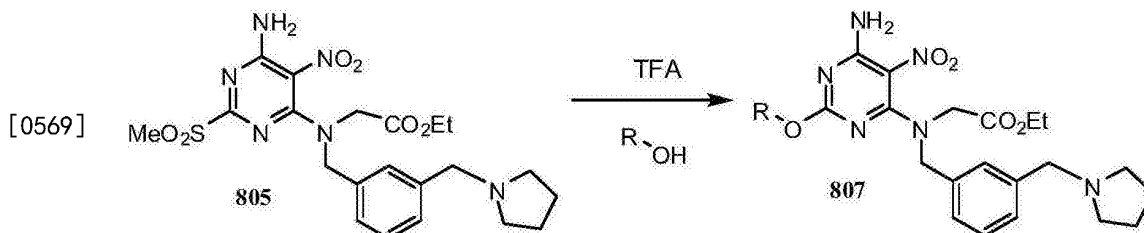
分离层,并且用EtOAc(2×30mL)萃取含水层。通过MgSO₄干燥,过滤并在真空下浓缩合并的有机层。通过硅胶色谱的纯化提供了2.11g化合物804。¹H NMR(CD₃OD, 300MHz): δ(ppm) 7.32–7.16(m, 4H), 4.69(s, 2H), 4.19(q, J=7Hz, 2H), 4.07(s, 2H), 3.60(s, 2H), 2.49(m, 4H), 2.40(s, 3H), 1.78(m, 4H), 1.23(t, 3H, J=7Hz)。LCMS-ESI⁺: C₂₁H₂₉N₆O₄S的分析计算值: 461.2(M+H⁺); 实测值: 461.0(M+H⁺)

[0565] d. 乙基-Na-[4-氨基-2-甲烷磺酰-5-硝基嘧啶-6-基], Na-[3'-(吡咯烷-1"-亚甲基)-苄基]-甘氨酸酯805的制备。



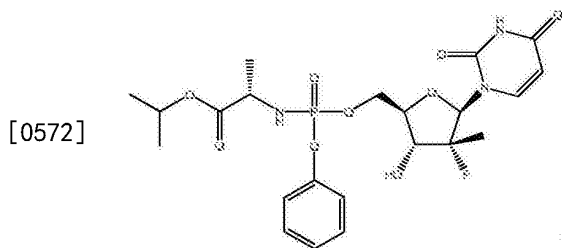
[0567] 在0℃,向EtOH(40mL)中的硫化物804(3.68g, 8.00mmol)溶液悬浮液中按序加入钨酸钠二水合物(792mg, 2.40mmol)、乙酸(4.6mL, 80mmol)和过氧化氢(3.4mL, ~40mmol, H₂O中35%w/w)。3小时后,加入另外的乙酸(4.6mL)和过氧化氢(3.4mL)。将反应在0℃维持16小时。小心地加入Na₂SO₃饱和溶液(50mL),同时保持在0℃,接着加入CH₂Cl₂(75mL)。分离层,并且用CH₂Cl₂(4×50mL)萃取含水层。将合并的有机层通过MgSO₄干燥,过滤,并且在真空下浓缩,以提供含有化合物805的材料,没有进一步纯化就使用。

[0568] e. 化合物807的制备。(R=n-丁基)



[0570] 向n-丁醇(10mL)中的磺805(1.0g, 2.0mmol)溶液中加入TFA(470μL, 6.1mmol)。将反应在100℃下搅拌1小时。将反应混合物倒在NaHCO₃(20mL)和CH₂Cl₂(30mL)上。分离层,并且用CH₂Cl₂(30mL)萃取含水层。将合并的有机层通过MgSO₄干燥,过滤,并且在真空下浓缩。通过硅胶色谱进行纯化(1g底物/10g SiO₂)(2–15%MeOH/CH₂Cl₂),以提供化合物807。

[0571] 实施例9: 化合物9的制备(来自US2010/0298257)



9

[0573] (S)-2-[(1R,4R,5R)-5-(2,4-二氧-3,4-二氢-2H-嘧啶-1-基)-4-(R)-氟-3-羟基-4-甲基-四氢-呋喃-2-基-甲氧基]-苯氧基磷酰基氨基}-丙酸异丙酯的制备(来自US2010/0298257实施例2) 异名: 5'-O-(异丙基-L-铝氢化物, 苯基磷酰胺)-2'-脱氧-2'-氟-

2'-C-甲基-尿苷非对映异构体混合物。

[0574] 将5L 3-颈烧瓶装备上机械搅拌器、盐水浴、内部温度计和氮气气氛。将烧瓶装满L-丙氨酸异丙酯盐酸盐(82.0g, 0.490摩尔)和无水二氯甲烷(0.80L)。在搅拌的同时, 以一批加入苯基二氯磷酸酯(85.0g, 0.40摩尔), 并搅拌。在维持内部温度计在-5至5℃的同时, 在半小时的时间段内加入二氯甲烷(250mL)中的N-甲基咪唑(NMI, 250g, 3.07摩尔)溶液。将溶液在该温度范围下搅拌1h。在0℃, 一次性加入2'-脱氧-2'-氟-2'-C-甲基-尿苷(3, 80.0g, 0.307摩尔), 然后使反应烧瓶在盐水浴中缓慢温热。1h时, 内部温度计升至-2℃。1h时的TLC(HCL中的5%甲醇)显示出消耗了超过50%的核苷。除去水浴, 并且使反应烧瓶在1h多的时间内达到环境温度。3h后和5h时的TLC总地显示出消耗了95%的起始核苷。通过加入甲醇(100mL)并将反应搅拌5分钟来淬灭反应混合物。用1N HCl(2×500mL), 接着饱和碳酸氢钠溶液(2×500mL)洗涤反应混合物。将分离的有机层通过无水硫酸钠(50g)干燥并过滤。将溶液在减压下蒸发, 然后在高真空下蒸发至干, 以获得作为粘性油的粗制产物(170g)。获取粗制产物的NMR(³¹P和¹H)。³¹P-NMR表明约1%的总磷结合是由于3'异构体5的存在。

[0575] 向粗制产物中加入无水吡啶(1700mL)。将溶剂在减压下蒸发, 然后在高真空下蒸发, 以通过共同蒸发降低粗制混合物的含水量。将所得到的油重新溶解于无水吡啶(500mL)中, 然后加入过量的t-丁基二甲基甲硅烷基氯化物(9.0g, 60mM)。将反应在环境温度下搅拌。通过UPLC/MS监控反应进展。3小时后, 不再检测到3'杂质5, 并通过加入甲醇(50mL)淬灭反应。

[0576] 将反应在减压下蒸发成油。将残余物溶解于乙酸乙酯(1.5L)中, 并用1N HCl(2×500mL)洗涤, 接着用饱和碳酸氢钠溶液(2×500mL)洗涤。将有机层通过无水硫酸钠(50g)干燥, 过滤并在减压下蒸发, 以获得作为淡黄色油的粗制产物。

[0577] 用相同体积的二氯甲烷稀释粗制油, 并加样于2.5Kg硅胶筒上, 100psi空气压力下的径向压缩模块。使用60psi下的梯度泵和400ml/min的流速, 用二氯甲烷(4L)接着二氯甲烷(48L)中的梯度1-4%甲醇洗涤筒。用~3%梯度洗脱了大部分的主要杂质(二-(异丙基丙氨酰)苯基磷酸酯, 3', 5'-双氨基磷酸酯, 3'-氨基磷酸酯-5'-TBDMS加合物(7))。所需的产物在3%和4%甲醇之间洗脱。将含有产物的级分分成两批。第一批含有少量上层杂质, 而后一批是纯产物。第一组级分含有少量极性较低的杂质(上层杂质), 如3', 5'-双氨基磷酸酯和二-丙氨酰苯基磷酸酯以及主要的Rp非对映异构体, 并且需要第二次柱纯化。(相对术语, 上层vs. 下层是指正常相硅胶色谱上的洗脱, 其中“上层异构体”意思是第一种洗脱的异构体)。第二组级分不含显著量的杂质-只有剩余的Rp和主要的Sp非对映异构体。之后将其与两次过柱的级分重新合并。在减压下蒸发溶解, 并且将所得到的白色泡沫进一步干燥(0.20mmHg)1h, 获得42g不纯批(4:1上层vs. 下层异构体, 基于³¹P-NMR)和38g纯产物批(1:3上层vs. 下层异构体)。将不纯批以相似的方式重新过柱, 获得3.8g 97%纯的上层异构体(级分留出)和36g以4:1比例的纯产物。将两个主要的批次溶解于HCL中, 合并, 在减压下蒸发并干燥(50℃, 0.2mmHg, 24h), 以获得74g(45.7%)作为白色泡沫的48:51非对映异构比的纯产物(化合物9), mp约75-85℃。

[0578] 为了产生非对映异构体混合物的无定形固体, 用t-丁甲醚(750mL)搅拌74g白色泡沫, 形成部分溶液和胶黏性固体残余物。边搅拌, 边缓慢加入庚烷(750mL), 并且将悬浮液机械搅拌1小时, 直至大部分胶体转化成白色固体。用刮铲刮下固体, 并且过滤所得到的浆液。

用庚烷(4×50mL)洗涤固体,并在真空下干燥(50℃,0.2mmHg,24h),以获得白色、无定形粉末(64g),具有ca 70–80℃的宽熔化范围。¹H和³¹P NMR证实了结构,并且HPLC显示出99.8%纯度,具有46:54非对映异构体比例(也通过³¹P NMR证实了)。

[0579] 制备化合物9的固体混合物的可替换方法。色谱后,将残余物与二氯甲烷共同蒸发两次(5mL/g),并且在35–40℃35–45mTorr下干燥24h。将泡沫残余物通过250微米筛网过筛,并且在相同条件下进一步干燥,直至残余二氯甲烷低于400ppm,如通过头部空间GC测量的。所得到的细灰白色至白色无定形粉末具有53.7℃至63.5℃的玻璃转变温度。

[0580] 化合物9的表征(异构体的混合物):

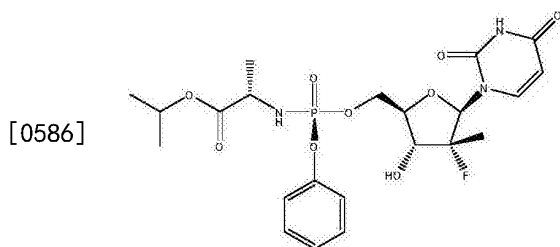
[0581] ¹H-NMR(CDCl₃)010.05(brs,1H,NH,Sp),10.00(brs,1H,NH,Rp),7.49(d,1H,C6-H,Sp),7.36(m,5H,C6-H,Rp,芳香族),7.23–7.14(m,6H,Rp/Sp,芳香族),6.18(br d,2H,Cl'-H,Rp/Sp),5.63(d,1H,C5-H,Sp),5.58(d,1H,C5-H,Rp),5.01(m,2H,CH-(CH₃)₂Rp/Sp),4.46–4.33(m,8H,C-5'-H₂,ala-NH,C3'-OH,Rp/Sp),4.12(m,2H,ala-CHCH₃,Rp/Sp),4.01–3.85(m,4H,C3'-H,C4'-H,Rp/Sp),1.391.22(m,12H,全部CH₃,Rp/Sp)。

[0582] ³¹P-NMR(CDCl₃)03.60(Rp),3.20Sp,相对于-17.80ppm下的三苯基磷酸酯。ES-MS M+1530.2。元素分析:计算的%(包括0.29%水,如通过Karl Fisher分析发现的)C,49.75;H,5.54;N,7.90;F,3.58;P,5.84。实测值%:C,49.50;H,5.44;N,7.85;F,3.62;P,6.05。

[0583] 2'-脱氧-2'-氟-2'-C-甲基尿苷的制备(来自US2010/0298257实施例1)

[0584] 在10L烧瓶中,加入3',5'-O-二苯甲酰-2'-脱氧-2'-氟-2'-C-甲基-N4-苯甲酰胞苷(500g,0.874mol)和70%含水乙酸(7.5L)。将溶液加热至回流(110℃),持续20h。TLC表明完全反应(Rf0.6,在二氯甲烷中5%甲醇中(HCL))。将混合物冷却至环境温度,并且用水(2L)稀释。搅拌2h后,通过过滤收集所得到的沉淀物,并且用水(5L)冲洗固体,并且在环境温度下在大气下干燥12h,以获得360g(88%)。将该二苯甲酰尿苷中间体直接用于下一个步骤中,在0℃下将其全部加入新鲜制备的甲醇氨(5.4L,ca 25%)中。将该温度维持3h,然后使其温热至15℃,持续24h。TLC表明完全反应(Rf0.4,HCL中的10%甲醇中)。将反应混合物通过硅藻土床过滤,并且在减压下浓缩,获得粗制产物(216g)。用乙酸乙酯(325mL)在室温下将粗制产物搅拌3h。通过过滤收集所得到的固体,并用乙酸乙酯(216mL)洗涤。将固体在真空下在环境温度下干燥4h,以获得160g(78%)98.7%HPLC纯度的所需产物。¹H-NMR(DMSO-d₆)011.44(br s,1H,NH),7.95(d,1H,C-6H),5.97(d,1H,C-1'H),5.64(d,1H,C-5H),3.84–3.77(m,3H,C-5'-Ha,C-3'H,C-4'H),3.63–3.60(m,1H,C5'-Hb),1.23(d,3H,C-2'-CH₃)。ES-MS M-I 259。

[0585] 实施例10:化合物10的制备(来自US2010/0298257)



[0587] 化合物10的直接沉淀(来自US2010/0298257;实施例4):在室温下向二氯甲烷(100mL)中的L-丙氨酸异丙酯盐酸盐(10.5g,61.5mmol,共沸干燥的,两次,每次使用50mL甲

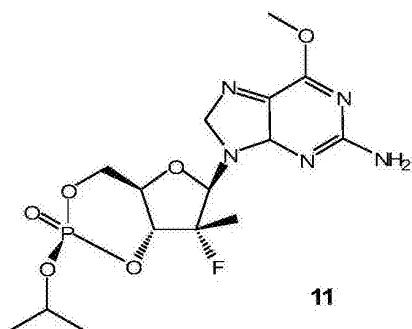
苯)的搅拌溶液中加入苯基二氯磷酸酯(7.5mL, 50mmol)。将混合物冷却至-10℃, 然后在30min的时间段内加入30mL二氯甲烷中的N-甲基咪唑(30.5mL, 384.3mmol)溶液。添加完成后, 将混合物在-10至-15℃之间搅拌1h。向以上混合物中一次性加入2'-脱氧-2'-氟-2'-C-甲基尿苷(10g, 38.4mmol)(参见US2010/0298257实施例1), 并且将混合物在低于-10℃下搅拌3h, 然后缓慢温热至20℃(6h)。将混合物在该温度下搅拌过夜(15h), 然后用10mL甲醇淬灭。将溶剂蒸发, 并且将残余物重新溶解于EtOAc(200mL)中。用水(100mL)、1N HCl(3×75mL)、2%NaHCO₃水溶液(50mL)和盐水(50mL)洗涤EtOAc层。将有机层通过Na₂SO₄干燥, 过滤并浓缩。将残余物在高真空下干燥2h, 以获得白色泡沫(22g)。

[0588] 将以上的泡沫溶解于33mL HCl中, 然后加入65mL异丙醚, 以获得饱和溶液。将该溶液通过小的硅藻土垫过滤, 并且在室温(约22℃, -注意将悬浮液冷却至0℃, 导致溜出粗制产物)下用化合物10的种子搅拌滤液72h。过滤白色固体, 用异丙醚(20mL)洗涤, 并干燥, 以获得4.58g(~85:15的分别为化合物10:P处的R异构体的混合物, 如通过³¹P NMR测定的)白色粉末。将以上固体悬浮于23mLHCl中, 然后回流3h。将混合物冷却至室温, 并且搅拌15h。过滤白色固体, 用4.5mL冷HCl洗涤, 并在高真空45℃下干燥, 以获得纯化合物10, mp 93.9-104.7℃, HPLC纯度99.74%(3.11g, 15.2%来自尿苷核苷)。

[0589] 化合物10: ¹H-NMR(CDCl₃) δ8.63(br s, ¹H, NH), 7.47(d, 1H, C6-H), 7.30(m, 2H, o-芳香族的), 7.26-7.18(m, 3H, m, p-芳香族的), 6.18(br d, 1H, C1'-H), 5.70(d, 1H, C5-H), 5.02(sept, CH-(CH₃)₂), 4.53(m, 2H, C-5'-H₂), 4.11(d, 1H, C3'-H), 3.97(m, 3H, C3'-OH, C4'-H, ala-CH-CH₃), 3.77(br s, 1H, ala-NH), 1.39(d, 3H, C2'-CH₃), 1.37(d, 3H, ala-CH₃) 1.24(d, 6H, CH-(CH₃)₂)。

[0590] 实施例11: 化合物11的制备(来自US2010/0081628)

[0591]



[0592] 6-乙氧基-9-((4aR, 6R, 7R, 7aR)-7-氟-2-异丙氧基-7-甲基-2-氧-四氢-2,5-呋喃并[3,2-d][1,3,2]二氧杂磷苯-6-基)-9H-嘌呤-2-基-胺(化合物11)(化合物19, US2010/0081628)的合成

[0593] 在0℃, 将(2R, 3R, 4R, 5R)-5-(2-氨基-6-乙氧基-嘌呤-9-基)-4-氟-2-羟甲基-4-甲基-四氢-呋喃-3-醇(150mg, 0.46mmol)溶解于无水吡啶(2mL)中。加入乙腈(2.55mL)中的0.45M 1H-四唑溶液, 接着加入双(N, N-二异丙基氨基)异丙基亚磷酸胺(0.16mL, 0.55mmol, 1.2eq.)。使混合物在3h内缓慢温热至环境温度。TLC表明完全反应。加入水(0.1mL)使反应淬灭。将反应溶液在减压下浓缩, 然后用乙酸乙酯(5mL)研磨残余物。通过过滤去除所得到的白色沉淀物, 将滤液在减压下浓缩。

[0594] 将所得到的中间体环亚磷酸酯残余物溶解于乙腈(2mL)中, 然后在室温下用t-丁基氢过氧化物(水中70%, 0.19mL)处理5h。TLC表明完全反应。将反应溶液在减压下浓缩, 并

且通过柱色谱纯化残余物(使用HCL中0至5% IPA梯度的Analogix)。两个非对映异构体(化合物11和P处的R-异构体)是可分离的。将含有每个非对映异构体的级分分开合并,并在减压下浓缩至白色固体,以获得20mg每个非对映异构体(合并产量20%)。

[0595] 化合物11

[0596] ^{31}P -NMR(162MHz, DMSO): δ -6.49;

[0597] ^1H -NMR(400MHz, DMSO): δ =8.17(s, 1H), 6.47(bs, 2H), 6.27(d, J =21.2Hz, 1H), 4.73-4.62(m, 4H), 4.45(q, J =7.0Hz, 2H), 4.27-4.21(m, 1H), 1.39-1.34(m, 9H), 1.20(d, J =22.8Hz, 3H). MS(ESI): m/z 432.4[M+H] $^+$

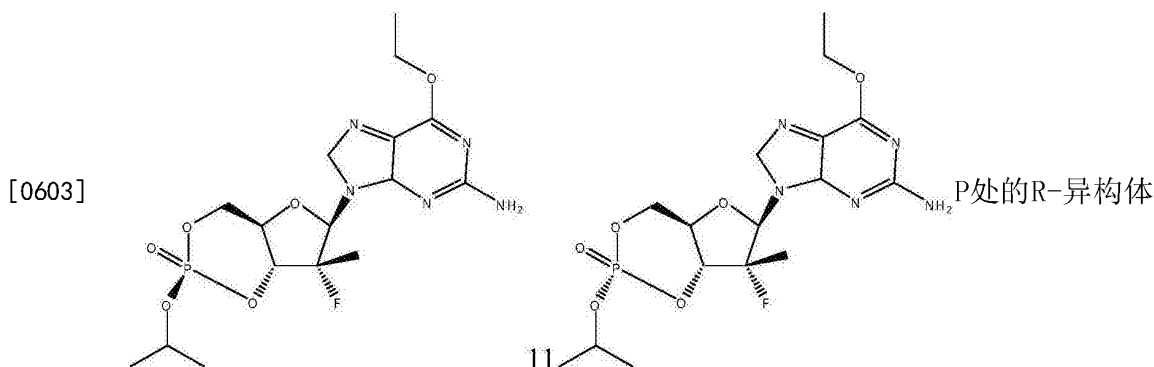
[0598] P处的R-异构体

[0599] ^{31}P -NMR(162MHz, DMSO): δ =-4.68;

[0600] ^1H -NMR(400MHz, DMSO): δ =8.15(s, 1H), 6.63(s, 2H), 6.27(d, J =21.2Hz, 1H), 4.74-4.58(m, 4H), 4.45(q, J =6.4Hz, 2H), 4.42-4.37(m, 1H), 1.36(t, J =7.2Hz, 3H), 1.32(d, J =3.6Hz, 3H), 1.30(d, J =3.6Hz, 3H), 1.22(d, J =22.8Hz, 3H).

[0601] MS(ESI): m/z 432.4[M+H] $^+$

[0602] 化合物11和P处的R-异构体的结构如下所示。



[0604] (2R,3R,4R,5R)-5-(2-氨基-6-乙氧基-9H-嘌呤-9-基)-4-氟-2-(羟甲基)-4-甲基四氢-呋喃-3-醇的合成(化合物16,US2010/0081628)

[0605] 向500mL圆底烧瓶中装入(2R,3R,4R,5R)-5-(2-氨基-6-氯-9H-嘌呤-9-基)-2-(苯甲酰氧甲基)-4-氟-4-甲基四氢呋喃-3-基苯甲酸酯(11g, 20.92mmol)。加入无水绝对乙醇(210mL),接着加入无水 K_2CO_3 (28.91g, 209.2mmol)。搅拌悬浮液,并且在氮气下在75℃下加热5.5h。通过TLC检测,在该时间,消耗了所有起始材料。将混合物冷却至室温,并且滤出固体。通过加入冰醋酸(2.52g),将滤液中和至pH~7,并且在减压下浓缩。将残余物溶解于甲醇中,并与硅胶(15g)混合。将粗制产物和硅胶的干燥混合物转移至空筒内,并且通过柱色谱分离(Analogix 220g, DCM中0至15% MeOH梯度),以获得作为白色泡沫固体(3.73g, 54.5%)的产物(DCM中5% MeOH)。从柱分离第二种白色固体(DCM中10% MeOH, 1.44g),并且是两种核苷二聚体的混合物。极性更大,从柱收集第三种白色固体(DCM中15% MeOH, 0.47g),并且是核苷三聚体的混合物。产物的HPLC纯度为99.94%。

[0606] ^1H -NMR(DMSO- d_6): δ 8.16(s, 1H, 8-H), 6.55(s, 2H, NH_2), 6.04(d, 1H, C1'-H), 5.66(d, 1H, 3'-OH), 5.24(m, 1H, 5'-OH), 4.44(q, 2H, 6-OCH $_2$), 4.23-4.08(m, 1H, C3'-H), 3.91-3.82(m, 2H, C4'-H和C5'-H $_a$), 3.71-3.66(m, 1H, C5'-H $_b$), 1.36(t, 3H, 乙基的CH $_3$), 1.06(d, 3H, C2'-CH $_3$)。

[0607] (2R,3R,4R,5R)-5-(2-氨基-6-氯-9H-嘌呤-9-基)-2-(苯甲酰氧甲基)-4-氟-4-甲基四氢呋喃-3-基苯甲酸酯(化合物12,US2010/0081628)的合成

[0608] 向12L三颈圆底烧瓶中装入6-氯-2-氨基嘌呤(225.4g,1.329mol)。加入无水叔-丁醇(4.5L),并且在室温下用机械搅拌器搅拌溶液。在氮气流动下分部分加入叔-丁醇钾(固体,151.6g,1.35mol),同时搅拌。将混合物在RT下再搅拌30min。在环境温度下向5L圆底烧瓶中装入 α -溴化物(10,197g,0.451mol)和3L无水乙腈。在环境温度下,在1min内将溴化物溶液加入嘌呤碱悬浮液中。用乙腈(2 $\times$ 1L)冲洗5L烧瓶,以将溴化物完全转移至反应混合物中。用加热罩和控制器,将混合物在2h内逐渐加热至50 $^{\circ}$ C,并且搅拌20h。通过TLCB显示反应几乎完成了(R_f 0.28,己烷中30%EtOAc)。通过加入饱和NH₄Cl(200mL)淬灭反应,以形成悬浮液。在2.5L瓷Buchner漏斗中,通过3cm硅藻土垫过滤除去悬浮的固体。用甲苯(3 $\times$ 100mL)洗涤固体。通过加入6N HCl中和合并的滤液,直至pH7(大约220mL)。将混合物在减压下浓缩。将混合物的体积减至约三分之一体积时,通过相似方式的过滤除去其他沉淀的固体。将滤液进一步浓缩至约800mL的体积。将残余物加样至插入式柱上(6L烧结的玻璃Buchner漏斗中1.6kg快速级别硅胶),并使用己烷(6L)中的10%乙酸乙酯梯度来洗脱(通过抽吸),以除去非极性杂质,己烷中的30%乙酸乙酯,以获得少量乳醇(6L),然后己烷(4L)中40%-45%乙酸乙酯,以洗脱主要含量的产物。合并含有产物的级分,在减压下浓缩,并在真空中(0.2mmHg,24h,环境温度)干燥成白色泡沫固体(150.7g, $\beta/\alpha=14:1$,通过NMR。¹H-NMR.(CDCl₃) β : $\delta=1.33$ (d,22.4Hz,2'-C-CH₃), α :1.55(d,22Hz,2'-C-CH₃)。

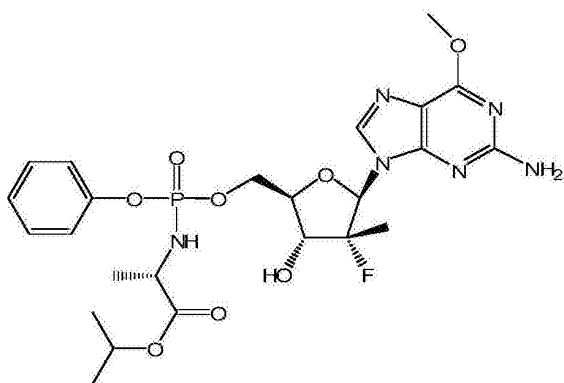
[0609] 在室温下将产物混合物泡沫溶解于甲醇(700mL)中。静置时,在2h内缓慢形成固体。将悬浮液在制冷器中冷却至-5 $^{\circ}$ C,持续17h。通过过滤收集所得到的白色固体,并用冷MeOH(-5 $^{\circ}$ C3 $\times$ 60mL)和乙酸乙酯(3 $\times$ 100mL)洗涤。将固体在真空(0.2mmHg,24h,环境温度)下干燥,以获得110.5g β -产物,具有极好的de(β/α 99.8:1,通过HPLC)。将滤液部分浓缩(ca.400mL),然后用更多MeOH(400mL)稀释,同时加热至60 $^{\circ}$ C。将溶液冷却至环境温度,接种并冷却至-5 $^{\circ}$ C。收集第二次产物,洗涤,并以相似方式干燥,以获得作为白色固体(12.26g)的更多产物,具有相似的非对映异构体纯度。将母液在减压下浓缩至干(ca.25g)。残余物是 β 和 α 异构体的混合物。将其接受自动化硅胶柱色谱(Analoxix,240g筒,己烷中40%至50%乙酸乙酯),以获得14.52g产物泡沫,将其从MeOH中重结晶出来,洗涤,并以相似方式干燥,以获得另外8.46g高纯度的产物。

[0610] 判断三种固体纯度相似,并将它们合并,以获得131.2g白色晶体产物(55%来自溴代糖,49%来自乳醇)。Mp 160.5-162.0 $^{\circ}$ C。HPLC纯度99.5%,包括0.20% α 。

[0611] ¹H-NMR(纯 β -异头物,CDCl₃): $\delta=8.03$ (m,2H,arom.),7.93(m,2H,arom.),7.88(s,1H,C8-H),7.60(m,1H,arom.),7.50(m,1H,arom.),7.44(m,2H,arom.),7.33(m,2H,arom.),6.44(dd,1H,C11'-H),6.12(d,1H,C3'-H),5.35(s,2H,NH₂),5.00(dd,1H,C5'-Ha),4.76(m,1H,C4'-H),4.59(dd,1H,C5'-Hb),1.33(d,3H,CH₃)。

[0612] 实施例12:化合物12的制备(来自US20110015146)

[0613]



12

[0614] (2S)-异丙基2-((((2R,3R,4R,5R)-5-(2-氨基-6-甲氧基-9H-嘌呤-9-基)-4-氟-3-羟基-4-甲基四氢呋喃-2-基)甲氧基)(苯氧基)磷酸基氨基)丙酸酯的合成

[0615] 向250mL干的圆底烧瓶中装入苯基二氯磷酸酯(2.66g, 12.61mmol)和无水二氯甲烷(40mL)。将氨基酯盐(2.60g, 15.53mmol)加入溶液中,并且将混合物冷却至-5℃,并将溶液在-5℃下搅拌1h。在-5℃下,从小瓶中将核苷((2R,3R,4R,5R)-5-(2-氨基-6-甲氧基-9H-嘌呤-9-基)-4-氟-2-(羟甲基)-4-甲基四氢呋喃-3-醇), 3.04g, 9.7mmol)一次性加入,并且固体在20分钟内缓慢溶解。在2h内使反应温度升至环境温度。17h后,反应没有完成。制得更多反应物(来自磷酸酯(2.66g), 氨基酯(2.60g)和N-甲基咪唑(3.8mL, 48mmol)),并在-5℃下加入反应混合物中。将反应在室温下再搅拌2小时。通过TLC结果显示反应几乎完成,并用70mL二氯甲烷稀释。加入HCl溶液(1N, 70mL)。分离含水层,并用二氯甲烷萃取。用饱和NaHCO₃、水、盐水洗涤有机层,并通过MgSO₄干燥。在减压下除去溶解后,通过自动化柱色谱纯化粘性残余物,使用240g筒和二氯甲烷中0-8%2-PrOH梯度,以获得作为泡沫固体的产物(4.16g, 7.14mmol, 73%产量)。HPLC纯度97.4%。产物的NMP谱显示出其是两种非对映异构体的混合物,具有1.2:1的比例。

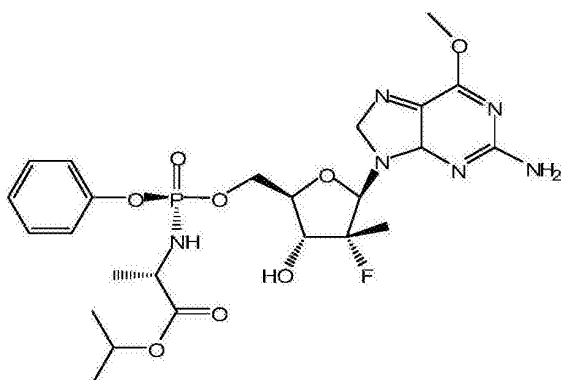
[0616] ¹H-NMR(DMSO-d₆): δ=7.98(1H, s, 一种异构体的8-Hr), 7.95(1H, s, 另一种异构体的8-H), 7.37-7.32(2H, m, 芳香的-H), 7.22-7.15(3H, m, 芳香的-H), 6.6(2H, s, NH₂), 6.11(1H, d, 一种异构体的C1'-H), 6.09(1H, d, 另一种异构体的C1'-H), 6.09-5.98(1H, m, 酰胺NH), 5.88(1H, d, 一种异构体的3'-OH), 5.81(1H, d, 另一种异构体的3'-H), 4.85-4.75(1H, 七, 异丙基的次甲基H), 4.46-4.27(2H, m, C4'-H, 氨基酯的α-H), 4.15-4.07(1H, m, C3'-H), 3.96(3H, s, OCH₃), 3.82-3.72(2H, m, C5'-H_a和C5'-H_b), 1.23-1.06(9H, m, 氨基酯的CH₃'s), 1.03(3H, d, C2'-CH₃)。

[0617] ³¹P-NMR(DMSO-d₆): δ=4.91(一种异构体), 4.72(另一种异构体)。

[0618] 可替换的纯化方法是在化学上改变少量3'氨基磷酸酯副产物,以简化色谱分离。将粗制氨基磷酸酯产物溶解于无水吡啶(5mL/g)中,并且在室温下用0.5摩尔当量的t-丁基二甲基甲硅烷基氯化物处理,以选择性地与3'异构体杂质的5'伯羟基反应。通过LC/MS监控反应进展。一旦3'异构体转化成5'-tBDMS-3'-氨基磷酸酯衍生物,用甲醇(3当量)淬灭反应,在减压下浓缩,在乙酸乙酯和5%柠檬酸之间分离,然后浓缩有机层。然后将残余物遭受色谱,所述色谱现在可以以较高载量和较快梯度来进行,并且获得较高纯度。

[0619] 实施例13: 化合物13的制备(来自US20110015146)

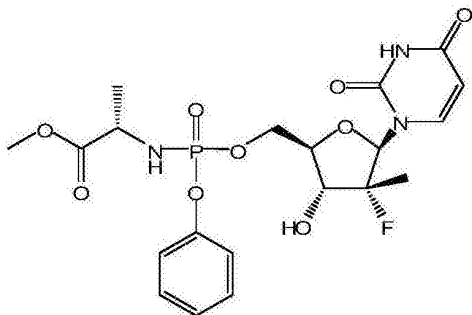
[0620]



13

[0621] 实施例14:化合物14的制备(来自US7,964,580,实施例5)

[0622]



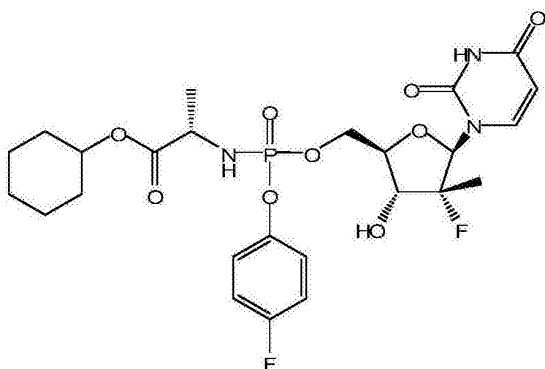
14

[0623] 2'-脱氧-2'-氟-2'-C-甲基尿苷-5'-苯基甲氧基-丙氨酰磷酸酯的制备

[0624] 在室温下,边强烈搅拌,边将溶解于3mL THF中的苯基甲氧基丙氨酰磷酸氯(1g, 6.5eq)加入3mL THF中的2'-脱氧-2'-氟-2'-C-甲基尿苷(0.15g, 1eq)和N-甲基咪唑(0.3g, 8eq)的混合物中,然后将反应搅拌过夜。通过减压除去溶剂。将所得到的粗制产物溶解于甲醇中,通过YMC 25×30×2mm柱上的制备型-HPLC纯化,使用水/乙腈梯度洗脱移动相。在减压下除去乙腈和水,以获得所需产物(50.1mg, 15.6%)。¹H NMR(DMSO-d₆) δ 1.20-1.27(m, 6H), 3.58(d, J=16.0Hz, 3H), 3.75-3.92(m, 2H), 4.015-4.379(m, 2H), 5.54(t, J=10.2Hz, 1H), 5.83-5.91(m, 1H), 6.00-6.16(m, 1H), 7.18(d, J=8.0Hz, 2H), 7.22(s, 1H), 7.35(t, J=4.4Hz, 2H), 7.55(s, 1H), 11.52(s, 1H); MS, m/e 502(M+1)⁺。

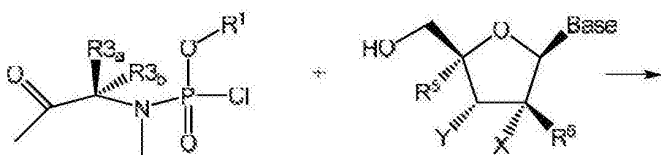
[0625] 实施例15:化合物15的制备(实施例55,来自US7,964,580)

[0626]

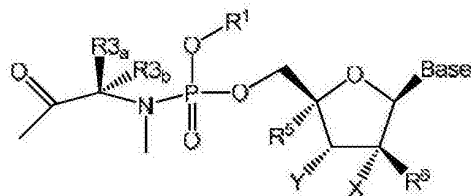


15

[0627] ¹H NMR(DMSO-d₆) δ 1.20-1.44(m, 12H), 1.60-1.71(m, 4H), 3.75-4.02(m, 2H), 3.94-4.02(m, 1H), 4.19-4.26(m, 2H), 4.59-4.61(m, 1H), 5.57(t, J=8.4Hz, 1H), 5.85-6.06(m, 3H), 7.17-7.23(m, 4H), 7.54(d, J=8.4Hz, 1H), 11.50(s, 1H); MS, m/e 587.92(M+1)⁺



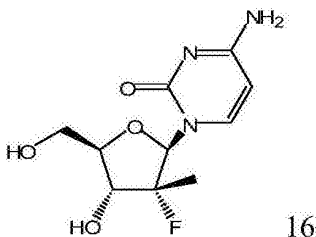
[0628]



[0629] 在US7,964,580的461栏报道了用于核苷氨基磷酸酯衍生物的一般程序。在室温下,边强烈搅拌,边将无水四氢呋喃(THF)中的合适氨基磷酸酯(6.5当量)的溶液加入核苷(1当量)和N-甲基咪唑(8当量)的混合物中,并将反应混合物搅拌过夜。真空除去溶剂,并且通过柱色谱和/或制备型薄层色谱纯化粗制物,以获得所需的化合物。

[0630] 实施例16: 化合物16的制备(来自US7,429,572)

[0631]



16

[0632] 从胞苷开始合成(2'R)-2'-脱氧-2'-氟-2'-C-甲基胞苷

[0633] 步骤1: 向DMF(2.06L)中的胞苷(100g, 0.411mol)悬浮液中加入苯甲酸酐(102.4g, 0.452mol)。将混合物在室温下搅拌20h。真空下除去DMF, 并且用二乙醚研磨残余物。通过抽滤收集所得到的固体, 并且用二乙醚(2×200mL)洗涤。在室温下进一步真空干燥获得了N4苯甲酰胺(140.6g, 98.3%)。将一部分的这种材料(139.3g, 0.401mol)溶解于无水吡啶(1.2L)中, 并且在室温下用1,3-二氯-1,1,3,3-四异丙基-二硅氧烷(141.4mL, 0.441mol)处理。将溶液在室温下搅拌过夜。将混合物真空浓缩至接近干燥, 并且用甲苯(3×200mL)共同蒸发。用EtOAc(1.8L)处理残余物, 并且用HCl(2×200mL, 0.05N)、NaHCO₃(5%, 2×400mL)处理残余物。洗涤有机层, 干燥(Na₂SO₄), 并蒸发至干。作为白色泡沫分离化合物16-1(来自US7,429,572的化合物4-1)(256.5g, >100%), 并且使用, 没有进一步纯化。

[0634] 步骤2: 将化合物16-1(236.5g, 0.40mol)溶解于干THF(1.22L)中。加入无水DMSO(180.8mL, 2.1mol), 并且将所得到的溶液冷却至-20℃至-15℃之间。在45分钟内逐滴加入三氟乙酸酐(90.6mL, 0.64mol), 并且将溶液在-20℃至-15℃之间搅拌2h, 此后, 在20分钟内加入无水三乙胺(223.5mL, 1.6mol)。将含有酮16-2的粗制反应物溶解于EtOAc(500mL)中, 并且用H₂O(3×400mL)洗涤所得到的溶液, 干燥(Na₂SO₄), 并真空下除去溶剂, 以获得黄色固体, 将其在硅胶柱上纯化, 用己烷中逐步梯度的Et₂O(0-60%)洗脱, 接着用己烷中逐步梯度的EtOAc(50-100%)洗脱。将由此获得的酮(~192g)从石油醚中结晶出来, 获得作为白色固体的酮16-2(来自US7,429,572的化合物4-2)(138.91g, 57.5%来自胞苷)和作为黄色固体的22g未反应的起始材料16-1。

[0635] 步骤3:将化合物16-2(48.57g, 8.26mmol)溶解于无水甲苯(~400mL)中,并且真空除去溶解,并排除水分。然后将残余物在真空(油泵)进一步再干燥2小时。严格排除水分,在氩气下将残余物泡沫溶解于无水二乙醚(1.03L)中。在氩气下将所得到的溶液冷却至-78℃,并且通过加样漏斗逐滴加入MeLi(1.6M, 258.0mL, 0.413mol)。添加完成后,将混合物在-78℃下搅拌2小时。缓慢加入含水1M NH₄Cl(500mL)。温热至室温后,用H₂O(2×500mL)洗涤混合物,干燥(Na₂SO₄),然后浓缩至干,以获得棕色泡沫(~60g, >100%)。

[0636] 使用37.62g和56.4g化合物16-2进行了两次反应。将合并的粗制产物(128.0g, 0.212mol)溶解于THF(1.28L)中,并用浓HOAc(23mL, 0.402mol)处理。向溶液中加入TBAF(384.0mL, THF中1M)。将溶液在室温下搅拌0.75h,并且用硅胶(750g)处理混合物,并浓缩至干。将粉末放在在CH₂Cl₂中填充的硅胶柱上。用1:7EtOH-CH₂Cl₂洗脱获得了暗色蜡质固体,将其在硅胶(300g)上预吸收并且按照之前的进行色谱。分离了作为灰白色固体的化合物16-3(来自US7,429,572的化合物4-3)(46.4g, 53.0%来自16-2)。¹H NMR(DMSO-d₆): δ1.20(s, 3H, CH₃), 3.62-3.69(m, 2H,), 3.73-3.78(m, 2H,), 5.19(t, 1H, J=5.4Hz, OH-5'), 5.25(s, 1H, OH-2'), 5.52(d, 1H, J=5.0Hz, OH-3'), 5.99(s, 1H, H-1'), 7.32(d, 1H, J=5.8Hz), 7.05(Ψ t, 2H, J=7.7Hz), 7.62(Ψ t, 1H, J=7.3Hz), 8.00(d, 2H, J=7.3Hz), 8.14(d, 1H, J=6.9Hz), 11.22(s, 1H, NH). C₁₇H₁₉N₃O₆·0.5H₂O的分析计算值:C, 55.13; H, 5.44; N, 11.35。实测值:C, 55.21; H, 5.47; N, 11.33。

[0637] 步骤4:将化合物16-3(46.0g, 0.13mol)溶解于无水吡啶中,并且真空浓缩至干。在氩气下将所得到的浆液溶解于无水吡啶中,并且边搅拌边冷却至0℃。在10分钟内用苯甲酰氯(30mL, 0.250mol)逐滴处理棕色溶液。除去冰浴,并且继续搅拌1.5h,由此TLC显示出没有剩余起始材料。通过加入水(5mL)来淬灭反应物,并且浓缩至干。将残余物溶解于最少量的CH₂Cl₂中,并且用饱和NaHCO₃(1×500mL)和H₂O(1×500mL)洗涤。将有机相干燥(Na₂SO₄)并过滤,浓缩至干,并且在硅胶上色谱纯化,使用逐步梯度的EtOAc-己烷(25-60%)洗脱,以获得作为黄色泡沫的化合物16-4(来自US7,429,572的化合物4-4)(48.5g, 67%)。¹H NMR(CDCl₃): δ1.64(s, 3H, CH₃), 4.50(m, 1H, H-4), 4.78-4.85(m, 2H, H-5', 5a'), 5.50(d, 1H, J=3.4Hz, H-3'), 6.42(s, 1H, H-1), 7.44-7.54(m, 7H, Ar), 7.57-7.66(m, 3H, Ar), 7.94(d, 2H, J=7.8Hz), 8.05-8.09(m, 4H, Ar), 8.21(d, 1H, J=7.3Hz). C₃₁H₂₇N₃O₈的分析计算值:C, 65.37; H, 4.78; N, 7.38。实测值:C, 65.59; H, 4.79; N, 7.16。

[0638] 步骤5:将化合物16-4(7.50g, 0.013mol)在氩气下溶解于无水甲苯(150mL)中,并且冷却至-20℃。缓慢加入DAST(2.5mL, 18.9mmol),并且在添加完成后除去冷却浴。继续搅拌1小时,并且将混合物倒入饱和NaHCO₃(100mL)中,并且洗涤直至停止产生气体。将有机相干燥(Na₂SO₄),浓缩,并通过硅胶色谱纯化,使用1:1EtOAc-己烷洗脱。产量为1.22g(16.3%)的作为白色固体的纯16-5(来自US7,429,572的化合物4-5)。mp 241℃(CH₂Cl₂-己烷);¹H NMR(CDCl₃): δ1.49(d, 3H, J=22.4Hz, CH₃), 4.64(dd, 1H, J=3.44, 12.9Hz, H-5'), 4.73(d, 1H, J=9.5Hz, H-4'), 4.90(dd, 1H, J=2.4, 12.7Hz, H-5a'), 5.56(dd, 1H, J=8.6, 20.7Hz, H-3'), 6.52(d, 1H, J=18.0Hz, H-1'), 7.47-7.57(m, 7H, Ar), 7.62-7.71(m, 3H, Ar), 7.89(d, 2H, J=6.9Hz), 8.07-8.11(m, 5H, Ar), 8.67(bs, 1H, NH). ¹⁹F NMR(CDCl₃): δ3.3(m). C₃₁H₂₆FN₃O₇·0.7H₂O的分析计算值:C, 63.74; H, 4.72; N, 7.20。实测值:C, 63.71; H, 4.54; N, 7.20。

[0639] 步骤6:将化合物16-5(6.30g,0.011mol)悬浮于甲醇氨(ca 7N,150mL)中,并且在室温下搅拌过夜。真空除去溶剂,用甲醇(1×20mL)共同蒸发,并且预吸附至硅胶上。将白色粉末置于硅胶柱上(在CHCl₃中填充的)并且用CHCl₃中的9%EtOH洗脱,然后17%EtOH,并且最后CHCl₃中的25%EtOH洗脱。将含有产物的级分浓缩,通过0.4 μ m盘过滤,并且从水中冻干,获得了化合物16-6(来自US7,429,572的化合物4-6),2.18g(76%)。¹H NMR(DMSO-d₆): δ 1.17(d,3H,J=22.3Hz,CH₃),3.63(dd,1H,J=2.7,13.7Hz,H-5'),3.70-3.84(m,3H,H-3',H-4',H-5a'),5.24(app s,1H,OH-3'),5.60(d,1H,J=5.4Hz,H-5'),5.74(d,1H,J=7.71Hz,H-5),6.07(d,1H,J=18.9Hz,H-1'),7.31(s,1H,NH₂),7.42(s,1H,NH₂),7.90(d,1H,J=7.3Hz,H-6)。¹⁹F NMR(DMSO-d₆): δ 2.60(m)。C₁₀H₁₄FN₃O₄·4.1.4H₂O的分析计算值:C,44.22;H,5.95;N,14.77。实测值:C,42.24;H,5.63;N,14.54。通过溶解于水(2mL)中并且用1M HCl将pH调节至大约3.0,将化合物16-6(0.10g,0.386mol)转化成盐酸盐。真空下除去水,并且从含水EtOH中结晶残余物,以获得作为盐酸盐的化合物16-6(71.0mg)。mp 243°C(dec);¹H NMR(DMSO-d₆): δ 1.29(d,3H,J=22.6Hz,CH₃),3.65(dd,1H,J=2.3,12.7Hz,H-5'),3.76-3.90(m,3H,H-3',H-4',H-5a'),5.96(d,1H,J=17.3Hz,H-1'),6.15(d,1H,J=7.9Hz,H-5),8.33(d,1H,J=7.9Hz,H-6),8.69(s,1.5H,NH),9.78(s,1.5H,NH)。¹⁹F NMR(DMSO-d₄): δ 1.69(m)。C₁₀H₁₄FN₃O₄·HCl的分析计算值:C,40.62;H,5.11;N,14.21。实测值:C,40.80;H,5.09;N,14.23。

[0640] 生物学实施例

[0641] 试验实验方案

[0642] 高通量复制试验(HTBS)

[0643] 将带有H77(基因型1a)或Con1(基因型1b)HCV RNA和Renilla荧光素酶报告子的复制子细胞以90 μ L DMEM培养基(排除G-418)中 1.6×10^3 细胞/孔的密度接种于384-孔黑色平板中。将化合物在100%DMSO中连续稀释,并以1:225稀释度加入细胞中,使用Biotek μ Flow工作台获得90 μ L总体积中0.44%DMSO的终浓度。将细胞平板在37°C和5%CO₂下培养3天,此后,除去培养基,并且测试作为复制水平标志物的细胞荧光素酶活性。使用Dual-Glo荧光素酶试验试剂(Promega, Madison, WI)测量了荧光素酶表达。简而言之,加入20 μ L Dual-Glo荧光素酶缓冲液,以裂解细胞10min,并且随后将20 μ L稀释的Dual-Glo Stop&Glo底物(1:100)加入每个孔中。孵育10分钟后,在Perkin Elmer Envision Plate Reader上测量发光信号。将荧光素酶水平转化成相对于未处理对照(限定为100%)的百分比,并且使用XLFit4软件(IDBS, Emeryville, CA),将数据与逻辑剂量应答等式 $y = a / (1 + (x/b)^c)$ 相拟合。从所得到的等式计算EC₅₀值。或者,可以通过HCV NS3蛋白酶IC₅₀测定来分析抗病毒活性。使用荧光共振能量转移(FRET)缩酚肽底物(RET S1, Anaspec, San Jose, CA)来监控HCV NS3蛋白酶活性,基于Taliani, Taliani M, Bianchi E, Narjes F, Fossatelli M, Urbani A, Steinkuhler C等,基于共振能量转移的缩肽底物的丙型肝炎的连续试验(A continuous assay of hepatitis C virus protease based on resonance energy transfer depsiptide substrates). Anal. Biochem. 1996; 240(1):60-7的方法,关于进行这样的试验,将其通过引用并入本文中。

[0644] 简而言之,将2-10nM纯化的NS3蛋白酶结构域在37°C下预孵育10分钟,使用20 μ M等基因NS4A肽辅因子(Sigma, St. Louis, MO),在含有50mM HPEPS pH7.5和10mM DTT的40%甘

油缓冲液中。将化合物连续1:3稀释于DMSO中,用酶/辅因子混合物孵育10分钟,并通过加入2 μ M RET S1底物(终浓度)来启动反应。使用Victor3V荧光平板阅读器(Perkin Elmer, Waltham, WA)在一小时内连续测量荧光增加。使用Workout 1.5软件(DAZDAQ, East Sussex, UK),使用最大斜率算法,计算每个抑制剂浓度的初始速度。将速度数据转化成相对于未处理对照的百分比(限定为100%),并且进行非线性回归,以计算50%抑制浓度(IC₅₀值)。

[0645] NS3酶功效:将纯化的NS3蛋白酶与NS4A肽复合,然后用连续稀释的化合物孵育(DMSO用作溶剂)。通过加入双重标记的肽底物来启动反应,并且测量所得到的荧光动力学增加。进行速度数据的非线性回归以计算IC₅₀。最初相对基因型1b蛋白酶来测试活性。根据相对基因型1b获得的功效,可以测试其他基因型(1a、2a、3)和或蛋白酶抑制剂抗性酶(D168Y、D168V或A156T突变体)。在所有试验过程中,将BILN-2061用作对照。在该试验中评价实施例的化合物,并且发现具有低于约1 μ M的IC₅₀值。

[0646] 复制子功效和细胞毒性:用连续稀释的化合物(DMSO用作溶剂)将Huh-1uc细胞(稳定复制Bartenschlager's I389luc-ubi-neo/NS3-3'/ET基因型1b复制子)处理72小时。通过生物发光测量复制子拷贝数,并且进行非线性回归以计算EC₅₀。使用Promega CellTiter-Glo细胞生活力试验,测试用相同药物稀释处理的平行平板的细胞毒性。根据相对1b复制子获得的功效,可以相对基因型1a复制子和/或编码D168Y或A156T突变的抑制剂抗性复制子测试化合物。在所有试验过程中,将BILN-2061用作对照。在该试验中评价实施例的化合物,并且发现具有低于约5 μ M的IC₅₀值。

[0647] 血清蛋白对复制子功效的作用

[0648] 在补充了生理学浓度的人血清白蛋白(40mg/mL)或 α -酸糖蛋白(1mg/mL)的正常细胞培养基(DMEM+10%FBS)中进行复制子试验。将人血清蛋白存在下的EC₅₀与正常培养基中的EC₅₀相比,以确定功效的倍数偏移。

[0649] 酶选择性:在针对每种酶的代表性底物的K_m下测量包括猪胰腺弹性酶、人白细胞弹性酶、蛋白酶3和组织蛋白酶D的哺乳动物蛋白酶的抑制。将每种酶的IC₅₀与使用NS3 1b蛋白酶获得的IC₅₀相比,以计算选择性。

[0650] MT-4细胞细胞毒性:用连续稀释的化合物处理MT4细胞五天。在处理时间段结束时,使用Promega CellTiter-Glo试验测量细胞生活力,并且进行非线性回归来计算CC₅₀。

[0651] EC₅₀下与细胞相关的化合物浓度:用等于EC₅₀浓度的化合物孵育Huh-1uc培养物。在多个时间点(0-72小时),用2 $\times$ 冷培养基洗涤细胞,并用85%乙腈提取;还在每个时间点提取了培养基的样品。通过LC/MS/MS分析了细胞和培养基提取物,以确定每个级分中的化合物的摩尔浓度。

[0652] 溶解度和稳定性:通过获取10mM DMSO储液的等份试样并在测试介质溶液(PBS, pH7.4和0.1N HCl, pH1.5)中制备100 μ M终浓度的化合物,使用1%的总DMSO浓度,来测定溶解度。将测试介质溶液在室温下振荡孵育1hr。然后将溶液离心,并且在HPLC/UV上测试所收集的上清液。可以通过比较与相同浓度的DMSO中检测的含量相比的限定测试溶液中检测的化合物的含量来计算溶解度。

[0653] 低温保存的人、狗和大鼠肝细胞的稳定性:将每种化合物在37 $^{\circ}$ C下在肝细胞悬浮液(100 μ L, 80,000细胞/孔)中孵育长达1小时。在无血清的孵育培养基中低温保存的肝细胞复原。将悬浮液转移至96-孔平板中(50 μ L/孔)。将化合物在孵育培养基中稀释至2 μ M,然后

加入肝细胞悬浮液中,以启动孵育。在启动孵育后的0、10、30和60分钟时取样,并且用由90%乙腈/10%水中的0.3%甲酸组成的混合物来淬灭反应。使用LC/MS/MS分析每个样品中的化合物浓度。通过将浓度-时间数据与单相指数方程拟合来确定肝细胞悬浮液中化合物的半衰期的消失。还将该数据按比例增大,用以表示内在的肝清除和/或总肝清除。

[0654] 来自人、狗和鼠的肝S9级分的稳定性:将每种化合物在S9悬浮液(500 μ l, 3mg蛋白/mL)中在37 $^{\circ}$ C下孵育长达1小时(n=3)。将化合物加入S9悬浮液中,以启动孵育。在启动孵育后的0、10、30和60分钟时取样。使用LC/MS/MS分析每个样品中的化合物浓度。通过将浓度-时间数据与单相指数方程拟合来确定S9悬浮液中化合物的半衰期的消失。

[0655] Caco-2渗透性:测量了正向(A-至-B)和反向(B-至-A)渗透性。将Caco-2单层在12-孔Costar Transwell $^{\circledR}$ 平板中的覆盖的胶原蛋白、微孔、聚碳酸酯膜上生长成融合。将化合物给药在肠腔侧,用于正向渗透性(A-至-B),并且给药在基底侧,用于反向渗透性(B-至-A)。将细胞在潮湿的培养箱中用5%CO₂在37 $^{\circ}$ C下孵育细胞。在孵育开始时,在孵育后1h和2h,从接收室获取200- μ L等份试样,并用新鲜试验缓冲剂替代。用LC/MS/MS测定每个样品中的化合物浓度。计算表观渗透性, Papp。

[0656] 血浆蛋白结合:通过平衡渗析来测量血浆蛋白结合。将每种化合物以2 μ M终浓度加入(spike into)空白血浆中。将加标血浆和磷酸盐缓冲液放入装配好的渗析池的相对侧,然后将其在37 $^{\circ}$ C水浴中缓慢旋转。在孵育结束时,测定血浆和磷酸盐缓冲液中的化合物浓度。使用以下等式计算未结合百分比:

$$[0657] \quad \% \text{ 未结合} = 100 \cdot \left(\frac{C_f}{C_b + C_f} \right)$$

[0658] 其中C_f和C_b是分别按照渗析后缓冲液和血浆浓度测定的游离和结合浓度。

[0659] CYP450分型:在NADPH存在或不存在下,用5种重组人CYP450酶中的每一种孵育每种化合物,所述5种酶包括CYP1A2、CYP2C9、CYP3A4、CYP2D6和CYP2C19。在孵育开始时以及在孵育开始后5、15、30、45和60min,从孵育混合物获取连续样品。通过LC/MS/MS测定孵育混合物中的化合物浓度。通过与孵育开始时的取样相比较来计算孵育后的每个时间点剩余化合物的百分比。

[0660] 在鼠、狗、猴和人血浆中的稳定性:将化合物在血浆(鼠、狗、猴或人)中在37 $^{\circ}$ C下孵育长达2小时。将化合物以1和10 μ g/mL的终浓度加入血浆中。在加入化合物后的0、5、15、30和120min时获取等份试样。通过LC/MS/MS测量每个时间点的化合物和主要代谢物的浓度。生物数据(使用基于Renilla荧光素酶(RLuc)的HCV复制子报告试验-HCV 1b RLuc测定了抗病毒功效[EC₅₀])。

[0661] 生物学实施例1:化合物1和化合物2的组的抗-HCV活性

[0662] 材料和方法

[0663] 化合物1和化合物2由Gilead Sciences(Foster City, CA)合成。

[0664] 细胞系

[0665] 从Reblikon(Mainz, 德国)获得HCV基因型1b复制子细胞(Huh-1uc)。将这些细胞中的复制子称为I389luc-ubi-neo/NS3-3'/ET,并且编码选择抗性标志物(新霉素磷酸转移酶)以及萤火虫荧光素酶报告基因。将Huh-1uc细胞维持于补充了10%胎牛血清(FBS; Hyclone, Logan, UT)和0.5mg/mL G-418(GIBCO)的Dulbecco's改良Eagle's培养基(DMEM;

GIBCO, Carlsbad, CA) 中。将细胞一周传代两次, 并且维持在亚融合(subconfluent)水平。

[0666] EC₅₀测定

[0667] 将复制子细胞以 5×10^3 细胞/孔接种于100 μ L DMEM培养基中, 除去G-418。将化合物1和2在100%DMSO(Sigma)以1:3中连续稀释。将这些连续稀释物以1:200稀释加入细胞中, 以在200 μ L总体积中获得0.5%DMSO的终浓度。将平板在37℃下孵育3天, 此后除去培养基, 裂解细胞, 并使用商业荧光素酶试验(Promega, Madison, WI)测试荧光素酶活性。将药物处理样品中的HCV复制水平表示为未处理对照中那些的百分比(限定为100%), 并且使用XLFit4软件(IDBS, Emeryville, CA), 将数据与逻辑剂量应答等式 $y = a / (1 + (x/b)^c)$ 拟合。按照之前所述的(Delaney, W.E., 等, 抗菌剂化学疗法(Antimicrobial Agents Chemotherapy), 45(6):1705-1713(2001)), 从所得到的等式计算EC₅₀值。

[0668] 抗病毒组合研究

[0669] 将复制子细胞以 5×10^3 细胞/孔接种于96-孔平板中的100 μ L培养基中。按照以上所述的, 将化合物1和2在100%DMSO中连续稀释, 并且以阵列形式加入96-孔平板中, 获得200 μ L终体积和0.5%DMSO终浓度中限定组的不同药物浓度和比例。对于每种单独的药物, 选择EC₅₀值作为用于测试的浓度范围的中点。如上所示, 将细胞孵育三天, 并且用于荧光素酶表达分析。对于组合研究, 将两个独立的实验重复进行三次。

[0670] 组合数据分析

[0671] 使用Prichard和Shipman(Prichard MN, Aseltine KR, Shipman C, Jr., MacSynergy™ II, Version 1.0. University of Michigan, Ann Arbor, Michigan, 1993; Prichard M.N., Shipman C., Jr., Antiviral Res 14(4-5):181-205(1990); Prichard M.N., Shipman C, Jr., Antivir Ther 1(1):9-20(1996); Prichard M.N., et al., Antimicrob Agents Chemother 37(3):540-5(1993))研发的MacSynergy II程序分析数据。该软件计算假定药物之间的加性效应的理论抑制(基于Bliss独立模型), 并且定量理论和观察到的抑制值之间的统计学显著差异。将这些差异作出三维曲线, 形成一个表面, 其中Z-平面中的上升表示抗病毒协同作用, 而下降表示化合物之间的抗病毒拮抗作用。以 $\text{nM}^2\%$ 表示表面偏差(surface deviations)的计算体积。根据Prichard和Shipman, 组合作用定义如下:

[0672] • 如果体积 $>100\text{nM}^2$, 高协同作用。

[0673] • 如果体积 >50 且 $\leq 100\text{nM}^2$, 略有协同作用。

[0674] • 如果体积 $>-50\text{nM}^2$ 且 $\leq 50\text{nM}^2$, 加性。

[0675] • 如果体积 $>-100\text{nM}^2$ 且 $\leq -50\text{nM}^2$, 略有拮抗作用。

[0676] • 如果体积 $\leq -100\text{nM}^2$, 拮抗作用。

[0677] 结果

[0678] 在启动组合实验之前, 测定化合物1和化合物2在Huh1-luc复制子细胞中的EC₅₀值, 并且结果显示于表II中。两种化合物都具有抗病毒作用。

[0679] 表II

[0680] Huh-luc复制子细胞中抗-HCV化合物1和2的各自EC₅₀

	化合物	EC ₅₀ (nM) ^a
[0681]	化合物 1	3 ± 2
	化合物 2	11 ± 3

[0682] ^a EC₅₀表示两个或多个独立实验的平均±标准偏差。

[0683] 测量了化合物1和化合物2的组合物的抗病毒作用,并且使用MacSynergy II分析了所得到的数据,其提供了表面曲线,该曲线呈现出明显偏离加性。统计学显著的偏离加性的定量表示化合物1和2的组合具有-50nM²至50nM²之间的协同/拮抗体积,表明了加性的抗病毒作用如表III中所示。

[0684] 表III

[0685] 化合物1和化合物2的组合物的抗病毒协同和拮抗以及药物相互作用的定量

	结合化合物2使用的药物	协同体积 (nM ²) ^a	拮抗体积 (nM ²) ^a	相互作用
[0686]	化合物 1	13.5 ± 10.5	0.07 ± 0.07	加性

[0687] ^a值表示重复三次进行的两个独立实验的平均±标准偏差。

[0688] 表III中列出的体外实验结果表明化合物2与化合物1结合时具有加性的抗病毒活性。

[0689] 生物学实施例2:与化合物3的组合

[0690] 材料和方法

[0691] 抗病毒化合物

[0692] 化合物1和化合物3由Gilead Sciences(Foster City,CA)合成。病毒唑和IFN-α购自Sigma(St.Louis,MO)。

[0693] 细胞系

[0694] 从Reblikon(Mainz,德国)获得HCV基因型1b复制子细胞(Huh-1uc)。将这些细胞中的复制子称为I3891uc-ubi-neo/NS3-3'/ET,并且编码选择抗性标志物(新霉素磷酸转移酶)以及萤火虫荧光素酶报告基因。将Huh-1uc细胞维持于补充了10%胎牛血清(FBS; Hyclone, Logan, UT)和0.5mg/mL G-418(Invitrogen)的含有GlutaMAX™(Invitrogen, Carlsbad, CA)的Dulbecco's改良Eagle's培养基(DMEM; GIBCO, Carlsbad, CA)中。将细胞一周传代两次,并且维持在亚融合水平。

[0695] EC₅₀测定

[0696] 将复制子细胞以5×10³细胞/孔接种于100μL DMEM加10%FBS培养基中,排除G-418。将化合物1和2以1:3在100%DMSO(Sigma)中连续稀释。将这些连续稀释物以1:200稀释加入细胞中,以在200μL总体积中获得0.5%DMSO的终浓度。将平板在37℃下孵育3天,此后除去培养基,裂解细胞,并使用商业荧光素酶试验(Promega, Madison, WI)测试荧光素酶活性。将药物处理样品中的HCV复制水平表示为未处理对照中那些的百分比(限定为100%),并且使用XLFit4软件(IDBS, Emeryville, CA),将数据与逻辑剂量应答等式 $y = a / (1 + (x/b)^c)$ 拟合。按照之前所述的,从所得到的等式计算EC₅₀值。

[0697] 抗病毒组合研究

[0698] 将复制子细胞以 5×10^3 细胞/孔接种于96-孔平板中的100 μ L培养基中,排除G-418。按照以上所述的,将化合物3和其他化合物在100%DMSO中连续稀释,并且以阵列形式加入96-孔平板中,使得200 μ L终体积和0.5%DMSO终浓度中限定组的不同药物浓度和比例。对于每种单独的药物(除了病毒唑),选择EC₅₀值作为用于测试的浓度范围的中点。对于病毒唑,其不具有选择性抗病毒作用,选择了6.2 μ M的最高剂量,因为这比开始观察到细胞毒性的浓度大约低3倍。如上所示,用药物将细胞孵育三天,并且用于荧光素酶表分析达。对于每个组合研究,将两个独立的实验重复进行三次。

[0699] 组合数据分析

[0700] 使用Prichard和Shipman研发的MacSynergy II程序分析数据。该软件计算假定药物之间的加性效应的理论抑制(基于Bliss独立模型),并且定量理论和观察到的抑制值之间的统计学显著差异。将这些差异作出三维曲线,形成一个表面,其中Z-平面中的上升表示抗病毒协同作用,而下降表示化合物之间的抗病毒拮抗作用。以nM²%表示表面偏差(surface deviations)的计算体积。根据Prichard和Shipman,组合作用定义如下:

- [0701] • 如果体积>100nM²,强协同作用;该协同作用含量在体内是重要的
- [0702] • 如果体积>50且 ≤ 100 nM²,适度协同作用;该协同作用含量在体内是重要的
- [0703] • 如果体积>25且<50nM²,较小协同作用
- [0704] • 如果体积>-25nM²且 ≤ 25 nM²,加性
- [0705] • 如果体积<-25和>-50nM²,较小拮抗作用
- [0706] • 如果体积>-100nM²和 ≤ -50 nM²,适度拮抗作用;该拮抗作用的含量在体内是重要的
- [0707] • 如果体积 ≤ -100 nM²,强拮抗作用;该拮抗作用含量在体内可能是重要的

[0708] 结果

[0709] Huh-1uc复制子细胞中各个化合物的EC₅₀值。

[0710] 在启动组合实验之前,测定每种化合物在Huh-1uc复制子细胞中的EC₅₀值,如表IV中所示。所有化合物都具有抗病毒作用,除了病毒唑,其直至开始显示出细胞毒性的浓度才具有抗病毒活性。

[0711] 表IV

[0712] Huh-1uc复制子细胞中抗-HCV化合物的各自EC₅₀

化合物	EC ₅₀ (nM) ^a
化合物 3	2.3 $\pm$ 2.6
IFN- α	0.105 $\pm$.003 (U/mL) ^b
病毒唑	> 12,500
化合物 1	0.4 $\pm$ 0.14

[0714] ^aEC₅₀表示两个或多个单独实验的平均 $\pm$ 标准偏差。

[0715] ^b IFN- α EC₅₀以单位(U)/毫升(mL)来表示,替代纳摩尔浓度。

[0716] 组合抗病毒作用和药物相互作用

[0717] 测试了化合物3结合IFN-α、病毒唑和化合物1时的抗病毒作用。使用MacSynergy II分析了所得到的数据,其提供了表面曲线,该曲线呈现出明显偏离加性。统计学显著的偏离加性的定量表示化合物3与IFN-α的结合导致较小协同作用(分别为32和36.5nM²的协同体积;表V)。化合物3与非-核苷NS5B抑制剂化合物1的组合产生了14.5nM²的协同体积,这表明加性的抗病毒相互作用。结合化合物3时,没有一种化合物产生了在加性范围(>-25nM²)外的抗病毒拮抗作用体积,如表V中所示。

[0718] 表V

[0719] 与化合物3的药物组合的抗病毒协同作用和拮抗作用以及药物相互作用的定量

	结合化合物 3 使用的药物	协同作用体积 (nM ²) ^a	拮抗作用体积 (nM ²) ^a	相互作用
[0720]	IFN-α	32 ± 4.2	0.15 ± 0.2	较小协同作用
	病毒唑	54 ± 14.1	1.6 ± 2.3	适度协同作用
	化合物 1	14.5 ± 0.7	4.22 ± 5.0	加性

[0721] ^a值表示重复三次进行的两个独立实验的平均±标准偏差

[0722] 这些体外抗病毒组合实验表明新的HCV NS3蛋白酶抑制剂化合物3与IFN-α组合时具有较小协同作用,与病毒唑组合时具有适度协同作用。这些结果表明在HCV病人中,化合物3可以潜在地结合目前的医疗标准(PEG-IFN-α加病毒唑)使用,以获得增强的病毒载量抑制,而没有降低任一种单独药物的功效。化合物3和非核苷(化合物1)NS5B聚合酶抑制剂(化合物1)的组合获得了加性作用。这些结果表明化合物3也适用于在病人中探究包含多种类别的特异性HCV抑制剂的药物组合。

[0723] 生物学实施例3:化合物4组合

[0724] 材料和方法

[0725] 抗-HCV剂

[0726] 化合物1、化合物2、化合物3、化合物4、化合物5和化合物6由Gilead Sciences (Foster City,CA)合成。嘌呤霉素、IFN-α和病毒唑购自Sigma(St.Louis,MO)。钙黄绿素AM购自Anaspec(Fremont,CA)。

[0727] 细胞系和细胞培养物

[0728] 之前描述了用于该研究中的HCV基因型1a复制子细胞系。将所述细胞生长于补充了10%FBS(Hyclone,Logan,UT,Cat#SH30071/03)、100单位/mL青霉素、100μg/mL链霉素(Gibco,Carlsbad,CA,Cat#15140-122)和0.1mM非必需氨基酸(Gibco,Carlsbad,CA,Cat#11140-050)的含有GlutaMAX(Gibco,Carlsbad,CA,Cat#10569-044)的Dulbecco's改良Eagle's培养基(DMEM;GIBCO,Carlsbad,CA)中。将复制子细胞维持于0.5mg/mL Geneticin (Invitrogen,Carlsbad,CA,Cat#10131-035)中,以防止HCV复制子的丢失。在达到融合前,将细胞每3-4天传代一次。

[0729] 用于EC₅₀、CC₅₀测定和组合研究的HCV复制子试验

[0730] 在100%DMSO中供给所有化合物,除了IFN-α,将其在制造商指定的缓冲液(Sigma, St.Louis,MO,Cat#I4276)中供应。在100%DMSO中进行化合物连续稀释,除了IFN-α,将其在

部分3.2中描述的细胞培养基中连续稀释。使用Biomek FX工作台,在384-孔聚丙烯平板(Thermo Scientific,Hudson,NH,Cat#4341)中进行所有连续稀释。对于EC₅₀和CC₅₀测定,在384-孔平板的柱3-20中,在1:3稀释的十个步骤中,连续稀释测试化合物。对于组合研究,一种化合物在1:2稀释的九个步骤中朝向水平方向稀释,而另一种化合物在1:2稀释的七个步骤中朝向垂直方法稀释。这获得了限定组的不同药物浓度和比例。对于每种单独的药物,选择EC₅₀值作为用于测试的浓度范围的中点。每种化合物在相同的384-孔平板中重复四次进行所有连续稀释。将100%DMSO加入每个连续稀释384-孔平板的柱1-2中。将100μM的HCV蛋白酶抑制剂ITMN-191作为HCV复制的100%抑制的对照加入柱23中,而将10mM的嘌呤霉素作为100%细胞毒性的对照加入柱24中。

[0731] 向黑色聚苯乙烯384-孔平板(Greiner Bio-one,Monroe,NC,Cat#781086,处理过的细胞培养物)的每个孔中,使用BiotekμFlow工作台加入90μL含有2000个悬浮HCV复制子细胞的细胞培养基(不含genetin)。对于化合物转移至细胞培养平板中,在Biomek FX工作台上,将来自化合物连续稀释平板的0.4μL化合物溶液转移至细胞培养平板中。最终试验孔中的DMSO浓度为0.44%。将平板在37℃下用5%CO₂和85%湿度孵育3天。

[0732] HCV复制子试验是多重试验,其可以从相同的孔同时测定细胞毒性和抗-复制子活性。首先进行CC₅₀试验。吸出384-孔细胞培养平板中的培养基,并且使用Biotek ELX405平板洗涤机,每个用100μL 1×PBS洗涤四次。使用BiotekμFlow工作台,将50μL体积的在1×PBS中含有400nM钙黄绿素AM(Anaspec,Fremont,CA,Cat#25200-056)的溶液加入平板的每个孔中。将平板在室温下孵育30分钟,接着使用Perkin Elmer Envision平板阅读器测量荧光信号(激发490nm,发射520nm)。

[0733] 在CC₅₀试验的相同孔中进行EC₅₀试验。用Biotek ELX405平板洗涤机吸出384-孔细胞培养平板中钙黄绿素-PBS溶液。使用BiotekμFlow工作台,将20μL体积的Dual-Glo荧光素酶缓冲液(Promega,Madison,WI,Cat#E298B)加入平板的每个孔中。将平板在室温下孵育10分钟。然后,使用BiotekμFlow工作台,将20μL体积的含有1:100Dual-Glo Stop&Glo底物(Promega,Madison,WI,Cat#E313B)和Dual-Glo Stop&Glo缓冲液(Promega,Madison,WI,Cat#E314B)混合物的溶液加入平板的每个孔中。然后将平板在室温下孵育10分钟,接着使用Perkin Elmer Envision平板阅读器测量荧光信号。

[0734] 数据分析

[0735] 通过钙黄绿素AM转化成荧光产物来测定细胞毒性作用。通过等式1来计算百分比细胞毒性:

$$[0736] \quad \% \text{ 细胞毒性或}\% \text{ 抑制} = 100 \times \left(1 - \frac{X_c - M_B}{M_D - M_B} \right) \quad (1)$$

[0737] 其中X_c是来自化合物处理的孔的荧光信号;M_B是来自嘌呤霉素处理的孔的平均荧光信号;M_D是来自DMSO-处理的孔的平均荧光信号。通过从HCV复制子的报告renilla荧光素酶产生的发光信号来测定抗-HCV复制活性。使用等式1计算对HCV复制子的百分比抑制,其中X_c是来自化合物处理的孔的发光信号;M_B是来自ITMN-191-处理的孔的平均发光信号;M_D是来自DMSO-处理的孔的平均发光信号。

[0738] 按照引起细胞生活力50%降低的测试化合物浓度来测定CC₅₀值。按照引起HCV复制50%降低的测试化合物浓度来测定EC₅₀值。通过将实验数据非线性回归拟合至等式2,使用

Pipeline Pilot 5.0软件包(Accelrys, San Diego, CA), 获得了CC₅₀和EC₅₀:

$$[0739] \quad y = d + \frac{a-d}{[1+(\frac{x}{c})^b]} \quad (2)$$

[0740] 其中y是在x化合物浓度下观察到的HCV复制子的%抑制;d是在零化合物浓度下估算的应答;a是在无限化合物浓度下估算的应答;c是中间单位浓度(CC₅₀或EC₅₀);b是Hill斜率因数。

[0741] 使用Prichard和Shipman研发的MacSynergy II程序分析了组合研究实验数据。软件(MacSynergy™ II, University of Michigan, MI)计算假定药物之间的加性效应的理论抑制(基于Bliss独立模型), 并且定量理论和观察到的抑制值之间的统计学显著差异。将这些差异作出三维曲线, 形成一个表面, 其中Z-平面中的上升表示抗病毒协同作用, 而下降表示化合物之间的抗病毒拮抗作用。以nM²%表示表面偏差(surface deviations)的计算体积。根据Prichard和Shipman, 组合作用定义如下:

- 强协同作用: >100 nM²%
- 适度协同作用: >50 且 ≤100 nM²%
- [0742] • 较小协同作用: >25 且 ≤50 nM²%
- 加性: ≤25 且 >-25 nM²%
- 较小拮抗作用: ≤-25 且 >-50 nM²%
- [0743] • 适度拮抗作用: ≤-50 且 >-100 nM²%
- 强拮抗作用: ≤-100 nM²%

[0744] 对于每个组合研究, 在每个实验中使用四次重复进行了三个独立实验。

[0745] 结果

[0746] HCV基因型1a复制子试验中单个化合物的抗病毒活性和细胞毒性。

[0747] 在携带HCV基因型1a复制子的Huh-7细胞中测试了化合物4和其他化合物的抗-HCV活性和细胞毒性。EC₅₀和CC₅₀值列于表VI中。直至测试的最高浓度, 所有化合物没观察到明显的细胞毒性。

[0748] 表VI

[0749] 该研究中使用的化合物相对HCV基因型1a复制子的EC₅₀和CC₅₀

[0750]

化合物	EC ₅₀ ^a (nM)	CC ₅₀ ^a (nM)
化合物 1	19 ± 8	>44400
化合物 2	496 ± 135	>22200
化合物 3	49 ± 18	>22200
化合物 4	201 ± 74	>44400
化合物 5	15 ± 2.4	>44400
化合物 6	0.033 ± 0.011	>44400
IFN-α	1.4 ± 0.3 ^b	>50 ^b
病毒唑	36482 ± 17507	>88800

[0751] ^a值是三个或更多个独立实验的平均±标准偏差[0752] ^b IFN-α值以单位(U)/毫升(mL)来表示,替代纳摩尔浓度

[0753] 化合物4结合其他类别的抗-HCV剂的抗病毒活性和细胞毒性。

[0754] 使用HCV基因型1a复制子评价了化合物4结合其他抗-HCV化合物的抗病毒作用。使用MacSynergy II分析了结果,其提供了表面曲线,其呈现出显著偏离加性。表VII中概括了从加性表面偏离计算的协同作用和拮抗作用体积(nM²%)。在95%置信区间,当化合物4与IFN-α、化合物2和化合物6结合时,平均协同作用和拮抗作用体积在25至-25nM²%之间,表示了这些化合物的加性效。此外,化合物4与化合物1、化合物5或化合物3结合时,显示出25至50nM²%的协同作用体积,表明了较小的协同相互作用。

[0755] 表VII

[0756] 与化合物4的药物组合的抗病毒协同作用和拮抗作用以及药物相互作用的定量

[0757]

结合化合物 4 使用的药物	协同作用体积 (nM ² %) ^a	拮抗作用体积 (nM ² %) ^a	相互作用
化合物 1	34 ± 26	-1 ± 2	较小协同作用
化合物 2	22 ± 14	-2 ± 3	加性
化合物 3	26 ± 6	-3 ± 2	较小协同作用
化合物 5	26 ± 28	-1 ± 3	较小协同作用
化合物 6	19 ± 17	-7 ± 7	加性
IFN-α	12 ± 6	0 ± 0	加性
病毒唑	1 ± 1	-43 ± 20	较小协同作用

[0758]

[0759] 值表示重复四次进行的三个独立实验的平均±标准偏差

[0760] 在所有组合研究中,在所有浓度比例下,细胞生活力高于85%,并且所有药物组合显示出对细胞毒性的加性作用,如表VIII中所示。

[0761] 表VIII

[0762] 与化合物4的药物组合的细胞毒性协同作用和拮抗作用以及药物相互作用的定量

	协同作用体积 (nM ² %) ^a	拮抗作用体积 (nM ² %) ^a	相互作用
结合化合物 4 使用的药物			
化合物 1	13 ± 11	0 ± 1	加性
化合物 2	17 ± 14	0 ± 0	加性
[0763] 化合物 3	3 ± 5	0 ± 0	加性
化合物 5	15 ± 8	-10 ± 7	加性
化合物 6	8 ± 4	0 ± 0	加性
IFN-α	8 ± 12	-7 ± 13	加性
病毒唑	4 ± 3	-1 ± 2	Additivity

[0764] ^a值表示重复四次进行的三个独立实验的平均±标准偏差

[0765] 然而,化合物4与病毒唑结合时,显示出-43nM²%的拮抗作用体积,表明较小的拮抗相互作用。

[0766] 表IX

[0767] 与病毒唑的药物组合的细胞毒性协同作用和拮抗作用以及药物相互作用的定量

	协同作用体积 (nM ² %) ^a	拮抗作用体积 (nM ² %) ^a	相互作用
结合病毒唑使用的药物			
[0768] 化合物 4	4 ± 3	-1 ± 2	加性

[0769] ^a值表示重复四次进行的三个独立实验的平均±标准偏差

[0770] 显示出与化合物4最高拮抗作用的病毒唑浓度大约为0.5至1μM,其低于以800mg/天剂量的人体中观察到的病毒唑的稳态血浆浓度(6-11μM)低大约10倍。在该病毒唑的生理学浓度(6-11μM)下,在宽范围的化合物4浓度(0-0.44μM)下,病毒唑和化合物4之间的拮抗相互作用最小。因此,在体外复制子系统中观察到的病毒唑和化合物4之间的最小拮抗作用不可能具有临床意义。

[0771] 结论

[0772] 测试了化合物4(在非对映异构体混合物中)结合目前的治疗标准(IFN-α/病毒唑),以及Gilead Sciences'内部研发候选物化合物1和化合物5(非核苷NS5B抑制剂)、化合物2和化合物3(NS3蛋白酶抑制剂)和化合物6(NS5A抑制剂)的抗病毒活性。如表VIII中概括的,化合物4显示出结合IFN-α、化合物2和化合物6的加性抗病毒活性,以及结合化合物1、化合物5和化合物3的较小协同作用。

[0773] 化合物4与病毒唑的组合在0.5至1μM的病毒唑浓度下导致较小协同作用,该病毒唑浓度大约低于人血浆中稳态生理学浓度(6-11μM)的10倍。在临床上相关的病毒唑浓度下,两种化合物之间的拮抗相互作用可以忽略。

[0774] 生物学实施例4:化合物5组合

[0775] 在GT-1b Huh-1unet细胞中,结合内部研发化合物化合物1、化合物2和化合物3(NS3蛋白酶抑制剂)、化合物6(NS5A抑制剂)、化合物4(C-nuc NS5B抑制剂)以及还有批准的HCV治疗剂PEG-IFN-α和病毒唑,测试了化合物的抗病毒活性(使用基本上与用于化合物4的试验中的相同方法)。使用MacSynergy II软件,基于Bliss独立模型,分析了组合数据,组合

试验的结果表示为在95%置信下从重复三次进行的两个独立实验计算的平均协同作用和拮抗作用体积(nM²)。

- [0776] 组合作用如下限定：
- [0777] • 如果体积>100nM²,强协同作用;该协同作用的含量在体内可能是重要的
 - [0778] • 如果体积>50且≤100nM²,适度协同作用;该协同作用的含量在体内是重要的
 - [0779] • 如果体积>25且<50nM²,较小协同作用
 - [0780] • 如果体积>-25且≤25nM²,加性
 - [0781] • 如果体积<-25且>-50nM²,较小拮抗作用
 - [0782] • 如果体积>-100nM²且≤-50nM²,适度拮抗作用;该拮抗作用的含量在体内是重要的
 - [0783] • 如果体积≤-100nM²,强拮抗作用;该拮抗作用的含量可能在体内是重要的
- [0784] 变构NS5B抑制剂化合物1和化合物5的组合在复制子试验中导致适度协同作用。使用其他HCV抑制剂(包括PEG-IFN-α和病毒唑)的研究揭示了最小协同的相互作用的加性。
- [0785] 表X
- [0786] 化合物5结合其他抗-HCV药物在Huh-1uc复制子细胞中的抗病毒作用

	结合化合物 5 使用的药物	协同作用体积 (nM ²) ^a	拮抗作用体积 (nM ²) ^a	相互作用
[0787]	化合物 1	70 ± 26	0 ± 0	适度协同作用
	化合物 2	22 ± 12	-7 ± 7	加性
	化合物 3	19 ± 13	-2 ± 2	加性
	化合物 4	26 ± 28	-1 ± 3	较小协同作用
	化合物 6	34 ± 19	0 ± 0	较小协同作用
	PEG-IFN-α	31 ± 23	-2 ± 4	较小协同作用
	病毒唑	12 ± 8	-12 ± 9	加性

- [0788] ^a值是重复三次进行的两个独立实验的平均±标准偏差
- [0789] 生物学实施例5:化合物6,组合
- [0790] 材料和方法
- [0791] 化合物
- [0792] 化合物1、化合物2、化合物3、化合物6和化合物7由Gilead Sciences(Foster City,CA)合成。IFN-α和病毒唑购自Sigma(St.Louis,MO)。
- [0793] 细胞系
- [0794] 从Reblikon(Mainz,德国)获得HCV基因型1b复制子细胞(Huh-1uc)。将这些细胞中的复制子称为I389luc-ubi-neo/NS3-3'/ET,并且编码选择抗性标志物(新霉素磷酸转移酶)以及萤火虫荧光素酶报告基因。将Huh-1uc细胞维持于补充了10%胎牛血清(FBS; Hyclone, Logan, UT)、1×青霉素/链霉素、1×非必需氨基酸和0.5mg/mL G-418(全部来自Invitrogen, Carlsbad, CA)的Dulbecco's改良Eagle's培养基GlutaMax(DMEM; Invitrogen,

Carlsbad, CA) 中。将细胞一周传代两次, 并且维持在亚融合水平。

[0795] 试验

[0796] HCV Huh-1uc 复制子细胞中的抗病毒活性试验

[0797] 将复制子细胞以 7×10^3 细胞/孔的密度接种于 96-孔平板中的 100 μ L DMEM 培养基中, 排除 G-418。将化合物以 1:2 在 100% DMSO 中连续稀释。将连续稀释物以 1:200 稀释加入细胞中, 以获得 200 μ L 总体积中 0.5% DMSO 的终浓度。将平板在 37°C 下孵育 3 天, 此后除去培养基, 裂解细胞, 并且使用商业荧光酶试验 (Promega, Madison, WI) 测试其荧光素酶活性。

[0798] 抗病毒组合研究

[0799] 将复制子细胞以 7×10^3 细胞/孔的密度接种于 96-孔平板中的 100 μ L DMEM 培养基中, 排除 G-418。将化合物 6 和其他化合物以 1:2 在 100% DMSO 中连续稀释, 并且以阵列形式加入 96-孔平板中, 获得 200 μ L 终体积和 0.5% DMSO 终浓度中限定组的不同药物浓度和比例。对于每种单独的药物, 选择 EC_{50} 值作为用于测试的浓度范围的中点。将细胞孵育 3 天, 并且使用商业荧光酶试验 (Promega) 分析荧光素酶表达。对于每个组合研究, 将两个独立的实验重复进行三次。

[0800] 细胞细胞毒性测定

[0801] 按照以上对抗病毒组合研究所述的, 接种复制子细胞, 并且用药物处理。在 37°C 下孵育 3 天后, 除去培养基, 裂解细胞, 并根据制造商的说明, 使用 CellTiter-Glo 发光细胞活力试验 (Promega) 测试细胞毒性。将相对光单位转化成相对于未处理对照 (限定为 100%) 的百分比。

[0802] 数据分析

[0803] EC_{50} 计算

[0804] 按照 EC_{50} 试验, 将药物处理过的样品中的荧光素酶水平表示为未处理对照 (限定为 100%) 中那些的百分比。使用 XLfit4 软件 (IDBS, Emeryville, CA), 通过复制数据集的非线性回归分析来计算 EC_{50} 值。

[0805] 抗病毒协同作用和拮抗作用的计算

[0806] 按照组合试验, 将药物处理过的样品中的荧光素酶水平表示为未处理对照 (限定为 100%) 中那些的百分比。然后使用 Prichard 和 Shipman 研发的 MacSynergy II 程序来分析复制数据集。软件 (MacSynergyTMII, University of Michigan, WI) 计算假定药物之间的加性效应的理论抑制 (基于 Bliss 独立模型), 并且定量理论和观察到的抑制值之间的统计学显著差异。将这些差异作出三维曲线, 形成一个表面, 其中 Z-平面中的上升表示抗病毒协同作用, 而下降表示化合物之间的抗病毒拮抗作用。以 $nM^2\%$ 表示表面偏差 (surface deviations) 的计算体积。根据 Prichard 和 Shipman, 组合作用定义如下:

- [0807] • 如果体积 $>100nM^2$, 强协同作用; 该协同作用的含量可能在体内是重要的
- [0808] • 如果体积 >50 且 $\leq 100nM^2$, 适度协同作用; 该协同作用的含量在体内是重要的
- [0809] • 如果体积 >25 且 $<50nM^2$, 较小协同作用
- [0810] • 如果体积 $>-25nM^2$ 且 $\leq 25nM^2$, 加性
- [0811] • 如果体积 $>-100nM^2$ 且 $\leq -50nM^2$, 适度拮抗作用; 该拮抗作用的含量在体内是重要的
- [0812] • 如果体积 $\leq -100nM^2$, 强拮抗作用; 该拮抗作用的含量可能在体内是重要的

[0813] 结果

[0814] 各个化合物在Huh-1uc复制子细胞中的抗病毒活性。

[0815] 在启动组合实验之前,在Huh-1uc复制子细胞中测定单个化合物的抗病毒活性。使用所有七种化合物观察到与历史结果相一致的EC₅₀值。

[0816] 表XI

[0817] 抗-HCV化合物在Huh-1uc复制子细胞中的各自EC₅₀值

化合物	EC ₅₀ (nM) ^a
IFN-α ^b	0.05 U/ml ± 0.04
病毒唑	> 12 ± 2.4
化合物 1	0.96 ± 0.39
化合物 2	5.0 ± 0.0
化合物 3	3.0 ± 1.2
化合物 6	0.0018 ± 0.0007
化合物 7	1245 ± 341

[0819] ^aEC₅₀表示单个或多个独立实验的算术平均±标准偏差。

[0820] ^b IFN-αEC₅₀以单位(U)/毫升(mL)来表示,替代纳摩尔浓度。

[0821] 组合抗病毒作用和药物相互作用

[0822] 使用HCV 1b复制子系统评价了化合物6结合其他HCV抑制剂的抗病毒作用。使用MacSynergy II分析了所得到的数据,其提供了呈现出显著偏离加性的表面曲线。来自两个独立实验的统计学上显著偏离加性的定量概括于表XII中。化合物6与IFN-α或化合物1的组合分别导致32和34nM²的协同作用体积,表明较小协同作用。病毒唑、化合物2和化合物7结合化合物6时,分别产生61、52和51的协同作用体积,表明化合物6和这三种HCV抑制剂之间的适度协同相互作用。化合物6与化合物3的组合导致132nM²%的协同作用体积,表示强协同抗病毒相互作用。结合化合物6时,没有一种化合物产生加性范围(>-25nM)外的抗病毒拮抗作用体积。

[0823] 表XII

[0824] 与化合物6结合的药物组合的抗病毒协同作用和拮抗作用以及药物相互作用的定量

结合化合物 6 中使用的药物	协同作用体积 (nM ²) ^a	拮抗作用体积 (nM ²) ^a	相互作用
IFN-α	32 ± 1.4	0.0 ± 0.0	较小协同作用
病毒唑	61 ± 0.5	-0.5 ± 0.1	适度协同作用
化合物 1	34 ± 9.9	-17 ± 0.7	较小协同作用
化合物 2	52 ± 5.1	-0.7 ± 0.7	适度协同作用
化合物 3	132 ± 44	-0.1 ± 0.2	强协同作用
化合物 7	51 ± 7.8	-0.2 ± 0.1	适度协同作用

[0826] ^a值表示重复三次进行的两个独立实验的算术平均±标准偏差。

[0827] 结合其他HCV抑制剂的化合物6的细胞生活力百分比

[0828] 为了确保抗病毒组合结果不受组合细胞毒性的混淆,使用抗病毒试验中测试的相同化合物浓度平行地研究了细胞毒性(表XIII)。对于所有化合物,对于在测试最高浓度的组合,细胞生活力至少为未处理对照的98%。因此,不管是单独的测试化合物6,或是结合这些药剂,都没有观察到显著的体外细胞毒性。

[0829] 表XIII

[0830] Huh-luc复制子细胞中化合物6、组合的细胞生活力百分比

[0831]	化合物	浓度(s) (nM)	细胞生活力% ^a
	化合物 6	0.014	99 ± 1
	化合物 6 + IFN- α^b	0.014 + 0.8	102 ± 3
	化合物 6 + 病毒唑	0.014 + 8000	105 ± 4
	化合物 6 + 化合物 1	0.014 + 4.0	99 ± 3
	化合物 6 + 化合物 2	0.014 + 24.0	103 ± 3
	化合物 6 + 化合物 3	0.014 + 12.8	104 ± 4
	化合物 6 + 化合物 7	0.014 + 8800	103 ± 3

[0832] ^a细胞生活力%表示重复三次进行的至少两个独立实验的算术平均±标准偏差。

[0833] ^b IFN- α EC₅₀以单位(U)/毫升(mL)来表示,替代纳摩尔浓度。

[0834] 结论

[0835] 这些体外实验结果表明化合物6结合IFN- α 或非核苷NS5B聚合酶抑制剂化合物1时具有较小抗病毒协同作用。化合物6与病毒唑、NS3蛋白酶抑制剂化合物2或核苷NS5B聚合酶抑制剂化合物7的组合导致适度抗病毒协同作用。在化合物6和NS3蛋白酶抑制剂化合物3之间观察到了强抗病毒协同作用。在测试这些药物组合时,没有鉴定出显著的体外细胞毒性。这些结果表明化合物6,可以合理地结合目前的治疗标准。

[0836] 生物学实施例6:

[0837] 化合物

[0838] 化合物1、化合物3、化合物4和化合物6由Gilead Sciences(Foster City,CA)合成。

[0839] 细胞系

[0840] 从Reblikon(Mainz,德国)获得HCV基因型1b复制子细胞(Huh-luc)。将这些细胞中的复制子称为I389luc-ubi-neo/NS3-3'/ET,并且编码选择抗性标志物(新霉素磷酸转移酶)以及萤火虫荧光素酶报告基因。将Huh-luc细胞维持于补充了10%胎牛血清(FBS; Hyclone,Logan,UT)、1×青霉素/链霉素、1×非必需氨基酸和0.5mg/mL G-418(全部来自Invitrogen,Carlsbad,CA)的Dulbecco's改良Eagle's培养基GlutaMax(DMEM;Invitrogen,Carlsbad,CA)中。将细胞一周传代两次,并且维持在亚融合水平。

[0841] 试验

[0842] 在6天处理时间内抑制复制子RNA 1-1.5log需要的化合物浓度的测定

[0843] 将基因型1b复制子细胞以 2.5×10^5 细胞/烧瓶的细胞密度接种于T-75烧瓶中,排除G418。将化合物以可变浓度单独加入细胞中:以1pM、2pM、4pM、6pM、8pM或12pM的浓度加入化合物6。以125nM、250nM、375nM、500nM或1000nM加入化合物4,以1.25nM、2.5nM、5nM、2.75nM或10nM加入化合物1,而以3.75nM、7.5nM、11.25nM、15nM、30nM或60nM的浓度加入化

合物3。将烧瓶在37℃下孵育,并且每两天更新培养基和化合物。孵育6天后,收集复制子细胞,用于RNA提取和复制子RNA QRT-PCR分析。

[0844] 化合物组合复制子治愈试验

[0845] 将基因型1b复制子细胞以 2.5×10^5 细胞/烧瓶的密度接种于T-75烧瓶中。以以下浓度将化合物加入T-75烧瓶中:4pM的化合物6、1000nM的化合物4、10nM的化合物1和26.25nM的化合物3。将烧瓶在37℃下孵育,并且每两天更新化合物和培养基。所有实验重复进行两次,并且将标注为烧瓶1和烧瓶2。在第6天,从烧瓶1收集所有细胞,用于RNA提取,接着HCV复制子特异性QRT-PCR分析,而将来自烧瓶2的细胞在G418的存在下重新涂布于10cm组织培养皿上,持续14天,以记录未治愈复制子细胞的群体形成。

[0846] QRT-PCR试验

[0847] 按照制造商的实验方案,用RiboPure试剂盒(AM1924Life Technologies Corporation Carlsbad,CA)提取总RNA。将提取的RNA样品存储在-80℃,直至使用。对于定量RT-PCR试验,根据制造商的实验方案(Qiagen,Valencia CA),使用Qiagen一步QRT-PCR试剂盒。基因型1b HCV NS3基因特异性引物,正向引物NS3_180FL5'-CGGCGGACTGTCTATCATGGTGC[FAM]G-3'(SEQ ID NO:1)和反向NS3_1805'-GGTCCTGGTCCACATTGGTGT-3'(SEQ ID NO:2)以及18S rRNA LUX™[FAM]内源性对照引物组(115HM-01)由Invitrogen公司(Carlsbad,CA)生产。对于逆转录酶步骤,将反应在44℃下孵育30min,然后通过将样品加热至94℃持续10min来降解逆转录酶。Q-PCR步骤包括94℃15s和58℃30s的38个循环。

[0848] 结果

[0849] 在启动组合复制子治愈实验前,测定了化合物6、化合物4、化合物1和化合物3抑制基因型1b复制子RNA 1-1.5log需要的化合物浓度。复制子RNA log下降是相对于维持了6天的DMSO对照处理的复制子细胞中的RNA水平。

[0850] 表XIV

[0851] 单个化合物剂量在6天试验中能够诱导复制子RNA 1-1.5log下降

[0852]	化合物	复制子 RNA log 下降	化合物浓度(nM)
	化合物 1	-1.0	10
[0853]	化合物 3	-0.9	26.25
	化合物 4	-1.2	1000
	化合物 6	-1.4	0.004

[0854] 组合基因型1b复制子治愈试验

[0855] 在6天试验中测定了化合物化合物6、化合物4、化合物1和化合物3作为单独化合物以及各种双重、三重和四重组合的复制子RNA抑制。复制子RNA log下降是相对于处理烧瓶旁边维持了6天的DMSO对照处理的复制子细胞中的RNA水平。通过群体形成测定了各种化合物组合治愈来自HCV复制子的细胞的能力。除去在化合物处理后发生的群体形成并且将G418压力恢复14天。如果化合物组合完全治愈了来自HCV复制子的细胞群,将没有集落产生,因为细胞缺乏对G418的抗性。

[0856] 表XV

[0857] 化合物组合在复制子治愈试验中的定量

[0858]

化合物	复制子RNA log下降	未治愈集落数
化合物6	-1.4	634
化合物4	-1.2	1054
化合物1	-1.0	657
化合物3	-0.9	989
化合物4+化合物6	-2.67	15
化合物1+化合物4	-2.022	14
化合物3+化合物4	-2.26	23
化合物1+化合物6	-2.3	148
化合物3+化合物6	-2.62	13
化合物1+化合物3	-1.8	113
化合物1+化合物4+化合物6	-2.66	0
化合物3+化合物4+化合物6	-2.71	0
化合物1+化合物3+化合物4	-2.69	0
化合物1+化合物3+化合物6	-2.69	0
化合物1+化合物3+化合物4+化合物6	-2.71	0
DMSO(0.2%以匹配四重组合)	0	6330

[0859] 结论

[0860] 这些体外实验的结果表明两种化合物的组合提高了在6天治疗中病毒RNA log下降,并且提高了治愈的复制子细胞的比率。化合物6与化合物4或化合物3的双重组合与所有其他双重化合物组合相比导致较大的复制子RNA log抑制和最低数量的未治愈集落。三种或四种化合物的组合治愈了所有复制子细胞并且组合治疗将复制子RNA水平抑制至试验检测极限。

[0861] 生物学实施例7:化合物10和化合物6交叉抗性

[0862] 进行该研究来确定化合物10和化合物6的体外交叉抗性谱。通过瞬时复制子试验来研究一组带有印记NS5B核苷HCV抗药性突变S282T或最常见的体外和体内NS5A HCV抗药性突变的HCV突变复制子,以确定在赋予降低的对化合物10或化合物6的易感性的突变之间是否存在交叉抗性。在这些化合物之间没有观察到交叉抗性,S282T突变复制子保持对化合物6的完全易感,且NS5A突变体显示出对化合物10的易感性没有降低。

[0863] 材料和方法

[0864] 试剂

[0865] 化合物

[0866] 化合物6和化合物10在Foster City,CA的Gilead Sciences,Inc合成。

[0867] 细胞系

[0868] 从ReBLikon GmbH(Mainz,德国)获得Huh-1unet,其是对HCV复制高度许可的Huh-7克隆。将Huh-1unet细胞维持于补充了10%胎牛血清(FBS;Hyclone,Logan,UT)的Dulbecco's改良Eagle's培养基(DMEM;GIBCO,Carlsbad,CA)中。将细胞在潮湿的培养器(85%湿度)中在37℃和5%CO₂气氛下维持。

[0869] 将PI-hRluc(编码脊髓灰质炎IRES下游的Renilla荧光酶基因和EMCV IRES下游的基因型1b(Con-1株系)HCV非结构基因(NS3-NS5B)的双顺反子复制子)用于瞬时转染研究。从质粒pFKI341PI-Luc/NS3-3'/ET(其编码基因型1b(Con-1株系)亚基因组复制子并且获自ReBLikon)产生质粒pPI-hRluc(Friebe等,J Virol 2001;75(24):12047-57)。使用Accuprime Super Mix I(Invitrogen,Carlsbad,CA)和引物PV_Rluc_Top and 3'-Rluc(NotI),通过PCR,从pF9CMV hRluc-neo Flexi(R)(Promega,Madison,WI)PCR扩增hRluc基因。这两个引物具有以下序列并携带用于随后克隆的限制性位点:PV_Rluc_Top:5' ATC AGA CAA TTG TAT CAT AAT GGC TTC CAA GGT GTA CG 3'(SEQ ID NO:3);3'-Rluc(NotI):5' ACG TCA CTA TCT ACG CGG CCG CTT ACT GCT CGT TCT TC3'(NotI位点下划线)(SEQ ID NO:4)。使用引物5'-P7(SbfI)和PV_Rluc_Bottom,从质粒pFKI341PI-Luc/NS3-3'/ET PCR扩增T7启动子、5'UTR和脊髓灰质炎病毒IRES。这两个引物具有以下序列并且携带用于随后克隆的限制性位点:5'-P7(SbfI):5'CAA GCT AAG CTG CCT GCA GG T 3'(SbfI位点下划线)(SEQ ID NO:5);PV_Rluc_Bottom:5'CGT ACA CCT TGG AAG CCA TTA TGA TAC AAT TGT CTG AT(SEQ ID NO:6)。然后使用重叠PCR以及引物5'-P7(SbfI)和3'-Rluc(NotI),将随后来自两个上述反应的PCR片段连接在一起。将完成的P7-5'UTR-脊髓灰质炎病毒IRES-hRluc扩增产物亚克隆至pCR2.1-TOP0中。用SbfI和NotI消化所得到的质粒,并且使用T4DNA连接酶,将切除的片段(P7-5'UTR-脊髓灰质炎病毒IRES-hRluc)连接至用相同的酶消化的pFKI341PI-Luc/NS3-3'/ET中。将所得到的载体pPI-hRluc测序,以证实正确的方向和质粒的P75'UTR-脊髓灰质炎病毒IRES-hRluc区的序列。

[0870] 之前已经描述了含有hRluc的GT 1a和2a复制子(Robinson M,Yang H,Sun SC,Peng B,Tian Y,Pagratitis N等.Novel HCV Reporter Replicon Cell Lines Enable Efficient Antiviral Screening against Genotype 1a.Antimicrob Agents Chemother 2010)。

[0871] 将PI-hRluc复制子用作用于嵌合构建的骨架。内部缺失在NS5B中进行使其不能复制。用来自基因型2b、3a、4a、5a和6a(Genscript Inc.Piscataway NJ)的NS5B序列在框内合成1b-con-1NS5A的末尾413个碱基对(编码末尾137个NS5A氨基酸)。通过排列欧洲HCV数据库中保藏的序列并提取共有序列,来产生用于这些基因型中的每一个的共有NS5B序列。将这些用于NS5B的新的共有序列以及源自单个临床分离物的序列(Herlihy等,Antimicrob Agents Chemother 2008;52(10):3523-31)用于构建NS5B嵌合复制子。在5'端使用了唯一的XhoI位点,并且在3'端使用了唯一的AseI位点,以通过标准分子生物学技术定向地克隆至1b-hRluc/NeoR NS5B载体中。

[0872] 根据制造商(Stratagene,La Jolla,CA)的说明,使用QuikChange II XL诱变试剂盒,将NS5B S282T突变引入复制子质粒中。将完整的突变复制子测序,以证实S282T突变的存在和任何次要位点突变的不存在。

[0873] 通过合成编码NS5A的头149个氨基酸的序列来形成NS5A突变复制子,所述NS5A含有两侧分别为5'和3'BsrGI和EcoRI位点的所需突变(Genscript,Piscataway,NJ)。然后通过标准分子生物学技术,将合成的片段克隆至1a Rluc复制子质粒中,所述质粒进行了修饰,以能够克隆至唯一的BsrGI和EcoRI限制性位点中。通过DNA测序来证实突变。

[0874] 使用以下酶将复制子线性化:Spe I(基于1b PI-Rluc的复制子)、Hpa I(基于1a-

Rluc的复制子)和XbaI/HpaI(2a Rluc复制子)。使用T7Ribomax体外转录试剂盒(Progema; Madison, WI),从复制子-编码质粒体外转录复制子RNA,接着使用RNAeasy柱(Qiagen; Valencia, CA)纯化。

[0875] 试验

[0876] 使用瞬时转染复制子试验的药物易感性测定

[0877] 使用Lohmann等(Lohmann等, Science 1999;285(5424):110-3)的方法,将RNA转染至Huh-1细胞中。简而言之,将细胞胰蛋白酶化,并且用PBS洗涤两次。将400 μ L PBS中的 4×10^4 细胞的悬浮液与5 μ g RNA混合,并且接受电穿孔,使用960 μ F和270V的设定。将细胞转移至40mL预温热的培养基中,然后接种于96-孔或384-孔平板中。将化合物在100%DMSO中3-倍连续稀释,并且加入细胞中,以获得0.5%的终DMSO浓度。将细胞处理三天,此后除去培养基,裂解细胞,并且使用商业购得的试剂(Promega)和Victor或Envision装置(Perkin Elmer, Waltham, MA)定量Renilla荧光素酶活性。

[0878] 数据分析

[0879] 将数据转化成相对于未处理对照(限定为100%)的百分比,并且使用GraphPad Prism软件或Pipeline Pilot,通过两个重复数据集的非线性回归来计算EC₅₀值。计算抗性倍数变化,作为突变与野生型复制子EC₅₀的比。

[0880] 结果

[0881] 化合物10和化合物6相对S282T的活性

[0882] 之前用化合物10的体外抗性选择在NS5B中具有一致鉴定的S282T,作为多个基因型(GT 1b、1a和2a)中的主要突变。随后将NS5B S282T突变引入全长GT1a、1b和2a复制子中,并且将含有2b、3a或4a NS5B序列的嵌合复制子克隆至GT1b骨架中。使用瞬时复制试验来评价对化合物10、化合物6和病毒唑(RBV)的易感性。S282T突变呈现出降低的对化合物10的易感性,在五个基因型中具有从117.1nM至346.1nM的EC₅₀值。与来自相应基因型的野生型相比,S282T的EC₅₀的倍数增加从2.4至16.0,证明存在NS5B S282T突变时,对化合物10降低的复制子易感性。

[0883] 对于野生型复制子,RBV的EC₅₀值在测试的五个基因型中也是相似的,相对GT 2b具有最低EC₅₀。有趣地,在所有五个基因型中,S282T复制子的EC₅₀值比其相应的野生型对RBV的治疗更敏感,高5-至10-倍。在野生型和S282T之间,在化合物6EC₅₀中没有观察到显著差异,表明该突变没有改变对化合物6的易感性。总之,尽管S282T复制子给予了对化合物10的易感性降低,但突变复制子证明了野生型对化合物6的敏感性以及比野生型对RBV引起的抑制的易感性提高。

[0884] 表7.1. 化合物10和RBV相对GT1b、2a、2b、3a和4a野生型和S282T突变体的抗病毒活性

[0885]

复制子	化合物 10			RBV			化合物 6		
	EC ₅₀ nM ^a		倍数 变化 ^b	EC ₅₀ nM ^a		倍数 变化 ^b	EC ₅₀ nM ^a		倍数 变化 ^b
	WT	S282T		WT	S282T		WT	S282T	
GT1b	21.5	189.2	8.8	6.6	1.6	0.2	0.5	0.4	0.8
GT2a	146.8	346.1	2.4	8.3	0.6	0.1	5165	2336	0.5
GT2b	13.3	215.6	16.2	2.6	0.6	0.2	0.5	0.5	0.9
GT3a	33.9	117.1	3.5	6.7	1.0	0.2	0.4	0.2	0.6
GT4a	35.8	217.5	6.1	6.2	0.6	0.1	0.5	0.4	0.8

[0886] ^aEC₅₀表示两个或多个独立实验的平均

[0887] ^b与相应野生型的倍数变化

[0888] 化合物10和化合物6相对NS5A突变体的活性

[0889] 为了确定NS5A抗药性突变是否与化合物10交叉抗性,测试了一组NS5A突变复制子对化合物6和化合物10的易感性。所有七个NS5A突变体呈现出对化合物6降低的易感性,EC₅₀从25-增至3029-倍。相反,对于化合物10或RBV对照的NS5A突变体,没有观察到EC₅₀的显著移动。

[0890] 表7.2化合物10或化合物6在基因型1a中相对NS5A突变体的体外活性

[0891]	化合物	EC ₅₀ 的倍数移动(DRM EC ₅₀ / 1a-H77 EC ₅₀)						
		M28T	Q30H	Q30R	Q30E	L31M	Y93C	Y93H
[0892]	化合物	EC ₅₀ 的倍数移动(DRM EC ₅₀ / 1a-H77 EC ₅₀)						
		M28T	Q30H	Q30R	Q30E	L31M	Y93C	Y93H
	化合物 6	25	73	170	997	140	327	3029
	化合物 10	0.9	1.0	0.8	1.0	1.1	ND	0.7
	RBV	0.4	0.7	0.8	0.8	0.5		1.0

[0893] 结论

[0894] 在该实施例中,使用瞬时HCV复制子评估了化合物10和化合物6的交叉抗性谱,所述瞬时HCV复制子分别编码NS5A和NS5B中给予对化合物6和化合物10降低的易感性的已知的抗性突变。NS5B S282T复制子给予对化合物10降低的易感性,而在化合物6中测量的野生型和S282T复制子的EC₅₀不存在显著差异。相反地,给予降低的化合物6易感性的突变保持对化合物10处理的敏感性。

[0895] 总之,这些结果表明化合物10和化合物6的抗性突变没有证明交叉抗性并且支持在将来使用这些化合物的组合治疗,用于HCV的治疗。

[0896] 生物学实施例8:组合活性

[0897] 显示了用于体外复制子试验的化合物10与NS5A抑制剂化合物6、非核苷抑制剂化

合物1或化合物5,蛋白酶抑制剂化合物3或病毒唑(RBV)的组合研究数据,所述试验保留用于评价HCV抑制剂的基于细胞的抗病毒活性的标准。这些结果表明化合物10结合化合物6、化合物1、化合物5或化合物3时具有加性抗病毒活性。另外,化合物10与RBV在体外结合时表现出较小协同作用。

[0898] 材料和方法

[0899] 细胞系和细胞培养物

[0900] 该研究中使用的HCV基因型1a复制子细胞系是之前描述的(Robinson M, Yang H, Sun SC, Peng B, Tian Y, Pagratis N等, Novel HCV Reporter Replicon Cell Lines Enable Efficient Antiviral Screening against Genotype 1a. *Antimicrob Agents Chemother* 2010)。将细胞生长于补充了10%FBS(HyClone, Logan, UT, Cat#SH30071.03)、100单位/mL青霉素、100 μ g/mL链霉素(Gibco, Carlsbad, CA, Cat#11040-050)和0.1mM非必需氨基酸(Gibco, Carlsbad, CA, Cat#11140-050)的含有Dulbecco's改良Eagle培养基(DMEM)的细胞培养基中,所述DMEM含有GlutaMAX(Gibco, Carlsbad, CA, Cat#10569-044)。将复制子细胞维持于0.5mg/mL Geneticin(Invitrogen, Carlsbad, CA, Cat#10131-035),以防止HCV复制子的丢失。在达到融合之前,将细胞每3-4天传代一次。

[0901] 用于EC₅₀、CC₅₀测定和组合研究的HCV复制子试验

[0902] 在100%DMSO中提供所有化合物。在100%DMSO中进行化合物连续稀释。所有连续稀释使用Biomek FX工作台在384-孔聚丙烯平板(Thermo Scientific, Hudson, NH, Cat#4341)中进行。对于EC₅₀和CC₅₀测定,在384-孔平板的柱3-20中,在1:3稀释的十个步骤中,连续稀释测试化合物。对于组合研究,一种化合物在1:2稀释的九个步骤中朝向水平方向稀释,而另一种化合物在1:2稀释的七个步骤中朝向垂直方法稀释。这获得了限定组的不同药物浓度和比例。对于每种单独的药物,选择EC₅₀值作为用于测试的浓度范围的中点。每种化合物在相同的384-孔平板中重复四次进行所有连续稀释。将100%DMSO加入每个连续稀释384-孔平板的柱1-2中。将100 μ M的HCV蛋白酶抑制剂ITMN-191作为HCV复制的100%抑制的对照加入柱23中,而将10mM的嘌呤霉素作为100%细胞毒性的对照加入柱24中。

[0903] 向黑色聚苯乙烯384-孔平板(Greiner Bio-one, Monroe, NC, Cat#781086,处理过的细胞培养物)的每个孔中,使用Biotek μ Flow工作台加入90 μ L含有2000个悬浮HCV复制子细胞的细胞培养基(不含genetin)。对于化合物转移至细胞培养平板中,在Biomek FX工作台上,将来自化合物连续稀释平板的0.4 μ L化合物溶液转移至细胞培养平板中。最终试验孔中的DMSO浓度为0.44%。将平板在37°C下用5%CO₂和85%湿度孵育3天。

[0904] HCV复制子试验是多重试验,其可以从相同的孔同时测定细胞毒性和抗-复制子活性。首先进行CC₅₀试验。吸出384-孔细胞培养平板中的培养基,并且使用Biotek ELX405平板洗涤机,每个用100 μ L 1 $\times$ PBS洗涤四次。使用Biotek μ Flow工作台,将50 μ L体积的在1 $\times$ PBS中含有400nM钙黄绿素AM(Anaspec, Fremont, CA, Cat#25200-056)的溶液加入平板的每个孔中。将平板在室温下孵育30分钟,接着使用Perkin Elmer Envision平板阅读器测量荧光信号(激发490nm,发射520nm)。

[0905] 在CC₅₀试验的相同孔中进行EC₅₀试验。用Biotek ELX405平板洗涤机吸出384-孔细胞培养平板中钙黄绿素-PBS溶液。使用Biotek μ Flow工作台,将20 μ L体积的Dual-Glo荧光素酶缓冲液(Promega, Madison, WI, Cat#E298B)加入平板的每个孔中。将平板在室温下孵育10

分钟。然后,使用BiotekµFlow工作台,将20µL体积的含有1:100Dual-Glo Stop&Glo底物(Promega, Madison, WI, Cat#E313B)和Dual-Glo Stop&Glo缓冲液(Promega, Madison, WI, Cat#E314B)混合物的溶液加入平板的每个孔中。然后将平板在室温下孵育10分钟,接着使用Perkin Elmer Envision平板阅读器测量荧光信号。

[0906] 数据分析

[0907] 通过钙黄绿素AM转化成荧光产物来测定细胞毒性作用。通过等式1来计算百分比细胞毒性:

$$[0908] \quad \% \text{ 细胞毒性或}\% \text{ 抑制} = 100 \times (1 - \frac{X_C - M_B}{M_D - M_B}) \quad (1)$$

[0909] 其中 X_C 是来自化合物处理的孔的荧光信号; M_B 是来自嘌呤霉素处理的孔的平均荧光信号; M_D 是来自DMSO-处理的孔的平均荧光信号。通过从HCV复制子的报告renilla荧光素酶产生的发光信号来测定抗-HCV复制活性。使用等式1计算对HCV复制子的百分比抑制,其中 X_C 是来自化合物处理的孔的发光信号; M_B 是来自ITMN-191-处理的孔的平均发光信号; M_D 是来自DMSO-处理的孔的平均发光信号。

[0910] 按照引起细胞生活力50%降低的测试化合物浓度来测定 CC_{50} 值。按照引起HCV复制50%降低的测试化合物浓度来测定 EC_{50} 值。通过将实验数据非线性回归拟合至等式2,使用Pipeline Pilot 5.0软件包(Accelrys, San Diego, CA),获得了 CC_{50} 和 EC_{50} :

$$[0911] \quad y = d + \frac{a-d}{[1+(\frac{x}{c})^b]} \quad (2)$$

[0912] 其中 y 是在 x 化合物浓度下观察到的HCV复制子的%抑制; d 是在空白化合物浓度下估算的应答; a 是在无限化合物浓度下估算的应答; c 是中间单位浓度(CC_{50} 或 EC_{50}); b 是Hill斜率因数。

[0913] 使用Prichard和Shipman研发的MacSynergy II程序(Prichard MN, Aseltine KR, Shipman C, Jr. MacSynergy™ II, 版本1.0. University of Michigan, Ann Arbor, Michigan, 1993)分析了组合研究实验数据。软件(MacSynergy™ II, University of Michigan, MI)计算假定药物之间的加性效应的理论抑制(基于Bliss独立模型),并且定量理论和观察到的抑制值之间的统计学显著差异。将这些差异作出三维曲线,形成一个表面,其中Z-平面中的上升表示抗病毒协同作用,而下降表示化合物之间的抗病毒拮抗作用。以 $nM^2\%$ 表示表面偏差的计算体积。根据Prichard和Shipman,组合作用定义如下:

- 强协同作用: $>100 \mu M^2\%$
- 适度协同作用: $>50 \text{ 且 } \leq 100 \mu M^2\%$
- 较小协同作用: $>25 \text{ 且 } \leq 50 \mu M^2\%$
- [0914] • 加性: $\leq 25 \text{ 且 } > -25 \mu M^2\%$
- 较小拮抗作用: $\leq -25 \text{ 且 } > -50 \mu M^2\%$
- 适度拮抗作用: $\leq -50 \text{ 且 } > -100 \mu M^2\%$
- 强拮抗作用: $\leq -100 \mu M^2\%$

[0915] 对于每个组合研究,在每个实验中使用四次重复进行了三个独立实验。

[0916] 结果

[0917] HCV基因型1a复制子试验中的单个化合物的抗病毒活性和细胞毒性

[0918] 在携带HCV基因型1a复制子的Huh-7细胞中测试了化合物10和其他抗-HCV化合物的抗-HCV活性和细胞毒性。所有化合物的EC₅₀和CC₅₀值列于下表中。直至组合试验中测试的最高浓度,所有单个化合物没有观察到明显的细胞毒性。

[0919] 表8.1该研究中使用的化合物相对HCV基因型1a复制子的EC₅₀和CC₅₀

化合物	类别	EC ₅₀ ^a (nM)	CC ₅₀ ^a (nM)
化合物 10	NS5B 核苷前药	39	>82446
化合物 6	NS5A 抑制剂	0.032	>44400
[0920] 化合物 1	NS5B 非核苷	18	>44400
化合物 5	NS5B 非核苷	14	>44400
化合物 3	NS3 蛋白酶抑制剂	46	>22200
RBV	核苷类似物	33626	>88800

[0921] ^a值是三个或更多个独立实验的几何平均

[0922] 化合物10结合其他类别的抗-HCV剂的抗病毒活性和细胞毒性。

[0923] 使用HCV基因型1a复制子评价了化合物10结合其他抗-HCV化合物的抗病毒作用。使用MacSynergy II分析了结果,其提供了表面曲线,其呈现出显著偏离加性。下表中概括了从加性表面偏离计算的协同作用和拮抗作用体积($\mu\text{M}^2\%$)。在95%置信区间,当化合物10结合化合物6、化合物1、化合物5或化合物3时,平均协同作用和拮抗作用体积在25至-25 $\mu\text{M}^2\%$ 之间,表示了与化合物10的加性相互作用。此外,化合物10结合RBV时显示出25至50 $\mu\text{M}^2\%$ 范围的系统协同作用,表明较小协同相互作用。在使用结合化合物10的直接作用抗病毒剂的组合研究中,在测试的最高浓度的化合物组合下,细胞生活力高于93%,同时分析化合物10和RBV组合作用的研究显示在最高组合药物浓度下高于85%的细胞生活力。

[0924] 表8.2结合化合物10的药物组合的抗病毒协同作用和拮抗作用以及药物相互作用的定量

结合化合物 10 使用的化合物	类别	协同作用体积 (nM^2) ^a	拮抗作用体积 (nM^2) ^a	相互 作用
化合物 6	NS5A 抑制剂	3.3 ± 4.2	-7.7 ± 13.3	加性
[0925] 化合物 1	NS5B 非核苷	4.7 ± 8.1	-11.7 ± 10.0	加性
化合物 5	NS5B 非核苷	1.3 ± 2.3	-5.7 ± 9.0	加性
化合物 3	NS3 蛋白酶抑制剂	1.0 ± 1.7	-3.0 ± 4.4	加性
RBV	核苷类似物	35.3 ± 3.2	-2.0 ± 2.0	较小协同 作用

[0926] ^a值表示重复四次进行的三个独立实验的算术平均±标准偏差。

[0927] 表8.3化合物组合中的细胞毒性定量

	结合化合物 10 使用的化合物	结合最高浓度 (320nM) 的化合物 10 使用的化合物的最高浓度	在最高浓度的化合物组合下的细胞毒性 (%细胞生长抑制)
[0928]	化合物 6	0.16 nM	5.0 ± 5.0
	化合物 1	120 nM	7.0 ± 4.6
	化合物 5	64 nM	4.3 ± 2.9
	化合物 3	240 nM	2.0 ± 3.5
	RBV	16000 nM	14.0 ± 4.4

[0929] ^a值表示重复四次进行的三个独立实验的算术平均±标准偏差。

[0930] 结论

[0931] 结合化合物6、化合物1、化合物5、化合物3或RBV测试了化合物10的抗病毒活性。化合物10显示出结合化合物6、化合物1、化合物5或化合物3的加性抗病毒活性,以及结合RBV的较小协同作用。

[0932] 总之,这些发现支持化合物10结合化合物6、化合物1、化合物5、化合物3或RBV使用来获得增强的病毒抑制而没有降低任一种单独药物功效的潜能。

[0933] 临床实施例1: 化合物1和化合物2的组合的抗-HCV活性的临床测试

[0934] 该临床实施例显示了化合物1和化合物2加病毒唑的组合在降低HCV病毒载量和抑制HCV病毒回弹上比化合物1加化合物2但没有病毒唑的组合更有效。

[0935] 临床试验设计:

[0936] 在患有慢性基因型1HCV感染的未经治疗(treatment-naive)患者中的化合物2加化合物1单独以及结合病毒唑的2期、随机、开放标签试验28天。组1的患者接受75mg化合物2+40mg化合物1,都是每日给药两次(BID)(双重方案),而组2的患者接受75mg化合物2+40mg化合物1,都是BID给药,并加上病毒唑,也是BID给药(三重方案),持续28天。

[0937] 在第28天,所有患者开始PEG/病毒唑。另外,实验方案要求具有不足的病毒学应答(到第5天,从基线HCV RNA的降低<2log₁₀IU/mL)或病毒学回弹(第5天后两个时间点发生了从证实的最低点的HCV RNA增加>0.5log₁₀IU/mL,绝对值>1000IU/mL)的患者在第28天前开始PEG/RIBA。

[0938] 对于具有不足的病毒学应答的患者,在第28天前开始PEG化的干扰素(PEG)和病毒唑(RIBA)的组合,使用或未用组合化合物2+化合物1。因此,到研究的第28天,患者接受了以下四种治疗之一:

[0939] (i) 化合物2+化合物1

[0940] (ii) 化合物2+化合物1+RIBA

[0941] (iii) 化合物2+化合物1+PEG/RIBA,或

[0942] (iv) PEG/RIBA。

[0943] 总共登记了31名患者,并且开始给药(16名患者接受了组1的双重方案,而15名患者接受了组2的三重方案)。初步患者人口统计和基线特征(表XVI)在组1和2之间通常是相当的,除了组2中具有基因型1b的患者数量更高。四名患者在筛选时为HCV基因型1b(一名患者在双重方案中,三名患者在三重方案中),但进一步分析时没有证明为基因型1a或1b,没有进一步继续评价。

[0944] 没有患者经历严重的不良事件。研究药物通常是充分耐受的,所有不良事件的严重性为等级1-2,除了单个等级3疲劳,其是唯一导致研究药物中止的治疗紧急不良事件。在开始PEG/病毒唑之前,超过一名患者中发生的最常见的治疗紧急不良事件为组1中的头疼($n=5$),以及腹泻或呕吐(各自 $n=3$),组2中的头疼($n=7$)、腹泻或疲劳(各自 $n=3$)、呕吐、衰弱、瘙痒或失眠(各自 $n=2$)。当化合物2+化合物1结合PEG/RIBA给予时,超过一名患者中发生的唯一不良事件为流感样疾病($n=5$)和肌痛($n=3$),这都是PEG/RIBA治疗的常见不良事件。关于实验室异常,在28-天治疗阶段过程中,没有等级4事件。在接受研究药物的患者中,在含有病毒唑的组2中,存在两名治疗紧急等级3的总胆红素升高(发生在第7天,但用持续给药研究药物解决了)。在该给药组(含有病毒唑)中,其他患者中还存在总胆红素的2名等级1升高和单个等级2升高。在组1(没有病毒唑)的患者中,存在四名等级1总胆红素升高。到第14天,两个组中的ALT值都从基线降低大约40U/L。在任一个研究组中,中值QTcF没有从基线显著变化,没有患者由于QTc异常而终止研究药物。初步安全性数据概括于表XVIII中。

[0945] 大约每周监控两次血浆HCV RNA,以测定关于早期开始PEG/RIBA的特定方案标准的病毒学应答。从HCV RNA值的初步分析看,HCV RNA的中值最大值下降为双重方案的 $3.9\log_{10}\text{IU/mL}$ 和三重方案的 $5.0\log_{10}\text{IU/mL}$ 。HCV RNA中至最大下降的中值时间为双重方案的7天和三重方案的14天,差异归因于含有病毒唑的组中延迟的发病和病毒突破的发作。接受双重方案的15名患者中的三名(20%)和13名接受三重方案中的10名(77%)具有 $\leq 30\text{IU/mL}$ 的最低点HCV RNA(排除非-GT1患者)。接受化合物2/化合物1的16名患者中的13名(81%)和接受化合物2/化合物1/病毒唑的15名患者中的6名(40%)在设定的研究第28天开始之前开始了PEG或PEG/病毒唑。其他病毒学结果的详细内容提供于

[0946] 结果。化合物2+化合物1单独以及结合RIBA在该研究中是HCV患者在长达28天中充分耐受的,在增加PEG或PEG/病毒唑之前和之后都是。两个方案都产生了有效的HCV RNA抑制,三种药物方案中活性更高并且持续时间更久。

[0947] 表XVI初步患者人口统计和基线特征

[0948]

	组#1: 75 mg 化合物 2 BID + 40 mg 化合物 1 BID (n=16)	组 #2: 75 mg 化合物 2 BID + 40 mg 化合物 BID + RIBA (n=15)
以岁计的年龄-中值 (范围)	47 (30,66)	55 (27, 63)
性别	14 男性 2 女性	11 男性 4 女性
种族划分	16 非-西班牙/拉丁美洲	15 非-西班牙/拉丁美洲
种族	13 白 2 黑 1 亚洲	13 白 2 黑 0 亚洲
以 kg 计的基线重量-中值 (范围)	86.1 (57.8, 110.5)	79.0 (51, 127.5)
以 kg/M ² 计的 BMI-中值 (范围)	27.1 (21.5, 34.1)	24.7 (19.9, 37.6)
来自中央实验室的基线 Log ₁₀ HCV RNA (IU/mL)-中值 (范围)中央实验室	6.17 (5.25, 7.26)	6.34 (5.41, 7.19)
基线 HCV 基因型	8 1a 8 1b	3 1a 12 1b

[0949] 表XVII初步安全性结果

[0950]

	组#1: 75 mg 化合物 2 BID + 40 mg 化合物 1 BID (n=16)	组 #2: 75 mg 化合物 2 BID + 40 mg 化合物 BID + RIBA (n=15)
等级 3 不良事件(AEs): 疲劳	1	0
等级 1/等级 2 (AEs): 头疼 腹泻 呕吐 疲劳 衰弱 瘙痒 失眠	5 (31%) 3 (19%) 3 (19%) 0 0 1 (6%) 0	7 (47%) 3 (20%) 2 (13%) 3 (20%) 2 (13%) 2 (13%) 2 (13%)
等级 3 实验室异常: 胆红素	0	2
等级 1/等级 2 实验室异常: 胆红素 血红蛋白 葡萄糖 (未禁食)	4 0 8	3 2 5

[0951] 表XVIII初步病毒学结果

[0952]

	组 1: 75 mg 化合物 2 BID + 40 mg 化 合物 1 BID (n=16)	组 1: 75 mg 化合物 2 BID + 40 mg 化 合物 1 BID 排除了未证实的 GT1 患者 (n=15)*	组 2: 75 mg 化合物 2 BID + 40 mg 化 合物 BID + 病 毒唑 (n=15)	组 2: 75 mg 化合物 2 BID + 40 mg 化 合物 BID + 病 毒唑 排除了未证实的 GT1 患者 (n=13)
中值最大 HCV RNA 下降	-3.9 log ₁₀ IU/mL	-4.0 log ₁₀ IU/mL	-5.0 log ₁₀ IU/mL	-5.0 log ₁₀ IU/mL
平均最大 HCV RNA 下降	-3.4 log ₁₀ IU/mL	-3.6 log ₁₀ IU/mL	-4.5 log ₁₀ IU/mL	-4.9 log ₁₀ IU/mL
至突破的平均时 间	16 天	16 天	23 天	23 天
具有 <50 IU/mL HCV RNA 最低 点的患者	3/16 (19%)	3/15 (20%)	10/15 (63%)	10/13 (77%)
具有突破的患者 **	12 (75%)	12/15 (80%)	6/15 (40%)	6/13 (46%)
第 28 天应答: < 25 IU/mL 的 RVR	1/16 (6%)	1/15 (7%)	5/15 (33%)	5/13 (38%)
< 50 IU/mL 的 RVR	1/16 (6%)	1/15 (7%)	6/15 (40%)	6/13 (46%)

[0953] *GT1是HCV基因型1的缩写。

[0954] 排除了一个法国研究中心的患者1011、1012和1043；

[0955] 患者1004未排除

[0956] **突破限定为高于最低点值的HCV RNA>1log增加或按照<25IU/mL最低点，HCV RNA>25IU/mL

[0957] 表XVIII中呈现的数据表明与不存在病毒唑相比，在病毒唑存在下，应答化合物2+化合物1组合的中值最大HCV RNA水平和平均最大HCV RNA水平都有大约10倍多的下降。此外，具有低于50IU/mL的HCV RNA最低点的研究患者的数量在病毒唑存在下多于病毒唑不存在的情况。这些结果表明病毒唑在不存在干扰素的情况下，显著加强了化合物1和化合物2组合的抗病毒活性。

[0958] 此外，HCV突破(这是随着病毒突变以及对抗病毒药物变得不太易感，HCV病毒载量最后增加的测量)的平均时间在病毒唑存在下高于病毒唑不存在的情况。此外，显示出病毒突破的患者数量在病毒唑存在下显著低于病毒唑不存在的情况。这些结果表明HCV病毒在病毒唑存在下不太能够产生对化合物1和化合物2组合的抗性。

[0959] 此外，表XVIII中呈现的数据表明在病毒唑存在下获得快速病毒学应答(RVR)的病人数量显著高于病毒唑不存在的情况。RVR的获得与HCV感染的治愈成正相关。

[0960] 总之，表XVIII中呈现的数据表明化合物1、化合物2和病毒唑的组合引起HCV病毒

载量快速且临床上显著的降低,即使在不存在干扰素给药的情况下。

[0961] 尽管本文中详细说明和描述了本发明的特定实施方案,但本发明不限于此。提供以上的详细描述作为本发明的示例,并且不应当解释为构成本发明的任何限制。改变将是本领域技术人员显而易见的,并且确定没有脱离本发明精神的所有改变包括在所附权利要求的范围内。

Abstract

The present application relates to a composition, comprising (1) compound 10 of the following structure, or the pharmaceutically acceptable salt thereof, and (2) compound 6, or the pharmaceutically acceptable salt thereof.