



# (12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105307662 B

(45)授权公告日 2019.06.04

(21)申请号 201480033108.9

(74)专利代理机构 北京市中咨律师事务所  
11247

(22)申请日 2014.05.15

代理人 隋晓平 黄革生

(65)同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 105307662 A

(51)Int.Cl.

A61K 31/7072(2006.01)

(43)申请公布日 2016.02.03

A61K 31/7076(2006.01)

(30)优先权数据

C07H 19/04(2006.01)

61/824,030 2013.05.16 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日  
2015.12.10

(56)对比文件

CN 104011061 A, 2014.08.27,

CN 105073766 A, 2015.11.18,

(86)PCT国际申请的申请数据  
PCT/US2014/038287 2014.05.15

CN 102325783 A, 2012.01.18,

CN 101918425 A, 2010.12.15,

(87)PCT国际申请的公布数据  
W02014/186637 EN 2014.11.20

CN 104011061 A, 2014.08.27,

CN 105073766 A, 2015.11.18,

(73)专利权人 里博科学有限责任公司  
地址 美国加利福尼亚州

CN 102325783 A, 2012.01.18,

CN 101918425 A, 2010.12.15,

(72)发明人 M·史密斯 K·G·克隆普

审查员 张茜

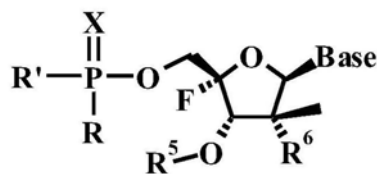
权利要求书2页 说明书23页

## (54)发明名称

4'-氟-2'-甲基取代的核苷衍生物

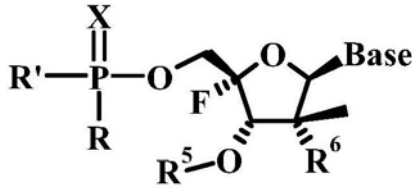
## (57)摘要

本发明涉及4'-氟-2'-甲基取代的核苷衍生物,本发明还涉及其药用组合物,使用此类化合物和/或组合物用于治疗HCV的方法。



I

1. 式I化合物或其药理学上可接受的盐:



I

其中:

R为O-R<sup>1</sup>或NHR<sup>1'</sup>;

或者R和R<sup>5</sup>一起形成键;

R' 为N(R<sup>4</sup>)C(R<sup>2a</sup>)(R<sup>2b</sup>)C(=O)OR<sup>3</sup>或-OR<sup>3</sup>;

R<sup>1</sup>为苯基或萘基;

R<sup>1'</sup>为-C(R<sup>2a</sup>)(R<sup>2b</sup>)C(=O)OR<sup>3</sup>;

每个R<sup>2a</sup>和R<sup>2b</sup>独立为H或C<sub>1-7</sub>烷基;

每个R<sup>3</sup>为C<sub>1-7</sub>烷基;

每个R<sup>4</sup>为H;

R<sup>5</sup>为H;

R<sup>6</sup>为OH或F;

X为O或S;并且

Base为胞嘧啶。

2. 权利要求1的化合物,其中R<sup>6</sup>为F。

3. 权利要求2的化合物,其中R<sup>2a</sup>为H。

4. 权利要求3的化合物,其中R<sup>2b</sup>为甲基。

5. 权利要求4的化合物,其中R<sup>3</sup>为异丙基。

6. 权利要求1的化合物,其中R和R<sup>5</sup>一起形成键。

7. 权利要求6的化合物,其中R<sup>6</sup>为OH。

8. 权利要求7的化合物,其中R' 为-OR<sup>3</sup>并且R<sup>3</sup>为异丙基。

9. 权利要求1的化合物,其中X为S。

10. 选自下列的化合物:

2'-脱氧基-2',4'-二氟-2'-甲基胞苷-5'-(0-苯基-N-(S)-1-(异丙氧基羰基)乙基硫代氨基磷酸酯;

2'-脱氧基-2',4'-二氟-2'-甲基胞苷-5'-(0-1-萘基-N-(S)-1-(异丙氧基羰基)乙基硫代氨基磷酸酯;

2'-脱氧基-2',4'-二氟-2'-甲基胞苷-5'-(0-2-萘基-N-(S)-1-(异丙氧基羰基)乙基硫代氨基磷酸酯;

2'-脱氧基-2',4'-二氟-2'-甲基胞苷-3',5'-环磷酸异丙基酯;

2'-脱氧基-2',4'-二氟-2'-甲基胞苷-3',5'-环硫代磷酸异丙基酯;

4'-氟-2'-甲基胞苷-5'-(0-苯基-N-(S)-1-(异丙氧基羰基)乙基氨基磷酸酯;

- 4'-氟-2'-胞苷-5'-(0-1-萘基-N-(S)-1-(异丙氧基羰基)乙基氨基磷酸酯；
- 4'-氟-2'-甲基胞苷-5'-(0-1-萘基-N-(S)-2-(异丙氧基羰基)乙基氨基磷酸酯；
- 4'-氟-2'-甲基胞苷-5'-(0-苯基-N-(S)-1-(异丙氧基羰基)乙基硫代氨基磷酸酯；
- 4'-氟-2'-甲基胞苷-5'-(0-1-萘基-N-(S)-1-(异丙氧基羰基)乙基硫代氨基磷酸酯；
- 4'-氟-2'-甲基胞苷-5'-(0-1-萘基-N-(S)-2-(异丙氧基羰基)乙基硫代氨基磷酸酯；
- 4'-氟-2'-甲基胞苷-3',5'-环磷酸异丙基酯；
- 4'-氟-2'-甲基胞苷-3',5'-环硫代磷酸异丙基酯；
- 2'-脱氧基-2',4'-二氟-2'-甲基胞苷-5'-{N,N'-二[(S)-1-(异丙氧基羰基)乙基]二氨基磷酸酯；
- 2'-脱氧基-2',4'-二氟-2'-甲基胞苷-5'-{N,N'-二[(S)-1-(异丙氧基羰基)乙基]硫代二氨基磷酸酯；
- 4'-氟-2'-甲基胞苷-5'-{N,N'-二[(S)-1-(异丙氧基羰基)乙基]二氨基磷酸酯；和
- 4'-氟-2'-甲基胞苷-5'-{N,N'-二[(S)-1-(异丙氧基羰基)乙基]硫代二氨基磷酸酯。
11. 权利要求1或10的化合物在制备用于治疗丙肝病毒(HCV)感染的药物中的用途。
12. 权利要求11的用途,该用途还包括给予免疫系统调节剂或能够抑制HCV复制的抗病毒药物或其组合。
13. 权利要求12的用途,其中所述免疫系统调节剂为干扰素或化学衍生的干扰素。
14. 权利要求12的用途,其中所述抗病毒药物选自HCV蛋白酶抑制剂、HCV聚合酶抑制剂、HCV解旋酶抑制剂、HCV引发酶抑制剂、HCV融合抑制剂及其组合。
15. 权利要求1或10的化合物在制备用于在细胞中抑制HCV复制的药物中的用途。
16. 组合物,该组合物包含权利要求1或10的化合物以及至少一种载体、稀释剂或赋形剂。

## 4'-氟-2'-甲基取代的核苷衍生物

[0001] 相关申请的交叉参考

[0002] 本申请要求提交于2013年5月16日的美国临时申请序列号61/824,030的优先权,其公开内容在此引入本文作为参考,视为共同拥有。

## 发明领域

[0003] 本发明涉及作为HCV复制子RNA复制抑制剂的核苷衍生物。具体而言,本发明涉及作为次基因组的丙肝病毒(HCV)RNA复制抑制剂的嘌呤和嘧啶核苷衍生物用途以及含有此类化合物的药用组合物。

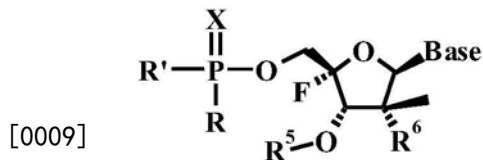
[0004] 丙肝病毒在世界范围内均是慢性肝病的主要原因。感染HCV的患者处于可能发展为肝硬化和随后肝细胞癌的风险中,因此,HCV是肝移植的主要指征。目前仅有两个被批准的疗法可用于治疗HCV感染(R.G.Gish, Sem.Liver.Dis., 1999, 19, 35)。它们是干扰素- $\alpha$ 单一疗法以及最近的核苷类似物利巴韦林(Virazole)与干扰素- $\alpha$ 的组合疗法。

[0005] 许多被批准的用于治疗病毒感染的药物为核苷类或核苷类似物,大多数这些核苷类似物药物能够通过抑制病毒聚合酶而抑制病毒复制,随后转化为相应的三磷酸酯。这种向三磷酸酯的转化通常通过细胞激酶介导,因此作为HCV复制的抑制剂的核苷类的直接评价仅可以方便地采用细胞类试验进行。对于HCV而言,缺乏实用的真正的细胞类病毒复制试验方法或动物感染模型。

[0006] 丙肝病毒属于黄病毒科(Flaviridae)家族。它是RNA病毒, RNA基因组能够编码多数多蛋白,经处理后其能够产生必需的复制机制以保证子代RNA的合成。据信,大多数由HCV RNA基因组编码的非结构性蛋白与RNA复制有关。Lohmann等人[V.Lohmann等, Science, 1999, 285, 110-113]已经描述了人肝癌(Huh7)细胞系的构建,其中次基因组HCV RNA分子已被引入并且显示了高效的复制能力。据信,这些细胞系中RNA复制的机制与被感染的肝细胞中的全长HCV RNA基因组的复制是相同的。用于这些细胞系的分离的次基因组HCV cDNA克隆已经形成了用于鉴别HCV复制的核苷类似物抑制剂的细胞类试验方法发展的基础。

[0007] 发明概述

[0008] 本申请提供了式I化合物或其药理学上可接受的盐:



[0010] 其中:

[0011] R为O-R<sup>1</sup>或NHR<sup>1</sup>;

[0012] 或者R和R<sup>5</sup>一起形成键;

[0013] R' 为N(R<sup>4</sup>)C(R<sup>2a</sup>)(R<sup>2b</sup>)C(=O)OR<sup>3</sup>或-OR<sup>3</sup>;

[0014]  $R^1$ 为H、低级卤代烷基或芳基,其中芳基为苯基或萘基,任选被一或多个下列基团取代:低级烷基、低级链烯基、低级炔基、低级烷氧基、卤素、低级卤代烷基、 $-N(R^{1a})_2$ 、酰基氨基、 $-SO_2N(R^{1a})_2$ 、 $-COR^{1b}$ 、 $-SO_2(R^{1c})$ 、 $-NHSO_2(R^{1c})$ 、硝基或氰基;

[0015] 每个 $R^{1a}$ 独立为H或低级烷基;

[0016] 每个 $R^{1b}$ 独立为 $-OR^{1a}$ 或 $-N(R^{1a})_2$ ;

[0017] 每个 $R^{1c}$ 为低级烷基;

[0018]  $R^1$ 为 $-C(R^{2a})(R^{2b})C(=O)OR^3$ ;

[0019] 每个 $R^{2a}$ 和 $R^{2b}$ 独立为H、低级烷基、 $-(CH_2)_rN(R^{1a})_2$ 、低级羟基烷基、 $-CH_2SH$ 、 $-(CH_2)_pS(O)_pMe$ 、 $-(CH_2)_3NHC(=NH)NH_2$ 、(1H-吡啶-3-基)甲基、(1H-吡啶-4-基)甲基、 $-(CH_2)_mC(=O)R^{1b}$ 、芳基和芳基低级烷基,其中芳基可以任选被一或多个下列基团取代:羟基、低级烷基、低级烷氧基、卤素、硝基或氰基;

[0020] 或者 $R^{2a}$ 为H并且 $R^{2b}$ 和 $R^4$ 一起形成 $(CH_2)_n$ ;

[0021] 每个 $R^3$ 为H、低级烷基、低级卤代烷基、苯基或苯基低级烷基;

[0022] 每个 $R^4$ 为H、低级烷基,或者 $R^{2b}$ 和 $R^4$ 一起形成 $(CH_2)_3$ ;

[0023]  $R^5$ 为H、 $C(=O)R^{1c}$ 、 $C(=O)R^{1b}$ 、 $P(=O)(OR^1)(OR^{1a})$ 或 $P(=O)(OR^1)(NR^4R^7)$ ;

[0024]  $R^6$ 为OH或F;

[0025]  $R^7$ 为 $C(R^{2a}R^{2b})C(=O)OR^3$ ;

[0026] m为0-3;

[0027] n为3、4或5;

[0028] p为0-2;

[0029] r为1-6;

[0030] X为O或S;并且

[0031] Base为尿嘧啶、胞嘧啶、鸟嘌呤、腺嘌呤、胸腺嘧啶或杂环烷基,它们每一个可以任选被一或多个下列基团取代:羟基、低级烷基、低级烷氧基、卤素、硝基或氰基。

[0032] 式I化合物可以用于治疗由丙肝病毒(HCV)介导的疾病,还可以用于含有此类化合物的药用组合物中。

[0033] 本申请提供了用于治疗丙肝病毒(HCV)感染的方法,该方法包括给予需要的患者治疗有效量的式I化合物。

[0034] 本申请提供了含有式I化合物和药学上可接受的赋形剂的组合物。

[0035] 发明详述

[0036] 式I化合物已经被证明是肝癌细胞系中次基因组丙肝病毒复制的抑制剂。这些化合物具有作为用于治疗人HCV感染的有效的抗病毒药物的潜力。

[0037] 本文中使用的术语“烷基”表示包含1-12个碳原子的直链或支链烃基。优选,术语“烷基”表示包含1-7个碳原子的直链或支链烃基。最优选为甲基、乙基、丙基、异丙基、正丁基、异丁基、叔丁基或戊基。所述烷基可以是未取代的或取代的。所述取代基选自一或多个下列基团:环烷基、硝基、氨基、烷基氨基、二烷基氨基、烷基羰基和环烷基羰基。

[0038] 本文中使用的术语“环烷基”表示任选取代的包含3-7个碳原子的环烷基,例如环丙基、环丁基、环戊基、环己基或环庚基。

[0039] 本文中使用的术语“烷氧基”表示任选取代的直链或支链烷基-氧基基团,其中所

述“烷基”部分如上文所定义,例如甲氧基、乙氧基、正-丙氧基、异-丙氧基、正-丁氧基、异-丁氧基、叔-丁氧基、戊氧基、己氧基、庚氧基,包括它们的异构体。

[0040] 本文中使用的术语“烷氧基烷基”表示如上文所定义的烷氧基,其与如上文所定义的烷基连接。示例为甲氧基甲基、甲氧基乙基、甲氧基丙基、乙氧基甲基、乙氧基乙基、乙氧基丙基、丙氧基丙基、甲氧基丁基、乙氧基丁基、丙氧基丁基、丁氧基丁基、叔-丁氧基丁基、甲氧基戊基、乙氧基戊基、丙氧基戊基,包括它们的异构体。

[0041] 本文中使用的术语“链烯基”表示具有2-7个碳原子(优选2-4个碳原子)并且具有1或2个链烯炔双键(优选1个链烯炔双键)的未取代的或取代的炔链基团。示例为乙烯基、1-丙烯基、2-丙烯基(烯丙基)或2-丁烯基(巴豆基)。

[0042] 本文中使用的术语“炔基”表示未取代的或取代的炔链基团,其具有2-7个碳原子(优选2-4个碳原子)并且具有1或(可能的话)2个三键(优选1个三键)。示例为乙炔基、1-丙炔基、2-丙炔基、1-丁炔基、2-丁炔基或3-丁炔基。

[0043] 本文中使用的术语“羟基烷基”表示如上文所定义的直链或支链烷基,其中1、2、3或更多个氢原子被羟基取代。示例为羟基甲基、1-羟基乙基、2-羟基乙基、1-羟基丙基、2-羟基丙基、3-羟基丙基、羟基异丙基、羟基丁基等。

[0044] 本文中使用的术语“卤代烷基”表示如上文所定义的直链或支链烷基,其中1、2、3或更多个氢原子被卤素取代。示例为1-氟甲基、1-氯代甲基、1-溴甲基、1-碘甲基、三氟甲基、三氯代甲基、三溴代甲基、三碘代甲基、1-氟乙基、1-氯代乙基、1-溴乙基、1-碘乙基、2-氟乙基、2-氯代乙基、2-溴乙基、2-碘乙基、2,2-二氯代乙基、3-溴丙基或2,2,2-三氟乙基等。

[0045] 本文中使用的术语“烷硫基”表示直链或支链(烷基)S-基团,其中“烷基”部分如上文所定义。示例为甲硫基、乙硫基、正-丙硫基、异-丙硫基、正-丁硫基、异-丁硫基或叔-丁硫基。

[0046] 本文中使用的术语“芳基”表示任选取代的苯基和萘基(例如1-萘基、2-萘基或3-萘基)。适当的芳基的取代基可以选自烷基中所指定的那些基团,另外,取代基也可以包括卤素、羟基和任选取代的烷基、卤代烷基、链烯基、炔基和芳氧基。

[0047] 本文中使用的术语“杂环基”表示任选取代的饱和的、部分不饱和的或芳族单环、双环或三环杂环环系,其含有一或多个选自氮、氧和硫的杂原子,其也可以与任选取代的饱和的、部分不饱和的或芳族单环碳环或杂环稠合。

[0048] 适当的杂环的示例为噁唑基、异噁唑基、呋喃基、四氢呋喃基、1,3-二氧戊环基、二氢吡喃基、2-噻吩基、3-噻吩基、吡嗪基、异噻唑基、二氢噻唑基、嘧啶基、四唑基、1-吡咯烷基、2-吡咯烷基、3-吡咯烷基、吡咯烷酮基、(N-氧化物)-吡啶基、1-吡咯基、2-吡咯基、三唑基(例如1,2,3-三唑基或1,2,4-三唑基)、1-吡唑基、2-吡唑基、4-吡唑基、哌啶基、吗啉基(例如4-吗啉基)、硫代吗啉基(例如4-硫代吗啉基)、噻唑基、吡啶基、二氢噻唑基、咪唑烷基、吡唑啉基、哌嗪基、1-咪唑基、2-咪唑基、4-咪唑基、噻二唑基(例如1,2,3-噻二唑基)、4-甲基哌嗪基、4-羟基哌啶-1-基。

[0049] 杂环基的适当的取代基可以选自烷基中所指定的那些基团,另外,取代基也可以包括任选取代的烷基、链烯基、炔基、氧代基团(=O)或氨基磺酰基。

[0050] 本文中使用的术语“酰基”(“烷基羰基”)表示式C(=O)R基团,其中R为氢、未取代

的或取代的含有1-7个碳原子的直链或支链烷基或者苯基。最优选的酰基中R为氢、未取代的或取代的含有1-4个碳原子的直链或支链烷基或者苯基。

[0051] 术语卤素表示氟、氯、溴或碘,优选氟、氯、溴。

[0052] 在本说明书中给出的化合物的图形表示中,粗黑渐变线( — )表示不对称碳原子所属环的平面上方的取代基,虚线( ····· )表示不对称碳原子所属环的平面下方的取代基。

[0053] 式I化合物具有立体异构现象。这些化合物可以是式I化合物的任何异构体或者这些异构体的混合物。具有一或多个不对称碳原子的本发明的化合物和中间体可以以立体异构体的外消旋混合物的形式获得,其可以被拆分。

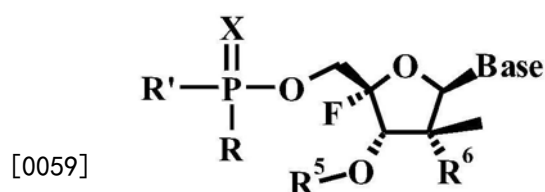
[0054] 式I化合物具有互变异构现象,这意味着本发明化合物可以存在两种或多种能够易于互变的化学化合物。在多种情况下,这仅仅意味着两个其它原子之间的一个氢原子与形成氢键的另一个氢原子可以互相转变。互变异构化合物彼此之间可以以动态平衡存在,因此制备各自不同的物质的企图通常导致混合物的形成,该混合物显示根据该成分的结构所预期的所有化学和物理性质。

[0055] 互变异构现象的最常见种类包括羰基或酮基化合物和不饱和的羟基化合物或烯醇。结构的变化是碳和氧原子之间的氢原子的移动以及伴随的键的重排,例如在多种脂肪醛和酮中,如乙醛,酮形式为主要成分;在酚中,烯醇式为主要形式。

[0056] 碱性的式I化合物可以与下列酸形成药学上可接受的盐:无机酸,例如氢卤酸(例如盐酸和氢溴酸)、硫酸、硝酸和磷酸等;有机酸(例如乙酸、酒石酸、琥珀酸、富马酸、马来酸、苹果酸、水杨酸、柠檬酸、甲磺酸和对甲苯磺酸等)。此类盐的形成和分离可以根据本领域已知的方法进行。

[0057] HCV抑制剂

[0058] 本申请提供了式I化合物或其药理学上可接受的盐:



### I

[0060] 其中:

[0061] R为O-R<sup>1</sup>或NHR<sup>1</sup>;

[0062] 或者R和R<sup>5</sup>一起形成键;

[0063] R' 为N(R<sup>4</sup>)C(R<sup>2a</sup>)(R<sup>2b</sup>)C(=O)OR<sup>3</sup>或-OR<sup>3</sup>;

[0064] R<sup>1</sup>为H、低级卤代烷基或芳基,其中芳基为苯基或萘基,任选被一或多个下列基团取代:低级烷基、低级链烯基、低级炔基、低级烷氧基、卤素、低级卤代烷基、-N(R<sup>1a</sup>)<sub>2</sub>、酰基氨基、-SO<sub>2</sub>N(R<sup>1a</sup>)<sub>2</sub>、-COR<sup>1b</sup>、-SO<sub>2</sub>(R<sup>1c</sup>)、-NHSO<sub>2</sub>(R<sup>1c</sup>)、硝基或氰基;

[0065] 每个R<sup>1a</sup>独立为H或低级烷基;

[0066] 每个R<sup>1b</sup>独立为-OR<sup>1a</sup>或-N(R<sup>1a</sup>)<sub>2</sub>;

- [0067] 每个 $R^{1c}$ 为低级烷基;
- [0068]  $R^{1'}$ 为 $-C(R^{2a})(R^{2b})C(=O)OR^3$ ;
- [0069] 每个 $R^{2a}$ 和 $R^{2b}$ 独立为H、低级烷基、 $-(CH_2)_rN(R^{1a})_2$ 、低级羟基烷基、 $-CH_2SH$ 、 $-(CH_2)_p(O)_pMe$ 、 $-(CH_2)_3NHC(=NH)NH_2$ 、(1H-吡啶-3-基)甲基、(1H-吡啶-4-基)甲基、 $-(CH_2)_mC(=O)R^{1b}$ 、芳基和芳基低级烷基,其中芳基可以任选被一或多个下列基团取代:羟基、低级烷基、低级烷氧基、卤素、硝基或氰基;
- [0070] 或 $R^{2a}$ 为H并且 $R^{2b}$ 和 $R^4$ 一起形成 $(CH_2)_n$ ;
- [0071] 每个 $R^3$ 为H、低级烷基、低级卤代烷基、苯基或苯基低级烷基;
- [0072] 每个 $R^4$ 为H、低级烷基或 $R^{2b}$ 和 $R^4$ 一起形成 $(CH_2)_3$ ;
- [0073]  $R^5$ 为H、 $C(=O)R^{1c}$ 、 $C(=O)R^{1b}$ 、 $P(=O)(OR^1)(OR^{1a})$ 或 $P(=O)(OR^1)(NR^{4R^7})$ ;
- [0074]  $R^6$ 为OH或F;
- [0075]  $R^7$ 为 $C(R^{2a}R^{2b})C(=O)OR^3$ ;
- [0076] m为0-3;
- [0077] n为3、4或5;
- [0078] p为0-2;
- [0079] r为1-6;
- [0080] X为O或S;并且
- [0081] Base为尿嘧啶、胞嘧啶、鸟嘌呤、腺嘌呤、胸腺嘧啶或杂环烷基,它们每一个可以任选被一或多个下列基团取代:羟基、低级烷基、低级烷氧基、卤素、硝基或氰基。
- [0082] 本申请提供了式I化合物,其中 $R^4$ 为H。
- [0083] 本申请提供了上述式I化合物,其中 $R^6$ 为H或卤素。
- [0084] 本申请提供了上述式I化合物,其中 $R^1$ 为萘基或苯基。
- [0085] 本申请提供了上述式I化合物,其中 $R^{2a}$ 为H。
- [0086] 本申请提供了上述式I化合物,其中 $R^{2b}$ 为甲基。
- [0087] 本申请提供了上述式I化合物,其中 $R^3$ 为异丙基。
- [0088] 本申请提供了上述式I化合物,其中 $R^5$ 为H。
- [0089] 本申请提供了式I化合物,其中R和 $R^5$ 一起形成键。
- [0090] 本申请提供了上述式I化合物,其中 $R^6$ 为OH。
- [0091] 本申请提供了上述式I化合物,其中 $R'$ 为 $-OR^3$ 并且 $R^3$ 为异丙基。
- [0092] 本申请提供了式I化合物,其中X为S。
- [0093] 本申请提供了式I化合物,其中Base为尿嘧啶或胞嘧啶。
- [0094] 本申请提供了选自下列化合物的式I化合物:
- [0095] 2'-脱氧基-2',4'-二氟-2'-甲基尿苷-5'-(0-苯基-N-(S)-1-(异丙氧基羰基)乙基硫代氨基磷酸酯(phosphoramidate);
- [0096] 2'-脱氧基-2',4'-二氟-2'-甲基尿苷-5'-(0-2-萘基-N-(S)-1-(异丙氧基羰基)乙基硫代氨基磷酸酯;
- [0097] 2'-脱氧基-2',4'-二氟-2'-甲基尿苷-5'-(0-1-萘基-N-(S)-1-(异丙氧基羰基)乙基硫代氨基磷酸酯
- [0098] 2'-脱氧基-2',4'-二氟-2'-甲基胞苷-5'-(0-苯基-N-(S)-1-(异丙氧基羰基)乙

基硫代氨基磷酸酯；

[0099] 2'-脱氧基-2',4'-二氟-2'-甲基胞苷-5'-(0-1-萘基-N-(S)-1-(异丙氧基羰基)乙基硫代氨基磷酸酯；

[0100] 2'-脱氧基-2',4'-二氟-2'-甲基胞苷-5'-(0-2-萘基-N-(S)-1-(异丙氧基羰基)乙基硫代氨基磷酸酯；

[0101] 2'-脱氧基-2',4'-二氟-2'-甲基尿苷-3',5'-环磷酸(cyclic phosphoric acid)异丙基酯；

[0102] 2'-脱氧基-2',4'-二氟-2'-甲基胞苷-3',5'-环磷酸异丙基酯；

[0103] 2'-脱氧基-2',4'-二氟-2'-甲基尿苷-3',5'-环硫代磷酸(cyclic thiophosphoric acid)异丙基酯；

[0104] 2'-脱氧基-2',4'-二氟-2'-甲基胞苷-3',5'-环硫代磷酸异丙基酯；

[0105] 4'-氟-2'-甲基尿苷-5'-(0-苯基-N-(S)-1-(异丙氧基羰基)乙基氨基磷酸酯；

[0106] 4'-氟-2'-甲基尿苷-5'-(0-1-萘基-N-(S)-1-(异丙氧基羰基)乙基氨基磷酸酯；

[0107] 4'-氟-2'-甲基尿苷-5'-(0-1-萘基-N-(S)-2-(异丙氧基羰基)乙基氨基磷酸酯；

[0108] 4'-氟-2'-甲基胞苷-5'-(0-苯基-N-(S)-1-(异丙氧基羰基)乙基氨基磷酸酯；

[0109] 4'-氟-2'-胞苷-5'-(0-1-萘基-N-(S)-1-(异丙氧基羰基)乙基氨基磷酸酯；

[0110] 4'-氟-2'-甲基胞苷-5'-(0-1-萘基-N-(S)-2-(异丙氧基羰基)乙基氨基磷酸酯；

[0111] 4'-氟-2'-甲基尿苷-5'-(0-苯基-N-(S)-1-(异丙氧基羰基)乙基硫代氨基磷酸酯；

[0112] 4'-氟-2'-甲基尿苷-5'-(0-1-萘基-N-(S)-1-(异丙氧基羰基)乙基硫代氨基磷酸酯；

[0113] 4'-氟-2'-甲基尿苷-5'-(0-1-萘基-N-(S)-2-(异丙氧基羰基)乙基硫代氨基磷酸酯；

[0114] 4'-氟-2'-甲基胞苷-5'-(0-苯基-N-(S)-1-(异丙氧基羰基)乙基硫代氨基磷酸酯；

[0115] 4'-氟-2'-甲基胞苷-5'-(0-1-萘基-N-(S)-1-(异丙氧基羰基)乙基硫代氨基磷酸酯；

[0116] 4'-氟-2'-甲基胞苷-5'-(0-1-萘基-N-(S)-2-(异丙氧基羰基)乙基硫代氨基磷酸酯；

[0117] 4'-氟-2'-甲基尿苷-3',5'-环磷酸异丙基酯；

[0118] 4'-氟-2'-甲基胞苷-3',5'-环磷酸异丙基酯；

[0119] 4'-氟-2'-甲基尿苷-3',5'-环硫代磷酸异丙基酯；

[0120] 4'-氟-2'-甲基胞苷-3',5'-环硫代磷酸异丙基酯；

[0121] 2'-脱氧基-2',4'-二氟-2'-甲基尿苷-5'-{N,N'-二[(S)-1-(异丙氧基羰基)乙基]二氨基磷酸酯(phosphorodiamidate)；

[0122] 2'-脱氧基-2',4'-二氟-2'-甲基胞苷-5'-{N,N'-二[(S)-1-(异丙氧基羰基)乙基]二氨基磷酸酯；

[0123] 2'-脱氧基-2',4'-二氟-2'-甲基尿苷-5'-{N,N'-二[(S)-1-(异丙氧基羰基)乙基]硫代二氨基磷酸酯；

[0124] 2'-脱氧基-2',4'-二氟-2'-甲基胞苷-5'-{N,N'-二[(S)-1-(异丙氧基羰基)乙基]硫代二氨基磷酸酯};

[0125] 4'-氟-2'-甲基尿苷-5'-{N,N'-二[(S)-1-(异丙氧基羰基)乙基]二氨基磷酸酯};

[0126] 4'-氟-2'-甲基胞苷-5'-{N,N'-二[(S)-1-(异丙氧基羰基)乙基]二氨基磷酸酯};

[0127] 4'-氟-2'-甲基尿苷-5'-{N,N'-二[(S)-1-(异丙氧基羰基)乙基]硫代二氨基磷酸酯};和

[0128] 4'-氟-2'-甲基胞苷-5'-{N,N'-二[(S)-1-(异丙氧基羰基)乙基]硫代二氨基磷酸酯}。

[0129] 本申请提供了治疗丙肝病毒(HCV)感染的方法,该方法包括给予需要的患者治疗有效量的式I化合物。

[0130] 本申请提供了上述方法,该方法还包括给予能够抑制HCV复制的免疫系统调节剂或抗病毒药物或其组合。

[0131] 本申请提供了上述方法,其中上述免疫系统调节剂为干扰素或化学衍生的干扰素。

[0132] 本申请还提供了上述方法,其中所述抗病毒药物选自HCV蛋白酶抑制剂、HCV聚合酶抑制剂、HCV解旋酶抑制剂、HCV引发酶抑制剂、HCV融合抑制剂及其组合。

[0133] 本申请提供了在细胞中抑制HCV复制的上述方法,该方法包括给予式I化合物。

[0134] 本申请提供了含有式I化合物的组合物。

[0135] 本申请提供了上述组合物以及与之混合的至少一种载体、稀释剂或赋形剂。

[0136] 本申请提供了式I化合物在生产用于治疗HCV的药物中的用途。

[0137] 本申请提供了本文中所述的化合物、组合物或方法。

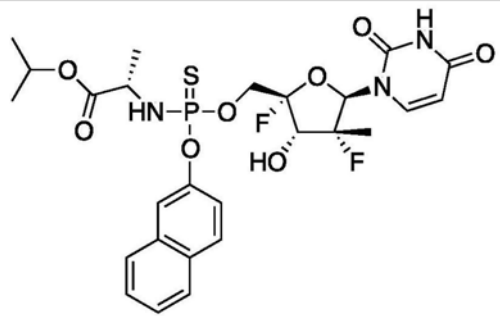
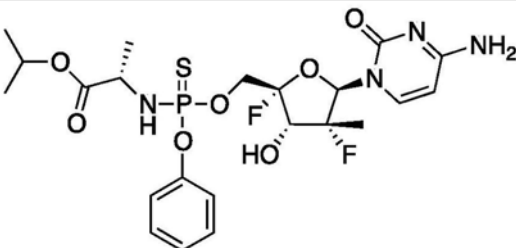
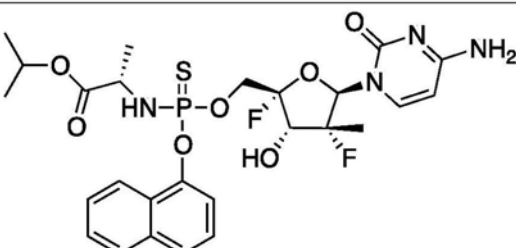
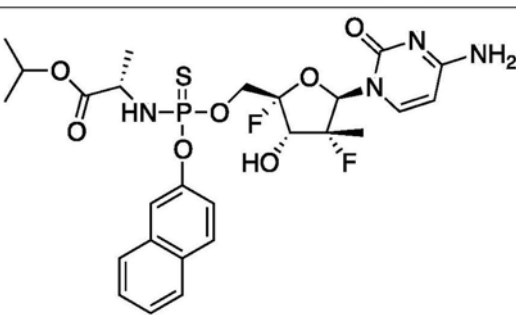
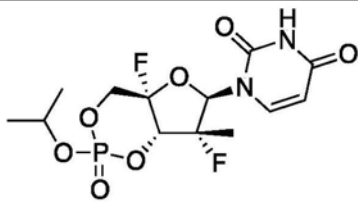
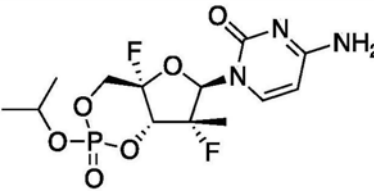
[0138] 本发明所包含的以及本发明范围内的代表性化合物的示例如下表所示。提供下面的这些示例和制备使得本领域技术人员能够更清楚地理解和实施本发明。它们不应当被视为是对本发明范围的限定,仅仅是其说明和代表。

[0139] 一般来讲,本申请中使用的命名法基于本领域技术人员公知的标准核酸命名法。如果描绘的结构与该结构给出的名称之间有矛盾,则应以描绘的结构为准。另外,如果一个结构或一个结构的一部分的立体化学没有采用例如粗线或虚线指明,则该结构或结构的一部分应当视为包含其所有的立体异构体。

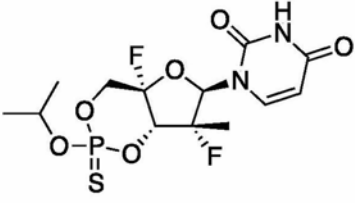
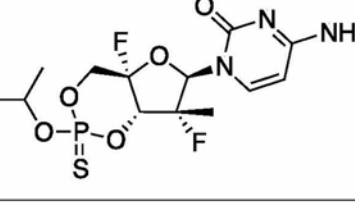
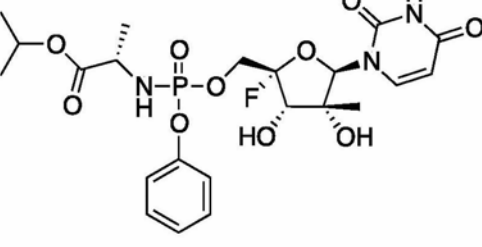
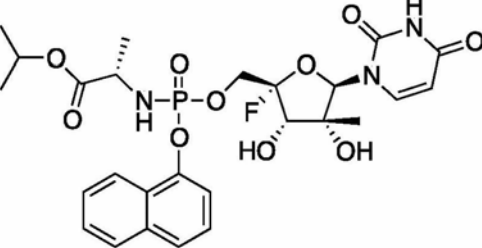
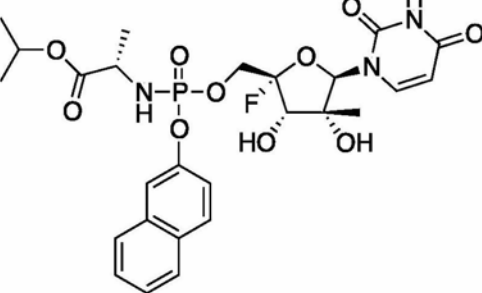
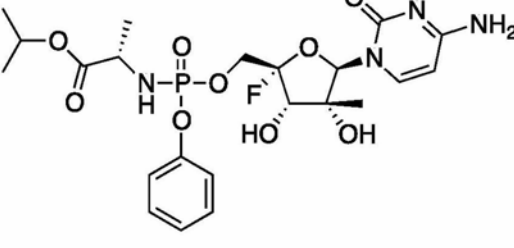
[0140]

表 1.		
化合物编号	结构	名称
I-1		2'-脱氧基-2',4'-二氟-2'-甲基尿苷 -5'-(O-苯基-N-(S)-1-(异丙氧基羰基) 乙基硫代氨基磷酸酯
I-2		2'-脱氧基-2',4'-二氟-2'-甲基尿苷 -5'-(O-2-萘基-N-(S)-1-(异丙氧基羰基) 乙基硫代氨基磷酸酯

[0141]

表 1.		
化合物编号	结构	名称
I-3		2'-脱氧基-2',4'-二氟-2'-甲基尿苷 -5'-(O-1-萘基-N-(S)-1-(异丙氧基羰基)乙基硫代氨基磷酸酯
I-4		2'-脱氧基-2',4'-二氟-2'-甲基胞苷 -5'-(O-苯基-N-(S)-1-(异丙氧基羰基)乙基硫代氨基磷酸酯
I-5		2'-脱氧基-2',4'-二氟-2'-甲基胞苷 -5'-(O-1-萘基-N-(S)-1-(异丙氧基羰基)乙基硫代氨基磷酸酯
I-6		2'-脱氧基-2',4'-二氟-2'-甲基胞苷 -5'-(O-2-萘基-N-(S)-1-(异丙氧基羰基)乙基硫代氨基磷酸酯
I-7		2'-脱氧基-2',4'-二氟-2'-甲基尿苷 -3',5'-环磷酸异丙基酯
I-8		2'-脱氧基-2',4'-二氟-2'-甲基胞苷 -3',5'-环磷酸异丙基酯

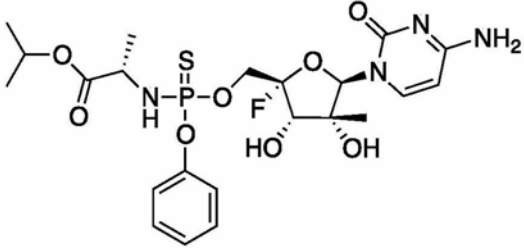
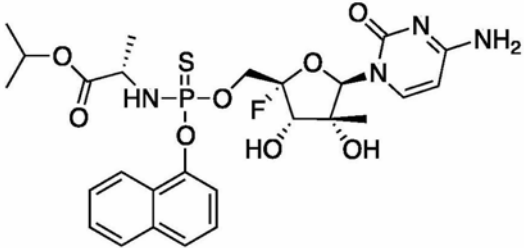
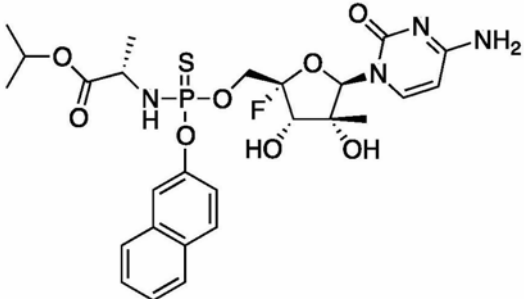
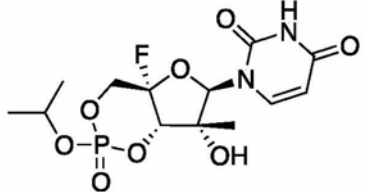
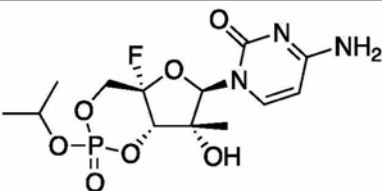
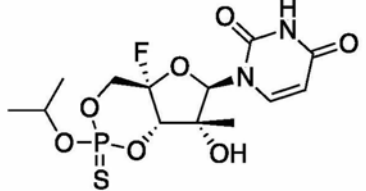
[0142]

表 1.		
化合物编号	结构	名称
I-9		2'-脱氧基-2',4'-二氟-2'-甲基尿苷 -3',5'-环硫代磷酸异丙基酯
I-10		2'-脱氧基-2',4'-二氟-2'-甲基胞苷 -3',5'-环硫代磷酸异丙基酯
I-11		4'-氟-2'-甲基尿苷-5'-(O-苯基 -N-(S)-1-(异丙氧基羰基)乙基氨基磷 酸酯
I-12		4'-氟-2'-甲基尿苷-5'-(O-1-萘基 -N-(S)-1-(异丙氧基羰基)乙基氨基磷 酸酯
I-13		4'-氟-2'-甲基尿苷-5'-(O-2-萘基 -N-(S)-2-(异丙氧基羰基)乙基氨基磷 酸酯
I-14		4'-氟-2'-甲基胞苷-5'-(O-苯基 -N-(S)-1-(异丙氧基羰基)乙基氨基磷 酸酯

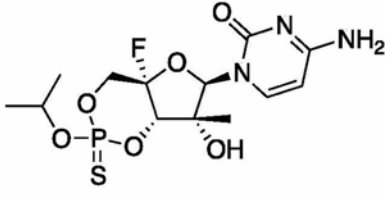
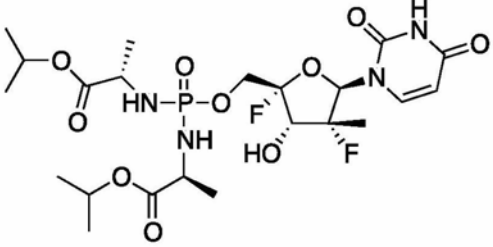
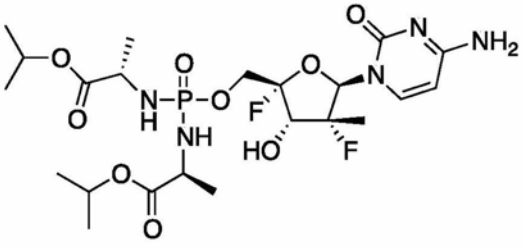
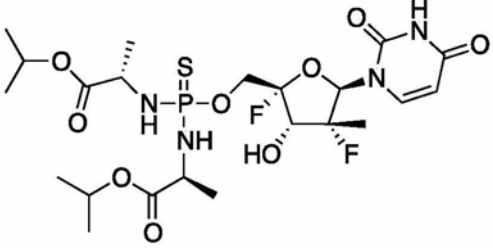
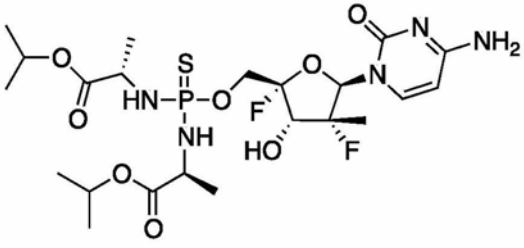
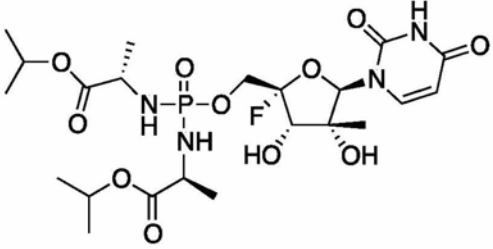
[0143]

表 1.		
化合物编号	结构	名称
I-15		4'-氟-2'-胞苷-5'-(O-1-萘基 -N-(S)-1-(异丙氧基羰基)乙基氨基磷 酸酯
I-16		4'-氟-2'-甲基胞苷-5'-(O-1-萘基 -N-(S)-2-(异丙氧基羰基)乙基氨基磷 酸酯
I-17		4'-氟-2'-甲基尿苷-5'-(O-苯基 -N-(S)-1-(异丙氧基羰基)乙基硫代氨 基磷酸酯
I-18		4'-氟-2'-甲基尿苷-5'-(O-1-萘基 -N-(S)-1-(异丙氧基羰基)乙基硫代氨 基磷酸酯
I-19		4'-氟-2'-甲基尿苷-5'-(O-1-萘基 -N-(S)-2-(异丙氧基羰基)乙基硫代氨 基磷酸酯

[0144]

表 1.		
化合物编号	结构	名称
I-20		4'-氟-2'-甲基胞苷-5'-(O-苯基)-N-(S)-1-(异丙氧基羰基)乙基硫代氨基磷酸酯
I-21		4'-氟-2'-甲基胞苷-5'-(O-1-萘基)-N-(S)-1-(异丙氧基羰基)乙基硫代氨基磷酸酯
I-22		4'-氟-2'-甲基胞苷-5'-(O-1-萘基)-N-(S)-2-(异丙氧基羰基)乙基硫代氨基磷酸酯
I-23		4'-氟-2'-甲基尿苷-3',5'-环磷酸异丙基酯
I-24		4'-氟-2'-甲基胞苷-3',5'-环磷酸异丙基酯
I-25		4'-氟-2'-甲基尿苷-3',5'-环硫代磷酸异丙基酯

[0145]

表 1.		
化合物编号	结构	名称
I-26		4'-氟-2'-甲基胞苷-3',5'-环硫代磷酸 异丙基酯
I-27		2'-脱氧基-2',4'-二氟-2'-甲基尿苷 -5'-{N,N'-二[(S)-1-(异丙氧基羰基)乙 基]二氨基磷酸酯
I-28		2'-脱氧基-2',4'-二氟-2'-甲基胞苷 -5'-{N,N'-二[(S)-1-(异丙氧基羰基)乙 基]二氨基磷酸酯
I-29		2'-脱氧基-2',4'-二氟-2'-甲基尿苷 -5'-{N,N'-二[(S)-1-(异丙氧基羰基)乙 基]硫代二氨基磷酸酯
I-30		2'-脱氧基-2',4'-二氟-2'-甲基胞苷 -5'-{N,N'-二[(S)-1-(异丙氧基羰基)乙 基]硫代二氨基磷酸酯
I-31		4'-氟-2'-甲基尿苷-5'-{N,N'-二 [(S)-1-(异丙氧基羰基)乙基]二氨基磷 酸酯

[0146]

表 1.		
化合物编号	结构	名称
I-32		4'-氟-2'-甲基胞苷-5'-{N,N'-二[(S)-1-(异丙氧基羰基)乙基]二氨基磷酸酯
I-33		4'-氟-2'-甲基尿苷-5'-{N,N'-二[(S)-1-(异丙氧基羰基)乙基]硫代二氨基磷酸酯
I-34		4'-氟-2'-甲基胞苷-5'-{N,N'-二[(S)-1-(异丙氧基羰基)乙基]硫代二氨基磷酸酯

## 实施例

[0147] 本申请中使用的缩写包括：乙酰基 (Ac)；乙酸 (HOAc)；偶氮-二-异丁酰基胍 (AIBN)；1-N-羟基苯并三唑 (HOBT)；大气压 (Atm)；高效液相色谱 (HPLC)；9-硼杂双环 [3.3.1] 壬烷 (9-BBN 或 BBN)；甲基 (Me)；叔-丁氧基羰基 (Boc)；乙腈 (MeCN)；二-叔-丁基焦碳酸酯或 boc 酸酐 (BOC<sub>2</sub>O)；1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 (EDCI)；苯甲酰基 (Bz)；苄基 (Bn)；间-氯代过苯甲酸 (MCPBA)；丁基 (Bu)；甲醇 (MeOH)；苄氧基羰基 (cbz 或 Z)；熔点 (mp)；羰基二咪唑 (CDI)；MeSO<sub>2</sub>- (甲磺酰基或 Ms)；1,4-二氮杂双环 [2.2.2] 辛烷 (DABCO)；质谱 (ms)；二乙基氨基三氟化硫 (DAST)；甲基叔-丁基醚 (MTBE)；二亚苄基丙酮 (Dba)；N-羧基酸酐 (NCA)；1,5-二氮杂双环 [4.3.0] 壬-5-烯 (DBN)；N-溴琥珀酰亚胺 (NBS)；1,8-二氮杂双环 [5.4.0] 十一碳-7-烯 (DBU)；N-甲基吗啉 (NMM)；N-甲基吡咯烷酮 (NMP)；1,2-二氯乙烷 (DCE)；吡啶氯代铬酸盐 (PCC)；N,N'-二环己基碳二亚胺 (DCC)；吡啶重铬酸盐 (PDC)；二氯甲烷 (DCM)；丙基 (Pr)；偶氮二甲酸二乙基酯 (DEAD)；苯基 (Ph)；偶氮二甲酸二-异丙基酯 (DIAD)；每平方英寸磅数 (psi)；二-异丙基乙基胺 (DIPEA)；吡啶 (pyr)；二-异丁基氯化铝；DIBAL-H；室温 (rt 或 RT)；N,N-二甲基乙酰胺 (DMA)；叔-丁基二甲基甲硅烷基或 t-BuMe<sub>2</sub>Si (TBDMS)；4-N,N-二甲基氨基吡啶 (DMAP)；三乙胺 (Et<sub>3</sub>N 或 TEA)；N,N-二甲基甲酰胺 (DMF)；三氟甲磺酸盐或 CF<sub>3</sub>SO<sub>2</sub>- (Tf)；二甲基亚砷 (DMSO)；三氟乙酸 (TFA)；1,1'-二-(二苯基膦基)乙烷 (dppf)；2,2,6,6-四甲基庚烷-2,6-二酮 (TMHD)；1,1'-二-(二苯基膦基)二茂铁 (dppf)；薄层色谱 (TLC)；乙酸乙酯 (EtOAc)；四氢呋喃 (THF)；乙醚 (Et<sub>2</sub>O)；三甲基甲硅烷基

或Me<sub>3</sub>Si (TMS) ;乙基 (Et) ;对-甲苯磺酸单水合物 (TsOH或pTsOH) ;六甲基二硅氮烷锂 (LiHMDS) ;4-Me-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>SO<sub>2</sub>-或甲苯磺酰基 (Ts) ;异-丙基 (i-Pr) ;N-尿烷-N-羧酸酐 (UNCA) ;乙醇 (EtOH) 。当与烷基部分一起使用时,常规名称包括前缀正 (n) 、异 (i-) 、仲 (sec-) 、叔 (tert-) 和新均具有其常规意义。(J.Rigaudy和D.P.Klesney,有机化学命名 (Nomenclature in Organic Chemistry) ,IUPAC 1979Pergamon Press,Oxford.) 。

[0148] 通用条件

[0149] 本发明化合物可以通过下面实施例章节所述说明性的合成反应中描述的各种方法制备。

[0150] 制备这些化合物中使用的原料和试剂通常可以获自商业供应商,例如Aldrich Chemical Co.,或者可以根据下面文献中所示工艺按照本领域技术人员已知的方法制备:例如Fieser和Fieser的有机合成试剂 (Fieser and Fieser's Reagents for Organic Synthesis) ;Wiley&Sons:纽约,1991,第1-15卷;Rodd的碳化合物化学 (Rodd's Chemistry of Carbon Compounds) ,Elsevier Science Publishers,1989,第1-5卷和增补卷;有机反应 (Organic Reactions) ,Wiley&Sons,纽约,1991,第1-40卷。应当理解,实施例章节中所示合成反应流程仅仅用于说明合成本发明化合物的某些方法,可以采用这些合成反应流程的各种变通方法,对已经参考本申请公开内容的本领域技术人员提供建议。

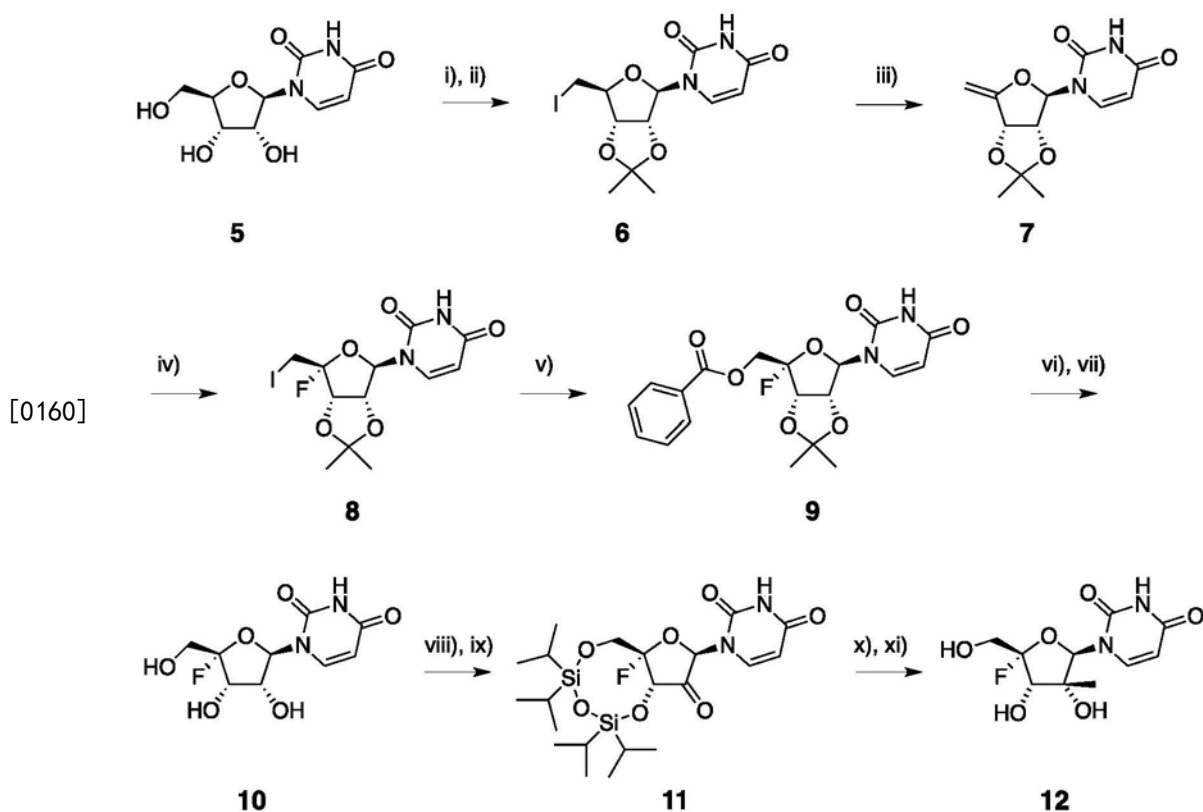
[0151] 如果需要,合成反应流程的原料和中间体可以采用常规技术进行分离和纯化,包括但不限于过滤、蒸馏、结晶、色谱等。此类材料可以采用常规方法定性,包括物理常数和色谱数据。

[0152] 除非有相反说明,本文中所述反应通常在惰性氛围中、大气压下、于约-78℃至约150℃的温度下 (通常约0℃至约125℃,更通常并便利地于约室温下,例如约20℃) 进行。

[0153] 本发明化合物的各种取代基可以存在于起始化合物中,添加到任何一个中间体中,或者根据已知的取代反应或转化反应在终产物形成后添加。如果取代基自身具有反应性,则取代基自身可以根据本领域已知技术进行保护。各类保护基团在本领域中是已知的,可以采用。许多可能的基团的示例可以参考:Green等编著的“有机合成中的保护基团 (Protective Groups in Organic Synthesis) ,John Wiley和Sons,1999。例如,硝基可以通过硝化反应添加,该硝基可以转化为其它基团,例如通过还原反应转化为氨基,通过氨基的重氮化反应并采用卤素置换重氮基基团而转化为卤素。酰基可以通过Friedel-Crafts酰化反应添加。然后酰基可以通过各种方法转化为相应的烷基,包括Wolff-Kishner还原反应和Clemmenson还原反应。氨基可以通过烷基化反应形成单-和二-烷基氨基基团;巯基和羟基可以通过烷基化反应形成相应的醚。伯醇可用本领域已知的氧化剂氧化形成羧酸或醛,仲醇可以被氧化形成酮。因此,可以采用取代或改变反应以提供原料、中间体或终产物 (包括分离的产物) 的整个分子的各种取代基。

[0154] 原料1可以根据下列文献中所述方法制备:Sofia,M.J.等,J.Med.Chem. (2010) ,53 (19) ,7202-7218和Clark,J.L等,J.Med.Chem. (2005) ,48 (17) ,5504-5508。通过碘化反应以及随后在碱性条件下碘化物的消除反应可以获得中间体2,其中3'-羟基采用苯甲酰基保护,随后通过关键的立体选择性氟化反应获得中间体4。类似的在4' α位上添加氟的转化反应已经描述于:Ajmera,S.等,J.Med.Chem. (1988) ,31 (6) ,1094-1098和Moffatt,J.G等,J.Am.Chem.Soc. (1971) ,93 (17) ,4323-4324。通过采用苯甲酸钠置换5' 碘以及随后将3' ,



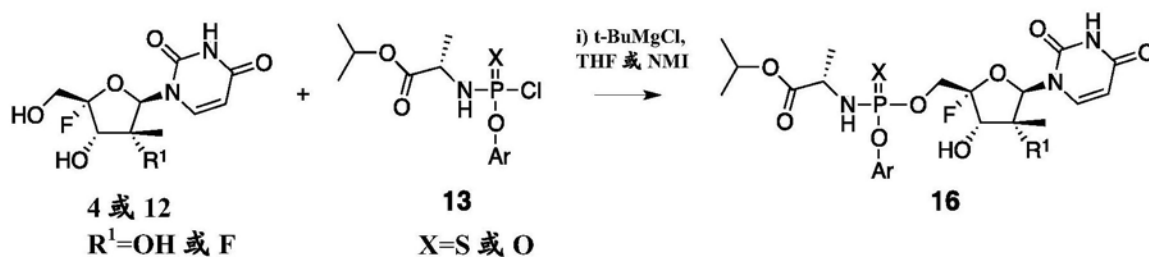


[0161] i) 丙酮, PTSA; ii)  $\text{I}_2, \text{PPh}_3, \text{THF}$ ; iii)  $\text{NaOMe}, \text{MeOH}$ ; iv)  $\text{I}_2, \text{AgF}, \text{CH}_2\text{Cl}_2$ ; v)  $\text{PhCO}_2\text{Na}, \text{DMSO}$ ; vi)  $\text{NH}_3, \text{MeOH}$ ; vii) 甲酸; viii)  $\text{DIPSCl}$ , 吡啶; ix) Dess-Martin,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ; x)  $\text{AlCl}_3, \text{CH}_2\text{Cl}_2$ ; xi) TBAF, THF

[0162] 本发明的氨基磷酸酯化合物可以在强碱存在下通过核苷4或12与13类的适当取代的氯磷酸酯(phosphochloridate)或其硫类似物的缩合反应制备(流程3)。在偶合条件下,式I的偶合的产物16最初作为两种非对映异构体的混合物获得,其可以通过手性柱、手性HPLC或手性SFC色谱方法分离为其相应的手性对映体。

[0163] 流程3

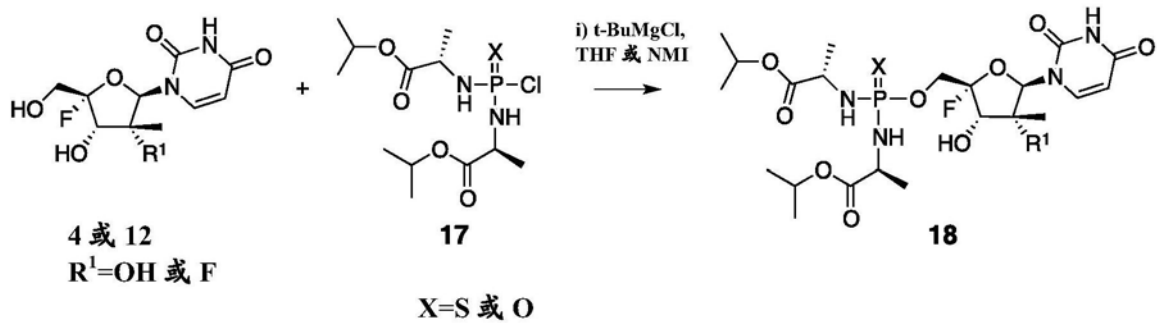
[0164]



[0165] 本发明中的式I的二氨基磷酸酯化合物可以在强碱存在下通过核苷4或12与17的适当取代的磷酰二胺氯(phosphorodiamidic chloride)或硫代磷酰二胺氯(phosphorodiamidothioic chloride)的缩合反应制备(流程4)。

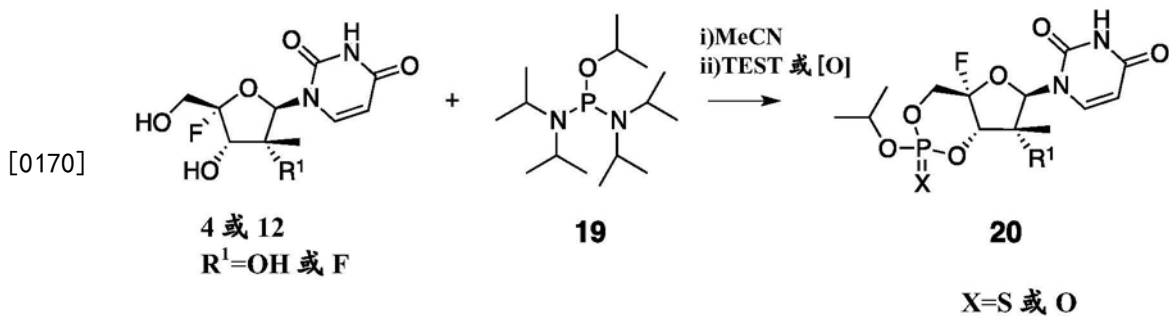
[0166] 流程4

[0167]



[0168] 本发明的磷酸酯可以通过核苷4或12与N,N,N,N-双(二异丙基氨基)磷酸异丙基酯(tetraisopropylphosphorodiamidite) 19的缩合反应制备(流程5)。硫代衍生物的转化可以通过将粗品反应混合物与二(3-三乙氧基甲硅烷基)丙基-四硫化物(TEST)加热而进行。

[0169] 流程5



[0171] 生物学实施例

[0172] HCV复制子试验

[0173] 该试验评价了式I化合物抑制HCV RNA复制的能力及其由此而来的用于治疗HCV感染的潜在效用。试验采用报告基因作为细胞内HCV复制子RNA水平的简单读取示值。将海肾荧光素酶基因引入基因型1b复制子构建体NK5.1(紧挨着内部核糖进入位点(IRES)序列后的第一个开放阅读框(N.Krieger等,J.Virol.2001 75(10):4614),通过源自口蹄疫病毒的自-裂解肽2A与新霉素磷酸转移酶(NPTII)基因融合(M.D.Ryan&J.Drew,EMBO 1994 13(4):928-933)。体外转录后,将RNA电穿孔到人肝癌Huh7细胞中,分离并扩增G418-抗性集落。稳定选择的细胞系2209-23含有复制型HCV次基因组RNA,复制子表达的海肾荧光素酶的活性反映了其在细胞中的RNA水平。该试验以一式两份在板中进行,一块板为不透明的白色,另一块板为透明的,以便于平行测定化学化合物的抗病毒活性和细胞毒性,从而保证观察到的活性不会受到细胞增生的减少或细胞死亡的干扰。

[0174] 将表达海肾荧光素酶报告基因的HCV复制子细胞(2209-23)在含有5%胎牛血清(FBS,Invitrogen cat.no.10082-147)的Dulbecco's MEM(Invitrogen cat no.10569-010)中温育,以每孔5000个细胞的密度铺板在96-孔板上,温育过夜。24小时后,将在生长介质中的不同稀释度的化学化合物加至细胞中,然后将其再于37℃温育3天。温育结束时,收集白色板中的细胞,采用海肾荧光素酶试验系统(Promega cat no.E2820)测定荧光素酶的活性。下文中所述所有试剂均包含在生产商试剂盒中,根据生产商说明书配制试剂。将细胞每孔采用100μL磷酸盐缓冲的生理盐水(pH 7.0)(PBS)洗涤一次,采用20μl的1×海肾荧光素酶试验裂解缓冲液裂解,然后于室温下温育20min。然后将板插入Centro LB 960微孔板

光度计 (Berthold Technologies) 中,向每个孔中注入100 $\mu$ l海肾荧光素酶试验缓冲液,采用2-秒延迟、2-秒测量程序测定信号。 $IC_{50}$  (相对于未处理细胞对照值而言降低复制子水平达50%所需要的药物的浓度)可以通过荧光素酶活性降低百分数与上述药物浓度的图计算。

[0175] 获自Roche Diagnostic的WST-1试剂(cat no.1644807)用于细胞毒性试验。将10微升的WST-1试剂加至仅含有介质作为空白的透明板的每个孔中。将细胞于37 $^{\circ}C$ 温育2h,采用MRX Revelation微孔板读数仪(Lab System)于450nm(参比滤波器于650nm)测定OD值。 $CC_{50}$  (相对于未处理细胞对照值而言减少细胞增殖达50%所需要的药物的浓度)可以通过WST-1值降低百分数与上述药物浓度的图计算。

[0176] 剂量和给药

[0177] 上面表中所示的式I化合物具有作为治疗人HCV感染的有效的抗病毒药物的潜力,或者其代谢的化合物具有此类活性。

[0178] 在本发明的另一个实施方案中,活性化合物或其前药衍生物或盐可以与另一个抗病毒药物组合给药,例如抗肝炎药物,包括那些式I化合物。当活性化合物或其前药衍生物或盐与另一个抗病毒药物组合给药时,活性可以高于母化合物。这可以通过根据本文中所述方法制备衍生物并测试其抗HCV活性而容易地评价。

[0179] 活性化合物的给药可以自连续(静脉滴注)到每天数次口服给药(例如每天给药四次(Q.I.D)),给药途径包括口服、局部、肠胃外、肌肉内、静脉内、皮下、经皮(其可以包含渗透促进剂)、颊内和栓剂给药。

[0180] 4'-F取代的核苷衍生物及其可药用的盐可以以任何药物制剂的形式用作药物。药物制剂可以通过肠内给药,例如以片剂、包衣片剂、糖锭剂、硬和软明胶胶囊剂、溶液剂、乳剂、糖浆剂或混悬液剂;或者通过直肠给药,例如以栓剂的形式。它们也可以通过胃肠外给药(肌肉内、静脉内、皮下或胸腔内注射或输液),例如以注射液的形式;还可以通过鼻腔给药,例如以鼻用喷雾剂或吸入喷雾剂的形式;还可以局部给药等。

[0181] 为了生产药物制剂,4'-取代的核苷衍生物及其可药用的盐可以与治疗上惰性的无机或有机赋形剂一起配制,用于生产片剂、包衣片剂、糖锭剂、硬和软明胶胶囊剂、溶液剂、乳剂或混悬液剂。

[0182] 式I化合物可以与可药用的载体混合配制。例如,本发明化合物可以以药理学上可接受的盐口服给药。因为本发明化合物大多是水溶性的,它们可以在生理盐水溶液中(例如缓冲至pH约7.2-7.5)静脉给药。常规缓冲液例如磷酸盐、碳酸氢盐或柠檬酸盐可以用于此目的。当然,本领域技术人员可以在说明书的指导范围内调整制剂以提供用于特定给药途径的各种制剂而不会使得本发明的组合物不稳定或损害其治疗活性。具体地讲,通过例如较小的修饰(成盐、酯化等)可以容易地完成对本发明化合物修饰以使得它们更易溶于水或其它介质,这是本领域技术人员很容易完成的。本领域技术人员可以容易地改变具体化合物的给药途径和剂量方案以便于调节本发明化合物的药代动力学从而使得患者获得有益的疗效。

[0183] 对于肠胃外制剂而言,所述载体通常包括无菌的水或氯化钠水溶液,也可以包括其它材料,包括那些分散辅助剂。当然,当使用无菌水并保持无菌时,组合物和载体也必须是无菌的。也可以制备注射用混悬液,在此情况下,可以采用适当的液体载体、助悬剂等。

[0184] 用于片剂、包衣片剂、糖锭剂、硬明胶胶囊剂的适当的赋形剂为例如乳糖、玉米淀粉及其衍生物、滑石粉和硬脂酸或其盐。

[0185] 如果需要,片剂或胶囊剂可以通过标准技术肠溶包衣或制成缓释制剂。

[0186] 用于软明胶胶囊的赋形剂为例如植物油类、蜡类、脂肪类、半固体和液体多元醇类。

[0187] 用于注射液的适当的赋形剂为例如水、生理盐水、醇类、多元醇类、甘油或植物油类。

[0188] 用于栓剂的适当的赋形剂为例如天然和硬化的油类、蜡类、脂肪类、半固体和液体多元醇类。

[0189] 用于肠道内应用的溶液剂和糖浆剂的适当的赋形剂为例如水、多元醇类、蔗糖、转化糖和葡萄糖。

[0190] 本发明的药物制剂也可以是缓释制剂或其它适当的制剂。

[0191] 药物制剂也可以包含防腐剂、增溶剂、稳定剂、润湿剂、乳化剂、甜味剂、着色剂、矫味剂、用于调节渗透压的盐、缓冲剂、掩蔽剂或抗氧化剂。

[0192] 药物制剂还可以包含其它本领域中已知的治疗活性药物。

[0193] 剂量可以在较宽的范围内变动,当然可以根据每个具体的病例进行调节以满足个体的需要。对于口服给药而言,约0.01至约100mg/kg体重/天的日剂量适合于单一疗法和/或组合疗法。优选日剂量为每天约0.1至约500mg/kg体重,更优选0.1至约100mg/kg体重,最优选1.0至约100mg/kg体重。代表性的制剂含有约5%至约95%活性化合物(w/w)。日剂量可以以单剂量或多剂量的形式给药,多剂量通常为每天1—5个剂量。

[0194] 在某些药物剂型中,化合物的前药特别包括酰化的(乙酰基化等)衍生物,优选本发明化合物的吡啶酯类和各种盐的形式。本领域技术人员知道如何容易地将本发明化合物修饰为前药形式从而有助于将活性化合物传递至宿主生物体或个体的靶点位置。在适当的情况下,本领域技术人员也可以利用前药形式的良好药代动力学参数,将本发明化合物传递至宿主生物体或个体的靶点位置以使得该化合物的预期效果最大化。

[0195] 适应症和治疗方法

[0196] 本发明化合物及其异构体形式和可药用的盐可以用于治疗和预防HCV感染。

[0197] 本申请提供了治疗丙肝病毒(HCV)感染的方法,该方法包括给予需要的患者治疗有效量的任意一种式I化合物。

[0198] 本申请提供了在细胞中抑制HCV复制的方法,该方法包括给予任意一种式I化合物。

[0199] 组合疗法

[0200] 本发明化合物及其异构体形式和可药用的盐可以单独用于治疗 and 预防HCV感染,或者与靶向参与HCV生命周期的病毒或细胞组分或功能的其它化合物组合使用。用于本发明的化合物的种类包括但不限于所有类别的HCV抗病毒药物。

[0201] 对于组合疗法而言,可以与本发明化合物组合使用的药物的类别包括例如HCV聚合酶的核苷和非核苷抑制剂、蛋白酶抑制剂、解旋酶抑制剂、NS4B抑制剂以及在功能上能够抑制内部核糖体进入位点(IRES)的药物和其它能够抑制HCV细胞附着或病毒进入、HCV RNA转译、HCV RNA转录、复制或HCV成熟、装配或病毒释放的药物。在这些类别中和本发明中使

用的具体的化合物包括但不限于：大环、杂环和线性HCV蛋白酶抑制剂，例如特拉匹韦 (VX-950)、伯克匹韦 (SCH-503034)、narlaprevir (SCH-900518)、ITMN-191 (R-7227)、TMC-435350 (a.k.a. TMC-435)、MK-7009、BI-201335、BI-2061 (西鲁瑞韦 (ciluprevir))、BMS-650032、ACH-1625、ACH-1095 (HCV NS4A蛋白酶辅因子抑制剂)、VX-500、VX-813、PHX-1766、PHX2054、IDX-136、IDX-316、ABT-450EP-013420 (及同系物) 和VBY-376；本发明中使用的核苷HCV聚合酶 (复制酶) 抑制剂包括但不限于：R7128、PSI-7851、IDX-184、IDX-102、R1479、UNX-08189、PSI-6130、PSI-938和PSI-879以及其它核苷和核苷酸类似物；HCV抑制剂包括 (但不限于) 那些衍生为2'-C-甲基修饰的核苷、4'-氮杂修饰核苷和7'-去氮杂修饰的核苷。本发明中使用的非核苷HCV聚合酶 (复制酶) 抑制剂包括但不限于：HCV-796、HCV-371、VCH-759、VCH-916、VCH-222、ANA-598、MK-3281、ABT-333、ABT-072、PF-00868554、BI-207127、GS-9190、A-837093、JKT-109、GL-59728和GL-60667。

[0202] 此外，本发明化合物可以与下列成分组合使用：亲环素 (cyclophyllin) 和亲免疫素 (immunophyllin) 拮抗剂 (例如但不限于DEBIO化合物、NM-811以及环孢菌素及其衍生物)、激酶抑制剂、热休克蛋白抑制剂 (例如HSP90和HSP70)、其它免疫调节剂，所述调节剂包括但不限于干扰素类 ( $-\alpha$ 、 $-\beta$ 、 $-\omega$ 、 $-\gamma$ 、 $-\lambda$ 或合成的)，例如Intron A、Roferon-A、Canferon-A300、Advaferon、Infergen、Humoferon、Sumiferon MP、Alfaferone、IFN- $\beta$ 、Feron等；聚乙二醇衍生化的 (聚乙二醇化) 干扰素化合物，例如PEG干扰素- $\alpha$ -2a (Pegasys)、PEG干扰素- $\alpha$ -2b (PEGIntron)、聚乙二醇化IFN- $\alpha$ -con1等；干扰素化合物的长效制剂和衍生物，例如白蛋白融合干扰素、Albuferon、Locteron等；干扰素的各种类型的控释传递系统 (例如ITCA-638，通过Duros皮下传递系统传递的 $\omega$ -干扰素)；刺激细胞中干扰素合成的化合物，例如瑞奎莫得 (resiquimod) 等；白介素类；增强I型辅助T细胞响应的化合物，例如SCV-07等；TOLL样受体激动剂，例如CpG-10101 (actilon)、Isotorabine、ANA773等；胸腺素 $\alpha$ -1；ANA-245和ANA-246；组胺二盐酸盐；丙帕锗 (propagermanium)；tetrachlorodecaoxide；安普利近 (ampligen)；IMP-321；KRN-7000；抗体，例如civacir、XTL-6865等；预防和治疗疫苗，例如InnoVac C、HCV E1E2/MF59等。另外，涉及给予NS5A抑制剂、I型干扰素受体激动剂 (例如IFN- $\alpha$ ) 和II型干扰素受体激动剂 (例如IFN- $\gamma$ ) 的任何上述方法都可以通过给予有效量的TNF- $\alpha$ 拮抗剂来增强疗效。适用于此类组合疗法的非限定性的典型TNF- $\alpha$ 拮抗剂包括依那西普 (ENBREL)、英利昔单抗 (REMICADE) 和阿达木单抗 (HUMIRA)。

[0203] 此外，本发明化合物可以与抗原生动物药物 (antiprotozoans) 和其它抗病毒药物组合使用，应当可以有效地治疗HCV感染，例如但不限于前药硝唑尼特。硝唑尼特可以用作与本发明公开的化合物组合的药物，也可以与其它用于治疗HCV感染的药物 (例如聚乙二醇干扰素 $\alpha$ -2a和利巴韦林) 组合使用。

[0204] 本发明化合物还可以与下列药物组合使用：替代形式的干扰素和聚乙二醇化干扰素、利巴韦林或其类似物 (例如tarabavarin、levoviron)、微RNA、小干扰RNA化合物 (例如SIRPLEX-140-N等)、核苷或核苷类似物、免疫球蛋白、保肝药、抗炎药和其它NS5A抑制剂。HCV生命周期中其它靶点的抑制剂包括NS3解旋酶抑制剂；NS4A辅因子抑制剂；反义寡核苷酸抑制剂，例如ISIS-14803、AVI-4065等；载体编码的短发夹RNA (shRNA)；HCV特异性核酶，例如heptazyme、RPI、13919等；进入抑制剂，例如HepeX-C、HuMax-HepC等； $\alpha$ 葡萄糖苷酶抑制剂，例如西戈斯韦 (celgosivir)、UT-231B等；KPE-02003002和BIVN 401以及IMPDH抑制剂。

其他说明性HCV抑制剂化合物包括下列文献公开的那些:U.S.Pat.Nos.5,807,876;6,498,178;6,344,465;和6,054,472;PCT专利申请公开号:W097/40028;W098/40381;W000/56331、W002/04425;W003/007945;W003/010141;W003/000254;W001/32153;W000/06529;W000/18231;W000/10573;W000/13708;W001/85172;W003/037893;W003/037894;W003/037895;W002/100851;W002/100846;W099/01582;W000/09543;W002/18369;W098/17679、W000/056331;W098/22496;W099/07734;W005/073216、W005/073195和W008/021927。

[0205] 另外,例如利巴韦林和干扰素的组合可以与至少一种本发明化合物作为多重组合疗法给药。本发明不限于上述类别或化合物,还包括预期的已知的和新的化合物以及生物学活性成分的组合。本发明的组合疗法预期包括任何化学上可相容的本发明化合物组的化合物与本发明组的其它化合物或本发明组以外的其它化合物的组合,只要该组合不会抵消本发明组的化合物的抗病毒活性或其药用组合物的抗病毒活性。

[0206] 组合疗法可以是序贯进行的,即首先采用一种药物,然后采用第二种药物(例如,其中每次治疗包括不同的本发明化合物,或者其中一次治疗包括本发明化合物而另一次治疗包括一或多种生物学活性药物),或者组合疗法可以在相同时间采用两种药物治疗(同时)。序贯疗法可以包括第一次治疗完成后到第二次治疗开始前的合理的时间。相同时间采用两种药物的治疗可以是相同的日剂量或不同的剂量。组合疗法不限于两种药物,可以包括三种或更多种药物。同时和序贯组合疗法的剂量取决于组合疗法的药物的吸收、分布、代谢和排泄速率以及本领域技术人员已知的其它因素。剂量还随待缓解的疾病的严重程度而发生变化。还应当理解,对于任何特定的患者而言,具体的剂量方案和时间安排可以根据个体的需要和实施或监督组合疗法给药的本领域技术人员的判断而随时间调整。

[0207] 本申请提供了用于治疗丙肝病毒(HCV)感染的方法,该方法包括给予需要的患者治疗有效量的任意一种式I化合物。

[0208] 本申请提供了上述方法,该方法还包括给予免疫系统调节剂或能够抑制HCV复制的抗病毒药物或其组合。

[0209] 本申请提供了上述方法,其中所述免疫系统调节剂为干扰素或化学衍生的干扰素。

[0210] 本申请提供了上述方法,其中抗病毒药物选自HCV蛋白酶抑制剂、HCV聚合酶抑制剂、HCV解旋酶抑制剂、HCV引发酶抑制剂、HCV融合抑制剂及其组合。

[0211] 应当理解,本文涉及的治疗扩展至预防以及对现有病症的治疗,动物的治疗包括人类以及其它哺乳动物的治疗。此外,本文中使用的丙肝病毒(HCV)感染的治疗还包括与丙型肝炎病毒(HCV)感染相关或由其介导的疾病或病症或其临床症状的治疗和预防。

[0212] 如果适当的话,以其特殊形式表达或按照用于实施本公开功能的方法表达或获得本公开结果的方法或工艺过程表达的在前面的描述中或后面权利要求中或附图中所公开的特征可以单独地或以这些特征的任意组合的方式以不同的形式用于实现本发明。

[0213] 为了清楚和理解,已经以说明和举例的方式相当详细地描述了前述本发明。本领域技术人员显而易见的是,可以在权利要求的范围内进行改变和修改。因此,应当理解,上面的描述应当是说明性的而非限制性的。因此,本发明的范围不应当参照上面的描述来确定,而应当参照权利要求来确定,还包括与此权利要求相当的全部范围。

[0214] 本申请中引用的所有专利、专利申请和出版物以其全部内容为了所有目的在此引

用作为参考,就如同每个单独的专利、专利申请或出版物是分别所指明的。