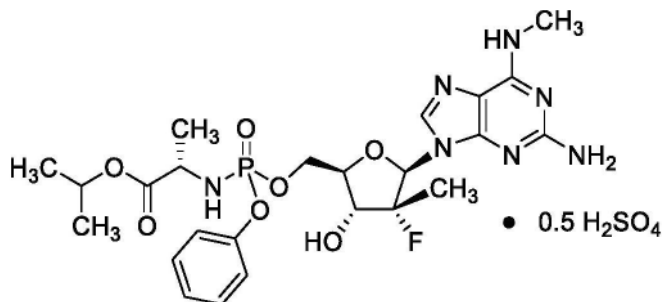
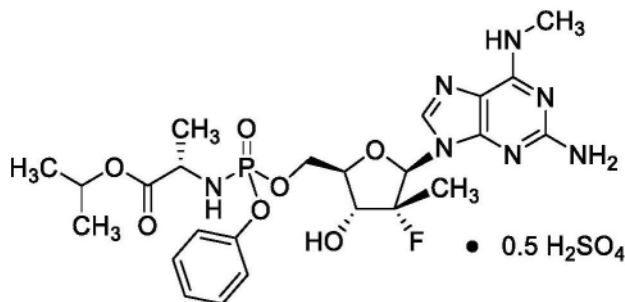


1. 下述式的化合物：



2. 如权利要求1所述的化合物，其任选地在药学载体中，用于在有需要的宿主中治疗丙型肝炎感染，或由丙型肝炎感染导致的病症。

3. 一种药物组合物，其在药学上可接受的载体中包含有效量的下述式的化合物



4. 如权利要求3所述的药物组合物，其为固体剂型，递送1mg至2,000mg的所述化合物。

5. 如权利要求3所述的药物组合物，其为固体剂型，递送100至800mg的所述化合物。

6. 如权利要求3所述的药物组合物，其为固体剂型，递送至少500mg的所述化合物。

7. 如权利要求3所述的药物组合物，其为固体剂型，递送至少600mg的所述化合物。

8. 如权利要求3所述的药物组合物，其为固体剂型，递送至少700mg的所述化合物。

9. 如权利要求3所述的药物组合物，其中所述药学上可接受的载体适合于口服递送。

10. 如权利要求9所述的药物组合物，其中所述药学上可接受的载体为片剂形式。

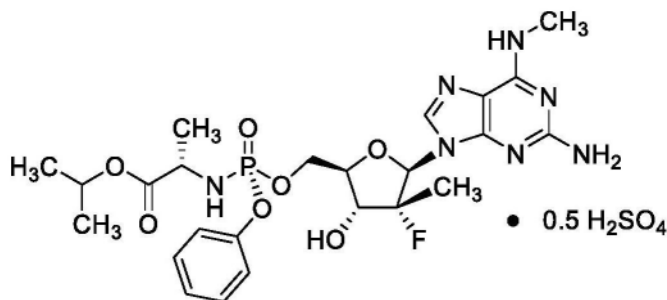
11. 如权利要求9所述的药物组合物，其中所述药学上可接受的载体为胶囊剂形式。

12. 如权利要求3所述的药物组合物，其为静脉内制剂。

13. 如权利要求3所述的药物组合物，其为肠胃外制剂。

14. 如权利要求13所述的药物组合物，其中所述药学上可接受的载体为混悬剂或溶液剂形式。

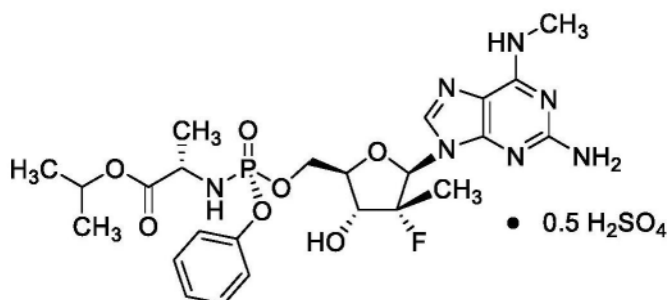
15. 下述式的化合物：



16. 如权利要求15所述的化合物，其中所述化合物至少98%排除相反的磷S-对映异构

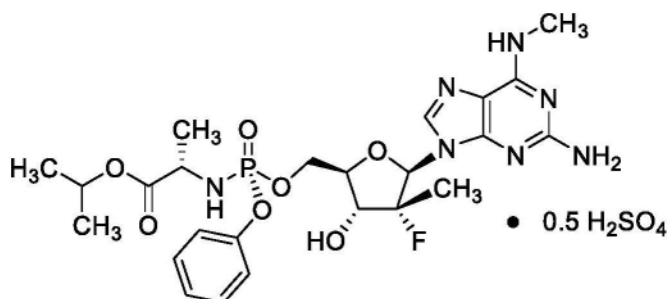
体。

17. 一种固体剂型, 其在药学上可接受的载体中包含有效量的下式的化合物



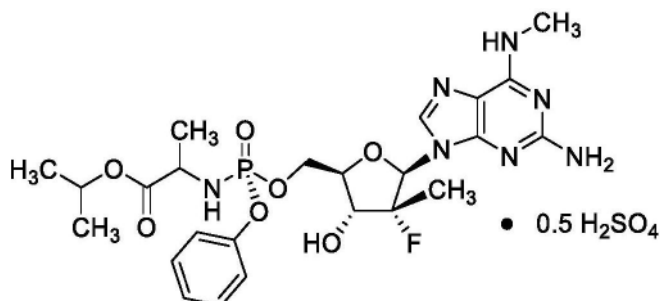
18. 如权利要求17所述的固体剂型, 其中所述化合物至少98%排除相反的磷S-对映异构体。

19. 一种药物组合物, 其在药学上可接受的载体中包含有效量的下式的化合物



20. 如权利要求19所述的药物组合物, 其中所述化合物至少98%排除相反的磷S-对映异构体。

21. 下述式的化合物:



22. 一种药物组合物, 其在药学上可接受的载体中包含有效量的权利要求21所述的化合物。

23. 如权利要求22所述的药物组合物, 其为口服剂型。

24. 如权利要求23所述的药物组合物, 其中所述口服剂型为固体剂型。

25. 如权利要求24所述的药物组合物, 其中所述固体剂型为片剂。

26. 如权利要求24所述的药物组合物, 其中所述固体剂型为胶囊剂。

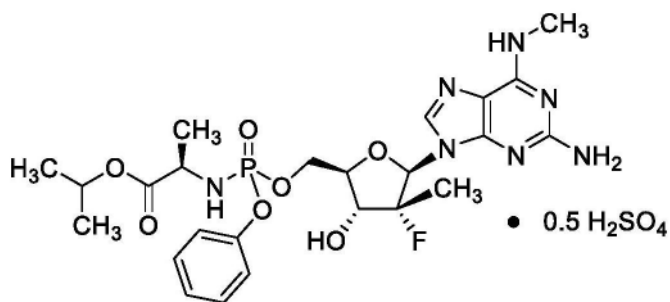
27. 如权利要求23所述的药物组合物, 其中所述口服剂型为液剂。

28. 如权利要求27所述的药物组合物, 其中所述液剂为混悬剂或溶液剂。

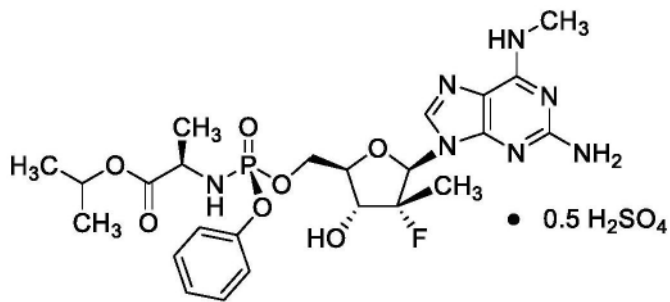
29. 如权利要求22所述的药物组合物, 其为静脉内制剂。

30. 如权利要求22所述的药物组合物, 其为肠胃外制剂。

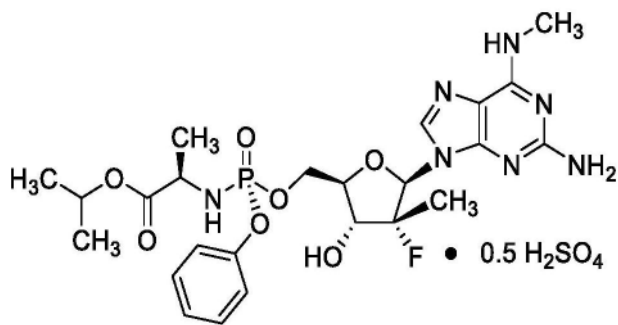
31. 下述式的化合物:



32. 如权利要求31所述的化合物,其具有下述式:

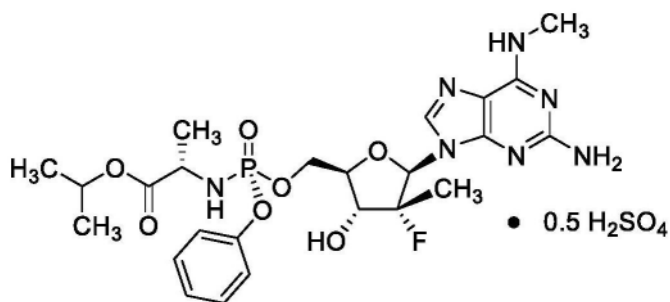


33. 如权利要求31所述的化合物,其具有下述式:



34. 一种药物组合物,其在药学上可接受的载体中包含权利要求31-33中任一项所述的化合物。

35. 下述式化合物在制造药物中的用途



所述化合物任选地在药学上可接受的载体中,所述药物用于在有需要的宿主中治疗丙型肝炎感染或由丙型肝炎感染导致的病症。

36. 如权利要求35所述的用途,其中所述化合物适合于口服给药。

37. 如权利要求35所述的用途,其中100至800mg的所述化合物是可给予的。

用于治疗丙型肝炎病毒的核苷酸半硫酸盐

[0001] 本申请是申请日为2018年1月31日、发明名称为“用于治疗丙型肝炎病毒的核苷酸半硫酸盐”的中国发明专利申请No.201880009871.6 (PCT申请号为PCT/US2018/016301)的分案申请。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求2017年2月1日提交的美国临时申请号62/453,437;2017年3月10日提交的美国临时申请号62/469,912;2017年4月21日提交的美国临时申请号62/488,366;和2017年10月20日提交的美国临时申请号62/575,248的权益。这些申请的全部内容以参考的方式并入本文中。

技术领域

[0004] 本发明是选定的核苷酸化合物的半硫酸盐,其具有用于治疗感染丙型肝炎的宿主的预料不到的治疗特性;以及其药物组合物和剂型。

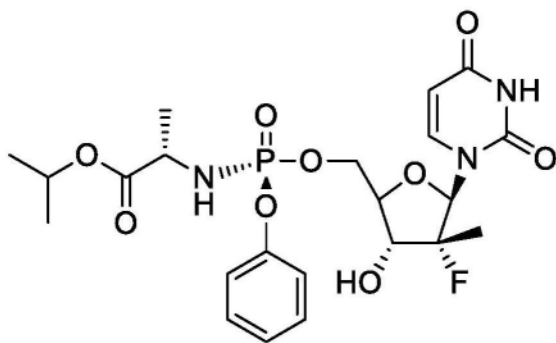
背景技术

[0005] 丙型肝炎 (HCV) 是一种RNA单链病毒,并且是丙型肝炎病毒属的成员。据估计,75%的所有肝病病例是由HCV引起的。HCV感染可导致肝硬化和肝癌,如果保持发展,可导致需要肝移植的肝衰竭。全世界约有7100万人患有慢性HCV感染,并且每年约有399,000人死于HCV,主要死于肝硬化和肝细胞性癌症。

[0006] RNA聚合酶是针对抗RNA单链病毒的药物开发的关键靶点。HCV非结构蛋白NS5B RNA依赖性RNA聚合酶是一种负责启动和催化病毒RNA合成的关键酶。NS5B抑制剂存在两个主要亚类:核苷类似物和非核苷抑制剂 (NNI)。核苷类似物被合成代谢为充当聚合酶的可替代底物的活性三磷酸酯;并且非核苷抑制剂 (NNI) 结合所述蛋白的变构区域。核苷或核苷酸抑制剂模拟天然聚合酶底物,并充当链终止剂。它们抑制RNA转录的启动和新生DNA链的延长。

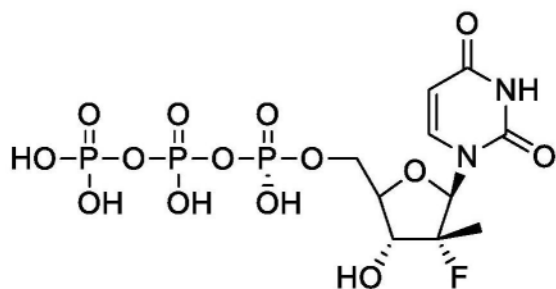
[0007] 除了靶向RNA聚合酶之外,在组合疗法中也可靶向其它RNA病毒蛋白质。例如,作为治疗方法的另一个靶标HCV蛋白是NS3/4A (一种丝氨酸蛋白酶) 和NS5A (一种非结构蛋白,其是HCV复制酶的一种必需组分,并且对于细胞途径发挥一系列作用)。

[0008] 在2013年12月,第一个核苷NS5B聚合酶抑制剂索非布韦 (sofosbuvir) (Sovaldi[®], Gilead Sciences) 被批准。Sovaldi[®]是一种尿嘧啶核苷氨基磷酸酯前药,其被肝细胞摄取,进行细胞内活化,以得到活性代谢产物2'-脱氧-2'- α -氟- β -C-甲基尿苷-5'-三磷酸酯。



[0009]

Sovaldi®



2'-脱氧-2'- α -氟- β -C-甲基尿苷-5'-三磷酸酯

[0010] **Sovaldi[®]**是已证实对于治疗特定类型的HCV感染而言安全且有效而不需要共同给药干扰素的第一种药物。**Sovaldi[®]**是获得FDA批准的突破性疗法认定 (breakthrough therapy designation) 的第三种药物。

[0011] 2014年,美国FDA批准了 **Harvoni**[®] (ledipasvir (雷迪帕韦,一种NS5A抑制剂) 和索非布韦) 用于治疗慢性丙型肝炎病毒基因型1感染。**Harvoni**[®] 是被批准用于治疗慢性HCV基因型1感染的第一种组合药丸。其也是不需要给药干扰素或利巴韦林的第一种获批方案。另外,FDA批准了西美瑞韦 (simeprevir, Olysio[™]) 与索非布韦组合 (**Sovaldi**[®]) 作为用于基因型1HCV感染的成年人的每日一次、全口服、无干扰素和利巴韦林的治疗方案。

[0012] 2014年,美国FDA还批准了AbbVie的VIEKIRA Pak™,一种包含达塞布韦(dasabuvir,一种非核苷NS5B聚合酶抑制剂)、奥贝他韦(ombitasvir,一种NS5A抑制剂)、帕利瑞韦(paritaprevir,一种NS3/4A抑制剂)和利托那韦的多丸包装。VIEKIRA Pak™可以与利巴韦林一起或不与利巴韦林一起用于治疗基因型1HCV感染患者,包括患有代偿性肝硬化的患者。VIEKIRA Pak™不需要干扰素组合治疗。

[0013] 2015年7月,美国FDA批准了Technivie™和Daklinza™分别用于治疗HCV基因型4和HCV基因型3。Technivie™(奥贝他韦/帕利瑞韦/利托那韦)被批准与利巴韦林组合用于治疗没有瘢痕形成和肝硬化的患者的HCV基因型4,并且是用于不需要与干扰素共同给药的HCV-4感染患者的第一选择。Daklinza™被批准与**Sovaldi®**一起用于治疗HCV基因型3感染。Daklinza™是已证实在治疗HCV基因型3中安全且有效而不需要共同给药干扰素或利巴韦林的第一种药物。

[0014] 2015年10月,美国FDA警告HCV治疗Viekira Pak和Technivie可导致严重的肝损

伤,主要在患有潜在晚期肝病的患者中,并且要求向说明书中加入关于安全性的附加信息。.

[0015] 其它目前批准用于HCV的治疗剂包括干扰素 α -2b或PEG基化的干扰素 α -2b (**Pegintron[®]**),其可以与利巴韦林(**Rebetol[®]**)、NS3/4A特拉匹韦 (**Incivek[®]**,Vertex和JohNSon&JohNSon)、伯赛匹韦(boceprevir) (**Victrelis[™]**,Merck)、西美瑞韦(**Olysio[™]**,JohNSon&JohNSon)、帕利瑞韦(AbbVie)、奥贝他韦(AbbVie)、NNI达卡他韦(ABT-333)和默克公司的Zepatier[™](两种药物格佐普韦(grazoprevir)和依巴司韦(elbasvir)的单一片剂组合)。

[0016] 另一种NS5B聚合酶抑制剂目前正在研发中。默克公司正在开发尿苷核苷酸前药MK-3682(原Idenix IDX21437)。该药物目前处于II期联合试验中。

[0017] 描述了用于治疗黄病毒科(包括HCV)的核苷聚合酶抑制剂的美国专利和WO申请包括如下公司提交的那些:Idenix Pharmaceuticals (6,812,219;6,914,054;7,105,493;7,138,376;7,148,206;7,157,441;7,163,929;7,169,766;7,192,936;7,365,057;7,384,924;7,456,155;7,547,704;7,582,618;7,608,597;7,608,600;7,625,875;7,635,689;7,662,798;7,824,851;7,902,202;7,932,240;7,951,789;8,193,372;8,299,038;8,343,937;8,362,068;8,507,460;8,637,475;8,674,085;8,680,071;8,691,788;8,742,101;8,951,985;9,109,001;9,243,025;US2016/0002281;US2013/0064794;WO/2015/095305;WO/2015/081133;WO/2015/061683;WO/2013/177219;WO/2013/039920;WO/2014/137930;WO/2014/052638;WO/2012/154321);Merck (6,777,395;7,105,499;7,125,855;7,202,224;7,323,449;7,339,054;7,534,767;7,632,821;7,879,815;8,071,568;8,148,349;8,470,834;8,481,712;8,541,434;8,697,694;8,715,638;9,061,041;9,156,872和WO/2013/009737);Emory University (6,348,587;6,911,424;7,307,065;7,495,006;7,662,938;7,772,208;8,114,994;8,168,583;8,609,627;US 2014/0212382;和WO2014/1244430);Gilead Sciences/Pharmasset Inc. (7,842,672;7,973,013;8,008,264;8,012,941;8,012,942;8,318,682;8,324,179;8,415,308;8,455,451;8,563,530;8,841,275;8,853,171;8,871,785;8,877,733;8,889,159;8,906,880;8,912,321;8,957,045;8,957,046;9,045,520;9,085,573;9,090,642;和9,139,604)和(6,908,924;6,949,522;7,094,770;7,211,570;7,429,572;7,601,820;7,638,502;7,718,790;7,772,208;RE42,015;7,919,247;7,964,580;8,093,380;8,114,997;8,173,621;8,334,270;8,415,322;8,481,713;8,492,539;8,551,973;8,580,765;8,618,076;8,629,263;8,633,309;8,642,756;8,716,262;8,716,263;8,735,345;8,735,372;8,735,569;8,759,510和8,765,710);Hoffman La-Roche (6,660,721)、Roche (6,784,166;7,608,599;7,608,601和8,071,567);Alios BioPharma Inc. (8,895,723;8,877,731;8,871,737;8,846,896;8,772,474;8,980,865;9,012,427;US 2015/0105341;US 2015/0011497;US 2010/0249068;US2012/0070411;WO 2015/054465;WO 2014/209979;WO 2014/100505;WO 2014/100498;WO 2013/142159;WO 2013/142157;WO 2013/096680;WO 2013/088155;WO 2010/108135)、Enanta Pharmaceuticals (US 8,575,119;8,846,638;9,085,599;WO 2013/044030;WO 2012/125900)、Biota (7,268,119;7,285,658;7,713,941;8,119,607;8,415,309;8,501,699和8,802,840)、Biocryst

Pharmaceuticals (7,388,002;7,429,571;7,514,410;7,560,434;7,994,139;8,133,870;8,163,703;8,242,085和8,440,813)、Alla Chem,LLC (8,889,701和WO 2015/053662)、Inhibitex (8,759,318和WO/2012/092484)、JaNSsen Products (8,399,429;8,431,588、8,481,510、8,552,021、8,933,052;9,006,29和9,012,428) the University of Georgia Foundation (6,348,587;7,307,065;7,662,938;8,168,583;8,673,926、8,816,074;8,921,384和8,946,244)、RFS Pharma,LLC (8,895,531;8,859,595;8,815,829;8,609,627;7,560,550;US 2014/0066395;US 2014/0235566;US 2010/0279969;WO/2010/091386和WO 2012/158811)University College Cardiff Consultants Limited (WO/2014/076490、WO 2010/081082;WO/2008/062206)、Achillion Pharmaceuticals,Inc. (WO/2014/169278和WO 2014/169280)、Cocrystal Pharma,Inc. (US 9,173,893)、Katholieke Universiteit Leuven (WO 2015/158913)、Catabasis (WO 2013/090420) 和the Regents of the University of Minnesota (WO 2006/004637)。

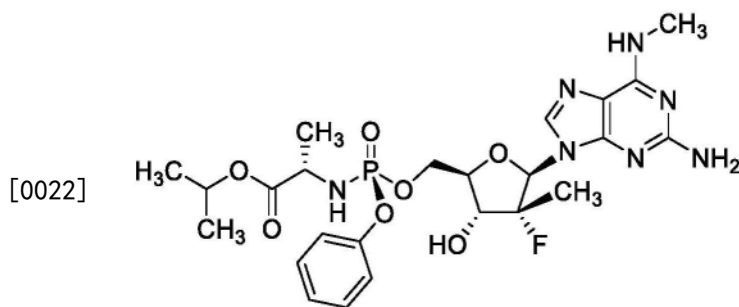
[0018] Atea Pharmaceuticals,Inc已经在美国专利号9,828,410和PCT申请号W02016/144918中公开了 β -D-2'-脱氧-2'- α -氟-2'- β -C-取代-2-修饰-N⁶- (单甲基和二甲基)嘌呤核苷酸用于治疗HCV。Atea还在US2018/0009836和W02018/009623中公开了 β -D-2'-脱氧-2'-取代-4'-取代-2-N⁶-取代-6-氨基嘌呤核苷酸用于治疗副粘病毒和正粘病毒感染。

[0019] 仍然存在开发安全、有效且良好耐受的抗HCV治疗剂的强烈医学需要。耐药性的预期加剧了这种需求。对于感染所有HCV基因型的患者,更有效的直接作用抗病毒药可以显著地缩短治疗持续时间并提高顺应性和SVR速率。

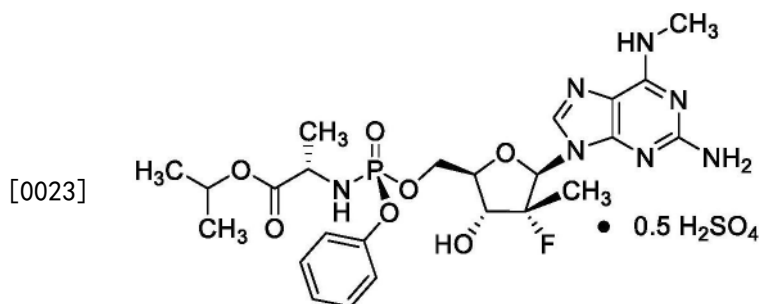
[0020] 因此,本发明的目的之一是提供用于治疗 and/或预防HCV感染的化合物、药物组合物、以及方法和用途。

发明内容

[0021] 已出人意料地发现,在下文中作为化合物2而提供的化合物1的半硫酸盐相对于其游离碱(化合物1)显示出预料不到的有利治疗特性,包括提高的生物利用度和靶器官选择性。这些预料不到的优点无法被提前预测。化合物2因此对于在有需要的宿主(典型而言是人)以有效量给予用于治疗丙型肝炎而言在治疗上优越的物质组成。化合物2被称为的((S)-(((2R,3R,4R,5R)-5-(2-氨基-6-(甲基氨基)-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)-L-丙氨酸异丙酯的半硫酸盐。化合物1被公开于美国专利号9,828,410中。



化合物 1



化合物 2

[0024] 化合物2以化合物1的形式在细胞中转化为其相应的三磷酸核苷酸(化合物1-6), 其是活性代谢物和RNA聚合酶的抑制剂(参见下述的方案1)。由于化合物1-6在细胞中产生并且不离开细胞, 因此在血浆中不能被测量。然而, 5'-OH代谢物化合物1-7(参见方案1)从细胞中输出, 因此在血浆中是可测量的, 并且充当细胞内活性代谢物化合物1-6的浓度替代物。

[0025] 已经发现的是, 替代化合物1-7的体内血药浓度、以及由此得到的化合物1-6的体内血药浓度在体内给予化合物2时实质上高于体内给予化合物1时。在给药化合物1和化合物2的狗的头对头比较(实施例19, 表28)中, 给药化合物2达到最终鸟嘌呤5'-OH核苷代谢物(1-7)的AUC_(0-4h)是给药化合物1后AUC的两倍。非共价盐对母体药物(化合物1)的血药浓度具有这样的效果是预料不到的。

[0026] 另外, 化合物2选择性地体内与心脏相比分配给肝脏(实施例19, 表29), 这是有益的, 因为肝脏是在感染HCV的宿主中的患病器官。对狗给药化合物1或化合物2, 并测量肝脏和心脏中活性三磷酸酯(1-6)的浓度。给药化合物2后活性三磷酸酯的肝脏对心脏浓度比与化合物1相比更高, 如表29所示。具体而言, 化合物2的肝脏/心脏分配比是20, 与此相比, 化合物1的肝脏/心脏分配比为3.1。该数据表明预料不到的是, 与化合物1相比, 给予化合物2导致活性鸟嘌呤三磷酸酯(化合物1-6)在肝脏比在心脏中优先分配, 这减少了潜在的脱靶效应。预料不到的是, 给予化合物2将显著减少不希望的脱靶分配。这允许在保健医生需要的情况下以比化合物1更高的剂量给予化合物2。

[0027] 另外, 在大鼠和猴中口服给药化合物2后, 测量化合物2的活性鸟嘌呤三磷酸酯衍生物(代谢物1-6)的肝脏和心脏组织水平(实施例20)。在所有测试物种的肝脏中测量到高水平的活性鸟嘌呤三磷酸酯(1-6)。重要的是, 在猴心脏中测量到无法量化的鸟嘌呤三磷酸酯(1-6)水平, 并且这表明活性三磷酸酯的肝脏特异性形成。因此发现, 与化合物1给药相比, 化合物2给药改善了鸟嘌呤三磷酸酯(1-6)的分布。

[0028] 当给予健康和丙型肝炎感染患者时, 化合物2在单次口服给药后是耐受良好的, 并且C_{max}、T_{max}和AUC_{0-24h}药代动力学参数在两组中可比(表34和35)。如实施例24中所述, HCV感染患者中单剂量的化合物2得到显著的抗病毒活性。在研究范围内, 代谢物1-7的血浆暴露绝大多数情况与剂量成比例。

[0029] 给药化合物2的患者的个体的药代动力学/药效学分析显示, 化合物2的与代谢物1-7的血浆暴露相关病毒应答(实施例24, 图23A-23F)表明, 可用稳健剂量的化合物2实现深刻的病毒应答。

[0030] 实施例24确认, 作为非限制性实施方案, 300mg、400mg和600mg的单次口服剂量在

人中得到显著的抗病毒活性。600mg剂量的化合物2后的代谢物1-7的 C_{24} 血药谷浓度是300mg剂量的化合物2后的代谢物1-7的 C_{24} 血药谷浓度的两倍。

[0031] 图24和实施例25突出了化合物2提供的用于治疗丙型肝炎的突破发明。如图24所示,预测了在人中给药化合物2 (600mg QD (550mg游离碱当量) 和450mg QD (400mg游离碱当量)) 后的代谢物1-7的稳态血药谷水平 ($C_{24,ss}$), 并在一系列HCV临床分离株中,在体外与化合物1的 EC_{95} 进行对比,以确定稳态血药浓度是否始终高于 EC_{95} ,这将得出在体内对多种临床分离株具有高效能。化合物1的 EC_{95} 与化合物2的 EC_{95} 相同。为使化合物2有效,代谢物1-7的稳态血药谷浓度水平应超过 EC_{95} 。

[0032] 如图24所示,针对所有受试的临床分离株,化合物2的 EC_{95} 为约18nM至24nM。

[0033] 如图24所示,在450mg QD (400mg游离碱当量) 的剂量下在人中,化合物2提供了约40ng/mL的预测稳态血药谷浓度 ($C_{24,ss}$)。在600mg QD (550mg游离碱当量) 下在人中,化合物2提供了约50ng/mL的预测稳态血药谷浓度 ($C_{24,ss}$)。

[0034] 因此,替代代谢物1-7的预测稳态血药浓度几乎是针对所有受试的临床分离株 (甚至难以治疗的GT3a) 的 EC_{95} 的两倍,这表明了优异的性能。

[0035] 与此相反,治疗核苷酸的标准索非布韦 (Sovaldi) 的 EC_{95} 在所有受试的HCV临床分离株中为50nM至265nM,在市售的400mg剂量下仅对两个分离株GT2a和GT2b而言 EC_{95} 小于预测稳态浓度。市售的400mg剂量的索非布韦对于其他临床分离株GT1a、GT1b、GT3a、GT4a和GT4d而言, EC_{95} 大于预测稳态浓度。

[0036] 图24中,比较药效和药代动力学稳态参数的数据清楚地证明了化合物2对于治疗丙型肝炎的预料不到的治疗重要性。事实上,对于所有受试的基因型,给予化合物2后的预测稳态 ($C_{24,ss}$) 血药水平比 EC_{95} 高至少2倍,并且针对GT2而言3至5倍有效。该数据表明,化合物2在人中具有有效的泛基因型抗病毒活性。如图24所示,针对GT1、GT3和GT4的索非布韦的 EC_{95} 大于100ng/mL。因此令人惊讶的是,化合物2针对HCV是活性的,其剂型提供比通过等效剂型的索非布韦所实现的稳态谷浓度 (约100ng/mL) 更低的稳态谷浓度 (40-50ng/mL)。

[0037] 因此,在一个实施方案中,本发明包括一种化合物2的剂型,其提供约15-75ng/mL之间、例如20-60ng/mL、25-50ng/mL、40-60ng/mL、或甚至40-50ng/mL的代谢物1-7稳态血浆谷浓度 ($C_{24,ss}$)。考虑到等效的索非布韦代谢物的稳态浓度为约100ng/mL,这是预料不到的。

[0038] 另外,已发现化合物2是具有抗HCV活性的异常稳定、高度可溶、非吸湿性的盐。这是令人惊讶的,因为除了半硫酸盐 (化合物2) 之外的化合物1的许多盐、包括单半硫酸盐 (化合物3) 是物理上不稳定,相反会潮解或变成胶状固体 (实施例4),因此不适用于稳定的固体药物剂型。令人惊讶的是,虽然化合物2不变成胶状,但在水中比化合物1的溶解度高43倍,并且在模拟胃液 (SGF) 条件下比化合物1的溶解度高6倍 (实施例15)。

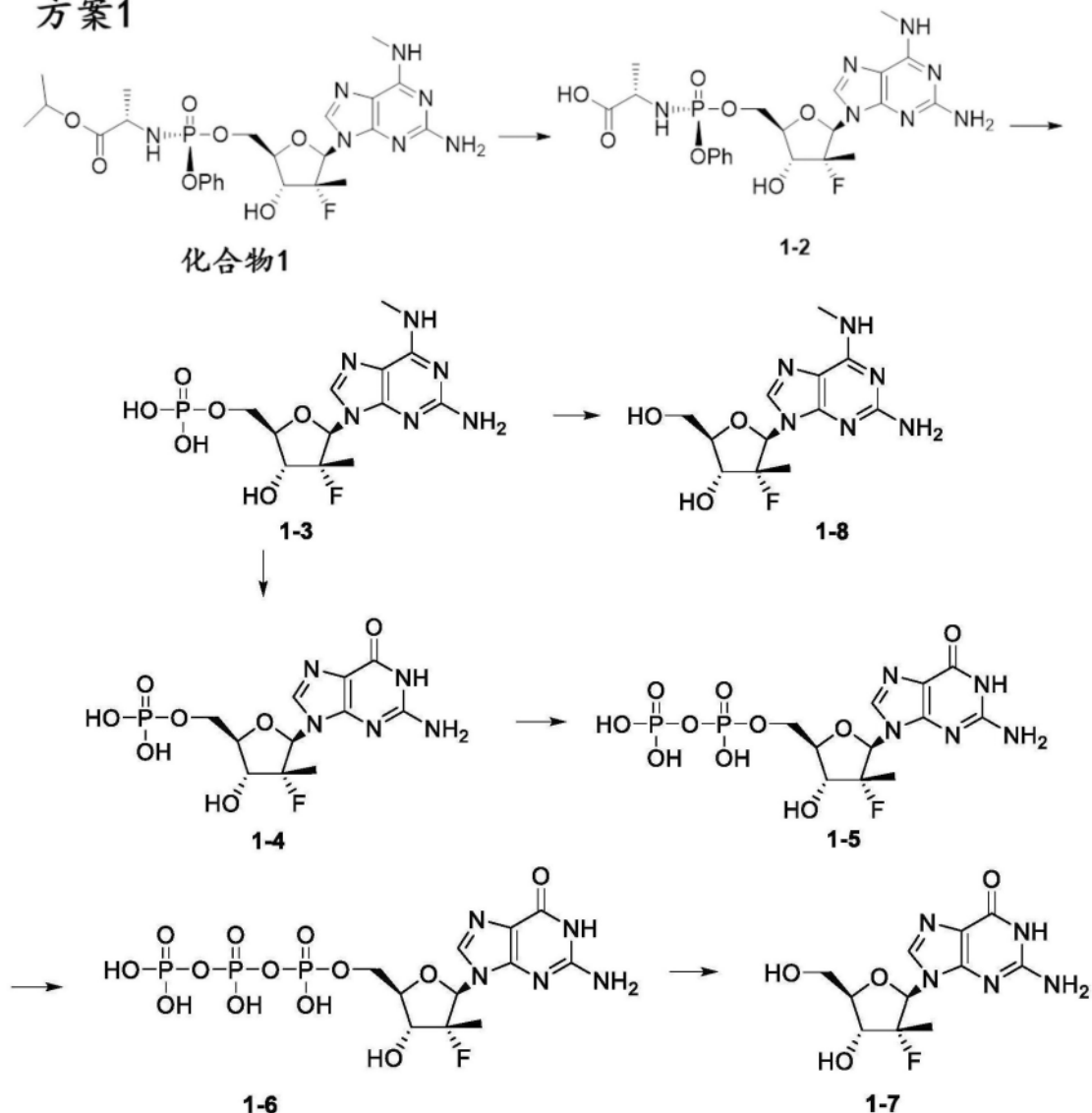
[0039] 如在实施例16中讨论的,化合物2在加速稳定性条件 (40°C/75%RH) 下6个月后保持白色固体,其具有对应于参比标准物质的IR。化合物2在环境条件 (25°C/60%RH) 和冷藏条件 (5°C) 下经过9个月是稳定的。

[0040] 化合物2的固体剂型 (50mg和100mg的片剂) 是在加速 (40°C/75%RH) 和冷藏 (5°C) 条件下6个月也是化学稳定的 (实施例26)。化合物2在环境条件 (25°C/60%RH) 下以固体剂型稳定至少9个月。

[0041] 方案1提供了化合物1和化合物2的代谢途径,其涉及氨基磷酸酯 (代谢物1-1) 的初

始脱酯化以形成代谢物1-2。然后将代谢物1-2转化为N⁶-甲基-2,6-二氨基嘌呤-5'-单磷酸衍生物(代谢物1-3),其又被代谢成5'-单磷酸酯形式的游离的5'-羟基-N⁶-甲基-2,6-二氨基嘌呤核苷(代谢物1-8)和((2R,3R,4R,5R)-5-(2-氨基-6-氧代-1,6-二氢-9H-嘌呤-9-基)-4-氟-3-羟基-4-甲基四氢呋喃-2-基)甲基二氢磷酸酯(代谢物1-4)。代谢物1-4被合成代谢为相应的二磷酸酯(代谢物1-5),然后代谢为活性三磷酸酯衍生物(代谢物1-6)。5'-三磷酸酯可以进一步被代谢,以生成-氨基-9-((2R,3R,4R,5R)-3-氟-4-羟基-5-(羟基甲基)-3-甲基四氢呋喃-2-基)-1,9-二氢-6H-嘌呤-6-酮(1-7)。代谢物1-7在血浆中是可测量的,因此是在血浆中是不可测量的活性三磷酸酯(1-6)的替代物。

方案1



[0042]

[0043] 在一个实施方案中,本发明是化合物2及其在有需要的宿主中治疗丙型肝炎(HCV)的用途,其任选地在药学上可接受的载体中。在一个方面,化合物2以非晶固体形式使用。在另一方面,化合物2以结晶固体形式使用。

[0044] 本发明进一步包括用于制备化合物2的示例性非限定方法,其包括:

[0045] (i) 第一步,在烧瓶或容器中,将化合物1溶解在有机溶剂(例如丙酮、乙酸乙酯、甲醇、乙腈或乙醚等)中;

[0046] (ii) 向第二烧瓶或容器中加入第二有机溶剂,其可以与步骤(i)中的有机溶剂相同或不同,任选地将第二溶剂冷却至0-10℃,并逐滴加入H₂SO₄至第二有机溶剂,从而生成H₂SO₄/有机溶剂混合物;其中溶剂例如可以是甲醇;

[0047] (iii) 在环境温度或略微升高或降低的温度(例如23-35℃)下,将来自步骤(ii)的H₂SO₄/溶剂混合物以0.5/1.0的摩尔比滴加到步骤(i)的化合物1的溶液中;

[0048] (iv) 在例如环境温度或略微升高或降低的温度下,搅拌步骤(iii)的反应直至形成化合物2的沉淀;

[0049] (v) 任选地过滤由步骤(iv)得到的沉淀物,并用有机溶剂洗涤;和

[0050] (vi) 任选地在升高的温度(例如55、56、57、58、59或60℃)下,任选地在真空中干燥所得化合物2。

[0051] 在一个实施方案中,步骤(i)中的有机溶剂是3-甲基-2-戊酮。在一个实施方案中,步骤(i)中的有机溶剂是乙基异丙基酮。在一个实施方案中,步骤(i)中的有机溶剂是丙酸甲酯。在一个实施方案中,步骤(i)中的有机溶剂是丁酸乙酯。

[0052] 尽管存在大量抗病毒核苷的文献和专利申请,但化合物2尚未被具体公开。因此,本发明包括本文所述的化合物2、或其药学上可接受的组合物或剂型。

[0053] 提供化合物、方法、剂型和组合物,用于通过给予有效量的化合物2来治疗感染HCV病毒的宿主。在某些实施方案中,化合物2以至少约100、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、或1000mg的剂量给予。在某些实施方案中,化合物2给予最多12周、最多10周、最多8周、最多6周、或最多4周。在替代的实施方案中,化合物2给予至少4周、至少6周、至少8周、至少10周、或至少12周。在某些实施方案中,化合物2至少每天一次或每隔一天一次给予。在某些实施方案中,化合物2以一种剂型给予,所述剂型实现约15-75ng/mL之间的代谢物1-7的稳态血药谷水平(C_{24,ss})。在一个实施方案中,化合物2以一种剂型给予,所述剂型实现约20-60ng/mL之间的代谢物1-7的稳态血药谷水平(C_{24,ss})。在某些实施方案中,化合物2以一种剂型给予,所述剂型实现约1200ng*h/mL和3,000ng*h/mL之间的代谢物1-7的AUC。在一个实施方案中,化合物2以一种剂型给予,所述剂型实现约1500和2,100ng*h/mL之间的代谢物1-7的AUC。

[0054] 所述化合物、组合物和剂型也可用于治疗相关病症,诸如抗HCV抗体阳性和抗原阳性病症、基于病毒的慢性肝炎、由晚期丙型肝炎引起的肝癌(肝细胞性癌症(HCC))、肝硬化、慢性或急性丙型肝炎、暴发性丙型肝炎、慢性持续性丙型肝炎、和基于抗HCV的疲劳。所述化合物或包括该化合物的制剂也可以预防性用于避免或限制抗HCV抗体或抗原阳性的个体、或已经暴露于丙型肝炎的个体的临床病症的进展。

[0055] 因此,本发明包括以下特征:

[0056] (a) 本文所述的化合物2;

[0057] (b) 化合物2的前药

[0058] (c) 化合物2在制造药物中的用途,所述药物用于治疗丙型肝炎病毒感染;

[0059] (d) 化合物2,其用于治疗丙型肝炎,其任选地在药学上可接受的载体中;

[0060] (e) 一种制造意图用于治疗用途的药物的方法,所述用途是用于治疗丙型肝炎病毒感染,所述方法的特征在于,将本文所述的化合物2或药学上可接受的盐用于制造;

[0061] (e) 一种药物制剂,其包含有效的宿主治疗量的化合物2、和药学上可接受的载体

或稀释剂；

[0062] (f) 用于制备治疗产品的方法，所述治疗产品包含有效量的化合物2；

[0063] (g) 固体剂型，其包括提供有利的药代动力学曲线的剂型；以及

[0064] (h) 用于制造化合物2的方法，本文所述。

附图说明

[0065] 图1A是在稳定性研究之前，出于表征目的而在实施例2和实施例5中描述样品1-1 (非晶化合物1)、1-2 (结晶化合物1) 和1-3 (非晶化合物2) 的XRPD衍射图的叠加图。x轴是以度为单位测量的 2θ ，y轴是以计数测量的强度。

[0066] 图1B是在实施例2中描述的非晶化合物1 (样品1-1) 的HPLC色谱，以确定纯度。样品的纯度为98.7%。x轴是以分钟为单位测量的时间，y轴是以计数测量的强度。

[0067] 图2A是在实施例2中描述的结晶化合物1 (样品1-2) 的HPLC色谱，以确定纯度。样品的纯度为99.11%。x轴是以分钟为单位测量的时间，y轴是以计数测量的强度。

[0068] 图2B是在稳定性研究之前，出于表征目的而在实施例2中描述的结晶化合物1 (样品1-2) 的DSC和TGA图。x轴是以 $^{\circ}\text{C}$ 测量的温度，左y轴是以 (W/g) 测量的热流量，右y轴是以百分比测量的重量。

[0069] 图3是化合物1的X射线晶体学图像，其示于实施例2中描述的绝对立体化学。

[0070] 图4A是在实施例2中描述的，在 25°C 和60%相对湿度下储存14天后的样品1-1 (非晶化合物1)、1-2 (结晶化合物1) 和1-3 (非晶化合物2) 的XRPD衍射图的叠加图。x轴是以度为单位测量的 2θ ，y轴是以计数测量的强度。

[0071] 图4B是在实施例4中描述的，在 25°C 和60%相对湿度下储存7天后的样品1-4、1-5、1-6、1-7和1-9的XRPD衍射图的叠加图。x轴是以度为单位测量的 2θ ，y轴是以计数测量的强度。

[0072] 图5A是在实施例4中描述的，在 25°C 和60%相对湿度下储存14天后的样品1-4、1-6、1-7和1-9的XRPD衍射图的叠加图。x轴是以度为单位测量的 2θ ，y轴是以计数测量的强度。

[0073] 图5B是在实施例5中描述的非晶化合物2 (样品1-3) 的XRPD图案。x轴是以度为单位测量的 2θ ，y轴是以计数测量的强度。

[0074] 图6A是在实施例5中描述的非晶化合物2 (样品1-3) 的HPLC色谱，以确定纯度。样品的纯度为99.6%。x轴是以分钟为单位测量的时间，y轴是以计数测量的强度。

[0075] 图6B是在稳定性研究之前，出于表征目的而在实施例5中描述的结晶化合物2 (样品1-3) 的DSC和TGA图。x轴是以 $^{\circ}\text{C}$ 测量的温度，左y轴是以 (W/g) 测量的热流量，右y轴是以百分比测量的重量。

[0076] 图7A是由化合物2的结晶 (实施例6) 中鉴定出的结晶样品 (样品2-2、2-6和2-7)、以及弱结晶样品 (样品2-3、2-4、2-5和2-8) 的XRPD衍射图的叠加图。x轴是以度为单位测量的 2θ ，y轴是以计数测量的强度。

[0077] 图7B是由化合物2的结晶 (实施例6) 中鉴定出的非晶样品 (样品2-9、2-10和2-11) 的XRPD衍射图的叠加图。x轴是以度为单位测量的 2θ ，y轴是以计数测量的强度。

[0078] 图8A是在 25°C 和60%相对湿度下储存6天后的样品 (样品2-2、2-3、2-4、2-5、2-6、2-7和2-8) 的XRPD衍射图的叠加图 (实施例6)。x轴是以度为单位测量的 2θ ，y轴是以计数测

量的强度。

[0079] 图8B是样品2-2的DSC和TGA图(实施例6)。x轴是以℃测量的温度,左y轴是以(W/g)测量的热流量,右y轴是以百分比测量的重量。DSC和TGA收集的实验程序在实施例2中给出。

[0080] 图9A是样品2-3的DSC和TGA图(实施例6)。x轴是以℃测量的温度,左y轴是以(W/g)测量的热流量,右y轴是以百分比测量的重量。DSC和TGA收集的实验程序在实施例2中给出。

[0081] 图9B是样品2-4的DSC和TGA图(实施例6)。x轴是以℃测量的温度,左y轴是以(W/g)测量的热流量,右y轴是以百分比测量的重量。DSC和TGA收集的实验程序在实施例2中给出。

[0082] 图10A是样品2-5的DSC和TGA图(实施例6)。x轴是以℃测量的温度,左y轴是以(W/g)测量的热流量,右y轴是以百分比测量的重量。DSC和TGA收集的实验程序在实施例2中给出。

[0083] 图10B是样品2-6的DSC和TGA图(实施例6)。x轴是以℃测量的温度,左y轴是以(W/g)测量的热流量,右y轴是以百分比测量的重量。DSC和TGA收集的实验程序在实施例2中给出。

[0084] 图11A是样品2-7的DSC和TGA图(实施例6)。x轴是以℃测量的温度,左y轴是以(W/g)测量的热流量,右y轴是以百分比测量的重量。DSC和TGA收集的实验程序在实施例2中给出。

[0085] 图11B是样品2-8的DSC和TGA图(实施例6)。x轴是以℃测量的温度,左y轴是以(W/g)测量的热流量,右y轴是以百分比测量的重量。DSC和TGA收集的实验程序在实施例2中给出。

[0086] 图12A是在实施例7中讨论的非晶化合物4(样品3-12)的XRPD图案。x轴是以度为单位测量的 2θ ,y轴是以计数测量的强度。无论使用何种溶剂,都未观察到丙二酸盐的结晶。

[0087] 图12B是由试图用丙二酸盐结晶化合物1中鉴定出的非晶样品(样品3-6、3-10、3-11和3-12)的XRPD衍射图的叠加图(实施例7)。x轴是以度为单位测量的 2θ ,y轴是以计数测量的强度。

[0088] 图13A是在实施例7中描述的来自试图用丙二酸盐结晶化合物1的样品3-12的HPLC色谱图。样品纯度为99.2%。x轴是以分钟为单位测量的时间,y轴是以mAu测量的强度。

[0089] 图13B是在实施例8中描述的与化合物1(样品1-2)相比,由使用LAG结晶得到的固体样品(样品4-13、4-12、4-9、4-3和4-1)的XRPD衍射图的叠加图。所有XRPD都与结晶的酸抗衡离子的图案匹配,没有额外的峰。x轴是以度为单位测量的 2θ ,y轴是以计数测量的强度。

[0090] 图14A是在实施例10中描述的与结晶化合物1(样品1-2)相比由使用乙酸乙酯作为结晶化溶剂获得的样品(样品6-13、6-12、6-11、6-10、6-8、6-7、6-6、6-5、6-4和6-2)的XRPD衍射图的叠加图。总体发现XRPD图案与化合物1图案匹配,除了样品6-2、6-4和6-5表现出轻微差异。x轴是以度为单位测量的 2θ ,y轴是以计数测量的强度。

[0091] 图14B是在实施例9中描述的样品5-1在MEK中第二次溶解并且加入反溶剂环己烷和帕莫酸后的XRPD衍射图的叠加图。样品5-1在帕莫酸中结晶,在熟化后是固体,但XRPD图案与帕莫酸的图案匹配。

[0092] 图15A是在实施例10中描述的与结晶化合物1(样品1-2)相比使用乙酸乙酯作为结晶溶剂获得的样品(样品6-5、6-4和6-2)的XRPD衍射图的叠加图。总体发现XRPD图案与化合物1图案匹配,除了样品6-2、6-4和6-5表现出轻微差异。x轴是以度为单位测量的 2θ ,y轴是

以计数测量的强度,并且标记出结晶化中使用的酸。

[0093] 图15B是在实施例14中描述的化合物2的XRPD图案。x轴是以度为单位测量的 2θ ,y轴是以计数测量的强度。

[0094] 图16A是在狗、大鼠、猴的肝脏和心脏中活性TP(代谢物1-6)浓度水平的图(实施例18)。x轴是每种物质以mg/kg测量的剂量,y轴是以ng/g测量的活性TP浓度。

[0095] 图16B是单次口服给药化合物1或化合物2的4小时后测量的在狗的肝脏和心脏中活性TP(代谢物1-6)浓度水平($n=2$)的图(实施例19)。x轴是以mg/kg测量的每种化合物的剂量,y轴是以ng/g测量的活性TP浓度。

[0096] 图17是在给药后72小时给予单次500mg/kg口服剂量的化合物2(实施例20)的大鼠中化合物1和代谢物1-7的血浆曲线。x轴是以小时为单位测量的时间,y轴是以ng/mL测量的血药浓度。

[0097] 图18是给予单剂量口服30mg、100mg或300mg化合物2(实施例20)后化合物1和代谢物1-7在血浆中的血浆曲线。x轴是以小时为单位测量的时间,y轴是以ng/mL测量的血药浓度。

[0098] 图19为以nM测量的索非布韦和化合物1抗HCV临床分离株的 EC_{95} 的图。化合物1的 EC_{95} 值比索非布韦低7-33倍(实施例22)。x轴用基因型标识,y轴是以nM测量的 EC_{95} 。

[0099] 图20是以nM测量的索非布韦和化合物1抗HCV基因型1a、1b、2a、3a、4a和5a的实验室毒株的 EC_{50} 的图。在基因型1-5中,化合物1的效力比索非布韦高约6-11倍(实施例22)。x轴用基因型标记,y轴是以nM测量的 EC_{50} 。

[0100] 图21是在实施例24中描述的研究中B部分的所有群组中在给予单剂量的化合物2后化合物1的平均血药浓度-时间曲线的图。在来自B部分的所有组群中,化合物1在约8小时内被快速吸收并快速代谢。x轴是以小时测量的时间,y轴是以ng/mL测量的几何平均血药浓度。

[0101] 图22是在实施例24中描述的研究中B部分的所有群组中在给予单剂量的化合物2后代物1-7的平均血药浓度-时间曲线的图。在来自B部分的所有组群中,代谢物1-7显示出持久的血药浓度。x轴是以小时测量的时间,y轴是以ng/mL测量的几何平均血药浓度。

[0102] 图23A是在实施例24中描述的1b群组中入组的受试者的个体药代动力学/药效学分析。该图显示了血浆代谢物1-7暴露和HCV RNA减少水平。虚线表示为了维持高于抗GT1b的 EC_{95} 值的病毒应答所需的代谢物1-7的最小浓度。x轴是以小时为单位测量的时间。左y轴是以ng/mL测量的代谢物1-7血药浓度,右y轴是以 $\log_{10}$ IU/mL测量的HCV RNA减少量。

[0103] 图23B是在实施例24中描述的1b群组中入组的受试者的个体药代动力学/药效学分析。该图显示了血浆代谢物1-7暴露和HCV RNA减少水平。虚线表示为了维持高于抗GT1b的 EC_{95} 值的病毒应答所需的代谢物1-7的最小浓度。x轴是以小时为单位测量的时间。左y轴是以ng/mL测量的代谢物1-7血药浓度,右y轴是以 $\log_{10}$ IU/mL测量的HCV RNA减少量。

[0104] 图23C在实施例24中描述的1b群组中入组的受试者的个体药代动力学/药效学分析。该图显示了血浆代谢物1-7暴露和HCV RNA减少水平。虚线表示为了维持高于抗GT1b的 EC_{95} 值的病毒应答所需的代谢物1-7的最小浓度。x轴是以小时为单位测量的时间。左y轴是以ng/mL测量的代谢物1-7血药浓度,右y轴是以 $\log_{10}$ IU/mL测量的HCV RNA减少量。

[0105] 图23D是在实施例24中描述的3b群组中入组的受试者的个体药代动力学/药效学

分析。该图显示了血浆代谢物1-7暴露和HCV RNA减少水平。虚线表示为了维持高于抗GT1b的 EC_{95} 值的病毒应答所需的代谢物1-7的最小浓度。x轴是以小时为单位测量的时间。左y轴是以ng/mL测量的代谢物1-7血药浓度,右y轴是以 $\log_{10}$ IU/mL测量的HCV RNA减少量。

[0106] 图23E是在实施例24中描述的3b群组中入组的受试者的个体药代动力学/药效学分析。该图显示了血浆代谢物1-7暴露和HCV RNA减少水平。虚线表示为了维持高于抗GT1b的 EC_{95} 值的病毒应答所需的代谢物1-7的最小浓度。x轴是以小时为单位测量的时间。左y轴是以ng/mL测量的代谢物1-7血药浓度,右y轴是以 $\log_{10}$ IU/mL测量的HCV RNA减少量。

[0107] 图23F是在实施例24中描述的3b群组中入组的受试者的个体药代动力学/药效学分析。该图显示了血浆代谢物1-7暴露和HCV RNA减少水平。虚线表示为了维持高于抗GT1b的 EC_{95} 值的病毒应答所需的代谢物1-7的最小浓度。x轴是以小时为单位测量的时间。左y轴是以ng/mL测量的代谢物1-7血药浓度,右y轴是以 $\log_{10}$ IU/mL测量的HCV RNA减少量。

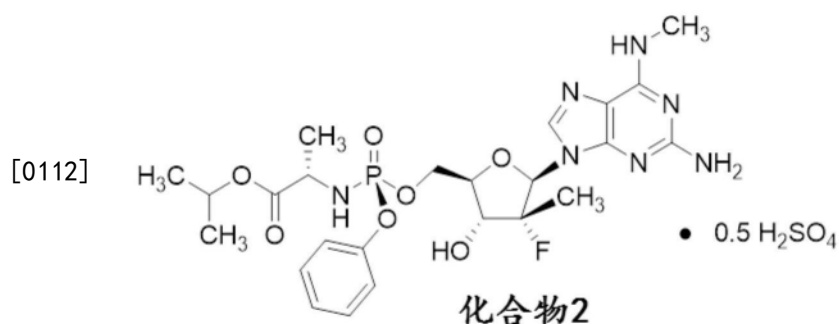
[0108] 图24是化合物1和索非布韦抗GT1、GT2、GT3和GT4HCV感染患者的临床分离株的 EC_{95} 值的图。水平虚线(----)表示索非布韦400mg QD给药后索非布韦核苷的稳态谷浓度($C_{24,ss}$)。水平实线(——)表示600mg的化合物2(等效于550mg化合物1)后代谢物1-7的稳态谷浓度($C_{24,ss}$)。水平点线(•••••)表示450mg的化合物2(等效于400mg化合物1)后代谢物1-7的稳态谷浓度($C_{24,ss}$)。如实施例25中所讨论的、600mg和450mg的化合物2后的代谢物1-7的预测稳态血药谷水平($C_{24,ss}$)超过化合物1抗所有受试临床分离株的体外 EC_{95} 。索非布韦的稳态血药谷水平($C_{24,ss}$)仅超过GT2临床分离株的 EC_{95} 。x轴用临床分离株标注,x轴下的表列出化合物1和索非布韦的 EC_{95} 值。y轴是以ng/mL测量的抗临床分离株的 EC_{95} 值。 EC_{95} 被表示为核苷当量。每天给予(QD)索非布韦和化合物2。

[0109] 图25是在实施例26中描述的示出化合物2的50mg和100mg片剂的制备方法的流程图。在步骤1中,通过600 μ M筛来过滤微晶纤维素、化合物2、乳糖一水合物和交联羧甲基纤维素钠。在步骤2中,将来自步骤1的内容物装入V型共混机中,并以25rpm混合5分钟。在步骤3中,通过600 μ M筛来过滤硬脂酸镁。在步骤4中,将硬脂酸镁装入含有来自步骤2的内容物(微晶纤维素|化合物2、乳糖一水合物和交联羧甲基纤维素钠)的V型共混机中,并以25rpm混合2分钟。然后将常规共混物分别用于生产50mg片剂和100mg片剂。为了生产50mg片剂,将来自步骤4的共混物用6mm圆形标准凹形工具压制。为了生产100mg片剂,将来自步骤4的共混物用8mm圆形标准凹形工具压制。然后将片剂包装在用PP帽和干燥剂感应密封的HDPE瓶中。

[0110] 图26是半硫酸盐,其相对于其相应的游离碱显示出有利的药理学特性,用于治疗HCV病毒。

具体实施方式

[0111] 本发明在此公开一种化合物、方法、组合物和固体剂型,用于治疗HCV病毒在人和其他宿主动物中感染或暴露,包括给予有效量的((S)-((2R,3R,4R,5R)-5-(2-氨基-6-(甲基氨基)-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)-L-丙氨酸异丙酯的半硫酸盐(化合物2),其任选地在药学上可接受的载体中。在一个实施方案中,化合物2是非晶固体。在又一个实施方案中,化合物2是结晶固体。



[0113] 所述化合物、组合物、和剂型也可用于治疗涉及HCV病毒暴露或由HCV病毒暴露引起的病症。例如，活性化合物可用于治疗HCV抗体阳性和HCV抗原阳性病症、基于病毒的慢性肝炎、由晚期丙型肝炎引起的肝癌（例如，肝细胞性癌症）、肝硬化、急性丙型肝炎、暴发性丙型肝炎、慢性持续性丙型肝炎和基于抗HCV的疲劳。

[0114] 活性化合物和组合物也可用于治疗大范围的HCV基因型。全球已鉴别出至少六种不同的基因型的HCV，其中每一个具有多个亚型。基因型1-3在世界范围内普遍存在，并且基因型4、5和6在地理上更局限。基因型4在中东和非洲常见。基因型5在南非最常见。基因型6主要存在于东南亚。尽管美国最常见的基因型是基因型1，但定义基因型和亚型可以有助于治疗类型和持续时间。例如，不同的基因型对不同的药物的应答不同，并且最佳治疗时间根据基因型感染而变化。在基因型内，亚型、诸如基因型1a和基因型1b对治疗也有不同的应答。被一种基因型感染并不排除在后被不同的基因型感染。

[0115] 如实施例22中所述，化合物2对大范围的HCV基因型具有活性，包括基因型1-5。在一个实施方案中，化合物2用于治疗HCV基因型1、HCV基因型2、HCV基因型3、HCV基因型4、HCV基因型5或HCV基因型6。在一个实施方案中，化合物2用于治疗HCV基因型1a。在一个实施方案中，化合物2用于治疗HCV基因型1b。在一个实施方案中，化合物2用于治疗HCV基因型2a。在一个实施方案中，化合物2用于治疗HCV基因型2b。在一个实施方案中，化合物2用于治疗HCV基因型3a。在一个实施方案中，化合物2用于治疗HCV基因型4a。在一个实施方案中，化合物2用于治疗HCV基因型4d。

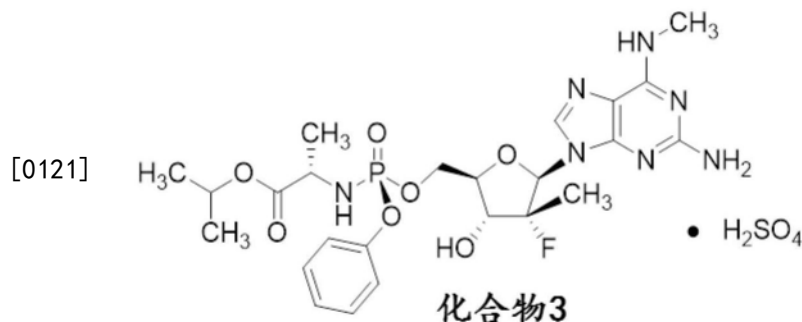
[0116] 在一个实施方案中，化合物1或化合物2用于治疗HCV基因型5a。在一个实施方案中，化合物1或化合物2用于治疗HCV基因型6a。在一个实施方案中，化合物1或化合物2用于治疗HCV基因型6b、6c、6d、6e、6f、6g、6h、6i、6j、6k、6l、6m、6n、6o、6p、6q、6r、6s、6t或6u。

[0117] 如实施例25中所讨论并在图24中示出的，给药450mg（400mg游离碱）和600mg（550mg游离碱）的化合物2后代物1-7的预测稳态谷浓度（ $C_{24,ss}$ ）为约40ng/mL至50ng/mL。该 $C_{24,ss}$ 水平超过化合物1在HCV基因型1a、1b、2a、2b、3a、4a和4d中的 EC_{95} 。该数据证实了化合物2具有有效的泛基因型活性。这是出人意料的，因为化合物2实现了比等效索非布韦给药后索非布韦的核苷代谢物的稳态谷浓度（ $C_{24,ss}$ ）更小的稳态谷浓度（ $C_{24,ss}$ ）。相应的索非布韦的核苷代谢物的稳态谷浓度（ $C_{24,ss}$ ）为约100ng/mL，但该水平仅超过索非布韦对GT2临床分离株的 EC_{95} （图24）。化合物2与索非布韦相比，对GT1、GT2、GT3和GT4更有效，因此允许递送更小的其代谢物稳态谷浓度但对所有受试的HCV基因型仍然有效的剂型。在一个实施方案中，递送化合物2的剂型，其实现代谢物1-7稳态谷浓度（ $C_{24,ss}$ ）为约15-75ng/mL之间。在一个实施方案中，递送化合物2的剂型，其实现代谢物1-7稳态谷浓度（ $C_{24,ss}$ ）为约20-60ng/mL、20-50ng/mL或20-40ng/mL之间。

[0118] 在一个实施方案中,包括该化合物的化合物、制剂或固体剂型也可以预防性地在HCV抗体或HCV抗原阳性的个体、或已暴露于丙型肝炎的个体中用于避免或延缓临床疾病的进展。

[0119] 特别地,已发现化合物2是抗HCV活性的,并且相比于其游离碱(化合物1)显示出优异的药物类和药理学特性。出人意料的是,化合物2比化合物1的生物利用度更高并实现了更高的AUC(实施例19),并且化合物2比化合物1对靶器官肝脏更具选择性(实施例19)。

[0120] 化合物2在溶解度和化学稳定性方面也优于化合物1。这是出人意料的,因为((S)-(((2R,3R,4R,5R)-5-(2-氨基-6-(甲基氨基)-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)-L-丙氨酸异丙酯的单硫酸(化合物3)不稳定,并且表现出粘性胶状外观,而化合物2(半硫酸盐)是稳定的白色固体。半硫酸盐无论作为固体还是在固体剂型中,经过9个月也非常稳定并且不吸湿。

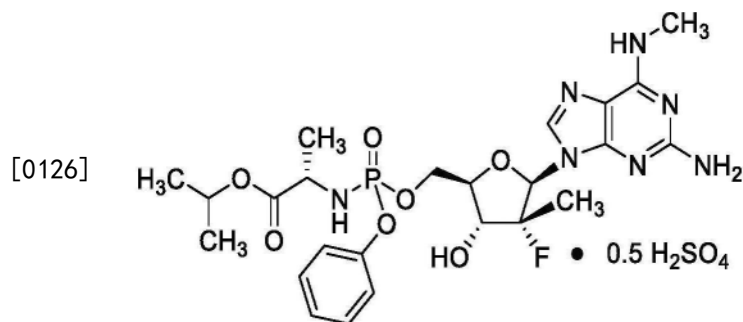


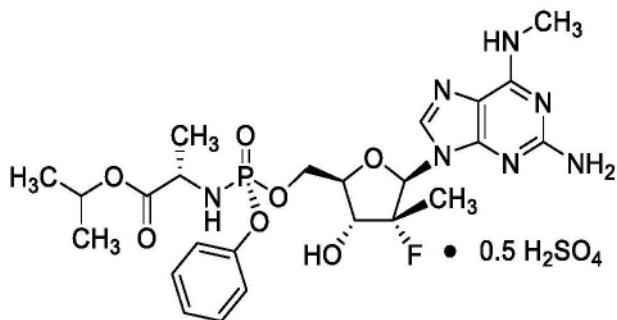
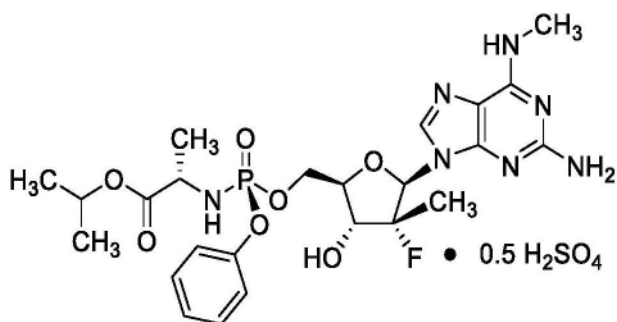
[0122] 尽管存在大量抗病毒核苷的文献和专利申请,但化合物2尚未被具体公开。

[0123] 化合物2在磷原子上具有S-立体化学,其已经用X射线晶体学证实(图3,实施例2)。在替代的实施方式中,化合物2可以以磷R-和S-对映异构体的任意所需比例形式使用,包括高达纯对映异构体。在一些实施方案中,化合物2以至少90%排除相反对映异构体的形式使用,并且可以至少98%、99%或甚至100%排除相反对映异构体。除非另有说明,对映异构体富集的化合物2至少90%排除相反的对映异构体。另外,在一个替代的实施方案中,氨基磷酸酯的氨基酸可以是D-或L-构型、或其混合物,其包括外消旋混合物。

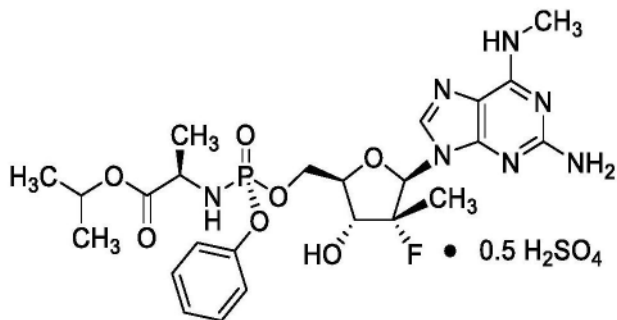
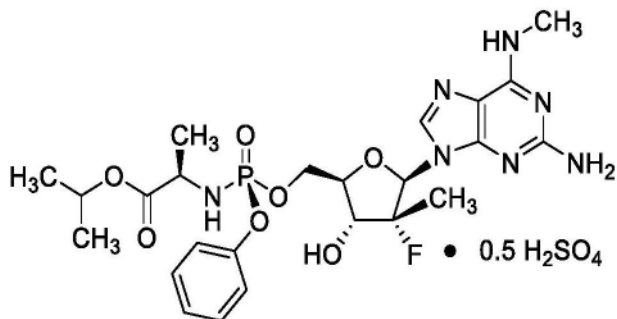
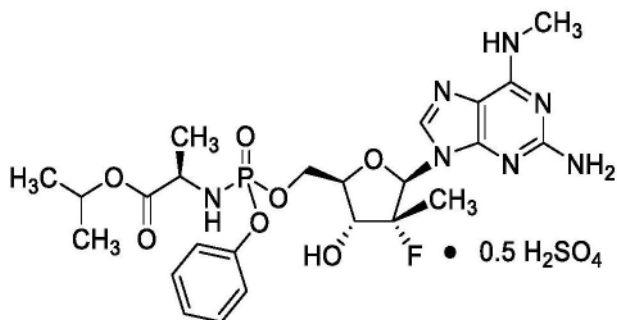
[0124] 除非另有说明,本文所述的化合物以β-D-构型提供。在一个替代的实施方案中,化合物可以以β-L构型提供。同样地,可以以外消旋、对映异构体、非对映异构体、或它们的任意混合物的形式提供表现出手性的任何取代基团。当氨基磷酸酯表现出手性时,它可以以R或S手性磷衍生物或其混合物的形式提供,其包括外消旋混合物。这些立体构型的所有组合是本文所述发明中的替代的实施方案。在另一个实施方案中,化合物2(核苷酸或半硫酸盐)中的至少一个氢可以被氘替代。

[0125] 这些替代的构型包括但不限于,





[0127]



[0128] I. ((S)-(((2R,3R,4R,5R)-5-(2-氨基-6-(甲基氨基)-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)磷酰基)-L-丙氨酸异丙酯的半硫酸盐(化合物2)

[0129] 本发明的活性化合物是化合物2,其可以以其药学上可接受的组合物或固体剂型

提供。在一个实施方案中,化合物2是非晶固体。在又一个实施方案中,化合物2是结晶固体。

[0130] 化合物2的合成

[0131] 本发明进一步包括用于制备化合物2的非限制性说明性方法,其包括:

[0132] (i) 第一步,在烧瓶或容器中,将化合物1溶解在有机溶剂(例如丙酮、乙酸乙酯、甲醇、乙腈或乙醚等)中;

[0133] (ii) 向第二烧瓶或容器中加入第二有机溶剂,其可以与步骤(i)中的有机溶剂相同或不同,任选地将第二溶剂冷却至0-10℃,并逐滴加入H₂SO₄至第二有机溶剂,从而生成H₂SO₄/有机溶剂混合物;其中溶剂例如可以是甲醇;

[0134] (iii) 在环境温度或略微升高或降低的温度(例如23-35℃)下,将来自步骤(ii)的H₂SO₄/溶剂混合物以0.5/1.0的摩尔比滴加到步骤(i)的化合物1的溶液中;

[0135] (iv) 在例如环境温度或略微升高或降低的温度下,搅拌步骤(iii)的反应直至形成化合物2的沉淀;

[0136] (v) 任选地过滤由步骤(iv)得到的沉淀物,并用有机溶剂洗涤;和

[0137] (vi) 任选地在升高的温度(例如55、56、57、58、59或60℃)下,任选地在真空中干燥所得化合物2。

[0138] 在某些实施方案中,上述步骤(i)在丙酮中进行。此外,步骤(ii)中的第二有机溶剂可以是例如甲醇,并且步骤(v)中的有机溶剂混合物是甲醇/丙酮。

[0139] 在一个实施方案中,在步骤(i)中将化合物1溶解在乙酸乙酯中。在一个实施方案中,在步骤(i)中将化合物1溶解在四氢呋喃中。在一个实施方案中,在步骤(i)中将化合物1溶解在乙腈中。在另一个实施方案中,在步骤(i)中将化合物1溶解在二甲基甲酰胺中。

[0140] 在一个实施方案中,步骤(ii)中的第二有机溶剂是乙醇。在一个实施方案中,步骤(ii)中的第二有机溶剂是异丙醇。在一个实施方案中,步骤(ii)中的第二有机溶剂是正丁醇。

[0141] 在一个实施方案中,溶剂混合物在步骤(v)中用于洗涤,例如是乙醇/丙酮。在一个实施方案中,步骤(v)中用于洗涤的溶剂混合物是异丙醇/丙酮。在一个实施方案中,步骤(v)中用于洗涤的溶剂混合物是正丁醇/丙酮。在一个实施方案中,步骤(v)中用于洗涤的溶剂混合物是乙醇/乙酸乙酯。在一个实施方案中,步骤(v)中用于洗涤的溶剂混合物是异丙醇/乙酸乙酯。在一个实施方案中,步骤(v)中用于洗涤的溶剂混合物是正丁醇/乙酸乙酯。在一个实施方案中,步骤(v)中用于洗涤的溶剂混合物是乙醇/四氢呋喃。在一个实施方案中,步骤(v)中用于洗涤的溶剂混合物是异丙醇/四氢呋喃。在一个实施方案中,步骤(v)中用于洗涤的溶剂混合物是正丁醇/四氢呋喃。在一个实施方案中,步骤(v)中用于洗涤的溶剂混合物是乙醇/乙腈。在一个实施方案中,步骤(v)中用于洗涤的溶剂混合物是异丙醇/乙腈。在一个实施方案中,步骤(v)中用于洗涤的溶剂混合物是正丁醇/乙腈。在一个实施方案中,步骤(v)中用于洗涤的溶剂混合物是乙醇/二甲基甲酰胺。在一个实施方案中,步骤(v)中用于洗涤的溶剂混合物是异丙醇/二甲基甲酰胺。在一个实施方案中,步骤(v)中用于洗涤的溶剂混合物是正丁醇/二甲基甲酰胺。

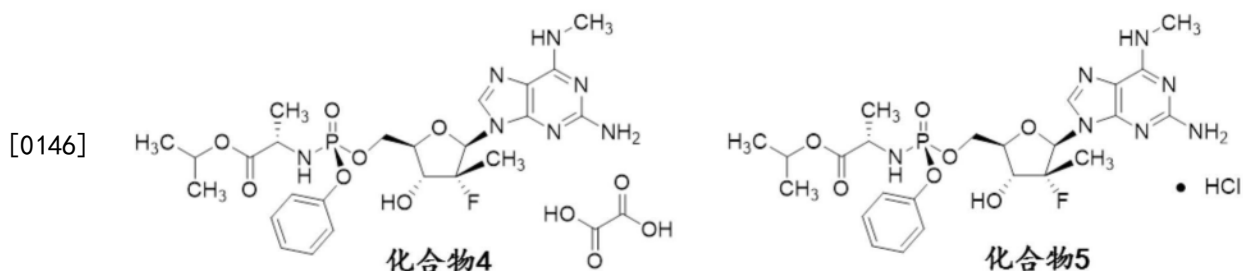
[0142] II. ((S)-(((2R,3R,4R,5R)-5-(2-氨基-6-(甲基氨基)-9H-嘌呤-9-基)-4-氟-3-羟基-4-甲基四氢呋喃-2-基)甲氧基)(苯氧基)磷酰基)-L-丙氨酸异丙酯(化合物2)的代谢

[0143] 化合物1和化合物2的代谢涉及产生5'-单磷酸酯、和随后的N⁶-甲基-2,6-二氨基

嘌呤碱(1-3)的合成代谢以生成作为5'-单磷酸酯的((2R,3R,4R,5R)-5-(2-氨基-6-氧代-1,6-二氢-9H-嘌呤-9-基)-4-氟-3-羟基-4-甲基四氢呋喃-2-基)甲基二氢磷酸酯(1-4)。然后,将单磷酸酯进一步合成代谢为活性三磷酸酯物种:5'-三磷酸酯(1-6)。5'-三磷酸酯可以是进一步被代谢,以生成2-氨基-9-((2R,3R,4R,5R)-3-氟-4-羟基-5-(羟基甲基)-3-甲基四氢呋喃-2-基)-1,9-二氢-6H-嘌呤-6-酮(1-7)。或者,5'-单磷酸酯1-2可以被代谢,以生成嘌呤碱1-8。((S)-(((2R,3R,4R,5R)-5-(2-氨基-6-(甲基氨基)-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)磷酰基)-L-丙氨酸异丙酯的代谢途径在方案1中说明(如上所示)。

[0144] III. 化合物1的其他盐

[0145] 在替代的实施方案中,本发明以草酸盐(化合物4)或HCl盐(化合物5)形式提供化合物1。



[0147] 1:1草酸盐和1:1HCl盐均形成固体,具有用于固体剂型的合理特性,用于治疗患有丙型肝炎的宿主、例如人。然而,如果患者易患肾结石,则草酸盐可能是不太期望的,并且可能不适合。HCl盐比半硫酸盐更具吸湿性。因此,半硫酸盐仍然是具有预料不到特性的化合物1的最期望的盐形式。

[0148] IV. 定义

[0149] 如在本发明的上下文中使用的术语“D-构型”指与非天然存在核苷或“L”构型相反的、模拟糖部分的天然构型的主要构型。术语“β”或“β端基异构体”用于指代核苷类似物,其中核苷碱基被装配(配置)在该核苷类似物中呋喃糖部分的平面之上。

[0150] 术语“共给予”和“共同给予”或组合治疗用于描述给予根据本发明所述的所述的化合物2与至少一种其它活性药剂的组合,例如当适合时至少一种另外的抗HCV药剂。共同给予的时机最好由治疗患者的医学专家确定。有时优选同时给予所述药剂。或者,选择用于组合治疗的药物可以在不同时间给予患者。当然,当存在多于一种病毒、其它感染或其它病症时,根据需要,本发明的化合物可以组合其它药剂以治疗其它感染或病症。

[0151] 如本文使用的术语“宿主”是指其中HCV病毒可以复制的单细胞或多细胞生物,包括细胞系和动物,典型为人类。术语宿主特别地指受感染细胞、转染全部或部分HCV基因组的细胞、以及动物,特别是灵长类动物(包括黑猩猩)和人。在本发明的大多数动物应用中,宿主为人患者。然而,在某些情形中,本发明显然预期兽医应用(例如黑猩猩)。宿主可以为例如牛类、马类、鸟类、犬科动物、猫科动物等。

[0152] 同位素替代

[0153] 本发明包括以高于天然同位素丰度(即富集)的量具有期望的原子同位素替代的化合物和化合物2的用途。同位素是具有相同原子序数但质量数不同的原子,即质子数相同但中子数不同的原子。以一般实例的方式而不加以限定,可以在所述结构中的任意位置使

用氢的同位素、例如氘 (^2H) 和氚 (^3H)。替代地或另外地,可以使用碳的同位素、例如 ^{13}C 和 ^{14}C 。优选的同位素替代是在分子上的一个或多个位置用氘替代氢,以改善药物的性能。氘可以结合在代谢过程中的键断裂的位置(α -氘动力学同位素效应)、或在键断裂位置相邻位置或附近(β -氘动力学同位素效应)。Achillion Pharmaceuticals, Inc. (WO/2014/169278和WO/2014/169280) 描述了核苷酸的氘代以改善其药代动力学或药效学,包括在分子的5-位氘代。

[0154] 用同位素例如氘替代由于更大的代谢稳定性、例如增加的体内半衰期或减少的剂量需求,从而可以提供某些治疗优势。在代谢分解位点用氘替代氢可以降低该键处的代谢速率或消除该键处的代谢。在可以存在氢原子的化合物的任何位置,氢原子可以是氢的任何同位素,包括氕 (^1H)、氘 (^2H) 和氚 (^3H)。因此,除非上下文另有明确规定,本文提及的化合物包括所有潜在的同位素形式。

[0155] 术语“同位素标记的”类似物是指作为“氘代类似物”、“ ^{13}C -标记的类似物”或“氘代/ ^{13}C -标记类似物”的类似物。术语“氘代类似物”是指其中H-同位素、即氢/氕 (^1H) 被H-同位素即氘 (^2H) 替代的本文所述化合物。氘替代可以是部分的或完全的。部分氘替代是指至少一个氢被至少一个氘替代。在某些实施方案中,同位素是在任何感兴趣的位置同位素富集90、95或99%。在一些实施方案中,其为在期望位置富集90、95或99%的氘。除非与指示相反,氘代在选定位置为至少80%。核苷的氘代可以发生在任何可替代的氢处,其提供期望的结果。

[0156] V. 治疗或预防方法

[0157] 如本文使用的治疗是指将化合物2给予被HCV病毒感染或可能被感染的宿主、例如人。

[0158] 术语“预防性的”或预防,当使用时,是指给予化合物2以预防或减少病毒性病症发生的可能性。本发明同时包括治疗和预防或预防性治疗。在一个实施方案中,将化合物2给予已经暴露于且因此处于丙型肝炎病毒感染的感染风险中的宿主。

[0159] 本发明涉及一种治疗或预防下述疾病的方法:丙型肝炎病毒(包括HCV的耐药性和多药耐药性形式和相关疾病状态、病症)、或HCV感染的并发症(包括肝硬化和相关肝毒性);以及HCV感染继发的其它病症,例如虚弱、食欲不振、体重减轻、乳房增大(特别是在男性中)、皮疹(特别是在手掌上)、血凝固困难、皮肤上的蜘蛛样血管、意识错乱、昏迷(脑病)、腹腔体液蓄积(腹水)、食管静脉曲张、门静脉高压、肾衰竭、脾肿大、血细胞减少、贫血、血小板减少症、黄疸病和肝细胞性癌症等。所述方法包括向有需要的宿主给予有效量的本文中所述的化合物2,任选地组合至少一种另外的生物活性药剂、例如另外的抗HCV药剂,进一步组合药学上可接受的载体添加剂和/或赋形剂。

[0160] 在另一个方面,本发明是一种预防或防止下述疾病的方法:HCV感染或疾病状态或相关或继发疾病状态、病症或HCV感染的并发症,包括肝硬化和相关肝毒性、虚弱、食欲不振、体重减轻、乳房增大(特别是在男性中)、皮疹(特别是在手掌上)、血凝固困难、皮肤上的蜘蛛样血管、意识错乱、昏迷(脑病)、腹腔体液蓄积(腹水)、食管静脉曲张、门静脉高压、肾衰竭、脾肿大、血细胞减少、贫血、血小板减少症、黄疸病和肝细胞性癌症等,所述方法包括向处于风险中的患者给予有效量的如上所述的化合物2与药学上可接受的载体、添加剂或赋形剂的组合,任选地组合其他抗HCV药剂。在另一个实施方案中,本发明的活性化合物可

以在肝炎相关肝移植之后给予患者以保护新器官。

[0161] 在一个替代的实施方案中,化合物2以化合物1的氨基磷酸酯的半硫酸盐形式提供,而不是化合物图示中描述的特定氨基磷酸酯。本领域技术人员已知多种氨基磷酸酯,包括各种酯和磷酸酯,其任何组合可用于以半硫酸盐形式提供本文所述的活性化合物。

[0162] VI. 药物组合物和剂型

[0163] 在本发明的一个方面,根据本发明所述的药物组合物包含抗HCV病毒有效量的本文所述的化合物2,任选地组合药学上可接受的载体、添加剂或赋形剂,进一步任选地组合或替代至少一种其他活性化合物。在一个实施方案中,本发明包括化合物2在药学上可接受的载体中的固体剂型。

[0164] 在本发明的一个方面,根据本发明所述的药物组合物包含抗HCV有效量的本文所述的化合物2,任选地组合药学上可接受的载体、添加剂或赋形剂,进一步任选地组合与至少一种其他抗病毒药剂、如抗HCV药剂。

[0165] 本发明包括药学组合物,其在药学上可接受的载体或赋形剂中,包含对于治疗丙型肝炎病毒感染而言有效量的本发明化合物2或前药。在一个替代的实施方案中,本发明包括药物组合物,其在在药学上可接受的载体或赋形剂中,包括对于预防丙型肝炎病毒感染而言有效量的本发明的化合物2或前药。

[0166] 本领域普通技术人员将认识到治疗有效量将随要治疗的感染或病症、其严重程度、要使用的治疗方案、所使用的药剂的药代动力学、以及要治疗的患者或受试者(动物或人)而变化,并且这种治疗量可由主治医师或专家确定。

[0167] 根据本发明所述的化合物2可以与药学上可接受的载体混合配制。一般而言,优选以可口服给予的形式、特别是固体剂型如丸剂或片剂来给予药物组合物。某些制剂可以通过肠胃外、静脉内、肌内、局部、经皮、口腔、皮下、栓剂、或其它途径(包括鼻内喷雾)给予。静脉内和肌肉内制剂通常以无菌盐水形式给予。本领域的普通技术人员可以修饰制剂以使得其更溶解于水或其他溶媒中,例如,这可以容易地通过较小修饰(成盐、酯化等)来完成,其完全属于本领域普通技术范围内。如在本文中更详细地描述地,修饰化合物2的给予途径和给药方案以管理本发明化合物的药代动力学,以在患者中获得最大有益效果也在常规技术范围内。

[0168] 在某些药物剂型中,可以使用化合物的前药形式、特别是包括本发明化合物的酰化(乙酰化或其他)和醚(烷基和相关)衍生物、磷酸酯、硫代氨基磷酸酯、氨基磷酸酯和各种盐形式,以实现期望的效果。本领域普通技术人员将认识到如何容易地将本发明化合物修饰成前药形式,以促进活性化合物向宿主生物或患者体内的靶向位点递送。在可用的情况下,本领域普通技术人员还将利用前药形式的有利药代动力学参数,用于将本发明化合物向宿主生物体或患者体内的靶向位点递送,以使化合物的预期效果最大化。

[0169] 根据本发明所述的治疗活性制剂中包括的化合物2的量是实现根据本发明所述的期望结果的有效量,所述例如用于治疗HCV感染、降低HCV感染的可能性、或抑制、减少和/或消除HCV或其继发效应,包括HCV继发的疾病状态、病症和/或并发症。通常,药物剂型中的本发明化合物的治疗有效量可以是每天约0.001mg/kg患者至约100mg/kg患者或更多,更常见每天略小于约0.1mg/kg患者至大于约25mg/kg患者或显著更多,取决于使用的化合物、所治疗的病症或感染、以及给予途径。化合物2通常以每天约0.1mg/kg患者至约15mg/kg患者的

量给予,这取决于患者中药剂的药代动力学。该剂量范围通常产生活性化合物的有效血液浓度,其可在患者中为约0.001至约100、约0.05至约100微克/cc血液。

[0170] 通常情况下,为了治疗、预防或延缓这些感染的发病和/或减少的HCV病毒感染的可能性、或HCV的继发性疾病状态、病症或并发症,将化合物2以固体剂型给药,其量根据健康护理提供者的导向,为至少每天一次约250微克至约800mg或更多,例如至少约5、10、20、25、50、75、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、或800mg或更多,一天一次、两次、三次或最多四次。化合物2通常口服给予,但也可以肠胃外、局部或以栓剂形式给予,以及鼻内给予、如鼻喷雾剂或本文另有说明那样。更通常地,化合物2可以以片剂、胶囊、注射剂、静脉内制剂、混悬剂、液剂、乳剂、植入物、颗粒、球形、乳膏、软膏、栓剂、可吸入形式、透皮形式、口腔、舌下、局部、凝胶或粘膜剂等形式给予。

[0171] 当本文的剂型是指mg重量剂量时,它是指化合物2的量(即,半硫酸盐的重量),除非另有相反说明。

[0172] 在某些实施方案中,药物组合物在单位剂型中,呈含有约1mg至约2000mg、约10mg至约1000mg、约100mg至约800mg、约200mg至约600mg、约300mg至约500mg、或约400mg至约450mg的化合物2的剂型。在某些实施方案中,药物组合物在单位剂型中,呈含有至多约10、约50、约100、约125、约150、约175、约200、约225、约250、约275、约300、约325、约350、约375、约400、约425、约450、约475、约500、约525、约550、约575、约600、约625、约650、约675、约700、约725、约750、约775、约800、约825、约850、约875、约900、约925、约950、约975、或约1000mg或更多的化合物2的剂型、例如固体剂型。在一个实施方案中,化合物2以递送至少约300mg的剂型给予。在一个实施方案中,化合物2以递送至少约400mg的剂型给予。在一个实施方案中,化合物2以递送至少约500mg的剂型给予。在一个实施方案中,化合物2以递送至少约600mg的剂型给予。在一个实施方案中,化合物2以递送至少约700mg的剂型给予。在一个实施方案中,化合物2以递送至少约800mg的剂型给予。在某些实施方案中,化合物2给予至少每天一次持续最多12周。在某些实施方案中,化合物2给予至少每天一次持续最多10周。在某些实施方案中,化合物2给予至少每天一次持续最多8周。在某些实施方案中,化合物2给予至少每天一次持续最多6周。在某些实施方案中,化合物2给予至少每天一次持续最多4周。在某些实施方案中,化合物2给予至少每天一次持续至少4周。在某些实施方案中,化合物2给予至少每天一次持续至少6周。在某些实施方案中,化合物2给予至少每天一次持续至少8周。在某些实施方案中,化合物2给予至少每天一次持续至少10周。在某些实施方案中,化合物2给予至少每天一次持续至少12周。在某些实施方案中,化合物2至少每隔一天给予持续最多12周、最多10周、最多8周、最多6周或最多4周。在某些实施方案中,化合物2至少每隔一天给予至少4周、至少6周、至少8周、至少10周或至少12周。在一个实施方案中,至少每天一次给予至少约600mg的化合物2持续最多6周。在一个实施方案中,至少每天一次给予至少约500mg的化合物2持续最多6周。在一个实施方案中,至少每天一次给予至少约400mg的化合物2持续最多6周。在一个实施方案中,至少每天一次给予至少约300mg的化合物2持续最多6周。在一个实施方案中,至少每天一次给予至少约200mg的化合物2持续最多6周。在一个实施方案中,至少每天一次给予至少约100mg的化合物2持续最多6周。

[0173] 代谢物1-6是化合物2的活性三磷酸酯,但代谢物1-6在血浆中是不可测量的。代谢物1-6的替代物是代谢物1-7。代谢物1-7是在血浆中可测量的核苷代谢物,并因此是代谢物

1-6的细胞内浓度的指标。对于最大的HCV抗病毒活性,化合物2的剂型必须达到代谢物1-7稳态谷浓度($C_{24,ss}$),其超过化合物2的 EC_{95} 值。如图24所示,化合物1抗GT1、GT2、GT3和GT4的临床分离株的 EC_{95} 小于25ng/mL(化合物1的 EC_{95} 和化合物2的 EC_{95} 值是相同的)。在一个实施方案中,递送化合物2的剂型,其实现约15至75ng/mL之间的代谢物1-7的稳态谷浓度($C_{24,ss}$)。在一个实施方案中,递送化合物2的剂型,其实现约20至60ng/mL之间的代谢物1-7的稳态谷浓度($C_{24,ss}$)。在一个实施方案中,送化合物2的剂型,其实现约30至60ng/mL之间的代谢物1-7的稳态谷浓度($C_{24,ss}$)。在一个实施方案中,送化合物2的剂型,其实现约20至50ng/mL之间的代谢物1-7的稳态谷浓度($C_{24,ss}$)。在一个实施方案中,送化合物2的剂型,其实现约30至50ng/mL之间的代谢物1-7的稳态谷浓度($C_{24,ss}$)。在一个实施方案中,送化合物2的剂型,其实现约20至45ng/mL之间的代谢物1-7的稳态谷浓度($C_{24,ss}$)。在一个实施方案中,送化合物2的剂型,其实现约20至30ng/mL之间的代谢物1-7的稳态谷浓度($C_{24,ss}$)。在一个实施方案中,送化合物2的剂型,其实现约20至35ng/mL之间的代谢物1-7的稳态谷浓度($C_{24,ss}$)。在一个实施方案中,递送化合物2的剂型,其实现约20至25ng/mL的代谢物1-7的稳态谷浓度($C_{24,ss}$)。近似剂型是稳态谷浓度的+10%。

[0174] 在一个实施方案中,化合物2以实现约1200和3,000ng/mL之间的代谢物1-7的AUC(曲线下面积)的量给药。在一个实施方案中,化合物2以实现约1500和3,000ng/mL之间的代谢物1-7的AUC的量给药。在一个实施方案中,化合物2以实现约1800和3,000ng/mL之间的代谢物1-7的AUC的量给药。在一个实施方案中,化合物2以实现约2100和3,000ng/mL之间的代谢物1-7的AUC的量给药。在一个优选的实施方案中,化合物2以实现约2200ng*h/mL的代谢物量1-7的AUC的量给药。近似剂型是AUC的+10%。

[0175] 在本文另外描述的化合物2与其他抗HCV化合物组合共给予的情况下,根据本发明所述的化合物2的给予量范围为约0.01mg/kg患者至约800mg/kg患者或更多、或显著更多,取决于共给予的第二药剂及其对病毒的效力、患者的状况和待治疗的疾病或感染的严重程度、以及给予途径。其他抗HCV药剂可以例如以约0.01mg/kg至约800mg/kg的量给予。第二活性剂的剂量的实例是至少每天一次约250微克至约750mg或更多的量,例如至少约5、10、20、25、50、75、100、150、200、250、300、350、400、450、500、600、700或800毫克或更多,最多一天四次。在某些优选的实施方案中,化合物2通常可以以约0.5mg/kg至约50mg/kg或更高(通常高达约100mg/kg)的量给予,通常取决于两种药剂在患者中的药代动力学。这些剂量范围通常在患者中产生有效的血液浓度的活性化合物。

[0176] 出于本发明的目的,根据本发明所述的组合物的预防或预防有效量落入与上述治疗有效量相同的浓度范围内,并且通常与治疗有效量相同。

[0177] 给予化合物2可以为连续(静脉内滴注)至每天多次口服或鼻内给予(例如一天四次)或头皮给药,并且可以包括口服、局部、肠胃外、肌内、静脉内、皮下、透皮(其可以包括渗透增强剂)、口腔和栓剂给予、以及其他给予途径。肠溶衣口服片剂也可用于增强用于口服给予途径的化合物的生物利用度。最有效的剂型取决于所选定的特定药剂的生物利用度/药代动力学、以及患者的疾病严重程度。口服剂型是特别优选的,因为易于给予和预期有利的患者依从性。

[0178] 为了制备根据本发明所述的药物组合物,通常将治疗有效量的根据本发明所述的化合物2根据常规药物配制技术与药学上可接受的载体紧密混合,以产生剂量。载体可以采

取多种形式,这取决于给予(例如口服或肠胃外)所期望的制剂形式。在制备呈口服剂型的药物组合物中,可以使用任何常用的药物介质。因此,对于液体口服制剂、如混悬剂、酏剂和溶液剂,可以使用适合的载体和添加剂,包括水、二醇、油、醇、矫味剂、防腐剂、着色剂等。对于固体口服制剂、如散剂、片剂、胶囊剂,并且对于固体制剂、如栓剂,可以使用适合的载体和添加剂,包括淀粉、糖载体如葡萄糖、歧管、乳糖和相关载体;稀释剂、造粒剂、润滑剂、粘合剂、崩解剂等。如果需要,片剂或胶囊剂可以通过标准技术而肠溶包衣或缓释的。使用这些剂型可显著增强化合物在患者体内的生物利用度。

[0179] 对于肠胃外制剂,载体通常包含无菌水或氯化钠水溶液,但也可包括其他成分,包括有助于分散的成分。当然,在使用无菌水并保持无菌的情况下,组合物和载体也必须进行灭菌。还可以制备可注射的混悬剂,在这种情况下,可以使用适合的液体载体、悬浮剂等。

[0180] 脂质体混悬剂(包括靶向病毒抗原的脂质体)也可通过常规方法制备,以生产药学上可接受的载体。这可能适合于递送根据本发明所述的核苷化合物的游离核苷、酰基/烷基核苷、或磷酸酯前药形式。

[0181] 在根据本发明所述的典型实施方案中,所述化合物2和组合物用于治疗、预防或延缓HCV感染或HCV的继发疾病状态、病症或并发症。

[0182] VII. 组合和交替疗法

[0183] 众所周知,在用抗病毒剂长期治疗后,可能出现耐药的病毒变体。耐药性有时因编码用于病毒复制的酶的基因的突变而发生。通过与另一种、甚至两种或三种其他的诱导不同于主药物的突变或通过不同于主药物的途径起作用的抗病毒化合物组合或交替给予所述化合物,可以延长、增强或恢复药物对HCV感染的效力。或者,药物的药代动力学、生物分布、半衰期或其他参数可通过这种组合疗法改变(如果认为协同,则可包括交替疗法)。由于所公开的化合物2是NS5B聚合酶抑制剂,因此将所述化合物与例如下述组合给予于宿主可能是有用的:

[0184] (1) 蛋白酶抑制剂,例如NS3/4A蛋白酶抑制剂;

[0185] (2) NS5A抑制剂;

[0186] (3) 另一种NS5B聚合酶抑制剂;

[0187] (4) NS5B非底物抑制剂;

[0188] (5) 干扰素 α -2a,其可以PEG化或以其他方式被修饰,和/或利巴韦林;

[0189] (6) 非基于底物的抑制剂;

[0190] (7) 解旋酶抑制剂;

[0191] (8) 反义寡脱氧核苷酸(S-ODN);

[0192] (9) 适体;

[0193] (10) 核酸酶耐性核糖酶;

[0194] (11) iRNA,包括microRNA和SiRNA;

[0195] (12) 抗病毒的抗体、部分抗体或结构域抗体,或

[0196] (13) 诱导宿主抗体应答的病毒抗原或部分抗原。

[0197] 可以单独或用来自该列表的多种药物与本发明的化合物2组合给予的抗HCV药剂的非限制性实例是:

[0198] (i) 蛋白酶抑制剂,例如特拉匹韦(**Incivek®**)、波普瑞韦(VICTRELIS™)、西美瑞

韦 (Olysio™)、帕利瑞韦 (ABT-450)、格来瑞韦 (ABT-493)、利托那韦 (Norvir)、ACH-2684、AZD-7295、BMS-791325、丹诺普韦、Filibuvir、GS-9256、GS-9451、MK-5172、Sotrovir、Sovaprevir、Tegobuvir、VX-135、VX-222、和ALS-220;

[0199] (ii) NS5A抑制剂,例如ACH-2928、ACH-3102、IDX-719、达卡他韦、雷迪帕韦、维帕他韦 (Epclusa)、依巴司韦 (MK-8742)、格佐普韦 (MK-5172) 和奥贝他韦 (ABT-267);

[0200] (iii) NS5B抑制剂,例如AZD-7295、克立咪唑、达塞布韦 (Exviera)、ITX-5061、PPI-461、PPI-688、索非布韦 (Sovaldi)、MK-3682和mericitabine;

[0201] (iv) NS5B抑制剂,例如ABT-333和MBX-700;

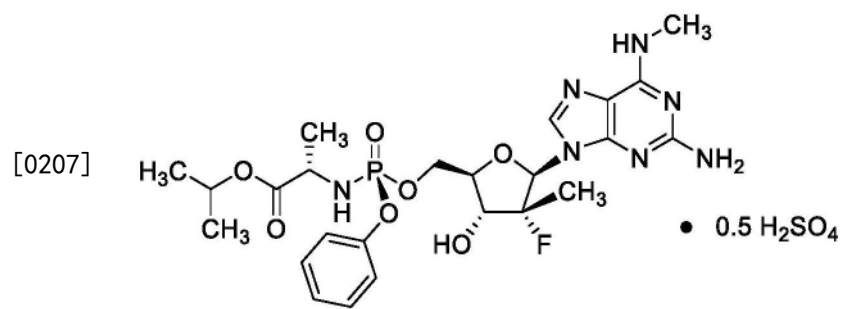
[0202] (v) 抗体,例如GS-6624;

[0203] (vi) 组合药物,例如Harvoni (雷迪帕韦/索非布韦); ViekiraPak (奥贝他韦/帕利瑞韦/利托那韦/达塞布韦); Viekirax (奥贝他韦/帕利瑞韦/利托那韦); G/P (帕利瑞韦和格来瑞韦); Technivie (奥贝他韦/帕利瑞韦/利托那韦)、以及Epclusa (索非布韦/维帕他韦)、以及Zepatier (依巴司韦和格佐普韦)。

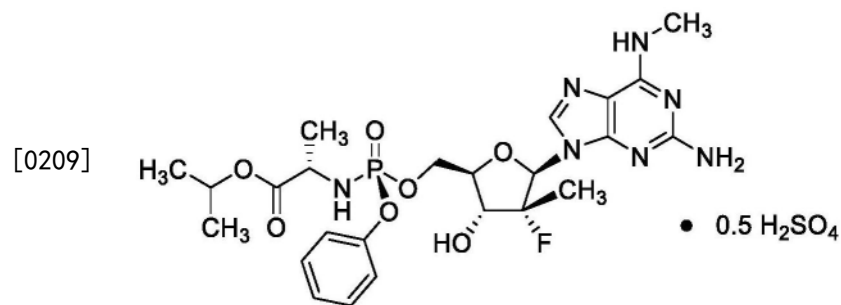
[0204] 如果给予化合物2以治疗导致肝癌或肝硬化的晚期丙型肝炎病毒,在一个实施方案中,该化合物可以与另一种典型用于治疗肝细胞性癌症 (HCC) 的药物组合或交替给予,例如由Andrew Zhu描述于“New Agents on the Horizon in Hepatocellular Carcinoma” Therapeutic Advances in Medical Oncology, V 5(1), January 2013, 41-50。适合于宿主已经患有HCC或处于HCC风险的联合治疗的化合物实例包括抗血管生成剂、舒尼替尼、布立尼布、利尼伐尼、雷莫芦单抗、贝伐珠单抗、西地尼布、帕唑帕尼、TSU-68、乐伐替尼、抗EGFR抗体、mTor抑制剂、MEK抑制剂和组蛋白去乙酰化酶抑制剂。

[0205] 以下项目在本发明范围内:

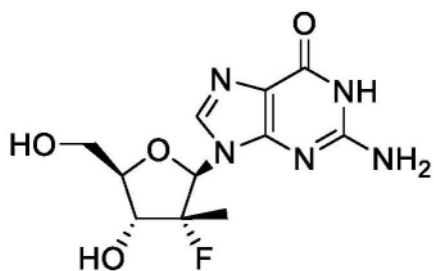
[0206] 1、下述式的化合物:



[0208] 2、一种固体剂型,其包含:



[0210] 其提供约20-60ng/mL之间的下述代谢物的稳态血药谷水平 (C_{24,ss}):



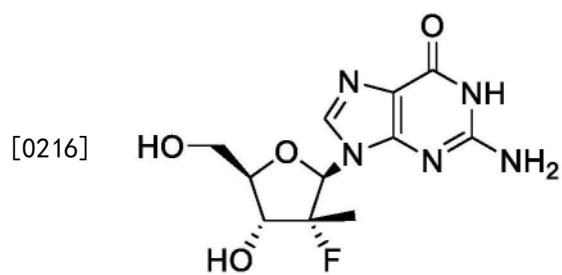
[0211] 3、如项目2所述的固体剂型,其中,所述稳态血药谷水平($C_{24,ss}$)为约20-50ng/mL之间。

[0212] 4、如项目2所述的固体剂型,其中,所述稳态血药谷水平($C_{24,ss}$)为约20-45ng/mL之间。

[0213] 5、如项目2所述的固体剂型,其中,所述稳态血药谷水平($C_{24,ss}$)为约20-30ng/mL之间。

[0214] 6、如项目2所述的固体剂型,其中,所述稳态血药谷水平($C_{24,ss}$)为约20-25ng/mL之间。

[0215] 7、如项目2-6中任一项所述的固体剂型,其中,下述代谢物的曲线下面积为约1,500ng*h/mL和3,000ng*h/mL之间:



[0217] 8、如项目7所述的固体剂型,其中,所述曲线下面积为约1,800ng*h/mL和3,000ng*h/mL之间。

[0218] 9、如项目7所述的固体剂型,其中,所述曲线下面积为约2,100ng*h/mL和3,000ng*h/mL之间。

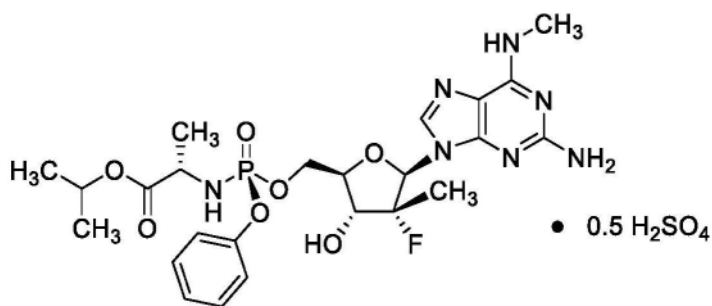
[0219] 10、如项目7所述的固体剂型,其中,所述曲线下面积为约2,400ng*h/mL和3,000ng*h/mL之间。

[0220] 11、如项目7所述的固体剂型,其中,所述曲线下面积为约2,700ng*h/mL和3,000ng*h/mL之间。

[0221] 12、如项目7所述的固体剂型,其中,所述曲线下面积为约2,000ng*h/mL和2,200ng*h/mL之间。

[0222] 13、一种药物组合物,其在药学上可接受的载体中包含有效量的下式的化合物:

[0223]



[0224] 14、如项目13所述的药物组合物,其为固体剂型,递送约300mg的所述化合物。

[0225] 15、如项目13所述的药物组合物,其为固体剂型,递送约400mg的所述化合物。

[0226] 16、如项目13所述的药物组合物,其为固体剂型,递送约500mg的所述化合物。

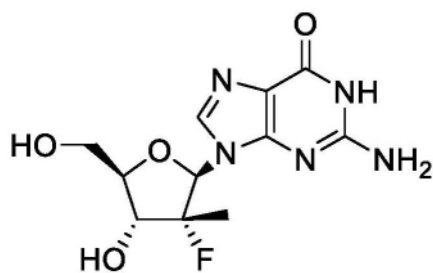
[0227] 17、如项目13所述的药物组合物,其为固体剂型,递送约600mg的所述化合物。

[0228] 18、如项目13所述的药物组合物,其为固体剂型,递送约700mg的所述化合物。

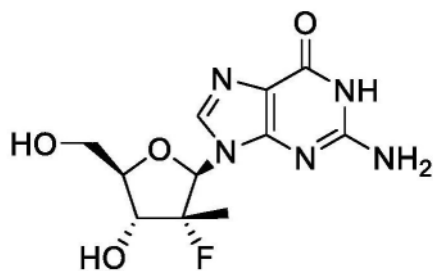
[0229] 19、如项目13所述的药物组合物,其为固体剂型,递送约800mg的所述化合物。

[0230] 20、如项目13-19中任一项所述的药物组合物,其中,所述固体剂型提供约20-60ng/mL之间的下述代谢物的稳态血药谷水平($C_{24,ss}$):

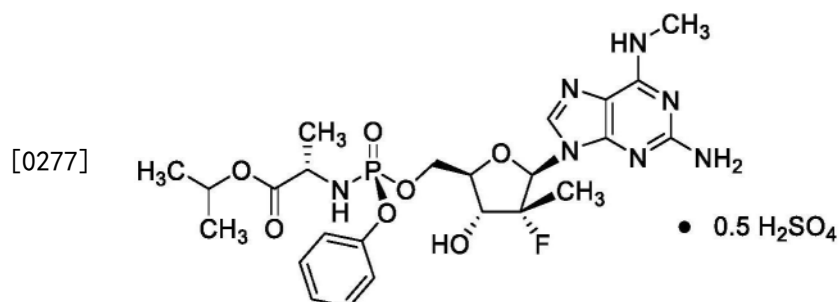
[0231]

[0232] 21、如项目20所述的药物组合物,其中,所述固体稳态血药谷水平($C_{24,ss}$)为约20-50ng/mL之间。[0233] 22、如项目20所述的药物组合物,其中,所述固体稳态血药谷水平($C_{24,ss}$)为约20-45ng/mL之间。[0234] 23、如项目20所述的药物组合物,其中,所述固体稳态血药谷水平($C_{24,ss}$)为约20-30ng/mL之间。[0235] 24、如项目20所述的药物组合物,其中,所述固体稳态血药谷水平($C_{24,ss}$)为约20-25ng/mL之间。[0236] 25、如项目17所述的药物组合物,其中,所述固体剂型提供约20-60ng/mL之间的下述代谢物的稳态血药谷水平($C_{24,ss}$):

[0237]

[0238] 26、如项目25所述的药物组合物,其中,所述稳态血药谷水平($C_{24,ss}$)为约40-60ng/mL之间。

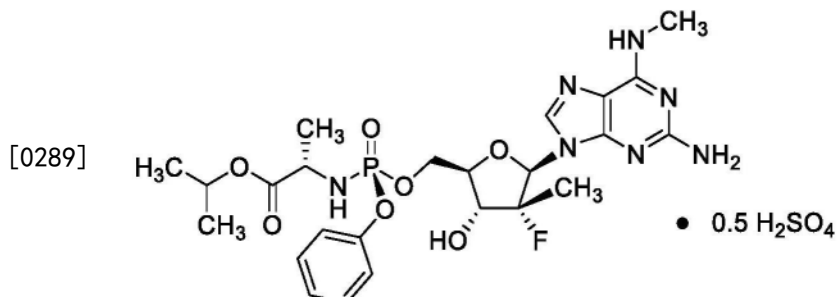
- [0263] 47、如项目32-35中任一项所述的方法,其中,给予所述化合物至少12周。
- [0264] 48、如项目42-47中任一项所述的方法,其中,所述化合物每天给予一次。
- [0265] 49、如项目42-47中任一项所述的方法,其中,所述化合物每隔一天给予。
- [0266] 50、如项目32-49中任一项所述的方法,其还包括将所述化合物与其他抗HCV药剂组合给予。
- [0267] 51、如项目50所述的方法,其中,所述其他抗HCV药剂选自蛋白酶抑制剂、NS5A抑制剂、另一种NS5B聚合酶抑制剂、非底物抑制剂、干扰素 α -2a、利巴韦林、解旋酶抑制剂、反义寡脱氧核苷酸、适体、核酸酶抗性核糖酶、iRNA、抗HCV抗体、抗HCV部分抗体和抗HCV结构域抗体。
- [0268] 52、如项目51所述的方法,其中,蛋白酶抑制剂选自特拉匹韦、波普瑞韦、西美瑞韦和帕利瑞韦。
- [0269] 53、如项目32所述的方法,其中,丙型肝炎病毒是基因型1a、1b、2a、2b、3a、4a、4d、5a或6。
- [0270] 54、如项目53所述的方法,其中,丙型肝炎病毒是基因型1a或1b。
- [0271] 55、如项目53所述的方法,其中,丙型肝炎病毒是基因型2a或2b。
- [0272] 56、如项目53所述的方法,其中,丙型肝炎病毒是基因型3a。
- [0273] 57、如项目53所述的方法,其中,丙型肝炎病毒是基因型4a或4b。
- [0274] 58、如项目53所述的方法,其中,丙型肝炎病毒是基因型5a。
- [0275] 59、如项目32-58中任一项所述的方法,其中,所述宿主是人。
- [0276] 60、下述式的化合物:



- [0278] 其任选地在药学上可接受的载体中,用于在有需要的宿主中治疗丙型肝炎感染或由丙型肝炎感染导致的病症。
- [0279] 61、如项目60所述的化合物,其中,所述化合物口服给予。
- [0280] 62、如项目60所述的化合物,其中,所述化合物通过控释给予。
- [0281] 63、如项目60所述的化合物,其中,所述由丙型肝炎感染导致的病症已导致抗体阳性和抗原阳性病症、基于病毒的慢性肝炎、由晚期丙型肝炎引起的肝癌、肝硬化或疲劳。
- [0282] 64、如项目60-63中任一项所述的化合物,其中,给予至少300mg的所述化合物。
- [0283] 65、如项目60-63中任一项所述的化合物,其中,给予至少400mg的所述化合物。
- [0284] 66、如项目60-63中任一项所述的化合物,其中,给予至少500mg的所述化合物。
- [0285] 67、如项目60-63中任一项所述的化合物,其中,给予至少600mg的所述化合物。
- [0286] 68、如项目60-67中任一项所述的化合物,其还包括将所述化合物与其他抗HCV药剂组合给予。

[0287] 69、如项目68所述的化合物,其中,所述其他抗HCV药剂选自蛋白酶抑制剂、NS5A抑制剂、另一种NS5B聚合酶抑制剂、非底物抑制剂、干扰素 α -2a、利巴韦林、解旋酶抑制剂、反义寡脱氧核苷酸、适体、核酸酶抗性核糖酶、iRNA、抗HCV抗体、抗HCV部分抗体和抗HCV结构域抗体。

[0288] 70、下述式的化合物在制造药物中的用途:



[0290] 所述化合物任选地在药学上可接受的载体中,所述药物用于在有需要的宿主中治疗丙型肝炎感染或由丙型肝炎感染导致的病症。

[0291] 71、如项目70所述的用途,其中,所述化合物口服给予。

[0292] 72、如项目70所述的用途,其中,所述化合物通过控释给予。

[0293] 73、如项目70所述的用途,其中,所述由丙型肝炎感染导致的病症已导致抗体阳性和抗原阳性病症、基于病毒的慢性肝炎、由晚期丙型肝炎引起的肝癌、肝硬化或疲劳。

[0294] 74、如项目70-73中任一项所述的用途,其中,给予至少300mg的所述化合物。

[0295] 75、如项目70-73中任一项所述的用途,其中,给予至少400mg的所述化合物。

[0296] 76、如项目70-73中任一项所述的用途,其中,给予至少500mg的所述化合物。

[0297] 77、如项目70-73中任一项所述的用途,其中,给予至少600mg的所述化合物。

[0298] 实施例

[0299] 通用方法

[0300] 在400MHz傅立叶变换Brücker光谱仪上记录¹H、¹⁹F和³¹P NMR谱。除非另有说明,获得DMSO-d₆的光谱。自旋多重态由符号s(单峰)、d(双重峰)、t(三重峰)、m(多重峰)和br(宽峰)表示。耦合常数(J)以Hz表示。反应通常在干燥的氮气氛围下使用Sigma-Aldrich无水溶剂进行。所有常规化学品均购自商业来源。

[0301] 以下缩写用于实施例中:

[0302] AUC:曲线下面积

[0303] C₂₄:24小时时的血浆中药物浓度

[0304] C_{24,ss}:在稳态下给药后24小时的浓度

[0305] C_{max}:血浆中所实现的药物的最大浓度

[0306] DCM:二氯甲烷

[0307] EtOAc:乙酸乙酯

[0308] EtOH:乙醇

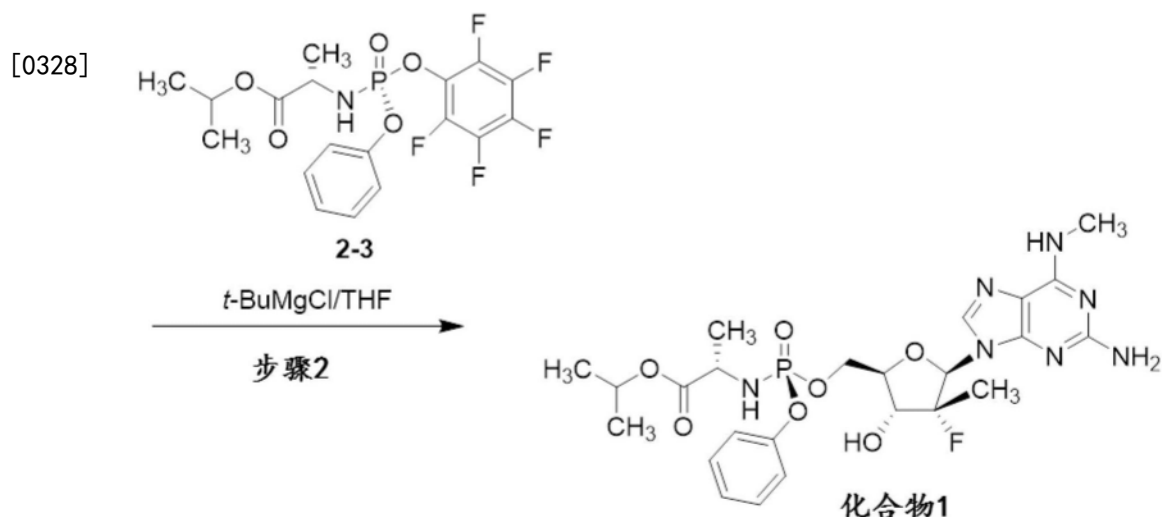
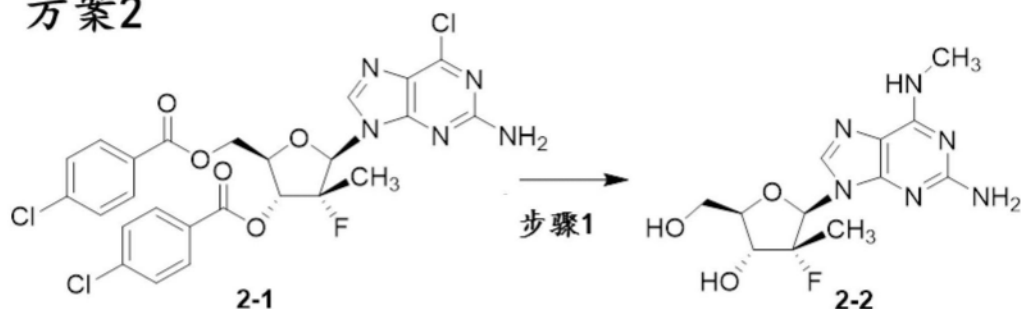
[0309] HPLC:高效液相色谱

[0310] NaOH:氢氧化钠

[0311] Na₂SO₄:硫酸钠(无水)

- [0312] MeCN:乙腈
 [0313] MeNH₂:甲胺
 [0314] MeOH:甲醇
 [0315] Na₂SO₄:硫酸钠
 [0316] NaHCO₃:碳酸氢钠
 [0317] NH₄Cl:氯化铵
 [0318] NH₄OH:氢氧化铵
 [0319] PE:石油醚
 [0320] Ph₃P:三苯基磷
 [0321] RH:相对湿度
 [0322] 硅胶 (230至400目, 吸附剂)
 [0323] t-BuMgCl:叔丁基氯化镁
 [0324] T_{max}:达到C_{max}的时间
 [0325] THF:四氢呋喃 (THF), 无水
 [0326] TP:三磷酸酯
 [0327] 实施例1. 化合物1的合成

方案2



[0329] 步骤1: (2R,3R,4R,5R) -5- (2-氨基-6- (甲基氨基) -9H-嘌呤-9-基) -4-氟-2- (羟基甲基) -4-甲基四氢呋喃-3-醇的合成 (2-2)

[0330] 向50L烧瓶中加入甲醇 (30L) 并在10±5℃下搅拌。在10±5℃下将NH₂CH₃ (3.95Kg)

缓慢通入反应器中。在 $20 \pm 5^\circ\text{C}$ 下分批加入化合物2-1 (3.77kg) 并搅拌1小时,从而得到澄清溶液。将反应物再搅拌6-8小时,此时HPLC表明中间体小于溶液的0.1%。向反应器中加入固体NaOH (254g), 搅拌30分钟并在 $50 \pm 5^\circ\text{C}$ 下浓缩(真空度:-0.095)。向所得残留物中加入EtOH (40L) 并在 60°C 下再浆化1小时。然后将混合物通过硅藻土过滤,并将滤饼用EtOH (15L) 在 60°C 下再浆化1小时。将滤液再次过滤,与先前过滤的滤液合并,然后在 $50 \pm 5^\circ\text{C}$ 下浓缩(真空度:-0.095)。沉淀出大量固体。将EtOAc (6L) 加入到固体残留物中,并将混合物在 $50 \pm 5^\circ\text{C}$ 下浓缩(真空度:-0.095)。然后将DCM加入到残留物中,将混合物在回流下再浆化1小时,冷却至室温,过滤,并在 $50 \pm 5^\circ\text{C}$ 下在真空烘箱中干燥,从而得到化合物2-2,为灰白色固体 (1.89Kg, 95.3%, 纯度99.2%)。

[0331] 化合物2-2的分析方法:使用配备Agilent Poroshell 120EC-C184.6*150mm 4-Micron柱的Agilent 1100HPLC系统,在以下条件下获得化合物2-2 (15mg) 的纯度:1mL/分钟流速,254nm下读数, 30°C 柱温,15 μL 注入体积和31分钟运行时间。将样品溶解在乙腈-水 (20:80) (v/v) 中。梯度法如下所示。

时间 (min)	A% (水中0.05TFA)	B% (乙腈)
0	95	5
8	80	20
13	50	50
23	5	95
26	5	95
26.1	95	5
31	95	5

[0333] 步骤2: ((S)-(((2R,3R,4R,5R)-5-(2-氨基-6-(甲基氨基)-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)磷酰基)-L-丙氨酸异丙酯(化合物1)的合成

[0334] 将化合物2-2和化合物2-3(((全氟苯氧基)(苯氧基)磷酰基)-L-丙氨酸异丙酯)溶解在THF (1L) 中并在氮气下搅拌。然后将悬浮液冷却至低于 -5°C 的温度,并经过1.5小时缓慢加入1.7M的t-BuMgCl溶液 (384mL), 同时保持 $5-10^\circ\text{C}$ 的温度。在室温下将 NH_4Cl (2L) 和水 (8L) 的溶液加入悬浮液中,然后加入DCM。将混合物搅拌5分钟,然后加入5% K_2CO_3 水溶液 (10L), 将混合物再搅拌5分钟,然后通过硅藻土 (500g) 过滤。用DCM洗涤硅藻土,并分离滤液。将有机相用5% K_2CO_3 水溶液 (10L $\times$ 2)、盐水 (10L $\times$ 3) 洗涤,并用 Na_2SO_4 (500g) 干燥约1小时。同时,整个过程并行重复7次,合并8批。过滤有机相,并在 $45 \pm 5^\circ\text{C}$ (真空度0.09Mpa) 下浓缩。加入EtOAc,将混合物在 60°C 下搅拌1小时,然后在室温下搅拌18小时。然后过滤混合物,并用EtOAc (2L) 洗涤,从而得到粗化合物1。将粗物质溶解于DCM (12L) 中,在 $10-20^\circ\text{C}$ 下加入庚烷 (18L),并将混合物在该温度下搅拌30分钟。过滤混合物,用庚烷 (5L) 洗涤,并在 $50 \pm 5^\circ\text{C}$ 下干燥,从而得到纯化合物1 (1650g, 60%)。

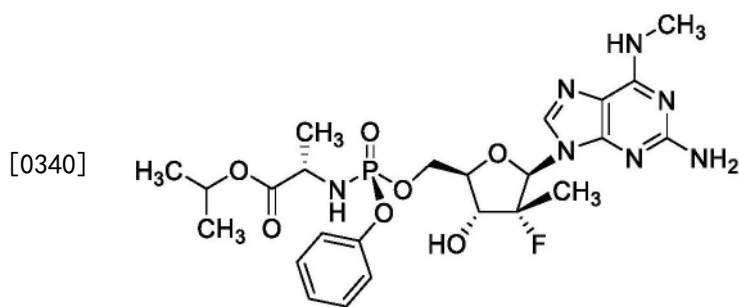
[0335] 化合物1的分析方法:使用配备有Waters XTerra Phenyl 5 μm 4.6*250mm柱的Agilent 1100HPLC系统,在以下条件下获得化合物1 (25mg) 的纯度:1mL/min流速,254nm下读数, 30°C 柱温,15 μL 注入体积和25分钟运行时间。将样品溶解在乙腈-水 (50:50) (v/v) 中。梯度法如下所示。

[0336]	时间 (min)	A% (水中 0.1% H ₃ PO ₄)	B% (乙腈)
	0	90	10
	20	20	80
	20.1	90	10
	25	90	10

[0337] 实施例2. 非晶和结晶化合物1的表征

[0338] 首先通过XRPD、¹H NMR和HPLC分析非晶化合物1和结晶化合物1。两种化合物的XRPD图谱均示于图1A, 并且确定纯度的HPLC迹线分别示于图1B和2A。表1是来自结晶化合物1的XRPD的峰的列表, 并且表2是来自HPLC迹线的相对保留时间(RTT)的列表。非晶化合物1的纯度为98.61%, 并且结晶化合物1的纯度为99.11%。两种化合物均为白色固体。图2B是结晶化合物1的TGA和DSC图。对于结晶化合物1, 在88.6°C下观察到吸热, 并且在80-110°C下有7.8%的质量损失。

[0339] 将化合物1的样品从EtOAc/己烷中重结晶并用ORTEP萃取。通过单晶的重结晶证实了化合物1的绝对结构。图3是化合物1的ORTEP图。晶体数据和测量数据如表3所示。基于X射线晶体学的化合物1的绝对立体化学如下所示:



[0341] DSC数据在配备有50位自动取样器的TA Instruments Q2000上收集。使用蓝宝石进行热容的校准, 并使用经认证的铟进行能量和温度的校准。典型地, 在针孔铝盘中将约3mg的每种样品以10°C/min从25°C加热至200°C。在样品上保持50ml/min的干燥氮气吹扫。仪器控制软件是Advantage for Q Series v2.8.0.394和Thermal Advantage v5.5.3, 并使用Universal Analysis v4.5A分析数据。

[0342] TGA数据在配备有16位自动取样器的TA Instruments Q500TGA上收集。使用经认证的铝镍合金和镍对仪器进行温度校准。典型而言, 将5-10mg的每种样品加载到预先配衡的铝DSC盘上, 并以10°C/min从环境温度加热至350°C。在样品上保持60ml/min的氮气吹扫。仪器控制软件是Advantage for Q Series v2.8.0.394和Thermal Advantage v5.5.3, 并使用Universal Analysis v4.5A分析数据。

[0343] 非晶化合物1 (1-1):

[0344] ¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δppm 1.01-1.15 (m, 9H), 1.21 (d, J=7.20Hz, 3H), 2.75-3.08 (m, 3H), 3.71-3.87 (m, 1H), 4.02-4.13 (m, 1H), 4.22-4.53 (m, 3H), 4.81 (s, 1H), 5.69-5.86 (m, 1H), 6.04 (br d, J=19.33Hz, 4H), 7.12-7.27 (m, 3H), 7.27-7.44 (m, 3H), 7.81 (s,

1H)

[0345] 结晶化合物1 (1-2) :

[0346] ^1H NMR (400MHz, DMSO- d_6) δ_{ppm} 0.97-1.16 (m, 16H) , 1.21 (d, $J=7.07\text{Hz}$, 3H) , 2.87 (br s, 3H) , 3.08 (s, 2H) , 3.79 (br d, $J=7.07\text{Hz}$, 1H) , 4.08 (br d, $J=7.58\text{Hz}$, 1H) , 4.17-4.55 (m, 3H) , 4.81 (quin, $J=6.25\text{Hz}$, 1H) , 5.78 (br s, 1H) , 5.91-6.15 (m, 4H) , 7.10-7.26 (m, 3H) , 7.26-7.44 (m, 3H) , 7.81 (s, 1H)

[0347] 表1. 结晶化合物1的峰列表

[0348] 表1. 结晶化合物1的峰列表

[0349]

角度 / °2 θ	d 间距 / Å	强度 / 计数	强度 / %
6.03	14.64	1005	39.0
7.36	12.00	315	12.2
7.94	11.13	1724	66.9
9.34	9.47	2500	97.0
9.51	9.29	860	33.4
9.77	9.05	1591	61.8
11.08	7.98	2576	100.0
12.02	7.36	171	6.6
12.95	6.83	319	12.4
13.98	6.33	241	9.4
14.30	6.19	550	21.4
14.69	6.03	328	12.7
15.20	5.82	2176	84.5
15.94	5.56	1446	56.1
16.75	5.29	1009	39.2
17.29	5.13	700	27.2
17.72	5.00	1213	47.1
18.11	4.89	1565	60.8
18.46	4.80	302	11.7
18.89	4.69	385	14.9
19.63	4.52	636	24.7
20.37	4.36	1214	47.1

[0350]

角度 / °2 θ	d 间距 / Å	强度 / 计数	强度 / %
20.74	4.28	1198	46.5
21.24	4.18	640	24.8
22.31	3.98	961	37.3
22.88	3.88	806	31.3
23.43	3.79	355	13.8
24.08	3.69	573	22.2
24.49	3.63	159	6.2
25.00	3.56	351	13.6
25.36	3.51	293	11.4
26.09	3.41	235	9.1
26.26	3.39	301	11.7
26.83	3.32	696	27.0
27.35	3.26	436	16.9
27.46	3.25	363	14.1
28.07	3.18	200	7.8
28.30	3.15	195	7.6
28.82	3.10	599	23.3
29.85	2.99	217	8.4
30.26	2.95	186	7.2
30.75	2.91	333	12.9
31.12	2.87	149	5.8
31.85	2.81	238	9.2
33.28	2.69	261	10.1
34.77	2.58	171	6.6
35.18	2.55	175	6.8
36.83	2.44	327	12.7
37.41	2.40	172	6.7

[0351] 表2. 非晶化合物1和结晶化合物1的HPLC色谱的相对保留时间

[0352]

非晶化合物 1		结晶化合物 1	
RRT	面积 %	RRT	面积 %
0.48	0.15	0.48	0.17
0.51	0.04	0.48	0.17
0.48	0.15	0.94	0.12
0.51	0.04	1.00	99.11
0.94	0.13	1.04	0.22
0.98	0.21	1.37	0.07
1.00	98.61		
1.04	0.29		
1.37	0.31		

[0353] 表3. 化合物1的晶体和数据测量

[0354]

键精度	C-C = 0.0297Å, 波长 = 1.54184	
晶胞	a=10.1884(3) b=28.6482(9) c=12.9497(5) $\alpha=90$ $\beta=113.184(4)$ $\gamma=90$	
温度	150K	
	计算值	报告值
体积	3474.5(2)	3474.5(2)
空间群	P21	P 1 21 1
Hall 群	P 2yb	P 2yb
部分式	C24 H34 F N7 O7 P	2(C24 H34 F N7 O7 P)
总式	C24 H34 F N7 O7 P	C48 H68 F2 N14 O14 P2

[0355]

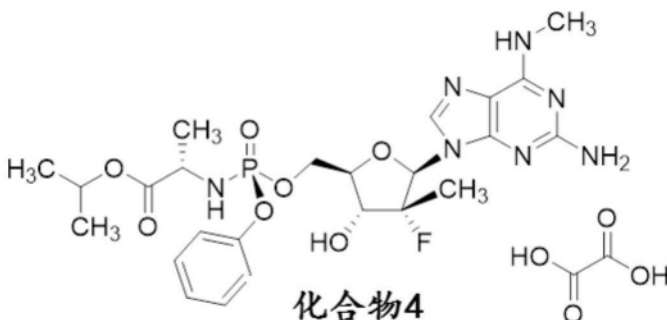
Mr	582.55	1165.10
Dx, g cm ⁻¹	1.114	1.114
Z	4	2
Mu (mm ⁻¹)	1.139	1.139
F000	1228.0	1228.0
F000'	1233.21	
h, k, l _{max}	12,34,15	12,34,15
N _{ref}	12742 [6510]	8259
T _{min} , T _{max}	0.790, 0.815	0.808, 1.000
T _{min} '	0.716	
校正方法	# 报告的 T 极限: T _{min} = 0.808 T _{max} = 1.00	
AbsCorr	MULTI-SCAN	
数据完整性	1.27/0.65	
θ (max)	68.244	
R (反射)	0.2091 (7995)	
wR2 (反射)	0.5338 (8259)	
S	2.875	
Npar	716	

[0356] 该初始表征之后在25℃/60%相对湿度(RH)下储存14天,在7天和14天后通过HPLC和XRPD分析。图4A是在25℃/60%(RH)下14天后的XRPD。非晶化合物1(样品1-1)保持差的结晶性,而结晶化合物1(样品1-2)保持其结晶性,但两种化合物在25℃/60%(RH)下14天后稳定。

[0357] 实施例3. 草酸盐化合物4的形成

[0358] 最初,通过将草酸盐与溶剂(5倍体积,100μL)混合并使任何溶液在室温下蒸发,形成化合物1的草酸盐化合物4。使任何悬浮液熟化(室温-50℃)3小时,并获得结晶性。

[0359]



[0360] 表4示出用于制备化合物4的不同溶剂。除了两种(环己烷和正庚烷)之外,所有溶

剂都提供结晶产物。尽管化合物4具有高结晶性和溶解度,但草酸盐对于临床开发是不可接受的,因为可能形成肾结石,并且研究了化合物1的其他盐。

[0361] 表4. 草酸盐化合物4的形成

[0362]

溶剂	在室温下加酸后观察	熟化/蒸发后观察结果
EtOH	溶液	OXA-晶型1
IPA	溶液	OXA-晶型1
丙酮	溶液	OXA-晶型1
MEK	溶液	OXA-晶型1
EtOAc	悬浮液	OXA-晶型1
iPrOAc	悬浮液	OXA-晶型1
THF	溶液	OXA-晶型1
甲苯	溶液	OXA-晶型1
MeCN	溶液	OXA-晶型1
IPA:10%水	溶液	OXA-晶型1
TBME	悬浮液	OXA-晶型1
环己烷	悬浮液	非晶
正庚烷	悬浮液	非晶

[0363] 实施例4. 非晶化合物1的盐化合物

[0364] 由于草酸盐化合物4(实施例3)因其潜在形成肾结石而不能在临床试验中推进,因此用表5中列出的抗衡离子形成化合物1的非晶盐。将化合物1溶解在叔丁醇(20倍体积, 6ml)中,并用酸抗衡离子处理该溶液(每种样品1当量,除了样品1-9具有0.5当量的硫酸盐)。然后将样品冷冻,通过冷冻干燥去除溶剂。最初通过XRPD和HPLC分析样品1-4、1-5、1-6、1-7、1-8和1-9中的残留固体。

[0365] 表5. 非晶盐形成详情

[0366]	样 品 ID	样品详情	储备溶液 详情	观察结果	NMR
	1-4	HCl (1:1)	THF 1M	白色固体	3 个更少的质子 ~0.3 eq <i>t</i> -BuOH
	1-5	硫酸 (1:1)	THF 1M	白色固体	3 个更少的质子 ~0.3 eq <i>t</i> -BuOH
	1-6	富 马 酸 (1:1)	MeOH:THF (1:1) 0.5M	玻璃状固体	1.05 eq 富马酸 0.84 eq <i>t</i> -BuOH
	1-7	苯 甲 酸 (1:1)	THF 1M	白色固体	1.0 eq 苯甲酸 0.34 eq <i>t</i> -BuOH
	1-8	丁 二 酸 (1:1)	MeOH 1M	发粘的白色 固体	~ 1.1 eq 丁二酸 0.37 eq <i>t</i> -BuOH
	1-9	硫酸 (0.5:1 酸:API)	THF 1M	白色固体	3 个更少的质子 ~0.3 eq <i>t</i> -BuOH

[0367] 对所有样品采集¹H NMR谱。

[0368] 样品1-4, HCl (1:1) 盐:

[0369] ¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δppm 0.93-1.39 (m, 16H), 2.97 (br s, 2H), 3.70-3.88 (m, 1H), 4.10 (br s, 1H), 4.18-4.49 (m, 3H), 4.70-4.88 (m, 1H), 5.71-5.94 (m, 1H), 6.07 (br d, J=19.07Hz, 2H), 7.14-7.27 (m, 3H), 7.29-7.44 (m, 2H), 7.83-8.19 (m, 1H)

[0370] 样品1-5, 硫酸 (1:1) 盐:

[0371] ¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δppm 0.97-1.38 (m, 15H), 2.96 (br s, 2H), 4.06-4.18 (m, 1H), 4.19-4.49 (m, 3H), 4.66-4.91 (m, 1H), 5.70-5.95 (m, 1H), 5.96-6.16 (m, 2H), 7.10-7.27 (m, 3H), 7.30-7.43 (m, 2H), 7.88-8.19 (m, 1H)

[0372] 样品1-6, 富马酸 (1:1) 盐:

[0373] ¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δppm 0.95-1.31 (m, 21H), 2.87 (br s, 3H), 3.79 (br d, J=7.20Hz, 1H), 4.01-4.13 (m, 1H), 4.16-4.23 (m, 1H), 4.16-4.24 (m, 1H), 4.20 (s, 1H), 4.18-4.23 (m, 1H), 4.24-4.52 (m, 1H), 4.24-4.52 (m, 1H), 4.24-4.49 (m, 1H), 4.72-4.88 (m, 1H), 5.68-5.86 (m, 1H), 6.04 (br d, J=19.33Hz, 4H), 6.63 (s, 1H), 6.61-6.66 (m, 1H), 7.12-7.27 (m, 3H), 7.27-7.45 (m, 3H), 7.81 (s, 1H), 13.16 (br s, 2H)

[0374] 样品1-7, 苯甲酸 (1:1) 盐:

[0375] ¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δppm 0.96-1.30 (m, 15H), 2.87 (br s, 3H), 3.79 (br d, J=7.07Hz, 1H), 4.07 (br s, 1H), 4.20 (s, 1H), 4.25-4.52 (m, 3H), 4.81 (s, 1H), 5.71-5.85 (m, 1H), 6.04 (br d, J=19.33Hz, 4H), 7.08-7.27 (m, 3H), 7.27-7.43 (m, 3H), 7.45-7.57 (m, 2H), 7.63 (s, 1H), 7.81 (s, 1H), 7.95 (dd, J=8.27, 1.33Hz, 2H), 12.98 (br s, 1H)

[0376] 样品1-8, 丁二酸 (1:1) 盐:

[0377] ^1H NMR (400MHz, DMSO- d_6) δ ppm 0.98-1.28 (m, 15H), 2.42 (s, 5H), 2.87 (br s, 3H), 3.57-3.62 (m, 1H), 3.70-3.86 (m, 1H), 4.02-4.14 (m, 1H), 4.20 (s, 1H), 4.24-4.51 (m, 3H), 4.70-4.88 (m, 1H), 5.69-5.86 (m, 1H), 6.04 (br d, $J=19.33\text{Hz}$, 4H), 7.12-7.27 (m, 3H), 7.27-7.44 (m, 3H), 7.81 (s, 1H), 11.95-12.58 (m, 2H)

[0378] 样品1-9, 硫酸(0.5:1)盐:

[0379] ^1H NMR (400MHz, DMSO- d_6) δ ppm 1.02-1.31 (m, 15H), 2.94 (br s, 3H), 3.79 (br d, $J=7.20\text{Hz}$, 2H), 4.09 (br s, 1H), 4.22-4.48 (m, 3H), 4.72-4.90 (m, 1H), 5.71-5.92 (m, 1H), 6.07 (br d, $J=19.07\text{Hz}$, 2H), 7.12-7.28 (m, 3H), 7.31-7.44 (m, 2H), 7.75-8.19 (m, 1H)。

[0380] 然后将样品在25°C/60%相对湿度(RH)下储存14天,在7天(图4B)和14天(图5A)之后通过HPLC和XRPD分析。所有制备的盐保持非晶,观察结果示于表6中。发现单硫酸盐(样品1-5)和丁二酸盐(样品1-8)在研究过程中物理上不稳定,并潮解或变成胶状。发现富马酸盐(样品1-6)和苯甲酸盐(样品1-7)都是玻璃状固体。发现HCl盐(样品1-4)保持其物理外观。出人意料的是,半硫酸盐(样品1-9)也保持其白色固体的物理外观,而单硫酸盐化合物(样品1-5)是发粘的胶状。结果如表6所示。发现在25°C/60%相对湿度(RH)下储存2周后,单HCl盐(样品1-4)和半硫酸盐(样品1-9)在物理和化学上是稳定的。虽然两种盐在两周内都是稳定的,但半硫酸盐优于HCl盐,因为HCl盐具有吸湿性,与半硫酸盐相比对于长期储存或使用而言有用性更低。

[0381] 表6. 在25°C/60%RH下7天和14天后样品的稳定性

样品 ID	暴露于 25°C / 60% RH 的时间(天)					
	0		7		14	
	HPLC	观察结果	HPLC	观察结果	HPLC	观察结果
1-1	98.6	白色固体	98.7	白色固体	98.5	白色固体
1-2	99.1	白色固体	99.2	白色固体	99.0	白色固体
1-3	99.7	白色固体	99.6	白色固体	99.4	白色固体
1-4	98.7	白色固体	98.8	白色固体	98.6	白色固体
[0382] 1-5	98.4	白色固体	55.7	发粘的白色固体	-	发粘的胶状
1-6	98.7	玻璃状固体	98.6	透明玻璃状固体	98.4	白色玻璃状固体
1-7	98.8	白色固体	98.8	透明玻璃状固体	98.7	透明玻璃状固体
1-8	98.7	发粘的白色固体	-	潮解 / 发粘的油	-	潮解
1-9	98.7	白色固体	98.1	白色固体	96.4	白色固体

[0383] 实施例5. 非晶化合物2的表征

[0384] 最初通过XRPD、¹H NMR、DSC、TGA和HPLC分析非晶化合物2。叠加了非晶化合物1和结晶化合物1的非晶化合物2的XRPD图案示于图1A, 并且单独的非晶化合物2的XRPD图案示于图5B。表7是来自图5B中示出的XRPD图案的峰列表。用于确定纯度的HPLC迹线示于图6A。表8是来自图6A中示出的HPLC迹线的相对保留时间 (RTT) 列表。非晶化合物2的纯度为99.68%。图6B是非晶化合物2的TGA和DSC图。实施例2中给出了TGA和DSC实验的实验细节。

[0385] 表7. 非晶化合物2的峰列表

角度 / °2θ	d 间距 / Å	强度 / 计数	强度 / %
4.20	21.03	486	81.8
4.67	18.91	482	81.0
5.16	17.10	595	100.0
9.13	9.68	547	92.0

[0387] 表8: 非晶化合物2的HPLC色谱图

非晶化合物 2	
RRT	面积 %
0.48	0.02
0.48	0.02
0.67	0.01
0.94	0.13
1.00	99.68
1.04	0.06

[0389] 非晶化合物2:

[0390] ¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δppm 0.93-1.29 (m, 13H), 2.94 (br s, 3H), 3.79 (td, J=10.04, 7.07Hz, 2H), 4.05-4.19 (m, 1H), 4.19-4.50 (m, 3H), 4.81 (quin, J=6.25Hz, 1H), 5.71-5.94 (m, 1H), 5.97-6.16 (m, 2H), 7.14-7.28 (m, 3H), 7.31-7.44 (m, 2H), 7.82-8.09 (m, 1H)

[0391] 实施例6. 非晶化合物2的结晶

[0392] 如表6所示, 由于半硫酸盐被发现在14天稳定性研究后保持固体, 实施了使用11种不同溶剂的研究结晶条件的初步测试。将非晶化合物2在25℃下悬浮于5倍体积的溶剂中 (样品2-1、2-2、2-3、2-4、2-5、2-6、2-7、2-8、2-9、2-10和2-11)。向未自由流动的样品 (2-1、2-2、2-3、2-4、2-5、2-6、2-7、2-8和2-10), 另外加入5倍体积的溶剂。然后将样品在25-50℃ (温度之间为1℃/分钟, 并且每个温度下4小时) 下熟化6天, 除了样品2-1在1天后观察到澄清溶液, 并且允许在环境条件下蒸发。结果示于表9。用异丁醇 (样品2-1)、丙酮 (样品2-2)、EtOAc (样品2-6) 和iPrOAc (样品2-7) 结晶得到晶体图案。还用MEK (样品2-4) 和MIBK (样品2-

5) 结晶鉴定出两个结晶不良的样品。XRPD图案示于图7A。

[0393] 表9. 化合物2的结晶条件

[0394]

样品 ID	溶剂	5 倍体积后的观察结果	10 倍体积后的观察结果	1 天熟化后的观察结果	XRPD
2-1	IPA	固体 - 未自由流动	自由流动悬浮液	溶液, 在室温下蒸发产生胶状	胶状
2-2	异丁醇	固体 - 未自由流动	自由流动悬浮液	悬浮液	结晶-图案 2
2-3	丙酮	固体 - 未自由流动	自由流动悬浮液	悬浮液	结晶-图案 3
2-4	MEK	固体 - 未自由流动	自由流动悬浮液	悬浮液	结晶不良-图案 4
2-5	MIBK	固体 - 未自由流动	自由流动悬浮液	悬浮液	结晶不良-图案 4
2-6	EtOAc	固体 - 未自由流动	自由流动悬浮液	悬浮液	结晶-图案 1
2-7	iPrOAc	固体 - 未自由流动	自由流动悬浮液	悬浮液	结晶-图案 1
2-8	THF	固体 - 未	自由流动悬浮液	悬浮液	结晶不良

[0395]

样品 ID	溶剂	5 倍体积后的观察结果	10 倍体积后的观察结果	1 天熟化后的观察结果	XRPD
		自由流动	悬浮液		
2-9	TBME	自由流动悬浮液	-	悬浮液	非晶
2-10	甲苯	固体 - 未自由流动	自由流动悬浮液	悬浮液	非晶
2-11	庚烷	自由流动悬浮液	-	悬浮液	非晶

[0396] 通过DSC,TGA、¹H-NMR和IC分析7个样品(样品2-2、2-3、2-4、2-5、2-6、2-7和2-8)(表10、图8A、图8B、图9A、图9B、图10A、图10B、图11A和图11B),以及在25℃/60%相对湿度(RH)下储存天后通过XRPD分析(所有样品在稳定后保持结晶/结晶不良)。所有样品保留大约半当量的半硫酸盐,但含有相对大量的残留溶剂。非晶样品2-9、2-10和2-11的X射线衍射图的重叠示于图7B。

[0397] 表10. 结晶化合物2样品的表征

[0398]

样品 ID	溶剂	DSC	TGA	¹ H NMR	IC (对 TGA 校准)
2-2	异丁醇	吸热 113.8℃	8.3% 环境-140℃	1.1 eq 异丁醇	0.45 eq
2-3	丙酮	吸热 30-95℃ 吸热 100-145℃	7.6% 环境-140℃	0.5 eq 丙酮	0.46 eq
2-4	MEK	宽的复杂吸热 30-115℃ 吸热 115-145℃	8.5 % 环境-140℃	0.8 eq MEK	0.45 eq

[0399]

样品 ID	溶剂	DSC	TGA	¹ H NMR	IC (对 TGA 校准)
2-5	MIBK	宽的吸热 30-105℃ 吸热 114.7℃	5.2% 环境-110℃	0.2 eq MIBK	0.46 eq
2-6	EtOAc	尖的吸热 113.6℃	2.0% 环境-100℃	0.9 eq EtOAc	0.46 eq
2-7	iPrOAc	吸热 30-90℃	1.6% 环境-90℃	0.8 eq iPrOAc	0.45 eq
2-8	THF	吸热 30-100℃ 较尖的吸热 115.6℃	4.2% 环境-130℃	0.7 eq THF	0.45 eq

[0400] 所有样品均采集¹H NMR谱,如下所示。

[0401] 样品2-2:

[0402] ¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δppm 0.83 (d, J=6.69Hz, 7H), 0.99-1.26 (m, 14H), 1.61 (dt, J=13.26, 6.63Hz, 1H), 3.73-3.87 (m, 2H), 4.03-4.18 (m, 1H), 4.18-4.51 (m, 4H), 4.66-4.92 (m, 1H), 4.70-4.90 (m, 1H), 4.72-4.88 (m, 1H), 5.81 (br s, 1H), 5.93-6.11 (m, 2H),

7.10-7.26 (m, 3H) , 7.14-7.26 (m, 1H) , 7.30-7.41 (m, 2H) , 7.94 (br s, 1H)

[0403] 样品2-3:

[0404] ^1H NMR (400MHz, DMSO- d_6) δ_{ppm} 1.00-1.26 (m, 13H) , 2.09 (s, 3H) , 3.74-3.87 (m, 2H) , 4.10 (br d, $J=7.70\text{Hz}$, 1H) , 4.22-4.50 (m, 3H) , 4.81 (quin, $J=6.28\text{Hz}$, 1H) , 5.71-5.90 (m, 1H) , 5.96-6.15 (m, 2H) , 7.12-7.26 (m, 3H) , 7.31-7.41 (m, 2H) , 7.79-8.07 (m, 1H)

[0405] 样品2-4:

[0406] ^1H NMR (400MHz, DMSO- d_6) δ_{ppm} 0.91 (t, $J=7.33\text{Hz}$, 3H) , 1.01-1.28 (m, 13H) , 2.08 (s, 2H) , 3.72-3.89 (m, 2H) , 4.10 (br d, $J=8.08\text{Hz}$, 1H) , 4.23-4.47 (m, 3H) , 4.81 (quin, $J=6.25\text{Hz}$, 1H) , 5.69-5.89 (m, 1H) , 5.94-6.13 (m, 2H) , 7.14-7.25 (m, 3H) , 7.32-7.41 (m, 2H) , 7.79-8.11 (m, 1H)

[0407] 样品2-5:

[0408] ^1H NMR (400MHz, DMSO- d_6) δ_{ppm} 0.86 (d, $J=6.69\text{Hz}$, 1H) , 0.98-1.33 (m, 13H) , 2.02-2.09 (m, 1H) , 4.03-4.17 (m, 1H) , 4.22-4.50 (m, 3H) , 4.81 (quin, $J=6.25\text{Hz}$, 1H) , 5.81 (br s, 1H) , 5.93-6.15 (m, 2H) , 7.11-7.27 (m, 3H) , 7.31-7.41 (m, 2H) , 7.77-8.21 (m, 1H)

[0409] 样品2-6:

[0410] ^1H NMR (400MHz, DMSO- d_6) δ_{ppm} 0.98-1.28 (m, 15H) , 2.00 (s, 3H) , 3.99-4.14 (m, 3H) , 4.21-4.49 (m, 3H) , 4.81 (quin, $J=6.22\text{Hz}$, 1H) , 5.82 (br s, 1H) , 5.93-6.14 (m, 2H) , 7.11-7.26 (m, 3H) , 7.29-7.42 (m, 2H) , 7.79-8.17 (m, 1H)

[0411] 样品2-7:

[0412] ^1H NMR (400MHz, DMSO- d_6) δ_{ppm} 0.92-1.28 (m, 17H) , 1.97 (s, 2H) , 4.04-4.16 (m, 1H) , 4.20-4.51 (m, 3H) , 4.71-4.93 (m, 2H) , 5.82 (br s, 1H) , 5.95-6.14 (m, 2H) , 7.11-7.28 (m, 3H) , 7.31-7.43 (m, 2H) , 7.75-8.21 (m, 1H)

[0413] 样品2-8:

[0414] ^1H NMR (400MHz, DMSO- d_6) δ_{ppm} 0.81-1.11 (m, 13H) , 1.19 (s, 1H) , 1.53-1.66 (m, 1H) , 3.87-4.01 (m, 1H) , 4.06-4.32 (m, 3H) , 4.64 (quin, $J=6.25\text{Hz}$, 1H) , 5.55-5.75 (m, 1H) , 5.77-5.97 (m, 2H) , 6.94-7.10 (m, 3H) , 7.13-7.26 (m, 2H) , 7.66-7.96 (m, 1H)

[0415] 实施例7. 无法将非晶丙二酸盐(化合物4)结晶

[0416] 如实施例3中所示, 当确定化合物1的适合盐时, 鉴定出结晶的草酸盐, 但草酸盐化合物4由于其潜在引起肾结石而不能在临床试验中推进。因此, 使用与半硫酸盐相同的11种溶剂, 尝试化学相关的丙二酸盐(化合物5)的结晶。化合物1 ($12 \times 50\text{mg}$, 将样品3-1、3-2、3-3、3-4、3-5、3-6、3-7、3-8、3-9、3-10、3-11和3-12) 溶解在叔丁醇(20倍体积)中, 然后用1当量的丙二酸储备溶液(1M在THF中)处理溶液。然后将样品冷冻, 通过冷冻干燥去除溶剂。在室温下加入样品3-1、3-2、3-3、3-4、3-5、3-6、3-7、3-8、3-9、3-10和3-11、相关溶剂(5倍体积)。使任何所得溶液在环境条件下蒸发, 同时将胶状或固体在25-50°C(温度之间为1°C/分钟, 并且每个温度下4小时)下熟化5天。通过XRPD分析固体(图12B), 但发现所有样品都形成胶状或非晶(图12B)。结果示于表11。通过 ^1H -NMR和HPLC分析一个固体(非晶)样品(3-12), 发现其含有约1当量的丙二酸(峰重叠)以及0.6当量t-BuOH。该混合物的纯度为99.2% (图13A)。图12A是样品3-12的XRPD, 并且图13A是样品3-12的HPLC色谱图。

[0417] 样品3-12:

[0418] ^1H NMR (400MHz, DMSO- d_6) δ ppm 0.81-1.11 (m, 13H), 1.19 (s, 1H), 1.53-1.66 (m, 1H), 3.87-4.01 (m, 1H), 4.06-4.32 (m, 3H), 4.64 (quin, $J=6.25\text{Hz}$, 1H), 5.55-5.75 (m, 1H), 5.77-5.97 (m, 2H), 6.94-7.10 (m, 3H), 7.13-7.26 (m, 2H), 7.66-7.96 (m, 1H)

[0419] 表11. 非晶丙二酸盐化合物4的结晶条件

[0420]

样品 ID	溶剂	5 倍体积后的观察结果	5 天熟化/蒸发后的观察结果	XRPD
3-1	IPA	澄清溶液*	透明胶状	-
3-2	异丁醇	澄清溶液*	透明胶状	-
3-3	丙酮	澄清溶液*	透明胶状	-
3-4	MEK	澄清溶液*	透明胶状	-
3-5	MIBK	溶液 & 一些胶状	透明胶状	-
3-6	EtOAc	澄清溶液*	透明胶状 & 晶体样外观	非晶
3-7	iPrOAc	胶状	透明胶状	-
3-8	THF	澄清溶液*	透明胶状	-
3-9	TBME	浓稠悬浮液	透明胶状	-
3-10	甲苯	白色胶状 / 固体	白色胶状	非晶
3-11	庚烷	白色固体 (静态)	白色胶状	非晶
3-12	-	(白色固体-无溶剂)	(发粘的白色固体-环境条件)	非晶

[0421] *在室温下蒸发

[0422] 实施例8. 无法使用液体辅助研磨 (LAG) 的形成适合盐

[0423] 使用表12中的14种抗衡离子进行液体辅助研磨 (LAG) 研究, 以确定除半硫酸盐之外的适合的盐。

[0424] 表12. 用于LAG结晶的抗衡离子储备溶液

[0425]

抗衡离子	溶剂 (1M)
帕莫酸	DMSO
丙二酸	THF
D- 葡萄糖醛酸	水

DL-扁桃酸	THF
D-葡萄糖酸	THF
乙醇酸	THF
L-乳酸	THF
油酸	THF
L-抗坏血酸	水
己二酸	THF (加热)
己酸	THF
硬脂酸	THF
棕榈酸	THF
甲磺酸	THF

[0426] 将化合物1 (30mg) 置于具有两个3mm球轴承的HPLC小瓶中。材料用溶剂润湿 (15 μ l 乙醇, 样品4-1、4-2、4-3、4-4、4-5、4-6、4-7、4-8、4-9、4-10、4-11、4-12、4-13和4-14), 并加入1当量的酸抗衡离子。然后使用配备有Automaxion适配器的Fritsch研磨系统将样品在650rpm下研磨2小时。研磨后的大多数样品被发现是透明胶状, 并且未进一步分析 (表13)。那些观察到含有固体的通过XRPD分析, 并且在所有情况下, 所获得的图案被发现匹配结晶的酸抗衡离子, 没有其他峰 (图13B)。

[0427] 表13. 化合物1的LAG的观察结果和XRPD结果

[0428]

样品 ID	酸	研磨后的观察结果	XRPD
4-1	帕莫酸	黄色胶状/固体	帕莫酸 & 非晶晕
4-2	丙二酸	透明胶状	-
4-3	D-葡萄糖醛酸	白色胶状/固体	D-葡萄糖醛酸 & 非晶晕
4-4	DL-扁桃酸	透明胶状	-
4-5	D-葡萄糖酸	透明胶状	-
4-6	乙醇酸	透明胶状	-
4-7	L-乳酸	透明胶状	-
4-8	油酸	透明胶状	-
4-9	L-抗坏血酸	白色胶状/固体	L-抗坏血酸 & 非晶晕
4-10	己二酸	透明胶状	-
4-11	己酸	透明胶状	-
4-12	硬脂酸	白色胶状/固体	硬脂酸 & 非晶晕
4-13	棕榈酸	白色胶状/固体	棕榈酸 & 非晶晕
4-4	甲磺酸	透明胶状	-

[0429] 实施例9. 无法使用甲乙酮 (MEK) 形成适合盐

[0430] 接着,使用甲乙酮(MEK)作为溶剂来研究除半硫酸盐之外的适合的盐。使用表12中的14种酸性抗衡离子,通过在室温下将化合物1 (50mg) 溶解在MEK (20倍体积) 中进行研究。用1当量的所选定的抗衡离子处理溶液(表12)。然后将样品以0.1℃/min冷却至5℃并在该温度下搅拌过夜。使所有样品在环境条件下蒸发,并通过XRPD分析观察到的任何固体。除了用硬脂酸(样品4-12)和棕榈酸(样品5-13)得到的样品得到玻璃状溶剂之外,该蒸发主要产生胶状。这些固体根据XRPD是非晶的,但没有获得结晶形式的盐。结果示于表14(图13A)。

[0431] 表14. 化合物1溶解在MEK中的结果(20倍体积)

样品 ID	酸	1M 下的酸的溶剂	加入酸后的观察结果	冷却后的观察结果	蒸发后的观察结果
5-1	帕莫酸	DMSO	黄色溶液	黄色溶液	黄色胶状
5-2	丙二酸	THF	溶液	溶液	透明胶状
5-3	D-葡萄糖醛酸	水	溶液	溶液	透明胶状
5-4	DL-扁桃酸	THF	溶液	溶液	透明胶状
5-5	D-葡萄糖酸	THF	白色沉淀	浑浊溶液	透明胶状
5-6	乙醇酸	THF	溶液	溶液	透明胶状
5-7	L-乳酸	THF	溶液	溶液	透明胶状
5-8	油酸	THF	溶液	溶液	透明胶状
5-9	L-抗坏血酸	水	溶液	溶液	黄色胶状
5-10	己二酸	THF (加热)	溶液	溶液	透明胶状
5-11	己酸	THF	溶液	溶液	透明胶状
5-12	硬脂酸	THF	溶液	浑浊溶液	透明玻璃状固体*
5-13	棕榈酸	THF	溶液	溶液	透明玻璃状固体*
5-14	甲磺酸	THF	溶液	溶液	透明胶状

[0433] 在加入酸之前制备的储备溶液

[0434] *通过XRPD分析样品,从而得到非晶图案加上酸抗衡离子的峰

[0435] 由于所有样品都是非晶的,所有样品都重新溶解在MEK (5倍体积) 中,在室温下加入环己烷(20倍体积反溶剂),然后在25℃下搅拌1小时。然后将样品在50-5℃(温度之间为1℃/分钟,每个温度下4小时)下熟化2天,然后将循环变为50-25℃再进行4天。在熟化后目视观察样品。结果示于表15。熟化后,发现除5-1(用帕莫酸得到)之外的所有样品都是胶状。样品5-1为黄色固体,通过XRPD分析,并且发现该图案匹配帕莫酸的已知形式(图14B),并因此没有获得盐的结晶形式。

[0436] 表15. 化合物1重新溶解在MEK (5倍体积) 和反溶剂中的结果

[0437]

样品 ID	立刻观察结果	10 分钟后的观察结果	60 分钟后的观察结果	熟化后的观察结果
5-1	沉淀	胶状	胶状	黄色悬浮液 **
5-2	沉淀	胶状	胶状	胶状
5-3	沉淀/胶状	胶状	胶状	胶状
5-4	沉淀	胶状	胶状	胶状
5-5	沉淀/胶状	胶状	胶状	胶状
5-6	沉淀	胶状	胶状	胶状
5-7	沉淀	胶状	胶状	胶状
5-8	沉淀	轻微悬浮液	胶状	胶状
5-9	沉淀	胶状	胶状	胶状
5-10	沉淀	胶状	胶状	胶状
5-11	沉淀	轻微悬浮液	胶状	胶状
5-12	沉淀	轻微悬浮液	胶状	胶状
5-13	沉淀	轻微悬浮液	胶状	胶状
5-14	沉淀	胶状	胶状	胶状

[0438] **通过XRPD分析样品,图案匹配帕莫酸的已知形式(无其他峰)

[0439] 实施例10. 无法使用乙酸乙酯获得适合盐

[0440] 接着,使用乙酸乙酯研究除半硫酸盐之外的适合的盐。利用表12中的14种酸性抗衡离子,通过在50℃下将化合物1 (50mg) 溶解在乙酸乙酯(20倍体积) 中进行研究。用1当量的所选定的抗衡离子处理溶液(表12)。然后将样品以0.1℃/min冷却至5℃并在该温度下搅拌4天。使溶液在环境条件下蒸发,同时通过XRPD分析任何固体。使用乙酸乙酯结晶的结果示于表16。与其中MEK是溶剂的实施例8相反,在冷却酸:化合物混合物(在环境条件下使溶液蒸发)后,观察到大部分样品是悬浮液。然而,总体发现XRPD衍射图与结晶化合物1匹配。样品6-2、6-4和6-5具有细微差别(图14A和图15A)。没有获得结晶形式的盐。

[0441] 表16. 化合物1溶解在EtOAc (20倍体积) 中的结果

[0442]

样品 ID	酸	1M 下的酸的溶剂	加入酸后的观察结果	冷却后的观察结果	XRPD	蒸发后的观察结果
6-1	帕莫酸	DMSO	黄色溶液	黄色溶液*	-	胶状
6-2	丙二酸	THF	溶液	白色悬浮液	与游离碱略有不同	-
6-3	D-葡萄糖醛酸	水	溶液	溶液*	-	胶状
6-4	DL-扁桃酸	THF	溶液	白色悬浮液	与游离碱略有不同	-
6-5	D-葡萄糖酸	THF	白色沉淀	近似白色胶状	与游离碱略有不同	-
6-6	乙醇酸	THF	溶液	白色悬浮液	游离碱	-
6-7	L-乳酸	THF	溶液	白色悬浮液	游离碱	-
6-8	油酸	THF	溶液	白色悬浮液	游离碱	-
6-9	L-抗坏血酸	水	溶液	溶液*	-	侧面白色固体/黄色胶状 - 非晶
6-10	己二酸	THF (加热)	溶液	白色悬浮液	游离碱	-
6-11	己酸	THF	溶液	白色悬浮液	游离碱	-
6-12	硬脂酸	THF	溶液	白色悬浮液	游离碱	-
6-13	棕榈酸	THF	溶液	白色悬浮液	游离碱	-
6-14	甲磺酸	THF	白色沉淀	溶液 / 透明胶状*	-	透明胶状

[0443] 实施例11. 通过HPLC确定化学纯度

[0444] 实施例2和实施例4中的纯度分析在配备有二极管阵列检测器的Agilent HP1100系列系统上进行, 并使用ChemStation软件vB.04.03, 使用表17中所示的方法进行。

[0445] 表17. 用于化学纯度确定的HPLC方法

[0446]

参数	值
方法类型	利用梯度洗脱的反相

[0447]

样品制备	乙腈:水 1:1 中 0.5 mg/ml		
柱	Supelco Ascentis Express C18, 100 x 4.6 mm, 2.7 μ m		
柱温度($^{\circ}$ C)	25		
注入量 (μ l)	5		
波长, 带宽 (nm)	255, 90		
流速 (ml/min)	2		
A 相	水中 0.1% TFA		
B 相	乙腈中 0.085% TFA		
时间表	时间(min)	% A 相	% B 相
	0	95	5
	6	5	95
	6.2	95	5
	8	95	5

[0448] 实施例12.X射线粉末衍射 (XRPD) 技术

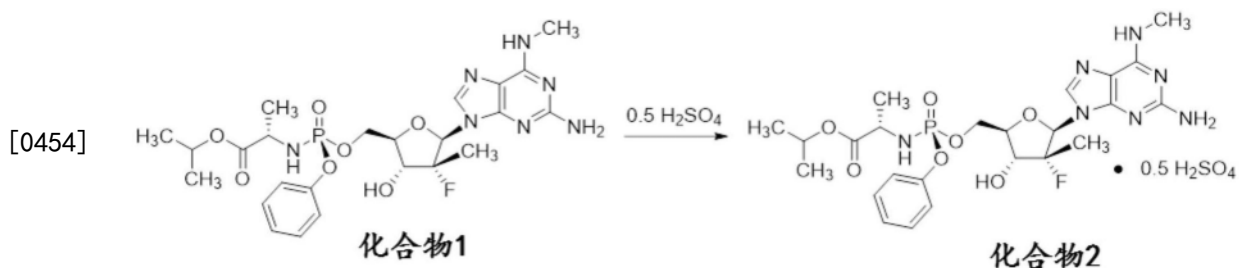
[0449] 实施例2、3、4、5、6、7、8和9中的XRPD图案在PANalytical Empyrean衍射仪上在透射几何学中使用CuK α 辐射 (45kV, 40mA) 收集。在入射光束上使用0.5 $^{\circ}$ 狭缝、4mm掩模和0.4rad带有聚焦镜的索勒狭缝。放置在该衍射光束上的PIXcel^{3D}检测器适配有接收狭缝和0.04rad带有聚焦镜的索勒狭缝。该仪器每周使用硅粉进行性能检查。用于数据收集的软件是X'Pert Data Collector v.5.3,并且使用Diffraction Plus EVA v.15.0.0.0或Highscore Plus v.4.5分析和呈现数据。制备样品并以透射模式在金属或Millipore 96孔板中分析。在金属孔板上的金属板之间使用X射线透明膜,并且原样使用粉末(约1-2mg)。通过在轻微真空下过滤之前将少量悬浮液直接加入板中,使用Millipore板从悬浮液中分离和分析固体。

[0450] 金属板的扫描图案使用测角扫描轴,而2 θ 扫描用于Millipore板。使用硅粉(金属孔板)进行性能检查。数据收集的细节是2.5至32.0 $^{\circ}$ 的2 θ 的角度范围,0.0130 $^{\circ}$ 的2 θ 的步长,以及2.07分钟的总收集时间。

[0451] 还在Bruker D8衍射仪上,使用CuK α 辐射 (40kV, 40mA), θ -2 θ 测角仪, V4发散和接收狭缝, Ge单色仪和Lynxeye探测器, 收集样品。仪器使用经过认证的刚玉标准物 (NIST 1976) 进行性能检查。用于数据收集的软件是X'Pert Data Collector v.5.3,并且使用Diffraction Plus EVA v.15.0.0.0分析和呈现数据。

[0452] 样品在环境条件下以平板样本形式使用原样粉末来进行。将样品轻轻地装入切成抛光的零背景 (510) 硅晶片的空腔中。在分析期间,样品在其本身的平面内旋转。数据收集的细节是2至42 $^{\circ}$ 的2 θ 的角度范围,0.05 $^{\circ}$ 的2 θ 的步长,和0.5秒/步的收集时间。

[0453] 实施例13.非晶化合物2的合成



[0455] 向250mL烧瓶中加入MeOH(151mL)并将溶液冷却至0-5℃。经过10分钟逐滴加入浓H₂SO₄溶液。向另一个烧瓶中加入化合物1(151g)和丙酮(910mL),并在25-30℃下经2.5小时滴加H₂SO₄/MeOH溶液。沉淀出大量固体。将溶液在25-30℃下搅拌12-15小时后,过滤混合物,用MeOH/丙酮(25mL/150mL)洗涤,并在55-60℃下真空干燥,从而得到化合物2(121g,74%)。

[0456] 化合物2的分析方法:使用配备有Waters XTerra Phenyl 5μm4.6*250mm柱的Agilent 1100HPLC系统,在以下条件下获得化合物2的纯度:1mL/min流速,254nm下读数,30℃柱温,10μL注入体积和30分钟运行时间。将样品溶解在ACN:水(90:10,v/v)中。用于分离的梯度法如下所示。化合物2的R_t(分钟)约为12.0分钟。

[0457]	时间(min)	水中的 0.1% H ₃ PO ₄ (A)%	乙腈 (B)%
	0	90	10
	20	20	80
	20.1	90	10
[0458]	30	90	10

[0459] ¹HNMR: (400MHz, DMSO-d₆): δ8.41 (br, 1H), 7.97 (s, 1H), 7.36 (t, J=8.0Hz, 2H), 7.22 (d, J=8.0Hz, 2H), 7.17 (t, J=8.0Hz, 1H), 6.73 (s, 2H), 6.07 (d, J=8.0Hz, 1H), 6.00 (dd, J=12.0, 8.0Hz, 1H), 5.81 (br, 1H), 4.84-4.73 (m, 1H), 4.44-4.28 (m, 3H), 4.10 (t, J=8.0Hz, 2H), 3.85-3.74 (m, 1H), 2.95 (s, 3H), 1.21 (s, J=4.0Hz, 3H), 1.15-1.10 (m, 9H)。

[0460] 实施例14. 化合物2的表征

[0461] 化合物2进一步通过目视、¹H NMR、¹³C NMR、¹⁹F NMR、MS、HPLC和XRPD(图15B)表征。通过GC测量残留溶剂。通过Karl Fischer滴定法测量水含量,水含量仅为0.70%。数据总结于表18。

[0462] 表18. 化合物2的其他表征数据的总结

[0463]

测试	结果
外观	白色固体
NMR	实施例 4 中列出的 ^1H NMR 峰
MS	MS(ESI+ve) $[\text{M}+\text{H}]^+ = 582.3$ -与结构一致
HPLC	254 nm 下以 AUC 计 99.8% (两次制备的平均值)
基于 GC 的残留溶剂	甲醇 -57 ppm 丙酮 -752 ppm 二氯甲烷 -50 ppm 乙酸乙酯 -176 ppm
水含量	0.70%

[0464] 实施例15. 化合物1和化合物2的溶解度

[0465] 测试化合物1和化合物2在生物相关测试介质中的溶解度,包括模拟胃液 (SGF)、禁食状态模拟胃液 (FaSSIF)、和进食状态胃液 (FeSSIF)。化合物1的结果示于表19,化合物2的结果示于表20。将样品在室温 (20-25°C) 下搅拌。化合物2与化合物1相比,在2小时时在水中的溶解度高大于40倍,并且在24小时时溶解度高大于25倍。在SGF条件下,在24小时时化合物1的溶解度为15.6mg/mL,与此相比,在24小时时化合物2的溶解度为84.2mg/mL。化合物2在SGF条件下在2小时时也比化合物1更易溶,并且即使在48小时后也充分可溶以足以进行测试,而在48小时测试时化合物1无法完成。

[0466] 表19. 化合物1溶解度测试结果

[0467]

测试介质	溶解度(以 mg/mL 计)		外观	描述性术语
	2 小时	24 小时		
水	1.5	2.5	澄清溶液*	略微可溶
SGF	13.8	15.6	在底部具有胶状的澄清溶液	难溶
FaSSIF	1.7	1.7	浑浊	略微可溶
FeSSIF	2.8	2.9	浑浊	略微可溶

[0468] *样品看起来是澄清的,但溶解度仅为1.5mg/mL。经过进一步研究,注意到在搅拌棒上形成了胶状薄膜。在标准物制备期间,化合物1活性药物成分在稀释剂 (90%水/10%乙腈) 中形成胶状球,其需要长超声处理时间才能完全溶解。

[0469] 表20. 化合物2溶解度测试结果

测试介质	溶解度(以 mg/mL 的盐基础计)			外观	描述性术语
	2 小时	24 小时	48 小时		
[0470] 水	65.3	68.0	N/A	浑浊	可溶
SGF	89.0	84.2	81.3	浑浊	可溶
FaSSIF	1.9	2.0	N/A	浑浊	略微可溶
FeSSIF	3.3	3.4	N/A	浑浊	略微可溶

[0471] 实施例16. 化合物2的化学稳定性

[0472] 通过监测有机物纯度、水含量、¹H NMR、DSC和Raman IR, 经过6个月的时间段在25和40℃下测试化合物2的化学稳定性。用于该研究的容器封闭系统是组合药用瓣膜袋, 其在软包上具有药物层压膜, 并在两层之间具有干燥剂硅胶。称量化合物2 (1g) 到每个容器中。然后将袋在25℃/60%RH (相对湿度) 和40℃/75%RH (相对湿度) 下储存。在时间为0、第1个月、第2个月、第3个月和第6个月测量有机物纯度、水含量、¹H NMR、DSC和拉曼光谱。

[0473] 化合物2的纯度使用配备有Waters XTerra Phenyl, 5μm, 4.6x250mm柱的Shimadzu LC-20AD系统, 在以下条件下获得: 1mL/min流速, 254nm下读数、35℃柱温和10μL注入体积。将样品溶解在乙腈-水 (90:10) (v/v) 中。梯度法如下所示。

[0474]	时间 (min)	A% (ACN)	B% (水)
	0	90	10
	20	20	80
	20.1	90	10
	30	90	10

[0475] 使用Karl Fischer滴定法, 通过水滴定装置确定化合物2 (250mg) 的水含量。

[0476] 结果示于表21和表22。当化合物2在25℃和40℃下储存6个月时, 降解速率最小。在3个月时, 化合物2在25℃条件下纯度为99.75%, 在40℃条件下纯度为99.58%。在6个月时, 化合物2在25℃条件下仍为99.74%纯度, 在40℃条件下纯度为99.30%。在25℃下, 降解产物的百分比从第0天的0.03%增加到6个月后的0.08%。在40℃下, 降解产物的百分比从0.03%增加到0.39%。在6个月的过程中, 水的百分比在25℃下增加约0.6%, 并且在40℃下增加约0.7%。

[0477] 在两个温度条件下, 通过在1、2、3, 和6个月时的化合物2的¹H NMR、拉曼光谱和DSC进行的表征与在第0天时化合物2的表征相同 (表22), 凸显了化合物2的长期稳定性。

[0478] 表21. 在25℃和40℃下的经过6个月的化合物2的降解速率

[0479]

	测试时间	水 百分比	纯度 百分比	降解产物 百分比	最大杂质 百分比
25°C	第 0 天	1.2	99.82	0.03	0.12
	第 1 个月	1.9	99.77	0.04	0.12
	第 2 个月	1.8	99.75	0.06	0.12
	第 3 个月	1.8	99.75	0.06	0.12
	第 6 个月	1.8	99.74	0.08	0.13
40°C	第 0 天	1.2	99.82	0.03	0.12
	第 1 个月	2.0	99.71	0.09	0.12
	第 2 个月	1.9	99.63	0.15	0.12
	第 3 个月	1.9	99.58	0.20	0.12
	第 6 个月	1.9	99.30	0.39	0.14

[0480] 表22. 在降解研究期间的化合物2的表征

[0481]

	测试时间	¹ H NMR	拉曼光谱	DSC
25°C	第 0 天	初始测试	初始测试	初始测试
	第 1 个月	与第 0 天相同	与第 0 天相同	与第 0 天相同
	第 2 个月	与第 0 天相同	与第 0 天相同	与第 0 天相同
	第 3 个月	与第 0 天相同	与第 0 天相同	与第 0 天相同
	第 6 个月	与第 0 天相同	与第 0 天相同	与第 0 天相同
40°C	第 0 天	初始测试	初始测试	初始测试
	第 1 个月	与第 0 天相同	与第 0 天相同	与第 0 天相同
	第 2 个月	与第 0 天相同	与第 0 天相同	与第 0 天相同
	第 3 个月	与第 0 天相同	与第 0 天相同	与第 0 天相同
	第 6 个月	与第 0 天相同	与第 0 天相同	与第 0 天相同

[0482] 测量化合物2的其他化学稳定性研究以确定杂质和水含量。测试了三个条件：经6个月的时间的加速稳定性 ($40 \pm 2^\circ\text{C}/75 \pm 5\% \text{RH}$)、经9个月的时间的环境稳定性 ($25 \pm 2^\circ\text{C}/60 \pm 5\% \text{RH}$)、和经9个月的时间的冷藏条件 ($5 \pm 3^\circ\text{C}$) 下的稳定性。加速稳定性、环境稳定性和冷藏条件的结果分别示于表23、表24和表25。基于这些研究的结果，化合物2在化学上非常稳定。

[0483] 在加速稳定性研究 (表23) 中，在测量化合物2的每个时间点 (第1个月、第3个月和第6个月)，化合物2的外观总是白色固体且IR与参比标准物匹配。6个月后，总相关物质1杂质仅为0.08%，并且没有检测到相关物质2和异构体。

[0484] 表23. 化合物2的加速稳定性 ($40 \pm 2^\circ\text{C}/75 \pm 5\% \text{RH}$)

[0485]

项目		说明	测试时点			
			第 0 个月	第 1 个月	第 3 个月	第 6 个月
外观		白色或近白色固体	白色固体	白色固体	白色固体	白色固体
IR		与参比标准物对应	与参比标准物对应	/	与参比标准物对应	与参比标准物对应
水		≤2.0%	0.45%	0.21%	0.36%	0.41%
相关物质 1	杂质 A	≤0.15%	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	杂质 B	≤0.15%	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	杂质 F	≤0.15%	N.D.	N.D.	N.D.	0.01%
	杂质 H	≤0.15%	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	任意其他单一杂质	≤0.10%	0.01%	0.02%	0.01%	0.05%
	总杂质	≤0.2%	0.01%	0.02%	0.02%	0.08%
相关物质 2	杂质 G	≤0.15%	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
异构体	杂质 C	≤0.15%	N.D.	/	N.D.	N.D.
	杂质 D	≤0.15%	N.D.	/	N.D.	N.D.
	杂质 E	≤0.15%	N.D.	/	N.D.	N.D.
测定		98.0%~102.0%	98.8%	101.5%	99.6%	99.5%
微生物测试	TAMC	≤1000cfu/g	<1cfu/g	/	/	/
	霉菌和酵母	≤100cfu/g	<1cfu/g	/	/	/
	大肠杆菌	未检测到	N.D.	/	/	/

[0486] N.D.: 未检测到

[0487] 在环境稳定性研究中,经9个月测量外观、IR、水和杂质含量,化合物2的外观总是白色固体,且IR总是与参比样品相对应。结果(表24)凸显了化合物2的化学稳定性。9个月后,样品中水的百分比仅为0.20%,总相关物质1杂质仅为0.02%。与加速稳定性研究类似,未检测到相关物质2和化合物2的任何异构体。

[0488] 表24. 化合物2的环境稳定性 (25±2℃/60±5%RH)

[0489]

项目	说明	测试时点				
		第 0 个月	第 1 个月	第 3 个月	第 6 个月	第 9 个月
外观	白或近白色固体	白色固体	白色固体	白色固体	白色固体	近白色固体
IR	与参比标准物对应	与参比标准物对应	/	与参比标准物对应	与参比标准物对应	与参比标准物对应
水	≤2.0%	0.45%	0.19%	0.29%	0.46%	0.20%
相关物质 1	杂质 A	≤0.15%	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	杂质 B	≤0.15%	N.D.	N.D.	0.03%	N.D.
	杂质 F	≤0.15%	N.D.	N.D.	0.02%	0.01%
	杂质 H	≤0.15%	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	任意其他单一杂质	≤0.10%	0.01%	0.01%	0.03%	0.02%
	总杂质	≤0.2%	0.01%	0.02%	0.11%	0.05%
相关物质 2	杂质 G	≤0.15%	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
异构体	杂质 C	≤0.15%	N.D.	/	N.D.	N.D.
	杂质 D	≤0.15%	N.D.	/	N.D.	N.D.
	杂质 E	≤0.15%	N.D.	/	N.D.	N.D.
测定	98.0%~102.0%	98.8%	101.1%	99.6%	99.7%	100.9%
微生物测试	TAMC	≤1000cfu/g	<1cfu/g	/	/	/
	霉菌和酵母	≤100cfu/g	<1cfu/g	/	/	/
	大肠杆菌	未检测到	N.D.	/	/	/

[0490] N.D.: 未检测到

[0491] 在冷藏条件下测量稳定性的结果示于表25。即使在9个月后,检测到的唯一杂质来自相关物质1和水。9个月后的水含量为0.32%,相关物质1的总杂质仅为样品的0.01%。化合物2在冷藏条件下非常稳定。

[0492] 表25. 化合物2的冷藏条件 ($5 \pm 3^{\circ}\text{C}$) 下的稳定性

[0493]

项目	说明	测试时点				
		第 0 个月	第 1 个月	第 3 个月	第 6 个月	第 9 个月
外观	白色或近白色固体	白色固体	白色固体	白色固体	白色固体	近白色固体
IR	与参比标准物对应	与参比标准物对应	/	与参比标准物对应	与参比标准物对应	与参比标准物对应
水	≤2.0%	0.45%	0.19%	0.32%	0.42%	0.32%
相关物质 1	杂质 A	≤0.15%	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	杂质 B	≤0.15%	N.D.	N.D.	0.01%	N.D.
	杂质 F	≤0.15%	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	杂质 H	≤0.15%	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	任意其他单一杂质	≤0.10%	0.01%	0.01%	0.01%	0.01%
	总杂质	≤0.2%	0.01%	0.01%	0.03%	0.01%
相关物质 2	杂质 G	≤0.15%	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
异构体	杂质 C	≤0.15%	N.D.	/	N.D.	N.D.
	杂质 D	≤0.15%	N.D.	/	N.D.	N.D.
	杂质 E	≤0.15%	N.D.	/	N.D.	N.D.
测定	98.0%~102.0%	98.8%	101.1%	100.2%	98.6%	101.4%
微生物测试	TAMC	≤1000cfu/g	<1cfu/g	/	/	/
	霉菌和酵母	≤100cfu/g	<1cfu/g	/	/	/
	大肠杆菌	未检测到	N.D.	/	/	/

[0494] N.D.: 未检测到

[0495] 实施例17. 单次口服剂量的化合物2后的代谢物的血药水平

[0496] 向大鼠、狗和猴给予单次口服剂量的化合物2, 并测量方案1中所示的某些代谢物的血药水平。

[0497] 化合物2向化合物1和代谢物1-7的转化率示于表26, 代谢物1-8和代谢物1-2的结果示于表27。在大鼠中, 观察到低水平的化合物1暴露, 但观察到高水平的代谢物1-7、活性三磷酸酯的核苷代谢物(代谢物1-6)。在猴中, 测量化合物1的大致剂量比例的暴露。在狗中, 测量到超比例的化合物1暴露, 表明肝脏中的首过代谢清除。在整个研究中, 观察到狗(高剂量组中的5/5)比猴子(高剂量组中的1/5)显著更多的呕吐。

[0498] 表26. 单次口服剂量的化合物2后化合物1和代谢物1-7的血药水平

[0499]

物种	剂量* (mg/kg)	化合物 1			代谢物 1-7	
		C _{max} (ng/mL)	T _{max} (hr)	AUC _{0-last} (hr*ng/mL)	C _{max} (ng/mL)	AUC _{0-last} (hr*ng/mL)
大鼠 ^a	500	70.5	0.25	60.9	748	12000
狗 ^b	30	1530	0.25-1	1300	783	9270
	100	8120	0.5-1	10200	2030	24200
	300	21300	204	44300	4260	60800
猴 ^b	30	63.5	0.5-2	176	42.5	1620
	100	783	1-2	1100	131	3030
	300	501	204	1600	93.6	3660

[0500] 每个物种每剂量3只雄性;*剂量制剂:^a水中的0.5%CMC、0.5%Tween 80;^b胶囊中的粉末

[0501] 表27. 单次口服剂量的化合物2后代谢物1-8和1-2的血药水平

[0502]

物种	剂量* (mg/kg)	代谢物 1-8		代谢物 1-2	
		C _{max} (ng/mL)	AUC _{0-last} (hr*ng/mL)	C _{max} (ng/mL)	AUC _{0-last} (hr*ng/mL)
大鼠 ^a	500	5060	35100	9650	20300
狗 ^b	30	291	905	196	610
	100	1230	4370	886	2830
	300	5380	35300	2380	8710
猴 ^b	30	209	5690	300	1730
	100	406	12300	1350	8160
	300	518	16800	1420	11400

[0503] 每个物种每剂量3只雄性;*剂量制剂:^a水中的0.5%CMC、0.5%Tween 80;^b胶囊中的粉末

[0504] 实施例18. 化合物2口服剂量后活性三磷酸酯的组织暴露

[0505] 在口服剂量的化合物2后4小时测量化合物2的活性三磷酸酯 (TP) (代谢物1-6) 的心脏和肝脏组织水平。在单剂量的化合物2后4小时获得肝脏和心脏样品, 快速冷冻, 匀浆并通过LC-MS/MS分析活性TP的细胞内水平。如图16A所示, 在大鼠、狗和猴中测量组织水平。在所有测试物种的肝脏中测量高水平的活性TP。由于首过肝代谢的饱和, 在狗的心脏中测量到相对低水平的活性TP, 并且在大鼠和猴心脏中测量到无法量化的TP水平, 表明活性TP的肝特异性形成。虽然未示出, 但与化合物1给药相比, 化合物2给药改善了TP分布。

[0506] 实施例19. 狗中的化合物1和化合物2的药理学比较

[0507] 实施了用化合物1和化合物2给药的狗的头对头比较。该研究测量了化合物1和代谢物1-7 (来自方案1) 至给药化合物1 (25mg/kg) 和化合物2 (30mg/kg) 后4小时的血药浓度 (表28), 并且代谢物的1-7的AUC_(0-4hr)在化合物2中与化合物1相比高达2倍。化合物1和代谢物1-7的剂量标准化暴露示于表28。化合物1、代谢物1-7、和化合物1+代谢物1-7之和的AUC_(0-4hr)值在给药化合物2后更大。

[0508] 表28. 给药化合物1和化合物2后血药水平的比较

[0509]	给药的化合物	平均剂量标准化 $AUC_{(0-4hr)}^a$ ($\mu M \cdot hr$):		
		化合物 1	代谢物 1-7	化合物 1 + 代谢物 1-7
	化合物 1 (25 mg/kg)	0.2	1.9	2.1
	化合物 2 (30 mg/kg)	1.0	4.1	5.1

[0510] ^a $AUC_{(0-4hr)}$ 值标准化为25mg/kg的剂量

[0511] 三磷酸酯浓度的肝脏/心脏比表明,与化合物1相比,给药化合物2增加了三磷酸酯向肝脏的选择性递送,如表29所示。给予化合物1后在心脏中测量到的活性鸟嘌呤代谢物(1-6)的 $AUC_{(0-4hr)}$ 为174 $\mu M \cdot hr$,而给予化合物2后在心脏中测量到的活性鸟嘌呤代谢物(1-6)的 $AUC_{(0-4hr)}$ 为28 $\mu M \cdot hr$ 。化合物2的肝脏/心脏比为20,而化合物1的肝脏/心脏比为3.1。

[0512] 表29. 给药化合物1和化合物2后肝脏和心脏暴露的比较

[0513]	给药的化合物	平均剂量标准化 $AUC_{(0-4hr)}^a$ ($\mu M \cdot hr$):		
		肝脏	心脏	肝脏/心脏
	化合物 2	565	28 ^b	20
	化合物 1	537	174	3.1

[0514] ^a活性TP浓度(1-6;方案1)标准为25mg/kg的剂量

[0515] ^b外推低于校准曲线的定量下限

[0516] 与化合物1相比,当给予化合物2时,肝脏相对于心脏的选择性增加的效果也示于图16B。化合物2的剂量(30mg/kg)后的活性三磷酸酯的心脏和肝脏组织水平与化合物1的剂量(25mg/kg)后的活性三磷酸酯的组织水平相比。对于化合物1和化合物2两者,活性TP在肝脏中的浓度高于心脏,但与化合物1相比,当给药化合物2时,活性TP的肝脏相对于心脏的选择性更高。

[0517] 实施例20. 大鼠和猴中化合物2代谢物的血浆曲线

[0518] 向雄性Sprague-Dawley大鼠和食蟹猴(每剂量组3只动物)给单次口服剂量的化合物2。通过LC-MS/MS分析从用二氯松处理的血液样品制备的血浆等分试样中化合物1和代谢物1-7(方案1中所示的化合物2的活性三磷酸酯的核苷代谢物)的浓度,并使用WinNonlin确定药代动力学参数。大鼠中单次500mg/kg剂量的结果示于图17,并且猴中单次30、100或300mg/kg剂量的结果示于图18。结果也总结于表30。

[0519] 代谢物1-7(化合物2的活性三磷酸酯(TP)的核苷代谢物)的高血药水平表明TP的高水平形成,即使在由于大鼠血液中化合物1的短半衰期(<2min)而观察到母体核苷酸前药的血药水平非常低的大鼠中也是如此。代谢物1-7的持久血药水平反映了TP的长半衰期。

[0520] 在猴中,化合物1的血浆暴露(AUC)大致与剂量成比例,而代谢物1-7暴露稍微小于剂量比例,同时母体药物和活性TP的核苷代谢物两者的AUC值继续增加至测试的最高剂量(300mg/kg)。

[0521] 在大鼠和猴中口服给予化合物2产生对代谢物1-7(化合物2的细胞内活性三磷酸酯的核苷代谢物)的高且剂量依赖性的血浆暴露;代谢物1-7暴露持续增加至最高测试剂量,反映了这些物种中活性TP的实质性形成。

[0522] 表30. 单次口服剂量的化合物2后化合物1和1-7的血药水平

	物种	大鼠 ^a	猴 ^b		
	剂量 (mg/kg)	500	30	100	300
[0523] 化合物 1	C _{max} (ng/mL)	60.8	63.5	783	501
	T _{max} (hr)	0.25	0.5-2	1-2	204
	AUC _{0-last} (hr*ng/mL)	78.2	176	1100	1600
代谢物 1-7	C _{max} (ng/mL)	541	42.5	131	93.6
	AUC _{0-last} (hr*ng/mL)	9640	1620	3030	3660
	T _{max} (hr)	6-8	12-24	4	4-24
	T _{1/2} (hr)	15.3	11.5	15.0	18.8

[0524] 剂量制剂:^a水中的0.5%CMC、0.5%Tween 80;^b胶囊中的粉末

[0525] 实施例21. 化合物1和化合物2的活性三磷酸酯对线粒体完整性的效果

[0526] 化合物1和化合物2的活性三磷酸酯 (TP)、代谢物1-6 (方案1) 通过人线粒体RNA聚合酶并入的相对效率与索非布韦的活性TP和INX-189的活性TP的相对效率进行比较。化合物1和化合物2不太可能影响线粒体完整性, 因为它们的活性三磷酸酯难以与索非布韦的三磷酸酯相似的效率而通过人线粒体RNA聚合酶并入; INX-189的三磷酸酯并入的相对效率高达55倍。结果示于表31。根据Arnold等人 (Sensitivity of Mitochondrial Transcription and Resistance of RNA Polymerase II Dependent Nuclear Transcription to Antiviral Ribonucleotides. PLoS Pathog., 2012, 8, e1003030), 确定通过人线粒体RNA依赖性RNA聚合酶 (POLRMT) 并入这些类似物。

[0527] 表31. 用人线粒体RNA聚合酶评估核苷酸类似物的动力学参数

	核苷酸类似物	K _{pol} (s ⁻¹)	K _{d,app} (μM)	K _{pol} /K _{d,app} (μM ⁻¹ s ⁻¹)	相对效率*
	2'-脱氧-2'-F-2'-C-甲基 UTP (索非布韦的活性 TP)	0.00034 ± 0.00005	590 ± 250	5.8 × 10 ⁻⁷ ± 2.6 × 10 ⁻⁷	1.0 × 10 ⁻⁶
[0528]	2'-C-甲基 GTP (INX-189 的活性 TP)	0.051 ± 0.002	240 ± 26	2.1 × 10 ⁻⁴ ± 0.2 × 10 ⁻⁴	5.5 × 10 ⁻⁵
	化合物 1 和化合物 2 的活性 TP (代谢物 1-6)	0.0017 ± 0.0002	204 ± 94	8.3 × 10 ⁻⁶ ± 4.0 × 10 ⁻⁶	2.2 × 10 ⁻⁶

[0529] *相对效率 = (K_{pol}/K_{d,app})_{核苷酸类似物} / (K_{pol}/K_{d,app})_{天然核苷酸}

[0530] 实施例22. 化合物1对含有NS5B序列的复制子的活性

[0531] 使用一组含有源自6个实验室参比株 (GT1a、1b、2a、3a、4a和5a) (图19) 和源自8个HCV患者血浆样品 (GT1a、1b、2a、2b、3a-1、3a-2、4a和4d) (图20) 的各种HCV基因型的NS5B序列的复制子, 确定化合物1和索非布韦的效力。

[0532] 对HCV的临床和实验室株, 化合物1比索非布韦更有效。化合物1在体外对野生型临床分离株具有EC₉₅ < 80nM, 显示出有效的泛基因型抗病毒活性, 其比索非布韦高4至14倍。如图20所示, 对受试的所有HCV基因型的临床分离株, 化合物1的EC₉₅值比索非布韦低7-33倍。对HCV基因型1-5的实验室株化合物1的EC50值比索非布韦低6-11倍 (图19)。

[0533] 实施例23. 化合物2在健康志愿者 (A部分) 和GT1-HCV感染的患者中 (B部分) 中的单

次递增剂量 (SAD) 研究

[0534] 在单次递增剂量 (SAD) 研究中测试化合物2,以测量其在健康受试者(部分A)中的安全性、耐受性和药代动力学。A部分是一项随机、双盲、安慰剂对照的SAD研究。A部分中健康受试者在禁食状态下接受单剂量的化合物2或安慰剂。受试者从第-1天起被限制在诊所至第6天。

[0535] 在各群组中交错给药,使得在给药后48小时评估2名受试者(1名活性剂:1名安慰剂),然后对剩余群组给药。各群组以升序接受化合物2。基于对先前群组的可用安全性数据(通过第5天)和血浆药代动力学数据(通过24小时)的审查,进行后续群组的给药。

[0536] 在审查这些数据合格后推进剂量递增。由于出现在前一群组中的药物代谢动力学和安全性数据,在群组3a-4a中评估的剂量以不超过100mg的增量进行调整。A部分中评估的总最大剂量不超过800mg。A部分的给药方案示于表32。

[0537] 表32. 研究中化合物2给药的给药方案A部分

群组	群体	N(活性剂:安慰剂)	化合物2(化合物1)*
1a	健康	6:2	50 (45) mg x 1天
2a	健康	6:2	100 (90) mg x 1天
3a	健康	6:2	200 (180) mg x 1天
4a	健康	6:2	400 (360) mg x 1天

[0539] *临床剂量以化合物2表示,括号中为近似的基于化合物1的等效量

[0540] 研究的A部分中的健康志愿者是年龄在18至65岁之间的男性和女性受试者。在各A部分群组内汇集活性剂和安慰剂接受者,以保持研究盲试。

[0541] 还在单次递增剂量 (SAD) 研究中测试化合物2,以测量其在GT1-HCV感染的患者中的安全性、耐受性、药代动力学和抗病毒活性(B部分)。B部分中的受试者在禁食状态下接受单剂量的化合物2。受试者从第-1天起被限制在诊所至第6天。

[0542] B部分在来自A部分的群组3a的安全性(至第5天)和血浆药代动力学(至24小时)数据审查后开始。在招募后续B部分群组之前,对B部分的第1群组(群组1b)审查可用的安全性数据(至第5天)和药代动力学数据(至24小时)。后续的B部分群组在审查来自A部分中对应剂量的可用安全性和药代动力学数据、以及来自前一B部分群组的可用安全性(至第5天)后才给药。

[0543] 在审查这些数据合格后推进剂量递增直至在HCV感染的患者中达到600mg。B部分的给药方案示于表33。

[0544] 表33. 研究中化合物2给药的给药方案B部分

群组	群体	N(活性剂)	化合物2(化合物1)*
1b	GT1HCV感染	3	100 (90) mg x1天
2b	GT1HCV感染	3	300 (270) mg x1天
3b	GT1HCV感染	3	400 (360) mg x1天
4b	GT1HCV感染	3	600 (540) mg x1天

[0546] *临床剂量以化合物2表示,括号中为近似的基于化合物1的等效量

[0547] HCV感染的患者是未经治疗的非肝硬化GT1感染的受试者,病毒载量 $\geq 5 \log_{10}$ IU/mL。

[0548] A部分或B部分中没有记录到严重的不良事件,并且都不需要提前中断。所有不良反应的强度均为轻度至中度,并且没有明显的剂量相关模式,包括实验室参数、生命体征和心电图。

[0549] 实施例24. 化合物2的单次递增剂量 (SAD) 研究结果

[0550] 在单剂量的化合物2后测量化合物1和核苷代谢物1-7的药代动力学。600mg的剂量的化合物2后代谢物1-7的 C_{24h} 血药谷浓度(C_{24h}) 在HCV感染的患者中为25.8ng/mL,这与300mg剂量的化合物2后的血药浓度剂量相比大于2倍。代谢物1-7 (如方案1中所示) 仅可通过细胞内磷酸酯代谢物1-4、代谢物1-5和代谢物1-6 (其为活性物质) 的去磷酸化而产生。因此,代谢物1-7可被认为是活性物种的替代物。所有组群的药代动力学数据示于表34和表35。值报告为平均值 $\pm$ SD,除了在 T_{max} 中报告中值 (范围)。药代动力学参数在健康和HCV感染的患者中是相当的。

[0551] 表34. 在健康志愿者中给予单剂量的化合物2后化合物1和代谢物1-7的人药代动力学

[0552]

	剂量 (mg)	C_{max} (ng/mL)	T_{max} (h)	AUC_{tot} (ng*h/mL)	$T_{1/2}$ (h)	C_{24h} (ng/mL)
A 部分, 健康受试者						
化合物 1	50	46.4 $\pm$ 17.6	0.5 (0.5-0.5)	36.4 $\pm$ 12.3	0.32 $\pm$ 0.02	--
	100	156 $\pm$ 96.3	0.5 (0.5-1.0)	167 $\pm$ 110	0.53 $\pm$ 0.24	--
	200	818 $\pm$ 443	0.5 (0.5-3.0)	656 $\pm$ 255	0.71 $\pm$ 0.16	--
	400	1194 $\pm$ 401	0.5 (0.5-1.0)	1108 $\pm$ 326	0.86 $\pm$ 0.15	--
代谢物 1-7	50	27.9 $\pm$ 5.62	3.5 (3.0-4.0)	285 $\pm$ 69.4	7.07 $\pm$ 4.59	2.28 $\pm$ 0.95
	100	56.6 $\pm$ 14.0	4.0 (3.0-6.0)	663 $\pm$ 242	17.7 $\pm$ 14.7	4.45 $\pm$ 1.87
	200	111 $\pm$ 38.8	5.0 (3.0-6.0)	1524 $\pm$ 497	15.9 $\pm$ 7.95	13.7 $\pm$ 5.09
	400	153 $\pm$ 49.4	6.0 (4.0-8.0)	2342 $\pm$ 598	15.6 $\pm$ 6.37	23.5 $\pm$ 6.31

[0553] *基于24小时的曲线。

[0554] 表35. 在GT1-HCV感染的患者中给予化合物2后化合物1和代谢物1-7的人药代动力学

[0555]

	剂量 (mg)	C _{max} (ng/mL)	T _{max} (h)	AUC _{tot} (ng*h/mL)	T _{1/2} (h)	C _{24h} (ng/mL)
化合物 1	100	212 ± 32.0	0.5 (0.5-1.0)	179 ± 54.4	0.54 ± 0.12	--
	300	871 ± 590	0.5 (0.5-1.0)	818 ± 475	0.64 ± 0.20	--
	300	2277 ± 893	0.5 (0.5-1.0)	1856 ± 1025	0.84 ± 0.18	--
	400	2675 ± 2114	1.0 (1.0-2.0)	2408 ± 1013	0.86 ± 0.18	--
	600	3543 ± 1649	1.0 (0.5-1.0)	4132 ± 1127	0.70 ± 0.13	--
代谢物 1-7	100	50.2 ± 15.4	6.0 (4.0-6.0)	538 ± 103*	8.4 ± 4.3*	3.60 ± 0.40
	300	96.9 ± 38.9	6.0 (3.0-6.0)	1131 ± 273*	8.1 ± 2.4*	10.9 ± 3.51
	300	123 ± 16.6	4.0 (3.0-6.0)	1420 ± 221	--	18.0 ± 8.83
	400	160 ± 36.7	4.0 (4.0-4.0)	2132 ± 120	11.6 ± 1.21	22.5 ± 3.29
	600	198 ± 19.3	4.0 (4.0-6.0)	2176 ± 116	--	25.8 ± 4.08

[0556] *基于24小时的曲线。

[0557] 还计算了研究中的A部分和B部分的所有组群的化合物1和代谢物1-7的平均血药浓度-时间曲线。图21是单剂量的化合物2后化合物1的平均血药浓度,并且图22是单剂量的化合物2后代代谢物1-7的平均血药浓度。如图21所示,化合物1在来自B部分的所有组群中被快速吸收并迅速/大量代谢。如图22所示,代谢物1-7是主要代谢物,并且表现出持续的血药浓度。化合物1的血浆暴露是剂量相关的,而代谢物1-7的暴露是成剂量比例的。

[0558] 对于B部分的HCV感染的受试者,在给予化合物2之前、期间和之后进行HCV RNA定量测量。通过使用经验证的商用测定实施血浆HCV RNA确定。基线定义为第-1天和第1天(给药前)的平均值。单次300mg剂量的化合物2(等效于270mg化合物1)在GT1b-HCV感染的受试者中产生显著的抗病毒活性。在GT1a HCV感染的受试者中,单次300mg剂量后24小时给药后平均最大HCV RNA减少量为1.71log₁₀IU/mL,与此相比,400mg索非布韦单药治疗1天后减少量为-21log₁₀IU/mL。单次100mg剂量后24小时给药后平均最大HCV RNA减少量为0.81log₁₀IU/mL。单次400mg剂量后平均最大HCV RNA减少量为2.21log₁₀IU/mL,来自研究的B部分的个体受试者的个体药代动力学/药效学分析示于图23A-23F。将代谢物1-7浓度对HCV RNA减少浓度作图,并且如图23A-23F所示,血浆HCV RNA减少量与血浆代谢物1-7暴露相关。病毒应答持续,其中代谢物1-7血药浓度大于对GT1b的EC₉₅值。血药浓度和HCV RNA减少水平之间的相关性表明,用更高剂量的化合物2可以实现更显著的应答。

[0559] 实施例25. 代谢物1-7的预测稳态谷水平超过化合物1对HCV GT1-4的临床分离株的EC₉₅

[0560] 如图24所示,在人中给药化合物2(600mg QD(550mg游离碱当量)和450mg QD(400mg游离碱当量))后,预测代谢物1-7的稳态血药谷水平($C_{24,ss}$),并与化合物1在体外在所有受试的临床分离株中的 EC_{95} 相比,以确定稳态血药浓度是否始终高于 EC_{95} ,这将得到对任何或所有受试的临床分离株在体内的高效力。化合物1的 EC_{95} 与化合物2的 EC_{95} 相同。为使化合物2有效,代谢物1-7的稳态谷浓度血药水平应超过 EC_{95} 。

[0561] 如图24所示,化合物2对所有受试的临床分离株的 EC_{95} 为约18至24nM。

[0562] 如图24所示,化合物2在人中,在450mg QD(400mg游离碱当量)的剂量下提供约40ng/mL的预测稳态血药谷浓度($C_{24,ss}$)。化合物2在600mg QD(550mg游离碱当量)的剂量下提供约50ng/mL的预测稳态血药谷浓度($C_{24,ss}$)。

[0563] 因此,替代的代谢物1-7的预测稳态血药浓度几乎是对所有受试的临床分离株(甚至难以治疗的GT3a)的 EC_{95} 的两倍,这表明优异的性能。

[0564] 与此相对地,所有受试的HCV临床分离株的标准治疗物核苷酸索非布韦的 EC_{95} 为50至265nM,仅对两种分离株(GT2a和GT2b)在400mg市售剂量下 EC_{95} 小于预测稳态浓度。对于其他临床分离株(GT1a、GT1b、GT3a、GT4a和GT4d),400mg市售剂量的索非布韦的 EC_{95} 大于预测稳态浓度。

[0565] 对于化合物2,使用300mg稳态血药谷浓度($C_{24,ss}$)预测450mg稳态血药谷浓度($C_{24,ss}$)。300mg下的平均稳态血药谷浓度($C_{24,ss}$)为26.4ng/mL,因此计算为 $26.4 \times 450/300 = 39.6$ ng/mL。

[0566] 使用三种方法预测600mg稳态血药谷浓度($C_{24,ss}$):1) 600mg第1天 C_{24} 平均值为25.8ng/mL,并且假定增加60%达到稳态。因此,计算值为 $25.8 \times 1.6 = 41.3$ ng/mL;2) 400mg第1天 C_{24} 平均值为22.5ng/mL,并且假定增加60%达到稳态。考虑到剂量比例的PK,计算值为 $22.5 \times 1.6 \times 600/400 = 54$ ng/mL;3) 300mg稳态血药谷浓度($C_{24,ss}$)为26.4ng/mL,并且假定成比例的PK。因此,计算值为 $26.4 \times 2 = 52.8$ ng/mL。600mg稳态血药谷浓度($C_{24,ss}$)是3个数据点的平均值($(41.3 + 54 + 52.8)/3 = 49.3$ ng/mL)。通常在单次剂量后,与 C_{24} 相比,稳态下 C_{24} 增加约60%。

[0567] 比较图24中的效力和药代动力学稳态参数的数据清楚地证明了化合物2用于治疗丙型肝炎的预料不到的治疗重要性。事实上,给予化合物2的预测稳态血药水平对所有受试的基因型被预测为至少比 EC_{95} 高2倍,并且对GT2的效力高3至5倍。该数据表明,化合物2在人中具有有效的泛基因型抗病毒活性。如图24所示,GT1、GT3和GT4的索非布韦的 EC_{95} 大于100ng/mL。因此,意料不到的是,化合物2对HCV具有活性,其剂型递送比通过类似剂型的索非布韦所达到的稳态谷浓度(约100ng/mL)更低的稳态谷浓度(40-50ng/mL)。

[0568] 实施例26. 化合物2的配方描述和制造

[0569] 化合物2片剂(50mg和100mg)的代表性非限制配方示于表36。如图25所示,使用直接压制法,由常规共混物制备片剂。基于原样测定调整活性药物成分(API),对微晶纤维素的百分比进行调整。将API和赋形剂(微晶纤维素、乳糖一水合物、交联羧甲基纤维素钠)过筛,放入V型共混机(PK Blendmaster, 0.5L碗),并在25rpm下混合5分钟。然后,将硬脂酸镁过筛并添加,将共混物进一步混合2分钟。将常规共混物分割用于生产50mg和100mg片剂。然后使用单冲压研究性压片机(Korsch XP1)和重力粉末进料器,以10片/分钟的速度压制经润滑的共混物。使用圆形标准凹型6mm工具和3.5kN的力生产50mg片剂。使用8mm圆形标准凹

形工具和3.9-4.2kN的力生产100mg片剂。

[0570] 表36. 50mg和100mg化合物2片剂的配方

	原材料	% w/w	g/批次	Mg/单位	
				50 mg 片剂	100 mg 片剂
[0571]	化合物 2	50.0	180.0	50.0	100.0
	微晶纤维素, USP/NF, EP	20.0	72.0	20.0	40.0
	乳糖一水合物, USP/NF, BP, EP, JP	24.0	86.4	24.0	48.0
	羧甲基纤维素钠, USP/NF, EP	5.0	18.0	5.0	10.0
	硬脂酸镁, USP/NF, BP, EP JP	1.0	3.6	1.0	2.0
总计				100.0	200.0

[0572] 将化合物2和赋形剂(微晶纤维素、乳糖一水合物、交联羧甲基纤维素钠)过筛,放入V型共混机(PK Blendmaster, 0.5L碗)中并以25rpm混合5分钟。然后,将硬脂酸镁过筛并添加,将共混物进一步混合2分钟。将常规共混物分割用于生产50mg和100mg片剂。然后使用单冲压研究性压片机(Korsch XP1)和重力粉末进料器,以10片/分钟的速度压制经润滑的共混物。使用圆形标准凹型6mm工具和3.5kN的力生产50mg片剂。使用8mm圆形标准凹形工具和3.9-4.2kN的力生产100mg片剂。50mg和100mg片剂的规格示于表37。

[0573] 表37. 化合物2的50mg和100mg片剂的规格

	50mg 片剂	100mg 片剂
平均重量 (n=10)	100±5mg	200±10mg
个人体重	100±10mg	200±20mg
硬度	5.3kp	8.3kp
崩解	<15分钟	<15分钟
脆性	NMT 0.5%	NMT 0.5%

[0575] 如上所述制备的50mg和100mg片剂在3种条件下进行6个月的稳定性研究:5℃(冷藏)、25℃/60%RH(环境)和40℃/75%RH(加速)。在所有3种测试条件下,50mg和100mg片剂都是化学稳定的。

[0576] 在冷藏条件(5℃)下,50mg和100mg片剂均为白色固体,其外观在T=0至T=6个月时没有变化。在整个6个月的研究中,没有报告50mg片剂或100mg片剂的杂质大于0.05%。两种片剂在6个月后的水含量也小于3.0%w/w。当片剂经受环境条件(25℃/60%RH)时,报告了类似的结果;两种片剂在整个6个月内均未报告大于0.05%的杂质,并且在6个月时水含量不超过3.0%w/w。当片剂经受加速条件(40℃/75%RH)时,50mg和100mg片剂的外观没有从白色圆形片剂改变。3个月后报告了一种杂质,但杂质仅为0.09%。6个月后报告了第二种杂质,但50mg和100mg片剂的总杂质百分比仅为0.21%。50mg片剂在6个月时的水含量为

3.4%w/w, 100mg片剂的含水量为3.2%w/w。

[0577] 在另一项研究中, 在环境条件 (25℃/60%RH) 下测量化合物2的50mg和100mg片剂经9个月的稳定性。在9个月的过程中, 50mg和100mg片剂的外观没有从白色圆形片剂改变。在9个月后, 50mg片剂中的杂质小于0.10%, 并且100mg片剂中的杂质小于0.05%。在9个月后, 50mg片剂和100mg片剂的水含量分别仅为2.7%w/w和2.6%w/w。

[0578] 本说明书已经参考本发明的实施方案进行了描述。然而, 本领域普通技术人员会认识到, 在不脱离随附权利要求书所述的本发明范围的情况下, 可以进行各种修改和改变。因此, 说明书应被视为说明性而非限制性意义, 并且所有这些修改旨在包括在本发明的范围内。

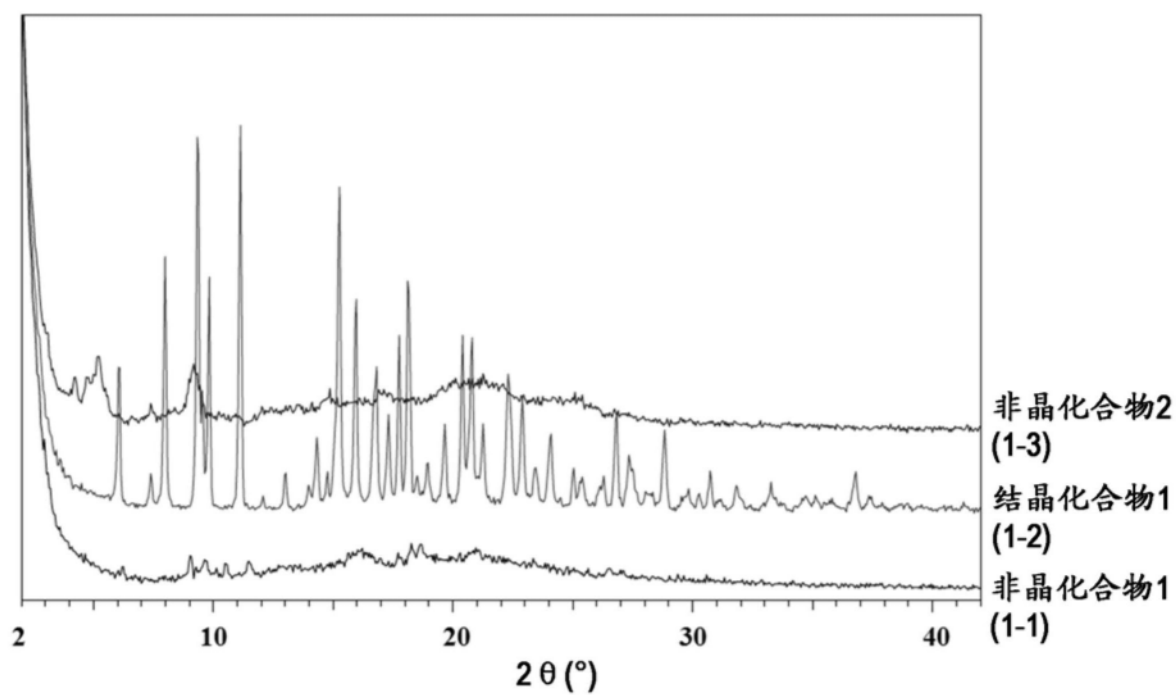


图1A

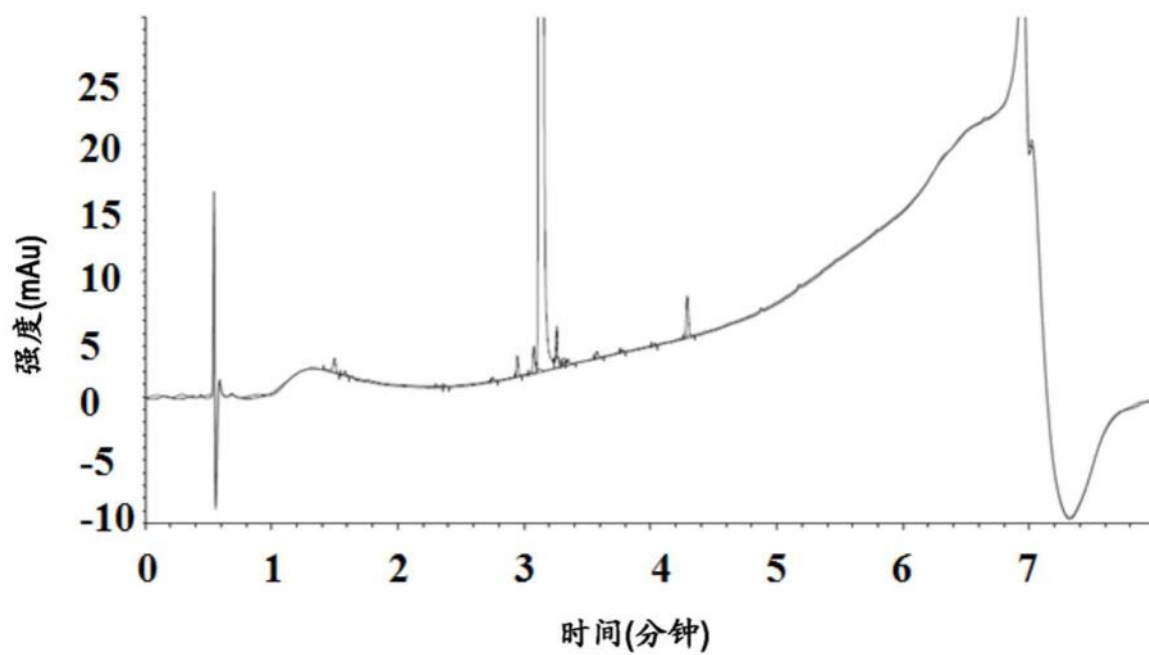


图1B

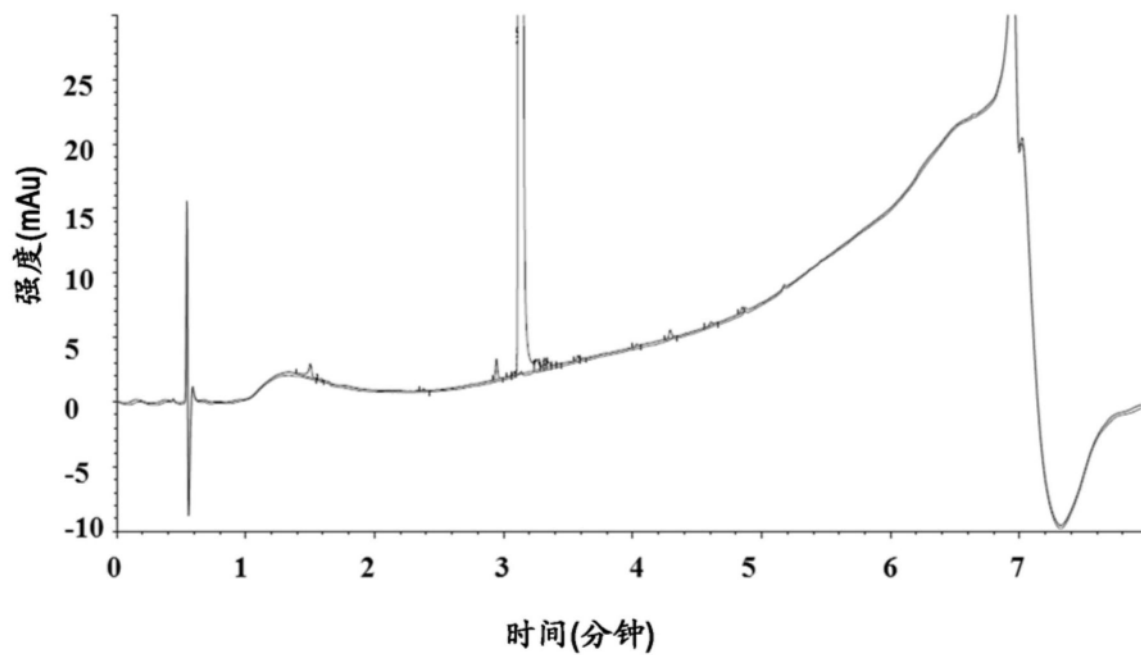


图2A

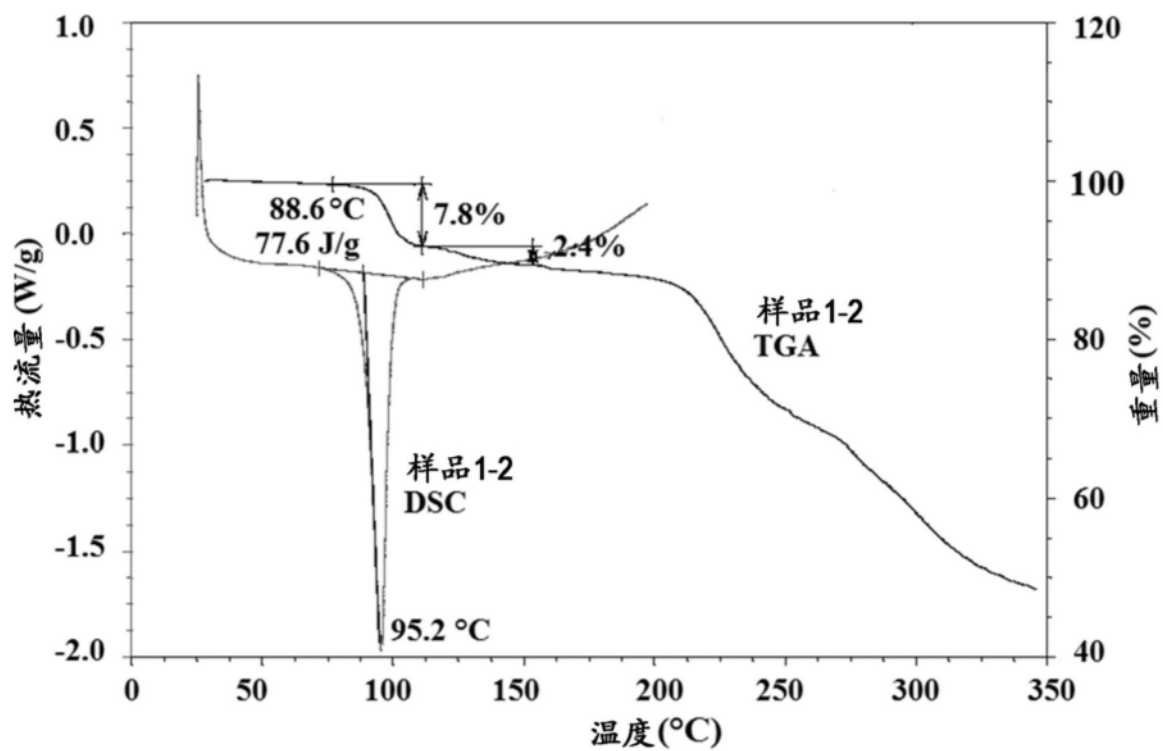


图2B

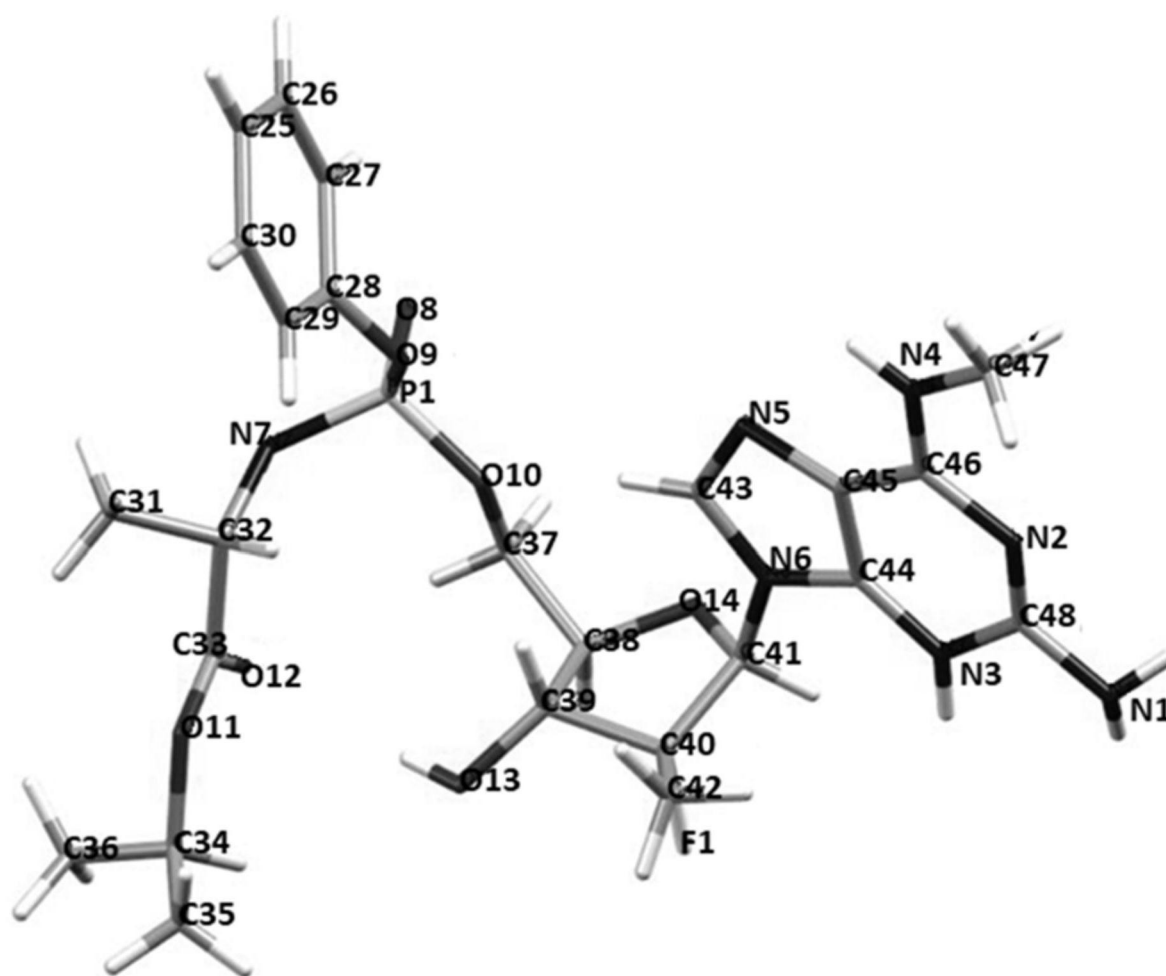


图3

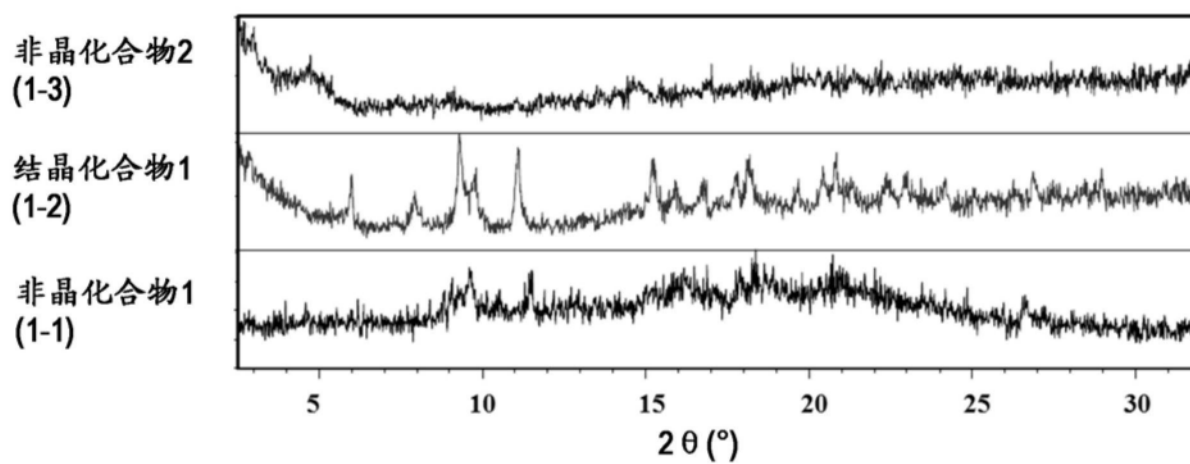


图4A

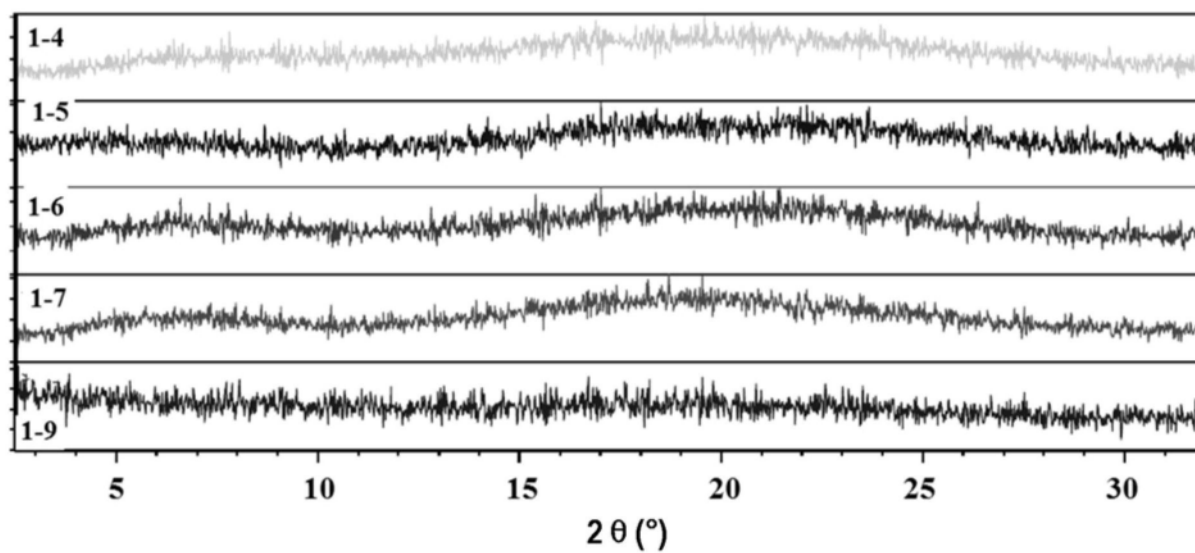


图4B

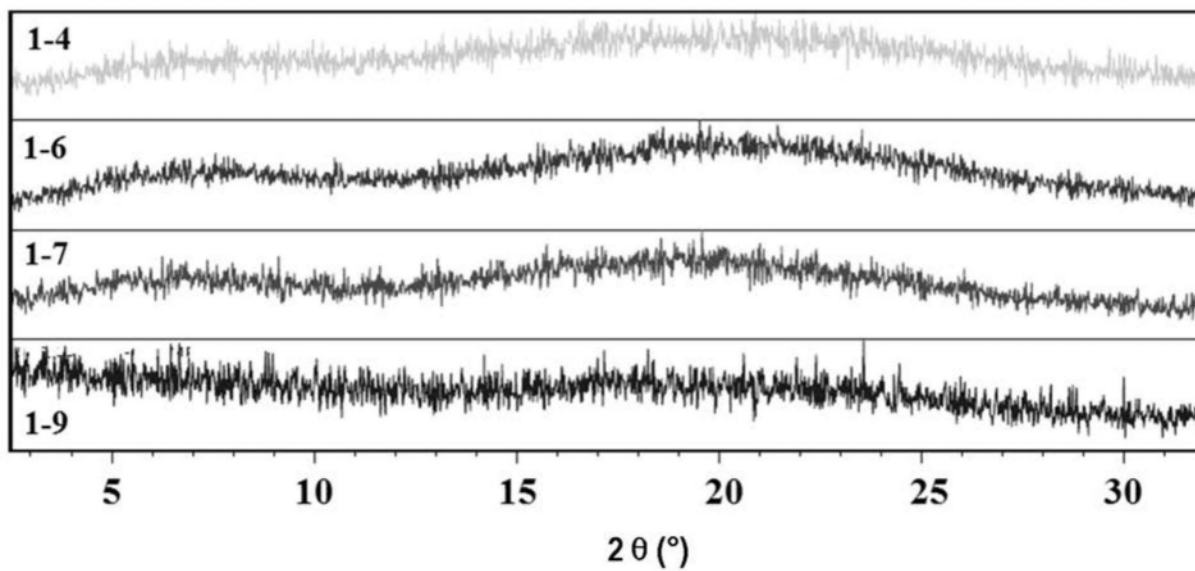


图5A

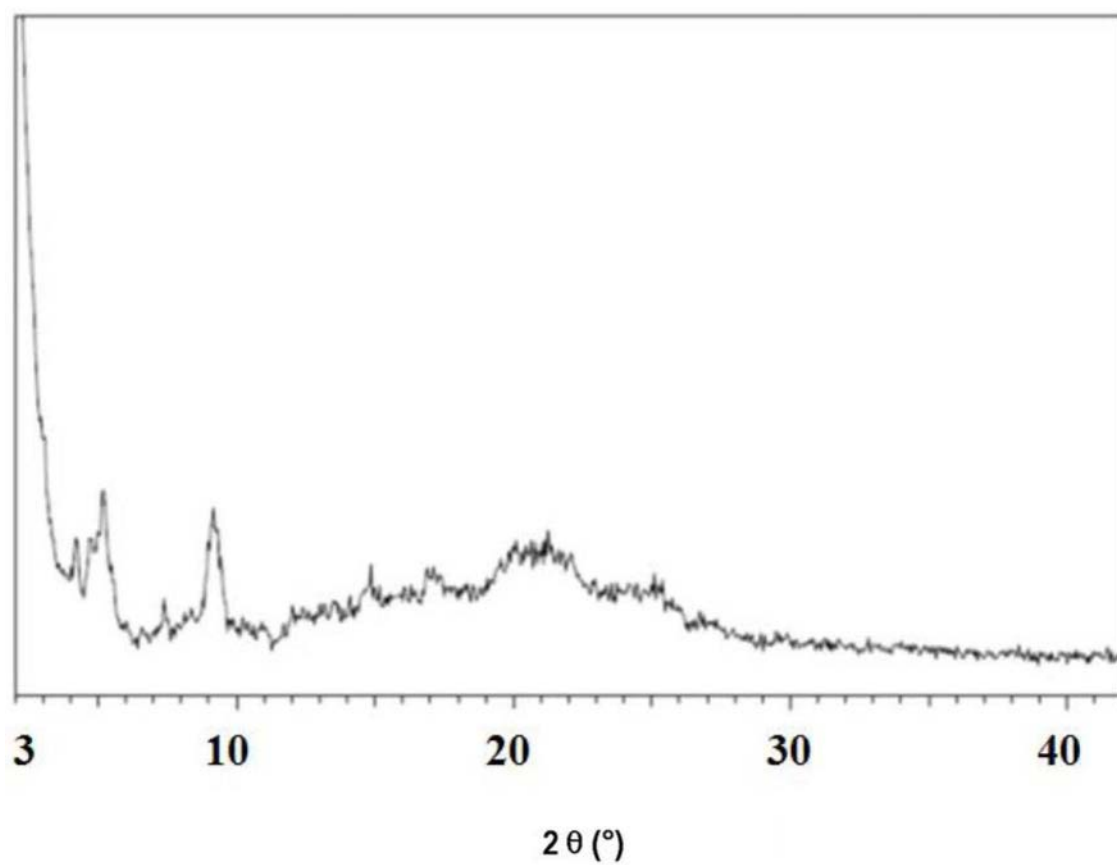


图5B

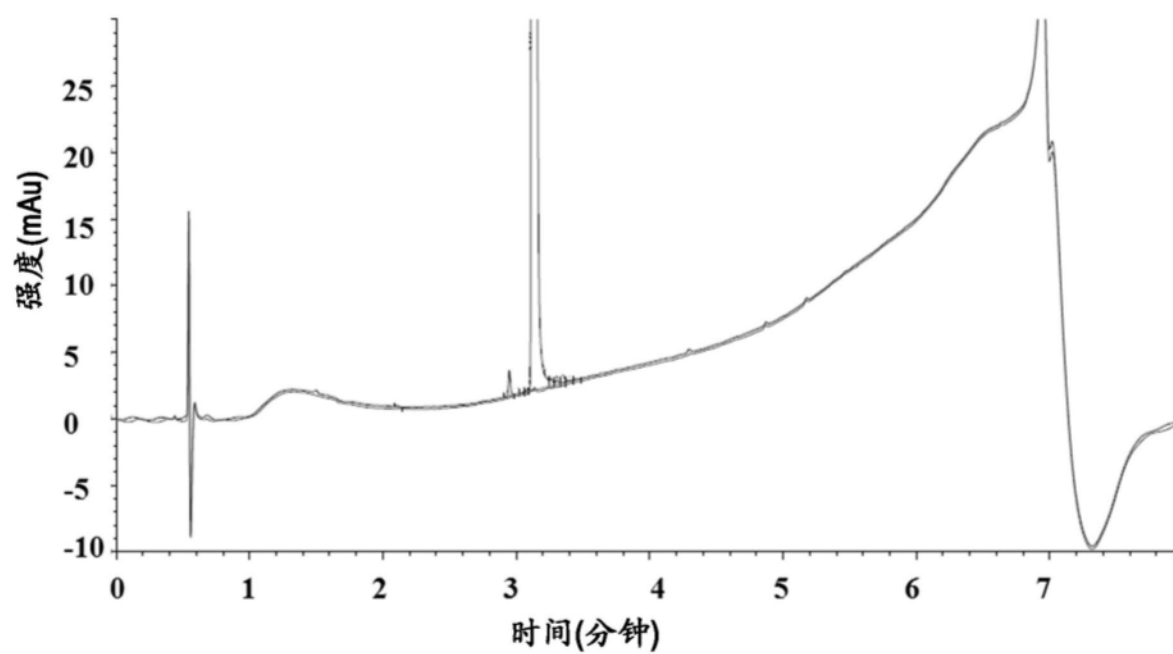


图6A

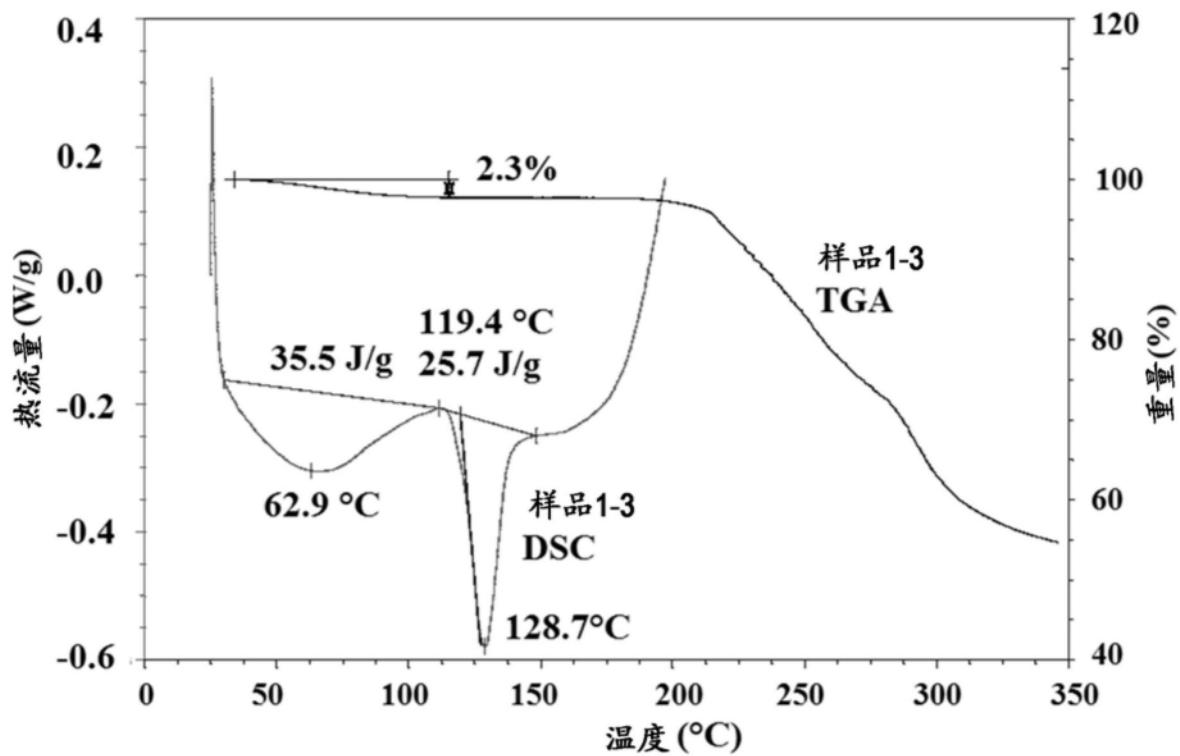


图6B

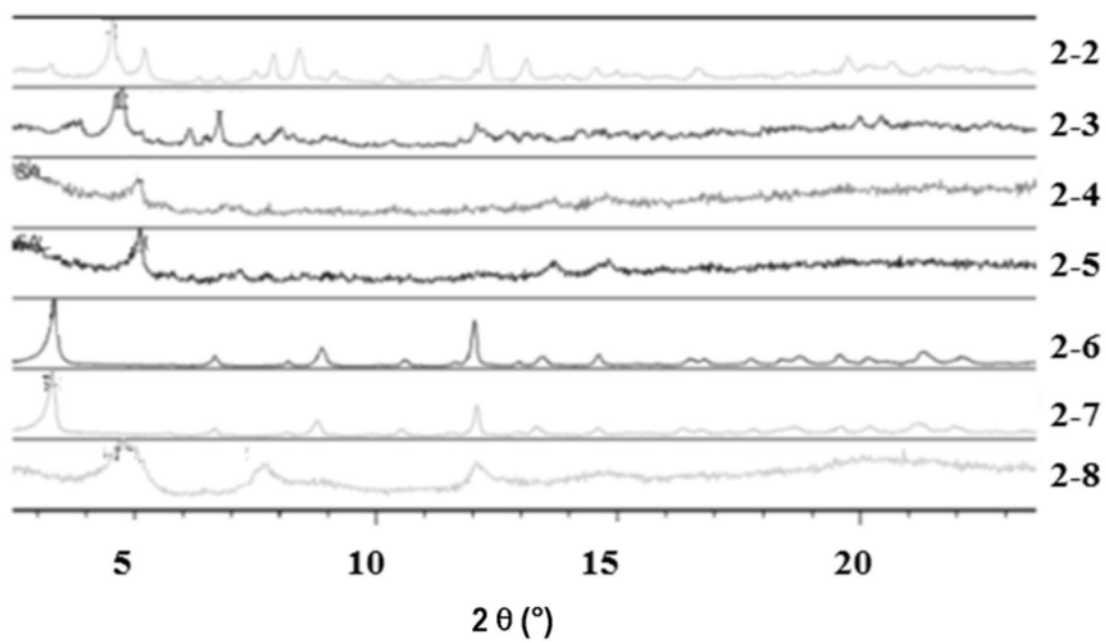


图7A

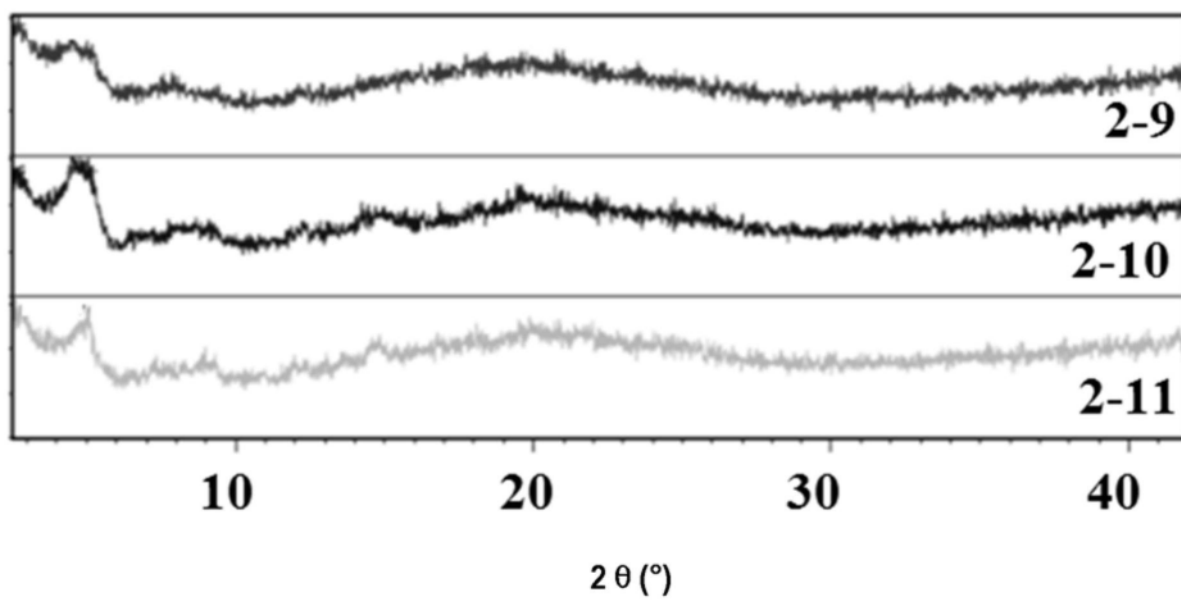


图7B

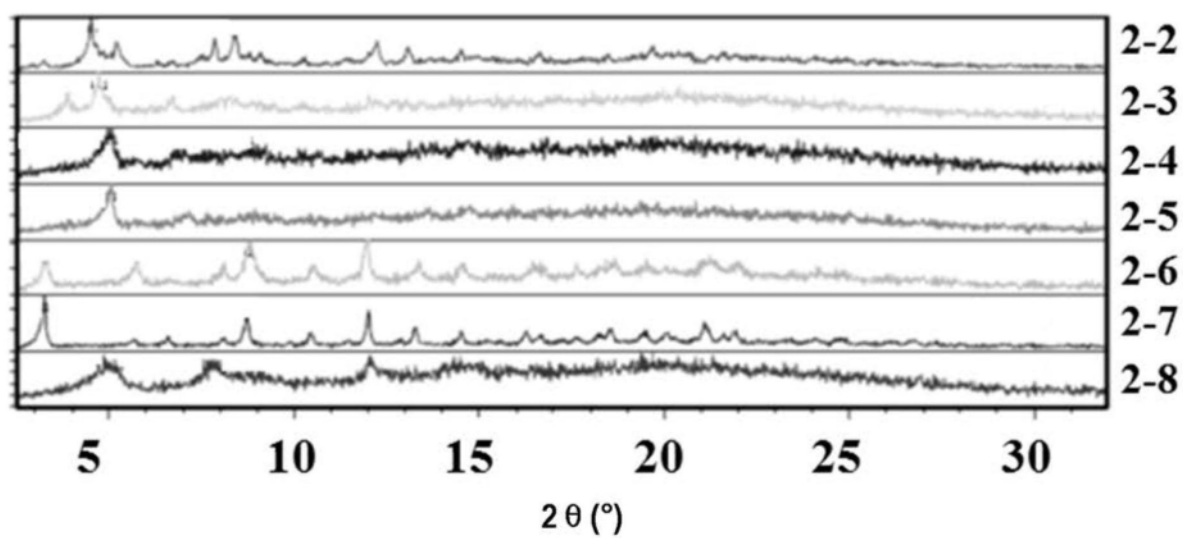


图8A

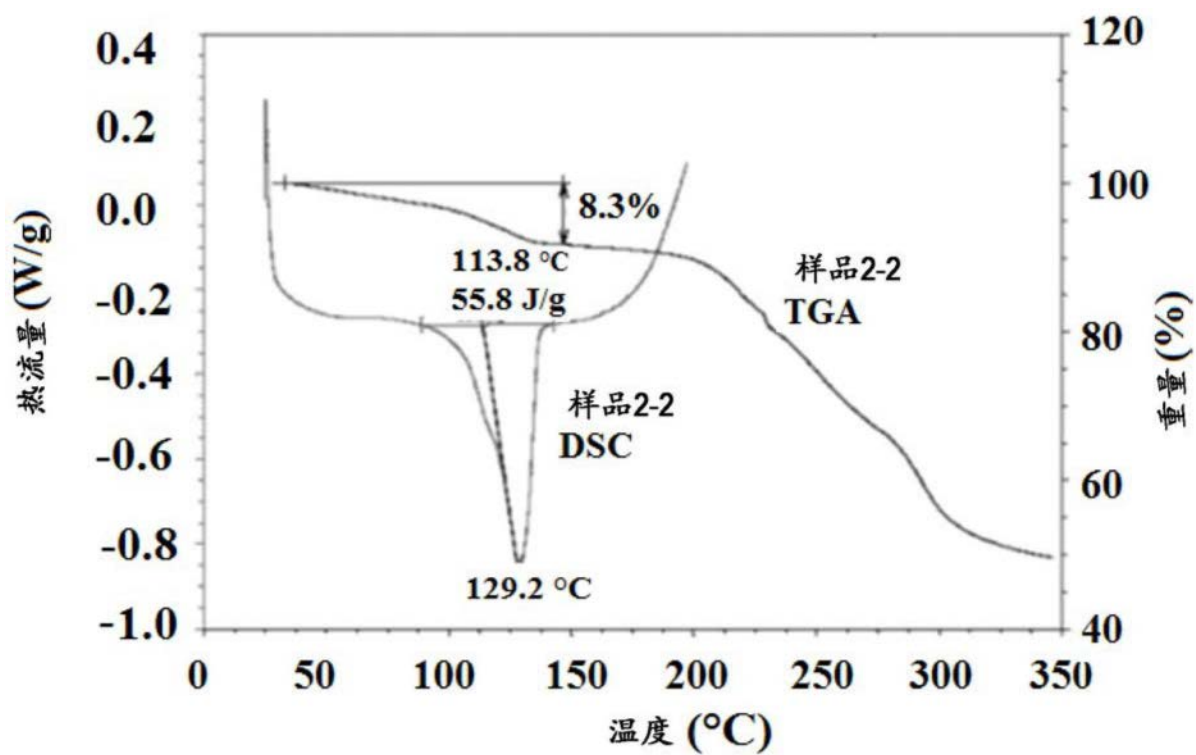


图8B

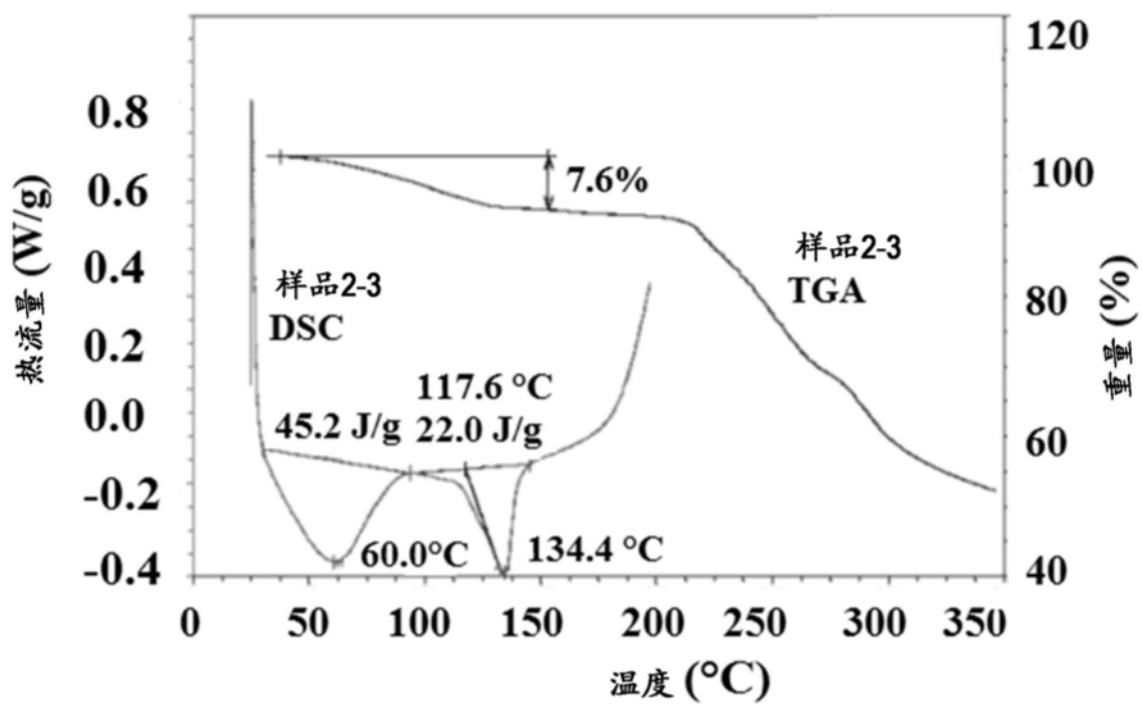


图9A

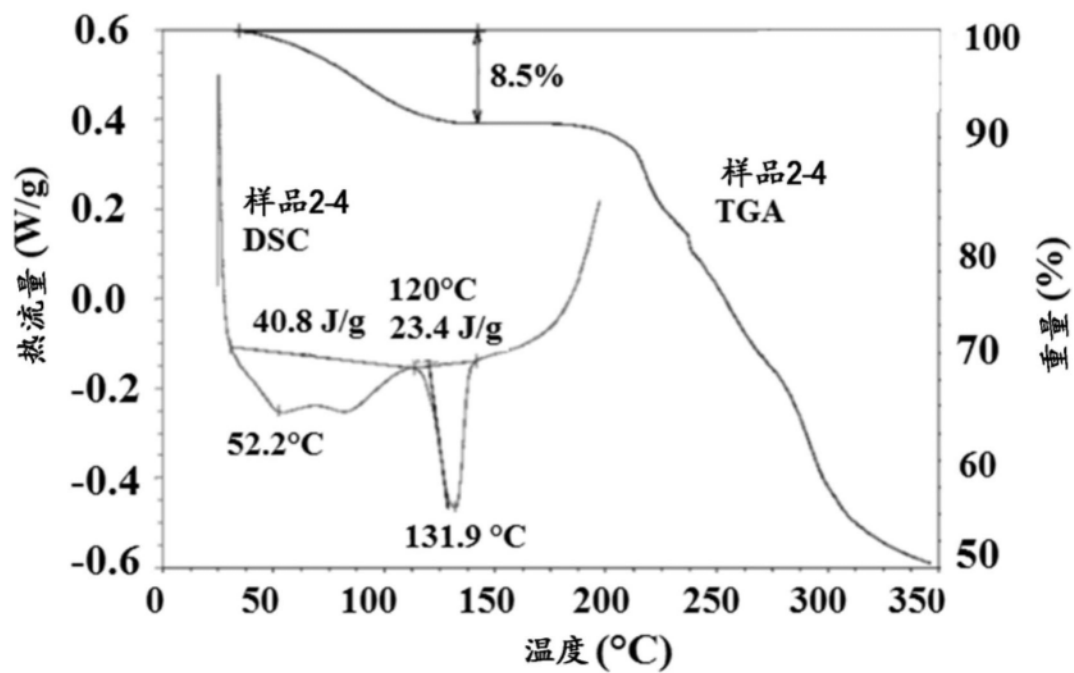


图9B

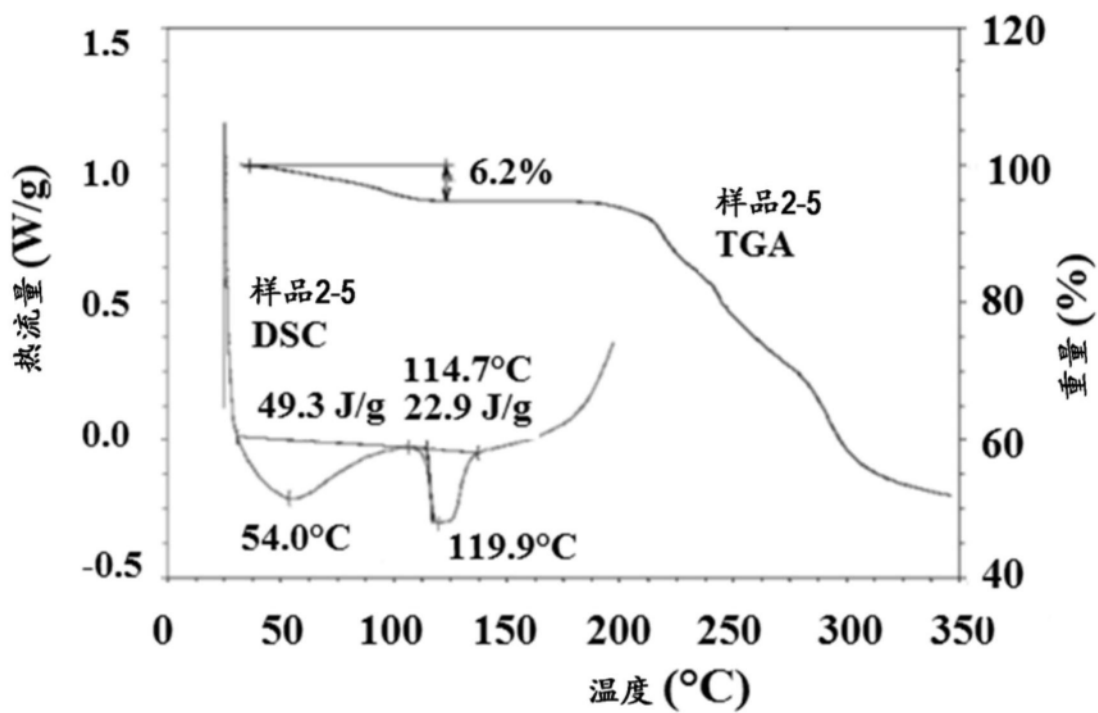


图10A

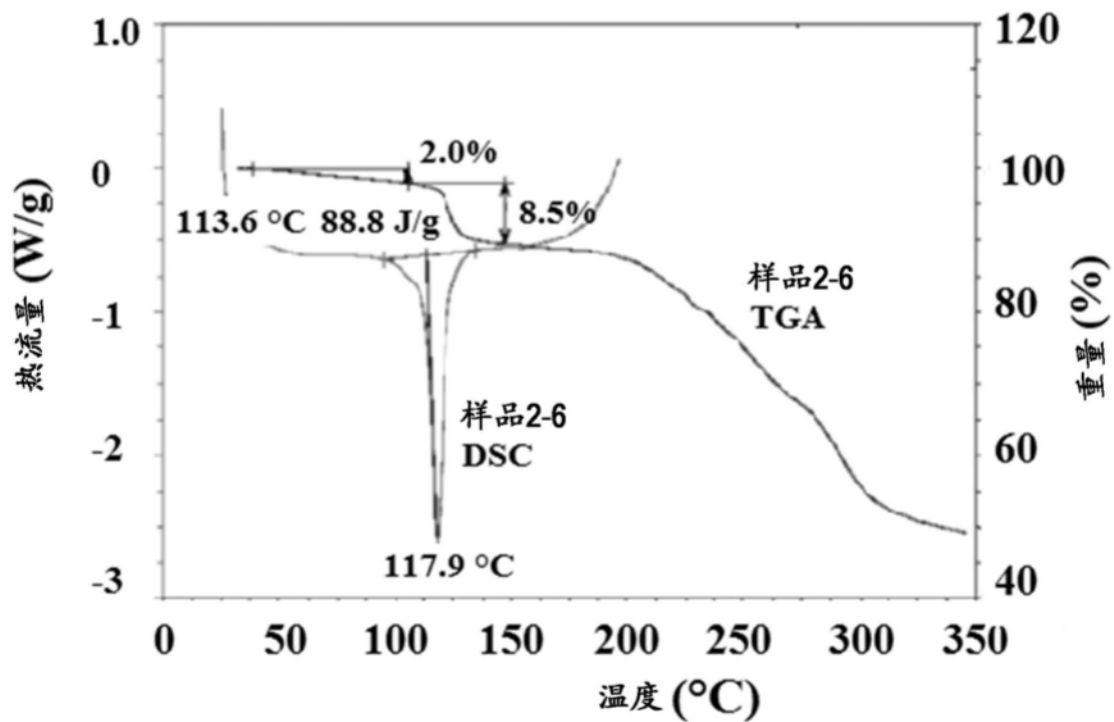


图10B

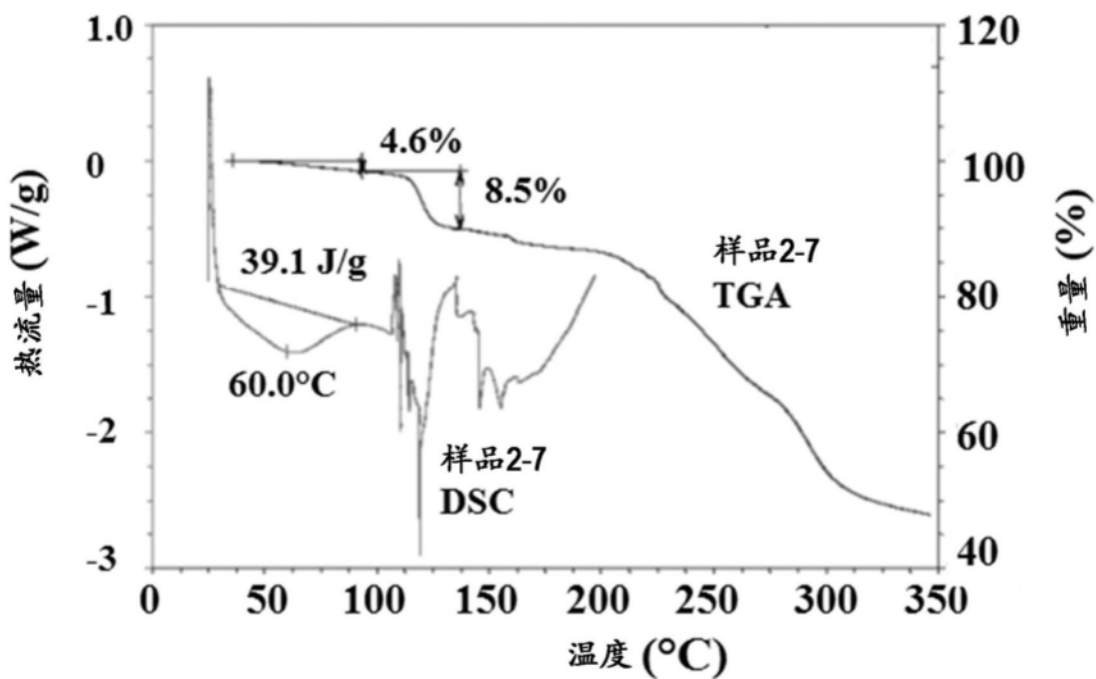


图11A

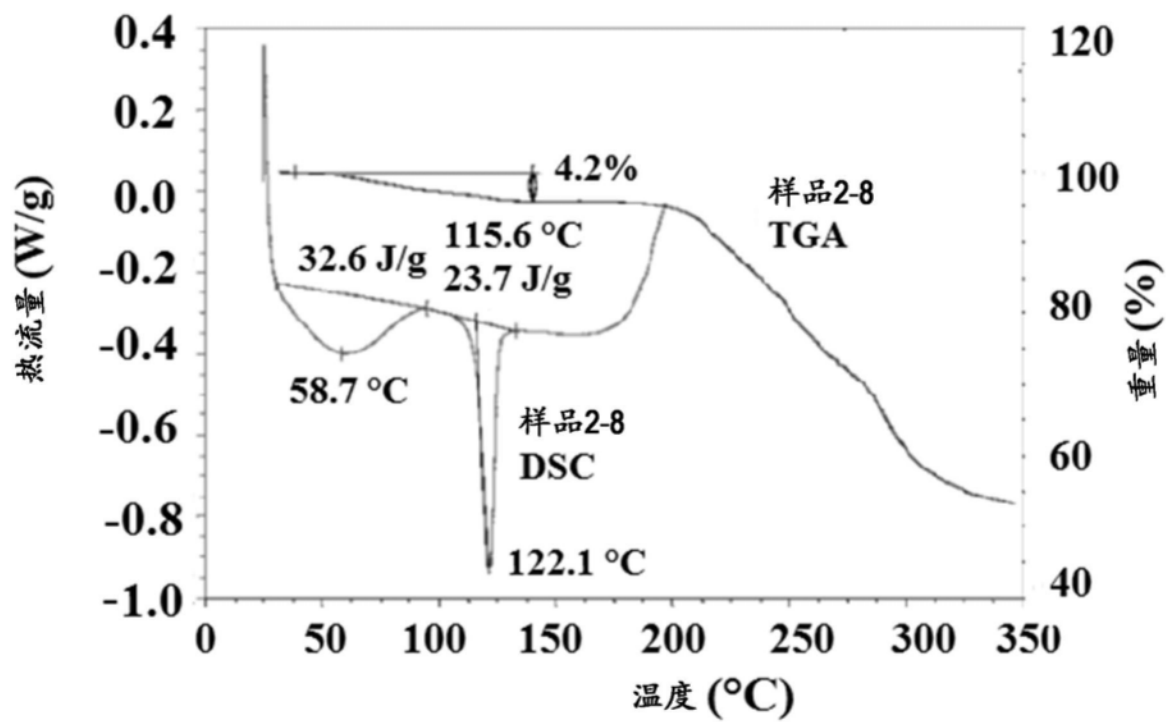


图11B

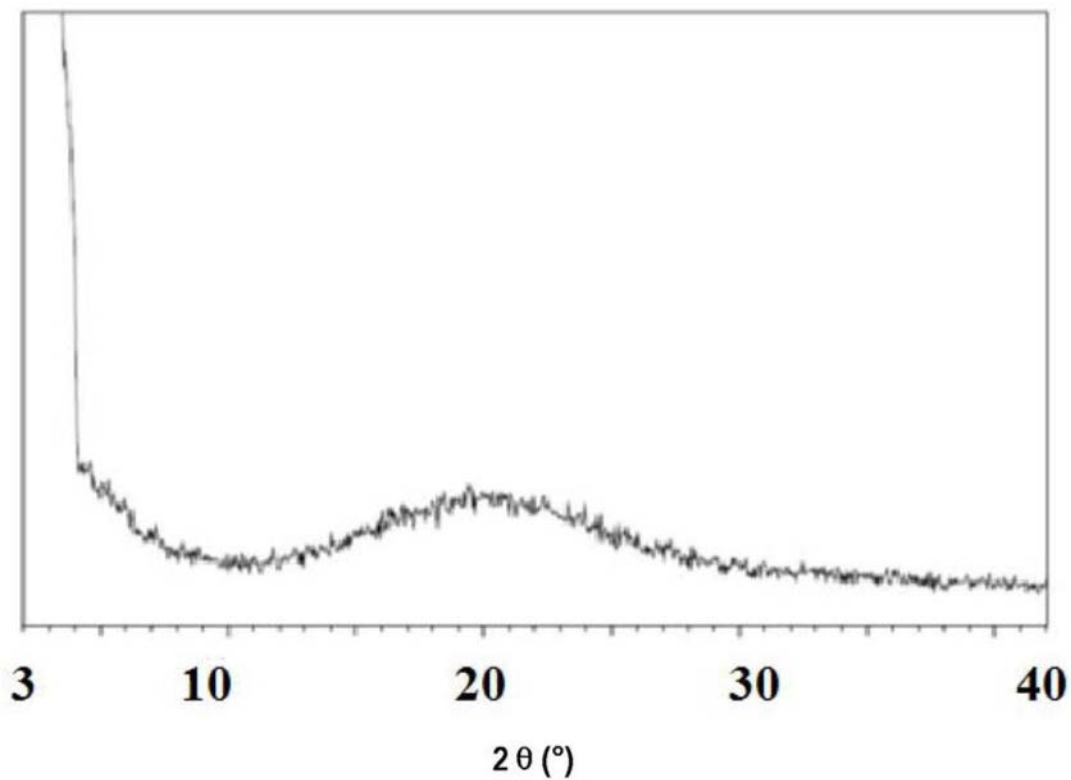


图12A

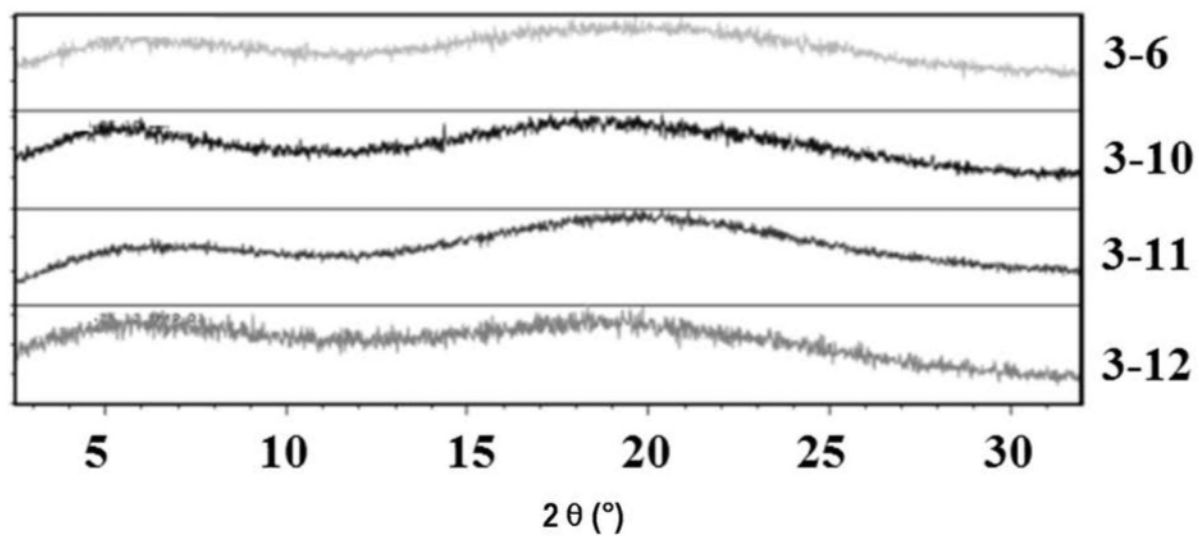


图12B

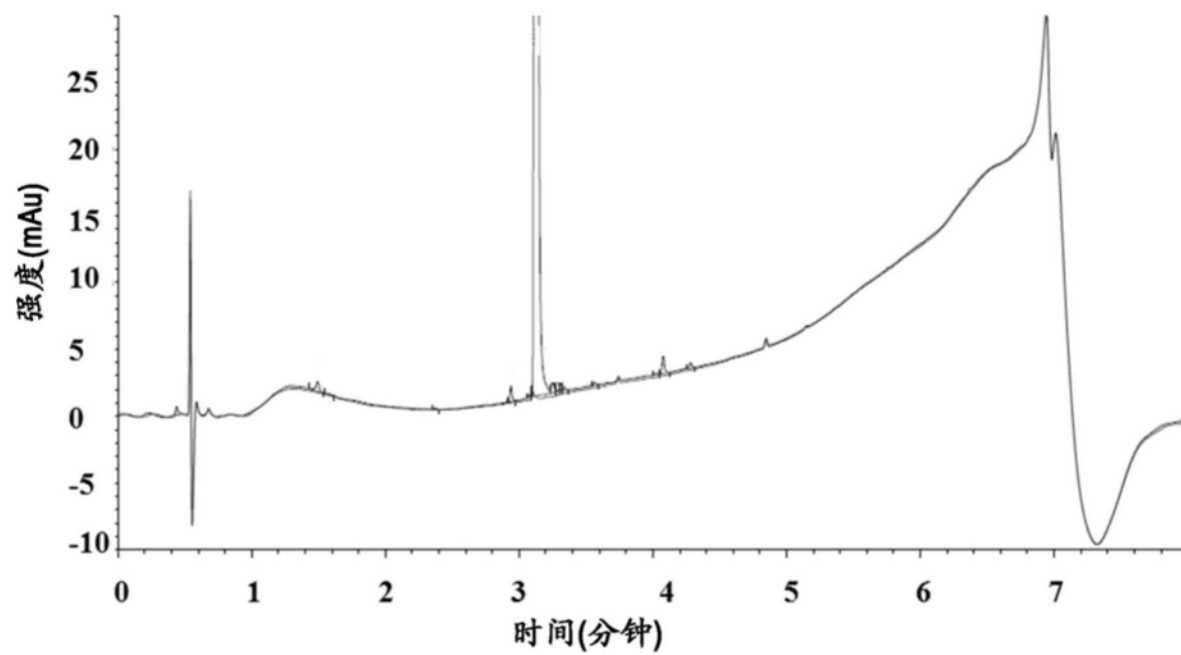


图13A

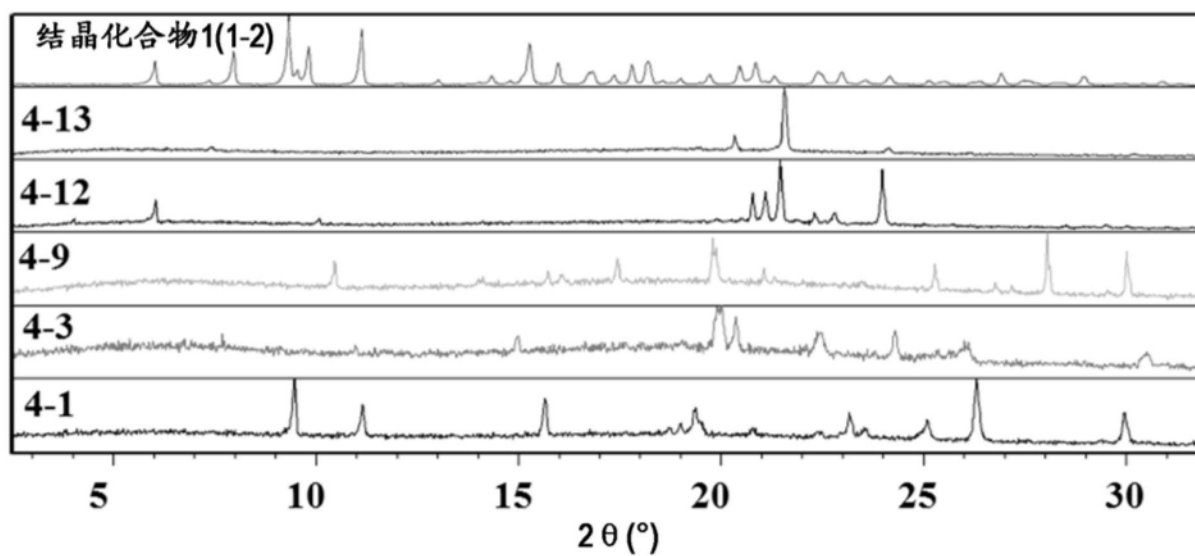


图13B

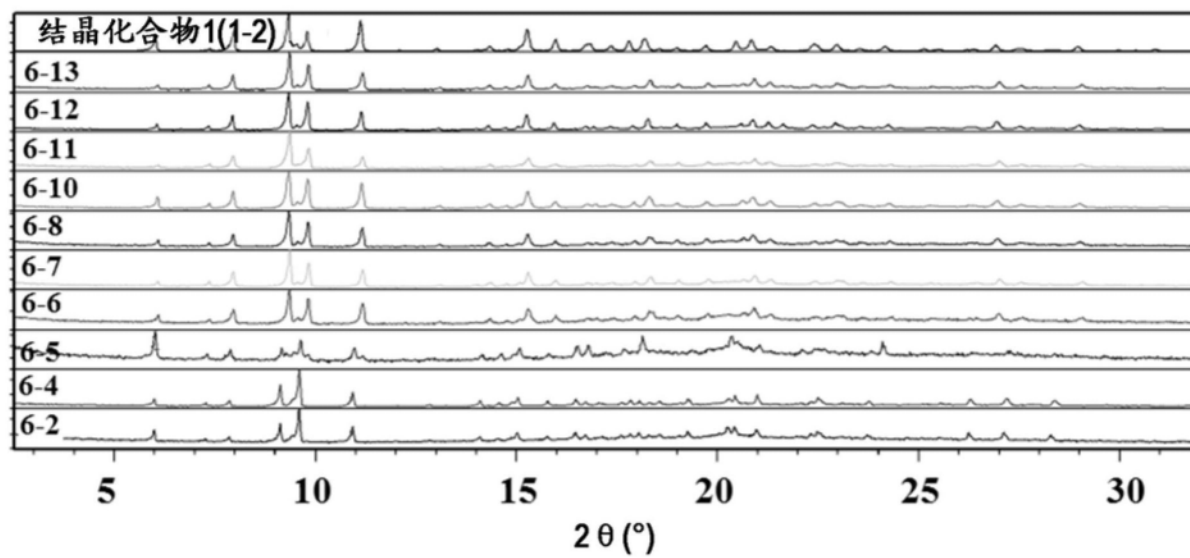


图14A

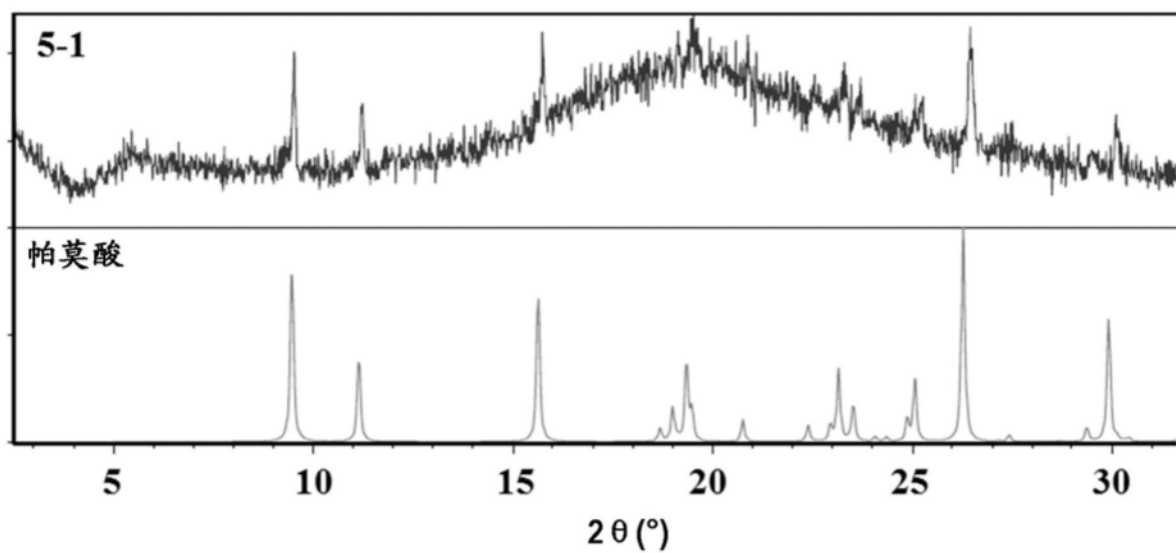


图14B

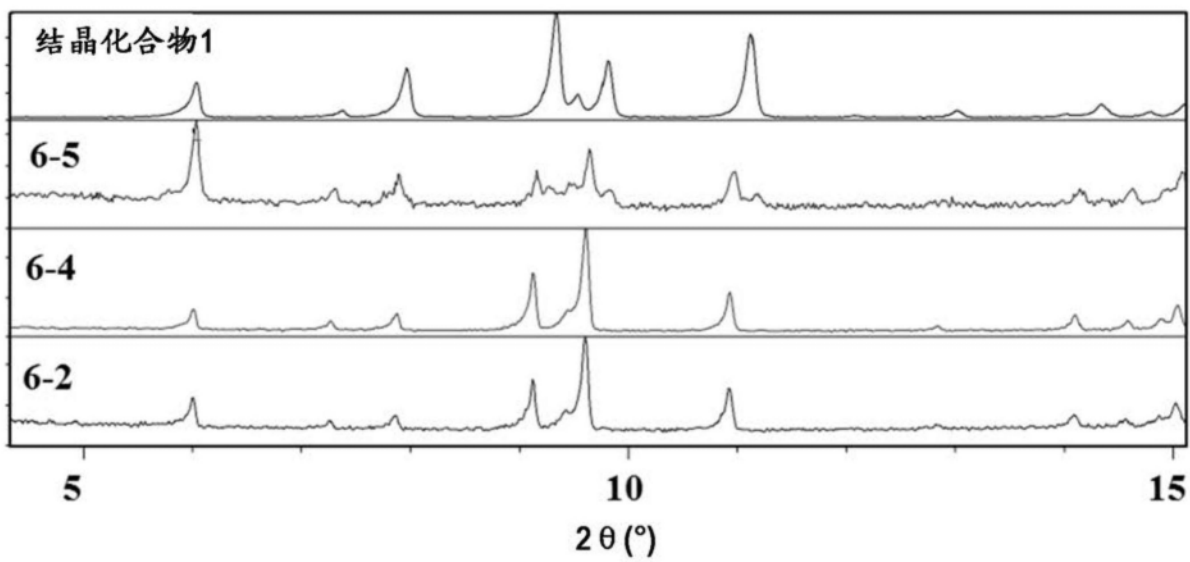


图15A

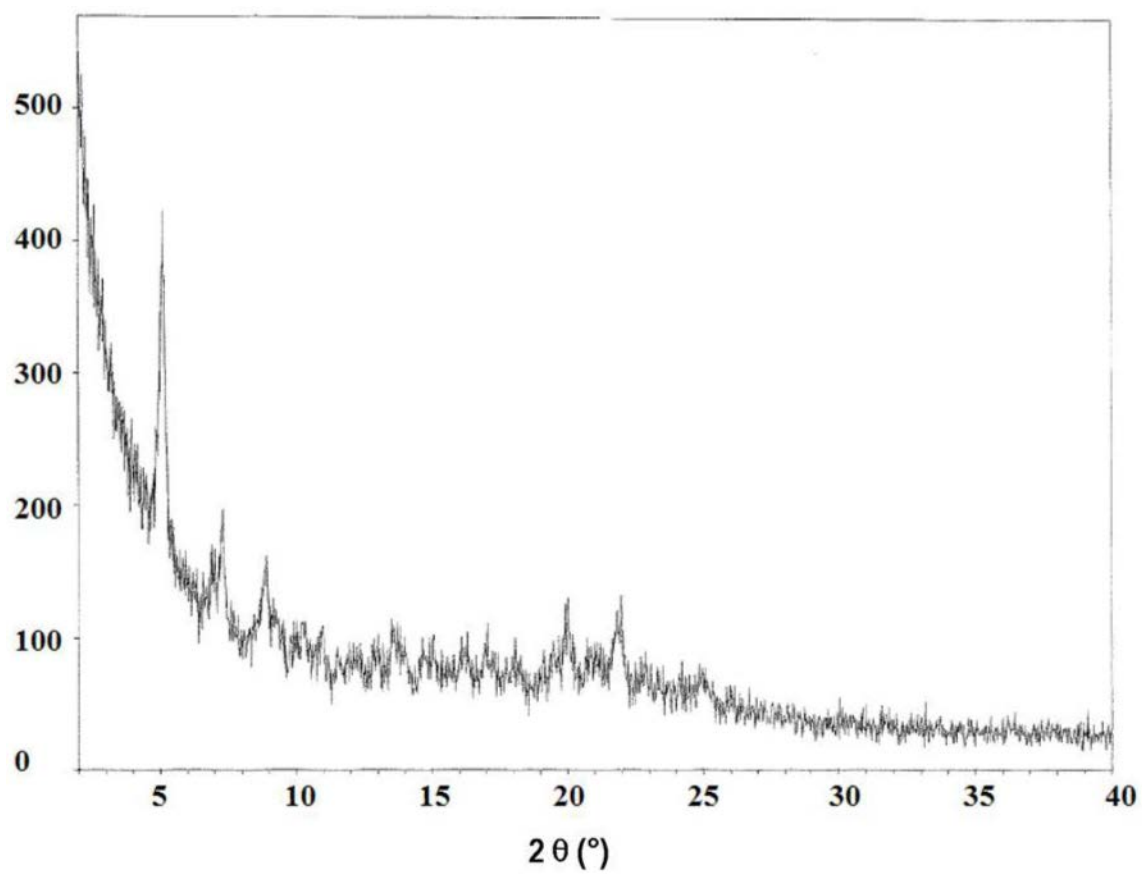


图15B

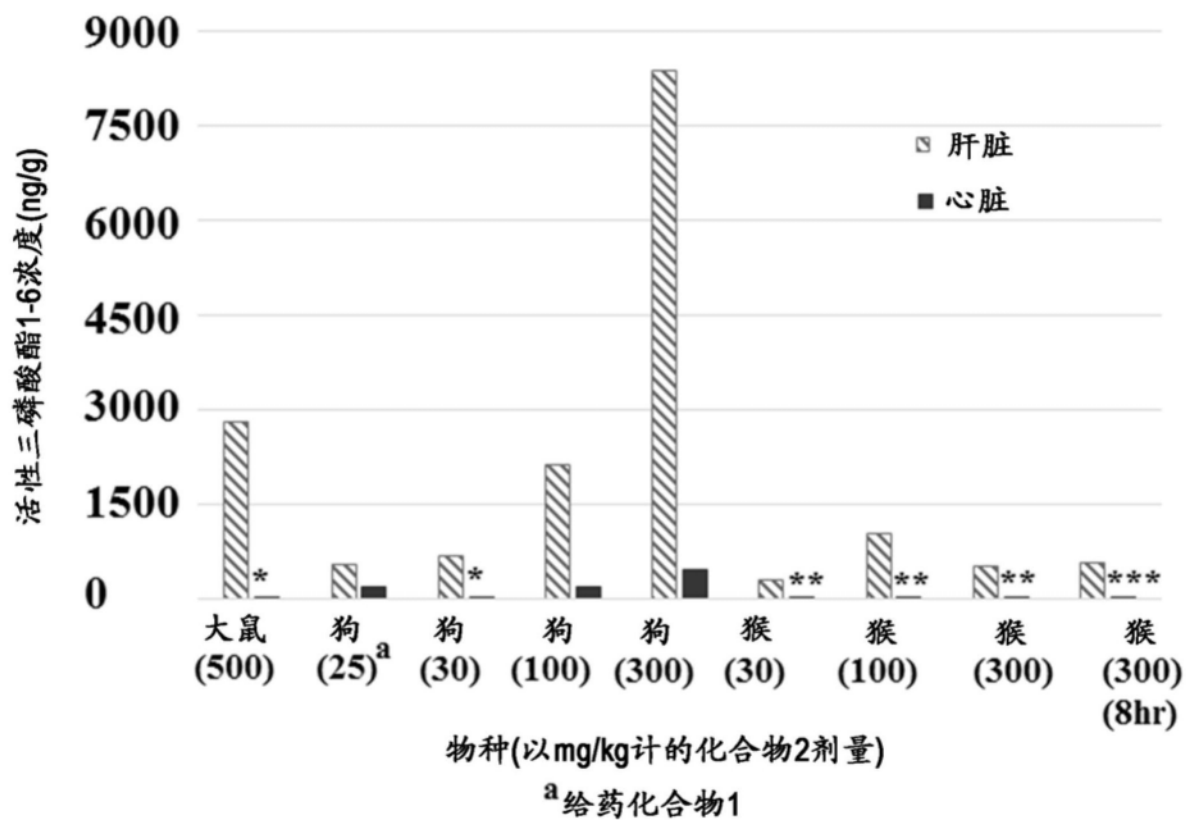


图16A

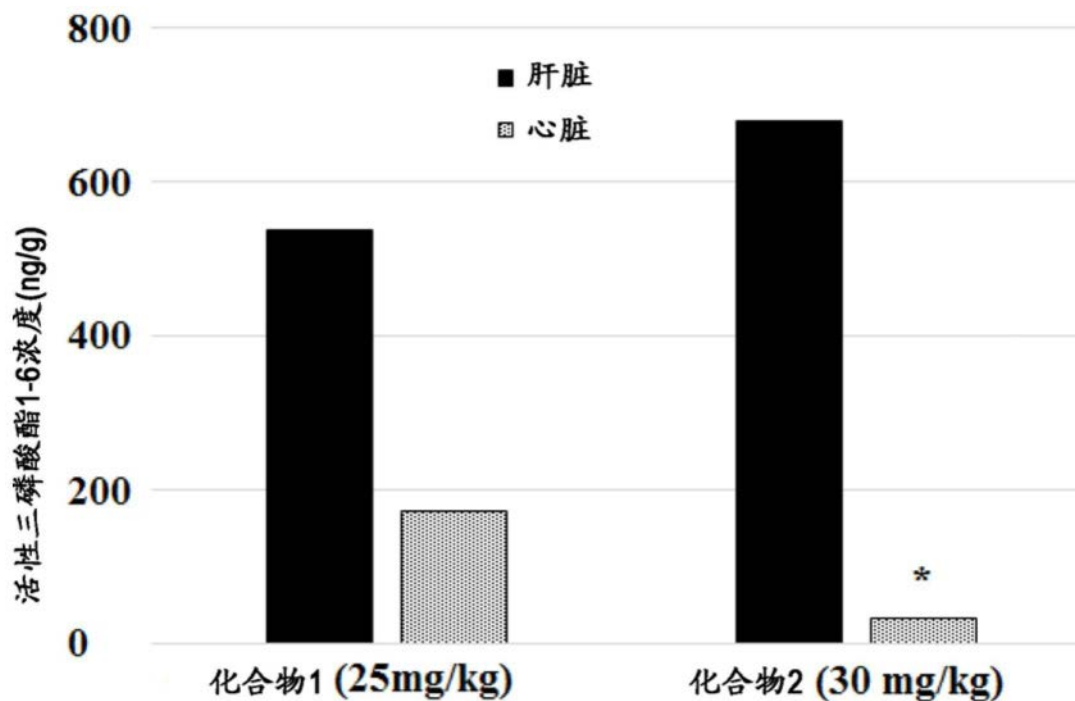


图16B

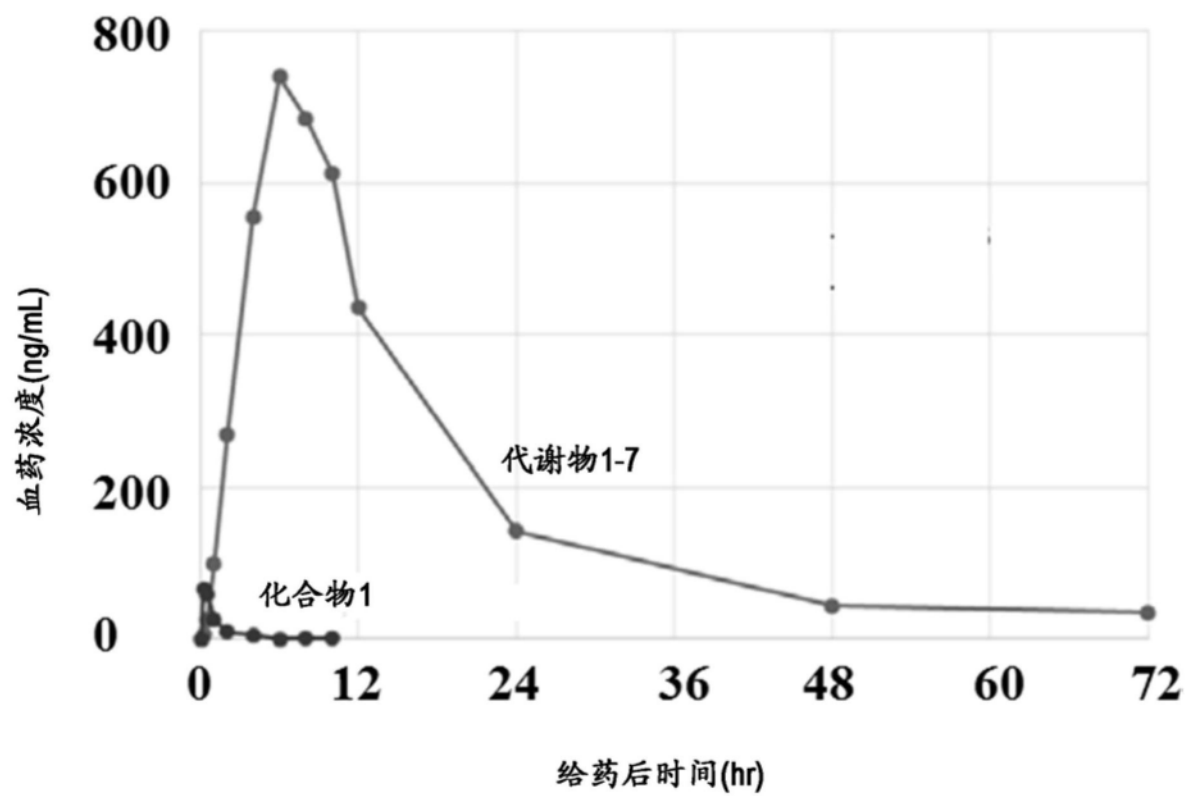


图17

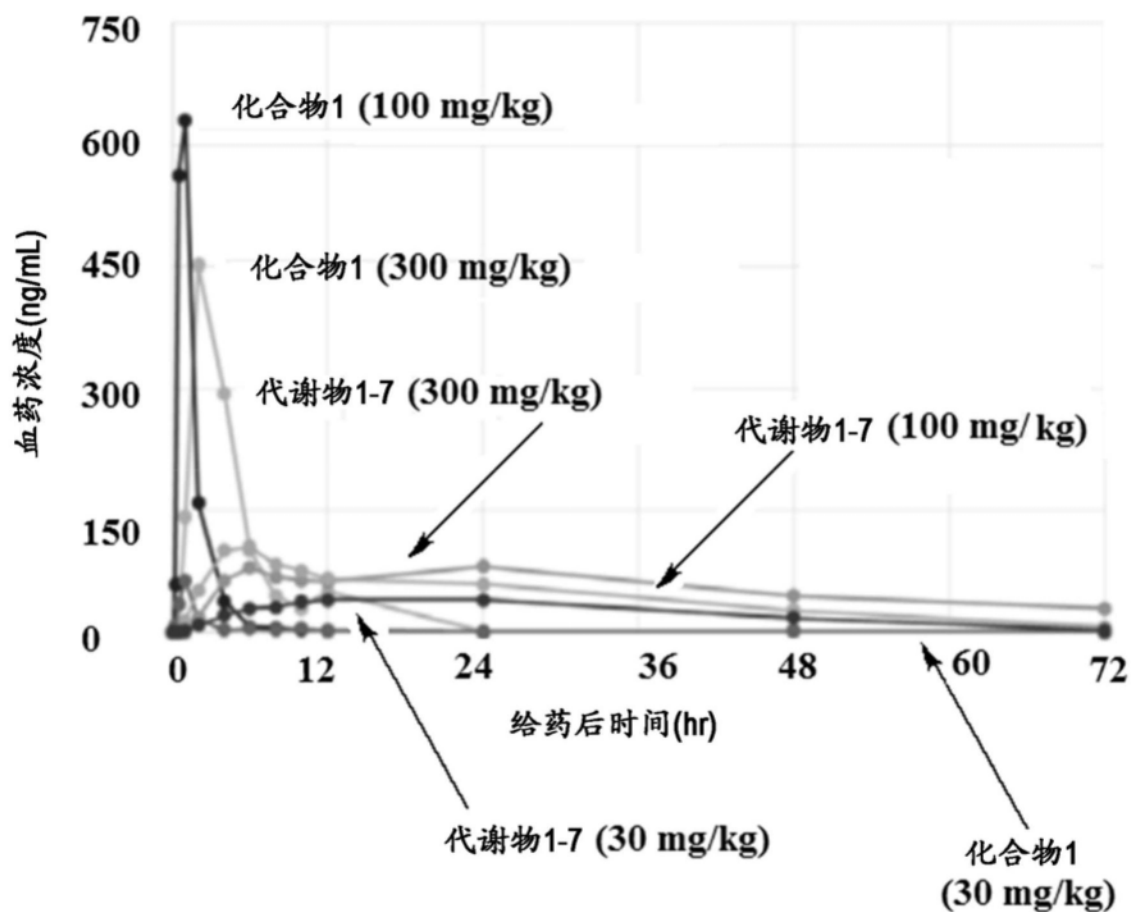


图18

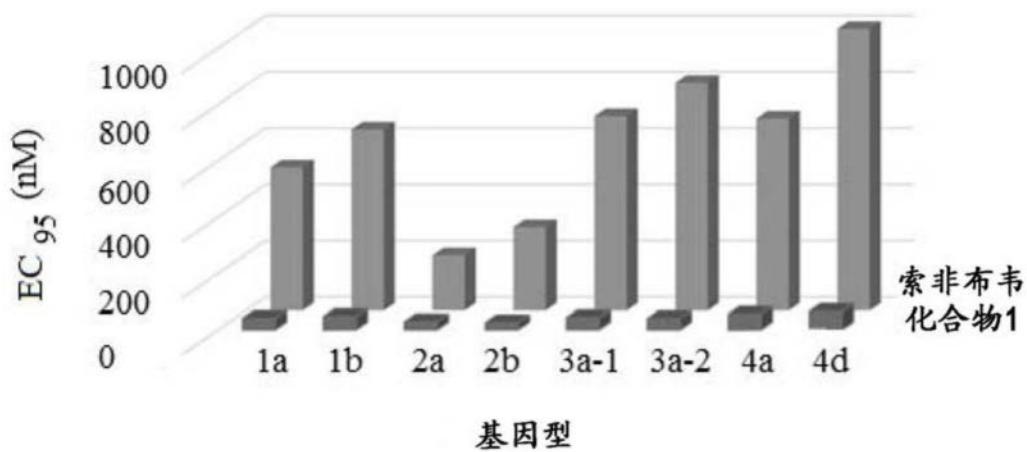


图19

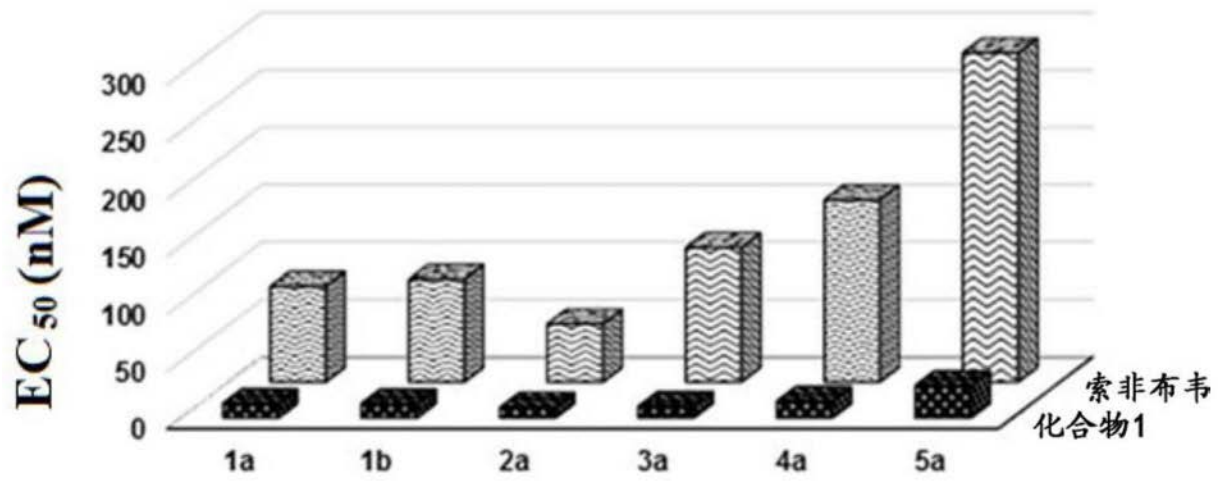


图20

化合物1的血浆PK

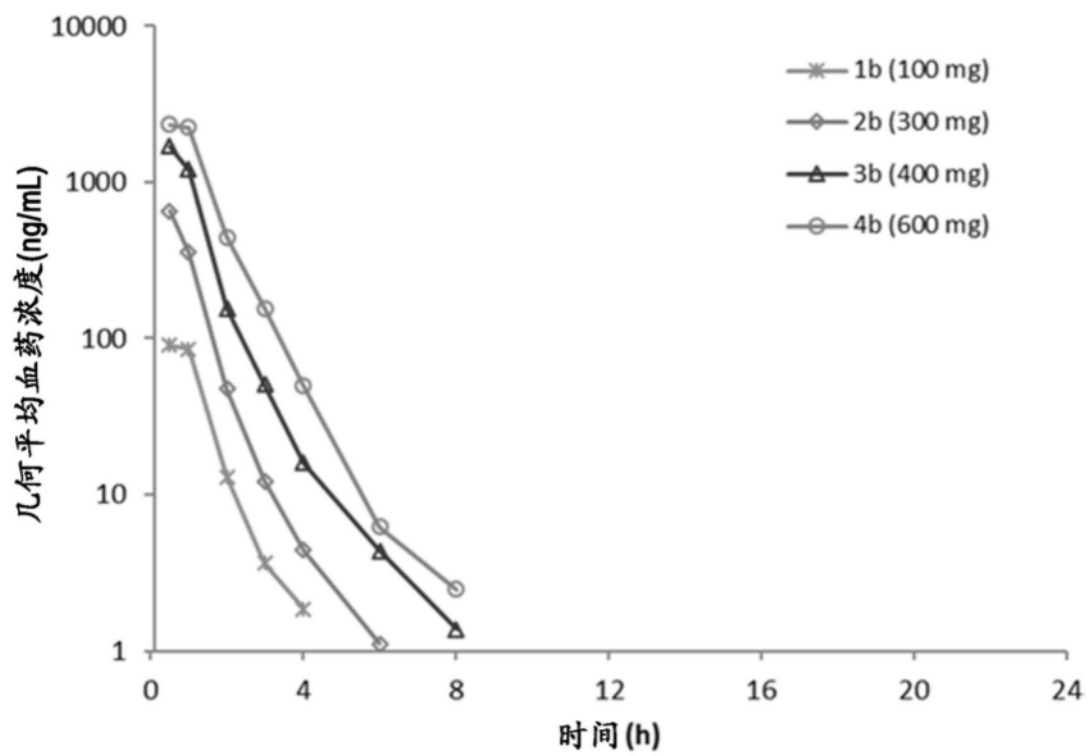


图21

代谢物1-7的血浆PK

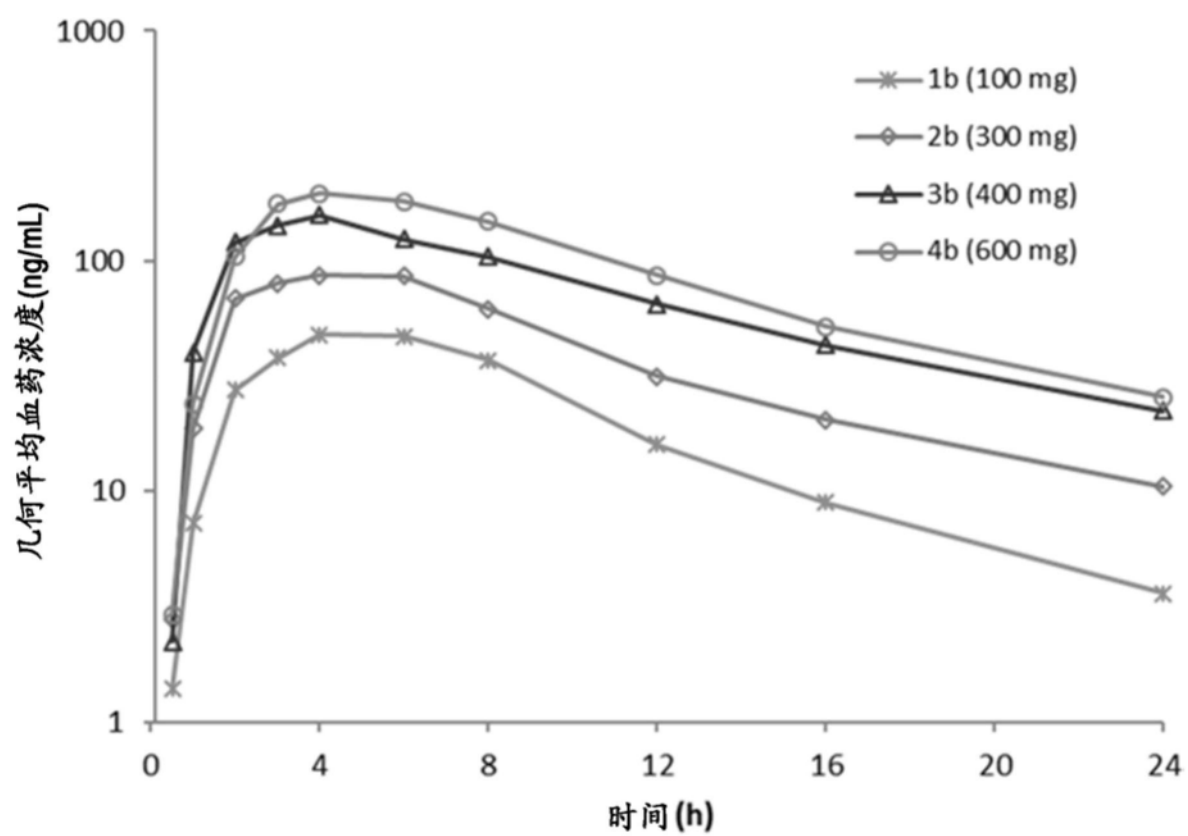


图22

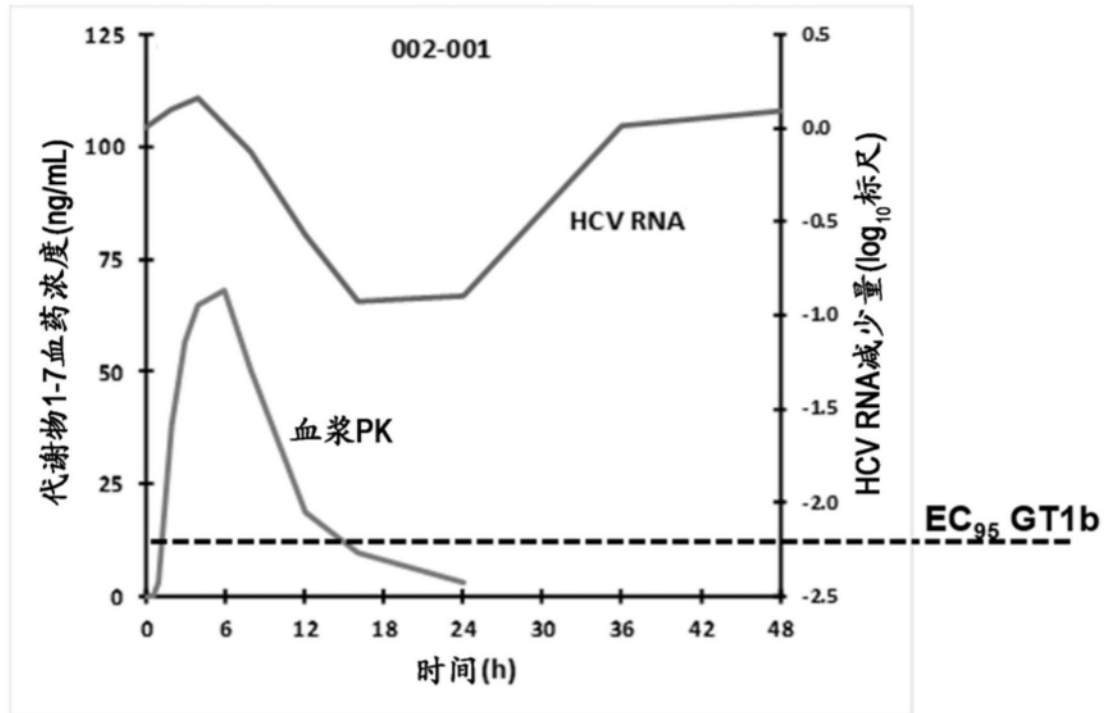
100 mg

图23A

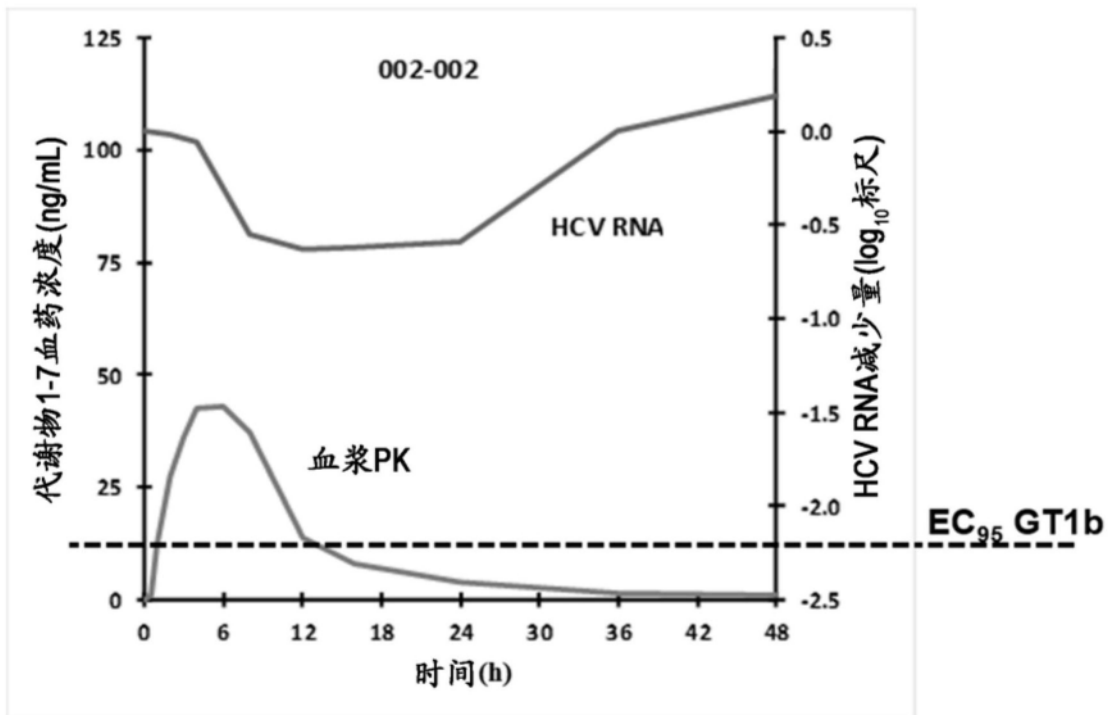
100 mg

图23B

100 mg

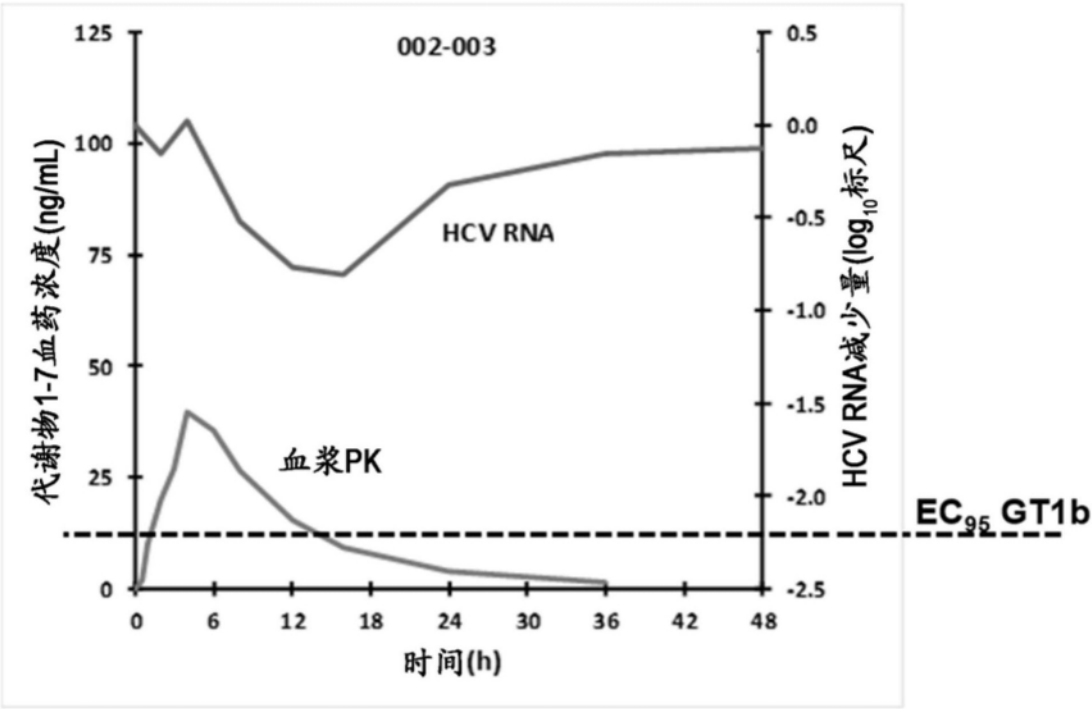


图23C

300 mg

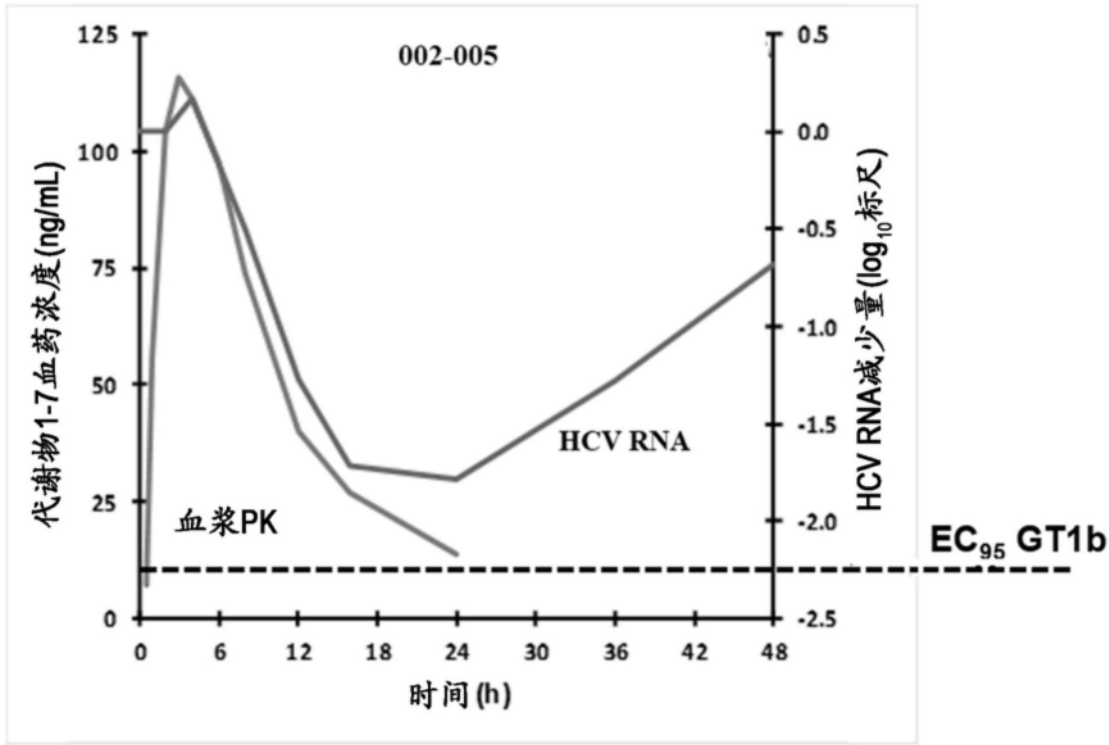


图23D

300 mg

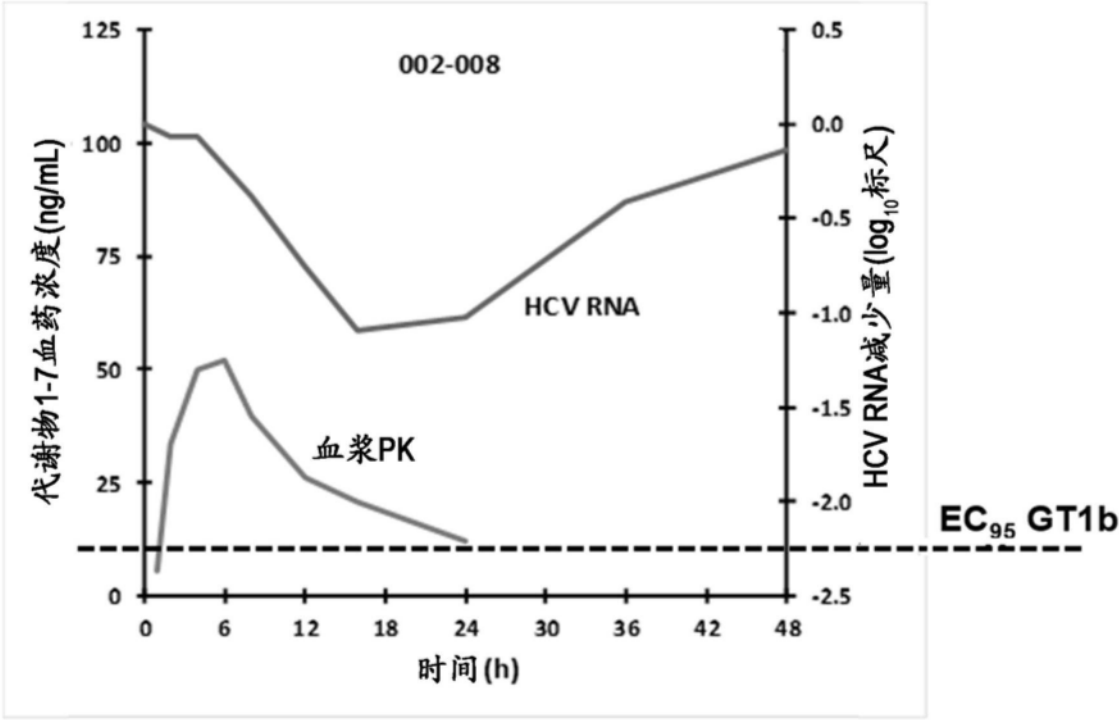


图23E

300 mg

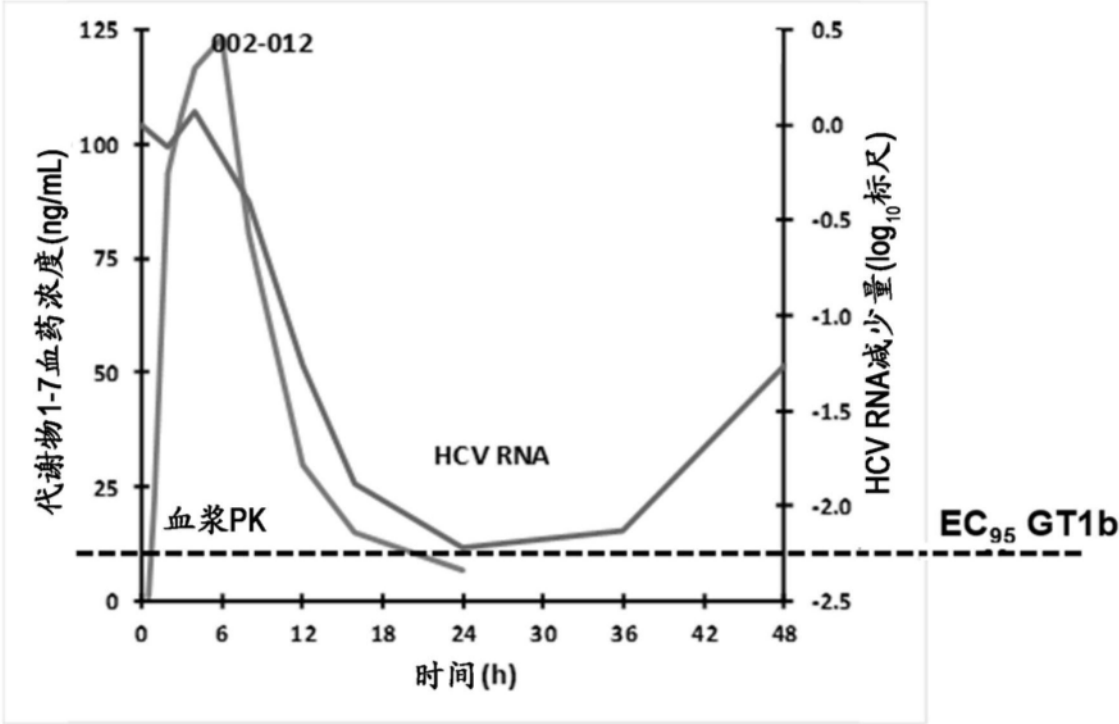


图23F

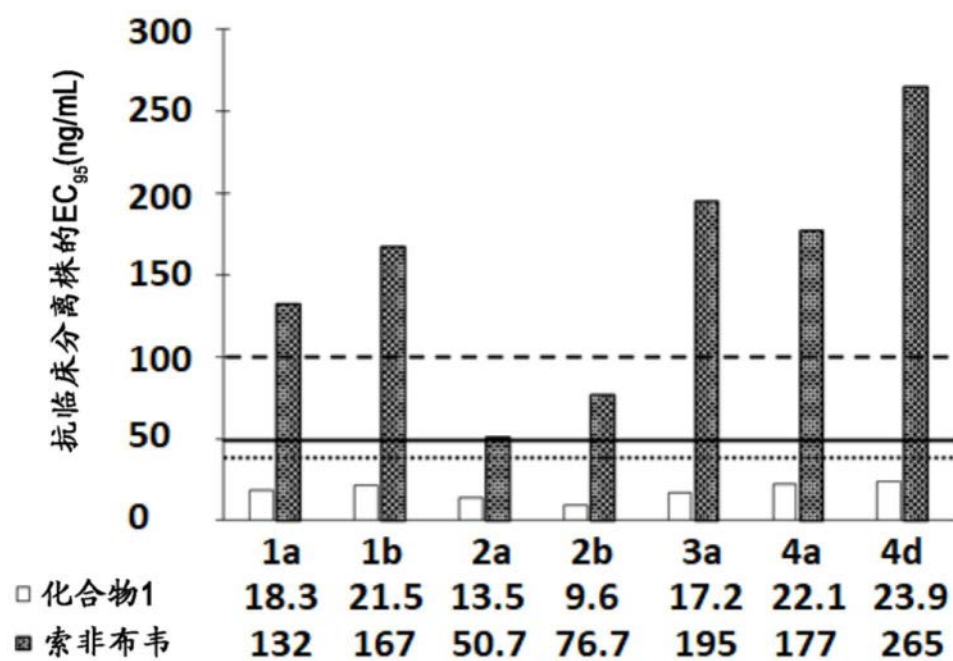


图24

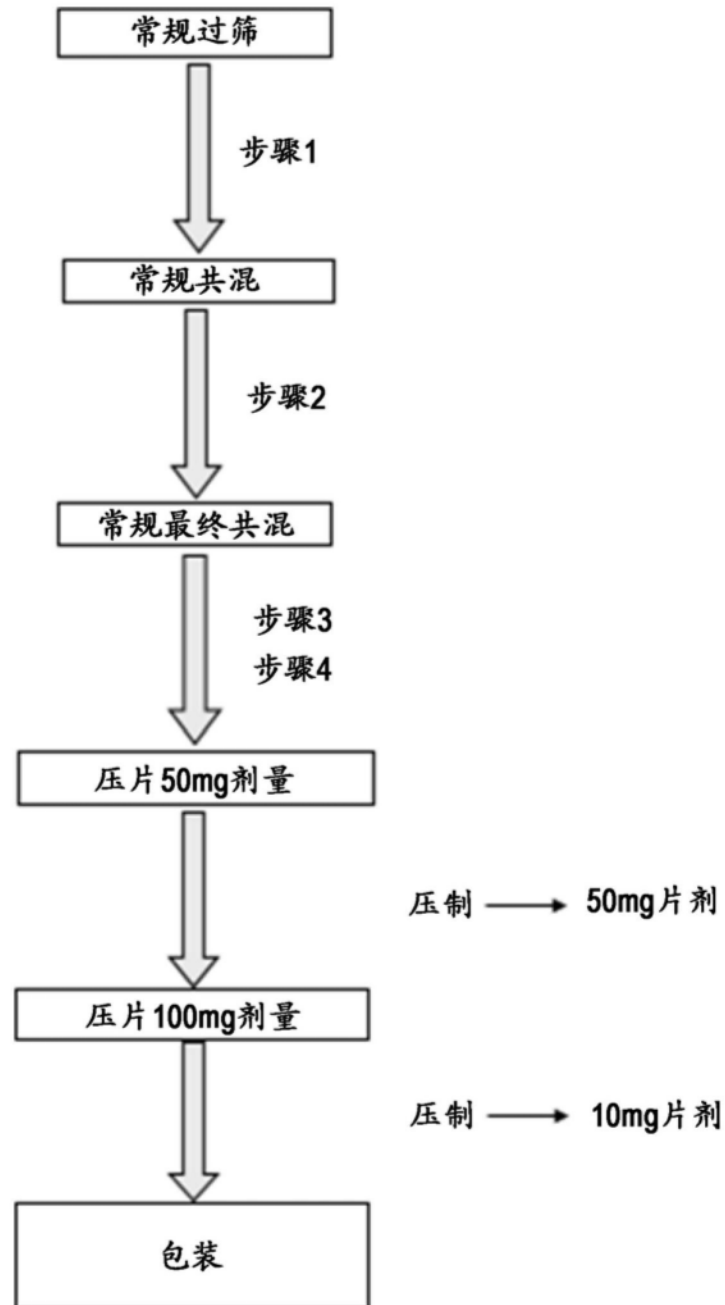


图25

