



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101573370 B

(45) 授权公告日 2013. 09. 11

(21) 申请号 200780037905. 4

A61K 31/513 (2006. 01)

(22) 申请日 2007. 10. 04

A61P 31/12 (2006. 01)

(30) 优先权数据

60/850, 926 2006. 10. 10 US

(56) 对比文件

WO 2006/021341 A1, 2006. 03. 02, 说明书第 1 页至第 44 页.

(85) PCT 申请进入国家阶段日

2009. 04. 10

CN 1443191 A, 2003. 09. 17, 说明书第 1 页至第 186 页.

(86) PCT 申请的申请数据

PCT/EP2007/060557 2007. 10. 04

WO 02/100415 A2, 2002. 12. 19, 说明书第 1 页至第 47 页.

(87) PCT 申请的公布数据

W02008/043704 EN 2008. 04. 17

审查员 楼兴隆

(73) 专利权人 美迪维尔公司

地址 瑞典胡丁厄

专利权人 杨森产品有限公司

(72) 发明人 N · -G · 约翰逊 G · 卡拉亚诺夫

J · A · 马丁 D · B · 史密斯

A · 温奎斯特

(74) 专利代理机构 中国专利代理 (香港) 有限公

司 72001

代理人 刘健 李炳爱

(51) Int. Cl.

C07H 19/073 (2006. 01)

权利要求书2页 说明书31页

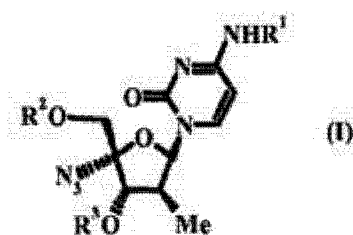
(54) 发明名称

HCV 核苷类抑制剂

(57) 摘要

4- 氨基 -1-((2R, 3S, 4S, 5R)-5- 叠氮基 -4- 羟基 -5- 羟基甲基 -3- 甲基 - 四氢呋喃 -2- 基)-1H- 嘧啶 -2- 酮 (22) 为丙型肝炎 (HCV) 聚合酶抑制剂。本发明还公开了用于抑制 HCV 及治疗 HCV- 介导的疾病的组合物及方法, 制备所述化合物的方法及该方法中所使用的合成中间体。

1. 式 I 化合物



其中

R¹ 是氢；

R² 和 R³ 独立地选自氢、COR⁴、和 C(=O)CHR⁵NHR⁶；

R⁴ 独立地选自 C₁-₁₀ 非支链或支链烷基；

R⁵ 是异丙基、异丁基或仲丁基；

R⁶ 是氢；或者，

其可药用盐。

2. 权利要求 1 的化合物，其中 R¹、R² 和 R³ 各自是氢。

3. 权利要求 1 的化合物，其中 R¹ 是氢，R² 和 R³ 是 COR⁴，且 R⁴ 是 C₁-₁₀ 非支链或支链烷基；或者其可药用盐。

4. 权利要求 3 的化合物，其中 R⁴ 部分是相同的并且选自甲基、乙基、异丙基或叔丁基；或者其可药用盐。

5. 权利要求 1 的化合物，其中 R³ 为氢或 C(=O)CHR⁵NHR⁶，R² 为 C(=O)CHR⁵NHR⁶。

6. 权利要求 5 的化合物，其中 R³ 是 C(=O)CHR⁵NHR⁶，并且其中所述 C(=O)CHR⁵NHR⁶ 的立体化学为 L-氨基酸的立体化学。

7. 权利要求 1 的化合物在制备用于治疗由丙型肝炎病毒 (HCV) 介导的疾病的药物中的用途。

8. 权利要求 7 的用途，其中所述化合物是以 1-100 mg/kg 患者体重 / 天的剂量递送。

9. 权利要求 7 的用途，其中该药物另外包含至少一种免疫系统调节剂和 / 或至少一种抑制 HCV 复制的抗病毒剂。

10. 权利要求 9 的用途，其中所述免疫系统调节剂是干扰素、白介素、肿瘤坏死因子或集落刺激因子。

11. 权利要求 10 的用途，其中所述免疫系统调节剂为干扰素或经化学衍生化的干扰素。

12. 权利要求 9 的用途，其中该药物另外包含至少一种其它抗病毒剂。

13. 权利要求 12 的用途，其中所述抗病毒剂选自 HCV 蛋白酶抑制剂、另一种核苷类 HCV 聚合酶抑制剂、非核苷类 HCV 聚合酶抑制剂、HCV 解旋酶抑制剂、HCV 引发酶抑制剂和 HCV 融合抑制剂。

14. 一种抑制 HCV 的药物组合物，其包含治疗有效量的权利要求 1 的化合物以及至少一种可药用载体或稀释剂。

15. 权利要求 14 的药物组合物，其包含 500-1500 mg 压制片剂，所述压制片剂含有 35-75 wt% 的权利要求 1 的化合物，其余包括至少一种可药用载体或稀释剂。

16. 权利要求 15 的药物组合物,其包含 500-1500 mg 压制片剂,所述压制片剂含有 40-60 wt% 的权利要求 1 的化合物,其余包括至少一种可药用载体或稀释剂。

HCV 核苷类抑制剂

[0001] 本发明提供了核苷类化合物及其某些衍生物,其为 RNA 依赖性 RNA 病毒聚合酶的抑制剂。这些化合物为 RNA 依赖性 RNA 病毒复制的抑制剂且适用于治疗 RNA 依赖性 RNA 病毒感染。其尤其适用作丙型肝炎病毒 (HCV) NS5B 聚合酶的抑制剂,用作 HCV 复制的抑制剂,和用于治疗丙型肝炎感染。

[0002] 本发明涉及 HCV 复制子 RNA 复制的核苷类抑制剂。尤其是,本发明涉及嘧啶核苷化合物用作次基因组 HCV RNA 复制的抑制剂的用途及含有所述化合物的药物组合物。

[0003] 丙型肝炎病毒为全世界慢性肝病的首要原因。(Boyer, N. 等人 J. Hepatol. 2000 32 :98-112)。感染 HCV 的患者有发展成肝硬化及随后肝细胞癌的风险,因此,HCV 是肝移植的主要适应症 (indication)。

[0004] HCV 已被归为黄病毒科 (Flaviviridae) 病毒家族成员之一,该病毒家族包括黄病毒属、瘟病毒属及包括丙型肝炎病毒在内的丙型肝炎病毒属 (Rice, C. M., Flaviviridae : The viruses and their replication, ;Fields Virology, Editors :Fields, B. N., Knipe, D. M., 和 Howley, P. M., Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, Pa., Chapter 30, 931-959, 1996)。HCV 是含有约 9.4kb 正义单链 RNA 基因组的包膜病毒。该病毒基因组是由 5' - 未翻译翻译区 (UTR)、编码约 3011 个氨基酸的多蛋白前体的长开放阅读框和短 3' UTR 组成。5' UTR 是 HCV 基因组的最高保守部分,且对于启动及控制多蛋白翻译有重要作用。

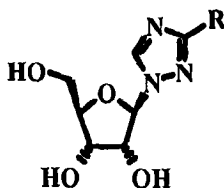
[0005] HCV 的遗传分析已鉴定了 6 种主要基因型,其在 DNA 序列上有超过 30% 的差异。已辨别出 30 种以上亚型。在美国,约 70% 的感染个体有 1a 型及 1b 型感染。1b 型是亚洲最流行的亚型。(X. Fornis 和 J. Bukh, Clinics in Liver Disease 1999 3 :693-716 ;J. Bukh 等人, Semin. Liv. Dis. 1995 15 :41-63)。遗憾地,1 型感染比 2 型或 3 型基因型更抗治疗 (N. N. Zein, Clin. Microbiol. Rev., 2000 13 :223-235)。

[0006] 病毒结构蛋白包括核壳核心蛋白 (C) 及两种包膜糖蛋白 E1 及 E2。HCV 还编码两种蛋白酶 :由 NS2-NS3 区编码的锌依赖性金属蛋白酶以及在 NS3 区编码的丝氨酸蛋白酶。这些蛋白酶是前体多蛋白的特异性区域裂解为成熟肽所必需的。非结构蛋白 5 (NS5B) 的羧基部分含有 RNA 依赖性 RNA 聚合酶。其余非结构蛋白 NS4A 和 NS4B 的功能以及 NS5A (非结构蛋白 5 的氨基末端部分) 的功能仍未知。据信由 HCV RNA 基因组编码的非结构蛋白的大部分涉及 RNA 复制。

[0007] 目前有可用于治疗 HCV 感染的有限数目的被批准疗法。新的和现存的治疗 HCV 的治疗方法以及 HCV NS5B 聚合酶的抑制作用已在以下文献中综述 :R. G. Gish, Sem. Liver. Dis., 1999 19 :5 ;Di Besceglie, A. M. 和 Bacon, B. R., Scientific American, October : 1999 80-85 ;G. Lake-Bakaar, 对于慢性丙型肝炎病毒肝病的目前和将来治疗, Curr. Drug Targ. Infect Dis. 2003 3(3) :247-253 ;P. Hoffmann 等人,关于丙型肝炎病毒感染的实验治疗的近期专利 (1999-2002), Exp. Opin. Ther. Patents 2003 13(11) :1707-1723 ; M. P. Walker 等人,治疗慢性丙型肝炎的有希望的候选物, Exp. Opin. investing. Drugs 2003 12(8) :1269-1280 ;S. -L. Tan 等人,丙型肝炎治疗 :目前的状态和新兴策略, Nature Rev.

Drug Discov. 2002 1 :867-881。

[0008]



[0009] 1a :R = C(=O)NH₂

[0010] 1b :R = C(=NH⁺)NH₂

[0011] 利巴韦林 (Ia ; 1-((2R,3R,4S,5R)-3,4-二羟基-5-羟基甲基-四氢-呋喃-2-基)-1H-[1,2,4]三唑-3-甲酸酰胺 ; 病毒唑 (Virazole)) 为合成的非干扰素诱发的广谱抗病毒核苷类似物。利巴韦林具有抗包括黄病毒科物种的若干 DNA 及 RNA 病毒的体外活性 (Gary L. Davis, Gastroenterology 2000 118 :S104-S114)。在单一疗法中,利巴韦林在 40% 患者中使血清氨基转移酶含量降至正常,但其未降低 HCV-RNA 的血清含量。利巴韦林还表现出显著毒性且已知其诱发贫血。Viramidine 1b 是在肝细胞中转化成 Ia 的前药。

[0012] 近十年来干扰素 (IFN) 可用于治疗慢性肝炎。IFN 是由免疫细胞反应病毒感染而产生的糖蛋白。已辨识两种不同类型的干扰素 : 1 型包括几种干扰素 α 以及一种干扰素 β , 2 型包括干扰素 γ 。1 型干扰素主要由感染细胞产生,且保护相邻细胞以免再次感染。IFN 抑制包括 HCV 的许多病毒的病毒复制,且当用作丙型肝炎感染的单独治疗时,IFN 抑制血清 HCV-RNA 至不可检测的水平。此外,IFN 使血清氨基转移酶水平恢复正常。遗憾地,IFN 的作用是短暂的。停止治疗导致 70% 的复发率且仅 10-15% 表现出持续的病毒反应,以及正常血清丙氨酸转移酶水平 (L. B. Davis, 上述)。

[0013] 早期 IFN 疗法的一个局限性为该蛋白从血液中快速清除。IFN 用聚乙二醇 (PEG) 的化学衍生化作用导致蛋白具有显著改善的药物动力学特性。PEGASYS® 为干扰素 α -2a 与 40kD 分支链单甲氧基 PEG 的缀合物,且 PEG-INTRON® 为干扰素 α -2b 与 12kD 单甲氧基 PEG 的缀合物。(B. A. Luxon 等人, Clin. Therap. 2002 24(9) :1363-1383 ; A. Kozlowski 和 J. M. Harris, J. Control. Release, 2001 72 :217-224)。

[0014] 目前用利巴韦林与干扰素- α 对 HCV 的组合疗法代表了最佳疗法。组合利巴韦林与 PEG-IFN (下文) 在 54-56% 患者中导致持续的病毒反应。对于 2 型及 3 型 HCV 而言,SVR 达到 80%。(Walker, 上文)。遗憾地,该组合还产生副作用,从而造成了对临床的挑战。抑郁、流感样症状及皮肤反应与皮下 IFN- α 相关,而溶血性贫血与用利巴韦林持续治疗相关。

[0015] 目前已确定的用于如抗 HCV 治疗的药物开发的许多潜在分子目标包括 (但不限于) : NS2-NS3 自体蛋白酶、N3 蛋白酶、N3 解旋酶及 NS5B 聚合酶。RNA 依赖性 RNA 聚合酶对于单链、正义、RNA 基因组的复制完全必需。这种酶激发药物化学家的强烈兴趣。NS5B 的核苷与非核苷类抑制剂均是已知的。

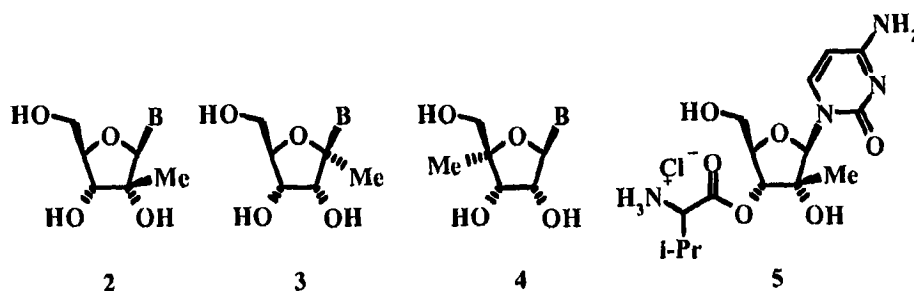
[0016] 核苷类抑制剂可用作链终止剂或用作干扰核苷酸与聚合酶结合的竞争性抑制剂。对于用作链终止剂而言,核苷类似物必须由细胞吸收且在体内转化成三磷酸酯以竞争聚合酶核苷酸的结合位点。这种向三磷酸酯的转化通常是由对潜在核苷聚合酶抑制剂赋予额外

结构要求的细胞激酶所介导的。此外,此将核苷作为 HCV 复制抑制剂的直接评估限制于能够原位磷酸化的基于细胞的测定。

[0017] 在 2001 年 11 月 29 日公开的 WO 0190121 中, J. -P. Sommadossi 及 P. Lacolla 公开且举例说明了式 2 和 3 的 1' - 烷基 - 和 2' - 烷基核苷的抗 -HCV 聚合酶活性。在 2001 年 12 月 6 日公开的 WO 01/92282 中, J. -P. Sommadossi 及 P. Lacolla 公开且举例说明了用式 2 和 3 的 1' - 烷基 - 和 2' - 烷基核苷治疗黄病毒及痘病毒。在均公开于 2003 年 4 月 3 日的 W003/026675 及 W0 03/026589 中, G. Gosselin 等人公开了 4' - 烷基核苷 4 以及使用 4' - 烷基核苷治疗黄病毒及痘病毒的方法。在均公开于 2004 年 1 月 8 日的 WO 2004003000 及 WO 2004002999 中, J. -P. Sommadossi 等人公开 1' -、2' -、3' - 和 4' - 取代的 β -D 及 β -L 核苷的前药。在公开于 2004 年 1 月 8 日的 WO 04/002422 中, J. -P. Sommadossi 等人公开了 2' -C- 甲基 - 呋喃核糖基胞嘧啶核苷的 3' -O-L- 缬氨酸酯及其用于治疗 HCV 的用途。

[0018] Idenix 已报导作为胞嘧啶核苷类似物 2 (B = 胞嘧啶) 的缬氨酸酯 5 的相关化合物 NM283 的临床试验。此外, Idenix Pharmaceuticals, Ltd. 还于 WO 04/046331 中公开了由生物学活性的 2' - 支链 β -D 或 β -L 核苷或其可药用盐或前药所导致的黄病毒科突变。

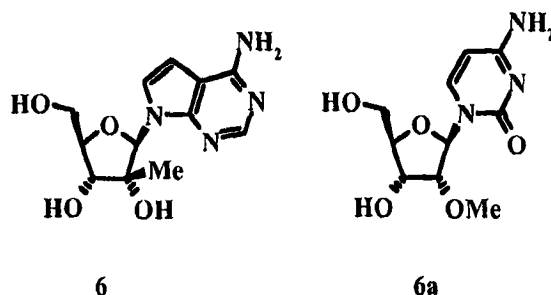
[0019]



[0020] B = 腺嘌呤、胸苷、尿嘧啶、胞嘧啶核苷、鸟嘌呤和次黄嘌呤

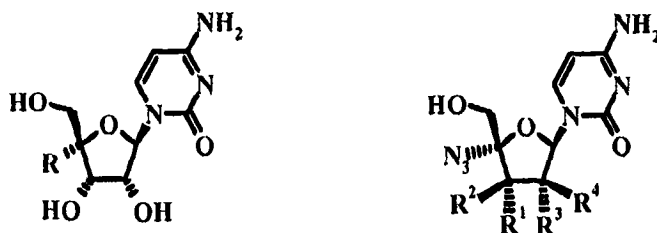
[0021] 在 2002 年 7 月 25 日公开的 WO 02/057425 中, S. S. Carroll 等人公开了其中碳水化合物亚单位经化学修饰的 RNA 依赖性 RNA 聚合酶的核苷类抑制剂。在 2002 年 7 月 25 日公开的 WO 02/05787 中, S. S. Carroll 等人公开了相关的 2 α - 甲基和 2 β - 甲基核糖衍生物, 其中碱基为任选经取代的 7H- 吡咯并 [2,3-d] 嘧啶基 6。该同一申请案公开了 3 β - 甲基核苷的一个实例。S. S. Carroll 等人 (J. Biol. Chem. 2003 278(14):11979-11984) 公开了 2' -O- 甲基胞嘧啶核苷 (6a) 对 HCV 聚合酶的抑制作用。在 2004 年 12 月 23 日公开的美国公开案第 2004/0259934 号中, D. B. Olsen 等人公开了用核苷化合物抑制冠状病毒科 (Coronaviridae) 病毒复制及治疗冠状病毒科病毒感染的方法。

[0022]



[0023] 在2002年12月19日公开的WO 02/100415(US 2003/0236216A1)中,R. R. Devos等人公开了表现出HCV活性的4'-取代的核苷化合物。明确鉴定的四种化合物包括4'-叠氮基化合物7a、4'-乙炔基化合物7b、4'-乙氧基化合物7c以及4'-乙酰基化合物7d。对所举例说明的核糖部分的修饰包括2'-脱氧衍生物8a、3'-脱氧衍生物8b、3'-甲氧基衍生物8e、3'-氟衍生物8c以及2',2'-二氟衍生物8d。在2004年6月3日公开的WO 2004/046159(US 2004121980)中,J. A. Martin等人公开了适用于治疗HCV-介导的疾病的7a的前药。美国申请案两者均以引用的方式全文并入本文中。

[0024]



[0025] 7a :R = N₃

8a :R¹ = OH, R² = R³ = R⁴ = H

[0026] 7b :R = 乙炔基

8b :R³ = OH, R¹ = R² = R⁴ = H

[0027] 7c :R = OEt

8c :R³ = OH, R² = F, R¹ = R⁴ = H

[0028] 7d :R = C(=O)Me

8d :R¹ = R² = H, R³ = R⁴ = F

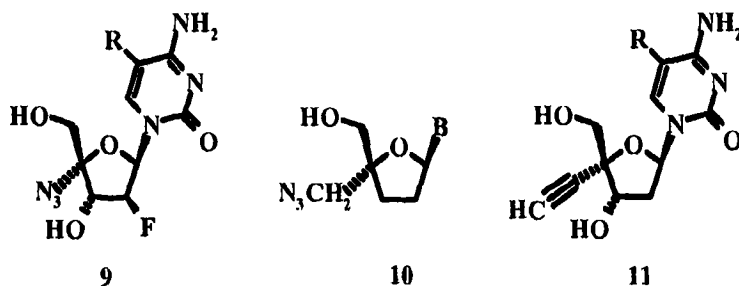
[0029]

8e :R¹ = OMe, R³ = OH, R² = R⁴ = H

[0030] 在2002年6月11日申请的题为“作为HCV RNA复制抑制剂的4'-取代的核苷衍生物”的美国申请案第10/167,106中,及在2003年11月19日申请的美国申请案第10/717,260号中公开了与本发明相关的化合物。所述申请案两者均以引用的方式全文并入本文中。

[0031] Y. -H. Yun 等人 (Arch. Pharm. Res. 1985 18(5) :364-35) 公开了4'-叠氮基-2'-脱氧-2'-氟-阿拉伯呋喃糖基核苷(9 :R = H、Me 和 Cl)的合成及抗病毒活性。

[0032]



[0033] B = 腺嘌呤、尿嘧啶、胸腺嘧啶

[0034] G. S. Jeon 及 V. Nair (Tetrahedron 1996 52(39) :12643-50) 公开了合成 4' - 叠氮基甲基 -2', 3' - 脱氧核糖核苷 10 (B = 腺嘌呤、胸腺嘧啶和尿嘧啶) 作为 HIV 逆转录酶抑制剂。

[0035] 已报导 4' - 叠氮基核苷的若干计算研究 :D. Galisteo 等人, J. Mol. Struct. 1996 384(1) :25-33 ;J. Pepe 等人, Eur. J. Med. Chem. 1996 32(10) :775-786 ;E. Estrada 等人, In silico studies toward the discovery of NewAnti HIV Nucleoside, J. Chem. Info. Comp. Sci. 2002 42(5) :1194-1203。

[0036] I. Sugimoto 等人公开了 4' - 乙炔基 -2' - 脱氧胞嘧啶核苷 (11) 以及在 4' - 位处的其它二碳取代基的合成及 HIV 及单纯疱疹 (H. simplex) 生物测定 (Nucleosides and Nucleotides. 183. Synthesis of 4' β -BranchedThymidines as a New Type of Antiviral Agent, Bioorg. Med. Chem. Lett. 1999 9 :385-88)。T. Wada 等人 (Nucleosides & Nucleotides 1996 15(1-3) :287-304) 公开了 4' -C- 甲基核苷的合成及抗 HIV 活性。

[0037] 在 2001 年 5 月 10 日公开的 WO 01/32153 中, R. Storer 公开了通过给药核苷的二氧戊环类似物治疗或预防黄病毒科病毒感染的方法。

[0038] 在 2002 年 3 月 7 日公开的 WO 02/18404 中, R. Devos 等人公开了新的以及已知的嘌呤和嘧啶核苷衍生物及其用作次基因组 HCV 复制的抑制剂的用途以及含有该等核苷衍生物的药物组合物。所公开的化合物是由具有被取代的嘌呤和嘧啶碱基的核苷组成的。

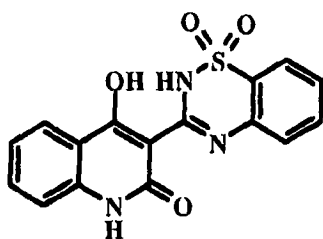
[0039] EPA 公开案第 0352248 号公开了用于治疗 HIV、疱疹及肝炎的多种 L- 呋喃核糖基嘌呤核苷。类似说明见于由 Aktiebolaget Astra 申请的 WO 88/09001 中。

[0040] K. Kitano 等人 (Tetrahedron 1997 53(39) :13315-13322) 公开了合成 4' - 氟甲基 2- 脱氧 -D- 赤 -、核糖 - 及阿拉伯 - 呋喃戊糖基胞嘧啶及抗肿瘤活性。

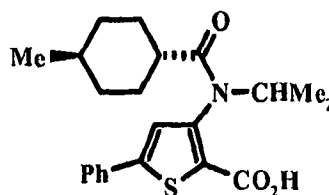
[0041] 已证实 HIV 逆转录酶的非核苷类别构抑制剂单独使用或与核苷类抑制剂以及与蛋白酶抑制剂组合使用具有疗效。已描述且目前处于各种开发阶段的非核苷类 HCV NS5B 抑制剂的若干种类包括 : 苯并咪唑类 (H. Hashimoto 等人 WO 01/47833, H. Hashimoto 等人 WO 03/000254, P. L. Beaulieu 等人 WO 03/020240A2 ; P. L. Beaulieu 等人 US 6, 448, 281B1 ; P. L. Beaulieu 等人 WO 03/007945A1) ; 吡啶类 (P. L. Beaulieu 等人 WO 03/0010141A2) ; 苯并噻二嗪类, 例如 1, (D. Dhanak 等人 2001 年 5 月 10 日申请的 WO 01/85172A1 ; D. Chai 等人 2002 年 6 月 7 日申请的 WO 2002098424, D. Dhanak 等人 2002 年 10 月 28 日申请的 WO03/037262A2 ; K. J. Duffy 等人 2003 年 5 月 23 日申请的 WO 03/099801A1, M. G. Darcy 等人 2002 年 10 月 28 日申请的 WO 2003059356 ; D. Chai 等人 2004 年 6 月 24 日申请的 WO 2004052312, D. Chai 等人 2003 年 12 月 13 日申请的 WO 2004052313 ; D. M. Fitch 等人 2003

年 12 月 11 日申请的 WO 2004058150 ;D. K. Hutchinson 等人 2004 年 8 月 19 日申请的 WO 2005019191 ;J. K. Pratt 等人 2003 年 10 月 31 日申请的 WO2004/041818A1) ;

[0042]



1



2

[0043] 噻吩类, 例如 2, (C. K. Chan 等人 WO 02/100851A2) ; 苯并噻吩类 (D. C. Young 和 T. R. Bailey WO 00/18231) ; β -酮基丙酮酸盐类 (S. Attamura 等人 US 6,492,423B1, A. Attamura 等人 WO 00/06529) ; 嘧啶类 (C. Gardelli 等人 WO 02/06246A1) ; 嘧啶二酮类 (T. R. Bailey 及 D. C. Young W000/13708) ; 三嗪类 (K. -H. Chung 等人 WO 02/079187A1) ; 罗丹宁衍生物 (T. R. Bailey 及 D. C. Young WO 00/10573, J. C. Jean 等人 W001/77091A2) ; 2,4- 二氧化吡喃类 (R. A. Love 等人 EP 256628A2) ; 苯丙氨酸衍生物 (M. Wang 等人 J. Biol. Chem. 2003 278 :2489-2495)。抑制 HCV NS5B 的噻嗪类已由 J. F. Blake 等人在 2005 年 8 月 22 日申请的美国公开案第 20060040927 号中公开了。

[0044] 还已公开了病毒复制所需的 HCV 蛋白酶的抑制剂 (F. McPhee 等人, Drugs of the Future 2003 28(5) :465-488 ; Y. S. Tsantrizos 等人, Angew. Chem. Int. Ed. Eng. 2003 42(12) :1356-1360)。本发明核苷化合物可与这些及其它聚合酶和蛋白酶抑制剂组合使用。

[0045] 这些努力成果已有综述 (J. Z. Chen 和 Z. Hong, Targeting NS5BRNA-Dependent RNA Polymerase for Anti-HCV Chemotherapy, Curr. Drug Targ. Inf. Dis. 2003 3(3) : 207-219)。本发明不涉及非核苷类抑制剂。

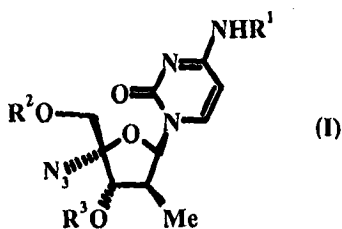
[0046] 本发明目的在于提供用于治疗感染丙型肝炎病毒的宿主的新的核苷化合物、方法及组合物。

[0047] 目前对丙型肝炎病毒 (HCV) 无预防性治疗, 并且现有的仅抗 HCV 的已批准的疗法是有限的。必需设计及开发新的医药化合物。

[0048] 惊人地, 2'-脱氧-2'- β -甲基-4'-叠氮基-胞嘧啶核苷或其酯适用于治疗 HCV 且当给药宿主后表现出较低毒性。本发明还提供了该化合物与至少一种可药用载体、赋形剂或稀释剂的药物组合物。

[0049] 已证实组合疗法适用于治疗病毒性疾病, 且新化合物与其它已批准及研究的 HCV 治疗剂的协同作用, 且本发明提供了用以上公开的通式的核苷或可药用盐, 与一或多种其它有效抗病毒剂或免疫调节剂组合使用或交替使用 (任选包括至少一种可药用载体、赋形剂或稀释剂) 来治疗 HCV。

[0050]



[0051] 本发明提供了式 I 的核苷或其可药用盐, 以及所述化合物在治疗感染 HCV 的宿主中的用途, 其中:

[0052] R^1 、 R^2 和 R^3 独立地选自氢、 COR^4 、 $C(=O)OR^4$ 和 $C(=O)CHR^5NHR^6$;

[0053] R^4 独立地选自 (a) C_{1-18} 非支链或支链烷基, (b) C_{1-18} 卤代烷基, (c) C_{3-8} 环烷基, (d) C_{1-10} 杂烷基和 (e) 苯基, 所述苯基任选被 1-3 个独立地选自下列的基团取代: C_{1-3} 烷基、 C_{1-3} 烷氧基、卤素、氰基或硝基;

[0054] R^5 是氢、 C_{1-10} 烷基、苯基或 C_{1-3} 苯基烷基, 所述苯基任选被 1-3 个独立地选自下列的基团取代: 卤素、羟基、 C_{1-3} 烷氧基、 C_{1-3} 烷基、氰基和硝基;

[0055] R^6 是氢或 C_{1-6} 烷氧基; 或者

[0056] 其酸加成盐。

[0057] 本发明还提供了任选与用于治疗 HCV 感染的其它有效抗病毒剂组合使用且任选包括至少一种可药用载体、赋形剂或稀释剂的式 I 化合物或可药用盐在制备用于治疗或预防宿主中 HCV 的药物中的用途。

[0058] 不希望受理论限制, 据信本发明化合物在人类细胞中是通过激酶连续磷酸化为 5' -O- 单磷酸酯、5' -O- 二磷酸酯且最终成为抗病毒活性代谢物 5' -O- 三磷酸酯。因此, 本发明的另一方面提供了这些 5' -O 磷酸化物质, 即其中 R^1 及 R^3 为 H 且 R^2 为单磷酸酯、二磷酸酯或三磷酸酯的式 I 化合物。

[0059] 核苷类抑制剂的抗病毒活性通常为核苷摄取入宿主细胞中、核苷转化为活性三磷酸酯、三磷酸酯的细胞内稳定性以及三磷酸酯干扰病毒聚合酶的 RNA 合成活性的能力的组合结果。如下文生物学实施例所呈现, 本发明化合物易于在体内磷酸化为活性三磷酸酯且具有长的细胞内三磷酸酯半衰期, 因此允许抗病毒活性物质的持续及高浓度。

[0060] 在本发明的一个实施方案中提供了式 I 化合物, 其中 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 和 R^6 如上文所定义; 或者其可药用盐。短语“如上文所定义”是指如上文给出的式 I 的定义中提供的各基团的最广泛定义。在下文提供的其它实施方案中, 在各实施方案中存在的未明确定义的取代基保留在“发明概述”中所提供的最广泛定义。

[0061] 在本发明的另一实施方案中提供了式 I 化合物, 其中 R^1 、 R^2 、 R^3 是氢; 或者其可药用盐。

[0062] 在本发明的另一实施方案中, 提供了式 I 化合物, 其中 R^1 和 R^3 是 H 且 R^2 是单磷酸酯、二磷酸酯或三磷酸酯。

[0063] 在本发明的还另一实施方案中提供了式 I 化合物, 其中 R^1 、 R^2 、 R^3 各自独立地是氢、 COR^4 或 $C(=O)OR^4$, 并且 R^4 如上文所述; 或者其可药用盐。

[0064] 在本发明的还另一实施方案中提供了式 I 化合物, 其中 R^1 、 R^2 、 R^3 各自独立地是氢、

COR^4 或 $\text{C}(=\text{O})\text{OR}^4$, 并且 R^4 是非支链或支链 C_{1-10} 烷基, 例如低级烷基, 尤其是甲基、乙基、异丙基或叔丁基; 或者其可药用盐。

[0065] 在本发明的还另一实施方案中提供了式 I 化合物, 其中 R^1 是氢; R^2 和 R^3 是 COR^4 , 或者其可药用盐。

[0066] 在本发明的还另一实施方案中提供了式 I 化合物, 其中 R^1 是氢; R^2 和 R^3 是 COR^4 , 并且 R^4 是非支链或支链 C_{1-10} 烷基, 例如低级烷基, 尤其是甲基、乙基、异丙基或叔丁基; 或者其可药用盐。当化合物包含两个 R^4 部分时, 为了合成的便利性, 其通常相同。

[0067] 在本发明的还另一实施方案中提供了式 I 化合物, 其中 R^1 和 R^3 是氢; R^2 是 COR^4 、 $\text{C}(=\text{O})\text{OR}^4$ 或 $\text{COCH}(\text{R}^5)\text{NHR}^6$; 并且 R^4 、 R^5 和 R^6 如上文所定义; 或者其可药用盐。

[0068] 在本发明的还另一实施方案中提供了式 I 化合物, 其中 R^1 和 R^2 是氢; R^3 是 COR^4 、 $\text{C}(=\text{O})\text{OR}^4$ 或 $\text{COCH}(\text{R}^5)\text{NHR}^6$; 并且 R^4 、 R^5 和 R^6 如上文所定义; 或者其可药用盐。

[0069] 在本发明的另一实施方案中提供了式 I 化合物, 其中 R^2 是 $\text{COCH}(\text{R}^5)\text{NHR}^6$, R^5 是异丙基、异丁基或仲丁基, 并且 R^6 是氢。在此实施方案的一个优选配置中, R^5 的立体构型是 (S), 即 R^2 是 L- 脂族氨基酸残基。 R^1 在该实施方案中通常为 H, 而 R^3 是 H 或 $\text{COCH}(\text{R}^5)\text{NHR}^6$ 基团是异丙基、异丁基或仲丁基, 并且 R^6 是氢。在化合物具有两个这样的 $\text{COCH}(\text{R}^5)\text{NHR}^6$ 部分时, 为了合成的便利, 其通常为相同的氨基酸。

[0070] 在本发明的另一实施方案中提供了式 I 化合物, 其中 R^3 是 $\text{COCH}(\text{R}^5)\text{NHR}^6$, R^5 是异丙基、异丁基或仲丁基, 并且 R^6 是氢。在此实施方案的优选配置中, R^5 基团的立体构型为 (S), 即 R^3 是 L- 脂族氨基酸残基。 R^1 在此实施方案中通常是 H。

[0071] 在本发明的还另一实施方案中提供了式 I 化合物, 其中 R^1 和 R^3 是氢; R^2 是 COR^4 ; 并且 R^4 如上文所定义; 或者其可药用盐。

[0072] 在本发明的另一实施方案中提供了式 I 化合物, 其中 R^1 和 R^3 是氢; R^2 是 COR^4 ; 并且 R^4 是 C_{1-10} 非支链或支链烷基, 例如低级烷基, 尤其是甲基、乙基、异丙基或叔丁基; 或者其可药用盐。

[0073] 在本发明的另一实施方案中, 提供了治疗由丙型肝炎病毒 (HCV) 介导的疾病的方法, 其包括向有此需要的哺乳动物给予治疗有效量的式 I 化合物或其可药用盐, 其中 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 和 R^6 如上文所定义; 或者其可药用盐。

[0074] 在本发明的另一实施方案中, 提供了治疗由丙型肝炎病毒 (HCV) 介导的疾病的方法, 其包括向有此需要的哺乳动物给予治疗有效量的式 I 化合物或其可药用盐, 其中 R^1 、 R^2 和 R^3 是氢; 或者其可药用盐。

[0075] 在本发明的另一实施方案中, 提供了治疗由丙型肝炎病毒 (HCV) 介导的疾病的方法, 其包括向有此需要的哺乳动物给予治疗有效量的式 I 化合物或其可药用盐, 其中 R^1 是氢; R^2 和 R^3 各自是 COR^4 ; R^4 选自 C_{1-10} 非支链或支链低级烷基; 或者其可药用盐。

[0076] 在本发明的另一实施方案中, 提供了治疗由丙型肝炎病毒 (HCV) 介导的疾病的方法, 其包括向有此需要的哺乳动物给予治疗有效量的式 I 化合物或其可药用盐, 其中 R^1 和 R^3 是氢; R^2 是 COR^4 或 $\text{COCH}(\text{R}^5)\text{NHR}^6$; R^4 选自 C_{1-10} 非支链或支链低级烷基; R^5 和 R^6 如上文所定义; 或者其可药用盐。

[0077] 在本发明的另一实施方案中, 提供了治疗由丙型肝炎病毒 (HCV) 介导的疾病的方法, 其包括向有此需要的哺乳动物给予 1-100mg/kg 患者体重 / 天剂量的式 I 化合物或其可

药用盐,其中 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 和 R^6 如上文所定义,或者其可药用盐。

[0078] 在本发明的另一实施方案中,提供了治疗由丙型肝炎病毒 (HCV) 介导的疾病的方法,其包括向有此需要的哺乳动物共同给予治疗有效量的式 I 化合物或其可药用盐,其中 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 和 R^6 如上文所定义;和至少一种免疫系统调节剂和/或至少一种抑制 HCV 复制的抗病毒剂。

[0079] 在本发明的另一实施方案中,提供了治疗由丙型肝炎病毒 (HCV) 病毒介导的疾病的方法,其包括向有此需要的哺乳动物共同给予治疗有效量的式 I 化合物或其可药用盐,其中 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 和 R^6 如上文所定义;和至少一种选自下列的免疫系统调节剂:干扰素、白介素、肿瘤坏死因子或集落刺激因子。本领域的专业人员将明白,这些免疫系统分子可呈其自然出现的形式或其经化学衍生化以赋予有益的药物动力学特性。

[0080] 在本发明的另一实施方案中,提供了治疗由丙型肝炎病毒 (HCV) 介导的疾病的方法,其包括向有此需要的哺乳动物给予治疗有效量的式 I 化合物,其中 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 和 R^6 如上文所定义,或其可药用盐;和干扰素或化学衍生化的干扰素。

[0081] 在本发明的另一实施方案中,提供了治疗由丙型肝炎病毒 (HCV) 介导的疾病的方法,其包括向有此需要的哺乳动物给予治疗有效量的式 I 化合物,其中 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 如上文所定义,或者其可药用盐;和至少一种其它抗病毒剂。

[0082] 在本发明的另一实施方案中,提供了治疗由丙型肝炎病毒 (HCV) 介导的疾病的方法,其包括向有此需要的哺乳动物给予治疗有效量的式 I 化合物,其中 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 如上文所定义,或者其可药用盐;以及至少一种其它 HCV 蛋白酶抑制剂、另一核苷类 HCV 聚合酶抑制剂、非核苷类 HCV 聚合酶抑制剂、HCV 解旋酶抑制剂、HCV 引发酶抑制剂或 HCV 融合抑制剂。

[0083] 在本发明的一个实施方案中,提供了药物组合物,其包含与至少一种可药用载体、稀释剂或赋形剂混合的治疗有效量的式 I 化合物或其可药用盐,其中 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 和 R^6 如上文所定义。

[0084] 在本发明的另一实施方案中,提供了药物组合物,其包含 500-1500mg 压制片剂,所述压制片剂含有 35-75wt% 式 I 化合物或其可药用盐,其中 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 和 R^6 如上文所定义;且其余包括至少一种可药用载体、稀释剂或赋形剂。

[0085] 在本发明的另一实施方案中,提供了药物组合物,其包含 500-1500mg 压制片剂,所述压制片剂含有 40-60wt% 式 I 化合物或可药用盐的,其中 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 和 R^6 如上文所定义;且其余包括至少一种可药用载体、稀释剂或赋形剂。

[0086] 如本文所使用的短语“一种”或“一个”实体指一或多种(个)该实体;例如,化合物是指一或多种化合物或至少一种化合物。同样,术语“一种”、“一或多种”和“至少一种”在本文中可互换使用。

[0087] 短语“如上文所定义”是指如式 I 的定义中所提供的各基团的第一定义。

[0088] 如本文所使用的术语“任选”或“任选地”意指所描述的事件或情况可发生或可不发生,且该描述包括该事件或情况发生的情形及不发生的情形。例如,“任选取代的苯基”意谓苯基可被取代或可不被取代,且该描述包括未被取代的苯基及其中有取代的苯基。

[0089] 本发明化合物可具有位于羧酸酯、酰胺或碳酸酯部分的侧链上的不对称中心,其在连接于核苷时产生非对映体。无论呈混合物形式或呈纯或基本上纯的形式,本发明化合

物的侧链的所有立体异构体都是涉及的。本发明化合物的定义包括所有分离的光学异构体对映异构体及其混合物,包括外消旋形式。纯光学异构体可通过自 α -D-核糖立体特异性合成来制备,或者外消旋形式可通过物理方法(例如分步结晶法、非对映体衍生物的分离或结晶或通过手性柱层析法来分离)来拆分。个别光学异构体可通过常规方法(例如与光学活性酸形成盐,随后结晶)由外消旋体获得。

[0090] 如本文所使用的术语“烷基”表示含有 1 至 18 个碳原子的非支链或支链烃基。术语“低级烷基”表示含有 1 至 6 个碳原子的非支链或支链烃基。代表性低级烷基包括甲基、乙基、丙基、异丙基、正丁基、异丁基、叔丁基或戊基。

[0091] 当术语“烷基”用作另一术语之后的后缀时,如在“苯基烷基”或“羟基烷基”中,此意指被 1 至 2 个选自其它特定命名的基团的取代基取代的上文所定义的烷基。因此,例如,“苯基烷基”是指具有 1 至 2 个苯基取代基的烷基,且因此包括苄基、苯基乙基和联苯基。“烷基氨基烷基”为具有 1 至 2 个烷基氨基取代基的烷基。

[0092] 本文所用术语“卤代烷基”是指上文定义的非支链或支链烷基,其中 1、2、3 或多个氢原子被卤素取代。实例是 1-氟甲基、1-氯甲基、1-溴甲基、1-碘甲基、三氟甲基、三氯甲基、三溴甲基、三碘甲基、1-氟乙基、1-氯乙基、1-溴乙基、1-碘乙基、2-氟乙基、2-氯乙基、2-溴乙基、2-碘乙基、2,2-二氯乙基、3-溴丙基或 2,2,2-三氟乙基。

[0093] 本文所用术语“环烷基”是指含有 3-8 个碳原子的饱和碳环,即环丙基、环丁基、环戊基、环己基、环庚基或环辛基。

[0094] 本文所用术语“环烷基烷基”是指基团 $R' - R'' -$, 其中 R' 是本文定义的环境烷基,并且 R'' 是本文定义的亚烷基,应了解环烷基烷基部分的连接点将在亚烷基上。环烷基烷基的实例包括,但不限于,环丙基甲基、环己基甲基、环戊基乙基。 C_{3-7} 环烷基- C_{1-3} 烷基是指基团 $R' - R''$, 其中 R' 是 C_{3-7} 环烷基,且 R'' 是本文定义的 C_{1-3} 亚烷基。

[0095] 除非另有说明,否则如本文所使用的术语“亚烷基”是指具有 1-8 个碳原子的二价饱和直链烃基或者具有 3-8 个碳原子的支链饱和和二价烃基。亚烷基的实例包括,但不限于,亚甲基、亚乙基、亚丙基、2-甲基-亚丙基、亚丁基、2-乙基亚丁基。

[0096] 本文所用术语“烯基”是指未取代的[或取代的]烃链基,其具有 2-18 个碳原子、优选 2-4 个碳原子,并且具有一个或两个烯属双键、优选一个烯属双键。实例是乙烯基、1-丙烯基、2-丙烯基(烯丙基)或 2-丁烯基(巴豆基)。

[0097] 本文所用术语“炔基”是指具有 2 至 18 个碳原子[优选 2 至 4 个碳原子],且具有一个或(若可能)两个三键[优选一个三键]的未取代的烃链基。实例是乙炔基、1-丙炔基、2-丙炔基、1-丁炔基、2-丁炔基或 3-丁炔基。

[0098] 本文所用术语“烷氧基”是指未取代的非支链或支链烷基氧基,其中该“烷基”部分如上文所定义,例如甲氧基、乙氧基、正丙基氧基、异丙基氧基、正丁基氧基、异丁基氧基、叔丁基氧基、戊基氧基、己基氧基、庚基氧基,包括其异构体。“低级烷氧基”表示具有如上文所定义的“低级烷基”的烷氧基。

[0099] 本文所用术语“烷基硫基”或“硫代烷基”是指非支链或支链(烷基)S-基团,其中“烷基”部分如上文所定义。实例是甲硫基、乙硫基、正丙基硫基、异丙基硫基、正丁基硫基、异丁基硫基或叔丁基硫基。

[0100] 本文所用术语“烷基亚磺酰基”和“芳基亚磺酰基”是指式 $-S(=O)R$ 的基团,其

中 R 分别是烷基或芳基,并且烷基和芳基如本文所定义。

[0101] 本文所用术语“烷基磺酰基”和“芳基磺酰基”表示式 $-S(=O)_2R$ 的基团,其中 R 分别是本文定义的烷基或芳基,并且烷基和芳基如本文所定义。

[0102] 本文所用术语“芳基”表示含有碳原子和氢原子的任选取代的单环或多环芳族基团。适宜的芳基的实例包括(但不限于)苯基及萘基(例如 1-萘基或 2-萘基)。芳基的合适的取代基选自烷基、烯基、炔基、芳氧基、环烷基、酰基、酰基氨基、烷氧基、氨基、烷基氨基、二烷基氨基、卤素、卤代烷基、羟基、硝基和氰基。

[0103] 本文所用术语“酰基”(“烷基羰基”)表示式 $C(=O)R$ 的基团,其中 R 是氢、含有 1-7 个碳原子的非支链或支链烷基或苯基。

[0104] 本文所用术语“烷氧基羰基”和“芳基氧基羰基”表示式 $-C(=O)OR$ 的基团,其中 R 分别是烷基或芳基,并且烷基和芳基如本文所定义。

[0105] 术语卤素表示氟、氯、溴或碘,优选氟、氯、溴。

[0106] 本文所用术语“酰化剂”是指酸酐、酰基卤或羧酸的其它活化衍生物。本文所用术语“酸酐”是指通式结构 $RC(O)-O-C(O)R$ 的化合物,其中 R 如上述段落中所定义。本文所用术语“酰基卤”是指其中 X 是溴或氯的基团 $RC(O)X$ 。本文所用术语化合物的“活化衍生物”是指使化合物在所需化学反应中活化的初始化合物的过渡反应性形式,其中该初始化合物仅具有中等反应性 or 无反应性。通过形成衍生物或分子中具有比初始化合物更高的自由能含量的化学基团来实现活化,其使得活化形式更易于与另一试剂反应。在本发明情况下,羧基的活化尤其重要。本文所使用的术语酰化剂另外包括产生碳酸酯 $OC(=O)OR^4$ 的试剂,其中 R^4 如上文所定义。

[0107] 本文所使用的术语“保护基”意指 (a) 保护反应性基团不参与不需要的化学反应;及 (b) 不再需要反应性基团的保护后很容易除去的化学基团。例如,三烷基甲硅烷基为伯羟基官能团的保护基,而缩丙酮化物 (acetone) 为邻二醇的保护基。

[0108] 在整个本申请中给出的化合物的图示说明中,加粗的斜楔形键表示不对称碳所属的环平面上方的取代基(还以 β 表示),且虚线的楔形键表示不对称碳所属的环平面下方的取代基(还以 α 表示)。

[0109] 本文所使用术语“组合”或“组合疗法”是指在同一时间或在不同时间同时或相继给予疗程中的多种药物。

[0110] 本文所用术语“化学衍生化的干扰素”是指共价连接于改变干扰素的物理和/或药物动力学特性的聚合物上的干扰素分子。所述聚合物的非限制性实例包括聚亚烷基氧化物均聚物,例如聚乙二醇 (PEG) 或聚丙二醇 (PPG),聚氧乙烯化多元醇 (polyoxyethylenated polyol)、其共聚物及其嵌段共聚物,条件是保持嵌段共聚物的水溶性。本领域的技术人员将明白众多连接聚合物与干扰素的方法(例如参见 A. Kozlowski 和 J. M. Harris J. Control. Release 2001 72(1-3):217-24)。涵盖于本专利中的化学衍生化的 IFN α 的非限制性实例包括聚乙二醇化干扰素- α -2a (PEGASYS®) 及聚乙二醇化干扰素- α -2b (PEGINTRON®)。

[0111] 式 I 化合物表现出互变异构性。互变异构化合物可以两种或两种以上相互转化的物质形式存在。质子移动互变异构体是由共价键联的氢原子在两个原子之间的迁移产生的。互变异构体通常存在平衡,并且分离个别互变异构体的尝试通常产生化学

及物理特性与化合物之混合物相一致的混合物。平衡的位置视分子中的化学特征而定。例如,在许多脂族醛及酮(诸如乙醛)中,酮式为主,而在酚中,烯醇式为主。常见质子移动互变异构体包括酮/烯醇($-C(=O)-CH \rightleftharpoons C(-OH)=CH-$),酰胺/亚胺酸($-C(=O)-NH \rightleftharpoons C(-OH)=N-$)及脒($-C(=NR)-NH \rightleftharpoons C(-NHR)=N-$)互变异构体。后两者尤其在杂芳基及杂环中常见,且本发明包括化合物的所有互变异构形式。

[0112] 常用缩写包括:乙酰基(Ac),偶氮-双-异丁腈(AIBN),大气(Atm),叔丁氧基羰基(Boc),焦碳酸二-叔丁酯或叔丁氧基羰基酐(BOC_2O),苄基(Bn),丁基(Bu),苄氧基羰基(CBZ或Z),羰基二咪唑(CDI),1,4-二氮杂双环[2.2.2]辛烷(DABCO),1,5-二氮杂双环[4.3.0]壬-5-烯(DBN),1,8-二氮杂双环[5.4.0]十一碳-7-烯(DBU),N,N'-二环己基碳二亚胺(DCC),1,2-二氯乙烷(DCE),二氯甲烷(DCM),偶氮二甲酸二乙酯(DEAD),偶氮二甲酸二异丙酯(DIAD),氢化二异丁基铝(DIBAL或DIBAL-H),二异丙基乙胺(DIPEA),N,N-二甲基乙酰胺(DMA),4-N,N-二甲基氨基吡啶(DMAP),N,N-二甲基甲酰胺(DMF),二甲亚砜(DMSO),1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳化二亚胺盐酸盐(EDCI),乙基(Et),乙酸乙酯(EtOAc),乙醇(EtOH),2-乙氧基-2H-喹啉-1-甲酸乙酯(EEDQ),乙醚(Et_2O),六氟磷酸0-(7-氮杂苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脒鎓(HATU),乙酸(HOAc),1-N-羟基苯并三唑(HOBT),高压液相色谱法(HPLC),六甲基二硅氮烷锂(LiHMDS),甲醇(MeOH),熔点(mp), $MeSO_2-$ (甲磺酰基或Ms),甲基(Me),乙腈(MeCN),间氯过苯甲酸(MCPBA),质谱(ms),甲基叔丁醚(MTBE),N-溴琥珀酰亚胺(NBS),N-羧基酐(NCA),N-氯琥珀酰亚胺(NCS),N-甲基吗啉(NMM),N-甲基吡咯烷酮(NMP),氯铬酸吡啶鎓(PCC),重铬酸吡啶鎓(PDC),苯基(Ph),丙基(Pr),异丙基(i-Pr),磅/平方英寸(psi),吡啶(pyr),室温(rt或RT),叔丁基二甲基甲硅烷基或t-BuMe₂Si(TBDMS),三乙胺(TEA或Et₃N),2,2,6,6-四甲基哌啶-1-氧基(TEMPO),三氟甲磺酸酯或CF₃SO₂-(Tf),三氟乙酸(TFA),薄层色谱法(TLC),四氢呋喃(THF),三甲基甲硅烷基或Me₃Si(TMS),对甲苯磺酸单水合物(TsOH或pTsOH),4-Me-C₆H₄SO₂-或甲苯磺酰基(Ts),N-脒烷-N-羧基酐(UNCA)。当用于烷基部分时,包括前缀正(n)、异(i-),仲(sec-),叔(tert-)及新(neo)的常规命名法具有其通常意义(J. Rigaudy和D. P. Klesney, Nomenclature in Organic Chemistry, IUPAC 1979 Pergamon Press, Oxford.)。

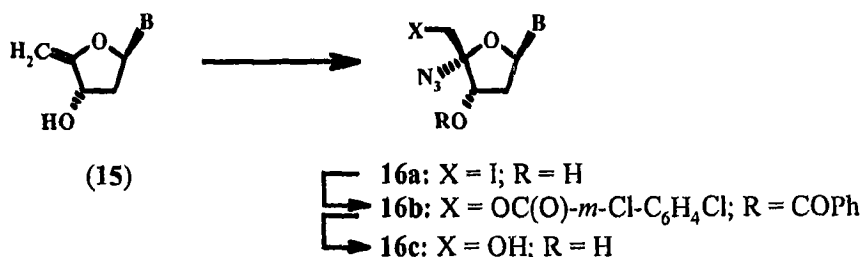
[0113] 本发明化合物可由下文所示及描述的示例性合成反应方案中所述的多种方法制得。用于制备这些化合物的原料及试剂通常可购自供货商,诸如Aldrich Chemical Co.,或通过本领域技术人员已知的方法根据以下参考文献中所述的方法来制备,诸如:Fieser and Fieser's Reagents for Organic Synthesis; Wiley & Sons: New York, 第1-21卷; R. C. LaRock, Comprehensive Organic Transformations, 第2版 Wiley-VCH, New York 1999; Comprehensive Organic Synthesis, B. Trost和I. Fleming(编辑)第1-9卷 Pergamon, Oxford, 1991; Comprehensive Heterocyclic Chemistry, A. R. Katritzky和C. W. Rees(编辑)Pergamon, Oxford 1984, 第1-9卷; Comprehensive Heterocyclic Chemistry II, A. R. Katritzky和C. W. Rees(编辑)Pergamon, Oxford 1996, 第1-11卷;及Organic Reactions, Wiley & Sons: New York, 1991, 第1-40卷。以下合成反应方案仅为示例性的可通过合成本发明化合物的某些方法,且可对这些合成反应方案进行各种修饰且可将这些修饰建议给参照本申请中所含公开内容的本领域技术人员。

[0114] 如果需要,则可使用常规技术(包括但不限于过滤、蒸馏、结晶、色谱法及其类似技术)分离及纯化合成反应方案的原料及中间体。所述物质可使用包括物理常数及光谱数据的常规方法来表征。

[0115] 除非相反说明,否则本文所述反应优选在惰性气氛、大气压下,于约 -78°C 至约 150°C 、更优选约 0°C 至约 125°C 的反应温度范围内,且最优选且适宜地在约室温(或环境)温度,例如约 20°C 下进行。

[0116] 已研究核苷的 2' 和 3' - 位的化学修饰,而 4' - 位的修饰已不太流行,最可能归因于与其合成有关的额外合成挑战。Maag 等人(4' - 叠氮基和 4' - 甲氧基核苷的抗 HIV 活性, *J. Med. Chem.* 1992 35 :1440-1451) 公开了 4' - 叠氮基 -2- 脱氧核糖核苷及 4- 叠氮基核苷的合成。C. O' Yang, 等人 (*Tetrahedron Lett.* 1992 33(1) :37-40 及 33(1) :41-44) 公开了合成 4' - 氰基、4' - 羟基甲基 - 及 4' - 甲酰基核苷化合物取代的核苷。这些化合物经评估为抗 HIV 化合物。Maag 等人(上述)教导可通过将叠氮化碘加成到 5- 亚甲基 - 四氢 - 呋喃 -2- 基核苷 15 中来制备 4' - 叠氮基核苷 16c, 其中 B 为胸腺嘧啶、尿嘧啶、腺嘌呤或鸟嘌呤核苷。在 2005 年 2 月 17 日公开的美国专利公开案第 20050038240 号中 T. J. Connolly 等人公开了制备 4' - 叠氮基核苷的改善方法。

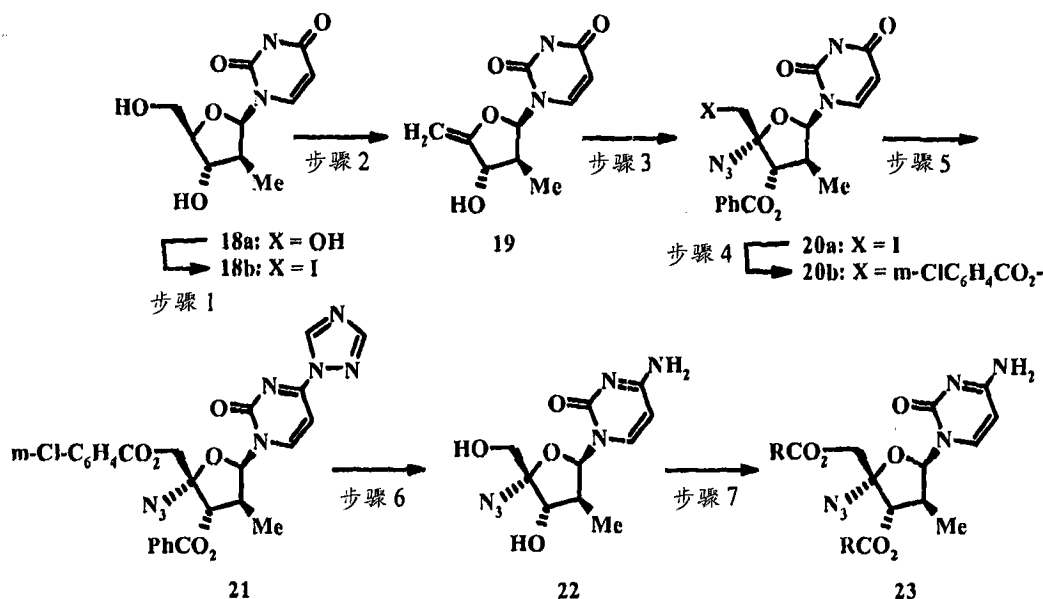
[0117]



[0118] 在 WO 02/100415 中, R. Devos 等人公开了抑制 HCV NS5B 病毒 DNA 聚合酶的新的 4' - 取代的核苷衍生物。叠氮化碘的加成最有效地在尿嘧啶核苷 15 (B = 尿嘧啶) 上进行, 尿嘧啶核苷 15 可使用由 A. D. Borthwick 等人 (*J. Med. Chem.* 1990 33(1) :179; 还参见 K. J. Divakar and C. B. Reese *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* 1982 1171-1176) 所述的方法转化成相应的胞嘧啶核苷。

[0119] 反应方案 A

[0120]



[0121] 使用 Maag 等人的方法 (参见上文) (反应方案 A), 由 1-(4-羟基-5-羟基甲基-3-甲基-四氢-呋喃-2-基)-1H-嘧啶-2,4-二酮 (18a) 制备 4-氨基-1-(5-叠氮基-4-羟基-5-羟基甲基-3-甲基-四氢-呋喃-2-基)-1H-嘧啶-2-酮 (22) (D. O. Cicero 等人, “具有潜在抗病毒活性的 2' -脱氧和 2' , 3' -二脱氧核苷的新类似物的立体选择性合成”, Bioorg. Med. Chem. Lett. 19944(7) :861-6 ;A. Iribarren, 1993 年 6 月 16 日公开的题为“用于科学研究、治疗和诊断的新的 (2' R)-和 (2' S)-2' -脱氧-2' -C-挺急反义寡核苷酸的制备”的 EP547008A1)。在 HCV 聚合酶活性的基于细胞的复制子测定中, 4-氨基-1-(5-叠氮基-4-羟基-5-羟基甲基-3-甲基-四氢-呋喃-2-基)-1H-嘧啶-2-酮 (22) 表现出良好活性 (表 I)。此外, 该化合物在该测定中表现出低水平的细胞毒性。

[0122]

表 I		
化合物	最大抑制 HCV 聚合酶% (100 μM)	最大细胞毒性% (100 μM)
22	98.58	9.48

[0123] 核苷衍生物通常是有效的抗病毒剂 (例如 HIV、HCV、单纯疱疹、CMV) 及抗癌化学治疗剂。遗憾地, 其实际效用常受限于两个因素。第一, 不良药物动力学特性往往限制核苷经消化吸收及核苷衍生物的细胞内浓度, 第二, 次最佳物理特性限制可用于增强活性成份递送的剂型选择。

[0124] Albert 引入术语前药以描述缺乏固有生物活性但能够代谢转化成活性药物的化合物 (A. Albert, Selective Toxicity, Chapman and Hall, London, 1951)。最近前药已有综述 (P. Ettmayer 等人, J. Med. Chem. 200447(10) :2393-2404 ;K. Beaumont 等人, Curr. Drug Metab. 2003 4 :461-485 ;H. Bundgaard, Design of Prodrugs :Bioreversible derivatives for various functional groups and chemical entities in Design of Prodrugs,

H. Bundgaard(ed)Elsevier Science Publishers, Amsterdam 1985 ;G. M. Pauletti 等人 Adv. Drug Deliv. Rev. 1997 27 :235-256 ;R. J. Jones 和 N. Bischofberger, Antiviral Res. 1995 27, 1-15 及 C. R. Wagner 等人, Med. Res. Rev. 2000 20 :417-45)。代谢转化可由特异性酶(常为水解酶)来催化,而活性化合物还可由非特异性化学方法再生。

[0125] 可药用前药是指在宿主中代谢(例如水解或氧化)形成本发明化合物的化合物。生物转化应避免形成具有毒理学倾向的片段。前药的典型实例包括具有连接于活性化合物的官能部分的生物不稳定性保护基的化合物。在设计正核苷酸时使用糖部分上的羟基的烷基化、酰基化或其它亲脂性修饰。这些正核苷酸可活体内水解或去烷基化以生成活性化合物。

[0126] 限制口服生物利用率的要素常为胃肠道吸收及消化道及肝脏的首次通过排泄。经由胃肠道的细胞间吸收最佳需要大于 0 的 $D_{(7,4)}$ 。然而,分配系数的最佳化并不确保成功。前药可能必须避免肠上皮细胞中的活性流出转运体。肠上皮细胞中的细胞内代谢可导致代谢物经流出泵被动转运或活性转运返回消化道腔内。前药在到达靶细胞或受体之前还必须抵抗血液中非所需的生物转化。

[0127] 虽然有时可基于分子中所存在的化学官能团合理地设计推定的前药,但活性化合物的化学修饰产生可表现出在母体化合物中不存在的非所需物理、化学及生物特性的完全新颖的分子实体。若多个途径产生多种代谢物,则代谢物的识别的管理需要可引起挑战。因此,前药的识别仍为不确定且具有挑战性的实践。而且,对于可能的前药的药物动力学特性的评估系具有挑战性且昂贵的努力。得自动物模型的药物动力学可难于外推至人类。

[0128] 在于 2005 年 1 月 25 日授权的美国专利第 6,846,810 号中,J. A. Martin 等人表现出已发现酰化的 4'-叠氮基核苷为有效的前药。22 的二酰基衍生物 23 可通过母体核苷 22 的酰化反应来制备。

[0129] 本发明化合物适宜在含水有机溶剂中通过 22 的酰化反应来进一步制备。溶剂可为均相水溶液或两相溶液。通过添加碱来中和酰化反应所产生的酸使含水有机溶剂的 pH 值维持在 7.5 以上。碱可为碱金属氢氧化物或叔胺。该反应可在本领域已知的是酰化反应催化剂的 DMAP 的存在下进行。本方法的一个优势在于所需产物可在杂环碱的酰化反应不存在的情况下获得。

[0130] 或者,该酰化反应适宜在 -20 至 200℃、但优选在 -10 至 160℃ 的温度下,在诸如 DCM、氯仿、四氯化碳、醚、THF、二噁烷、苯、甲苯、MeCN、DMF、氢氧化钠溶液或环丁酮的溶剂中,任选在无机碱或有机碱存在下与相应酰基卤或酐一起进行。该酰化反应还可在 SchottenBaumann 条件下在相转移催化剂及 DMAP 存在下在双相有机-水性介质中进行。

[0131] 可实现羟基的选择性酰化。或者,N, O, O-三酰基核苷的 N-酰基可用溴化锌选择性裂解以生成保护的二酰基化合物(R. Kierzek 等人 Tetrahedron Lett. 1981 22(38) : 3762-64)。

[0132] 可通过酶催化的酰化反应或去酰化反应便利地实现碳水化合物基团上的特定羟基的选择性酰化。酶催化提供有机转化的温和选择条件。S. M. Roberts 已综述制备性生物转化(J. Chem. Soc. Perkin 1, 2001, 1475 ;2000 611 ;1999, 1 及 1998 157)。M. Mahmoudian 等人(Biotechnol. Appl. Biochem. 1999 29 :229-233)报导用 Novozyme 435,即一种南极假丝酵母(Candida antarctica)脂肪酶的固定化制剂,选择性酰化 2-氨基-9-β-D-阿拉

伯呋喃糖基-6-甲氧基-9H-嘌呤的5'-位。所报导的选择性酰化5'-羟基的其它酶包括：地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*) 蛋白酶、Lipozyme IM (米黑毛霉 (*Mucor miehei*) 脂肪酶)、CLEC-BL (地衣芽孢杆菌蛋白酶)、savinase (芽孢杆菌属 (*Bacillus* sp.) 蛋白酶)、Novozyme-243 (地衣芽孢杆菌蛋白酶)、产碱杆菌属 (*Alcaligenes* sp.) 脂肪酶及 lipolase (Novo)。

[0133] 发现Lipolase®酶制剂 (来自嗜热真菌 (*Thermomyces lanuginosus*) 的脂肪酶, Sigma 目录号 L 0777) 选择性水解三酰基衍生物的5'-酰基, 得到2', 3'-二酰基化合物。在 WO 2004043894 中, G. G. Heraldsson 等人公开了嗜热真菌脂肪酶用于船舶用油的酯化的用途。N. Weber 等人 (*Eur. J. of Lipid Sci. and Technol.* 2003 105(10) :624-626) 公开了嗜热真菌催化的油酸甲酯的酯基转移反应。V. Bodai 等人 (*Adv. Synth. Cat.* 2003 345(6 及 7) :811-818) 描述可用于选择性生物转化的来自嗜热丝状真菌 (*thermophilic filamentous fungi*) 的新水解酶。

[0134] 位置选择性酶促酯水解的其它报导包括：R. Hanson 等人, *Bioorg. and Med. Chem.* 2000, 2681-2687 (经由位置选择性酰化和水解的 lobucavir 前药的合成)；R. Pfau 等人, *Syn Lett* 1999, 1817-1819 (碳水化合物酯的选择性水解)；A. Bianco 等人, *J. of Mol. Cat. B:Enzymatic* 1997 209-212 (用于合成唾液酸衍生物的位置选择性酰化和水解)；Y. Ota 等人, *Bioscience, Biotechnology, Biochemistry* (1997), 166-167 (1, 2, 3-三己酰基甘油的位置选择性酯水解)；U. T. Bornscheuer 等人, *Enzyme Microbial Technol.* 1995, 578-86 (脂肪酶催化的单酰基甘油的合成；综述)；C. T. Goodhue 等人 WO 9403625 (用于拆分碳水化合物单酯的位置选择性方法)；N. W. Boaz, WO 9115470 (通过选择性酶水解来分离醇-酯混合物)；Y. S. Sanghvi 等人 US2002142307 (3', 5'-二-O-块茎糖酰基核苷的位置选择性水解)；J. Garcia 等人 *J. Org. Chem.* 2002, 4513-4519 (3', 5'-二-O-块茎糖酰基核苷的位置选择性水解)；O. Kirk 等人 *Biocat and Biotransformation* (1995) 91-7 (脂肪酶催化的葡萄糖衍生物的位置选择性酰化和去酰化)。

[0135] 本领域技术人员将认识到选择性酯化反应还可通过标准化学方法来实现。已描述5'-羟基的选择性保护 (其允许2'-羟基的直接酯化) 或者第二保护基的并入 (其允许伯醇的去保护及选择性酰化)。

[0136] 本发明化合物可配制成多种口服剂型及载体。口服剂型可呈片剂、包衣片剂、硬及软明胶胶囊、溶液、乳液、糖浆或悬浮液形式。在其它给药途径中, 当通过栓剂给药形式给予时, 本发明化合物为有效的。给药的最便利方式通常为使用便利的每日给药方案来口服, 该方案可根据疾病的严重程度及患者对抗病毒药物的反应来调节。

[0137] 本发明化合物以及其可药用盐, 连同一或多种常规赋形剂、载体或稀释剂一起置于药物组合物形式及单位剂型中。这些药物组合物及单位剂型可包含具有或不具有额外活性化合物的常规比例的常规组分, 且单位剂型可含有任何与欲使用的计划日剂量范围相称的合适有效量的活性组分。该药物组合物可以诸如片剂或填充胶囊的固体、半固体、散剂、持续释放制剂或诸如悬浮液、乳液的液体或用于口服的填充胶囊；或呈用于直肠或阴道给药的栓剂形式使用。典型制剂将含有约5%至约95%活性化合物 (w/w)。术语“制剂”或“剂型”意欲包括活性化合物的固体及液体制剂, 并且本领域技术人员将了解根据所需剂量及药物动力学参数而定活性成份可存在于不同制剂中。

[0138] 本文所用术语“赋形剂”是指用于制备药物组合物且通常安全无毒性且既非生物学上又非另外非所需的化合物,且包括兽医学用途以及人类医药用途均可接受的赋形剂。本发明化合物可单独给药,但通常与关于预期的给药途径及标准医药实践所选择的一种或多种合适的医药学上的赋形剂、稀释剂或载体混合给予。

[0139] 活性组分的“可药用盐”形式还可最初赋予活性成份在非盐形式中缺乏的所需药物动力学特性,且甚至可积极影响活性成份关于其在体内治疗活性的药效学。本文所用短语化合物的“可药用盐”意谓可药用且具有所需母体化合物药理学活性的盐。这样的盐包括:(1)与诸如盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、磷酸及其类似酸的无机酸形成的酸加成盐;或与诸如乙醇酸、丙酮酸、乳酸、丙二酸、苹果酸、顺丁烯二酸、反丁烯二酸、酒石酸、柠檬酸、3-(4-羟基苯甲酰基)苯甲酸、肉桂酸、扁桃酸、甲磺酸、乙磺酸、1,2-乙烷-二磺酸、2-羟基乙磺酸、苯磺酸、4-氯苯磺酸、2-萘磺酸、4-甲苯磺酸、樟脑磺酸、月桂基硫酸、葡萄糖酸、谷氨酸、水杨酸、粘康酸及其类似酸的有机酸形成的酸加成盐。应当理解所有可药用盐包括如本文所定义的相同酸加成盐的溶剂加成形式(溶剂合物)或结晶形式(多晶型)。

[0140] 固体形式制剂包括粉剂、片剂、丸剂、胶囊、栓剂及可分散颗粒。固体载体可以是一种或多种,还可用作稀释剂、调味剂、增溶剂、润滑剂、悬浮剂、黏合剂、防腐剂、片剂崩解剂或囊封材料的物质。在粉剂形式中,载体通常为与细粉状活性组份形成的混合物的细粉状固体。在片剂形式中,活性组份通常与呈合适比例的具有必要粘合能力的载体混合且压缩成所需形状及尺寸。合适的载体包括(但不限于)碳酸镁、硬脂酸镁、滑石粉、糖、乳糖、果胶、糊精、淀粉、明胶、黄蓍、甲基纤维素、羧甲基纤维素钠、低熔点蜡、可可脂及其类似物。固体形式制剂除活性组份外还可含有着色剂、调味剂、稳定剂、缓冲剂、人造及天然甜味剂、分散剂、增稠剂、增溶剂及其类似物。

[0141] 还适用于口服的液体制剂包括包含乳液、糖浆、酏剂及水性悬浮液的液体制剂。其包括在即将使用前欲转化成液体形式制剂的固体形式制剂。乳液可在例如水性丙二醇溶液的溶液中制备,或可含有诸如卵磷脂、山梨糖醇单油酸酯或阿拉伯胶的乳化剂。水性悬浮液可通过用诸如天然或合成胶的粘性物质、树脂、甲基纤维素、羧甲基纤维素钠及其它众所周知的悬浮剂将细粉状活性组份分散于水中而制备。

[0142] 本发明化合物可经配制以栓剂形式来给药。首先将诸如脂肪酸甘油酯或可可脂的混合物的低熔点蜡熔化且(例如)通过搅拌将活性组份均匀分散。接着将熔化的均相混合物倒入适宜尺寸的模具中,使其冷却且固化。

[0143] 本发明化合物可经配制用于经阴道给药。在该项技术中已知除活性成份以外,诸如子宫托、止血棉球、乳霜、凝胶、糊状物、发泡体或喷雾剂的载体也是适合的。

[0144] 合适的制剂连同医药载体、稀释剂及赋形剂于以下文献中描述:Remington:The Science and Practice of Pharmacy 1995,E.W.Martin 编辑,Mack Publishing Company,第19版,Pennsylvania。熟练配制技术人员可在本说明书的教导中修改制剂以提供多种用于给药的特定途径而不会使本发明组合物不稳定或危害其治疗活性的制剂。

[0145] 本发明化合物的修改使得其在水中或其它载体中更可溶,所述修改可容易地通过(例如)少许改变来实现(例如盐制剂),其正好在一般技术范畴内。还正好在一般技术范畴内改变特定化合物的给药途径及给药方案以便控制本发明化合物的药物动力学以最大惠及患者。

[0146] 本文所使用术语“治疗有效量”意谓减少个体中的疾病症状所需的量。剂量可根据个别需要在各特定情况下调节。该剂量可视诸如待治疗疾病的严重性、患者年龄及一般健康状况、患者治疗所用的其它药物、给药途径及形式及所涉及之开业医生的偏好及经验的多种因素而在较大范围内变化。对于口服，在单一疗法和 / 或组合疗法中日剂量介于每日约 0.1 与约 10g 之间应为适当的。优选日剂量介于每日约 0.5 与约 7.5g 之间，更优选介于每日 1.5 与约 6.0g 之间。一般而言，治疗以大的起始“冲击剂量”开始以快速减少或消灭病毒，随后减少剂量至足以预防感染复发的程度。对于给定疾病及患者，治疗本文所述疾病的本领域专业人员将能够在无不当实验的情况下依靠个人知识、经验及本申请案的公开了内容来确定本发明化合物的治疗有效量。

[0147] 可通过肝功能测试确定治疗功效，肝功能包括（但不限于）诸如血清蛋白（例如白蛋白、凝血因子、碱性磷酸酶、氨基转移酶（例如丙氨酸转氨酶、天冬氨酸转氨酶），5'-核苷酶、 γ -谷氨酰胺酰基转肽酶等）的蛋白含量、胆红素的合成、胆固醇的合成及胆酸的合成；肝代谢功能包括（但不限于）碳水化合物代谢、氨基酸及氮代谢。或者，治疗效果可通过测量 HCV-RNA 来监控。这些测试结果使得剂量最佳化。

[0148] 在本发明之实施例中，活性化合物或盐可与另一诸如利巴韦林的抗病毒剂、另一核苷类 HCV 聚合酶抑制剂、HCV 非核苷聚合酶抑制剂、HCV 蛋白酶抑制剂、HCV 解旋酶抑制剂或 HCV 融合抑制剂组合给药。当活性化合物或其衍生物或盐与另一抗病毒剂组合给药时，活性可超过母体化合物。当治疗为组合疗法时，该给药可关于核苷衍生物同时或相继进行。因此本文所用“同时给药”包括在相同时间或在不同时间给予所述药物。在相同时间给予两种或两种以上药物可通过含有两种或两种以上活性成份的单一制剂或通过大体上同时给予两种或两种以上具有单一活性剂的剂型来实现。

[0149] 应当理解本文提及的治疗扩展至预防以及治疗现有病况。此外，如本文所使用术语 HCV 感染的“治疗”还包括治疗或预防与 HCV 感染相关或由 HCV 感染介导的疾病或病况或其临床症状。

[0150] 实施例 1

[0151] 步骤 1- 将 18a (2.17g, 8.96mmol, 1 当量)、咪唑 (732mg, 10.7mmol, 1.2 当量) 和 Ph_3P (2.82g, 10.7mmol, 1.2 当量) 在无水 THF (30mL) 中的溶液在冰水浴上冷却，并用 10 分钟滴加碘 (2.50g, 9.85mmol, 1.1 当量) 在无水 THF (10mL) 中的溶液。在 0-5°C 下再搅拌反应混合物 10 分钟。移去冰水浴，并且在 RT 下搅拌反应混合物 70 小时。用 DCM (200mL) 稀释反应混合物，并且用 0.5M $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 在饱和 NaHCO_3 水溶液 (150mL) 中的溶液洗涤。用 DCM (4×50mL) 洗涤水层。将合并的有机萃取液干燥 (Na_2SO_4)，过滤且浓缩。将残余物通过 SiO_2 色谱法纯化，用 MeOH/DCM 逐步梯度洗脱 (1-5% v/v MeOH)，获得 1.75g (55%) 18b： ^1H -NMR 数据 (CDCl_3 , 25 °C) : δ 8.22 (br s, 1H), 7.59 (d, 1H), 6.19 (d, 1H), 5.75 (dd, 1H), 3.79 (m, 1H), 3.65 (m, 1H), 3.57 (dd, 1H), 3.47 (dd, 1H), 2.69 (m, 1H), 2.13 (d, 1H), 1.00 (d, 3H)。

[0152] 步骤 2- 将 18b (1.84g, 5.22mmol) 和 0.4M 甲醇钠在 MeOH (81mL) 中的溶液于 60°C 搅拌 5 小时，然后在冰水浴上冷却。分批加入吡啶形式 DOWEX H^+ (通过用吡啶 (10mL/g 树脂) 处理 DOWEX H^+ ，过滤且在使用前用 MeOH 洗涤来制备) 直至溶液 pH 为中性 (总共 5-6g)。移去冰水浴且在 RT 下搅拌混合物 5 分钟。通过过滤除去树脂且用 MeOH (100mL) 洗涤。将残余物在 6% EtOH/DCM 中浆液化，并且施加于 SiO_2 柱，且用 EtOH/DCM 梯度洗脱 (6-7% v/

v EtOH), 获得 0.942g (80%) 19, 其纯度足以用于下一步骤中。

[0153] 步骤 3- 将氯化苄基三乙基铵 (1.91g, 8.4mmol, 2 当量) 和叠氮化钠 (546mg, 8.4mmol, 2 当量) 悬浮于无水 MeCN (32mL) 中且超声处理数分钟。将所得精细悬浮液在 RT 下搅拌 3 小时, 然后在 N₂ 气氛下过滤到化合物 19 (942mg, 4.2mmol, 1 当量) 的无水 THF 溶液 (30mL) 中。加入 NMM (140 μ l, 0.106mmol, 0.3 当量) 且将所得溶液在冰水浴上冷却, 并且用 1 小时滴加碘 (1.81g, 7.14mmol, 1.7 当量) 在无水 THF (39mL) 中的溶液。在 0-5°C 下再搅拌所得反应混合物 2 小时。加入 N-乙酰基-L-半胱氨酸 (69mg, 0.035mmol, 0.1 当量) 且搅拌溶液直至气泡平息。加入 NMM (2.31mL, 21.0mmol, 5 当量) 和 DMAP (513mg, 4.2mmol, 1 当量), 随后滴加苯甲酰氯 (1.1mL, 9.24mmol, 2.2 当量)。在 0-5°C 下搅拌反应混合物 30 分钟, 接着储存于冰箱中过夜。TLC 及 LC-MS 分析显示反应完全。加入 MeOH (5mL) 且数分钟后在旋转蒸发器上浓缩溶剂至一半体积, 然后在搅拌下加入 0.1M Na₂S₂O₃ 在饱和 NaHCO₃ 水溶液 (300mL) 中的溶液, 且将混合物温至 RT。用 DCM (150mL) 萃取该混合物, 且用 DCM (50mL) 萃取水层两次。将合并的有机萃取液干燥 (Na₂SO₄), 过滤且浓缩。然后用 5% 柠檬酸萃取有机相且用 DCM (2 $\times$ 50mL) 洗涤水相两次。将 DCM 萃取液干燥 (Na₂SO₄), 过滤且真空浓缩。将残余物 SiO₂ 通过色谱法纯化, 用逐步 EtOH/DCM 梯度洗脱 (0、0.5、0.75、1.0、1.5 及 2.0% EtOH), 得到 1.72g (83%) 20a: ¹H-NMR 数据 (CDCl₃, 25°C): δ 8.22-7.46 (7H), 6.49-6.39 (1H), 5.84 (dd, 1H), 5.55-5.47 (1H), 3.85 (d, 1H), 3.74 (d, 1H), 3.18 (m, 1H), 1.09 (d, 3H)。

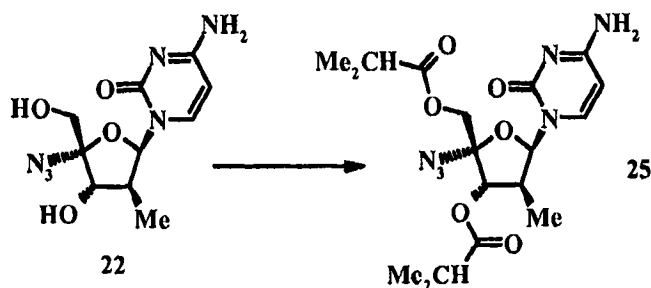
[0154] 步骤 4- 将化合物 20a (1.72g, 3.47mmol, 1 当量) 在 DCM (155mL) 中的溶液与 Bu₄N HSO₄ (825mg, 2.43mmol, 0.7 当量) 和间氯苯甲酸 (359mg, 2.29mmol, 0.66 当量) 在 1.75M K₂HPO₄ 水溶液 (55mL) 中的混合物混合。将该两相系统在 RT 下剧烈搅拌, 且经过 1.5 小时间隔加入两份含有 55% MCPBA、10% 间氯苯甲酸及 35% H₂O (2 $\times$ 3.57g, 相当于 2 $\times$ 16.5mmol 或 2 $\times$ 3.28 当量 MCPBA 与 2 $\times$ 3.3mmol 或 2 $\times$ 0.66 当量间氯苯甲酸) 的市售试剂混合物。将混合物在 RT 下再剧烈搅拌 18 小时。LC-MS 分析显示 > 96% 反应。加入 Na₂S₂O₃·5H₂O (35g) 在饱和 NaHCO₃ 水溶液 (500mL) 中的溶液且将混合物在 RT 下剧烈搅拌 30 分钟。分离有机层且用 DCM (2 $\times$ 10mL) 洗涤水层。用饱和 NaHCO₃ 水溶液 (40mL) 洗涤合并的有机层。用 DCM (2 $\times$ 10mL) 洗涤 NaHCO₃ 水层。将合并的有机层干燥 (Na₂SO₄), 过滤且浓缩。将残余物通过 SiO₂ 色谱法纯化, 用 EtOH/DCM 梯度洗脱 (1-2% v/v EtOH), 得到 1g (56%) 20b: ¹H-NMR (CDCl₃, 25°C): δ 8.19 (br s, 1H), 8.07-7.88 (4H), 7.65-7.36 (6H), 6.57-6.45 (1H), 5.64 (dd, 1H), 5.51-5.42 (1H), 4.80 (m, 2H), 3.24 (m, 1H), 1.09 (d, 3H)。

[0155] 步骤 5- 将二酯 20b (100mg, 0.19mmol, 1 当量) 与 1,2,4-三唑 (131mg, 1.9mmol, 10 当量) 在无水吡啶中共蒸发且再溶解于无水吡啶 (1mL) 中。将溶液在冰水浴中冷却, 且用几分钟滴加 POCl₃ (44 μ l, 0.475mmol, 2.5 当量) 在 MeCN (0.5mL) 中的溶液。在 0-5°C 下再搅拌反应混合物 5 分钟, 然后在 RT 下搅拌 3 小时。将反应混合物在旋转蒸发器上浓缩至一半体积, 然后用在乙醇 (20mL) 中的饱和 NH₃ 处理, 且将所得溶液在 RT 下搅拌隔夜。将蒸发后的残余物通过 SiO₂ 色谱法纯化, 用逐步 EtOH/DCM 梯度洗脱 (6、10、15 及 20% v/v EtOH), 得到 0.036g (66%) 22, 其经 LCMS 测得 98% 纯度 (约 2.0% 的杂质为 2' - α 异构体)。用 900mg 化合物 20b 重复此反应, 色谱法纯化后得到 270mg (54%, 97% 纯度) 22: ¹H-NMR (DMSO-d₆, 25°C): δ 7.69 (d, 1H), 7.14 (d, 2H), 6.32 (br s, 1H), 5.72 (d, 1H), 5.78 (br s, 2H), 3.89 (br s, 1H), 3.74 (d, d, d, 2H), 2.54 (m, 1H), 0.77 (d, 3H)。

[0156] 实施例 2

[0157] 异丁酸 (2R,3S,4S,5R)-5-(4-氨基-2-氧代-2H-嘧啶-1-基)-2-异丁酰基氧基甲基-4-甲基-四氢-呋喃-3-基酯 (25)

[0158]

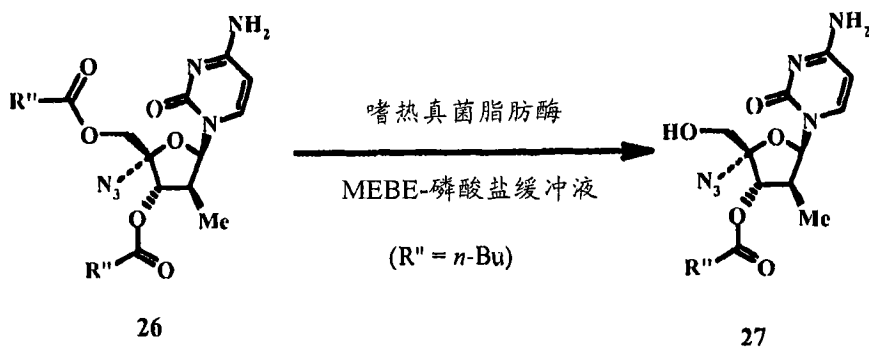


[0159] 将 22 (0.700g, 2.48mmol) 在 THF (7mL) 和稀盐水 (7mL) 中的溶液的 pH 用稀 KOH 水溶液调节至大约 11。缓慢 (逐滴) 将异丁酰氯 (1.0g) 添加到冰冷的经搅拌的双相反应混合物中,同时如需要则通过添加稀 KOH 水溶液使 pH 值维持在约 11。通过 HPLC 监控反应程度。在 HPLC 下添加额外的 1 当量异丁酰氯表示接近完全转化。使反应混合物在 RT 下静置过夜。用 EtOAc (50mL) 稀释溶液且用浓 HCl 调节水相的 pH 值至大约 7.5。分离各相且用水将有机相洗涤 3 次,且将其蒸发至干,获得 25。

[0160] 实施例 3

[0161] 戊酸 (2R,3S,4S,5R)-5-(4-氨基-2-氧代-2H-嘧啶-1-基)-2-叠氮基-4-羟基甲基-4-甲基-四氢-呋喃-3-基酯 (27)

[0162]

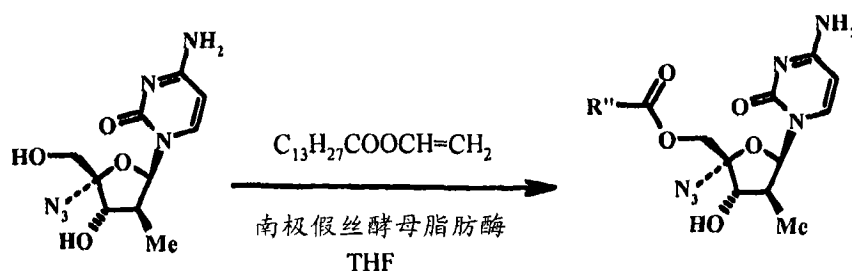


[0163] 向二戊酸酯 26 ($R'' = n-C_4H_9$, 1.9g, 3.46mmol) 在 MTBE (13mL) 和磷酸盐缓冲液 (15mL, 调节为 pH 约 6.5 的 5mM 磷酸钠及 0.1M NaCl) 中的悬浮液内加入 (约 2mL) Lipolase[®] (来自嗜热真菌的脂肪酶, Sigma 目录号 L 0777)。将反应混合物温至 35°C 且搅拌 2 小时。通过加入 NaHCO₃ 使反应混合物的 pH 值维持在 6.5。2 小时后,反应进行至完成 8%。加入额外 2mL 的 Lipolase[®] 且继续搅拌 6 小时,之后加入额外 2mL 该酶的等分试样且将反应再搅拌 24 小时。向该溶液中加入丙酮 (10mL)、MTBE (20mL) 和盐水 (10mL) 且将反应温至 50°C。分离各相且用温 MTBE 两次萃取有机相。用热盐水两次洗涤合并的有机相且将其干燥 (Na₂SO₄), 过滤且真空浓缩。

[0164] 实施例 4

[0165] 十四烷酸 (2R, 3S, 4S, 5R)-5-(4-氨基-2-氧代-2H-嘧啶-1-基)-2-叠氮基-3-丁酰基氧基-4-甲基-四氢-呋喃-2-基甲酯 (28)

[0166]



[0167] 29

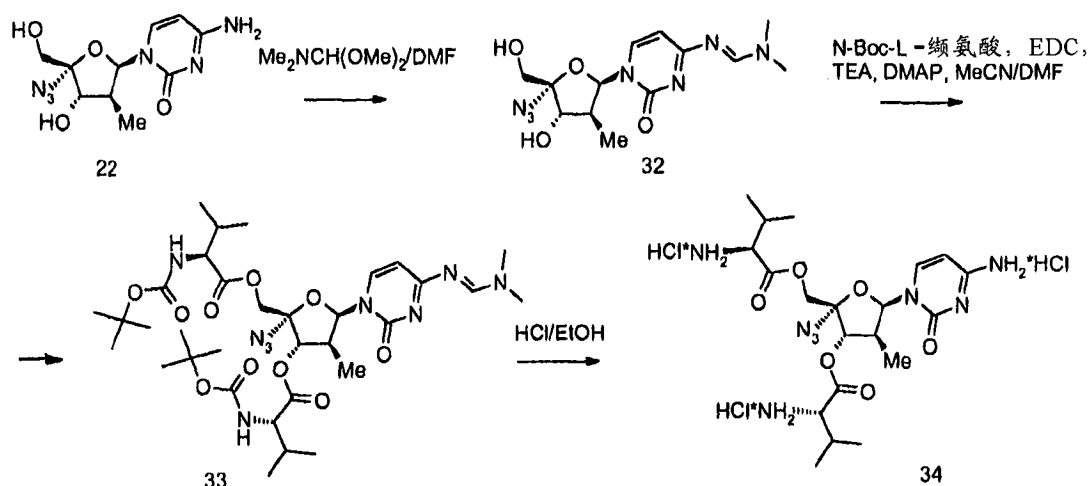
28 : $\text{R}'' = \text{C}_{13}\text{H}_{27}$

[0168] 将 29 (1.0g, 3.52mmol)、十四烷酸乙烯酯 (1.2g, 4.57mmol)、固定于聚丙烯酸酯树脂上的南极假丝酵母脂肪酶 (0.30g; 来自 Novosome, Sigma 目录号为 L4777) 和 THF (20mL) 的悬浮液温至 60°C 过夜。HPLC 分析表示反应约完成 33% 且加入额外的 2.4mL 十四烷酸乙烯酯及 0.3g 脂肪酶。在另外 48 小时后, 反应完成 50% 且加入额外 0.3g 酶及 3mL 十四烷酸乙烯酯。约 80h (总反应时间) 后, 向单酯的转化完全。经 CELITE® 过滤粗反应混合物且用 THF 洗涤过滤衬垫。将合并的有机相蒸发。将残余物溶解于 MeOH (50mL) 中且用己烷 (2×20mL) 萃取。将甲醇溶液蒸发且将残余物溶解于 EtOAc 中且用 NaHCO_3 洗涤且将 EtOAc 相干燥 (Na_2SO_4), 过滤及蒸发得到 0.930g 28 ($\text{R}'' = \text{C}_{13}\text{H}_{27}$), 将其通过 SiO_2 色谱法纯化, 用 MeOH/DCM 梯度洗脱 (0 至 10% MeOH)。

[0169] 实施例 5

[0170] 3', 5'-O-双(L-缬氨酰基)-4'-叠氮基-2'-β-C-甲基-2'-脱氧胞嘧啶核苷 (34)

[0171]



[0172] N^4 -[(二甲基氨基)亚甲基]-4'-叠氮基-2'-β-C-甲基-2'-脱氧胞嘧啶核苷 (32).

[0173] 在室温下用二甲基甲酰胺缩二甲醇 (8.2ml, 61.73mmol) 处理 22 (1.81g, 6.42mmol) 在 DMF (30ml) 中的溶液且搅拌 1.5 小时。在减压下蒸发溶液且与乙醇共蒸发。自乙醇 / 乙醚结晶得到标题化合物 32。

[0174] 3', 5' -O- 双 [N-(叔丁氧基羰基)-L-缬氨酰基]-N⁴-[(二甲基氨基)亚甲基]-4' -叠氮基-2' -β-C-甲基-2' -脱氧胞嘧啶核苷 (33)。

[0175] 向 32 (1.26g, 3.74mmol) 在无水乙腈 (30ml) 与 DMF (15ml) 的混合物中的溶液内连续加入 Boc-Val-OH (1.62g, 7.48mmol)、EDC (1.43g, 7.48mmol)、TEA (1.04ml, 7.48mmol) 和 DMAP (0.1g)。将所得混合物在室温下搅拌。通过 HPLC 追踪该反应进程, 且向反应混合物中再加入 Boc-Val-OH (0.63g)、EDC (0.72g)、TEA (0.52ml) 和 DMAP (0.05g)。当原料完全耗尽后, 在减压下除去溶剂。将残余物溶解在乙酸乙酯中且用水及盐水洗涤。通过硅胶柱色谱法纯化 (梯度 5-40% EtOAc 在己烷中的混合物), 得到标题化合物 33。

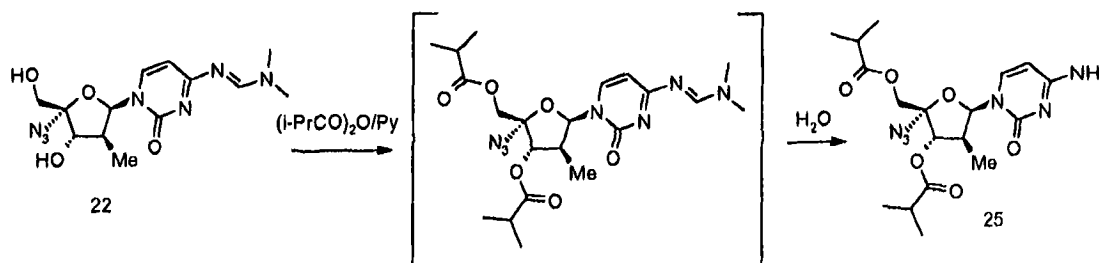
[0176] 3', 5' -O- 双 (L-缬氨酰基)-4' -叠氮基-2' -β-C-甲基-2' -脱氧胞嘧啶核苷 (三盐酸盐, 34)。

[0177] 向 33 (1.6g, 2.17mmol) 在 EtOH 中的浓溶液中缓慢加入 13ml 1M HCl 在 EtOH 中的溶液。在室温下将反应混合物搅拌 4 小时且用乙醚稀释。过滤沉淀且用乙醚来洗涤, 得到三盐酸盐形式的标题化合物 34。

[0178] 实施例 6

[0179] 3', 5' -O- 双 (异丁酰基 (isobutyryl))-4' -叠氮基-2' -β-C-甲基-2' -脱氧胞嘧啶核苷之另一制备方法。(异丁酸 (2R, 3S, 4S, 5R)-2-(4-氨基-2-氧代-2H-嘧啶-1-基)-2-异丁酰基氧基甲基-4-甲基-四氢呋喃-3-基酯) (25)。

[0180]



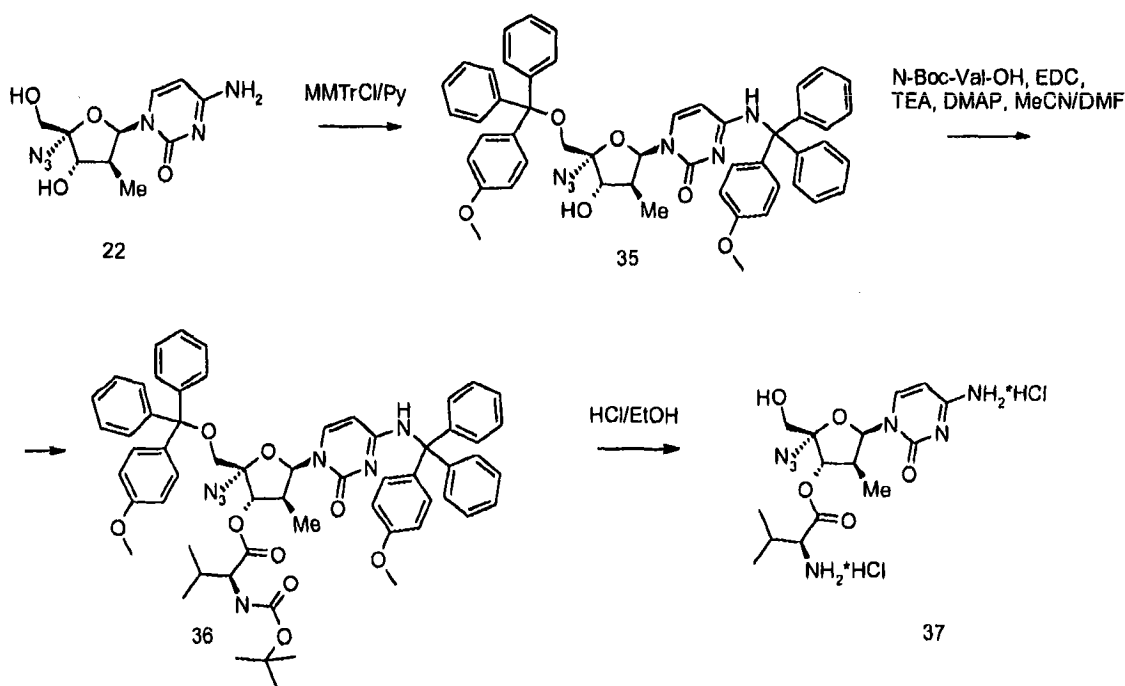
[0181] 3', 5' -O- 双 (异丁酰基)-4' -叠氮基-2' -β-C-甲基-2' -脱氧胞嘧啶核苷 (25)。

[0182] 在 0°C 下向 22 (1.26g, 3.74mmol) 在无水吡啶 (25ml) 中的溶液内加入异丁酸酐 (1.77g, 11.2mmol)。通过 HPLC 追踪反应, 且当完成时用水中止反应以破坏过量异丁酸酐, 且移除 N⁴-保护。将溶剂在减压下蒸发且与乙醇共蒸发。将残余物溶解在乙酸乙酯中, 且用 NaHCO₃、盐水洗涤。通过硅胶柱层析法纯化 (梯度在己烷中的 10-40% EtOAc), 得到标题化合物 25。

[0183] 实施例 7

[0184] 4' -叠氮基-3' -O-(L-缬氨酰基)-2' -β-C-甲基-2' -脱氧胞嘧啶核苷 (37)

[0185]



[0186] $N^4, 5'$ -O- 双 (单甲氧基三苯甲基) -4' -叠氮基 -2' - β -C- 甲基 -2' -脱氧胞嘧啶核苷 (35).

[0187] 在 80℃ 下将 22 (2.82g, 10mmol) 和 MMTrCl (9.15g, 30mmol) 在吡啶 (50ml) 中的混合物搅拌过夜。加入 MeOH (5ml) 后且再搅拌 2 小时, 蒸发溶剂且将残余物在乙酸乙酯与水之间分配。将有机相用水、盐水洗涤且蒸发。通过硅胶柱色谱法纯化 (在 DCM 中的 0-5% MeOH), 得到标题化合物 35。

[0188] $N^4, 5'$ -O- 双 (单甲氧基三苯甲基) -4' -叠氮基 -3' -[N-(叔丁氧基羰基)-L-缬氨酰基] -2' - β -C- 甲基 -2' -脱氧胞嘧啶核苷 (36)。

[0189] 向 35 (3.09g, 3.74mmol) 在无水乙腈 (30ml) 与 DMF (15ml) 的混合物中的溶液内连续加入 Boc-Val-OH (0.81g, 3.74mmol)、EDC (0.72g, 3.74mmol)、TEA (0.52ml, 3.74mmol) 和 DMAP (0.07g)。在室温下搅拌所得混合物。通过 HPLC 追踪反应进程, 且向反应混合物中再加入 Boc-Val-OH (0.4g)、EDC (0.36g)、TEA (0.26ml) 和 DMAP (0.04g)。当原料完全耗尽时, 在减压下移除溶剂。将残余物溶解在乙酸乙酯中且用水及盐水洗涤。通过硅胶柱色谱法纯化 (梯度于己烷中的 5-40% EtOAc), 得到标题化合物 36。

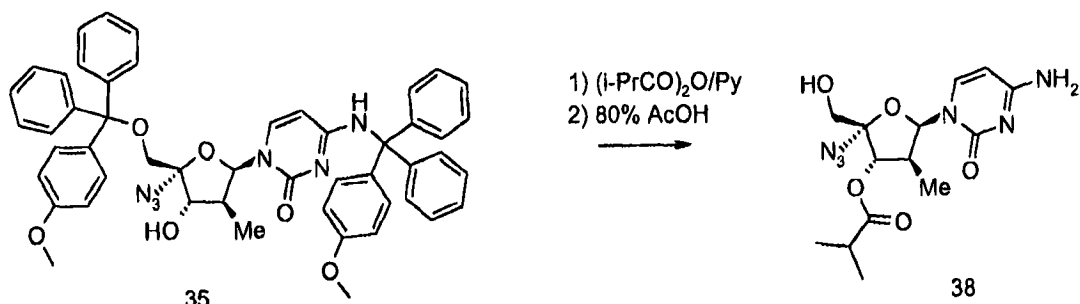
[0190] 4' -叠氮基 -3' -O-(L-缬氨酰基) -2' - β -C- 甲基 -2' -脱氧胞嘧啶核苷 (二盐酸盐, 37)。

[0191] 向 36 (2.4g, 2.34mmol) 在 EtOH 中的浓溶液中缓慢加入 13ml 1M HCl 在 EtOH 中的溶液。在室温下将反应混合物搅拌 4 小时且用乙醚稀释。过滤沉淀且用乙醚洗涤, 得到二盐酸盐形式的标题化合物 (37)。

[0192] 实施例 8

[0193] 4' -叠氮基 -3' -O- 异丁酰基 -2' - β -C- 甲基 -2' -脱氧胞嘧啶核苷 (38)。

[0194]



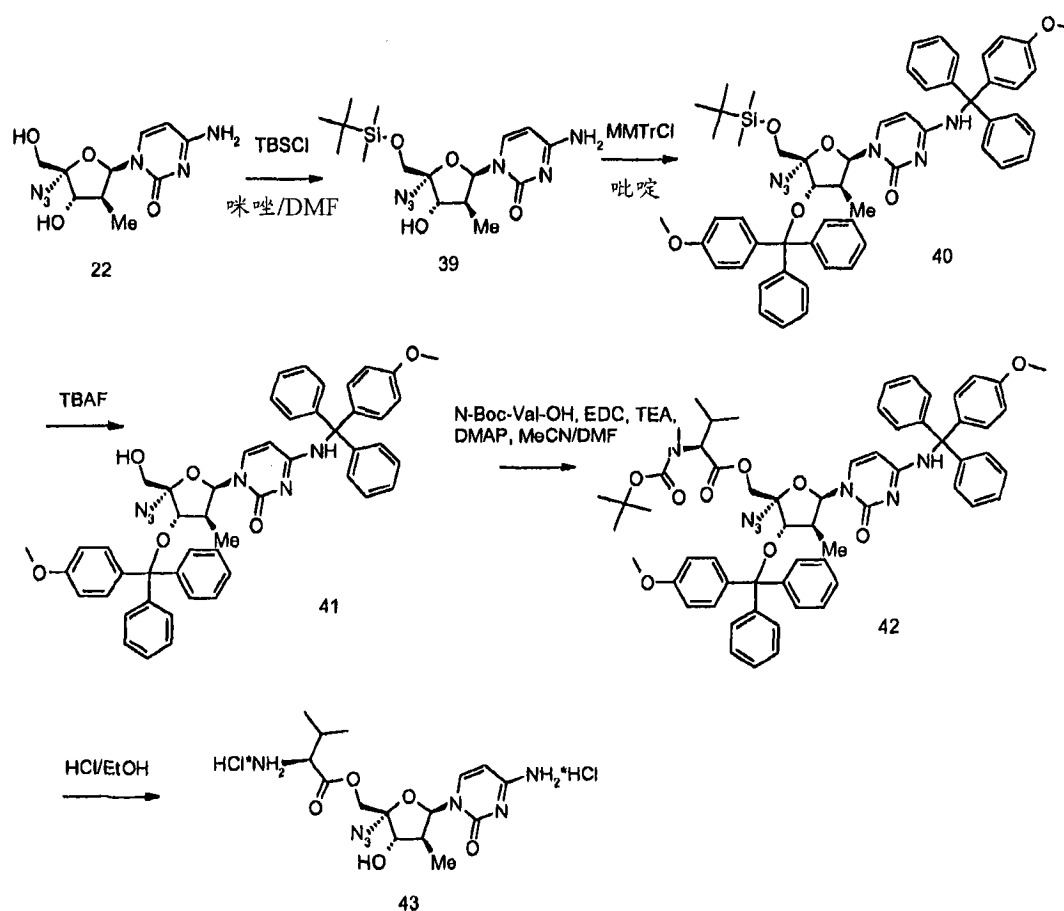
[0195] 4' -叠氨基-3' -O-异丁酰基-2' -β-C-甲基-2' -脱氧胞嘧啶核苷 (38)。

[0196] 在 0℃ 下向 35 (3.09g, 3.74mmol) 在无水吡啶 (25ml) 中的溶液内加入异丁酸酐 (0.89g, 5.61mmol)。通过 HPLC 追踪反应, 且当完成时用水中止反应以破坏过量异丁酸酐。将溶剂在减压下蒸发且与乙醇共蒸发。将残余物溶解在乙酸乙酯中, 用 NaHCO₃、盐水洗涤且蒸发。在 50℃ 下将粗 MMTr 保护的 3' -异丁酰基衍生物溶解在 80% AcOH 中, 且搅拌直至完全去掉 MMTr 基团的保护。蒸发溶剂, 且将残余物通过硅胶管柱层析法纯化 (在 DCM 中的 0-20% MeOH), 得到标题化合物 38。

[0197] 实施例 9

[0198] 5' -O-(L-缬氨酰基)-4' -叠氨基-2' -β-C-甲基-2' -脱氧胞嘧啶核苷 (43)

[0199]



[0200] 5'-O-叔丁基二甲基甲硅烷基-4'-叠氮基-2'-β-C-甲基-2'-脱氧胞嘧啶核苷(39)。

[0201] 向22(2.82g, 10mmol)在DMF(5ml)中的溶液内添加咪唑(1.02g, 15mmol)和TBSCl(1.95g, 13mmol)。当原料耗尽时,用MeOH(1ml)使反应混合物骤冷,且将其在乙酸乙酯与水之间分配。用水、盐水洗涤有机相且将其蒸发。将残余物通过硅胶柱色谱法纯化(在DCM中的0-20% MeOH),得到标题化合物39。

[0202] 5'-O-叔丁基二甲基甲硅烷基-4'-叠氮基-N⁴, 3'-O-双(单甲氧基三苯甲基)-2'-β-C-甲基-2'-脱氧胞嘧啶核苷(40)。

[0203] 在80℃下将39(3.7g, 9.34mmol)和MMTrCl(8.63g, 28mmol)在无水吡啶(50ml)中的混合物搅拌隔夜。加入MeOH(5ml)且再搅拌2h后,将溶剂蒸发且将残余物在乙酸乙酯与水之间分配。将有机相用水、盐水洗涤且蒸发。通过硅胶柱色谱法纯化(0-5%于DCM中之MeOH),得到标题化合物40。

[0204] 4'-叠氮基-N⁴, 3'-O-双(单甲氧基三苯甲基)-2-β-C-甲基-2-脱氧胞嘧啶核苷(41)。

[0205] 在室温下用1M TBAF在THF中的溶液(5.7ml, 5.7mmol)处理40(5.3g, 5.64mmol)在THF(20ml)中的溶液2小时。将反应混合物用乙酸乙酯稀释,用水、盐水洗涤且蒸发。硅胶色谱法纯化(在CHCl₃中的0-5%乙酸乙酯),得到标题化合物41。

[0206] 5'-[N-(叔丁氧基羰基)-L-缬氨酰基]-N⁴, 3'-O-双(单甲氧基三苯甲

基)-4'-叠氮基-2'-β-C-甲基-2'-脱氧胞嘧啶核苷(42)。

[0207] 向 41 (3.09g, 3.74mmol) 在无水乙腈 (30ml) 与 DMF (15ml) 的混合物中的溶液内连续加入 Boc-Val-OH (0.81g, 3.74mmol)、EDC (0.72g, 3.74mmol)、TEA (0.52ml, 3.74mmol) 和 DMAP (0.07g)。在室温下搅拌所得混合物。通过 HPLC 追踪反应进程, 且向反应混合物中再加入 Boc-Val-OH (0.4g)、EDC (0.36g)、TEA (0.26ml) 和 DMAP (0.04g)。当原料完全耗尽时, 在减压下移除溶剂。将残余物溶解在乙酸乙酯中, 且用水及盐水洗涤。通过硅胶柱色谱法纯化 (梯度在己烷中的 5-40% EtOAc), 得到标题化合物 42。

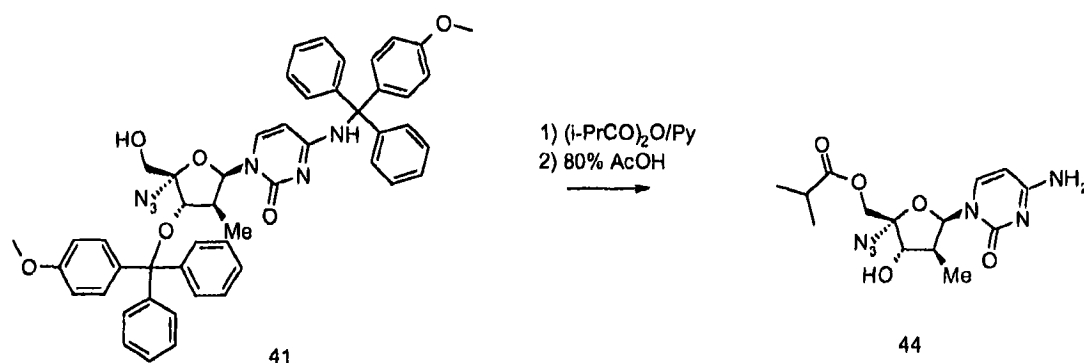
[0208] 5'-O-(L-缬氨酰基)-4'-叠氮基-2'-β-C-甲基-2'-脱氧胞嘧啶核苷 (二盐酸盐, 43)。

[0209] 向 42 (2.4g, 2.34mmol) 在 EtOH 中的浓溶液中缓慢加入 13ml 1M HCl 在 EtOH 中的溶液。在室温下将反应混合物搅拌 4h 且用乙醚稀释。过滤沉淀且用乙醚洗涤, 得到二盐酸盐形式的标题化合物 43。

[0210] 实施例 10

[0211] 5'-O-异丁酰基-4'-叠氮基-2'-β-C-甲基-2'-脱氧胞嘧啶核苷 (44)

[0212]



[0213] 5'-O-异丁酰基-4'-叠氮基-2'-β-C-甲基-2'-脱氧胞嘧啶核苷 (44)。

[0214] 在 0°C 下向 41 (3.09g, 3.74mmol) 在无水吡啶 (25ml) 中的溶液内加入异丁酸酐 (0.89g, 5.61mmol)。通过 HPLC 追踪反应, 且当完成时用水中止反应以破坏过量异丁酸酐。将溶剂在减压下蒸发且与乙醇共蒸发。将残余物溶解在乙酸乙酯中, 用 NaHCO₃、盐水洗涤且蒸发。在 50°C 下将粗 MMTr 保护的 3'-异丁酰基衍生物溶解在 80% AcOH 中, 且搅拌直至完全去掉 MMTr 基团的保护。蒸发溶剂, 且将残余物通过硅胶管柱层析法纯化 (在 DCM 中的 0-20% MeOH), 得到标题化合物 44。

[0215] 实施例 11

[0216] 海肾 (Renilla) 荧光素酶测定

[0217] 此测定测量式 I 化合物抑制 HCV RNA 复制的能力及因此其用于治疗 HCV 感染的可能效用。该测定利用报道基因作为细胞内 HCV 复制子 RNA 含量的简单读出器。在内部核糖体进入位点 (IRES) 序列后立即将海肾荧光素酶基因引入复制子构建体 NK5.1 的第一开放阅读框架 (Krieger 等人, J. Virol. 75:4614), 且经来自口蹄疫病毒的自分裂肽 2A 与新霉素磷酸转移酶 (NPTII) 基因融合 (Ryan & Drew, EMBO Vol 13:928-933)。在活体外转录后, 将 RNA 电穿孔至人类肝肿瘤 Huh7 细胞中, 且分离及扩增抗 G418 集落。经稳定选择的细胞

株 2209-23 含有复制型 HCV 次基因组 RNA,且在细胞中由复制子所表现的海肾荧光素酶的活性反映其 RNA 含量。在双重板中进行该测定,一个是不透明白色且另一个是透明的,以便测量化合物的抗病毒活性及细胞毒性,同时确保所观测的活性并不归因于减少的细胞增殖。

[0218] 将在 Dulbecco's MEM(GibcoBRL 目录号 31966-021) 中用 5% 胎牛血清 (FCS, GibcoBRL 目录号 10106-169) 培养的海肾荧光素酶 HCV 复制子细胞 (2209-23) 按每孔 5000 个细胞置在 96-孔板上且培育过夜。24 小时后,将生长培养基中的化合物的不同稀释物加到细胞中,接着将该等细胞在 37°C 下再培育三天。培育时间结束时,收集白板中的细胞,且通过使用双荧光素酶 (Dual-Luciferase) 报导基因测定系统 (Promega 目录号 E1960) 测量荧光素酶活性。所有在以下段落中描述的试剂包括在制备商试剂盒中,且附有制备商关于制备该试剂的说明书。将细胞用 200 μ l 磷酸盐缓冲的盐水 (pH7.0) (PBS) 以每孔洗涤且在用 25 μ l 1 $\times$ 被动裂解缓冲液溶解细胞后在室温下培育 20 分钟。将 100 微升 LAR II 试剂添加至各孔中。接着将板插入 LB 96V 微量板式光度计 (MicroLumatPlus, Berthold) 中,且将 100 μ l Stop & Glo® 试剂注入各孔中且使用 2 秒延迟、10 秒测量程序来测定信号。IC₅₀ 是相对于未处理的细胞对照值将复制子水平降低 50% 所需的药物浓度,其可由荧光素酶活性降低的百分比对药物浓度的曲线计算出。

[0219] 将来自 Roche Diagnostic 的 WST-1 试剂 (目录号 1644807) 用于细胞毒性测定。将 10 微升 WST-1 试剂添加至各孔中,包括仅含有培养基作为空白的孔。接着在 37°C 下培育细胞 1 至 1.5 小时,且通过 96-孔板读取器在 450nm 下 (参考滤波器在 650nm 下) 测定 OD 值。再者,CC₅₀ 是相对于未处理的细胞对照值将细胞增殖降低 50% 所需的药物浓度,其可由 WST-1 值减少的百分比对药物浓度的曲线计算出。

[0220] 实施例 12

[0221] MT4/XTT 测定

[0222] 还可测定本发明化合物抵抗并发感染的活性。例如,有诸如 HCV 的血液传播感染风险的个体有时合并感染 HIV。

[0223] 例如,使用 XTT 在 MT-4 细胞中的多种测定法来测定化合物的 HIV 活性 (Weislow 等人, J Nat Cancer Inst 1989, 第 81 卷第 8 号, 577 以及下列等等), 优选包括 40-50% 人类血清存在下的测定以说明蛋白结合的作用。简言之, 典型 XTT 测定使用生长于 RPMI 1640 培养基中的人类 T 细胞株 MT4 细胞, 该培养基补充有 10% 胎牛血清 (或若适当, 40-50% 人类血清), 青霉素及链霉素, 将细胞接种于 96 孔微量板中 (2 $\times$ 10⁴ 个细胞 / 孔), 每孔感染 10-20 TCID₅₀ 的 HIV-1_{IIIB} (野生型) 或诸如带有 RT I1e100、Cys 181 或 Asn 103 突变的突变病毒。将连续稀释的测试化合物添加至个别孔中且将培养物在 37°C 下于富含 CO₂ 的气氛中培育且在第五日或第六日用 XTT 活体染料测定细胞的生存力。通常结果表示为 ED₅₀ μ M。在 XTT 测定中实施例 1 的化合物表现出约 0.6 μ M 的 ED₅₀。

[0224] 实施例 13

[0225] 细胞内三磷酸酯浓度及半衰期

[0226] 推定的本发明化合物的活性物质为 β -D-2' -脱氧-2' - β -C-甲基-4' -叠氮基胞嘧啶核苷三磷酸酯。在用氘化母体化合物预培育的新鲜人类初级肝细胞 (CellzDirect 或 In Vitro Technologies) 中测定三磷酸酯的稳定性。通常使用完全含血清的培养基 (CellzDirect 或 In Vitro Technologies) / 37°C / 5% CO₂ 在 6 孔胶原蛋白包被的板 (BD

Biosciences) 上以 150 万细胞 / 孔培育肝细胞。可使用诸如 Hu497、MHL-091806 及 Hu504 的各种肝细胞株,且因此适用于同时测试该等细胞株且由一定范围的细胞株计算平均值。

[0227] 通常用 $2\mu\text{M}$ 的氟化母体以 $10\mu\text{Ci/ml}$ 预培育 24 小时。在 t_0 时,用细胞培养基洗涤细胞单层以移除细胞外母体化合物,且将细胞培养物用新鲜细胞培养基再培育。将细胞内三磷酸酯的浓度在不同时点(至多 72 小时)测定。便利的时点为 0、0.5、1、2、4、6、8、24、48 及 72 小时,在各时点有一式两份细胞培养物。

[0228] 在适当时点,通过对细胞培养基抽气来收集细胞且用冷 PBS 洗涤细胞。将细胞刮入萃取介质中,诸如 1ml 预冷却的 60% (v/v) 甲醇,在 -20°C 下萃取至甲醇中历时 24 小时。所萃取的样品经离心以移除细胞碎片。将上清液移至新鲜管中,蒸发且储存于液氮中以供分析。将干燥的细胞小球萃取液溶于水中且经纳米过滤(例如 nanosep 离心装置, Pall Life Sciences)。在 HPLC 分析前,用母体及其单磷酸酯、二磷酸酯及三磷酸酯形式的未经标记的参考标准使样品突出(spike)。典型 HPLC 系统使用具有与放射测定检测器(诸如 β -RAM, IN/US Systems Inc) 偶联的 Whatman Partisil 10SAX ($4.6\times 250\text{mm}$) 管柱的离子交换 HPLC。常规流动相线性梯度为:以诸如 1ml/min 的流速的 0% 水缓冲液至 100% 磷酸盐缓冲液(例如 $0.5\text{M KH}_2\text{PO}_4/0.8\text{M KCl}$)。对于检测 β -RAM 中的放射标记物质而言,可使用 5 : 1 比率的 FloScint IV 或 UltimaFloAP (PerkinElmer) 与管柱溶离剂。通过比较放射层析图中细胞内物质的保留时间与细胞萃取样品中突出的非放射活性参考标准的保留时间来识别母体及细胞内代谢物且通过 UV 吸收,通常在 270nm 处检测。

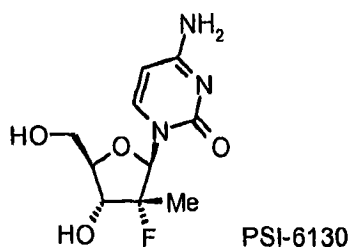
[0229] 以类似方式测定摄取及磷酸化作用的时程,通过用(例如) $2\mu\text{M}$ 及 $10\mu\text{Ci/ml}$ 的本发明的氟化化合物培养人类初级肝细胞。在细胞收集前,将合适的时程添加于化合物在 72、48、24、16、6 和 1 小时的一式两份培养物中。为测定本发明化合物的磷酸化作用的剂量反应,用例如在 0、2、10、25、50、100 及 $250\mu\text{M}$ 下的氟化测试化合物培育人类初级肝细胞 24 小时。通过补充非放射标记的测试化合物达到最终浓度。通常在 24 小时培育后收集一式两份细胞培养物。

[0230] 在该测定中本发明化合物的平均三磷酸酯半衰期为 21.4 小时(标准偏差 4.22 小时)。稳态三磷酸酯含量在 24 小时于 $2\mu\text{M}$ 下为约 15pM / 百万细胞。使用 $3\mu\text{l}$ 作为人类肝实质细胞的平均体积,三磷酸酯的浓度相当于显著超过母体化合物的 K_i 的值。

[0231] 三磷酸酯长半衰期及高浓度表明活性物质的抗病毒活性浓度将存在于 HCV 感染细胞中历时给药后的长时间。此又意味最小每日水平(minimum diurnal through level) 将保持较高,甚至在使用 QD 给药时也是如此,因此最小化次最优暴露于药物的机会,导致药物逃离突变的发展。

[0232] 与本发明的三磷酸酯长半衰期相比,类似的 $2'$ - β -C 甲基化合物 PSI-6130 (β -D- $2'$ -脱氧- $2'$ -氟- $2'$ - β -C-甲基胞嘧啶核苷的三磷酸酯半衰期(下文所述) 仅为 4.7 小时,在 24 小时稳态三磷酸酯浓度仅为 1.3pM / 百万细胞。

[0233]



[0234] 实施例 14

[0235] 如该实施例所述制备经由几种途径给药的本发明化合物的药物组合物。

[0236] 用于口服的组合物 (A)

[0237]	成份	% wt./wt.
	活性成份	20.0%
	乳糖	79.5%
	硬脂酸镁	0.5%

[0238] 将成份混合且分配于各自含有约 500 至 1000mg 的胶囊中。

[0239] 用于口服的组合物 (B)

[0240]	成份	% wt./wt.
	活性成份	20.0%
	硬脂酸镁	0.5%
	交联羧甲基纤维素钠	2.0%
	乳糖	76.5%
	PVP(聚乙烯吡咯烷酮)	1.0%

[0241] 将成份组合, 且使用诸如甲醇的溶剂来制粒。接着使制剂干燥, 且用适当制片机使其形成片剂 (含有约 20mg 活性化合物)。

[0242] 用于口服的组合物 (C)

	成份	% wt./wt.
[0243]	活性化合物	1.0 g
	富马酸	0.5 g
	氯化钠	2.0 g
	对羟基苯甲酸甲酯	0.15 g
	对羟基苯甲酸丙酯	0.05 g
	砂糖	25.5 g
	山梨糖醇(70%溶液)	12.85 g
	Veegum K (Vanderbilt Co.)	1.0 g
	调味剂	0.035 ml
	着色剂	0.5 mg
	蒸馏水	适量至100 ml

[0244] 将成份混合以形成用于口服的悬浮液。

[0245] 胃肠外用制剂 (D)

	成份	% wt./wt.
[0246]	活性成份	0.25 g
	氯化钠	适量以使其等渗
	注射用水	100 ml

[0247] 将活性成份溶于注射用水的一部分中。接着添加足量氯化钠同时搅拌使溶液等渗。将溶液配制与注射用水的剩余部分一起称重,经由 0.2 微米过滤膜过滤,且在无菌条件下封装。

[0248] 栓剂制剂 (E)

	成份	% wt./wt.
[0249]	活性成份	1.0%
	聚乙二醇1000	74.5%
	聚乙二醇4000	24.5%

[0250] 将成份一起融化,在蒸气浴上混合,且倾入含有 2.5g 总重量的模具中。

[0251] 上述发明已通过举例说明及实例详细描述,其旨在说明及理解。本领域技术人员明白可实践在随附的权利要求书中的改变及修改。因此,应了解上述说明意欲为说明性的而非限制性的。因此本发明的范围不应参考上述描述来确定,而应通过下面的权利要求以及这些权利要求所赋予的等同物的全部范围而确定。

[0252] 出于所有目的,在本申请中所引用的所有专利、专利申请及公开是以引用的方式全部并入本文中,引用的程度就如同已将各个别专利、专利申请案或公开个别说明一样。