



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104884462 A

(43) 申请公布日 2015. 09. 02

(21) 申请号 201380068925. 3

(74) 专利代理机构 北京品源专利代理有限公司

(22) 申请日 2013. 10. 29

11332

代理人 巩克栋 杨生平

(30) 优先权数据

61/719, 696 2012. 10. 29 US

61/763, 534 2013. 02. 12 US

(51) Int. Cl.

C07H 19/06(2006. 01)

C07H 19/10(2006. 01)

A61K 31/7068(2006. 01)

A61P 31/18(2006. 01)

A61P 31/22(2006. 01)

A61P 31/14(2006. 01)

A61P 35/00(2006. 01)

A61P 31/12(2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2015. 06. 29

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2013/067309 2013. 10. 29

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/070771 EN 2014. 05. 08

(71) 申请人 共晶制药股份有限公司

地址 美国乔治亚州

申请人 埃默里大学

(72) 发明人 弗兰克·安布拉尔

斯蒂文·J·科阿斯

雷蒙德·F·斯基那兹

权利要求书15页 说明书86页

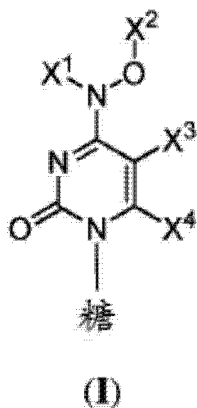
(54) 发明名称

用于治疗病毒感染和癌症的嘧啶核苷及其单磷酸酯前药

(57) 摘要

本发明涉及用于治疗或预防在人患者或其它动物宿主中的癌症和病毒感染,特别是HIV、HCV、诺瓦克病毒、札如病毒、巨细胞病毒(CMV)、疱疹病毒(HSV-1、HSV-2)、登革热病毒、黄热病或HBV的化合物、组合物及方法。所述化合物是某些A⁺-羟基胞苷核苷衍生物、修饰的单磷酸盐和磷酸盐前药类似物、及其药学上可接受的盐、前药及其它衍生物。具体地说,所述化合物显示针对HIV-1、HIV-2、HCV、诺瓦克病毒、札如病毒、巨细胞病毒(CMV)、疱疹病毒(HSV-1、HSV-2)、登革热病毒、黄热病及HBV的有效抗病毒活性。

1. 一种式 (I) 化合物：



或其药学上可接受的盐或前药，其中：

X^1 是 H、 C_1-C_6 烷基、 C_1-C_6 卤烷基、 C_1-C_6 烷氧基、 C_2-C_6 烯基、 C_2-C_6 炔基、 COR^1 或 $COOR^1$ ； X^2 是氢、 COR^1 或 $COOR^1$

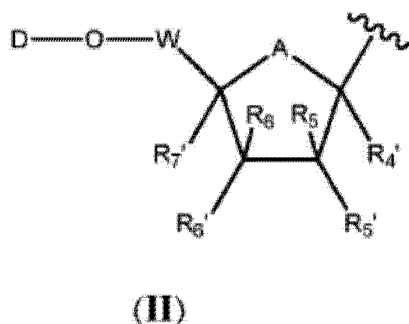
其中每个 R^1 独立地是 $CH_2-O(CO)-X^5$ 、 $CH_2-O(CO)O-X^5$ 、 C_{1-20} 烷基、来源于脂肪醇的碳链或被以下取代的 C_{1-20} 烷基： C_1-C_6 烷基、烷氧基、二 (C_1-C_6 烷基)-氨基、氟、 C_{3-10} 环烷基、环烷基烷基、环杂烷基、芳基、杂芳基、取代的芳基或取代的杂芳基；其中所述取代基是 C_{1-6} 烷基、或被 C_1-C_6 烷基、 C_1-C_6 烷氧基、二 (C_1-C_6 烷基)-氨基、氟或 C_{3-10} 环烷基取代的 C_{1-6} 烷基

X^5 独立地是 C_{1-20} 烷基、来源于脂肪醇的碳链或被以下取代的 C_{1-20} 烷基： C_1-C_6 烷基、烷氧基、 C_{3-10} 环烷基、环烷基烷基、环杂烷基、芳基、杂芳基、取代的芳基或取代的杂芳基；其中所述取代基是 C_{1-6} 烷基、或被 C_1-C_6 烷基、 C_1-C_6 烷氧基、二 (C_1-C_6 烷基)-氨基、氟或 C_{3-10} 环烷基取代的 C_{1-6} 烷基

X^3 和 X^4 各自独立地是 H、 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、 C_{2-6} 炔基、芳基、烷基芳基、卤素、 NH_2 、OH、SH、CN 或 NO_2 。

2. 如权利要求 1 所述的化合物，其中每个 R^1 独立地是 C_{1-20} 烷基、来源于脂肪醇的碳链或被以下取代的 C_{1-20} 烷基： C_1-C_6 烷基、烷氧基、二 (C_1-C_6 烷基)-氨基、氟、 C_{3-10} 环烷基、环烷基烷基、环杂烷基、芳基、杂芳基、取代的芳基或取代的杂芳基；其中所述取代基是 C_{1-6} 烷基、或被 C_1-C_6 烷基、 C_1-C_6 烷氧基、二 (C_1-C_6 烷基)-氨基、氟或 C_{3-10} 环烷基取代的 C_{1-6} 烷基。

3. 如权利要求 1 所述的化合物，其中糖是通式 (II) 的核糖或修饰的核糖：



其中：

D 是 H、 $C(O)R^1$ 、 $C(O)OR^1$ 、二磷酸酯或三磷酸酯；

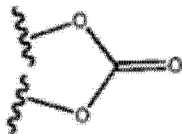
R^1 如上所定义；

W 是 CL_2 或 CL_2CL_2 , 其中 L 独立地选自由以下组成的组: H、 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基及 C_{2-6} 炔基, 其中 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基及 C_{2-6} 炔基可各自任选地含有一个或多个杂原子;

A 是 O、S、 CH_2 、CHF、 CF_2 、 $\text{C} = \text{CH}_2$ 、 $\text{C} = \text{CHF}$ 或 $\text{C} = \text{CF}_2$;

$\text{R}^{4'}$ 、 R^5 、 $\text{R}^{5'}$ 、 R^6 、 $\text{R}^{6'}$ 及 $\text{R}^{7'}$ 独立地选自由以下组成的组: H、F、Cl、Br、I、OH、SH、 NH_2 、NHOH、 NHNH_2 、 N_3 、 $\text{C}(\text{O})\text{OH}$ 、CN、 CH_2OH 、 $\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$ 、 $\text{C}(\text{S})\text{NH}_2$ 、 $\text{C}(\text{O})\text{OR}$ 、R、OR、SR、SSR、NHR 及 NR_2 ;

$\text{R}^{5'}$ 和 $\text{R}^{6'}$ 可一起形成环



其中:

当 A 是 O 或 CH_2 , D 是 H 或酰基, W 是 CH_2 , $\text{R}^{4'}$ 和 $\text{R}^{7'}$ 是 H 时, R^5 、 $\text{R}^{5'}$ 、 R^6 、 $\text{R}^{6'}$ 不能是 H、卤素、OH、SH、 OCH_3 、 SCH_3 、 NH_2 、 NHCH_3 、 CH_3 、 $\text{CH} = \text{CH}_2$ 、CN、 CH_2NH_2 、 CH_2OH 、COOH

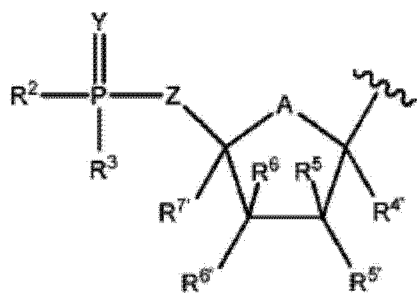
当 A 是 O 或 S 时, $\text{R}^{7'}$ 不能是 OH、SH、 NH_2 、NHOH、 NHNH_2 、OR、SR、SSR、NHR 或 NR_2 , 并且

R 独立地是 C_1 - C_6 烷基、 C_{2-6} 烯基、 C_{2-6} 炔基、 C_{3-6} 环烷基、(C_3 - C_6 环烷基) 芳基、烷基芳基或芳基烷基, 其中所述基团可被一个或多个如上面在权利要求 1 中所定义的取代基取代。

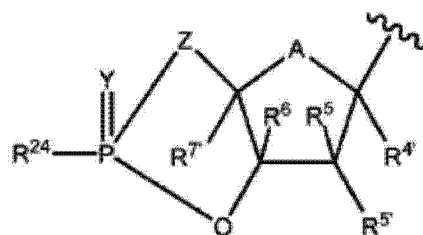
4. 如权利要求 3 所述的化合物, 其中 $\text{R}^{6'}$ 独立地选自由以下组成的组: NHOH、 NHNH_2 、 N_3 、 $\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$ 、 $\text{C}(\text{S})\text{NH}_2$ 、 $\text{C}(\text{O})\text{OR}$ 、R、OR、SR、SSR、NHR 及 NR_2 , 并且其中 R 独立地是 C_1 - C_6 烷基、 C_{2-6} 烯基、 C_{2-6} 炔基、 C_{3-6} 环烷基、(C_3 - C_6 环烷基) 芳基、烷基芳基或芳基烷基, 其中所述基团可被一个或多个如上面在权利要求 1 中所定义的取代基取代。

5. 如权利要求 3 所述的化合物, 其中 $\text{R}^{7'}$ 独立地选自由以下组成的组: H、F、Cl、Br、I、 N_3 、 $\text{C}(\text{O})\text{OH}$ 、CN、 CH_2OH 、 $\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$ 、 $\text{C}(\text{S})\text{NH}_2$ 、 $\text{C}(\text{O})\text{OR}$ 及 R, 并且其中 R 独立地是 C_1 - C_6 烷基、 C_{2-6} 烯基、 C_{2-6} 炔基、 C_{3-6} 环烷基、(C_3 - C_6 环烷基) 芳基、烷基芳基或芳基烷基, 其中所述基团可被一个或多个如上面在权利要求 1 中所定义的取代基取代。

6. 如权利要求 1 所述的化合物, 其中糖是通式 (III) 或 (IV) 的核糖或修饰的核糖:



(III)



(IV)

其中:

Y 是 O 或 S;

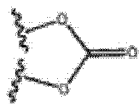
Z 选自由以下组成的组: CL_2 、 CL_2CL_2 、 CL_2OCL_2 、 CL_2SCL_2 、 CL_2O 、 OCL_2 及 CL_2NHCL_2 , 其中 L 独立地选自由以下组成的组: H、F、 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基及 C_{2-6} 炔基, 其中 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基及 C_{2-6} 炔基可各自任选地含有一个或多个杂原子;

A 是 O、S、 CH_2 、CHF、 CF_2 、 $\text{C} = \text{CH}_2$ 、 $\text{C} = \text{CHF}$ 或 $\text{C} = \text{CF}_2$;

$\text{R}^{4'}$ 、 R^5 、 $\text{R}^{5'}$ 、 R^6 、 $\text{R}^{6'}$ 及 $\text{R}^{7'}$ 独立地选自由以下组成的组: H、F、Cl、Br、I、OH、SH、 NH_2 、NHOH、

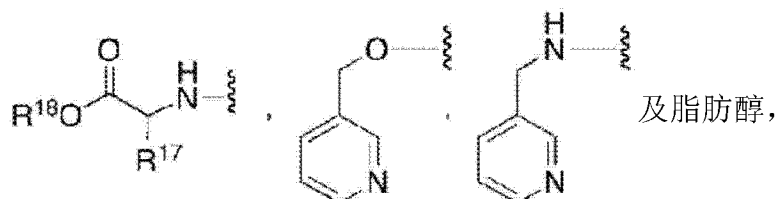
NHNH₂、N₃、C(O)OH、CN、CH₂OH、C(O)NH₂、C(S)NH₂、C(O)OR、R、OR、SR、SSR、NHR 及 NR₂;

R^{5'} 和 R^{6'} 可一起形成环



其中当 A 是 O 或 S 时, R^{7'} 不能是 OH、SH、NH₂、NHOH、NHNH₂、OR、SR、SSR、NHR 或 NR₂, 并且 R 独立地是 C₁₋₆烷基、C₂₋₆烯基及 C₂₋₆炔基、C₃₋₆环烷基、芳基、烷基芳基或芳基烷基, 其中所述基团可被一个或多个如上面在权利要求 1 中所定义的取代基取代,

R²⁴选自由以下组成的组: OR¹⁵、



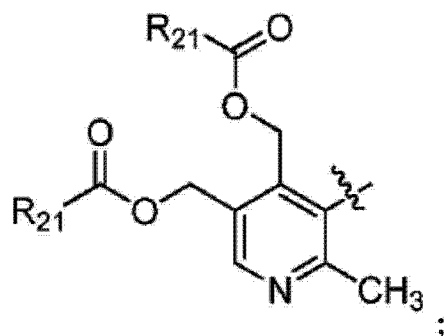
R¹⁵选自由以下组成的组: H、Li、Na、K、苯基及吡啶基; 其中苯基和吡啶基任选地被一个至三个独立地选自由 (CH₂)₀₋₆CO₂R¹⁶和 (CH₂)₀₋₆CON(R¹⁶)₂组成的组的取代基取代;

R¹⁷选自在天然 L-氨基酸中存在的那些基团、C₁₋₆烷基、C₂₋₆烯基、C₂₋₆炔基、C₃₋₆环烷基、芳基、烷基芳基或芳基烷基, 其中所述基团可被一个或多个如上面在权利要求 1 中所定义的取代基取代,

R¹⁸是 H、C₁₋₂₀烷基、来源于脂肪醇的碳链或被以下取代的 C₁₋₂₀烷基: C₁₋₆烷基、C₁₋₆烷氧基、二(C₁₋₆烷基)-氨基、氟、C₃₋₁₀环烷基、环烷基烷基、环杂烷基、芳基、杂芳基、取代的芳基或取代的杂芳基; 其中所述取代基是 C₁₋₅烷基、或被 C₁₋₆烷基、C₁₋₆烷氧基、二(C₁₋₆烷基)-氨基、氟、C₃₋₁₀环烷基或环烷基取代的 C₁₋₅烷基;

R²和 R³独立地选自由以下组成的组:

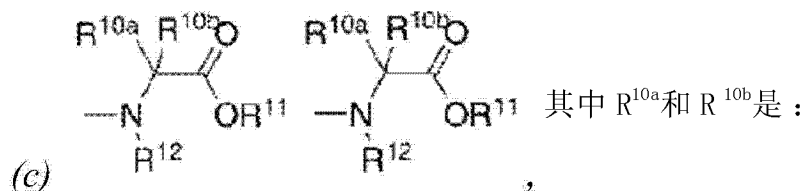
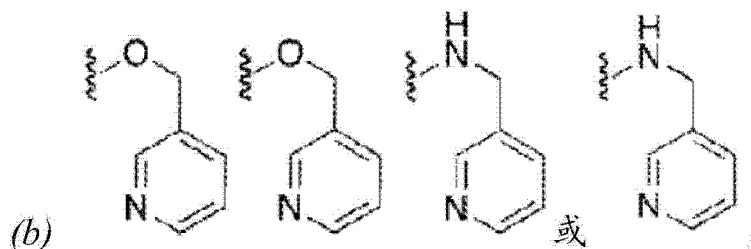
(a) OR⁸, 其中 R⁸是 H、Li、Na、K、C₁₋₂₀烷基、C₃₋₆环烷基、C₁₋₆卤烷基、芳基或杂芳基, 任选地被一个至三个独立地选自由以下组成的组的取代基取代: C₁₋₆烷基、C₂₋₆烯基、C₂₋₆炔基、C₁₋₆烷氧基、(CH₂)₀₋₆CO₂R^{9a}、卤素、C₁₋₆卤烷基、-N(R^{9a})₂、C₁₋₆酰基氨基、-NHSO₂C₁₋₆烷基、-SO₂N(R^{9a})₂、-SO₂C₁₋₆烷基、COR^{9b}、硝基、氰基及



其中 R²¹如下所定义:

R^{9a}独立地是 H、C₁₋₂₀烷基、来源于脂肪醇的碳链或被以下取代的 C₁₋₂₀烷基: C₁₋₆烷基、C₁₋₆烷氧基、二(C₁₋₆烷基)-氨基、氟、C₃₋₁₀环烷基、C₃₋₁₀环烷基烷基、环杂烷基、芳基、杂芳基、取代的芳基或取代的杂芳基; 其中所述取代基是 C₁₋₅烷基、或被 C₁₋₆烷基、C₁₋₆烷氧基、二(C₁₋₆烷基)-氨基、氟、C₃₋₁₀环烷基或 C₃₋₁₀环烷基烷基取代的 C₁₋₅烷基;

R^{9b} 是 $-OR^{9a}$ 或 $-N(R^{9a})_2$;



(i) 独立地选自由以下组成的组: H 、 C_{1-10} 烷基、 $-(CH_2)_rNR^{9a}_2$ 、 C_{1-6} 羟烷基、 $-CH_2SH$ 、 $-(CH_2)_2S(O)_pMe$ 、 $-(CH_2)_3NHC(=NH)NH_2$ 、(1H-吡啶-3-基)甲基、(1H-咪唑-4-基)甲基、 $-(CH_2)_mCOR^{9b}$ 、芳基及芳基- C_{1-3} 烷基, 其中所述芳基任选地被选自由以下组成的组的基团取代: 羟基、 C_{1-10} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基、卤素、硝基及氰基;

(ii) R^{10a} 是 H 且 R^{10b} 和 R^{12} 一起是 $(CH_2)_{2-4}$ 以形成包含邻接的 N 和 C 原子的环;

(iii) R^{10a} 和 R^{10b} 一起是 $(CH_2)_n$ 以形成环;

(iv) R^{10a} 和 R^{10b} 都是 C_{1-6} 烷基; 或

(v) R^{10a} 是 H 且 R^{10b} 是 H 、 CH_3 、 CH_2CH_3 、 $CH(CH_3)_2$ 、 $CH_2CH(CH_3)_2$ 、 $CH(CH_3)CH_2CH_3$ 、 CH_2Ph 、 CH_2 -吡啶-3-基、 $-CH_2CH_2SCH_3$ 、 CH_2CO_2H 、 $CH_2C(O)NH_2$ 、 CH_2CH_2COOH 、 $CH_2CH_2C(O)NH_2$ 、 $CH_2CH_2CH_2CH_2NH_2$ 、 $-CH_2CH_2CH_2NHC(NH)NH_2$ 、 CH_2 -咪唑-4-基、 CH_2OH 、 $CH(OH)CH_3$ 、 $CH_2((4'-OH)-Ph)$ 、 CH_2SH 或 C_{3-10} 环烷基;

p 是 0 至 2;

r 是 1 至 6;

n 是 4 或 5;

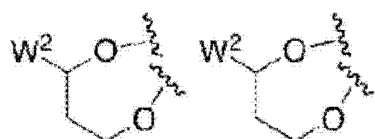
m 是 0 至 3;

R^{11} 是 H 、 C_{1-10} 烷基、或被以下取代的 C_{1-10} 烷基: C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基、二(C_{1-6} 烷基)-氨基、氟、 C_{3-10} 环烷基、 C_{3-10} 环烷基烷基、环杂烷基、芳基、杂芳基、取代的芳基或取代的杂芳基; 其中所述取代基是 C_{1-5} 烷基、或被 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基、二(C_{1-6} 烷基)-氨基、氟、 C_{3-10} 环烷基或 C_{3-10} 环烷基烷基取代的 C_{1-5} 烷基;

R^{12} 是 H 或 C_{1-3} 烷基, 或 R^{10a} 、或 R^{10b} 和 R^{12} 一起是 $(CH_2)_{2-4}$ 以便形成包含邻接的 N 和 C 原子的环;

(d) O 连接的脂质(包括磷脂)、 N 或 O 连接的肽、 O 连接的胆固醇或 O 连接的植物甾醇;

(e) R^2 和 R^3 可在一起形成环



其中 W^2 选自由以下组成的组: 苯基或单环杂芳基, 其任选

地被一个至三个独立地选自由以下组成的组的取代基取代: C_{1-6} 烷基、 CF_3 、 C_{2-6} 烯基、 C_{1-6} 烷氧基、 OR^{9c} 、 CO_2R^{9a} 、 COR^{9a} 、卤素、 C_{1-6} 卤烷基、 $-N(R^{9a})_2$ 、 C_{1-6} 酰基氨基、 $CO_2N(R^{9a})_2$ 、 SR^{9a} 、 $-NHSO_2C_{1-6}$

烷基、 $-\text{SO}_2\text{N}(\text{R}^{9a})_2$ 、 $-\text{SO}_2\text{C}_{1-6}$ 烷基、 COR^{9b} 及氰基,并且其中所述单环杂芳基和取代的单环杂芳基具有 1-2 个独立地选自 N、O 及 S 组成的组的杂原子,前提条件是:

a) 当存在两个杂原子且一个是 O 时,那么另一个不能是 O 或 S,并且

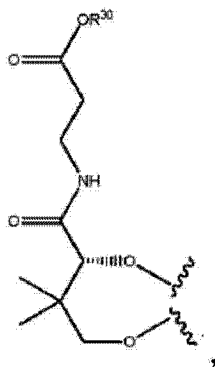
b) 当存在两个杂原子且一个是 S 时,那么另一个不能是 O 或 S;

R^{9a} 独立地是 H 或 C_{1-6} 烷基;

R^{9b} 是 $-\text{OR}^{9a}$ 或 $-\text{N}(\text{R}^{9a})_2$;

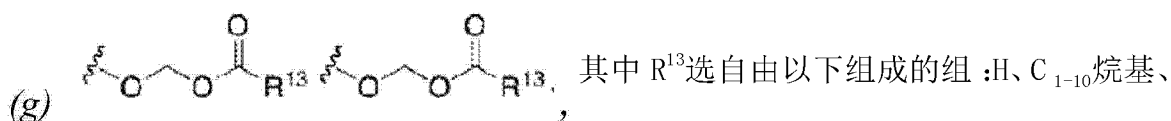
R^{9c} 是 H 或 C_{1-6} 酰基;

(f) R^2 和 R^3 可在一起形成环



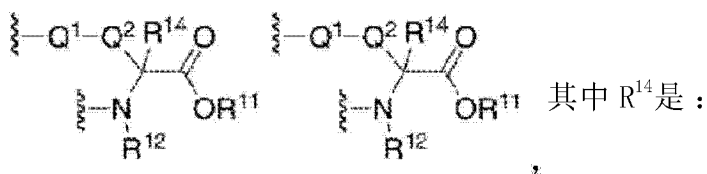
其中 R^{30} 是 H、 C_{1-20} 烷基、 C_{1-20} 烯基、来源于

脂肪醇的碳链或被以下取代的 C_{1-20} 烷基: C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基、二(C_{1-6} 烷基)-氨基、氟、 C_{3-10} 环烷基、 C_{3-10} 环烷基烷基、环杂烷基、芳基、杂芳基、取代的芳基或取代的杂芳基;其中所述取代基是 C_{1-5} 烷基或被 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基、二(C_{1-6} 烷基)-氨基、氟、 C_{3-10} 环烷基或 C_{3-10} 环烷基烷基取代的 C_{1-5} 烷基;



被以下取代的 C_{1-10} 烷基: C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基、二(C_{1-6} 烷基)-氨基、氟、 C_{3-10} 环烷基、 C_{3-10} 环烷基烷基、环杂烷基、芳基、杂芳基、取代的芳基或取代的杂芳基部分;其中所述取代基是 C_{1-5} 烷基、或被以下取代的 C_{1-5} 烷基: C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基、二(C_{1-6} 烷基)-氨基、氟、 C_{3-10} 环烷基或 C_{3-10} 环烷基烷基;

(h) R^2 和 R^3 可在一起形成环



(i) 独立地选自自由以下组成的组: H、 C_{1-10} 烷基、 $-(\text{CH}_2)_r\text{NR}_2^{9a}$ 、 C_{1-6} 羟烷基、 $-\text{CH}_2\text{SH}$ 、 $-(\text{CH}_2)_2\text{S}(\text{O})_p\text{Me}$ 、 $-(\text{CH}_2)_3\text{NHC}(=\text{NH})\text{NH}_2$ 、(1H-吡啶-3-基)甲基、(1H-咪唑-4-基)甲基、 $-(\text{CH}_2)_m\text{COR}^{9b}$ 、芳基、芳基- C_{1-3} 烷基、杂芳基及杂芳基- C_{1-3} 烷基,其中所述芳基和杂芳基任选地被选自自由以下组成的组的基团取代:羟基、 C_{1-10} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基、卤素、硝基及氰基;

(ii) R^{14} 是 H、 CH_3 、 CH_2CH_3 、 $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ 、 $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ 、 $\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$ 、 CH_2Ph 、 CH_2 -吡啶-3-基、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SCH}_3$ 、 $\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$ 、 $\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$ 、 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ 、 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$ 、 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ 、 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHC}(\text{NH})\text{NH}_2$ 、 CH_2 -咪唑-4-基、 CH_2OH 、 $\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$ 、 $\text{CH}_2((4'-\text{OH})-\text{Ph})$ 、 CH_2SH 或 C_{3-10} 环

烷基；

p 是 0 至 2；

r 是 1 至 6；

m 是 0 至 3

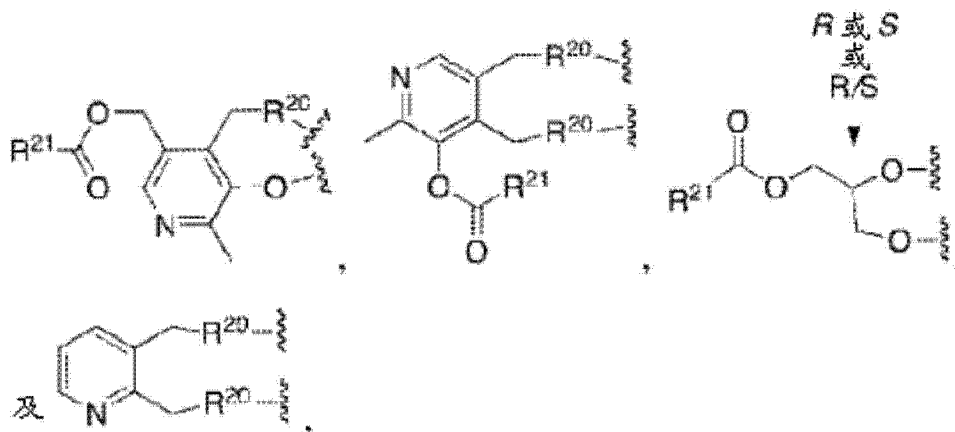
Q^1 是 NR^{9a} 、O 或 S

Q^2 是 C_{1-10} 烷基、 C_{1-6} 羟烷基、芳基和芳基- C_{1-3} 烷基、杂芳基及杂芳基- C_{1-3} 烷基，所述芳基和杂芳基任选地被选自以下组成的组的基团取代：羟基、 C_{1-10} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基、氟及氯；

R^{11} 是 H、 C_{1-10} 烷基、被以下取代的 C_{1-10} 烷基： C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基、二(C_{1-6} 烷基)-氨基、氟、 C_{3-10} 环烷基、 C_{3-10} 环烷基烷基、环杂烷基、芳基、杂芳基、取代的芳基或取代的杂芳基部分；其中所述取代基是 C_{1-5} 烷基、或被以下取代的 C_{1-5} 烷基： C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基、二(C_{1-6} 烷基)-氨基、氟、 C_{3-10} 环烷基或 C_{3-10} 环烷基烷基；

R^{12} 是 H 或 C_{1-3} 烷基，或 R^{14b} 和 R^{12} 一起是 $(CH_2)_{2-4}$ 以便形成包含邻接的 N 和 C 原子的环；

(i) R^2 和 R^3 可在一起形成选自以下组成的环



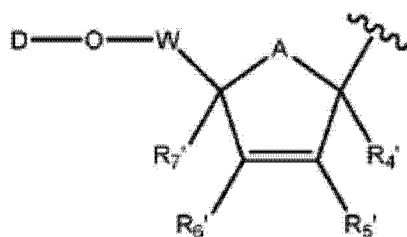
其中 R^{20} 是 O 或 NH，并且

R^{21} 选自以下组成的组：H、 C_{1-20} 烷基、 C_{1-20} 烯基、来源于脂肪酸的碳链、及被以下取代的 C_{1-20} 烷基： C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基、二(C_{1-6} 烷基)-氨基、氟、 C_{3-10} 环烷基、 C_{3-10} 环烷基烷基、环杂烷基、芳基、杂芳基、取代的芳基或取代的杂芳基；其中所述取代基是 C_{1-5} 烷基或被 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基、二(C_{1-6} 烷基)-氨基、氟、 C_{3-10} 环烷基或 C_{3-10} 环烷基烷基取代的 C_{1-5} 烷基，并且

(j) 当 R^3 是 OH、 O^-K^+ 、 O^-Li^+ 或 O^-Na^+ 时， R^2 是单磷酸酯或二磷酸酯。

7. 如权利要求 6 所述的化合物，其中 R^7 独立地选自以下组成的组：H、F、Cl、Br、I、 N_3 、 $C(O)OH$ 、CN、 CH_2OH 、 $C(O)NH_2$ 、 $C(S)NH_2$ 、 $C(O)OR$ 及 R。

8. 如权利要求 1 所述的化合物，其中糖是通式 (V) 的核糖或修饰的核糖：



(V)

其中：

D 是 H、C(O)R¹、C(O)OR¹、二磷酸酯或三磷酸酯；

R¹ 独立地是 C₁₋₂₀ 烷基、来源于脂肪醇的碳链或被以下取代的 C₁₋₂₀ 烷基：C₁₋₆ 烷基、C₁₋₆ 烷氧基、二 (C₁₋₆ 烷基)-氨基、氟、C₃₋₁₀ 环烷基、C₃₋₁₀ 环烷基烷基、环杂烷基、芳基、杂芳基、取代的芳基或取代的杂芳基；其中所述取代基是 C₁₋₅ 烷基、或被 C₁₋₆ 烷基、C₁₋₆ 烷氧基、二 (C₁₋₆ 烷基)-氨基、氟、C₃₋₁₀ 环烷基或 C₃₋₁₀ 环烷基烷基取代的 C₁₋₅ 烷基；

W 是 CL₂ 或 CL₂CL₂，其中 L 独立地选自由以下组成的组：H、C₁₋₆ 烷基、C₂₋₆ 烯基及 C₂₋₆ 炔基，

其中 C₁₋₆ 烷基、C₂₋₆ 烯基及 C₂₋₆ 炔基可各自任选地含有一个或多个杂原子；

A、R²、R³、Y、Z、R^{4'}、R^{5'}、R^{6'} 及 R^{7'} 如上关于权利要求 1-3 所定义；

其中当 A 是 O 或 S 时，R^{7'} 不能是 OH、SH、NH₂、NHOH、NHNH₂、OR、SR、SSR、NHR 及 NR₂，

其中 R 独立地是 C₁₋₆ 烷基、C₂₋₆ 烯基、C₂₋₆ 炔基、C₃₋₆ 环烷基、芳基、烷基芳基或芳基烷基，其中所述基团可被一个或多个如上关于权利要求 1-3 所定义的取代基取代，

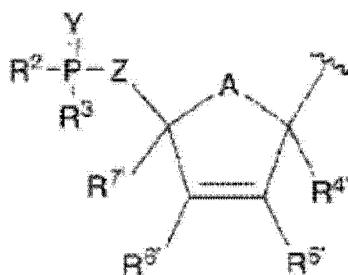
且其中，当 A 是 O 或 CH₂，D 是 H 或酰基，W 是 CH₂，R^{4'} 和 R^{7'} 是 H 时，R^{5'} 和 R^{6'} 不能是 H、卤素、OH、SH、OCH₃、SCH₃、NH₂、NHCH₃、CH₃、CH = CH₂、CN、CH₂NH₂、CH₂OH 或 COOH。

9. 如权利要求 8 所述的化合物，其中 R^{7'} 独立地选自由以下组成的组：H、F、Cl、Br、I、N₃、C(O)OH、CN、CH₂OH、C(O)NH₂、C(S)NH₂、C(O)OR 及 R，其中 R 独立地是 C₁₋₆ 烷基、C₂₋₆ 烯基、C₂₋₆ 炔基、C₃₋₆ 环烷基、芳基、烷基芳基或芳基烷基，其中所述基团可被一个或多个如上关于式 I、II、III 及 IV 所定义的取代基取代。

10. 如权利要求 8 所述的化合物，其中 R^{5'} 和 R^{6'} 独立地选自由以下组成的组：NHOH、NHNH₂、N₃、C(O)NH₂、C(S)NH₂、C(O)OR、R、OR、SR、SSR、NHR 及 NR₂。

11. 如权利要求 8 所述的化合物，其中当 A 是 O 或 CH₂，D 是 H 或酰基，W 是 CH₂，R^{4'} 和 R^{7'} 是 H 时，R^{5'} 和 R^{6'} 不能是 H、卤素、OH、SH、OCH₃、SCH₃、NH₂、NHCH₃、CH₃、CH = CH₂、CN、CH₂NH₂、CH₂OH 或 COOH。

12. 如权利要求 1 所述的化合物，其中糖是通式 (VI) 的修饰的核糖：



(VI)

其中：

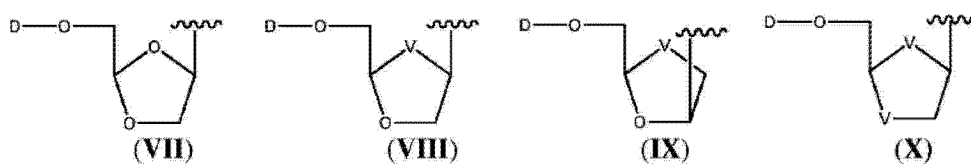
A、R²、R³、Y、Z、R⁴、R⁵、R⁶及R⁷如上关于权利要求1-3所定义；

其中当A是O或S时，R⁷不能是OH、SH、NH₂、NHOH、NHNH₂、OR、SR、SSR、NHR或NR₂，

其中R独立地是C₁-C₆烷基、C₂-C₆烯基、C₂-C₆炔基、C₃-C₆环烷基、芳基、烷基芳基或芳基烷基，其中所述基团可任选地被一个或多个如上关于权利要求1-3所定义的取代基取代。

13. 如权利要求12所述的化合物，其中R⁷独立地选自由以下组成的组：H、F、Cl、Br、I、N₃、C(O)OH、CN、CH₂OH、C(O)NH₂、C(S)NH₂、C(O)OR及R。

14. 如权利要求1所述的化合物，其中糖是通式(VII)、(VIII)、(IX)及(X)的二氧戊环、氧硫杂环戊烷或二硫戊环：



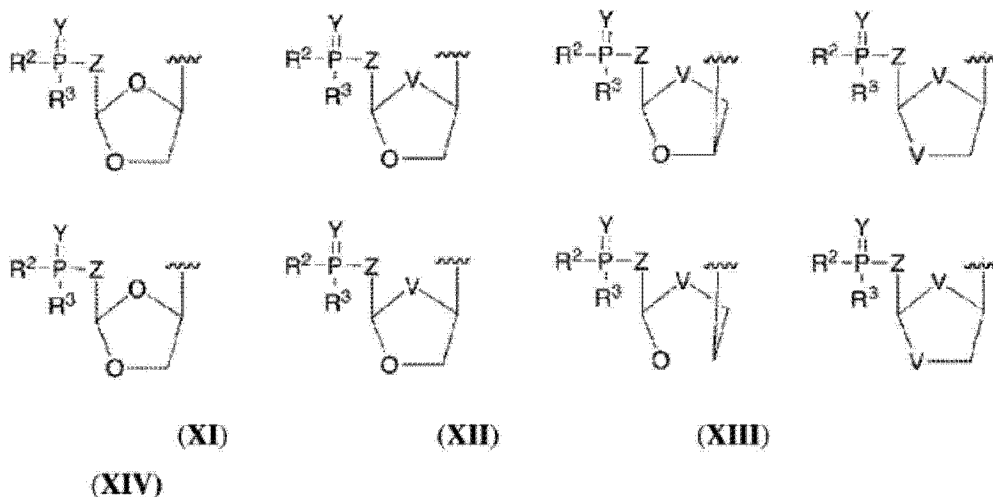
D是H、C(O)R¹、C(O)OR¹、二磷酸酯或三磷酸酯；

V个别地是S或Se；

R¹独立地是C₁₋₂₀烷基、来源于脂肪醇的碳链或被以下取代的C₁₋₂₀烷基：C₁-C₆烷基、C₁-C₆烷氧基、二(C₁-C₆烷基)-氨基、氟、C₃₋₁₀环烷基、C₃₋₁₀环烷基烷基、环杂烷基、芳基、杂芳基、取代的芳基或取代的杂芳基；其中所述取代基是C₁₋₅烷基、或被C₁-C₆烷基、C₁-C₆烷氧基、二(C₁-C₆烷基)-氨基、氟、C₃₋₁₀环烷基或C₃₋₁₀环烷基烷基取代的C₁₋₅烷基；

其中D不能是H或酰基。

15. 如权利要求1所述的化合物，其中糖是通式(XI)、(XII)、(XIII)及(XIV)的二氧戊环、氧硫杂环戊烷或二硫戊环：

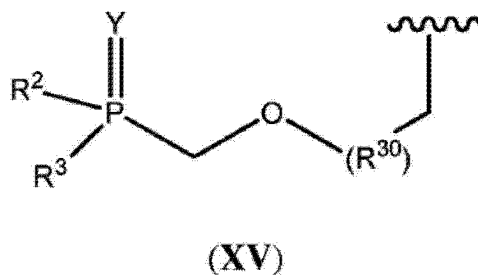


其中：

V 个别地是 S 或 Se；

R²、R³、Y 及 Z 如上关于权利要求 1-3 所定义。

16. 如权利要求 1 所述的化合物，其中糖是通式 (XV) 的磷酰基甲氧基烷基：

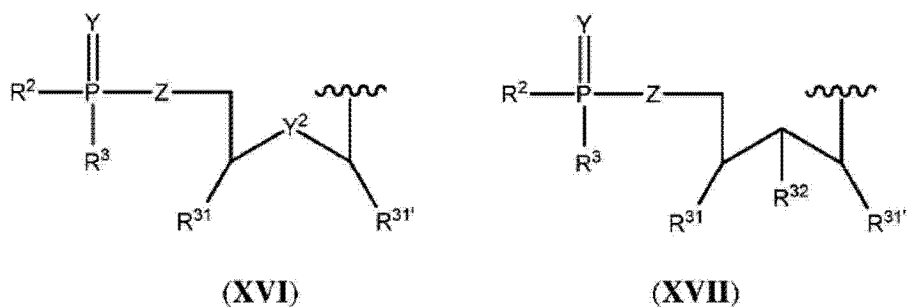


其中：

R²、R³及 Y 如上关于权利要求 1-3 所定义；并且

R³⁰选自由以下组成的组：C₁₋₂₀烷基、C₂₋₂₀烷基、C₂₋₂₀烯基、C₂₋₂₀炔基、C₃₋₁₀环烷基、芳基、杂芳基、芳基烷基及烷基芳基。

17. 如权利要求 1 所述的化合物，其中糖具有通式 (XVI) 或 (XVII)：



其中：

R²、R³、Z 及 Y 如上面在权利要求 1-3 中所定义；

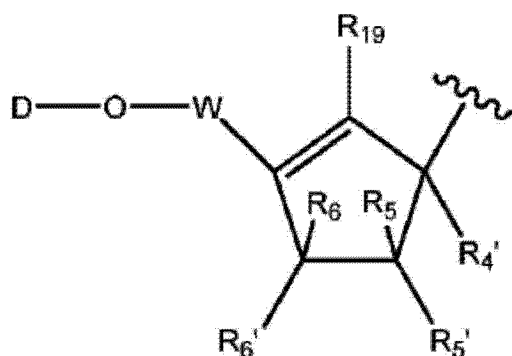
Y²是 O、S、Se 或 NR；

R 独立地是 C₁-C₆烷基、C₂-C₆烯基、C₂-C₆炔基、C₃-C₆环烷基、芳基、烷基芳基或芳基烷基，其中所述基团可被一个或多个如上面在权利要求 1 中所定义的取代基取代，

R³¹、R^{31'}及 R³²是 H、CH₃或 CH₂OR³³；并且

R^{33} 是 H 或 C_1-C_6 酰基。

18. 如权利要求 1 所述的化合物, 其中糖是通式 (XVIII) 的修饰的核糖:



(XVIII)

其中:

D、W、 $R^{4'}$ 、 R^5 、 $R^{5'}$ 、 R^6 及 $R^{6'}$ 如上面在权利要求 1-3 中所定义;

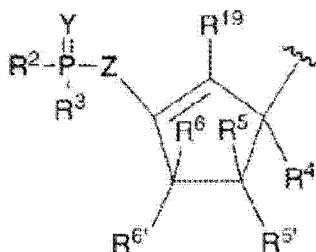
R^{19} 是 H、F、Cl、Br、I、 N_3 、 $C(O)OH$ 、CN、 $C(O)NH_2$ 、 $C(S)NH_2$ 、 $C(O)OR$ 或 R;

其中 R 独立地是 C_1-C_6 烷基、 C_2-C_6 烯基、 C_2-C_6 炔基、 C_3-C_6 环烷基、芳基、烷基芳基或芳基烷基, 其中所述基团被一个或多个如上所定义的取代基取代,

其中, 当 D 是 H 或酰基, W 是 CH_2 , $R^{4'}$ 和 R^{19} 是 H 时, R^5 、 $R^{5'}$ 、 R^6 、 $R^{6'}$ 不能是 H、卤素、OH、SH、 OCH_3 、 SCH_3 、 NH_2 、 $NHCH_3$ 、 CH_3 、 $CH=CH_2$ 、CN、 CH_2NH_2 、 CH_2OH 或 $COOH$ 。

19. 如权利要求 18 所述的化合物, 其中 $R^{6'}$ 独立地选自由以下组成的组: $NHOH$ 、 $NHNH_2$ 、 N_3 、 $C(O)NH_2$ 、 $C(S)NH_2$ 、 $C(O)OR$ 、R、OR、SR、SSR、NHR 及 NR_2 。

20. 如权利要求 1 所述的化合物, 其中糖是通式 (XIX) 的修饰的核糖:



(XIX)

其中:

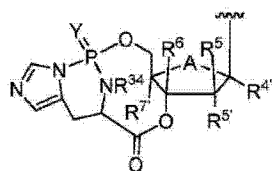
R^2 、 R^3 及 Y 如上关于权利要求 1-3 所定义;

$R^{4'}$ 、 R^5 、 $R^{5'}$ 、 R^6 及 $R^{6'}$ 如上面在权利要求 1-3 中所定义;

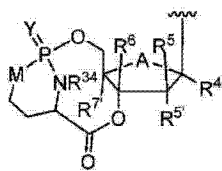
R^{19} 是 H、F、Cl、Br、I、 N_3 、 $C(O)OH$ 、CN、 $C(O)NH_2$ 、 $C(S)NH_2$ 、 $C(O)OR$ 或 R, 并且

其中 R 独立地是 C_1-C_6 烷基、 C_2-C_6 烯基、 C_2-C_6 炔基、 C_3-C_6 环烷基、芳基、烷基芳基或芳基烷基, 其中所述基团可任选地被一个或多个如上关于权利要求 1-3 所定义的取代基取代。

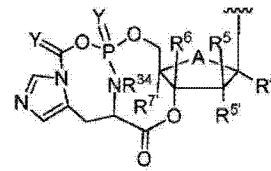
21. 如权利要求 1 所述的化合物, 其中糖具有式 (XX)、(XXI) 或 (XXII) 之一:



(XX)



(XXI)



(XXII)

其中：

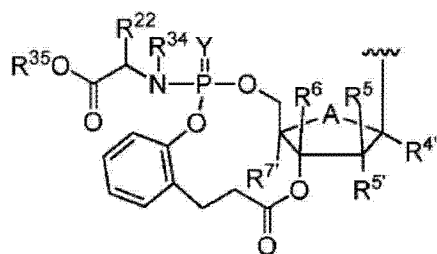
$R^{4'}$ 、 R^5 、 $R^{5'}$ 、 R^6 、 Y 、 A 及 $R^{7'}$ 如上关于权利要求 1-3 所定义；

R^{34} 是 C_1 - C_6 烷基；

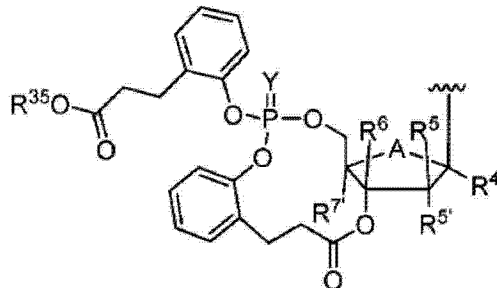
M 是 O 、 S 或 NR ；

其中 R 独立地是 C_1 - C_6 烷基、 C_{2-6} 烯基、 C_{2-6} 炔基、 C_3 - C_6 环烷基、芳基、烷基芳基或芳基烷基，其中所述基团可被一个或多个如上关于权利要求 1-3 所定义的取代基取代。

22. 如权利要求 1 所述的化合物，其中糖具有式 (XXIII) 或 (XXIV) 之一：



(XXIII)



(XXIV)

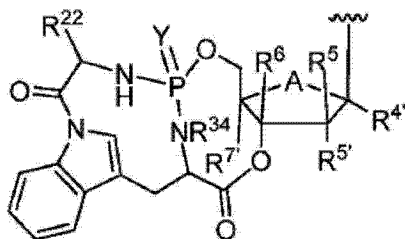
其中：

$R^{4'}$ 、 R^5 、 $R^{5'}$ 、 R^6 、 Y 、 A 、 $R^{7'}$ 、 R^{34} 如上关于权利要求 1-3 所定义；

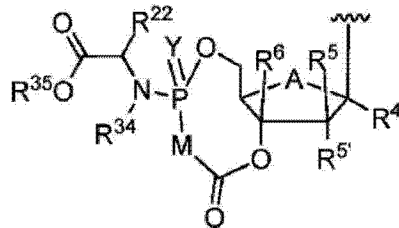
R^{35} 是 H 、 C_{1-10} 烷基、被以下取代的 C_{1-10} 烷基： C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基、二 (C_{1-6} 烷基)-氨基、氟、 C_{3-10} 环烷基、 C_{3-10} 环烷基烷基、环杂烷基、芳基、杂芳基、取代的芳基或取代的杂芳基部分；其中所述取代基是 C_{1-5} 烷基、或被以下取代的 C_{1-5} 烷基： C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基、二 (C_{1-6} 烷基)-氨基、氟、 C_{3-10} 环烷基或 C_{3-10} 环烷基烷基；并且

R^{22} 是 H 、 CH_3 、 CH_2CH_3 、 $CH(CH_3)_2$ 、 $CH_2CH(CH_3)_2$ 、 $CH(CH_3)CH_2CH_3$ 、 CH_2Ph 、 CH_2 - 吡啶-3-基、 $-CH_2CH_2SCH_3$ 、 CH_2CO_2H 、 $CH_2C(O)NH_2$ 、 CH_2CH_2COOH 、 $CH_2CH_2C(O)NH_2$ 、 $CH_2CH_2CH_2CH_2NH_2$ 、 $CH_2CH_2CH_2NHC(NH)NH_2$ 、 CH_2 - 咪唑-4-基、 CH_2OH 、 $CH(OH)CH_3$ 、 $CH_2((4'-OH)-Ph)$ 、 CH_2SH 或 C_{3-6} 环烷基。

23. 如权利要求 1 所述的化合物，其中糖具有式 (XXV) 或 (XXVI) 之一：



(XXV)

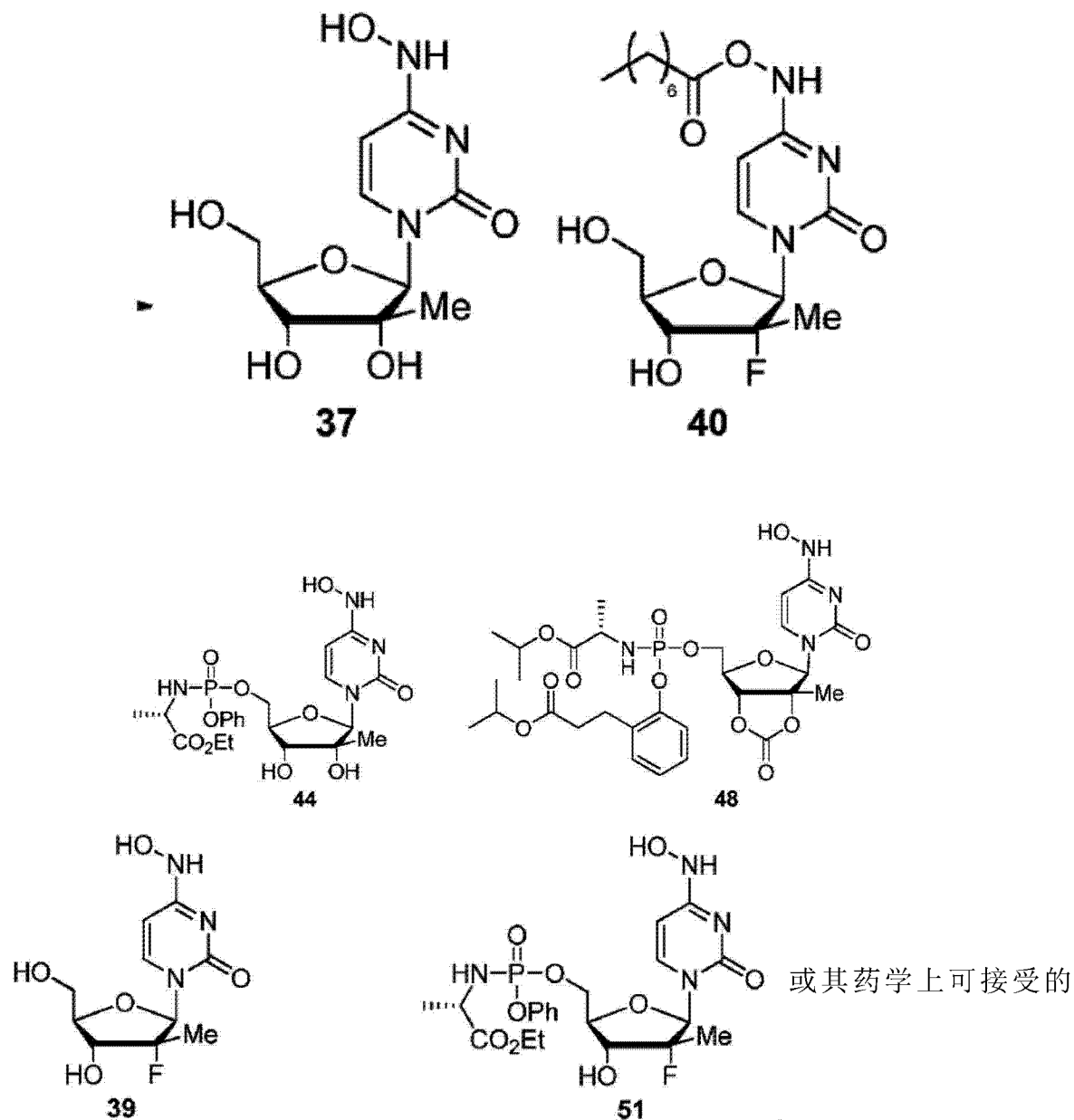


(XXVI)

其中：

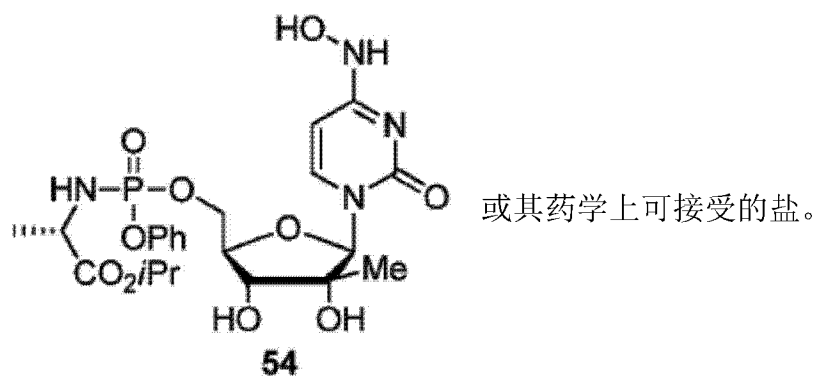
$R^{4'}$ 、 R^5 、 $R^{5'}$ 、 R^6 、 Y 、 M 、 $R^{7'}$ 、 R^{34} 、 R^{35} 、 R^{22} 如上关于权利要求 1-3 所定义。

24. 一种具有下式之一的化合物：



盐。

25. 一种下式的化合物：



26. 如权利要求 1-25 中任一项所述的化合物, 其中本文所述的化合物可呈以下形式: β -L- 或 β -D- 构型, 或其混合物, 包括其外消旋混合物。

27. 如权利要求 1-25 中任一项所述的化合物, 其中当本文所述的化合物的磷部分含有手性中心时, 这种手性中心可呈以下形式: R_p - 或 S_p - 构型或其混合物, 包括其外消旋混合物。

28. 一种用于治疗感染了 HIV-1 或 HIV-2 的宿主的方法, 其包括向需要这种治疗的患者施用有效量的如权利要求 1 至 27 中任一项所述的化合物。

29. 一种用于预防 HIV-1 或 HIV-2 感染的方法, 其包括向需要这种预防的患者施用预防有效量的如权利要求 1 至 25 中任一项所述的化合物。

30. 一种用于降低宿主中的 HIV-1 或 HIV-2 感染的生物活性的方法, 其包括向需要这种治疗的患者施用有效量的如权利要求 1 至 25 中任一项所述的化合物。

31. 如权利要求 26 所述的方法, 其中所述 HIV-1 或 HIV-2 感染是由包含选自由 TAM 突变和 M184V 突变组成的组的突变的病毒引起。

32. 一种用于治疗感染了 HIV-1 或 HIV-2 的宿主的方法, 其包括施用与另一种抗 HIV 剂组合的有效量的在药学上可接受的载体中的如权利要求 1 至 24 中任一项所述的化合物。

33. 如权利要求 32 所述的方法, 其中所述 HIV-1 或 HIV-2 感染是由包含选自由 TAM 突变和 M184V 突变组成的组的突变的病毒引起。

34. 一种用于预防 HIV-1 或 HIV-2 感染的方法, 其包括向需要这种预防的患者施用与另一种抗 HIV 剂组合的预防有效量的在药学上可接受的载体中的如权利要求 1 至 25 中任一项所述的化合物。

35. 一种用于治疗感染了 HBV 的宿主的方法, 其包括向需要这种治疗的患者施用有效量的如权利要求 1 至 25 中任一项所述的化合物。

36. 一种用于预防 HBV 感染的方法, 其包括向需要这种预防的患者施用预防有效量的如权利要求 1 至 25 中任一项所述的化合物。

37. 一种用于降低宿主中的 HBV 感染的生物活性的方法, 其包括向需要这种治疗的患者施用有效量的如权利要求 1 至 25 中任一项所述的化合物。

38. 一种用于治疗感染了 HBV 的宿主的方法, 其包括施用与另一种抗 HBV 剂组合的有效量的在药学上可接受的载体中的如权利要求 1 至 25 中任一项所述的化合物。

39. 一种用于预防 HBV 感染的方法, 其包括向需要这种预防的患者施用与另一种抗 HBV 剂组合的预防有效量的在药学上可接受的载体中的如权利要求 1 至 25 中任一项所述的化

合物。

40. 一种用于治疗感染了诺瓦克病毒或札如病毒的宿主的方法,其包含向需要这种治疗的患者施用有效量的如权利要求 1 至 25 中任一项所述的化合物。

41. 一种用于预防诺瓦克病毒或札如病毒感染的方法,其包括向需要这种预防的患者施用预防有效量的如权利要求 1 至 25 中任一项所述的化合物。

42. 一种用于降低宿主中的诺瓦克病毒或札如病毒感染的生物活性的方法,其包括向需要这种治疗的患者施用有效量的如权利要求 1 至 25 中任一项所述的化合物。

43. 一种用于治疗感染了诺瓦克病毒或札如病毒的宿主的方法,其包括施用与另一种抗诺瓦克病毒或抗札如病毒剂组合的有效量的在药学上可接受的载体中的如权利要求 1 至 25 中任一项所述的化合物。

44. 一种用于预防诺瓦克病毒或札如病毒感染的方法,其包括向需要这种预防的患者施用与另一种抗诺瓦克病毒或抗札如病毒剂组合的预防有效量的在药学上可接受的载体中的如权利要求 1 至 25 中任一项所述的化合物。

45. 一种用于治疗感染了包括 HCV、黄热病、登革热及西尼罗病毒的黄病毒科病毒的宿主的方法,其包括向需要这种治疗的患者施用有效量的如权利要求 1 至 25 中任一项所述的化合物。

46. 一种用于预防包括 HCV、黄热病、登革热及西尼罗病毒的黄病毒科病毒的感染的方法,其包括向需要这种预防的患者施用预防有效量的如权利要求 1 至 25 中任一项所述的化合物。

47. 一种用于降低宿主中的包括 HCV、黄热病、登革热及西尼罗病毒的黄病毒科病毒感染的生物活性的方法,其包括向需要这种治疗的患者施用有效量的如权利要求 1 至 25 中任一项所述的化合物。

48. 一种用于治疗感染了包括 HCV、黄热病、登革热及西尼罗病毒的黄病毒科病毒的宿主的方法,其包括施用与另一种抗诺瓦克病毒或抗札如病毒剂组合的有效量的在药学上可接受的载体中的如权利要求 1 至 25 中任一项所述的化合物。

49. 一种用于预防包括 HCV、黄热病、登革热及西尼罗病毒的黄病毒科病毒的感染的方法,其包括向需要这种预防的患者施用与另一种抗诺瓦克病毒或抗札如病毒剂组合的预防有效量的在药学上可接受的载体中的如权利要求 1 至 25 中任一项所述的化合物。

50. 一种用于治疗感染了 HSV-1 或 HSV-2 的宿主的方法,其包括向需要这种治疗的患者施用有效量的如权利要求 1 至 25 中任一项所述的化合物。

51. 一种用于预防 HSV-1 或 HSV-2 感染的方法,其包括向需要这种预防的患者施用预防有效量的如权利要求 1 至 25 中任一项所述的化合物。

52. 一种用于降低宿主中的 HSV-1 或 HSV-2 感染的生物活性的方法,其包括向需要这种治疗的患者施用有效量的如权利要求 1 至 25 中任一项所述的化合物。

53. 一种用于治疗感染了 HSV-1 或 HSV-2 的宿主的方法,其包括施用与另一种抗 HSV-1 和 HSV-2 剂组合的有效量的在药学上可接受的载体中的如权利要求 1 至 25 中任一项所述的化合物。

54. 一种用于预防 HSV-1 或 HSV-2 感染的方法,其包括向需要这种预防的患者施用与另一种抗 HSV-1 或抗 HSV-2 剂组合的预防有效量的在药学上可接受的载体中的如权利要求 1

至 25 中任一项所述的化合物。

55. 一种用于治疗具有癌症的宿主的方法,其包括向需要这种治疗的患者施用有效量的如权利要求 1 至 25 中任一项所述的化合物。

56. 一种用于治疗具有癌症的宿主的方法,其包括施用与另一种抗癌剂组合的有效量的在药学上可接受的载体中的如权利要求 1 至 25 中任一项所述的化合物。

57. 如权利要求 28-56 中任一项所述的方法,其中所述化合物在生物系统中被转化为包含 4-NHOH、4-NH₂和 4-OH 嘧啶三磷酸酯的混合物 C 或 D 的化合物的混合物:



58. 如权利要求 1-27 中任一项所述的化合物在制备用于治疗感染了 HIV-1 或 HIV-2 的宿主、预防 HIV-1 或 HIV-2 感染、或降低宿主中的 HIV-1 或 HIV-2 感染的生物活性的药剂中的用途。

59. 如权利要求 59 所述的用途,其中所述药剂还包含另一种抗 HIV 剂。

60. 如权利要求 1-27 中任一项所述的化合物在制备用于治疗感染了 HBV 的宿主、预防 HBV 感染、或降低宿主中的 HBV 感染的生物活性的药剂中的用途。

61. 如权利要求 60 所述的用途,其中所述药剂还包含另一种抗 HBV 剂。

62. 如权利要求 1-27 中任一项所述的化合物在制备用于治疗感染了黄病毒科、诺瓦克病毒或札如病毒感染的宿主、预防黄病毒科、诺瓦克病毒或札如病毒感染、或降低宿主中的黄病毒科、诺瓦克病毒或札如病毒感染的生物活性的药剂中的用途。

63. 如权利要求 62 所述的用途,其中所述药剂还包含另一种抗黄病毒科、抗诺瓦克病毒或抗札如病毒剂。

64. 如权利要求 1-27 中任一项所述的化合物在制备用于治疗感染了 HSV-1 或 HSV-2 的宿主、预防 HSV-1 或 HSV-2 感染、或降低宿主中的 HSV-1 或 HSV-2 感染的生物活性的药剂中的用途。

65. 如权利要求 64 所述的用途,其中所述药剂还包含另一种抗 HSV-1 或抗 HSV-2 剂。

66. 如权利要求 1-27 中任一项所述的化合物在制备用于治疗癌症的药剂中的用途。

67. 如权利要求 67 所述的用途,其中所述药剂还包含另一种抗癌剂。

用于治疗病毒感染和癌症的嘧啶核苷及其单磷酸酯前药

技术领域

[0001] 本发明涉及使用核苷酸类似物治疗或预防病毒感染的化合物、方法及组合物。更具体地说,本发明描述 N⁴-羟基胞苷核苷衍生物及修饰的单磷酸酯前药类似物、其药学上可接受的盐或其它衍生物,以及其在治疗癌症或病毒感染、且特别是以下疾病中的用途:1) 人类免疫缺陷病毒 (HIV-1 和 HIV-2); 2) 黄病毒科病毒,包括丙型肝炎 (HCV)、西尼罗病毒、登革热病毒和黄热病; 3) 杯状病毒科感染,包括诺瓦克病毒和札如病毒; 4) HSV-1、HSV-2; 以及 5) 巨细胞病毒 (CMV); 6) 乙型肝炎病毒 (HBV) 感染。本发明教导如何制备 N⁴-羟基胞苷核苷衍生物,将其转化为治疗上相关的核苷酸前药并且最终将相应的核苷酸三磷酸酯在治疗上相关的浓度下递送至逆转录酶和聚合酶。

[0002] 发明背景

[0003] 作为一类的核苷类似物具有非常确定的调控史,目前有超过 10 种已得到美国食品与药物管理局 (US FDA) 的批准用于治疗人类免疫缺陷病毒 (HIV)、乙型肝炎病毒 (HBV)、单纯性疱疹 C 病毒 (HSV)。开发抗病毒疗法的挑战在于抑制病毒复制,而不会损害宿主细胞。

[0004] 丙型肝炎病毒 (HCV) 在全世界已经感染了超过一亿八千万人口。据估计每年有三至四百万人被新感染,70% 的人将发展为慢性肝炎。HCV 导致 50-76% 所有的肝癌病例,以及发达国家中所有肝移植的三分之二。标准疗法 [聚乙二醇化干扰素 α + 病毒唑 (核苷类似物)] 仅在 50-60% 的患者中有效且与明显的副作用有关。两种 HCV 蛋白酶抑制剂 Incivek 和 Victrelis 在 2011 年 5 月得到批准的标准护理的效果仍不清楚,因为两种药物都需要反应指导的疗法方案,这会将 IFN 疗法在具有早期病毒反应的感染者中的持续时间从 48 周缩短至短至 24 周,但对于当施用 IFN 和 RBV 时在仅约 70 至 80% 中存在的基因型 1 HCV 来说仍具有持续的病毒学反应 (SVR) (Sheridan, C. Nature Biotech. 2011, 29, 553)。因此,迫切需要新的 HCV 药物。

[0005] HCV 基因组包含包裹在核衣壳和脂质包膜中的正链 RNA 并且由 9.6kb 核糖核苷酸组成,其编码约 3000 个氨基酸的大多肽 (Dymock 等人 Antiviral Chemistry & Chemotherapy 2000, 11, 79)。成熟之后,此多肽被切割成至少 10 个蛋白。这些蛋白质中的一个, NS5B, 具有聚合酶活性并且涉及从充当模板的单链病毒 RNA 基因组合成双链 RNA。对于新型的抗病毒策略选择性地抑制 HCV 复制的发现由于缺乏用于 HCV 增殖的便利的细胞培养模型而长期受到阻碍。这个障碍首先在 1999 年通过建立 HCV 复制子系统而被克服 (Bartenschlager, R., Nat. Rev. Drug Discov. 2002, 1, 911-916 及 Bartenschlager, R., J. Hepatol. 2005, 43, 210-216), 并且在 2005 年,通过开发稳固的 HCV 细胞培养模型而得以解决 (Wakita, T., 等人, Nat. Med. 2005, 11, 791-6; Zhong, J., 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2005, 102, 9294-9; Lindenbach, B. D., 等人, Science 2005, 309, 623-6)。

[0006] HCV 复制可通过经由竞争性抑制 NS5B 蛋白操纵 NS5B 的聚合酶活性来防止。或者,链终止核苷类似物也可并入延长的 RNA 链中。目前,用于治疗 HCV 的最先进的核苷是 PSI-7977 (GS-7977), 其目前作为安全和有效的抗 HCV 剂处在 III 期临床试验中

(Sofia, M. J. ; Bao, D. ; Chang, W. ; Du, J. ; Nagarathnam, D. ; Rachakonda, S. ; Reddy, P. G. ; Ross, B. S. ; Wang, P. ; Zhang, H. -R ; Bansal, S. ; Espiritu, C ; Keilman, M. ; Lam, A. M. ; Micolochick Steuer, H. M. ; Niu, C ; Otto, M. J. ; Furman, P. A. J. Med. Chem. 2010, 53, 7202) 。关于 HCV NS5B 的核苷和核苷前药抑制剂的综述, 参见 : 1) Bobeck DR, Coats SJ, Schinazi RF. Advances in nucleoside monophosphate prodrugs as anti-hepatitis C virus agents. Antivir. Ther. 2010, 15, 935-50 ; 2) Ray AS, Hostetler KY. Application of kinase bypass strategies to nucleoside antivirals. Antiviral Res. 2011, 92, 277-91 ; 3) Sofia, M. J. ; Furman P. A. Symonds, W. T. 第 11 章, Accounts in Drug Discovery: Case Studies in Medicinal Chemistry by RSC ; 4) Brown, N. A. Progress towards improving antiviral therapy for hepatitis C with hepatitis C virus polymerase inhibitors. 第 I 部分 : Nucleoside analogues. Expert Opin. Invest. Drugs 2009, 709-725 ; 5) Beaulieu, P. L. Recent advances in the development of NS5B polymerase inhibitors for the treatment of hepatitis C virus infection. Expert Opin. Ther. Pat. 2009, 19, 145-164 ; 6) Koch, U. ; Narjes, F. Recent Progress in the Development of Inhibitors of the Hepatitis C Virus RNA-Dependent RNA Polymerase. Curr. Top. Med. Chem. 2007, 7, 1302-1329。

[0007] 近来, 若干专利申请 (包括 WO 09/086192、WO 12/040124、WO 12/040126、WO 12/040127、US 12/070415、WO 08/082601、WO 10/014134、WO 11/017389、WO 11/123586、WO 10/135569、WO 10/075549、WO 10/075554、WO 10/075517、WO 09152095、WO 08/121634、WO 05/03147、WO 99/43691、WO 01/32153、WO 01160315、WO 01179246、WO 01/90121、WO 01/92282、WO 02/48165、WO 02/18404、WO 02/094289、WO 02/057287、WO 02/100415 (A2)、US 06/040890、WO 02/057425、EP 1674104 (A1)、EP 1706405 (A1)、US 06/199783、WO 02/32920、US 04/6784166、WO 05/000864、WO 05/021568) 已经描述了作为抗 HCV 剂的核苷类似物。

[0008] 在 HIV 中, 用于药物开发的关键靶标是逆转录酶 (HIV-RT), 一种独特的病毒聚合酶。此酶最初在病毒复制周期中有活性并且将病毒的遗传信息从 RNA 转化成 DNA, 这是连续病毒复制所必需的过程。核苷逆转录酶抑制剂 (NRTI) 模拟天然的核苷。在三磷酸酯形式下, 每个 NRTI 与四种天然存在的 2'-脱氧核苷-5'-三磷酸酯 (dNTP) 中的一种竞争, 即 dCTP、dTTP、dATP 或 dGTP, 用于靠近 HIV-1 RT 的活性位点的结合和 DNA 链延长。

[0009] 逆转录是 HIV-1 复制周期中的必需事件并且是开发抗逆转录病毒药物的主要靶标 (参见 Parniak MA, Sluis-Cremer N. Inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase. Adv. Pharmacol. 2000, 49, 67-109 ; Painter GR, Almond MR, Mao S, Liotta DC. Biochemical and mechanistic basis for the activity of nucleoside analogue inhibitors of HIV reverse transcriptase. Curr. Top. Med. Chem. 2004, 4, 1035-44 ; Sharma PL, Nurpeisov V, Hernandez-Santiago B, Beltran T, Schinazi RF. Nucleoside inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. Curr. Top. Med. Chem. 2004, 4, 895-919)。已经鉴定出抑制 HIV-1 RT 的两种不同的化合物组。它们是核苷或核苷酸 RT 抑制剂 (NRTI) 和非核苷 RT 抑制剂 (NNRTI)。

[0010] NRTI 是在核糖上缺乏 3'-OH 基团的 2'-脱氧核糖核苷。它们是最早用于治疗

HIV-1 感染的药物并且它们保留几乎所有的抗逆转录病毒方案的整体组分。

[0011] 在 1985 年,据报道合成的核苷 3'-叠氮基-3'-脱氧胸苷(齐多夫定, AZT, 一种代表性的 NRTI) 抑制 HIV 的复制。从那时起,包括但不限于以下的若干其它 NRTI 已被证明对 HIV 是有效的: 2', 3'-双去氧肌苷(去羟肌苷, ddI)、2', 3'-二脱氧胞苷(扎西他滨, ddC)、2', 3'-双脱氧-2', 3'-二脱氢胸苷(司他夫定, d4T)、(-)-2', 3'-双脱氧-3'-硫杂胞苷(拉米夫定, 3TC)、(-)-2', 3'-双脱氧-5-氟-3'-硫杂胞苷(恩曲他滨, FTC)、(1S, 4R)-4-[2-氨基-6-(环丙基-氨基)-9H-嘌呤-9-基]-2-环戊烯-1-甲醇琥珀酸酯(阿巴卡韦, ABC)、(R)-9-(2-磷酸基甲氧丙基)腺嘌呤(PMPA, 替诺福韦地索普西富马酸盐)(TDF) 以及 (-)-碳环 2', 3'-二脱氢-2', 3'-双脱氧鸟嘌呤核苷(卡波韦)及其前药阿巴卡韦。在通过细胞激酶磷酸化为 5'-三磷酸酯之后,这些 NRTI 被并入病毒 DNA 的生长链中,造成链终止,因为它们缺乏 3'-羟基。

[0012] 一般说来,为了展现抗病毒活性, NRTI 必须通过宿主-细胞激酶代谢转化为其相应的三磷酸酯形式(NRTI-TP)。NRTI-TP 通过充当 DNA 合成的链终止剂来抑制 HIV-1 RT DNA 合成(参见 Goody RS, Muller B, Restle T. Factors contributing to the inhibition of HIV reverse transcriptase by chain terminating nucleotides in vitro and in vivo. FEBS Lett. 1991, 291, 1-5)。虽然含有一种或多种 NRTI 的组合疗法已经极大地降低与 AIDS 有关的发病率和死亡率,但获批准的 NRTI 可具有显著的局限性。这些局限性包括急性和慢性毒性、与其它抗逆转录病毒的药理学相互作用以及对其它 NRTI 展现交叉耐药性的 HIV-1 的耐药性变体的选择。

[0013] 在个体内的 HIV-1 耐药性是由病毒群体的遗传变异性和疗法对耐药性变体的选择所造成(参见 Chen R, Quinones-Mateu ME, Mansky LM. Drug resistance, virus fitness and HIV-1 mutagenesis. Curr. Pharm. Des. 2004, 10, 4065-70)。HIV-1 遗传变异是由于 HIV-1 RT 在复制期间不能校对核苷酸序列所致。此变异性通过高速的 HIV-1 复制、前病毒变体在 HIV-1 感染过程中的积聚以及当不同序列的病毒感染同一细胞时的遗传重组而得到增强。因此,无数的遗传学上不同的变体(称为准物种)在初始感染之后的岁月里在个体内进化。耐药性的发展取决于药物治疗期间病毒复制继续的程度、获得一个具体突变(或突变组)的便利性以及耐药性突变对药物敏感性和病毒适合度的影响。一般说来, NRTI 疗法选择在 RT 中具有突变的病毒。取决于所选的 NRTI 耐药性突变,突变病毒通常展现对一些或在某些情况下所有 NRTI 的敏感性的降低。从临床观点上说,耐药性 HIV-1 的发展通过有效地减少保留针对耐药性病毒的效力的可利用药物的数量来限制未来的治疗选择。这经常需要更复杂的药物方案,其涉及密集的给药方案和由于药物毒性所致的更大的严重副作用风险。这些因素经常促成对药物方案的不完全遵从性。因此,具有优良的活性和安全概况以及目前可利用的药物之间有限的或没有交叉耐药性的新型 NRTI 的开发是有效的 HIV-1 感染疗法的关键。

[0014] 对耐药性 HIV-1 有活性的核苷类似物的开发需要详细理解涉及对此类化合物有抗性的分子机制。因此,提供对 NRTI 有耐药性的 HIV-1 的突变和分子机制的简要概述。已经提出对 NRTI 有耐药性的 HIV-1 的两种动力学上不同的分子机制(参见 Sluis-Cremer N, Arion D, Parniak MA. Molecular mechanisms of HIV-1 resistance to nucleoside reverse transcriptase inhibitors(NRTIs). Cell Mol. Life Sci. 2000 ;57, 1408-22)。

一种机制涉及在病毒 DNA 合成期间 NRTI-TP 对比正常的 dNTP 掺入的选择性减少。这种抗性机制被称为辨别 (discrimination)。第二机制涉及从提前终止的 DNA 链上选择性除去链终止的 NRTI- 单磷酸酯 (NRTI-MP) (参见 Arion D, Kaushik N, McCormick S, Borkow G, Parniak MA. Phenotypic mechanism of HIV-1 resistance to 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT): increased polymerization processivity and enhanced sensitivity to pyrophosphate of the mutant viral reverse transcriptase. *Biochemistry*. 1998, 37, 15908-17; Meyer PR, Matsuura SE, Mian AM, So AG, Scott WA. A mechanism of AZT resistance: an increase in nucleotide-dependent primer unblocking by mutant HIV-1 reverse transcriptase. *Mol. Cell*. 1999, 4, 35-43)。这种机制被称为切除。

[0015] 辨别机制涉及在 RT 中获得一个或多个抗性突变, 这改善了酶辨别天然 dNTP 底物与 NRTI-TP 的能力。在这点上, 抗性通常与 NRTI-TP 掺入的降低的催化效率有关。NRTI-TP (和 dNTP) 催化效率是由以下两种动力学参数驱动: (i) 核苷酸对于 RT 聚合酶活性位点的亲和力 (K_d) 以及 (ii) 核苷酸掺入的最大速率 (k_{pol}), 这两者都可使用预稳态动力学分析来确定 (参见 Kati WM, Johnson KA, Jerva LF, Anderson KS. Mechanism and fidelity of HIV reverse transcriptase. *J. Biol. Chem*. 1992, 26:25988-97)。

[0016] 对于 NRTI 抗性的切除机制, 突变 HIV-1 RT 不能在核苷酸掺入步骤时辨别天然 dNTP 底物与 NRTI-TP (参见 Kerr SG, Anderson KS. Pre-steady-state kinetic characterization of wild type and 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT) resistant HIV-1 RT: implication of RNA directed DNA polymerization in the mechanism of AZT resistance. *Biochemistry*. 1997, 36, 14064-70)。反之, 含有“切除”突变的 RT 显示出在生理浓度的 ATP (通常在 0.8-4mM 范围内) 或焦磷酸盐 (PPi) 存在下解阻断 NRTI-MP 终止的引物的提高的能力 (参见 Arion D, Kaushik N, McCormick S, Borkow G, Parniak MA. Phenotypic mechanism of HIV-1 resistance to 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT): increased polymerization processivity and enhanced sensitivity to pyrophosphate of the mutant viral reverse transcriptase. *Biochemistry*. 1998, 37, 15908-17; Meyer PR, Matsuura SE, Mian AM, So AG, Scott WA. A mechanism of AZT resistance: an increase in nucleotide-dependent primer unblocking by mutant HIV-1 reverse transcriptase. *Mol. Cell*. 1999, 4, 35-43)。与切除机制有关的 NRTI 抗性突变包括胸苷类似物突变 (TAMS) 和 T69S 插入突变。

[0017] 引起严重的人类健康问题的另一种病毒是乙型肝炎病毒 (HBV)。HBV 作为人类癌症病因仅在烟草之后处于第二位。HBV 诱发癌症的机制是未知的。据推测, 它可直接触发肿瘤发展, 或经由慢性炎症、肝硬化和与感染有关的细胞再生间接地触发肿瘤发展。

[0018] 2 至 6 个月的温育期之后 (在此期间宿主通常不知道感染), HBV 感染可造成急性肝炎和肝脏损伤, 导致腹痛、黄疸和某些酶的血液水平的升高。HBV 可引起暴发型肝炎, 这是一种快速进行性、经常致命的疾病形式, 其中大部分肝脏被破坏。

[0019] 患者通常从 HBV 感染的急性期中痊愈。然而, 在一些患者中, 病毒继续复制延长的或不确定的时间, 造成慢性感染。慢性感染可导致慢性持续性肝炎。感染了慢性持续性 HBV 的患者在发展中国家中最常见。截至 1991 年中期, 仅在亚洲就有大约 2 亿 2 千 5 百万 HBV

的慢性携带者且全世界有将近 3 亿携带者。目前 (2012 年 7 月), 据 WHO 估计全世界有二十亿人已感染了乙型肝炎病毒并且超过 2 亿 4 千万具有慢性 (长期) 肝脏感染。约 600,000 人每年死于乙型肝炎的急性或慢性后果。慢性持续性肝炎可引起疲劳、肝硬化和肝细胞癌 (一种原发性肝癌)。

[0020] 在工业化国家中, HBV 感染的高风险群组包括与 HBV 携带者或其血液样品接触的那些人。HBV 的流行病学非常类似于 HIV/AIDS, 这是为什么 HBV 感染在感染了 HIV 或患有 AIDS 的患者中常见的原因。然而, HBV 比 HIV 更具传染性。

[0021] 3TC (拉米夫定)、干扰素 α -2b、聚乙二醇化干扰素 α -2a、贺维力 (阿德福韦酯)、贝乐克 (恩替卡韦) 及替泽卡 (替比夫定) 是目前用于治疗 HBV 感染的 FDA 批准的药物。然而, 一些药物具有严重的副作用, 且病毒耐药性在用这些药物治疗的患者中快速发展。

[0022] 诺瓦克病毒是在非包膜正链 RNA 杯状病毒科中发现的四种病毒属中的一种。杯状病毒科中的其它三个物种是兔病毒、囊病毒和札如病毒。札如病毒是除了将人作为宿主的诺瓦克病毒外的属中的唯一成员。诺瓦克病毒基因组是大约 7.56kb, 具有三个开放阅读框架 (ORF)。第一个 ORF 编码包括解旋酶、蛋白酶和 RNA 指导的 RNA 聚合酶 (RDRP) 的非结构蛋白, 这些酶全部都是复制病毒所需要的。剩余的两个 ORF 编码衣壳蛋白 (Jiang, X. (1993) *Virology* 195(1):51-61)。已将众多的诺瓦克病毒株分为 5 个基因组, 其中 I、IV 和 V 感染人 (Zheng, D. P., 等人 (2006) *Virology* 346(2):312-323) 并且据 CDC 估计引起大约 2 千 3 百万肠胃炎病例, 相当于美国每年 40% 的食物传染性疾病 (Mead P. S. (1999) *Emerg. Infect. Dis.* 5(5):607-625)。

[0023] 常见症状是呕吐、腹泻及肠痉挛。呕吐是儿童中最常见的症状, 而腹泻在受感染的成人中更常见。脱水是一个重要问题。由于此病毒所致的丧命在美国每年有约 300 个患者, 并且这些死亡通常发生在具有薄弱的免疫系统的患者中 (Centers for Disease Control and Prevention. "Norwalk-like viruses:" public health consequences and outbreak management. *MMWR* 2001 ;50 (No. RR-9):3)。从对完全感染的暴露开始的温育期通常是 24 小时至 48 小时, 其中有大约 30% 受感染的个体不显示症状。症状一般持续 24 至 60 小时 (Adler, J. L. 和 Zickl, R., J. (1969) *Infect. Dis.* 119:668-673)。病毒脱落可持续感染之后长达 2 周, 然而, 并不清楚此病毒是否具有传染性。

[0024] 诺瓦克病毒主要通过粪-口途径经由污染的食物或水、人与人的接触、呕吐或粪便样品的气溶胶来传播。粪便样品中的病毒滴度可达到每毫升 10^6 至 10^7 个颗粒, 并且颗粒在 0°C (32°F) 至 60°C (140°F) 的温度下是稳定的 (Duizer, E. 等人, (2004) *Appl. Environ. Microbiol.* 70(8):4538-4543)。病毒是高度传染性的, 并且各种来源提示感染可能需要少至 10 至 100 个病毒颗粒的接种 (Centers for Disease Control and Prevention. "Norwalk-like viruses:" public health consequences and outbreak management. *MMR* 2001 ;50 (第 RR-9 期):3-6)。这导致在学校、疗养院、旅游客轮、医院或人群聚集的其它场所中的流行。

[0025] 诺瓦克样 (Norwalk-like) 病毒被命名为诺瓦克病毒, 这是一个来源于 1968 年在俄亥俄州的诺瓦克的学校中的爆发的名称。造成诺瓦克疾病的病毒颗粒在 1972 年在三组人志愿者的直肠拭子滤液的传代之后通过免疫电子显微镜术来鉴定 (Kapikian, A. Z. 等人 (1972) *J. Virol.* 10:1075-1081)。在接下来的时间里, 病毒因其电子显微图像而被称为小圆

结构病毒；杯状病毒，因为它是杯状病毒科的成员；和 / 或在最初分离株之后大概最常用的诺瓦克样病毒。该病毒的常见名称包括冬季呕吐病毒、胃流感、食物中毒以及病毒性胃肠炎。虽然感染的后果通常并不危急生命，但机构使用的成本损失以及生产率的损失很大，且因此非常需要一种用于治疗人的诺瓦克病毒感染的疗法。

[0026] 目前没有被批准用于诺瓦克病毒感染的药物治疗 (<http://www.cdc.gov/ncidod/dvrd/revb/gastro/norovirus-qa.htm>)，并且这大概至少部分是由于缺乏细胞培养系统的可用性。近来，已经开发用于原始的诺瓦克 G-I 毒株的复制子系统 (Chang, K. O., 等人 (2006) *Virology* 353:463-473)。诺瓦克病毒复制子和丙型肝炎复制子都需要病毒解旋酶、蛋白酶和聚合酶的作用以便进行复制子的复制。最近，已经报道利用诺瓦克病毒基因组 I 和 II 接种体的体外细胞培养传染性测定 (Straub, T. M. 等人 (2007) *Emerg. Infect. Dis.* 13(3):396-403)。此测定是在利用微载体珠上的小肠上皮细胞的旋转壁生物反应器中进行，并且至少最初似乎难以用此系统筛选有意义数量的化合物。最终，传染性测定可适用于筛选进入抑制剂。其他集团如 Ligocyte Pharmaceuticals, Inc. (<http://www.ligocyte.com/>) 关注设法开发一种针对诺瓦克病毒的疫苗，然而，这些努力尚未成功并且可能证明经常在低复制酶保真度是一个革命性益处的病毒系统中出现的情况是困难的。

[0027] 增殖性病症是一种严重危急生命的疾病并且几十年来已进行了深入的研究。癌症现在是美国的第二主要死亡原因，且超过 500,000 人每年死于此增殖性病症。肿瘤是细胞生长不受调控的混乱的增殖。肿瘤是恶性的或癌性的，如果它具有侵袭性和转移特性的话。侵袭性是指肿瘤进入周围组织，穿透限定组织边界的基层层，进而常常进入身体的循环系统中的倾向。转移是指肿瘤迁移到身体其它区域并且确立远离初始出现部位的增殖区域的倾向。

[0028] 癌症在分子水平上还没有被完全理解。众所周知，细胞向致癌物如某些病毒、某些化学品或辐射的暴露导致 DNA 改变，这种改变使“抑制”基因失活或“致癌基因”激活。抑制基因是生长调控基因，其一旦突变，便不再能控制细胞生长。致癌基因最初是正常基因（称为前致癌基因），其通过突变或表达环境的改变而变为转化基因。转化基因的产物造成不适当的细胞生长。超过二十种不同的正常细胞基因可通过遗传变化变为致癌基因。转化的细胞在许多方面不同于正常细胞，包括细胞形态、细胞与细胞的相互作用、膜含量、细胞骨架结构、蛋白质分泌、基因表达以及死亡（转化的细胞可无限生长）。

[0029] 身体的所有不同的细胞类型均可转变成良性或恶性肿瘤细胞。最常见的肿瘤部位是肺，其次是结肠直肠、乳腺、前列腺、膀胱、胰腺以及卵巢。其它常见的癌症类型包括白血病、中枢神经系统癌症，包括脑癌、黑色素瘤、淋巴瘤、红白血病、子宫癌以及头颈癌。

[0030] 癌症目前主要用以下三种方式的疗法中的一种或组合来治疗：手术、辐射及化疗。手术涉及患病组织的整体摘除。虽然手术有时在摘除位于某些部位（例如乳腺、结肠和皮肤）的肿瘤中是有效的，但其不能用于治疗位于其它区域如脊椎中的肿瘤或治疗扩散性肿瘤病状如白血病。

[0031] 化疗涉及细胞复制或细胞代谢的破坏。它最常用于治疗白血病以及乳腺癌、肺癌和睾丸癌。目前存在五种主要类别的化疗剂用于治疗癌症：天然产物及其衍生物；蒽环霉素类；烷化剂；抗增殖剂（又称为抗代谢物）；以及激素剂。化疗剂经常被称为抗肿瘤剂。

[0032] 已经鉴定展现抗癌活性的若干合成核苷如 5- 氟尿嘧啶。5- 氟尿嘧啶已在临床上

用于治疗恶性肿瘤,包括例如癌瘤、肉瘤、皮肤癌、消化器官癌以及乳腺癌。然而,5-氟尿嘧啶引起严重的不良反应,如恶心、脱发、腹泻、口炎、白细胞血小板减少、厌食、色素沉着及浮肿。

[0033] 尽管有疫苗的可用性 (Crit. Rev. Clin. Lab. Sci. 2004, 41, 391-427), 但黄热病病毒 (YFV) 仍然是一种严重的人类健康问题, 每年造成大约 30,000 人死亡。YFV 是最致命性的人类病毒感染之一 (Expert Rev. Vaccines 2005, 4, 553-574.)。在受感染的个体中, 大约 15% 将发展成严重的疾病, 在那些个体中有 20 至 50% 的病死率。没有被批准的对于治疗 YFV 有特异性的疗法。治疗是症状性 - 停止 (symptomatic-rest) 流体, 并且布洛芬、萘普生、醋氨酚或扑热息痛可减轻发热和疼痛症状。应当避免阿斯匹林。虽然病毒流行至非洲和南美洲, 但 YFV 也可能在这些地区之外的地方爆发且已有这种输入病例的报道 (J. Travel Med. 2005, 12 (增刊 1), S3-S11)。

[0034] 西尼罗病毒 (WNV) 来自黄病毒科且主要引起蚊传播的疾病。它首先在 1937 年于乌干达的西尼罗河地区被发现。根据来自疾病控制和预防中心的报道, 已在非洲、中东、欧洲、大洋洲、西亚和中亚以及北美洲发现 WNV。其在北美洲的首次出现是在 1999 年纽约市的大都市地区。它在北美洲是季节性流行的, 一般在夏季爆发且持续到秋季, 呈现出对环境卫生的威胁。它的自然循环是鸟 - 蚊 - 鸟和哺乳动物。蚊子、特别是尖音库蚊物种当以受感染的鸟为食时变得受感染。受感染的蚊子然后当其叮咬时将 WNV 传播给其它鸟和包括人的哺乳动物。在人和马中, 致命性脑炎是 WNV 感染最严重的表现。WNV 还可在一些受感染的鸟中引起死亡。没有用于 WNV 感染的特异性治疗。在具有轻度症状的病例中, 人们经受在其自身传递的如发热和疼痛的症状, 尽管甚至健康的人也会患病几周。在更严重的病例中, 人们通常需要去医院, 在那里他们可以接受支持治疗。

[0035] 登革热感染也来自黄病毒科并且是新加坡最重要的虫媒传播感染 (Epidemiol News Bull 2006, 32, 62-6)。在全球, 每年估计有 5 千万至 1 亿登革热 (DF) 病例以及几十万登革热出血热 (DHF) 病例且平均病死率是 5%。许多患者从具有最少或没有残余疾病的登革热感染中痊愈。登革热感染通常是无症状的, 但可表现出典型的登革热、登革出血热或登革热休克综合征。甚至对于门诊患者, 对维持足够的水合的需要也是非常重要的。登革热感染可通过静脉内补液疗法得到有效的控制, 并且如果及早诊断, 病死率可保持低于 1%。为了控制疼痛和发热, 疑似具有登革热感染的患者都应给予醋氨酚制剂。阿斯匹林和非甾族抗炎药疗法可加重与一些登革热感染有关的出血倾向。然而, 先前所述的登革热感染的一些表现包括肝功能衰竭 (Dig Dis Sci 2005, 50, 1146-7)、脑病 (J Trop Med Public Health 1987, 18, 398-406)、以及格林 - 巴利综合征 (Intern Med 2006, 45, 563-4)。

[0036] 鉴于获得性免疫缺陷综合征、AIDS- 相关复合物、HCV、诺瓦克病毒、札如病毒、HSV-1、HSV-2、登革热病毒、黄热病、癌症以及 HBV 在全球已经达到警戒水平且对受影响的患者具有显著且在一些情况下悲剧性影响的事实, 仍强烈需要提供治疗这些疾病的新的有效药剂, 其中的药剂对宿主具有低毒性。

[0037] 有利的是, 提供新的抗病毒或化疗剂、包含这些试剂的组合物以及使用这些试剂的治疗方法, 特别是用于治疗耐药性癌症或突变病毒。本发明提供这种试剂、组合物及方法。

[0038] 发明概述

[0039] 本发明提供用于治疗或预防宿主中的癌症和 HIV-1、HIV-2、HCV、诺瓦克病毒、札如病毒、HSV-1、HSV-2、登革热病毒、黄热病、巨细胞病毒 (CMV) 或 HBV 感染的化合物、方法及组合物。所述方法涉及施用治疗或预防有效量的至少一种如本文所述的化合物来治疗或预防癌症或 HIV-1、HIV-2、HCV、诺瓦克病毒、札如病毒、HSV-1、HSV-2、登革热病毒、黄热病、巨细胞病毒 (CMV) 或 HBV 的感染或施用足以降低这些疾病的生物活性的量。药物组合物包含与药学上可接受的载体或赋形剂组合的一种或多种本文所述的化合物, 所述化合物用于治疗具有癌症或感染了 HIV-1、HIV-2、HCV、诺瓦克病毒、札如病毒、HSV-1、HSV-2、登革热病毒、黄热病、巨细胞病毒 (CMV) 或 HBV 的宿主。所述制剂还可包含至少一种其它治疗剂。另外, 本发明包括用于制备这种化合物的方法。

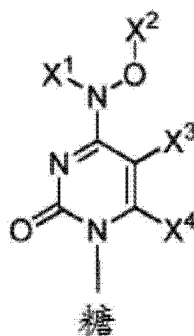
[0040] 与丙型肝炎复制子情况一样, 诺瓦克病毒复制子需要病毒解旋酶、蛋白酶和聚合酶的作用以便进行复制子的复制。复制子可用于高通量测定中, 所述测定评价有待就活性被筛选的化合物是否抑制诺瓦克病毒解旋酶、蛋白酶和 / 或聚合酶发挥作用的能力, 如通过抑制复制子的复制所证明。

[0041] 本文所述的化合物包括 β -D 和 β -L-N⁴- 羟基胞苷核苷衍生物及修饰的单磷酸酯、磷酸酯前药。在一个实施方案中, 活性化合物具有式 (I) :

[0042] 另外, 本文所述的化合物是 HIV-1、HIV-2、HCV、诺瓦克病毒、札如病毒、疱疹病毒 (HSV-1、HSV-2)、登革热病毒、黄热病、巨细胞病毒 (CMV) 癌症和 / 或 HBV 的抑制剂。因此, 这些化合物还可用于治疗感染或合并感染有 HIV-1、HIV-2、HCV、诺瓦克病毒、札如病毒、HSV-1、HSV-2、登革热病毒、黄热病、癌症和 / 或 HBV 的患者。

[0043] 在一个实施方案中, 化合物是式 (I) 化合物 :

[0044]



(I)

[0045] 或其药学上可接受的盐或前药, 其中 :

[0046] i) X¹ 是 H、C₁-C₆烷基、C₁-C₆卤烷基、C₁-C₆烷氧基、C₂-C₆烯基、C₂-C₆炔基、COR¹或 COOR¹;

[0047] ii) X² 是氢、COR¹或 COOR¹

[0048] 其中每个 R¹独立地是 CH₂-O(CO)-X⁵、CH₂-O(CO)O-X⁵、C₁₋₂₀烷基、来源于脂肪醇的碳链或被以下取代的 C₁₋₂₀烷基 : C₁-C₆烷基、烷氧基、二 (C₁-C₆烷基)-氨基、氟、C₃₋₁₀环烷基、环烷基烷基、环杂烷基、芳基、杂芳基、取代的芳基或取代的杂芳基 ; 其中所述取代基是 C₁₋₆烷基、或被 C₁-C₆烷基、C₁-C₆烷氧基、二 (C₁-C₆烷基)-氨基、氟或 C₃₋₁₀环烷基取代的 C₁₋₆烷基

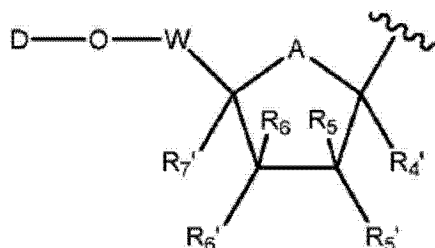
[0049] X⁵独立地是 C₁₋₂₀烷基、来源于脂肪醇的碳链或被以下取代的 C₁₋₂₀烷基 : C₁-C₆烷基、

烷氧基、 C_{3-10} 环烷基、环烷基烷基、环杂烷基、芳基、杂芳基、取代的芳基或取代的杂芳基；其中所述取代基是 C_{1-6} 烷基、或被 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基、二(C_{1-6} 烷基)-氨基、氟或 C_{3-10} 环烷基取代的 C_{1-6} 烷基

[0050] iii) X^3 和 X^4 各自独立地是 H、 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、 C_{2-6} 炔基、芳基、烷基芳基、卤素(F、Cl、Br、I)、 NH_2 、OH、SH、CN 或 NO_2 。

[0051] 在一个实施方案中，糖是通式(II)的核糖或修饰的核糖：

[0052]



(II)

[0053] 其中：

[0054] D 是 H、 $C(O)R^1$ 、 $C(O)OR^1$ 、二磷酸酯或三磷酸酯；

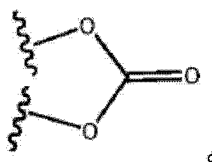
[0055] R^1 如上所定义；

[0056] W 是 CL_2 或 CL_2CL_2 ，其中 L 独立地选自由以下组成的组： H 、 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基及 C_{2-6} 炔基，其中 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基及 C_{2-6} 炔基可各自任选地含有一个或多个杂原子；

[0057] A 是 O、S、 CH_2 、CHF、 CF_2 、 $C=CH_2$ 、 $C=CHF$ 或 $C=CF_2$ ；

[0058] $R^{4'}$ 、 $R^{5'}$ 、 $R^{6'}$ 、 $R^{7'}$ 独立地选自由以下组成的组： H 、F、Cl、Br、I、OH、SH、 NH_2 、 $NHOH$ 、 $NHNH_2$ 、 N_3 、 $C(O)OH$ 、CN、 CH_2OH 、 $C(O)NH_2$ 、 $C(S)NH_2$ 、 $C(O)OR$ 、R、OR、SR、SSR、NHR 及 NR_2 ；

[0059] $R^{5'}$ 和 $R^{6'}$ 可一起形成环



[0060] 在一个实施方案中，其中糖是式(II)，当 A 是 O 或 CH_2 ， D 是 H 或酰基， W 是 CH_2 ， $R^{4'}$ 和 $R^{7'}$ 是 H 时， $R^{5'}$ 、 $R^{6'}$ 不能是 H、卤素、OH、SH、 OCH_3 、 SCH_3 、 NH_2 、 $NHCH_3$ 、 CH_3 、 $CH=CH_2$ 、CN、 CH_2NH_2 、 CH_2OH 或 $COOH$ 。

[0061] 在另一实施方案中， $R^{6'}$ 独立地选自由以下组成的组： $NHOH$ 、 $NHNH_2$ 、 N_3 、 $C(O)NH_2$ 、 $C(S)NH_2$ 、 $C(O)OR$ 、R、OR、SR、SSR、NHR 及 NR_2 ；

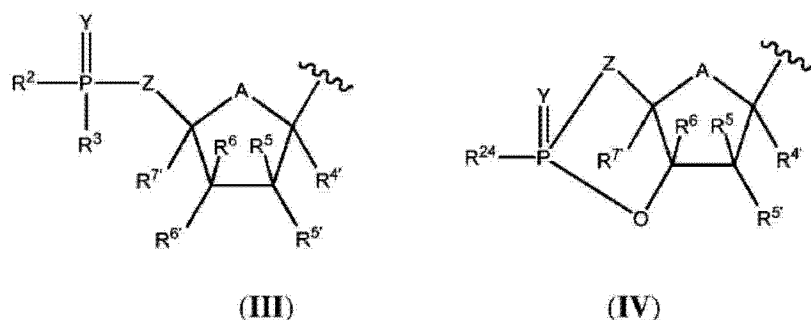
[0062] 在一个实施方案中，其中对于糖是式(II)的式(I)，当 A 是 O 或 S 时， $R^{7'}$ 不能是 OH、SH、 NH_2 、 $NHOH$ 、 $NHNH_2$ 、OR、SR、SSR、NHR 或 NR_2 。

[0063] 在另一实施方案中， $R^{7'}$ 独立地选自由以下组成的组： H 、F、Cl、Br、I、 N_3 、 $C(O)OH$ 、CN、 CH_2OH 、 $C(O)NH_2$ 、 $C(S)NH_2$ 、 $C(O)OR$ 及 R；

[0064] R 独立地是 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、 C_{2-6} 炔基、 C_{3-6} 环烷基、(C_{3-6} 环烷基)芳基、烷基芳基或芳基烷基，其中所述基团可被一个或多个如上所定义的取代基取代，其中代表性取代基包括例如羟烷基、氨基烷基和烷氧基烷基。

[0065] 在另一实施方案中,糖是通式 (III) 或 (IV) 的核糖或修饰的核糖:

[0066]



[0067] 其中:

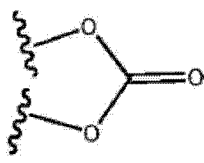
[0068] Y 是 O 或 S;

[0069] Z 选自由以下组成的组: CL_2 、 CL_2CL_2 、 CL_2OCL_2 、 CL_2SCL_2 、 CL_2O 、 OCL_2 及 CL_2NHCL_2 , 其中 L 独立地选自由以下组成的组: H、F、 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基及 C_{2-6} 炔基, 其中 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基及 C_{2-6} 炔基可各自任选地含有一个或多个杂原子;

[0070] A 是 O、S、 CH_2 、CHF、 CF_2 、 $\text{C}=\text{CH}_2$ 、 $\text{C}=\text{CHF}$ 或 $\text{C}=\text{CF}_2$;

[0071] R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^7 及 R^8 独立地选自由以下组成的组: H、F、Cl、Br、I、OH、SH、 NH_2 、 NHOH 、 NHNH_2 、 N_3 、 $\text{C}(\text{O})\text{OH}$ 、CN、 CH_2OH 、 $\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$ 、 $\text{C}(\text{S})\text{NH}_2$ 、 $\text{C}(\text{O})\text{OR}$ 、R、OR、SR、SSR、NHR 及 NR_2 ;

[0072] R^5 和 R^6 可一起形成环

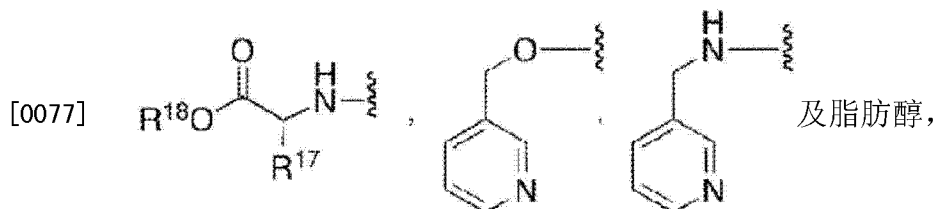


[0073] 在一个实施方案中,其中糖是式 (III) 或 (IV), 当 A 是 O 或 S 时, R^7 不能是 OH、SH、 NH_2 、 NHOH 、 NHNH_2 、OR、SR、SSR、NHR 或 NR_2 。

[0074] 在另一实施方案中, R^7 独立地选自由以下组成的组: H、F、Cl、Br、I、 N_3 、 $\text{C}(\text{O})\text{OH}$ 、CN、 CH_2OH 、 $\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$ 、 $\text{C}(\text{S})\text{NH}_2$ 、 $\text{C}(\text{O})\text{OR}$ 及 R。

[0075] R 独立地是 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基及 C_{2-6} 炔基、 $\text{C}_3\text{-C}_6$ 环烷基、芳基、烷基芳基或芳基烷基, 其中所述基团可被一个或多个如上所定义的取代基取代。

[0076] R^{24} 选自由以下组成的组: OR^{15} 、



[0078] R^{15} 选自由以下组成的组: H、Li、Na、K、苯基及吡啶基; 其中苯基和吡啶基任选地被零至三个独立地选自由 $(\text{CH}_2)_{0-6}\text{CO}_2\text{R}^{16}$ 和 $(\text{CH}_2)_{0-6}\text{CON}(\text{R}^{16})_2$ 组成的组的取代基取代;

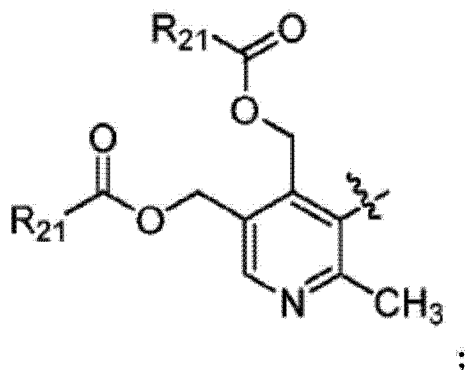
[0079] R^{17} 选自在天然 L-氨基酸中存在的那些基团、 C_{1-6} 烷基、 $(\text{C}_{1-6}\text{烷基})$ 、 C_{2-6} 烯基、 C_{2-6} 炔基、 $\text{C}_3\text{-C}_6$ 环烷基、芳基、烷基芳基或芳基烷基, 其中所述基团可被一个或多个如上所定义的取代基取代。

[0080] R^{18} 是 H、 C_{1-20} 烷基、来源于脂肪醇 (如油醇、二十八醇、三十醇、亚油醇等) 的碳链或

被以下取代的 C_{1-20} 烷基： C_1-C_6 烷基、 C_1-C_6 烷氧基、二 (C_1-C_6 烷基)-氨基、氟、 C_{3-10} 环烷基、环烷基烷基、环杂烷基、芳基如苯基、杂芳基如吡啶基、取代的芳基或取代的杂芳基；其中所述取代基是 C_{1-5} 烷基、或被 C_1-C_6 烷基、 C_1-C_6 烷氧基、二 (C_1-C_6 烷基)-氨基、氟、 C_{3-10} 环烷基或环烷基取代的 C_{1-5} 烷基。

[0081] 代表性 R^2 和 R^3 独立地选自由以下组成的组：

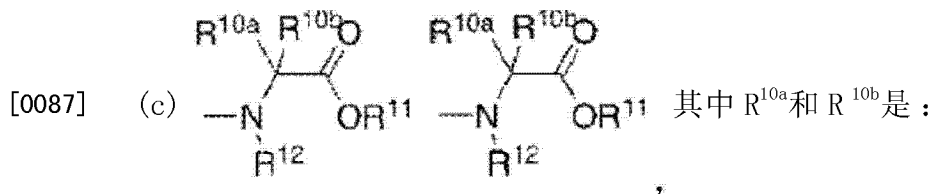
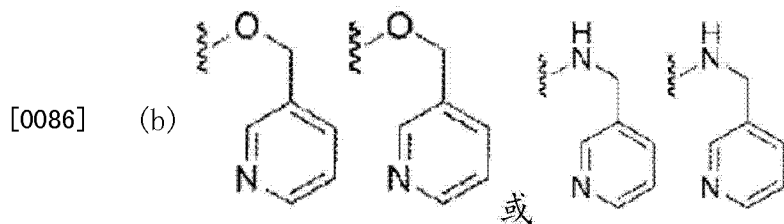
[0082] (a) OR^8 ，其中 R^8 是 H、Li、Na、K、 C_{1-20} 烷基、 C_{3-6} 环烷基、 C_{1-6} 卤烷基、芳基或杂芳基（包括但不限于苯基或萘基），任选地被一个至三个独立地选自由以下组成的组的取代基取代： C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、 C_{2-6} 炔基、 C_{1-6} 烷氧基、 $(CH_2)_{0-6}CO_2R^{9a}$ 、卤素、 C_{1-6} 卤烷基、 $-N(R^{9a})_2$ 、 C_{1-6} 酰基氨基、 $-NHSO_2C_{1-6}$ 烷基、 $-SO_2N(R^{9a})_2$ 、 $-SO_2C_{1-6}$ 烷基、 COR^{9b} 、硝基、氰基及



[0083] 其中 R^{21} 如下所定义：

[0084] R^{9a} 独立地是 H、 C_{1-20} 烷基、来源于脂肪醇的碳链或被以下取代的 C_{1-20} 烷基： C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基、二 (C_{1-6} 烷基)-氨基、氟、 C_{3-10} 环烷基或 C_{3-10} 环烷基烷基、环杂烷基、芳基、杂芳基、取代的芳基或取代的杂芳基；其中所述取代基是 C_{1-5} 烷基、或被 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基、二 (C_{1-6} 烷基)-氨基、氟、 C_{3-10} 环烷基或 C_{3-10} 环烷基烷基取代的 C_{1-5} 烷基；

[0085] R^{9b} 是 $-OR^{9a}$ 或 $-N(R^{9a})_2$ ；



[0088] (i) 独立地选自由以下组成的组：H、 C_{1-10} 烷基、 $-(CH_2)_rNR^{9a}_2$ 、 C_{1-6} 羟烷基、 $-CH_2SH$ 、 $-(CH_2)_2S(O)_pMe$ 、 $-(CH_2)_3NHC(=NH)NH_2$ 、(1H-吡啶-3-基)甲基、(1H-咪唑-4-基)甲基、 $-(CH_2)_mCOR^{9b}$ 、芳基及芳基- C_{1-3} 烷基，所述芳基任选地被选自由以下组成的组的基团取代：羟基、 C_{1-10} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基、卤素、硝基及氰基；

[0089] (ii) R^{10a} 是 H 且 R^{10b} 和 R^{12} 一起是 $(CH_2)_{2-4}$ 以形成包含邻接的 N 和 C 原子的环；

[0090] (iii) R^{10a} 和 R^{10b} 一起是 $(CH_2)_n$ 以形成环；

[0091] (iv) R^{10a} 和 R^{10b} 都是 C_{1-6} 烷基 ; 或

[0092] (v) R^{10a} 是 H 且 R^{10b} 是 H、 CH_3 、 CH_2CH_3 、 $CH(CH_3)_2$ 、 $CH_2CH(CH_3)_2$ 、 $CH(CH_3)CH_2CH_3$ 、 CH_2Ph 、 CH_2 - 吡 啶 -3- 基、 $-CH_2CH_2SCH_3$ 、 CH_2CO_2H 、 $CH_2C(O)NH_2$ 、 CH_2CH_2COOH 、 $CH_2CH_2C(O)NH_2$ 、 $CH_2CH_2CH_2CH_2NH_2-CH_2CH_2CH_2NHC(NH)NH_2$ 、 CH_2 - 咪 唑 -4- 基、 CH_2OH 、 $CH(OH)CH_3$ 、 $CH_2((4'-OH)-Ph)$ 、 CH_2SH 或 C_{3-10} 环烷基 ;

[0093] p 是 0 至 2 ;

[0094] r 是 1 至 6 ;

[0095] n 是 4 或 5 ;

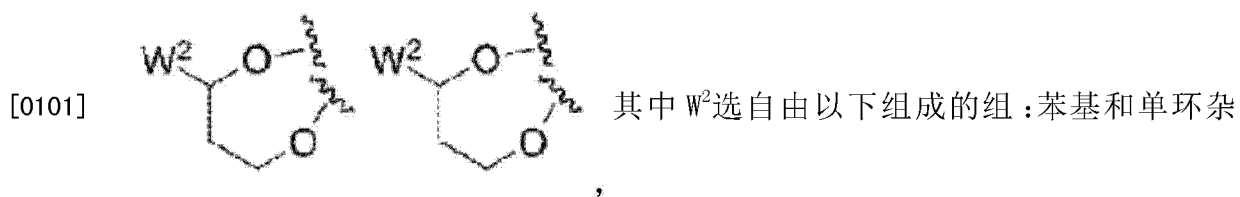
[0096] m 是 0 至 3 ;

[0097] R^{11} 是 H、 C_{1-10} 烷基、或被以下取代的 C_{1-10} 烷基 : C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基、二 (C_{1-6} 烷基)- 氨基、氟、 C_{3-10} 环烷基、 C_{3-10} 环烷基烷基、环杂烷基、芳基如苯基、杂芳基如吡啶基、取代的芳基或取代的杂芳基 ; 其中所述取代基是 C_{1-5} 烷基、或被 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基、二 (C_{1-6} 烷基)- 氨基、氟、 C_{3-10} 环烷基或 C_{3-10} 环烷基烷基取代的 C_{1-5} 烷基 ;

[0098] R^{12} 是 H 或 C_{1-3} 烷基, 或 R^{10a} 、或 R^{10b} 和 R^{12} 一起是 $(CH_2)_{2-4}$ 以便形成包含邻接的 N 和 C 原子的环 ;

[0099] (d) O 连接的脂质 (包括磷脂)、N 或 O 连接的肽、O 连接的胆固醇或 O 连接的植物甾醇 ;

[0100] (e) R^2 和 R^3 可在一起形成环



C_{1-6} 烷基、 CF_3 、 C_{2-6} 烯基、 C_{1-6} 烷氧基、 OR^{9c} 、 CO_2R^{9a} 、 COR^{9a} 、卤素、 C_{1-6} 卤烷基、 $-N(R^{9a})_2$ 、 C_{1-6} 酰基氨基、 $CO_2N(R^{9a})_2$ 、 SR^{9a} 、 $-NHSO_2C_{1-6}$ 烷基、 $-SO_2N(R^{9a})_2$ 、 $-SO_2C_{1-6}$ 烷基、 COR^{9b} 及氰基, 并且其中所述单环杂芳基和取代的单环杂芳基具有 1-2 个独立地选自由 N、O 及 S 组成的组的杂原子, 前提条件是 :

[0102] a) 当存在两个杂原子且一个是 O 时, 那么另一个不能是 O 或 S, 并且

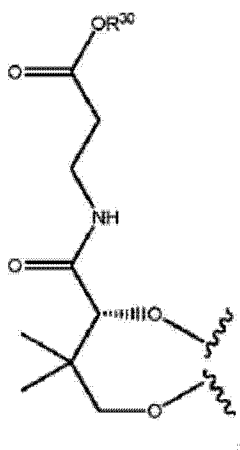
[0103] b) 当存在两个杂原子且一个是 S 时, 那么另一个不能是 O 或 S ;

[0104] R^{9a} 独立地是 H 或 C_{1-6} 烷基 ;

[0105] R^{9b} 是 $-OR^{9a}$ 或 $-N(R^{9a})_2$;

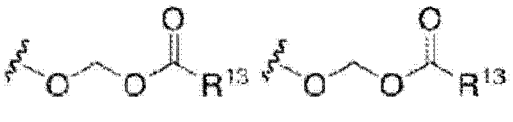
[0106] R^{9c} 是 H 或 C_{1-6} 酰基 ;

[0107] (f) R^2 和 R^3 可在一起形成环



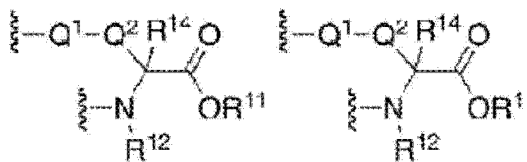
其中 R^{30} 是 H、 C_{1-20} 烷基、 C_{1-20} 烯基、

来源于脂肪醇的碳链或被以下取代的 C_{1-20} 烷基： C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基、二 (C_{1-6} 烷基)-氨基、氟、 C_{3-10} 环烷基、 C_{3-10} 环烷基烷基、环杂烷基、芳基、杂芳基、取代的芳基或取代的杂芳基；其中所述取代基是 C_{1-6} 烷基或被 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基、二 (C_{1-6} 烷基)-氨基、氟、 C_{3-10} 环烷基或 C_{3-10} 环烷基烷基取代的 C_{1-5} 烷基；

[0108] (g)  其中 R^{13} 选自由以下组成的组：H、 C_{1-10}

烷基、被以下取代的 C_{1-10} 烷基： C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基、二 (C_{1-6} 烷基)-氨基、氟、 C_{3-10} 环烷基、 C_{3-10} 环烷基烷基、环杂烷基、芳基如苯基、杂芳基如吡啶基、取代的芳基和取代的杂芳基；其中所述取代基是 C_{1-5} 烷基、或被以下取代的 C_{1-5} 烷基： C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基、二 (C_{1-6} 烷基)-氨基、氟、 C_{3-10} 环烷基或 C_{3-10} 环烷基烷基；

[0109] (h) R^2 和 R^3 可在一起形成环

[0110]  其中 R^{14} 是：

[0111] (i) 独立地选自由以下组成的组：H、 C_{1-10} 烷基、 $-(CH_2)_rNR_2^{9a}$ 、 C_{1-6} 羟烷基、 $-CH_2SH$ 、 $-(CH_2)_2S(O)_pMe$ 、 $-(CH_2)_3NHC(=NH)NH_2$ 、(1H-吡啶-3-基)甲基、(1H-咪唑-4-基)甲基、 $-(CH_2)_mCOR^{9b}$ 、芳基、芳基- C_{1-3} 烷基、杂芳基及杂芳基- C_{1-3} 烷基，所述芳基和杂芳基任选地被选自由以下组成的组的基团取代：羟基、 C_{1-10} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基、卤素、硝基及氰基；

[0112] (ii) R^{14} 是 H、 CH_3 、 CH_2CH_3 、 $CH(CH_3)_2$ 、 $CH_2CH(CH_3)_2$ 、 $CH(CH_3)CH_2CH_3$ 、 CH_2Ph 、 CH_2 -吡啶-3-基、 $-CH_2CH_2SCH_3$ 、 CH_2CO_2H 、 $CH_2C(O)NH_2$ 、 CH_2CH_2COOH 、 $CH_2CH_2C(O)NH_2$ 、 $CH_2CH_2CH_2CH_2NH_2$ 、 $CH_2CH_2CH_2NHC(NH)NH_2$ 、 CH_2 -咪唑-4-基、 CH_2OH 、 $CH(OH)CH_3$ 、 $CH_2((4'-OH)-Ph)$ 、 CH_2SH 或 C_{3-10} 环烷基；

[0113] p 是 0 至 2；

[0114] r 是 1 至 6；

[0115] m 是 0 至 3

[0116] Q^1 是 NR^{9a} 、O 或 S

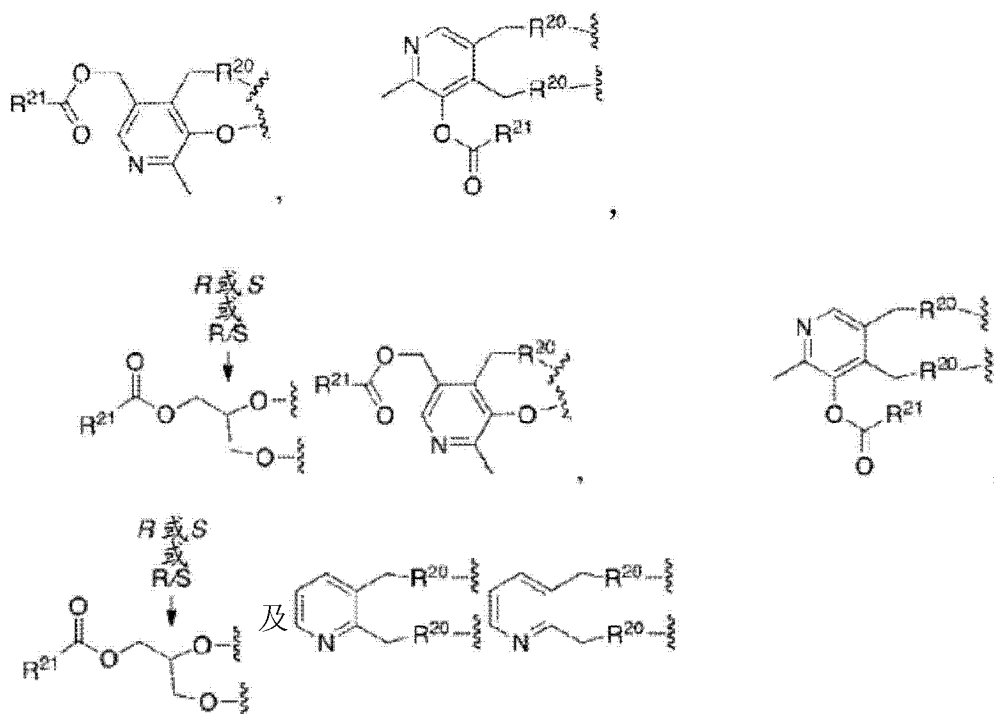
[0117] Q^2 是 C_{1-10} 烷基、 C_{1-6} 羟烷基、芳基和芳基- C_{1-3} 烷基、杂芳基及杂芳基- C_{1-3} 烷基, 所述芳基和杂芳基任选地被选自由以下组成的组的基团取代: 羟基、 C_{1-10} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基、氟及氯;

[0118] R^{11} 是 H、 C_{1-10} 烷基、被以下取代的 C_{1-10} 烷基: C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基、二(C_{1-6} 烷基)-氨基、氟、 C_{3-10} 环烷基、 C_{3-10} 环烷基烷基、环杂烷基、芳基如苯基、杂芳基如吡啶基、取代的芳基或取代的杂芳基; 其中所述取代基是 C_{1-5} 烷基、或被以下取代的 C_{1-5} 烷基: C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基、二(C_{1-6} 烷基)-氨基、氟、 C_{3-10} 环烷基或 C_{3-10} 环烷基烷基;

[0119] R^{12} 是 H 或 C_{1-3} 烷基, 或 R^{14b} 和 R^{12} 一起是 $(CH_2)_{2-4}$ 以便形成包含邻接的 N 和 C 原子的环;

[0120] R^2 和 R^3 可在一起形成选自由以下组成的组的环:

[0121]



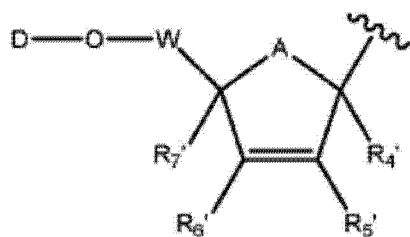
[0123] 其中 R^{20} 是 O 或 NH, 并且

[0124] R^{21} 选自由以下组成的组: H、 C_{1-20} 烷基、 C_{1-20} 烯基、来源于脂肪酸的碳链、及被以下取代的 C_{1-20} 烷基: C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基、二(C_{1-6} 烷基)-氨基、氟、 C_{3-10} 环烷基、 C_{3-10} 环烷基烷基、环杂烷基、芳基、杂芳基、取代的芳基及取代的杂芳基; 其中所述取代基是 C_{1-5} 烷基或被 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基、二(C_{1-6} 烷基)-氨基、氟、 C_{3-10} 环烷基或 C_{3-10} 环烷基烷基取代的 C_{1-5} 烷基, 并且

[0125] (j) 当 R^3 是 OH、 O^-K^+ 、 O^-Li^+ 或 O^-Na^+ 时, R^2 是单磷酸酯或二磷酸酯。

[0126] 在又一实施方案中, 糖是通式 (V) 的核糖或修饰的核糖:

[0127]



(V)

[0128] 其中：

[0129] D 是 H、C(O)R¹、C(O)OR¹、二磷酸酯或三磷酸酯；

[0130] R¹独立地是 C₁₋₂₀烷基、来源于脂肪醇的碳链或被以下取代的 C₁₋₂₀烷基：C₁₋₆烷基、C₁₋₆烷氧基、二(C₁₋₆烷基)-氨基、氟、C₃₋₁₀环烷基、C₃₋₁₀环烷基烷基、环杂烷基、芳基、杂芳基、取代的芳基或取代的杂芳基；其中所述取代基是 C₁₋₅烷基、或被 C₁₋₆烷基、C₁₋₆烷氧基、二(C₁₋₆烷基)-氨基、氟、C₃₋₁₀环烷基或 C₃₋₁₀环烷基烷基取代的 C₁₋₅烷基；

[0131] W 是 CL₂或 CL₂CL₂，其中 L 独立地选自由以下组成的组：H、C₁₋₆烷基、C₂₋₆烯基及 C₂₋₆炔基，其中 C₁₋₆烷基、C₂₋₆烯基及 C₂₋₆炔基可各自任选地含有一个或多个杂原子；

[0132] A、R²、R³、Y、Z、R^{4'}、R^{5'}、R^{6'}及 R^{7'}如上关于式 I、II、III 及 IV 所定义；

[0133] 其中对于糖是式 (V) 的式 (I)，当 A 是 O 或 S 时，R^{7'}不能是 OH、SH、NH₂、NHOH、NHNH₂、OR、SR、SSR、NHR 或 NR₂，

[0134] 在另一实施方案中，R^{7'}独立地选自由以下组成的组：H、F、Cl、Br、I、N₃、C(O)OH、CN、CH₂OH、C(O)NH₂、C(S)NH₂、C(O)OR 及 R；

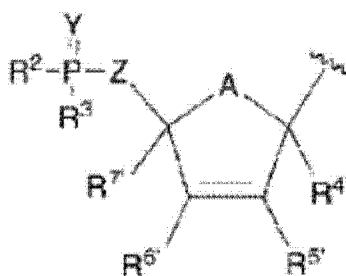
[0135] 其中 R 独立地是 C₁₋₆烷基、C₂₋₆烯基、C₂₋₆炔基、C₃₋₆环烷基、芳基、烷基芳基或芳基烷基，其中所述基团可被一个或多个如上关于式 I、II、III 及 IV 所定义的取代基（例如羟烷基、氨基烷基及烷氧基烷基）取代。

[0136] 在一个实施方案中，其中糖具有式 (V)，当 A 是 O 或 CH₂，D 是 H 或酰基，W 是 CH₂，R^{4'}和 R^{7'}是 H 时，R^{5'}和 R^{6'}不能是 H、卤素、OH、SH、OCH₃、SCH₃、NH₂、NHCH₃、CH₃、CH=CH₂、CN、CH₂NH₂、CH₂OH 或 COOH。

[0137] 在另一实施方案中，R⁵和 R⁶独立地选自由以下组成的组：NHOH、NHNH₂、N₃、C(O)NH₂、C(S)NH₂、C(O)OR、R、OR、SR、SSR、NHR 及 NR₂；

[0138] 在又一实施方案中，糖是通式 (VI) 的修饰的核糖：

[0139]



(VI)

[0140] 其中：

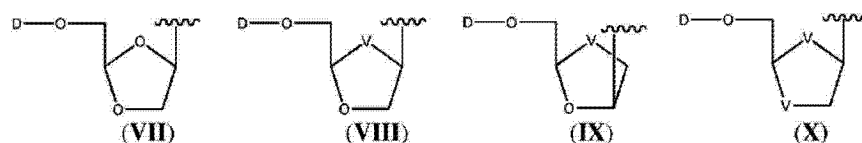
[0141] A、 R^2 、 R^3 、Y、Z、 $R^{4'}$ 、 $R^{5'}$ 、 $R^{6'}$ 及 $R^{7'}$ 如上关于式 I、II、III 及 IV 所定义；

[0142] 其中对于糖是式 (VI) 的式 (I)，当 A 是 O 或 S 时， $R^{7'}$ 不能是 OH、SH、 NH_2 、NHOH、 $NHNH_2$ 、OR、SR、SSR、NHR 或 NR_2 ，

[0143] 其中 R 独立地是 C_1 - C_6 烷基、 C_2 - C_6 烯基、 C_2 - C_6 炔基、 C_3 - C_6 环烷基、芳基、烷基芳基或芳基烷基，其中所述基团可被一个或多个如上关于式 I、II、III 及 IV 所定义的取代基（例如，羟烷基、氨基烷基及烷氧基烷基）取代。

[0144] 在另一实施方案中，糖是通式 (VII)、(VIII)、(IX) 及 (X) 的二氧戊环、氧硫杂环戊烷或二硫戊环：

[0145]



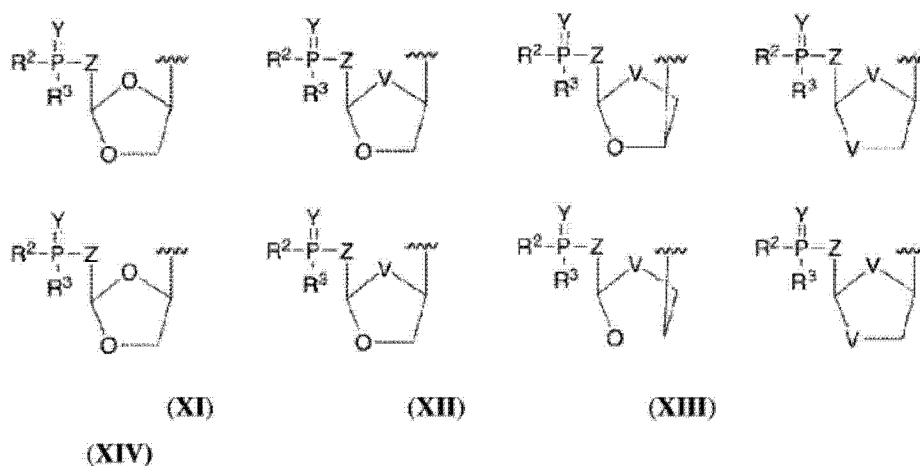
[0146] D 是 $C(O)OR^1$ 、二磷酸酯或三磷酸酯；

[0147] V 个别地是 S 或 Se；

[0148] R^1 独立地是 C_{1-20} 烷基、来源于脂肪醇的碳链或被以下取代的 C_{1-20} 烷基： C_1 - C_6 烷基、 C_1 - C_6 烷氧基、二 (C_1 - C_6 烷基)-氨基、氟、 C_{3-10} 环烷基、 C_{3-10} 环烷基烷基、环杂烷基、芳基、杂芳基、取代的芳基或取代的杂芳基；其中所述取代基是 C_{1-5} 烷基、或被 C_1 - C_6 烷基、 C_1 - C_6 烷氧基、二 (C_1 - C_6 烷基)-氨基、氟、 C_{3-10} 环烷基或 C_{3-10} 环烷基烷基取代的 C_{1-5} 烷基；

[0149] 在又一实施方案中，糖是通式 (XI)、(XII)、(XIII) 及 (XIV) 的二氧戊环、氧硫杂环戊烷或二硫戊环：

[0150]



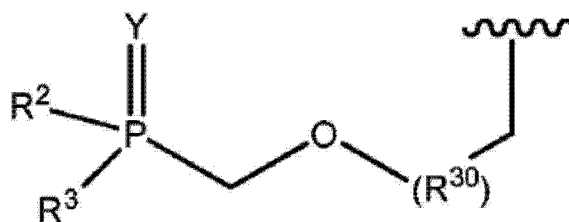
[0151] 其中：

[0152] V 个别地是 S 或 Se；

[0153] R^2 、 R^3 、Y 和 Z 如上关于式 I、II、III 和 IV 所定义。

[0154] 在又一实施方案中，糖是通式 (XV) 的磷酸基甲氧烷基：

[0155]



(XV)

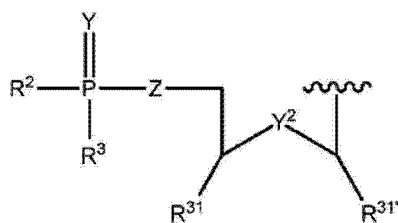
[0156] 其中：

[0157] R^2 、 R^3 和Y如上关于式I、II、III和IV所定义；并且；

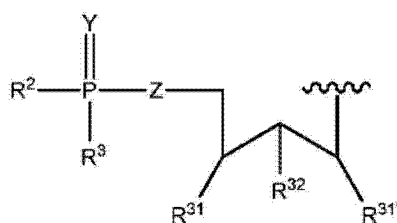
[0158] R^{30} 选自由以下组成的组： C_{1-20} 烷基、 C_{2-20} 烷基（包括但不限于 C_1-C_6 ）、烯基（包括但不限于 C_2-C_6 ）、和 C_{2-20} 炔基、 C_{3-10} （包括但不限于 C_2-C_6 ）、环烷基（包括但不限于 C_3-C_8 ）、芳基（包括但不限于 C_6-C_{10} ）、杂芳基（包括但不限于 C_6-C_{10} ）、芳基烷基以及烷基芳基；

[0159] 在又一实施方案中，糖具有通式(XVI)或(XVII)：

[0160]



(XVI)



(XVII)

[0161] 其中：

[0162] R^2 、 R^3 、Z和Y如上所定义；

[0163] Y^2 是O、S、Se或NR；

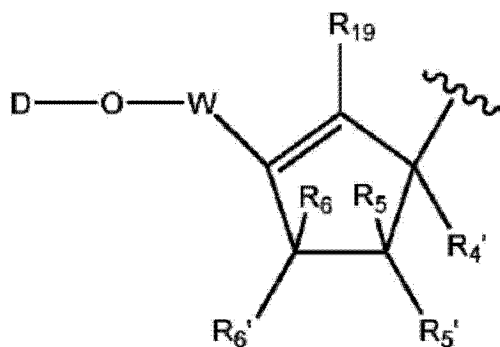
[0164] R独立地是 C_1-C_6 烷基、 C_2-C_6 烯基、 C_2-C_6 炔基、 C_3-C_6 环烷基、芳基、烷基芳基或芳基烷基，其中所述基团可被一个或多个如上所定义的取代基（例如羟烷基、氨基烷基和烷氧基烷基）取代；

[0165] R^{31} 、 $R^{31'}$ 和 R^{32} 被定义为H、 CH_3 或 CH_2OR^{33} ；并且

[0166] R^{33} 是H或 C_1-C_6 酰基。

[0167] 在另一实施方案中，糖是通式(XVIII)的修饰的核糖

[0168]



(XVIII)

[0169] 其中：

[0170] D、W、R^{4'}、R⁵、R^{5'}、R⁶及R^{6'}如上所定义；

[0171] R¹⁹是H、F、Cl、Br、I、N₃、C(O)OH、CN、C(O)NH₂、C(S)NH₂、C(O)OR或R；

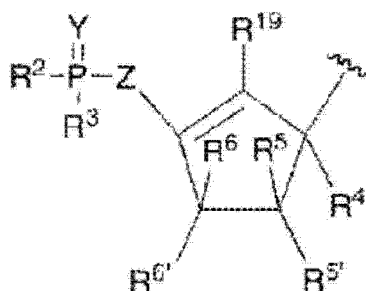
[0172] 其中R独立地是C₁-C₆烷基、C₂-C₆烯基、C₂-C₆炔基、C₃-C₆环烷基、芳基、烷基芳基或芳基烷基，其中所述基团可被一个或多个如上所定义的取代基（例如，羟烷基、氨基烷基及烷氧基烷基）取代。

[0173] 在一个实施方案中，其中糖具有式(XVII)，当D是H或酰基，W是CH₂，R^{4'}和R¹⁹是H时，R⁵、R^{5'}、R⁶、R^{6'}不能是H、卤素、OH、SH、OCH₃、SCH₃、NH₂、NHCH₃、CH₃、CH=CH₂、CN、CH₂NH₂、CH₂OH或COOH。

[0174] 在另一实施方案中，R^{6'}独立地选自由以下组成的组：NHOH、NHNH₂、N₃、C(O)NH₂、C(S)NH₂、C(O)OR、R、OR、SR、SSR、NHR及NR₂。

[0175] 在又一实施方案中，糖是式(XIX)的修饰的核糖：

[0176]



(XIX)

[0177] 其中：

[0178] R²、R³和Y如上关于式I、II、III和IV所定义；

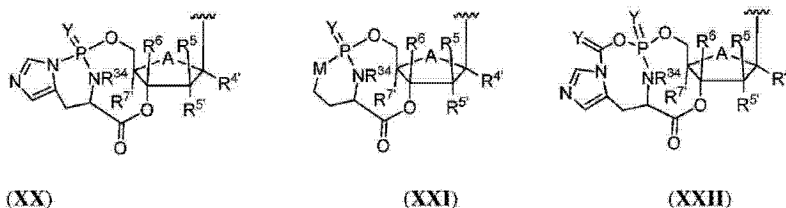
[0179] R^{4'}、R⁵、R^{5'}、R⁶及R^{6'}如上所定义；

[0180] R¹⁹是H、F、Cl、Br、I、N₃、C(O)OH、CN、C(O)NH₂、C(S)NH₂、C(O)OR或R，

[0181] 其中R独立地是C₁-C₆烷基、C₂-C₆烯基、C₂-C₆炔基、C₃-C₆环烷基、芳基、烷基芳基或芳基烷基，其中所述基团可被一个或多个如上关于式I、II、III及IV所定义的取代基（例如，羟烷基、氨基烷基及烷氧基烷基）取代。

[0182] 在又一实施方案中，糖具有式(XX)、(XXI)或(XXII)中的一种：

[0183]



[0184] 其中：

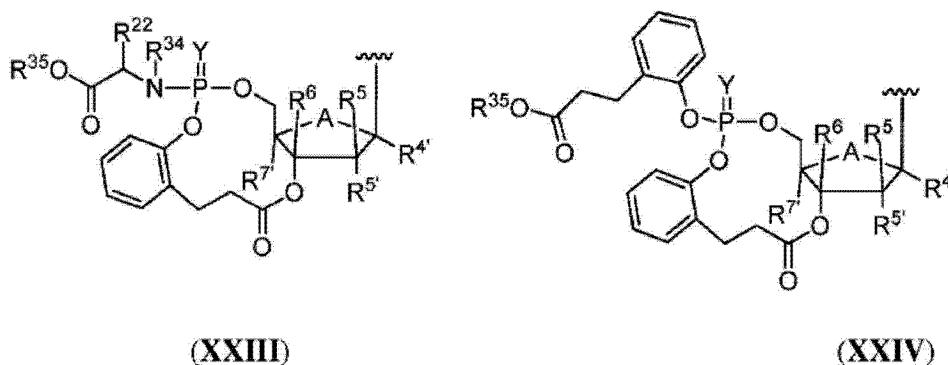
[0185] $R^{4'}$ 、 R^5 、 $R^{5'}$ 、 R^6 、Y、A 及 $R^{7'}$ 如上关于式 I、II、III 及 IV 所定义；[0186] R^{34} 是 C_1 - C_6 烷基；

[0187] M 是 O、S 或 NR；

[0188] 其中 R 独立地是 C_1 - C_6 烷基、 C_{2-6} 烯基、 C_{2-6} 炔基、 C_3 - C_6 环烷基、芳基、烷基芳基或芳基烷基，其中所述基团可被一个或多个如上关于式 I、II、III 和 IV 所定义的取代基（例如羟烷基、氨基烷基和烷氧基烷基）取代；

[0189] 在另一实施方案中，糖具有式 (XXIII) 或 (XXIV) 中的一种：

[0190]



[0191] 其中：

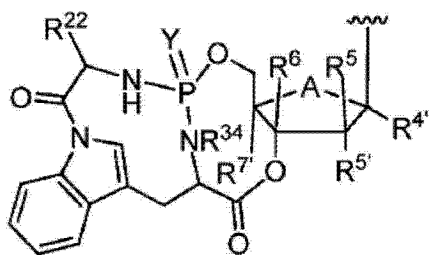
[0192] $R^{4'}$ 、 R^5 、 $R^{5'}$ 、 R^6 、Y、A、 $R^{7'}$ 、 R^{34} 如上关于式 I、II、III 及 IV 所定义；

[0193] R^{35} 是 H、 C_{1-10} 烷基、被以下取代的 C_{1-10} 烷基： C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基、二 (C_{1-6} 烷基)-氨基、氟、 C_{3-10} 环烷基、 C_{3-10} 环烷基烷基、环杂烷基、芳基如苯基、杂芳基如吡啶基、取代的芳基或取代的杂芳基；其中所述取代基是 C_{1-5} 烷基、或被 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基、二 (C_{1-6} 烷基)-氨基、氟、 C_{3-10} 环烷基或 C_{3-10} 环烷基烷基取代的 C_{1-5} 烷基；并且

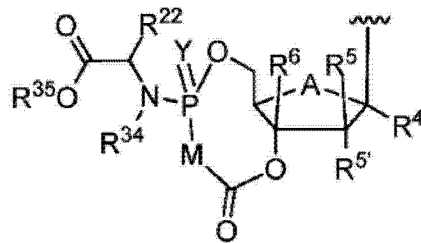
[0194] R^{22} 是 H、 CH_3 、 CH_2CH_3 、 $CH(CH_3)_2$ 、 $CH_2CH(CH_3)_2$ 、 $CH(CH_3)CH_2CH_3$ 、 CH_2Ph 、 CH_2 - 吡啶 -3- 基、 $-CH_2CH_2SCH_3$ 、 CH_2CO_2H 、 $CH_2C(O)NH_2$ 、 CH_2CH_2COOH 、 $CH_2CH_2C(O)NH_2$ 、 $CH_2CH_2CH_2CH_2NH_2$ 、 $CH_2CH_2CH_2NHC(NH)NH_2$ 、 CH_2 - 咪唑 -4- 基、 CH_2OH 、 $CH(OH)CH_3$ 、 $CH_2((4'-OH)-Ph)$ 、 CH_2SH 或 C_{3-6} 环烷基；

[0195] 在又一实施方案中，糖具有式 (XXV) 或 (XXVI) 中的一种：

[0196]



(XXV)



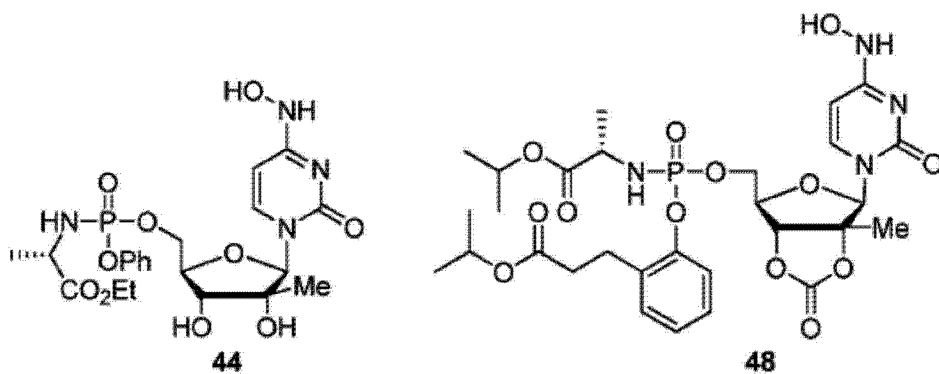
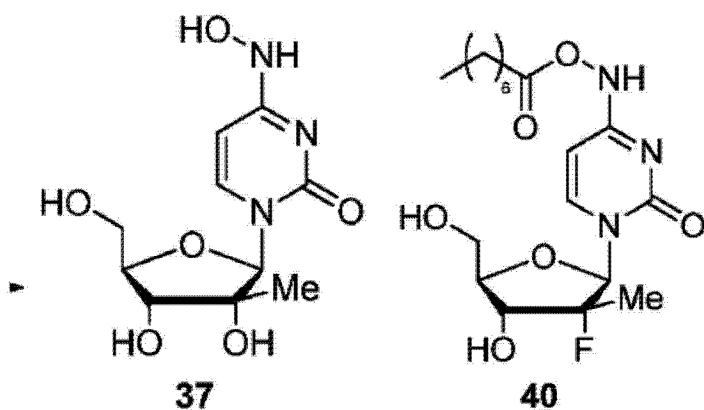
(XXVI)

[0197] 其中：

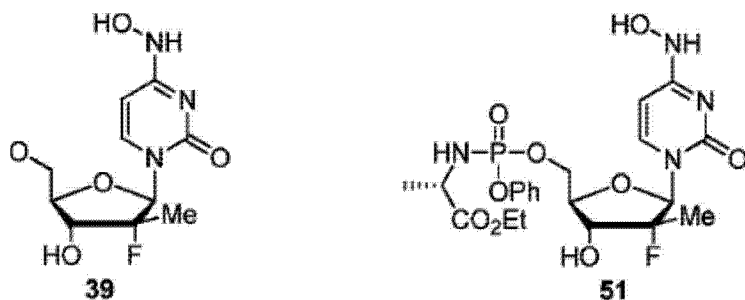
[0198] $R^{4'}$ 、 $R^{5'}$ 、 R^6 、 Y 、 M 、 R^7 、 R^{34} 、 R^{35} 、 R^{22} 如上关于式 I、II、III 及 IV 所定义；

[0199] 在一个实施方案中，化合物具有下式中的一种：

[0200]



[0201]



或其药学上可接受的

盐。

[0202] 在一个实施方案中， R^5 或 $R^{5'}$ 中的至少一个是 F、Cl 或 Me。

[0203] 在另一实施方案中, R^5 和 $R^{5'}$ 分别是 Me 和 F。

[0204] 在另一实施方案中, R^5 和 $R^{5'}$ 分别是 Me 和 Cl。

[0205] 在另一实施方案中, L 是甲基。

[0206] 在另一实施方案中, 碱基是嘧啶, 并且 R^5 和 $R^{5'}$ 中的一个为 OH、Cl 或 F。

[0207] 本文所述的化合物可呈以下形式: β -L- 或 β -D- 构型、或其混合物, 包括其外消旋混合物。

[0208] 在那些实施方案中, 当本文所述的化合物的磷部分含有手性中心时, 这种手性中心可呈以下形式: R_p - 或 S_p - 构型或其混合物, 包括其外消旋混合物。

[0209] 在一个实施方案中, 化合物在生物系统中被转化为嘧啶三磷酸酯的混合物, 这是由于在嘧啶环上的 -NHOH 部分转化为 -NH₂ 部分且任选地嘧啶环上的 -NHOH 部分或所得的 -NH₂ 部分转化为 OH 部分。这类部分转化的一个实例显示如下, 其中嘧啶三磷酸酯的混合物 C 或 D 包括 4-NHOH、4-NH₂ 及 4-OH 嘧啶三磷酸酯。这种混合物可例如当所施用的化合物包括在糖的 5'-OH 部分上的前药时形成。适合的前药的实例包括如上所例示的那些。

[0210]



[0211] 因此, 通过施用单一化合物, 两种或三种活性化合物的组合可在药物代谢期间形成, 并且这些药物可以不同方式靶向病毒。例如, 其中 NHOH 直接地或间接地转化为 OH 部分的类似物当通过病毒掺入生长中的 DNA 或 RNA 链中时的作用类似于尿苷类似物。其中 NHOH 部分转化为 NH₂ 部分的类似物当通过病毒掺入生长中的 DNA 或 RNA 链中时的作用类似于胞嘧啶类似物。NHOH 类似物当通过病毒掺入生长中的 DNA 或 RNA 链中时的作用可类似于胞嘧啶或尿苷类似物。预期三种活性三磷酸酯的组合对比通常施用的任何单个三磷酸酯药物将产生不同且更难的突变选择。

[0212] 通过以多种方式攻击病毒, 即通过用 U 和 C 型类似物呈递病毒, 前药化合物具有抵御病毒耐药性的嵌入机制 (built-in mechanism)。也就是说, 如果病毒应突变以避免占用 U 类似物, 则其还可对一种或多种 C 类似物敏感, 且反之亦然, 并且如果应存在多种 C 类似物, 则对其中一种的抗性可能不会赋予对另一种的抗性。

[0213] 因此, 本文所述的化合物可作为单一组分施用, 且还提供组合抗病毒疗法的益处。当与另外的抗病毒剂、特别是非 NNRTI 抗病毒剂组合时, 所述组合可提供与许多另外的组分的组合的益处, 同时提供仅包括一种核苷前药的简单性。

[0214] 发明详述

[0215] 本文所述的N⁴-羟基胞苷核苷衍生物及修饰的单磷酸酯前药类似物显示针对HIV、HCV、诺瓦克病毒、札如病毒、HSV-1、HSV-2、登革热病毒、黄热病、癌症、HBV 和疱疹病毒如HSV-1、HSV-2、以及巨细胞病毒(CMV) 的抑制活性。因此,所述化合物可用于治疗或预防宿主中的病毒感染或降低病毒的生物活性。宿主可以是感染了 HIV-1、HIV-2、HCV、诺瓦克病毒、札如病毒、HSV-1、HSV-2、登革热病毒、黄热病、癌症、巨细胞病毒(CMV) 和 / 或 HBV 的哺乳动物且特别是人。所述方法包括施用有效量的一种或多种本文所述的核苷或核苷酸单磷酸酯前药。

[0216] 还公开了包含与药学上可接受的载体或赋形剂组合的一种或多种本文所述的化合物的药物制剂。在一个实施方案中,所述制剂包含至少一种本文所述的化合物和至少一种其它治疗剂。

[0217] 本发明将参考以下定义得到更好的理解:

[0218] I. 定义

[0219] 术语“独立地”在本文中用于指示独立地应用的变量在应用与应用之间独立地变化。因此,在如 R¹XYR² 的化合物中,其中 R¹ “独立地是碳或氮”,两个 R¹ 均可可是碳,两个 R¹ 均可可是氮,或一个 R¹ 可以是碳且另一个 R¹ 是氮。

[0220] 如本文所用,术语“对映异构体纯的”是指包含至少大约 95% 且优选地大约 97%、98%、99% 或 100% 核苷酸的单一对映异构体的核苷酸组合物。

[0221] 如本文所用,术语“基本上不含”或“基本上不存在下”是指包含至少 85 至 90 重量%、优选地 95 重量%至 98 重量%、且甚至更优选地 99 重量%至 100 重量%的核苷酸的指定对映异构体的核苷酸组合物。在一个优选实施方案中,本文所述的化合物基本上不含对映异构体。

[0222] 类似地,术语“分离的”是指包含至少 85 至 90 重量%、优选地 95 重量%至 98 重量%、且甚至更优选地 99 重量%至 100 重量%的核苷酸且其余包含其它化学物种或对映异构体的核苷酸组合物。

[0223] 在一些情况下,磷原子可以是手性的,在本文中被称为“P*”或“P”,这意味着并且是指其具有对应于对于这种指配的 Cahn-Ingold-Prelog 规则的所接受的含义的“R”或“S”名称。式 A 的前药可由于在磷中心处的手性而作为非对映异构体的混合物存在。当在磷中心处存在手性时,其可能全部或部分为 R_p 或 S_p 或其任何混合物。

[0224] 除非另作说明,如本文所用的术语“烷基”是指饱和直链、支链或环状伯烃、仲烃或叔烃,包括取代的和未被取代的烷基。烷基可任选地被不另外干扰反应或提供过程中的改善的任何部分取代,包括但不限于卤基、卤烷基、羟基、羧基、酰基、芳基、酰氧基、氨基、酰胺基、羧基衍生物、烷基氨基、二烷基氨基、芳基氨基、烷氧基、芳氧基、硝基、氰基、磺酸、硫酸、亚胺、磺酰基、硫烷基、亚硫酰基、氨磺酰基、酯、羧酸、酰胺、膦酰基、氧膦基、磷酰基、磷化氢、硫酯、硫醚、酰卤、酸酐、脞、脞、氨基甲酸酯、膦酸、膦酸酯,根据需要是未受保护或受保护的,如本领域技术人员已知,例如如在 Greene, 等人, Protective Groups in Organic Synthesis, John Wiley and Sons, 第二版, 1991 中所教导,该文献据此以引用的方式并入。具体地包括 CF₃ 和 CH₂CF₃。

[0225] 在正文中,每当使用术语 C(烷基范围),该术语独立地包括那类中的每个成员,就如同具体地和单独地列出一一般。术语“烷基”包括 C₁₋₂₂ 烷基部分,且术语“低级烷基”包括

C₁₋₆烷基部分。本领域技术人员应理解,有关烷基是通过用后缀“-基”取代后缀“-ane”来命名。

[0226] 术语“烯基”是指直链或支链的程度以致其含有一个或多个双键的不饱和烃基,且术语“低级烯基”包括 C₂₋₆烯基部分。本文所公开的烯基可任选地被不会不利地影响反应过程的任何部分取代,包括但不限于针对烷基部分上的取代基所述的那些。烯基的非限制性实例包括乙烯、甲基乙烯、异丙烯、1,2-乙烷-二基、1,1-乙烷-二基、1,3-丙烷-二基、1,2-丙烷-二基、1,3-丁烷-二基以及 1,4-丁烷-二基。

[0227] 术语“炔基”是指直链或支链的程度以致其含有一个或多个三键的不饱和无环烃基,且术语“低级炔基”包括 C₂₋₆炔基部分。炔基可任选地被不会不利地影响反应过程的任何部分取代,包括但不限于如上针对烷基部分所述的那些。适合的炔基的非限制性实例包括乙炔基、丙炔基、羟基丙炔基、丁炔-1-基、丁炔-2-基、戊炔-1-基、戊炔-2-基、4-甲氧基戊炔-2-基、3-甲基丁炔-1-基、己炔-1-基、己炔-2-基以及己炔-3-基、3,3-二甲基丁炔-1-基。

[0228] 术语“烷基氨基”或“芳基氨基”是指分别具有一个或两个烷基或芳基取代基的氨基。

[0229] 如本文所用且除非另外指明,术语“受保护的”是指添加到氧、氮或磷原子中以防止它的进一步反应或出于其它目的的基团。广泛多种氧和氮保护基为有机合成领域的技术人员所知且描述于例如上述 Greene 等人, *Protective Groups in Organic Synthesis* 中。

[0230] 单独或组合的术语“芳基”意指含有一个、两个或三个环的碳环芳族系统,其中这种环可以悬挂方式连接在一起或可以被稠合。芳基的非限制性实例包括苯基、联苯或萘基、或在从芳族环上除去氢之后剩余的其它芳族基团。术语芳基包括取代的和未被取代的部分。芳基可任选地被不会不利地影响过程的任何部分取代,包括但不限于如上针对烷基部分所述的那些。取代的芳基的非限制性实例包括杂芳基氨基、N-芳基-N-烷基氨基、N-杂芳基氨基-N-烷基氨基、杂芳烷氧基、芳基氨基、芳烷基氨基、芳硫基、单芳基酰氨基磺酰基、芳基亚磺酰氨基、二芳基酰氨基磺酰基、单芳基酰氨基磺酰基、芳基亚磺酰基、芳基磺酰基、杂芳硫基、杂芳基亚磺酰基、杂芳基磺酰基、芳酰基、杂芳酰基、杂芳烷酰基、羟基芳烷基、羟基杂芳烷基、卤烷氧基烷基、芳基、芳烷基、芳氧基、芳烷基、芳氧基烷基、饱和杂环基、部分饱和杂环基、杂芳基、杂芳氧基、杂芳氧基烷基、芳基烷基、杂芳基烷基、芳基烯基以及杂芳基烯基、碳芳烷氧基。

[0231] 术语“烷芳基”或“烷基芳基”是指具有芳基取代基的烷基。术语“芳烷基”或“芳基烷基”是指具有烷基取代基的芳基。

[0232] 如本文所用的术语“卤基”包括氯、溴、碘及氟。

[0233] 术语“酰基”是指羧酸酯,其中酯基的非羰基部分选自直链、支链或环状烷基或低级烷基、烷氧基烷基,包括但不限于甲氧基甲基;芳烷基,包括但不限于苄基;芳氧基烷基如苯氧基甲基;芳基,包括但不限于苯基,任选地被卤素(F、Cl、Br、I)取代;烷基(包括但不限于 C₁、C₂、C₃及 C₄);烷氧基(包括但不限于 C₁、C₂、C₃及 C₄);磺酸酯,如烷基或芳烷基磺酰基,包括但不限于甲磺酰基;单磷酸酯、二磷酸酯或三磷酸酯;三苯甲基或单甲氧基三苯甲基、取代的苄基、三烷基甲硅烷基(例如二甲基-叔丁基甲硅烷基)或二苯基甲基甲硅烷基。酯中的芳基最适合包括苯基。术语“低级酰基”是指其中非羰基部分是低级烷基的酰

但不限于细胞系和动物且优选是人。或者,宿主可携带一部分病毒基因组,其复制或功能可由本发明化合物改变。术语宿主具体是指受感染的细胞、被病毒基因组全部或部分转染的细胞以及动物,特别是灵长类动物(包括但不限于黑猩猩)和人。在本发明的大多数动物应用中,宿主是人患者。然而,在某些适应症中,本发明明确地考虑到了兽医应用(如用于治疗黑猩猩)。

[0241] 术语“肽”是指含有由一个氨基酸的羧基连接到另一个的氨基上的二至一百个氨基酸的各种天然或合成化合物。

[0242] 术语“药学上可接受的盐或前药”在本说明书通篇中用于描述核苷酸化合物的任何药学上可接受的形式(如酯、磷酸酯、酯的盐或相关基团),其一旦施用于患者便提供核苷酸单磷酸酯化合物。药学上可接受的盐包括由药学上可接受的无机或有机碱和酸衍生的那些盐。适合的盐包括由碱金属如钾和钠、碱土金属如钙和镁与药学领域中熟知的许多其它酸衍生的那些盐。药学上可接受的前药是指在宿主中代谢,例如水解或氧化以形成本发明化合物的化合物。前药的典型实例包括在活性化合物的官能部分上具有生物学不稳定的保护基团的化合物。前药包括可被氧化、还原、氨化、脱氨基、羟基化、脱羟基化、水解、脱水、烷基化、脱烷基化、酰化、脱酰化、磷酸化或去磷酸化以产生活性化合物的化合物。本发明化合物的前药形式可具有抗病毒活性,可被代谢形成展现这种活性的化合物,或两者。

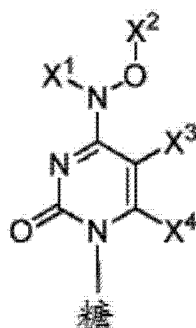
[0243] 前药还包括所公开的核苷的氨基酸酯(参见,例如欧洲专利说明书号 99493,其正文以引用的方式并入,该专利描述阿昔洛韦的氨基酸酯,具体是甘氨酸和丙氨酸酯,其显示与阿昔洛韦本身相比改善的水溶性,以及美国专利号 4,957,924(Beauchamp),其公开了以靠近 α -碳原子的侧链支化为特征的阿昔洛韦的缬氨酸酯,其显示与丙氨酸和甘氨酸酯相比在口服施用之后改善的生物利用率)。用于制备这种氨基酸酯的方法公开于美国专利号 4,957,924(Beauchamp)中,其内容以引用的方式并入。作为使用缬氨酸本身的一种替代方案,可使用氨基酸的功能等效物(例如,酰卤如酰氯,或酸酐)。在这种情况下,为了避免不合需要的副反应,使用氨基保护的衍生物可以是有利的。

[0244] II. 活性化合物

[0245] 在本发明的一个实施方案中,活性化合物具有式(I):

[0246] 在一个实施方案中,化合物是式(I)化合物:

[0247]



(I)

[0248] 或其药学上可接受的盐或前药,其中:

[0249] iv) X¹是 H、C₁-C₆烷基、C₁-C₆卤烷基、C₁-C₆烷氧基、C₂-C₆烯基、C₂-C₆炔基、COR¹或

COOR¹;

[0250] v) X²是氢、COR¹或COOR¹

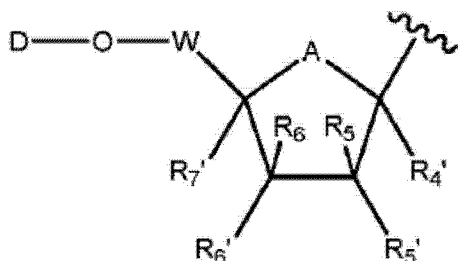
[0251] 其中每个 R¹独立地是 CH₂-O(CO)-X⁵、CH₂-O(CO)O-X⁵、C₁₋₂₀烷基、来源于脂肪醇的碳链或被以下取代的 C₁₋₂₀烷基：C₁-C₆烷基、烷氧基、二(C₁-C₆烷基)-氨基、氟、C₃₋₁₀环烷基、环烷基烷基、环杂烷基、芳基、杂芳基、取代的芳基或取代的杂芳基；其中所述取代基是 C₁₋₆烷基、或被 C₁-C₆烷基、C₁-C₆烷氧基、二(C₁-C₆烷基)-氨基、氟或 C₃₋₁₀环烷基取代的 C₁₋₆烷基

[0252] X⁵独立地是 C₁₋₂₀烷基、来源于脂肪醇的碳链或被以下取代的 C₁₋₂₀烷基：C₁-C₆烷基、烷氧基、C₃₋₁₀环烷基、环烷基烷基、环杂烷基、芳基、杂芳基、取代的芳基或取代的杂芳基；其中所述取代基是 C₁₋₆烷基、或被 C₁-C₆烷基、C₁-C₆烷氧基、二(C₁-C₆烷基)-氨基、氟或 C₃₋₁₀环烷基取代的 C₁₋₆烷基

[0253] vi) X³和 X⁴各自独立地是 H、C₁₋₆烷基、C₂₋₆烯基、C₂₋₆炔基、芳基、烷基芳基、卤素(F、Cl、Br、I)、NH₂、OH、SH、CN 或 NO₂。

[0254] 在一个实施方案中，糖是通式(II)的核糖或修饰的核糖：

[0255]



(II)

[0256] 其中：

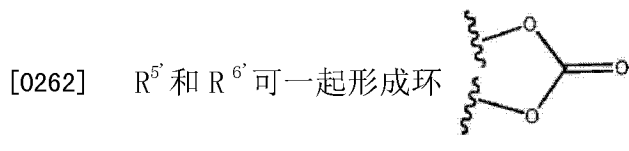
[0257] D 是 H、C(O)R¹、C(O)OR¹、二磷酸酯或三磷酸酯；

[0258] R¹如上所定义；

[0259] W 是 CL₂或 CL₂CL₂，其中 L 独立地选自由以下组成的组：H、C₁₋₆烷基、C₂₋₆烯基及 C₂₋₆炔基，其中 C₁₋₆烷基、C₂₋₆烯基及 C₂₋₆炔基可各自任选地含有一个或多个杂原子；

[0260] A 是 O、S、CH₂、CHF、CF₂、C=CH₂、C=CHF 或 C=CF₂；

[0261] R⁴、R⁵、R⁵、R⁶、R⁶及 R⁷独立地选自由以下组成的组：H、F、Cl、Br、I、OH、SH、NH₂、NHOH、NHNH₂、N₃、C(O)OH、CN、CH₂OH、C(O)NH₂、C(S)NH₂、C(O)OR、R、OR、SR、SSR、NHR 及 NR₂；



[0263] 在一个实施方案中，其中糖是式(II)，当 A 是 O 或 CH₂，D 是 H 或酰基，W 是 CH₂，R⁴和 R⁷是 H 时，R⁵、R⁵、R⁶、R⁶不能是 H、卤素、OH、SH、OCH₃、SCH₃、NH₂、NHCH₃、CH₃、CH=CH₂、CN、CH₂NH₂、CH₂OH 或 COOH。

[0264] 在另一实施方案中，R⁶独立地选自由以下组成的组：NHOH、NHNH₂、N₃、C(O)NH₂、C(S)NH₂、C(O)OR、R、OR、SR、SSR、NHR 及 NR₂；

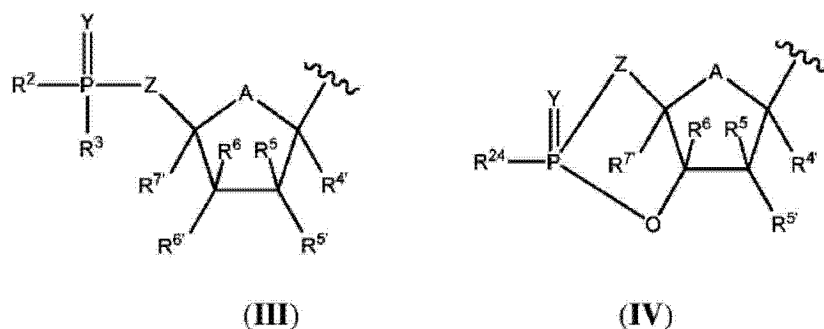
[0265] 在一个实施方案中,其中对于糖是式 (II) 的式 (I),当 A 是 O 或 S 时, $R^{7'}$ 不能是 OH、SH、 NH_2 、 $NHOH$ 、 $NHNH_2$ 、OR、SR、SSR、NHR 或 NR_2 。

[0266] 在另一实施方案中, $R^{7'}$ 独立地选自由以下组成的组: H、F、Cl、Br、I、 N_3 、 $C(O)OH$ 、CN、 CH_2OH 、 $C(O)NH_2$ 、 $C(S)NH_2$ 、 $C(O)OR$ 及 R;

[0267] R 独立地是 C_1 - C_6 烷基、 C_{2-6} 烯基、 C_{2-6} 炔基、 C_{3-6} 环烷基、(C_3 - C_6 环烷基)芳基、烷基芳基或芳基烷基,其中所述基团可被一个或多个如上所定义的取代基取代,其中代表性取代基包括例如羟烷基、氨基烷基和烷氧基烷基。

[0268] 在另一实施方案中,糖是通式 (III) 或 (IV) 的核糖或修饰的核糖:

[0269]



[0270] 其中:

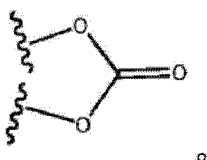
[0271] Y 是 O 或 S;

[0272] Z 选自由以下组成的组: CL_2 、 CL_2CL_2 、 CL_2OCL_2 、 CL_2SCL_2 、 CL_2O 、 OCL_2 及 CL_2NHCL_2 , 其中 L 独立地选自由以下组成的组: H、F、 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基及 C_{2-6} 炔基, 其中 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基及 C_{2-6} 炔基可各自任选地含有一个或多个杂原子;

[0273] A 是 O、S、 CH_2 、CHF、 CF_2 、 $C = CH_2$ 、 $C = CHF$ 或 $C = CF_2$;

[0274] $R^{4'}$ 、 R^5 、 $R^{5'}$ 、 R^6 、 $R^{6'}$ 及 $R^{7'}$ 独立地选自由以下组成的组: H、F、Cl、Br、I、OH、SH、 NH_2 、 $NHOH$ 、 $NHNH_2$ 、 N_3 、 $C(O)OH$ 、CN、 CH_2OH 、 $C(O)NH_2$ 、 $C(S)NH_2$ 、 $C(O)OR$ 、R、OR、SR、SSR、NHR 及 NR_2 ;

[0275] $R^{5'}$ 和 $R^{6'}$ 可一起形成环

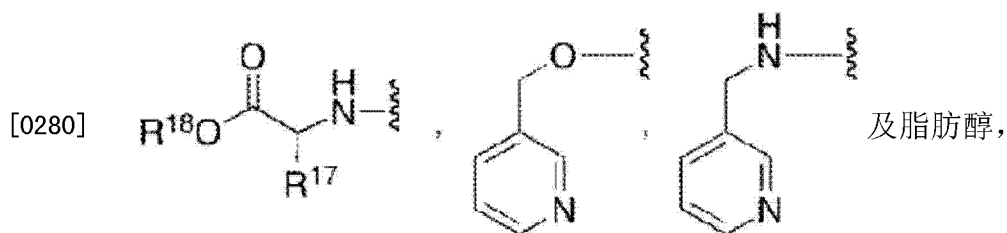


[0276] 在一个实施方案中,其中糖是式 (III) 或 (IV),当 A 是 O 或 S 时, $R^{7'}$ 不能是 OH、SH、 NH_2 、 $NHOH$ 、 $NHNH_2$ 、OR、SR、SSR、NHR 或 NR_2 。

[0277] 在另一实施方案中, $R^{7'}$ 独立地选自由以下组成的组: H、F、Cl、Br、I、 N_3 、 $C(O)OH$ 、CN、 CH_2OH 、 $C(O)NH_2$ 、 $C(S)NH_2$ 、 $C(O)OR$ 及 R。

[0278] R 独立地是 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基及 C_{2-6} 炔基、 C_{3-6} 环烷基、芳基、烷基芳基或芳基烷基,其中所述基团可被一个或多个如上所定义的取代基取代。

[0279] R^{24} 选自由以下组成的组: OR^{15} 、



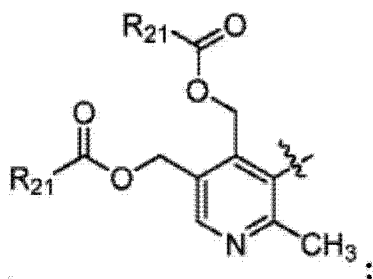
[0281] R^{15} 选自由以下组成的组: H、Li、Na、K、苯基及吡啶基;其中苯基和吡啶基任选地被零至三个独立地选自由 $(CH_2)_{0-6}CO_2R^{16}$ 和 $(CH_2)_{0-6}CON(R^{16})_2$ 组成的组的取代基取代;

[0282] R^{17} 选自在天然 L-氨基酸中存在的那些基团、 C_{1-6} 烷基、 (C_1-C_6) 烷基、 C_{2-6} 烯基、 C_{2-6} 炔基、 C_3-C_6 环烷基、芳基、烷基芳基或芳基烷基,其中所述基团可被一个或多个如上所定义的取代基取代。

[0283] R^{18} 是 H、 C_{1-20} 烷基、来源于脂肪醇(如油醇、二十八醇、三十醇、亚油醇等)的碳链或被以下取代的 C_{1-20} 烷基: C_1-C_6 烷基、 C_1-C_6 烷氧基、二 (C_1-C_6) 烷基-氨基、氟、 C_{3-10} 环烷基、环烷基烷基、环杂烷基、芳基如苯基、杂芳基如吡啶基、取代的芳基或取代的杂芳基;其中所述取代基是 C_{1-5} 烷基、或被 C_1-C_6 烷基、 C_1-C_6 烷氧基、二 (C_1-C_6) 烷基-氨基、氟、 C_{3-10} 环烷基或环烷基取代的 C_{1-5} 烷基。

[0284] 代表性 R^2 和 R^3 独立地选自由以下组成的组:

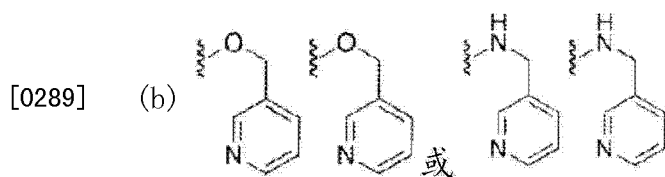
[0285] (a) OR^8 , 其中 R^8 是 H、Li、Na、K、 C_{1-20} 烷基、 C_{3-6} 环烷基、 C_{1-6} 卤烷基、芳基或杂芳基(包括但不限于苯基或萘基),任选地被一个至三个独立地选自由以下组成的组的取代基取代: C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、 C_{2-6} 炔基、 C_{1-6} 烷氧基、 $(CH_2)_{0-6}CO_2R^{9a}$ 、卤素、 C_{1-6} 卤烷基、 $-N(R^{9a})_2$ 、 C_{1-6} 酰基氨基、 $-NHSO_2C_{1-6}$ 烷基、 $-SO_2N(R^{9a})_2$ 、 $-SO_2C_{1-6}$ 烷基、 COR^{9b} 、硝基、氰基及

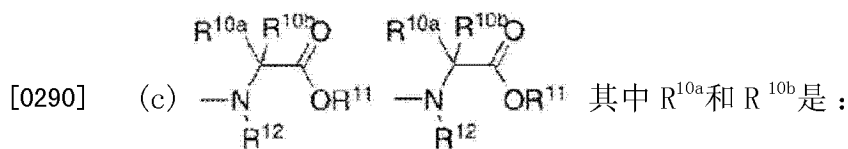


[0286] 其中 R^{21} 如下所定义:

[0287] R^{9a} 独立地是 H、 C_{1-20} 烷基、来源于脂肪醇的碳链或被以下取代的 C_{1-20} 烷基: C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基、二 (C_{1-6}) 烷基-氨基、氟、 C_{3-10} 环烷基或 C_{3-10} 环烷基烷基、环杂烷基、芳基、杂芳基、取代的芳基或取代的杂芳基;其中所述取代基是 C_{1-5} 烷基、或被 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基、二 (C_{1-6}) 烷基-氨基、氟、 C_{3-10} 环烷基或 C_{3-10} 环烷基烷基取代的 C_{1-5} 烷基;

[0288] R^{9b} 是 $-OR^{9a}$ 或 $-N(R^{9a})_2$;





[0291] (i) 独立地选自由以下组成的组： H 、 C_{1-10} 烷基、 $-(CH_2)_1NR^{9a}_2$ 、 C_{1-6} 羟烷基、 $-CH_2SH$ 、 $-(CH_2)_2S(O)_pMe$ 、 $-(CH_2)_3NHC(=NH)NH_2$ 、 $(1H-吡啶-3-基)$ 甲基、 $(1H-咪唑-4-基)$ 甲基、 $-(CH_2)_mCOR^{9b}$ 、芳基及芳基- C_{1-3} 烷基，所述芳基任选地被选自由以下组成的组的基团取代：羟基、 C_{1-10} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基、卤素、硝基及氰基；

[0292] (ii) R^{10a} 是 H 且 R^{10b} 和 R^{12} 一起是 $(CH_2)_{2-4}$ 以形成包含邻接的 N 和 C 原子的环；

[0293] (iii) R^{10a} 和 R^{10b} 一起是 $(CH_2)_n$ 以形成环；

[0294] (iv) R^{10a} 和 R^{10b} 都是 C_{1-6} 烷基；或

[0295] (v) R^{10a} 是 H 且 R^{10b} 是 H 、 CH_3 、 CH_2CH_3 、 $CH(CH_3)_2$ 、 $CH_2CH(CH_3)_2$ 、 $CH(CH_3)CH_2CH_3$ 、 CH_2Ph 、 CH_2 -吡啶-3-基、 $-CH_2CH_2SCH_3$ 、 CH_2CO_2H 、 $CH_2C(O)NH_2$ 、 CH_2CH_2COOH 、 $CH_2CH_2C(O)NH_2$ 、 $CH_2CH_2CH_2CH_2NH_2$ 、 $-CH_2CH_2CH_2NHC(NH)NH_2$ 、 CH_2 -咪唑-4-基、 CH_2OH 、 $CH(OH)CH_3$ 、 $CH_2((4'-OH)-Ph)$ 、 CH_2SH 或 C_{3-10} 环烷基；

[0296] p 是 0 至 2；

[0297] r 是 1 至 6；

[0298] n 是 4 或 5；

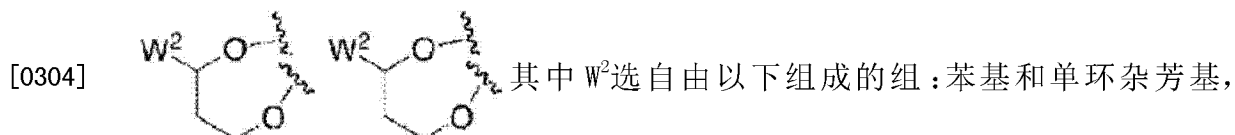
[0299] m 是 0 至 3；

[0300] R^{11} 是 H 、 C_{1-10} 烷基、或被以下取代的 C_{1-10} 烷基： C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基、二(C_{1-6} 烷基)-氨基、氟、 C_{3-10} 环烷基、 C_{3-10} 环烷基烷基、环杂烷基、芳基如苯基、杂芳基如吡啶基、取代的芳基或取代的杂芳基；其中所述取代基是 C_{1-5} 烷基、或被 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基、二(C_{1-6} 烷基)-氨基、氟、 C_{3-10} 环烷基或 C_{3-10} 环烷基烷基取代的 C_{1-5} 烷基；

[0301] R^{12} 是 H 或 C_{1-3} 烷基，或 R^{10a} 、或 R^{10b} 和 R^{12} 一起是 $(CH_2)_{2-4}$ 以便形成包含邻接的 N 和 C 原子的环；

[0302] (d) O 连接的脂质（包括磷脂）、 N 或 O 连接的肽、 O 连接的胆固醇或 O 连接的植物甾醇；

[0303] (e) R^2 和 R^3 可在一起形成环



其任选地被一个至三个独立地选自由以下组成的组的取代基取代： C_{1-6} 烷基、 CF_3 、 C_{2-6} 烯基、 C_{1-6} 烷氧基、 OR^{9c} 、 CO_2R^{9a} 、 COR^{9a} 、卤素、 C_{1-6} 卤烷基、 $-N(R^{9a})_2$ 、 C_{1-6} 酰基氨基、 $CO_2N(R^{9a})_2$ 、 SR^{9a} 、 $-NHSO_2C_{1-6}$ 烷基、 $-SO_2N(R^{9a})_2$ 、 $-SO_2C_{1-6}$ 烷基、 COR^{9b} 及氰基，并且其中所述单环杂芳基和取代的单环杂芳基具有 1-2 个独立地选自由 N 、 O 及 S 组成的组的杂原子，前提条件是：

[0305] a) 当存在两个杂原子且一个是 O 时，那么另一个不能是 O 或 S ，并且

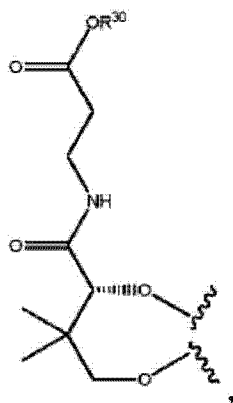
[0306] b) 当存在两个杂原子且一个是 S 时，那么另一个不能是 O 或 S ；

[0307] R^{9a} 独立地是 H 或 C_{1-6} 烷基；

[0308] R^{9b} 是 $-OR^{9a}$ 或 $-N(R^{9a})_2$ ；

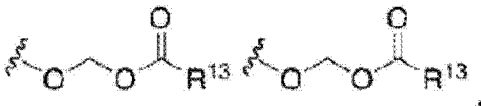
[0309] R^{9c} 是 H 或 C_{1-6} 酰基；

[0310] (f) R^2 和 R^3 可在一起形成环



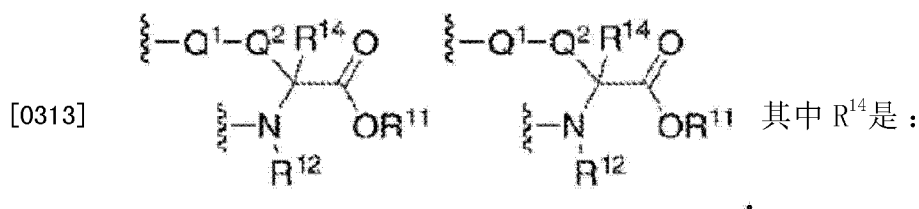
其中 R^{30} 是 H、 C_{1-20} 烷基、 C_{1-20} 烯基、来

源于脂肪醇的碳链或被以下取代的 C_{1-20} 烷基： C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基、二 (C_{1-6} 烷基)-氨基、氟、 C_{3-10} 环烷基、 C_{3-10} 环烷基烷基、环杂烷基、芳基、杂芳基、取代的芳基或取代的杂芳基；其中所述取代基是 C_{1-5} 烷基或被 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基、二 (C_{1-6} 烷基)-氨基、氟、 C_{3-10} 环烷基或 C_{3-10} 环烷基烷基取代的 C_{1-5} 烷基；

[0311] (g)  其中 R^{13} 选自由以下组成的组：H、 C_{1-10} 烷

基、被以下取代的 C_{1-10} 烷基： C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基、二 (C_{1-6} 烷基)-氨基、氟、 C_{3-10} 环烷基、 C_{3-10} 环烷基烷基、环杂烷基、芳基如苯基、杂芳基如吡啶基、取代的芳基和取代的杂芳基；其中所述取代基是 C_{1-5} 烷基、或被以下取代的 C_{1-5} 烷基： C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基、二 (C_{1-6} 烷基)-氨基、氟、 C_{3-10} 环烷基或 C_{3-10} 环烷基烷基；

[0312] (h) R^2 和 R^3 可在一起形成环



[0314] (i) 独立地选自由以下组成的组：H、 C_{1-10} 烷基、 $-(CH_2)_rNR_2^{9a}$ 、 C_{1-6} 羟烷基、 $-CH_2SH$ 、 $-(CH_2)_2S(O)_pMe$ 、 $-(CH_2)_3NHC(=NH)NH_2$ 、(1H-吡啶-3-基)甲基、(1H-咪唑-4-基)甲基、 $-(CH_2)_mCOR^{9b}$ 、芳基、芳基- C_{1-3} 烷基、杂芳基及杂芳基- C_{1-3} 烷基，所述芳基和杂芳基任选地被选自由以下组成的组的基团取代：羟基、 C_{1-10} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基、卤素、硝基及氰基；

[0315] (ii) R^{14} 是 H、 CH_3 、 CH_2CH_3 、 $CH(CH_3)_2$ 、 $CH_2CH(CH_3)_2$ 、 $CH(CH_3)CH_2CH_3$ 、 CH_2Ph 、 CH_2 -吡啶-3-基、 $-CH_2CH_2SCH_3$ 、 CH_2CO_2H 、 $CH_2C(O)NH_2$ 、 CH_2CH_2COOH 、 $CH_2CH_2C(O)NH_2$ 、 $CH_2CH_2CH_2CH_2NH_2$ 、 $CH_2CH_2CH_2NHC(NH)NH_2$ 、 CH_2 -咪唑-4-基、 CH_2OH 、 $CH(OH)CH_3$ 、 $CH_2((4'-OH)-Ph)$ 、 CH_2SH 或 C_{3-10} 环烷基；

[0316] p 是 0 至 2；

[0317] r 是 1 至 6；

[0318] m 是 0 至 3

[0319] Q^1 是 NR^{9a} 、O 或 S

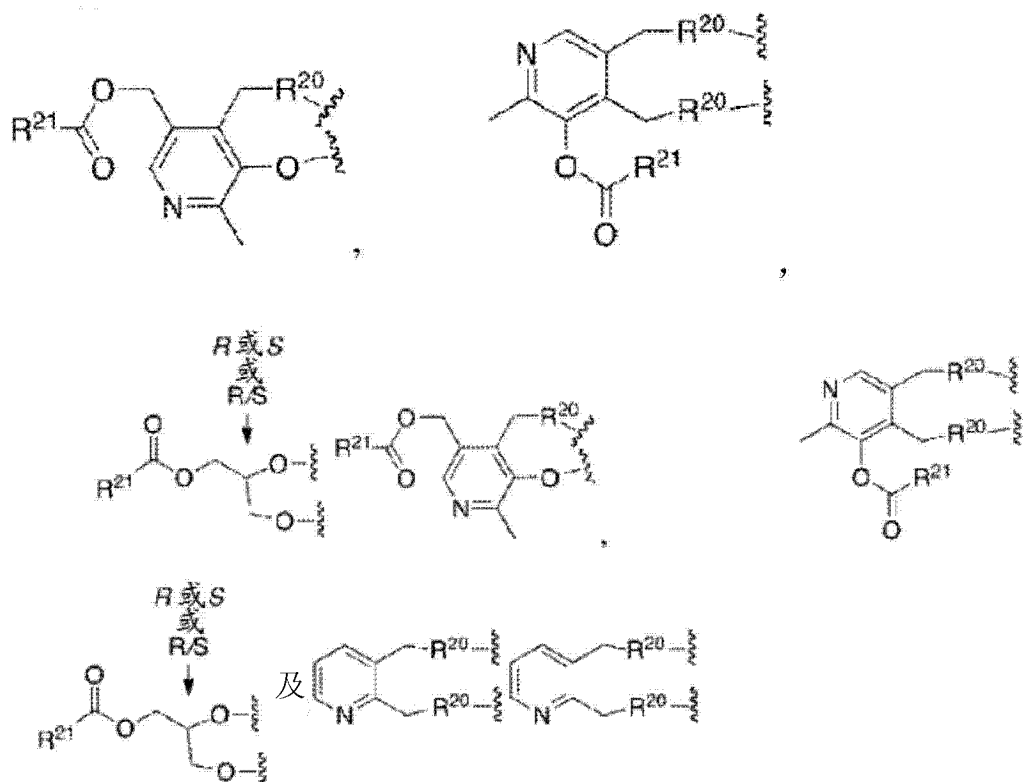
[0320] Q^2 是 C_{1-10} 烷基、 C_{1-6} 羟烷基、芳基和芳基- C_{1-3} 烷基、杂芳基及杂芳基- C_{1-3} 烷基, 所述芳基和杂芳基任选地被选自以下组成的组的基团取代: 羟基、 C_{1-10} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基、氟及氯;

[0321] R^{11} 是 H、 C_{1-10} 烷基、被以下取代的 C_{1-10} 烷基: C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基、二(C_{1-6} 烷基)-氨基、氟、 C_{3-10} 环烷基、 C_{3-10} 环烷基烷基、环杂烷基、芳基如苯基、杂芳基如吡啶基、取代的芳基或取代的杂芳基; 其中所述取代基是 C_{1-5} 烷基、或被以下取代的 C_{1-5} 烷基: C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基、二(C_{1-6} 烷基)-氨基、氟、 C_{3-10} 环烷基或 C_{3-10} 环烷基烷基;

[0322] R^{12} 是 H 或 C_{1-3} 烷基, 或 R^{14b} 和 R^{12} 一起是 $(CH_2)_{2-4}$ 以便形成包含邻接的 N 和 C 原子的环;

[0323] (i) R^2 和 R^3 可在一起形成选自以下组成的环

[0324]



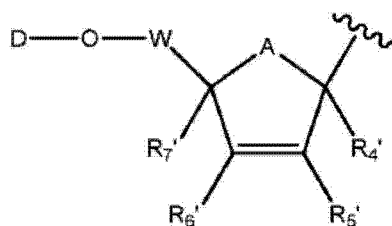
[0326] 其中 R^{20} 是 O 或 NH, 并且

[0327] R^{21} 选自以下组成的组: H、 C_{1-20} 烷基、 C_{1-20} 烯基、来源于脂肪酸的碳链、及被以下取代的 C_{1-20} 烷基: C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基、二(C_{1-6} 烷基)-氨基、氟、 C_{3-10} 环烷基、 C_{3-10} 环烷基烷基、环杂烷基、芳基、杂芳基、取代的芳基及取代的杂芳基; 其中所述取代基是 C_{1-5} 烷基或被 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基、二(C_{1-6} 烷基)-氨基、氟、 C_{3-10} 环烷基或 C_{3-10} 环烷基烷基取代的 C_{1-5} 烷基, 并且

[0328] (j) 当 R^3 是 OH、 O^-K^+ 、 O^-Li^+ 或 O^-Na^+ 时, R^2 是单磷酸酯或二磷酸酯。

[0329] 在又一实施方案中, 糖是通式 (V) 的核糖或修饰的核糖:

[0330]



(V)

[0331] 其中：

[0332] D 是 H、C(O)R¹、C(O)OR¹、二磷酸酯或三磷酸酯；

[0333] R¹独立地是 C₁₋₂₀烷基、来源于脂肪醇的碳链或被以下取代的 C₁₋₂₀烷基：C₁₋₆烷基、C₁₋₆烷氧基、二(C₁₋₆烷基)-氨基、氟、C₃₋₁₀环烷基、C₃₋₁₀环烷基烷基、环杂烷基、芳基、杂芳基、取代的芳基或取代的杂芳基；其中所述取代基是 C₁₋₅烷基、或被 C₁₋₆烷基、C₁₋₆烷氧基、二(C₁₋₆烷基)-氨基、氟、C₃₋₁₀环烷基或 C₃₋₁₀环烷基烷基取代的 C₁₋₅烷基；

[0334] W 是 CL₂或 CL₂CL₂，其中 L 独立地选自由以下组成的组：H、C₁₋₆烷基、C₂₋₆烯基及 C₂₋₆炔基，其中 C₁₋₆烷基、C₂₋₆烯基及 C₂₋₆炔基可各自任选地含有一个或多个杂原子；

[0335] A、R²、R³、Y、Z、R^{4'}、R^{5'}、R^{6'}及 R^{7'}如上关于式 I、II、III 及 IV 所定义；

[0336] 其中对于糖是式 (V) 的式 (I)，当 A 是 O 或 S 时，R^{7'}不能是 OH、SH、NH₂、NHOH、NHNH₂、OR、SR、SSR、NHR 或 NR₂，

[0337] 在另一实施方案中，R^{7'}独立地选自由以下组成的组：H、F、Cl、Br、I、N₃、C(O)OH、CN、CH₂OH、C(O)NH₂、C(S)NH₂、C(O)OR 及 R；

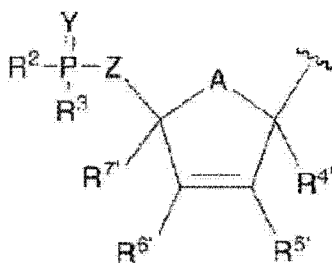
[0338] 其中 R 独立地是 C₁₋₆烷基、C₂₋₆烯基、C₂₋₆炔基、C₃₋₆环烷基、芳基、烷基芳基或芳基烷基，其中所述基团可被一个或多个如上关于式 I、II、III 及 IV 所定义的取代基（例如羟烷基、氨基烷基及烷氧基烷基）取代。

[0339] 在一个实施方案中，其中糖具有式 (V)，当 A 是 O 或 CH₂，D 是 H 或酰基，W 是 CH₂，R^{4'}和 R^{7'}是 H 时，R^{5'}和 R^{6'}不能是 H、卤素、OH、SH、OCH₃、SCH₃、NH₂、NHCH₃、CH₃、CH=CH₂、CN、CH₂NH₂、CH₂OH 或 COOH。

[0340] 在另一实施方案中，R^{5'}和 R^{6'}独立地选自由以下组成的组：NHOH、NHNH₂、N₃、C(O)NH₂、C(S)NH₂、C(O)OR、R、OR、SR、SSR、NHR 及 NR₂；

[0341] 在又一实施方案中，糖是通式 (VI) 的修饰的核糖：

[0342]



(VI)

[0343] 其中：

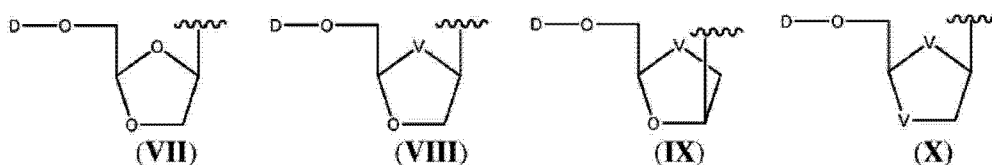
[0344] A、R²、R³、Y、Z、R^{4'}、R^{5'}、R^{6'}及 R^{7'}如上关于式 I、II、III 及 IV 所定义；

[0345] 其中对于糖是式 (VI) 的式 (I), 当 A 是 O 或 S 时, R^7 不能是 OH、SH、 NH_2 、NHOH、 $NHNH_2$ 、OR、SR、SSR、NHR 或 NR_2 ,

[0346] 其中 R 独立地是 C_1 - C_6 烷基、 C_2 - C_6 烯基、 C_2 - C_6 炔基、 C_3 - C_6 环烷基、芳基、烷基芳基或芳基烷基, 其中所述基团可被一个或多个如上关于式 I、II、III 及 IV 所定义的取代基 (例如, 羟烷基、氨基烷基及烷氧基烷基) 取代。

[0347] 在另一实施方案中, 糖是通式 (VII)、(VIII)、(IX) 及 (X) 的二氧戊环、氧硫杂环戊烷或二硫戊环:

[0348]



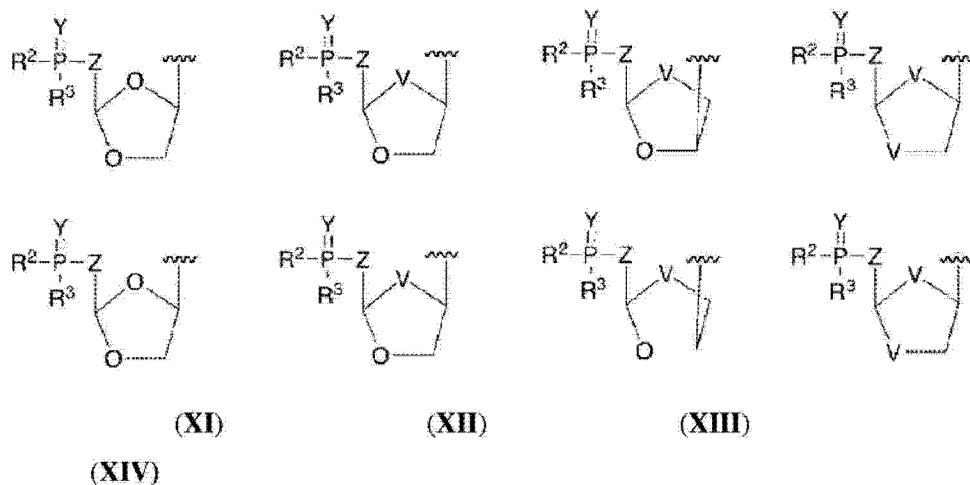
[0349] D 是 $C(O)OR^1$ 、二磷酸酯或三磷酸酯;

[0350] V 个别地是 S 或 Se;

[0351] R^1 独立地是 C_{1-20} 烷基、来源于脂肪醇的碳链或被以下取代的 C_{1-20} 烷基: C_1 - C_6 烷基、 C_1 - C_6 烷氧基、二 (C_1 - C_6 烷基)-氨基、氟、 C_{3-10} 环烷基、 C_{3-10} 环烷基烷基、环杂烷基、芳基、杂芳基、取代的芳基或取代的杂芳基; 其中所述取代基是 C_{1-5} 烷基、或被 C_1 - C_6 烷基、 C_1 - C_6 烷氧基、二 (C_1 - C_6 烷基)-氨基、氟、 C_{3-10} 环烷基或 C_{3-10} 环烷基烷基取代的 C_{1-5} 烷基;

[0352] 在又一实施方案中, 糖是通式 (XI)、(XII)、(XIII) 及 (XIV) 的二氧戊环、氧硫杂环戊烷或二硫戊环:

[0353]



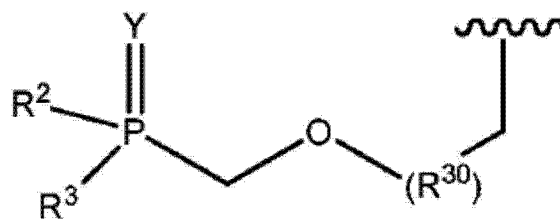
[0354] 其中:

[0355] V 个别地是 S 或 Se;

[0356] R^2 、 R^3 、Y 和 Z 如上关于式 I、II、III 及 IV 所定义。

[0357] 在又一实施方案中, 糖是通式 (XV) 的磷酰基甲氧烷基:

[0358]



(XV)

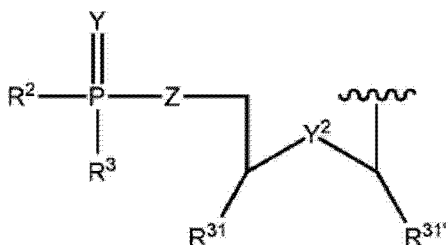
[0359] 其中：

[0360] R^2 、 R^3 和 Y 如上关于式 I、II、III 及 IV 所定义；并且；

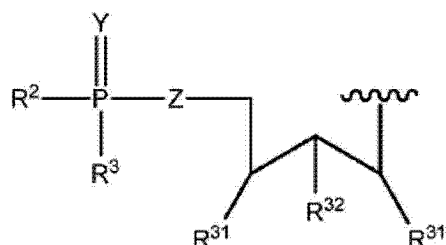
[0361] R^{30} 选自由以下组成的组： C_{1-20} 烷基、 C_{2-20} 烷基（包括但不限于 C_1-C_6 ）、烯基（包括但不限于 C_2-C_6 ）、和 C_{2-20} 炔基、 C_{3-10} （包括但不限于 C_2-C_6 ）、环烷基（包括但不限于 C_3-C_8 ）、芳基（包括但不限于 C_6-C_{10} ）、杂芳基（包括但不限于 C_6-C_{10} ）、芳基烷基以及烷基芳基；

[0362] 在又一实施方案中，糖具有通式 (XVI) 或 (XVII)：

[0363]



(XVI)



(XVII)

[0364] 其中：

[0365] R^2 、 R^3 、Z 和 Y 如上所定义；

[0366] Y^2 是 O、S、Se 或 NR；

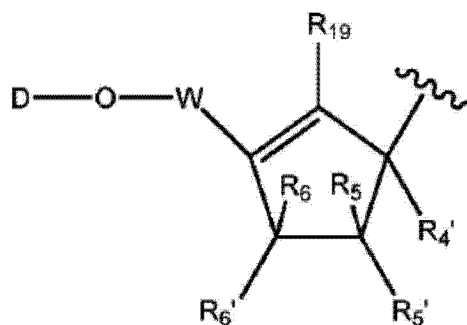
[0367] R 独立地是 C_1-C_6 烷基、 C_2-C_6 烯基、 C_2-C_6 炔基、 C_3-C_6 环烷基、芳基、烷基芳基或芳基烷基，其中所述基团可被一个或多个如上所定义的取代基（例如羟烷基、氨基烷基和烷氧基烷基）取代；

[0368] R^{31} 、 $R^{31'}$ 和 R^{32} 被定义为 H、 CH_3 或 CH_2OR^{33} ；并且

[0369] R^{33} 是 H 或 C_1-C_6 酰基。

[0370] 在另一实施方案中，糖是通式 (XVIII) 的修饰的核糖

[0371]



(XVIII)

[0372] 其中：

[0373] D、W、R^{4'}、R⁵、R^{5'}、R⁶及 R^{6'} 如上所定义；

[0374] R¹⁹是 H、F、Cl、Br、I、N₃、C(O)OH、CN、C(O)NH₂、C(S)NH₂、C(O)OR 或 R；

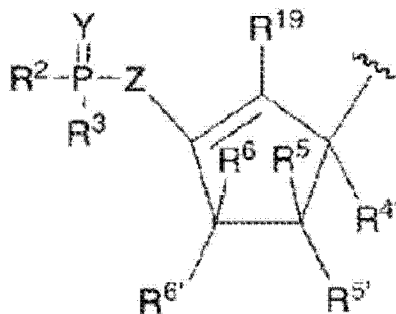
[0375] 其中 R 独立地是 C₁-C₆烷基、C₂-C₆烯基、C₂-C₆炔基、C₃-C₆环烷基、芳基、烷基芳基或芳基烷基，其中所述基团可被一个或多个如上所定义的取代基（例如，羟烷基、氨基烷基及烷氧基烷基）取代。

[0376] 在一个实施方案中，其中糖具有式 (XVII)，当 D 是 H 或酰基，W 是 CH₂，R^{4'} 和 R¹⁹ 是 H 时，R⁵、R^{5'}、R⁶、R^{6'} 不能是 H、卤素、OH、SH、OCH₃、SCH₃、NH₂、NHCH₃、CH₃、CH = CH₂、CN、CH₂NH₂、CH₂OH 或 COOH。

[0377] 在另一实施方案中，R^{6'} 可独立地选自由以下组成的组：NHOH、NHNH₂、N₃、C(O)NH₂、C(S)NH₂、C(O)OR、R、OR、SR、SSR、NHR 及 NR₂。

[0378] 在又一实施方案中，糖是式 (XIX) 的修饰的核糖：

[0379]



(XIX)

[0380] 其中：

[0381] R²、R³和 Y 如上关于式 I、II、III 及 IV 所定义；

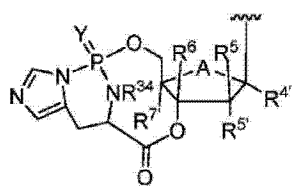
[0382] R^{4'}、R⁵、R^{5'}、R⁶及 R^{6'} 如上所定义；

[0383] R¹⁹是 H、F、Cl、Br、I、N₃、C(O)OH、CN、C(O)NH₂、C(S)NH₂、C(O)OR 或 R；

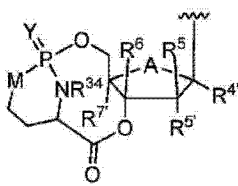
[0384] 其中 R 独立地是 C₁-C₆烷基、C₂-C₆烯基、C₂-C₆炔基、C₃-C₆环烷基、芳基、烷基芳基或芳基烷基，其中所述基团可被一个或多个如上关于式 I、II、III 及 IV 所定义的取代基（例如，羟烷基、氨基烷基及烷氧基烷基）取代。

[0385] 在又一实施方案中，糖具有式 (XX)、(XXI) 或 (XXII) 中的一种：

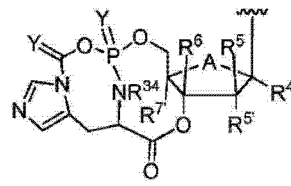
[0386]



(XX)



(XXI)



(XXII)

[0387] 其中：

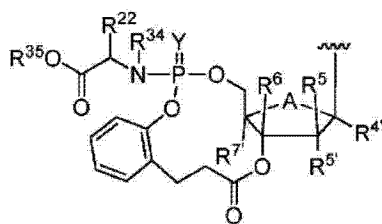
[0388] $R^{4'}$ 、 R^5 、 $R^{5'}$ 、 R^6 、Y、A 及 $R^{7'}$ 如上关于式 I、II、III 及 IV 所定义；[0389] R^{34} 是 C_1 - C_6 烷基；

[0390] M 是 O、S 或 NR；

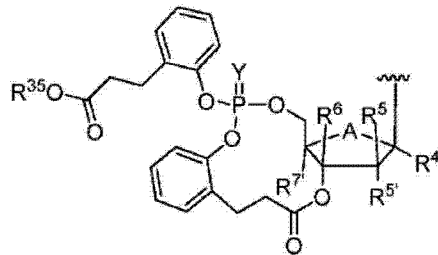
[0391] 其中 R 独立地是 C_1 - C_6 烷基、 C_{2-6} 烯基、 C_{2-6} 炔基、 C_3 - C_6 环烷基、芳基、烷基芳基或芳基烷基，其中所述基团可被一个或多个如上关于式 I、II、III 及 IV 所定义的取代基（例如羟烷基、氨基烷基和烷氧基烷基）取代；

[0392] 在另一实施方案中，糖具有式 (XXIII) 或 (XXIV) 中的一种：

[0393]



(XXIII)



(XXIV)

[0394] 其中：

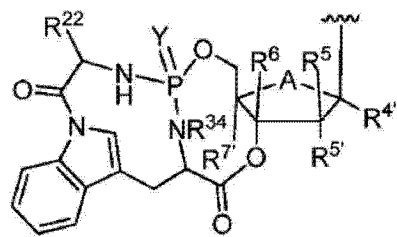
[0395] $R^{4'}$ 、 R^5 、 $R^{5'}$ 、 R^6 、Y、A、 $R^{7'}$ 、 R^{34} 如上关于式 I、II、III 及 IV 所定义；

[0396] R^{35} 是 H、 C_{1-10} 烷基、被以下取代的 C_{1-10} 烷基： C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基、二 (C_{1-6} 烷基)-氨基、氟、 C_{3-10} 环烷基、 C_{3-10} 环烷基烷基、环杂烷基、芳基如苯基、杂芳基如吡啶基、取代的芳基或取代的杂芳基；其中所述取代基是 C_{1-5} 烷基、或被 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基、二 (C_{1-6} 烷基)-氨基、氟、 C_{3-10} 环烷基或 C_{3-10} 环烷基烷基取代的 C_{1-5} 烷基；并且

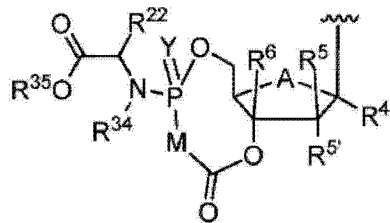
[0397] R^{22} 是 H、 CH_3 、 CH_2CH_3 、 $CH(CH_3)_2$ 、 $CH_2CH(CH_3)_2$ 、 $CH(CH_3)CH_2CH_3$ 、 CH_2Ph 、 CH_2 - 吡啶-3-基、 $-CH_2CH_2SCH_3$ 、 CH_2CO_2H 、 $CH_2C(O)NH_2$ 、 CH_2CH_2COOH 、 $CH_2CH_2C(O)NH_2$ 、 $CH_2CH_2CH_2CH_2NH_2$ 、 $CH_2CH_2CH_2NHC(NH)NH_2$ 、 CH_2 - 咪唑-4-基、 CH_2OH 、 $CH(OH)CH_3$ 、 $CH_2((4'-OH)-Ph)$ 、 CH_2SH 或 C_{3-6} 环烷基；

[0398] 在又一实施方案中，糖具有式 (XXV) 或 (XXVI) 中的一种：

[0399]



(XXV)



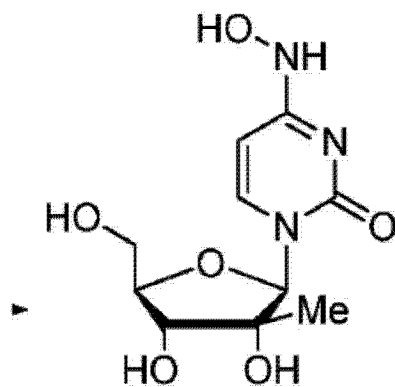
(XXVI)

[0400] 其中：

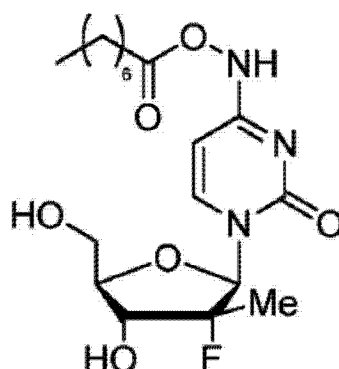
[0401] $R^{4'}$ 、 R^5 、 $R^{5'}$ 、 R^6 、 Y 、 M 、 $R^{7'}$ 、 R^{34} 、 R^{35} 、 R^{22} 如上关于式 I、II、III 及 IV 所定义；

[0402] 在一个实施方案中，化合物具有下式中的一种：

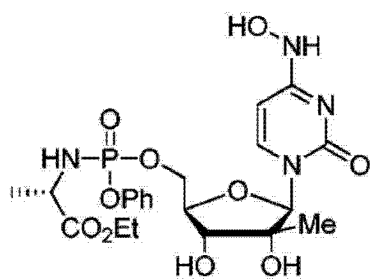
[0403]



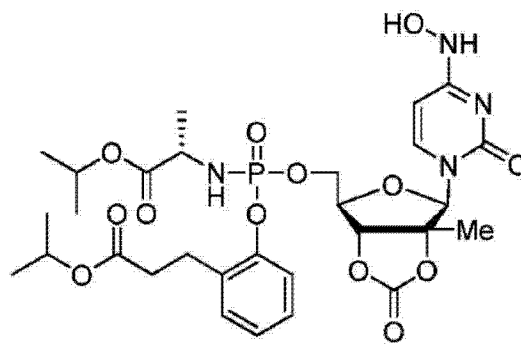
37



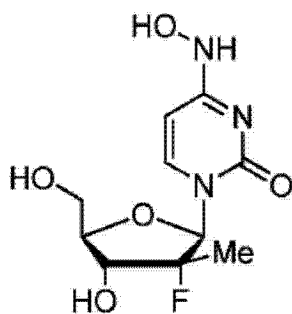
40



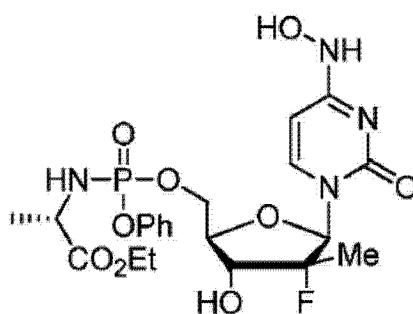
44



48



39



51

或其药学上

可接受的盐。

[0405] 在一个实施方案中, R^5 或 $R^{5'}$ 中的至少一个是 F、Cl 或 Me。

[0406] 在另一实施方案中, R^5 和 $R^{5'}$ 分别是 Me 和 F。

[0407] 在另一实施方案中, R^5 和 $R^{5'}$ 分别是 Me 和 Cl。

[0408] 在另一实施方案中, L 是甲基。

[0409] 在另一实施方案中, 碱基是嘧啶, 并且 R^5 和 $R^{5'}$ 中的一个 OH、Cl 或 F。

[0410] 本文所述的化合物可呈以下形式: β -L- 或 β -D- 构型、或其混合物, 包括其外消旋混合物。

[0411] 在那些实施方案中, 当本文所述的化合物的磷部分含有手性中心时, 这种手性中心可呈以下形式: R_p - 或 S_p - 构型或其混合物, 包括其外消旋混合物。

[0412] 在一个实施方案中, 化合物在生物系统中被转化为嘧啶三磷酸酯的混合物, 这是由于在嘧啶环上的 -NHOH 部分转化为 -NH₂ 部分且任选地嘧啶环上的 -NHOH 部分或所得的 -NH₂ 部分转化为 OH 部分。这类部分转化的一个实例显示如下, 其中嘧啶三磷酸酯的混合物 C 或 D 包括 4-NHOH、4-NH₂ 及 4-OH 嘧啶三磷酸酯。这种混合物可例如当所施用的化合物包括在糖的 5'-OH 部分上的前药时形成。适合的前药的实例包括如上所例示的那些。

[0413]



[0414] 因此, 通过施用单一化合物, 两种或三种活性化合物的组合可在药物代谢期间形成, 并且这些药物可以不同方式靶向病毒。例如, 其中 NHOH 直接地或间接地转化为 OH 部分的类似物当通过病毒掺入生长中的 DNA 或 RNA 链中时的作用类似于尿苷类似物。其中 NHOH 部分转化为 NH₂ 部分的类似物当通过病毒掺入生长中的 DNA 或 RNA 链中时的作用类似于胞嘧啶类似物。NHOH 类似物当通过病毒掺入生长中的 DNA 或 RNA 链中时的作用可类似于胞嘧啶或尿苷类似物。预期三种活性三磷酸酯的组合对比通常施用的任何单个三磷酸酯药物将产生不同且更难的突变选择。

[0415] 通过以多种方式攻击病毒, 即通过用 U 和 C 型类似物呈递病毒, 前药化合物具有抵御病毒耐药性的嵌入机制。也就是说, 如果病毒应突变以避免占用 U 类似物, 则其还可对一种或多种 C 类似物敏感, 且反之亦然, 并且如果应存在多种 C 类似物, 则对其中一种的抗性可能不会赋予对另一种的抗性。

[0416] 因此, 本文所述的化合物可作为单一组分施用, 且还提供组合抗病毒疗法的益处。当与另外的抗病毒剂、特别是非 NNRTI 抗病毒剂组合时, 所述组合可提供与许多另外的组分的组合的益处, 同时提供包括仅一种核苷前药的简单性。

[0417] III. 立体异构现象和多晶型现象

[0418] 本文所述的化合物可具有不对称中心并且作为外消旋体、外消旋混合物、个别非对映异构体或对映异构体存在,其中所有异构体形式都包括在本发明中。具有手性中心的本发明化合物可以光学活性和外消旋形式存在和分离。一些化合物可以展现多晶型现象。本发明包括本发明化合物的外消旋、光学活性、多晶型或立体异构形式或其混合物,其具有本文所述的有用的特性。光学活性形式可通过以下方式来制备:通过再结晶技术拆分外消旋形式,通过从光学活性起始材料来合成,通过手性合成,或通过使用手性固定相进行色谱分离或通过酶促拆分。可纯化各自的核苷,然后衍生化所述核苷以形成本文所述的化合物,或纯化核苷酸本身。

[0419] 光学活性形式的化合物可使用本领域中已知的任何方法来制备:包括但不限于通过再结晶技术拆分外消旋形式,通过从光学活性起始材料来合成,通过手性合成,或通过使用手性固定相进行色谱分离。

[0420] 获得光学活性材料的方法的实例包括至少以下。

[0421] i) 晶体的物理分离: 该技术手工地分离个别对映异构体的肉眼可见晶体。如果存在单独的对映异构体的晶体,即所述材料是团聚体且晶体在视觉上是不同的,便可使用此技术;

[0422] ii) 同时结晶: 该技术将个别的对映异构体从外消旋体溶液中单独结晶,可能只有当后者是呈固态的团聚体时才发生;

[0423] iii) 酶促拆分: 该技术在酶的作用下借助于针对对映异构体的不同反应速度部分或完全分离外消旋体;

[0424] iv) 酶促不对称合成: 在该合成技术中,合成的至少一个步骤使用酶促反应以获得所需对映异构体的对映异构纯的或富集的合成前体;

[0425] v) 化学不对称合成: 该合成技术在产物中产生不对称性(即手性)条件下从非手性前体合成所需对映异构体,所述合成可使用手性催化剂或手性助剂完成;

[0426] vi) 非对映异构体分离: 该技术通过外消旋化合物与对映异构纯的试剂(手性助剂)反应,将个别对映异构体转化为非对映异构体。所得非对映异构体然后通过色谱法或结晶借助于其现在更明显的结构差异被分离且手性助剂随后被除去以获得所需对映异构体;

[0427] vii) 一级和二级不对称转化: 该技术通过平衡外消旋体的非对映异构体,使得其在由所需对映异构体形成的非对映异构体溶液中占一定优势,或者是由来自所需对映异构体的非对映异构体的优先结晶作用破坏这种平衡,这样使得所有的物质最终几乎都被转化为所需对映异构体的结晶型非对映异构体。所需对映异构体然后从非对映异构体中释放;

[0428] viii) 动力学拆分: 该技术是指利用在动力学条件下对映异构体和手性、非外消旋试剂或催化剂反应的不同反应速率,来获得对外消旋体的部分或完全的拆分(或对部分拆分的化合物的进一步拆分);

[0429] ix) 从非外消旋前体的对映体特异性合成: 在该合成技术中,从非手性起始物质获得所需对映异构体,并且在合成过程中,其立体化学完整性未受到或仅仅受到最低程度的危害;

[0430] x) 手性液相色谱法: 在该技术中,外消旋体的对映异构体在液体流动相中借助于它们与固定相具有不同的相互作用(包括但不限于经由手性 HPLC) 而被分离。固定相可由

手性材料制成,或者流动相可含有另外的手性材料以诱导不同的相互作用;

[0431] xi) 手性气相色谱法: 该技术通过将外消旋体挥发,然后借助于对映异构体在气态流动相中与含有固定的非外消旋手性吸附相的柱相互作用的程度不同而将对映异构体分离出来;

[0432] xii) 用手性溶剂萃取: 该技术借助于一种对映异构体可以优先溶解于特定的手性溶剂中,从而实现对映异构体的分离;

[0433] xiii) 透过手性膜的转运: 在该技术中将外消旋体与薄膜屏障接触。屏障通常分离两种互溶液体,一种含有外消旋体,并且驱动力如浓度或压差使得优先转运透过膜屏障。由于膜的非外消旋手性性质只允许外消旋体的一种对映异构体通过,从而实现分离。

[0434] 在一个实施方案中使用包括但不限于模拟移动床色谱法的手性色谱法。广泛多种手性固定相可商购获得。

[0435] IV. 核苷酸盐或前药制剂

[0436] 在化合物具有足够碱性或酸性以形成稳定的无毒酸或碱盐的情况下,施用作为药理学上可接受的盐形式的化合物可为适当的。药理学上可接受的盐的实例是以形成生理学上可接受的阴离子的酸形成的有机酸加成盐,例如甲苯磺酸盐、甲磺酸盐、乙酸盐、柠檬酸盐、丙二酸盐、酒石酸盐、琥珀酸盐、安息香酸盐、抗坏血酸盐、 α -酮戊二酸盐以及 α -甘油磷酸盐。还可形成适合的无机盐,包括但不限于硫酸盐、硝酸盐、碳酸氢盐及碳酸盐。

[0437] 可利用本领域公知的标准方法,例如将足够碱性的化合物,如胺与提供生理学可接受的阴离子的合适的酸进行反应来获得药理学上可接受的盐。也可以制备羧酸的碱金属(例如钠、钾或锂)或碱土金属(例如钙)盐。

[0438] 可施用本文所述的核苷酸前药以另外提高核苷酸单磷酸酯的活性、生物利用率、稳定性或以其它方式改变其特性。

[0439] 许多核苷酸前药配体是已知的。一般来说,核苷的单磷酸酯或其它类似物的烷基化、酰化或其它亲脂性修饰将提高核苷酸的稳定性。

[0440] 可取代单磷酸酯部分上的一个或多个氢的取代基的实例是烷基、芳基、类固醇、碳水化合物,包括但不限于糖、1,2-二酰基甘油及醇。许多都描述于 R. Jones & N. Bischofberger, *Antiviral Research*, 1995, 27, 1-17 及 S. J. Hecker & M. D. Erion, *J. Med. Chem.*, 2008, 51, 2328-2345 中。这些中的任一种都可组合所公开的核苷酸使用以实现预期效果。

[0441] 如以下文献(以引用的方式并入本文)中所公开,所述活性核苷还可以 5'-磷酸酯形式提供: Kucera, L. S., N. Iyer, E. Leake, A. Raben, Modest E. K., D. L. W., 和 C. Piantadosi, "Novel membrane-interactive ether lipid analogs that inhibit infectious HIV-1 production and induce defective virus formation," *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, 1990, 6, 491-501; Piantadosi, C, J. Marasco C. J., S. L. Morris-Natschke, K. L. Meyer, F. Gumus, J. R. Surles, K. S. Ishaq, L. S. Kucera, N. Iyer, C. A. Wallen, S. Piantadosi 和 E. J. Modest, "Synthesis and evaluation of novel ether lipid nucleoside conjugates for anti-HIV activity," *J. Med. Chem.*, 1991, 34, 1408-14; Hosteller, K. Y., D. D. Richman, D. A. Carson, L. M. Stuhmiller, G. M. T. van Wijk 和 H. van den Bosch, "Greatly enhanced inhibition

of human immunodeficiency virus type 1 replication in CEM and HT4-6C cells by 3'-deoxythymidine diphosphate dimyristoylglycerol, a lipid prodrug of 3, -deoxythymidine, "Antimicrob. Agents Chemother., 1992, 36, 2025-29; Hostetler, K. Y., L. M. Stuhmiller, H. B. Lenting, H. van den Bosch 和 D. D. Richman, "Synthesis and antiretroviral activity of phospholipid analogs of azidothymidine and other antiviral nucleosides." J. Biol. Chem., 1990, 265, 61127。

[0442] 公开可（优选在本文所述的核苷酸的 R²和 / 或 R³位置处）共价结合到核苷中的合适的亲脂性取代基，或亲脂性制剂的美国专利的非限制性实例包括：美国专利号 5, 149, 794 (Yatvin 等人)；5, 194, 654 (Hostetler 等人)；5, 223, 263 (Hostetler 等人)；5, 256, 641 (Yatvin 等人)；5, 411, 947 (Hostetler 等人)；5, 463, 092 (Hostetler 等人)；5, 543, 389 (Yatvin 等人)；5, 543, 390 (Yatvin 等人)；5, 543, 391 (Yatvin 等人)；以及 5, 554, 728 (Basava 等人)，所有均以引用的方式并入。公开可连接至本发明的核苷的亲脂性取代基的外国专利申请包括：WO 89/02733、WO 90/00555、WO 91/16920、WO 91/18914、WO 93/00910、WO 94/26273、WO 96/15132、EP 0 350 287、EP 93917054.4 以及 WO 91/19721。

[0443] V. 治疗方法

[0444] 感染了 HIV-1、HIV-2、HBV、HCV、诺瓦克病毒、札如病毒、HSV-1、HSV-2、登革热病毒、黄热病或其基因片段的宿主（包括但不限于人）可通过在药学上可接受的载体或稀释剂存在下向所述患者施用有效量的活性化合物或其药学上可接受的前药或盐来治疗。活性物质可通过任何适当途径，例如口服、胃肠外、静脉内、真皮内、皮下或局部，以液体或固体形式来施用。

[0445] 所述化合物还可用于治疗癌症。可根据本发明方法用本文所述的化合物及这些化合物的药学上可接受的盐和前药治疗的患者包括例如已被诊断为具有以下疾病的患者：肺癌、骨癌、胰腺癌、皮肤癌、头颈癌、皮肤或眼内黑素瘤、子宫癌、卵巢癌、直肠癌或肛门癌、胃癌、结肠癌、乳腺癌、妇科肿瘤（例如子宫肉瘤、输卵管癌、子宫内膜癌、子宫颈癌、阴道癌或外阴癌）、何杰金氏病、食道癌、小肠癌、内分泌系统癌（例如甲状腺癌、甲状旁腺癌或肾上腺癌）、软组织肉瘤、尿道癌、阴茎癌、前列腺癌、慢性或急性白血病、儿童实体肿瘤、淋巴瘤、膀胱癌、肾或输尿管癌（例如肾细胞癌、肾盂癌）、或中枢神经系统肿瘤（例如原发性 CNS 淋巴瘤、脊椎轴肿瘤、脑干神经胶质瘤或垂体腺瘤）。

[0446] 本发明还涉及用于抑制患者中的异常细胞增殖的方法和药物组合物，所述药物组合物包含一定量的本文所述的化合物或其药学上可接受的盐或前药、以及定量的一种或多种选自抗血管生成剂、信号转导抑制剂及抗增殖剂的物质。

[0447] 抗血管生成剂，如 MMP-2（基质 - 金属蛋白酶 2）抑制剂、MMP-9（基质 - 金属蛋白酶 9）抑制剂和 COX-II（环加氧酶 II）抑制剂可以与本文所述的式 1 的化合物和药物组合物联合使用。有用的 COX-II 抑制剂的实例包括 CELEBREX™（阿来考昔）、伐地考昔及罗非考昔。有用的基质金属蛋白酶抑制剂的实例描述于 WO 96/33172（公开于 1996 年 10 月 24 日）、WO 96/27583（公开于 1996 年 3 月 7 日）、欧洲专利申请号 97304971.1（申请于 1997 年 7 月 8 日）、欧洲专利申请号 99308617.2（申请于 1999 年 10 月 29 日）、WO 98/07697（公开于 1998 年 2 月 26 日）、WO 98/03516（公开于 1998 年 1 月 29 日）、WO 98/34918（公开于 1998 年 8 月 13 日）、WO 98/34915（公开于 1998 年 8 月 13 日）、WO 98/33768（公开于 1998

年 8 月 6 日)、WO 98/30566(公开于 1998 年 7 月 16 日)、欧洲专利公布 606,046(公开于 1994 年 7 月 13 日)、欧洲专利公布 931,788(公开于 1999 年 7 月 28 日)、WO 90/05719(公开于 1990 年 5 月 31 日)、WO 99/52910(公开于 1999 年 10 月 21 日)、WO 99/52889(公开于 1999 年 10 月 21 日)、WO 99/29667(公开于 1999 年 6 月 17 日)、PCT 国际申请号 PCT/IB98/01113(申请于 1998 年 7 月 21 日)、欧洲专利申请号 99302232.1(申请于 1999 年 3 月 25 日)、英国专利申请号 9912961.1(申请于 1999 年 6 月 3 日)、美国临时申请号 60/148,464(申请于 1999 年 8 月 12 日)、美国专利号 5,863,949(授权于 1999 年 1 月 26 日)、美国专利号 5,861,510(授权于 1999 年 1 月 19 日)以及欧洲专利公布 780,386(公开于 1997 年 6 月 25 日)中,所有专利都以引用的方式整体并入本文。优选的 MMP 抑制剂是不表现关节痛的那些抑制剂。更优选的是相对于其它基质-金属蛋白酶(即 MMP-1、MMP-3、MMP-4、MMP-5、MMP-6、MMP-7、MMP-8、MMP-10、MMP-11、MMP-12 及 MMP-13)选择性抑制 MMP-2 和/或 MMP-9 的那些。

[0448] 本文所述的化合物还可与以下活性剂一起使用:信号转导抑制剂,如可抑制 EGFR(表皮生长因子受体)反应的试剂,如 EGFR 抗体、EGF 抗体和作为 EGFR 抑制剂的分子; VEGF(血管内皮生长因子)抑制剂,如 VEGF 受体和可以抑制 VEGF 的分子;和 erbB2 受体抑制剂,如与 erbB2 受体结合的有机分子或抗体,例如 HERCEPTIN™(Genentech, Inc. of South San Francisco, Calif., USA)。

[0449] EGFR 抑制剂描述于例如 WO 95/19970(公开于 1995 年 7 月 27 日)、WO 98/14451(公开于 1998 年 4 月 9 日)、WO 98/02434(公开于 1998 年 1 月 22 日)以及美国专利号 5,747,498(授权于 1998 年 5 月 5 日)中,并且这种物质可用于如本文所述的本发明中。EGFR-抑制剂包括但不限于单克隆抗体 C225 和抗 EGFR 22Mab(ImClone Systems Incorporated of New York, N.Y., USA)、ABX-EGF(Abgenix/Cell Genesys)、EMD-7200(Merck KgaA)、EMD-5590(Merck KgaA)、MDX-447/H-477(Medarex Inc. of Annandale, N.J., USA 和 Merck KgaA)、以及化合物 ZD-1834、ZD-1838 和 ZD-1839(AstraZeneca)、PKI-166(Novartis)、PKI-166/CGP-75166(Novartis)、PTK 787(Novartis)、CP 701(Cephalon)、来氟米特(Pharmacia/Sugen)、CI-1033(Warner Lambert Parke Davis)、CI-1033/PD 183,805(Warner Lambert Parke Davis)、CL-387,785(Wyeth-Ayerst)、BBR-1611(Boehringer Mannheim GmbH/Roche)、Naamidine A(Bristol Myers Squibb)、RC-3940-II(Pharmacia)、BIBX-1382(Boehringer Ingelheim)、OLX-103(Merck&Co. of Whitehouse Station, N.J., USA)、VRCTC-310(Ventech Research)、EGF 融合毒素(Seragen Inc. of Hopkinton, Mass.)、DAB-389(Seragen/Lilgand)、ZM-252808(Imperial Cancer Research Fund)、RG-50864(INSERM)、LFM-A12(Parker Hughes Cancer Center)、WHI-P97(Parker Hughes Cancer Center)、GW-282974(Glaxo)、KT-8391(Kyowa Hakko)及 EGFR 疫苗(York Medical/Centro de Immunologia Molecular(CIM))。这些及其它 EGFR-抑制剂可用于本发明中。

[0450] 以下 VEGF 抑制剂也可与本发明化合物组合:例如 CP-547,632(Pfizer Inc., N.Y.)、AG-13736(Agouron Pharmaceuticals, Inc. a Pfizer Company)、SU-5416 及 SU-6668(Sugen Inc. of South San Francisco, Calif., USA) 和 SH-268(Schering)。VEGF 抑制剂描述于例如 WO 99/24440(公开于 1999 年 5 月 20 日)、PCT 国际申请 PCT/

IB99/00797(申请于1999年5月3日)、WO 95/21613(公开于1995年8月17日)、WO 99/61422(公开于1999年12月2日)、美国专利号5,834,504(授权于1998年11月10日)、WO 98/50356(公开于1998年11月12日)、美国专利号5,883,113(授权于1999年3月16日)、美国专利号5,886,020(授权于1999年3月23日)、美国专利号5,792,783(授权于1998年8月11日)、WO 99/10349(公开于1999年3月4日)、WO 97/32856(公开于1997年9月12日)、WO 97/22596(公开于1997年6月26日)、WO 98/54093(公开于1998年12月3日)、WO 98/02438(公开于1998年1月22日)、WO 99/16755(公开于1999年4月8日)以及WO 98/02437(公开于1998年1月22日)中,所有专利都以引用的方式整体并入本文。本发明中适用的一些具体 VEGF 抑制剂的其它实例是 IM862(Cytran Inc. of Kirkland, Wash., USA); Genentech, Inc. of South San Francisco, Calif. 的抗 VEGF 单克隆抗体; 以及血管酶(angiozyme), 一种来自 Ribozyne(Boulder, Colo.) 和 Chiron(Emeryville, Calif.) 的合成核糖酶。这些及其它 VEGF 抑制剂可用于如本文所述的本发明中。

[0451] ErbB2 受体抑制剂如 CP-358,774(OSI-774)(它塞瓦)(OSI Pharmaceuticals, Inc.)、GW-282974(Glaxo Wellcome plc) 以及单克隆抗体 AR-209(Aronex Pharmaceuticals Inc. of The Woodlands, Tex., USA) 和 2B-1(Chiron) 可此外与本发明化合物组合, 例如以下专利中所示的那些: WO 98/02434(公开于1998年1月22日)、WO 99/35146(公开于1999年7月15日)、WO 99/35132(公开于1999年7月15日)、WO 98/02437(公开于1998年1月22日)、WO 97/13760(公开于1997年4月17日)、WO 95/19970(公开于1995年7月27日)、美国专利号5,587,458(授权于1996年12月24日)以及美国专利号5,877,305(授权于1999年3月2日), 所有专利都据此以引用的方式整体并入本文。适用于本发明中的 ErbB2 受体抑制剂还描述于1999年1月27日申请的美国临时申请号60/117,341和1999年1月27日申请的美国临时申请号60/117,346中, 这两者都以引用的方式整体并入本文。erbB2 受体抑制剂化合物和在上述 PCT 申请、美国专利和美国临时申请中描述的物质以及抑制 erbB2 受体的其它化合物和物质都可根据本发明与本文所述的化合物一起使用。

[0452] 化合物还可与适用于治疗异常细胞增殖或癌症的其它试剂一起使用, 包括但不限于能增强抗肿瘤免疫应答的试剂, 如 CTLA4(细胞毒性淋巴细胞抗原4)抗体、及能阻断 CTLA4 的其它试剂; 以及抗增殖剂如其它法呢基蛋白转移酶抑制剂及其类似物。可用于本发明中的特定的 CTLA4 抗体包括美国临时申请60/113,647(申请于1998年12月23日)中描述的那些, 该专利以引用的方式整体并入, 然而, 其它 CTLA4 抗体也可以用于本发明。

[0453] 还可使用其它抗血管生成剂, 包括但不限于其它 COX-II 抑制剂、其它 MMP 抑制剂、其它抗 VEGF 抗体或其它血管形成效应物的抑制剂。

[0454] 本文所述的化合物和药物组合物可用于治疗或预防一种或多种诺瓦克病毒以及杯状病毒科分类学科中的其它病毒的感染。

[0455] 在治疗诺瓦克病毒感染的治疗用途中, 将化合物和/或组合物在适于实现治疗益处的剂量水平下向诊断有诺瓦克病毒感染的患者施用。“治疗益处”及语法等效物指的是化合物的施用造成患者在一段时间内的有益效果。例如, 当在患者中的诺瓦克病毒滴度或病毒载量减少或停止增加时, 可以实现治疗益处。

[0456] 如果化合物的施用减慢或完全停止了诺瓦克病毒感染通常伴随的不利症状的进展,那么不论患者体内的诺瓦克病毒滴度或病毒载量如何,也认为获得了治疗益处。本文所述的化合物和/或组合物还可预防性地施用于有发展诺瓦克病毒感染危险或已经暴露于诺瓦克病毒的患者,以防止诺瓦克病毒感染的发展。例如,化合物和/或其组合物可向可能已经暴露于诺瓦克病毒的患者施用。

[0457] 诺瓦克病毒疾病的爆发经常发生在封闭或半封闭的社区群体中,如长期护理机构、医院、监狱以及旅游客轮,在那些地方一旦病毒被引入,感染便会通过人与人之间的传播或经由污染的食物非常快速地传播。许多诺瓦克病毒爆发都追溯到由一个感染者触摸过的食物。因此,向很可能接触到诺瓦克病毒或其它杯状病毒科的这些机构中的个体提供预防剂量的本文所述的化合物可为有利。

[0458] VI. 组合或交替疗法

[0459] 在一个实施方案中,本发明化合物可与选自以下的至少一种其它抗病毒剂一起使用:进入抑制剂、逆转录酶抑制剂、蛋白酶抑制剂以及基于免疫的治疗剂。

[0460] 例如,当用于治疗或预防 HIV 或 HBV 感染时,活性化合物或其前药或药学上可接受的盐可与另一种抗病毒剂组合或交替施用,如抗 HIV、抗 HBV 或抗 HCV 剂,包括但不限于上式的那些物质。一般说来,在组合疗法中,有效剂量的两种或更多种试剂在一起施用,而在交替疗法期间,有效剂量的每个试剂被连续地施用。剂量将取决于药物的吸收、失活及排泄率以及本领域技术人员已知的其它因素。应注意,剂量值还将随有待缓解的病状的严重性而变化。进一步应理解的是对于任何具体的受试者、具体的给药方案和安排都应该根据个体的需要以及施用或监督组合物施用的人的专业判断并随着时间来调整。

[0461] 可与本文所公开的化合物组合使用的抗病毒剂的非限制性实例包括在下表中的那些。

[0462] 乙型肝炎疗法

[0463]

药物名称	药物类别	公司
tron A 干扰素 α -2b)	干扰素	Schering-Plough
egasys 聚乙二醇化干扰素 α -2a)	干扰素	Roche
pivir-HBV 拉米夫定; 3TC)	核苷类似物	GlaxoSmithKline
epsera (阿德福韦酯)"	核苷类似物	Gilead Sciences
mtriva® (恩曲他滨; TC)	核苷类似物	Gilead Sciences http://www.hivandhepatitis.com/advertisement/triangle.html :
恩替卡韦	核苷类似物	Bristol-Myers Squibb
levudine (CLV, L- MAU)	核苷类似物	Pharmasset/Bukwang
CH 126, 443 (L-Fd4C)	核苷类似物	Achillion Pharmaceuticals
M365	核苷类似物	Amrad
氨多索韦(AMDX, APD)	核苷类似物	RFS Pharma LLC
dT (替比夫定)	核苷类似物	Idenix/Novartis

[0464]

药物名称	药物类别	公司
S-1220	核苷类似物	Emory University
heradigm	免疫刺激剂	Epimmune
adaxin (胸腺素)	免疫刺激剂	SciClone
HT 899	病毒蛋白	Enzo Biochem
exelucitabine/Reverset/D-4FC	核苷类似物	Pharmasset
PD	核苷类似物	RFS Pharma
BV DNA 疫苗	免疫刺激剂	PowderJect (UK)
CC 478	核苷类似物	Eli Lilly
dLdC (伐托他滨)	核苷类似物	Idenix
IN 2001	核苷类似物	ICN
acicvir	核苷类似物	Pharmasset/Emory University
罗波斯塔双黄酮	核苷类似物	Advanced Life Sciences

[0465]

药物名称	药物类别	公司
M-019c		Emory University
喷昔洛韦	核苷类似物	Novartis
法昔洛韦	核苷类似物	Novartis
XG	核苷类似物	RFS Pharma, LLC
a-AMP 前药		
BV/MF59		
DP-P-阿昔洛韦	核苷类似物	
锤头状核酶		
糖苷酶抑制剂		
聚乙二醇化干扰素		

[0466]

人类单克隆抗体

[0467] HIV 疗法 :蛋白酶抑制剂 (PI)

[0468]

商标名称	一般名称	缩写	实验代码	制药公司
Invirase®	沙奎那韦 (硬凝胶帽)	SQV(HGC)	Ro-31-8959	Hoffmann-La Roche
Fortovase®	沙奎那韦 (软凝胶帽)	SQV (SGC)		Hoffmann-La Roche
Norvir®	利托那韦	RTV	ABT-538	Abbott Laboratories
Crixivan®	茚地那韦	IDV	MK-639	Merck & Co.
Viracept®	奈非那韦	NFV	AG-1343	Pfizer
Agenerase®	安普那韦	APV	141W94 或 VX-478	GlaxoSmithKline
Kaletra®	洛匹那韦 + 利托那韦	LPV	ABT-378/r	Abbott Laboratories
Lexiva®	福沙那韦		GW-433908 或 VX-175	GlaxoSmithKline
Aptivus®	替拉那韦	TPV	PNU-140690	Boehringer Ingelheim
Reyataz®	阿扎那韦		BMS-232632	Bristol-Myers Squibb
	贝肯那韦		GW640385	GlaxoSmithKline
Prezista™	地瑞那韦		TMC114	Tibotec

[0469] HIV 疗法 :核苷 / 核苷酸逆转录酶抑制剂 (NRTI)

[0470]

商标名称	一般名称	缩写	实验代码	制药公司
Retrovir®	齐多夫定	AZT 或 ZDV		GlaxoSmithKline
Epivir®	拉米夫定	3TC		GlaxoSmithKline
Combivir®	齐多夫定 + 拉米夫定	AZT + 3TC		GlaxoSmithKline
Trizivir®	阿巴卡韦 + 齐多夫定 + 拉米夫定	ABC + AZT + 3TC		GlaxoSmithKline
Ziagen®	阿巴卡韦	ABC	1592U89	GlaxoSmithKline
Epzicom™	阿巴卡韦 + 拉米夫定	ABC + 3TC		GlaxoSmithKline
Hivid®	扎西他滨	ddC		Hoffmann-La Roche
Videx®	去羟肌苷 : 缓冲形式	ddI	BMV-40900	Bristol-Myers Squibb

[0471]

恩替卡韦	贝乐克			Bristol-Myers Squibb
Videx® EC	去羟肌苷： 延迟释放胶囊	ddI		Bristol-Myers Squibb
Zerit®	司他夫定	d4T	BMV-27857	Bristol-Myers Squibb
商标名称	一般名称	缩写	实验代码	制药公司
Viread™	替诺福韦地索 普西富马酸盐 (DF)	TDF 或 双(POC) PMPA		Gilead Sciences
Emtriva®	恩曲他滨	FTC		Gilead Sciences
Truvada®	Viread Emtriva	TDF + FTC		Gilead Sciences
Atripla™		TDF + FTC + Sustiva®		Gilead/BMS/Merck
	氨多索韦	DAPD, AMDX		RFS Pharma LLC
阿立他滨	AVX754		SPD754	Avexa Ltd
	阿洛夫定	FLT	MIV-310	Boehringer
	艾夫他滨	L-FD4C	ACH-126443	Achillion
	KP-1461		SN1461, SN1212	Koronis
	Racivir	RCV		Pharmasset
Dexelvucitabine	Reverset	D-D4FC	DPC817	Pharmasset/Emory
			GS9148 及其前 药	Gilead Sciences

[0472] HIV 疗法：非核苷逆转录酶抑制剂 (NNRTI)

[0473]

商标名称	一般名称	缩写	实验代码	制药公司
Viramune®	奈韦拉平	NVP	BI-RG-587	Boehringer Ingelheim
Rescriptor®	地拉韦啉	DLV	U-90152S/T	Pfizer
Sustiva®	依法韦仑	EFV	DMP-266	Bristol-Myers Squibb
	(+)-胡桐素 A			Sarawak Medichem
	卡普韦林	CPV	AG-1549 或 S-1153	Pfizer
			DPC-083	Bristol-Myers Squibb
			TMC-125	Tibotec-Virco Group
			TMC-278	Tibotec-Virco Group
			IDX12899	Idenix
			IDX12989	Idenix

[0474] HIV 疗法 :其它类别的药物

[0475]

商标名称	一般名称	缩写	实验代码	制药公司
Viread™	替诺福韦地索普西富马酸盐 (DF)	TDF 或双 (POC) PMPA		Gilead Sciences

[0476] 细胞抑制剂

[0477]

商标名称	一般名称	缩写	实验代码	制药公司
Droxia®	羟基脲	HU		Bristol-Myers Squibb

[0478] 进入抑制剂 (包括融合抑制剂)

[0479]

商标名称	一般名称	缩写	实验代码	制药公司
Fuzeon™	恩夫韦地		T-20	Trimeris
			T-1249	Trimeris
			AMD-3100	AnorMED, Inc.
	CD4-IgG2		PRO-542	Progenics Pharmaceuticals
			BMS-488043	Bristol-Myers Squibb
	阿拉韦罗		GSK-873,140	GlaxoSmithKline
	肽 T			Advanced Immuni T, Inc.
			TNX-355	Tanox, Inc.
	马拉维若		UK-427,857	Pfizer
CXCR4 抑制剂				
	AMD070		AMD11070	AnorMED, Inc.
CCR5 拮抗剂				

[0480]

商标名称	一般名称	缩写	实验代码	制药公司
vicriroc		SCH-D	SCH-417690	Schering-Plough

[0481] HIV 疗法 : 基于免疫的疗法

[0482]

商标名称	一般名称	缩写	实验代码	制药公司
Proleukin®	阿地白介素或 白介素-2	IL-2		Chiron Corporation
Remune®	HIV-1 免疫原或沙克疫苗		AG1661	The Immune Response Corporation :
			HE2000	HollisEden Pharmaceuticals

[0483] 在当前临床发展中的抗丙型肝炎化合物的表

[0484]

药物名称	药物类别	制药公司
派罗欣 聚乙二醇化干扰素 α -2a	长效干扰素	Roche
干复津 干扰素 α -1	干扰素, 长效干扰素	InterMune
OMNIFERON 天然干扰素	干扰素, 长效干扰素	Viragen
ALBUFERON	更长效干扰素	Human Genome Sciences
REBIF 干扰素 β -1a	干扰素	Ares-Serono
ω 干扰素	干扰素	BioMedicine
口服干扰素 α	口服干扰素	Amarillo Biosciences
干扰素 γ-1b	抗纤维变性	InterMune
IP-501	抗纤维变性	Intemuron
Merimebodib VX-497	IMPDH 抑制剂(肌苷单磷酸酯脱氢酶)	Vertex
金刚烷胺 (Symmetrel)	光谱抗病毒剂	Endo Labs Solvay
IDN-6556	凋亡调控	Idun Pharma.
XTL-002	单克隆抗体	XTL
HCV/MF59	疫苗	Chiron
CIVACIR	多克隆抗体	NABI
	治疗性疫苗	Inno genetics
VIRAMIDINE	核苷类似物	ICN
ZADAXIN (胸腺素 α -1)	免疫调节剂	Sci Clone
CEPLENE 组胺二盐酸盐	免疫调节剂	Maxim
VX 950/LY 570310	蛋白酶抑制剂	Vertex/Eli Lilly
ISIS 14803	反义	Isis Pharmaceutical/ Elan
IDN-6556	半胱氨酸蛋白酶抑制剂	Idun Pharmaceuticals, Inc. http://www.idun.com
JTK 003	聚合酶抑制剂	AKROS Pharma
Tarvacin	抗磷脂疗法	Peregrine

[0485]

HCV-796	聚合酶抑制剂	ViroPharma/ AVye
CH-6	丝氨酸蛋白酶	Schering
ANA971	艾沙托立宾	ANADYS
ANA245	艾沙托立宾	ANADYS
CPG 10101 (Actilon):	免疫调节剂	Coley
利妥昔单抗(Rituxam)	抗 CD20 单克隆抗体	Genetech/IDEC
NM283 (瓦洛他滨)	聚合酶抑制剂	Idenix Pharmaceuticals
HepX™-C	单克隆抗体	<u>XTL</u>
IC41	治疗性疫苗	Intercell
水母干扰素	更长效干扰素	Flamel Technologies
E-1	治疗性疫苗	Innogenetics
Multiferon	长效干扰素	Viragen
BILN 2061	丝氨酸蛋白酶	Boehringer - Ingelheim
干扰素 β-1a (REBIF)	干扰素	Ares-Serono

[0486] VII. 用于治疗增殖病状的组合疗法

[0487] 在另一实施方案中,化合物当用作抗增殖剂时可与增强疗法有效性的另一种化合物组合施用,包括但不限于抗叶酸剂、5- 氟嘧啶 (包括 5- 氟尿嘧啶)、胞苷类似物如 β -L-1, 3- 二氧戊环基胞苷或 β -L-1, 3- 二氧戊环基 5- 氟胞苷、抗代谢物 (包括嘌呤抗代谢物、阿糖胞苷、氟达拉滨、5- 氟脱氧尿苷、6- 巯基嘌呤、氨甲蝶呤及 6- 巯鸟嘌呤)、羟基脲、有丝分裂抑制剂 (包括 CPT-11、依托泊苷 (VP-21)、紫杉酚及长春花生物碱如长春新碱和长春花碱)、烷化剂 (包括但不限于白消安、苯丁酸氮芥、环磷酰胺、异环磷酰胺、氮芥、美法仑及硫替派)、非典型烷化剂、含铂的化合物、博来霉素、抗肿瘤抗生素、蒽环霉素如阿霉素和道诺霉素、蒽二酮、拓扑异构酶 II 抑制剂、激素试剂 (包括但不限于皮质甾类 (地塞米松、强的松和甲基强的松)、雄激素如氟羟甲睾酮和甲基睾酮、雌激素如二乙基己烯雌酚、抗雌激素药如他莫昔芬、LHRH 类似物如亮丙瑞林、抗雄激素药如氟他胺、氨鲁米特、甲地孕酮和甲羟孕酮)、天冬酰胺酶、卡莫司汀、洛莫司汀、六甲基三聚氰胺、达卡巴嗪、米托坦、链脲霉素、顺铂、卡铂、左旋咪唑以及甲酰四氢叶酸。本发明化合物还可与酶治疗剂和免疫系统调节剂如干扰素、白介素、肿瘤坏死因子、巨噬细胞集落刺激因子及集落刺激因子组合使用。在一个实施方案中,本文所述的化合物可与选自以下的至少一种其它抗病毒剂一起使用:逆转录酶抑制剂、蛋白酶抑制剂、融合抑制剂、进入抑制剂及聚合酶抑制剂。

[0488] 另外,根据本发明的化合物可与一种或多种抗逆转录病毒、抗 HBV、干扰素、抗癌或抗菌剂,包括但不限于本发明的其它化合物组合或交替施用。本文所述的某些化合物可通过减少其它化合物的代谢、分解代谢或失活有效提高根据本发明的某些试剂的生物活性,且因此为了此预期效果而共同施用。

[0489] VIII. 用于治疗诺瓦克病毒感染的组合疗法

[0490] 除本文所述的抗病毒化合物之外,还可以存在其它化合物。例如,已知 I 型干扰素

(IFN) 抑制诺瓦克病毒复制。某些维生素（特别是维生素 C）被认为在治疗某些病毒感染中是有效的。一项研究显示维生素 A 补充给药减少诺瓦克病毒 GII 感染的发病，增加诺瓦克病毒 GI 和 GII 脱落的长度并且减少 NoV 相关腹泻的发病 (1: J Infect Dis. 2007 年 10 月 1 日 ;196(7):978-85. Epub 2007 年 8 月 22 日)。已知赖氨酸是抗病毒剂。还已知，来源于基因组 II (GII) 诺瓦克病毒的病毒样颗粒 (VLP) 结合至细胞表面硫酸乙酰肝素蛋白聚糖及其它带负电的糖胺聚糖。为了治疗感染症状，还可以施用止吐剂、抗腹泻剂和 / 或止痛剂。

[0491] VIII. 药物组合物

[0492] 感染了人类免疫缺陷病毒、乙型肝炎病毒、黄病毒科病毒或杯状病毒科病毒或其基因片段或癌症的宿主（包括但不限于人）可通过在药学上可接受的载体或稀释剂存在下向所述患者施用有效量的活性化合物或其药学上可接受的前药或盐来治疗。活性物质可通过任何适当途径，例如口服、胃肠外、静脉内、真皮内、皮下或局部，以液体或固体形式来施用。

[0493] 化合物的优选剂量将在以下范围内：在约 0.1 与约 100mg/kg 之间、更一般在约 1 与 50mg/kg 之间、且优选地在约 1 与约 20mg/kg 接受者体重 / 天之间。药学上可接受的盐和前药的有效剂量范围可基于有待递送的母体核苷的重量来计算。如果盐或前药本身展现活性，那么有效剂量可如上使用盐或前药的重量或通过本领域技术人员已知的其它方式来估算。

[0494] 化合物方便地以任何适合的单位剂型施用，包括但不限于含有 7 至 3000mg、优选地 70 至 1400mg 活性成分 / 单位剂型的剂型。50-1000mg 的口服剂量通常是适宜的。

[0495] 理想地，应施用活性成分以实现从约 0.2 至 70 μ M、优选地约 1.0 至 15 μ M 的活性化合物的峰值血浆浓度。这可例如通过静脉内注射 0.1 至 5% 活性成分任选地在盐水中的溶液或施用活性成分的大丸剂来实现。

[0496] 活性化合物在药物组合物中的浓度将取决于药物的吸收、失活及排泄率以及本领域技术人员已知的其它因素。应注意剂量值还将随有待缓解的病状的严重性而变化。还应理解，对于任何具体的受试者而言，具体的剂量方案应根据个体需要和施用或监督组合物施用的人员的职业判断随时间进行调整，而且本文所列举的浓度范围只是示例性的，而不是为限制所要求保护的组合物的范围或实践。活性成分可以一次施用，或者可将其分成许多较小的剂量，而以不同的时间间隔施用。

[0497] 施用活性化合物的一个优选模式是口服。口服组合物通常将包含惰性稀释剂或可食用的载体。可以将它们包封在明胶胶囊中，或者压制成片剂。为用于口服治疗性施用目的，可以将活性化合物加入赋形剂中并以片剂、锭剂或胶囊形式使用。药学上相容的粘合剂和 / 或佐剂物质可以作为所述组合物的一部分包括在内。

[0498] 片剂、丸剂、胶囊、锭剂等可含有以下成分或相似性质的化合物：粘合剂如微晶纤维素、黄蓍胶或明胶；赋形剂如淀粉或乳糖；崩解剂如藻酸、Primogel 或玉米淀粉；润滑剂如硬脂酸镁或 Sterotes；助流剂如胶态二氧化硅；甜味剂如蔗糖或糖精；或者调味剂如薄荷、水杨酸甲酯或橙味调味剂。当所述单位剂型为胶囊时，除上述类型的物质外，还可含有液体载体如脂肪油。另外，单位剂型还可含有各种改变剂量单位的物理形式的其它物质，例如糖包衣物、虫胶或其它肠包衣剂。

[0499] 所述化合物可以作为酞剂、混悬液、糖浆剂、干胶片 (wafer)、咀嚼胶等的组分施

用。除活性化合物外,糖浆剂还可以含有作为甜味剂的蔗糖和某些防腐剂、染料和着色剂以及调味剂。

[0500] 还可将化合物、其药学上可接受的前药或盐与不损害所需作用的其它活性物质混合,或与补充所需作用的物质如抗生素、抗真菌剂、抗炎药或其它抗病毒药,包括但不限于其它核苷化合物混合。用于肠胃外、真皮内、皮下或局部施用的溶液或混悬液可包含下列组分:无菌稀释剂如注射用水、盐水溶液、不挥发油、聚乙二醇、甘油、丙二醇或其它合成溶剂;抗细菌剂如苄醇或对羟基苯甲酸甲酯;抗氧化剂如抗坏血酸或亚硫酸氢钠;螯合剂如乙二胺四乙酸;缓冲剂如乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐,以及渗透压调节剂如氯化钠或葡萄糖。肠胃外制剂可以被包封在由玻璃或塑料制成的安瓿、一次性注射器或多剂量小瓶内。

[0501] 如果静脉内施用,那么优选载体是生理盐水或磷酸盐缓冲盐水(PBS)。

[0502] 在一个优选实施方案中,所述活性化合物与保护所述化合物免受体内快速清除的载体共同制备,如控释制剂,包括但不限于植入物和微囊化递送系统。可使用生物可降解性、生物相容性聚合物,如乙烯乙酸乙烯酯、聚酐、聚乙醇酸、胶原、聚原酸酯及聚乳酸。例如,肠溶包衣的化合物可用来保护胃酸引起的裂解。用于制备这种制剂的方法对本领域技术人员是显而易见的。适合的材料也可以商购获得。

[0503] 脂质体悬浮液(包括但不限于靶向具有针对病毒抗原的单克隆抗体的受感染细胞的脂质体)也优选作为药学上可接受的载体。这些可根据本领域技术人员已知的方法,例如如美国专利号 4,522,811(以引用的方式并入)中所述来制备。例如,可以如下制备脂质体制剂:溶解合适的一种或多种脂质(如硬脂酰磷脂酰乙醇胺、硬脂酰磷脂酰胆碱、花生酰磷脂酰胆碱和胆固醇)于无机溶剂中,然后蒸发,在容器表面留下干脂质的薄膜。然后将活性化合物或其单磷酸酯、二磷酸酯和/或三磷酸酯衍生物的水溶液引入容器中。随后用手转动容器使脂类物质从容器壁上脱落并分散到脂类聚集物中,从而形成脂质体混悬液。

[0504] 描述本发明中所用的术语是常用的且为本领域技术人员所知。如本文所用,以下缩写具有指定含义:

- | | | |
|--------|---------|--|
| [0505] | aq | 含水 |
| [0506] | CDI | 羰基二咪唑 |
| [0507] | DMF | N, N- 二甲基甲酰胺 |
| [0508] | DMSO | 二甲亚砜 |
| [0509] | EDC | 1- 乙基 -3-(3- 二甲基氨基丙基) 碳二亚胺盐酸盐 |
| [0510] | EtOAc | 乙酸乙酯 |
| [0511] | H | 小时 |
| [0512] | HOBt | N- 羟基苯并三唑 |
| [0513] | M | 摩尔 |
| [0514] | min | 分钟 |
| [0515] | rt 或 RT | 室温 |
| [0516] | TBAT | 三苯基二氟硅酸四丁基铵 |
| [0517] | TBTU | O-(苯并三唑 -1- 基)-N, N', N' - 四甲基脲四氟硼酸盐 |
| [0518] | THF | 四氢呋喃 |
| [0519] | IX. | 用于制备活性化合物的一般流程 |

[0520] 还提供用于简易制备 N^4 -羟基胞苷核苷衍生物、修饰的单磷酸酯和磷酸酯前药类似物的方法。本文所公开的 N^4 -羟基胞苷核苷衍生物、修饰的单磷酸酯和磷酸酯前药类似物可如下所详细描述或通过本领域技术人员已知的其它方法来制备。本领域普通技术人员应当理解到这些流程决非是限制性的而且在不脱离本发明的精神和范围的情况下可对这些流程进行各种具体改变。

[0521] 通常,式 III、IV、VI、XI-XIV、XIX-XXVI 的核苷酸通过以下操作来制备:首先制备相应的核苷,然后为 5'-羟基加帽作为本文所述的单磷酸酯或其它类似物,其可容易地在体内转化为化合物的活性三磷酸酯形式。

[0522] 各种反应流程概述如下。

[0523] 流程 1 是合成本发明活性化合物的一个非限制性实例,且特别是单磷酸酯前药 XX、XXI、XXII 的合成方法。

[0524] 流程 2 是合成本发明活性化合物的一个非限制性实例,且特别是单磷酸酯前药 XX、XXI、XXII 的替代合成方法。

[0525] 流程 3 是合成本发明活性化合物的一个非限制性实例,且特别是单磷酸酯前药 XXIII 的合成方法。

[0526] 流程 4 是合成本发明活性化合物的一个非限制性实例,且特别是单磷酸酯前药 XXIV 的合成方法。

[0527] 流程 5 是合成本发明活性化合物的一个非限制性实例,且特别是单磷酸酯前药 XXV 的合成方法。

[0528] 流程 6 是合成本发明活性化合物的一个非限制性实例,且特别是单磷酸酯前药 XXV 的替代合成方法。

[0529] 流程 7 是合成本发明活性化合物的一个非限制性实例,且特别是单磷酸酯前药 XXVI 的合成方法。

[0530] 流程 8 是合成本发明活性化合物的一个非限制性实例,且特别是单磷酸酯前药 XXVI 的替代合成方法。

[0531] 流程 9 是合成本发明活性化合物的一个非限制性实例,且特别是核苷 27 的合成方法。

[0532] 流程 10 是合成本发明活性化合物的一个非限制性实例,且特别是核苷 27 的替代合成方法。

[0533] 流程 11 是合成本发明活性化合物的一个非限制性实例,且特别是核苷 29 和 30 的合成方法。

[0534] 流程 12 是合成本发明活性化合物的一个非限制性实例,且特别是核苷 30 的替代合成方法。

[0535] 流程 13 是合成本发明活性化合物的一个非限制性实例,且特别是单磷酸酯前药 35 的合成方法。

[0536] 流程 14 是合成本发明活性化合物的一个非限制性实例,且特别是 N^4 -羟基胞苷 2'-C-Me 核苷 37 的合成方法。

[0537] 流程 15 是合成本发明活性化合物的一个非限制性实例,且特别是 N^4 -羟基胞苷 2'-脱氧-2'- α -氟-2'- β -C-Me 核苷 39 的合成方法。

[0538] 流程 16 是合成本发明活性化合物的一个非限制性实例,且特别是 N⁴-(辛酰氧基)胞苷 2'-脱氧-2'-α-氟-2'-β-C-Me 核苷 40 的合成方法。

[0539] 流程 17 是合成本发明活性化合物的一个非限制性实例,且特别是 N⁴-羟基胞苷 2'-C-Me 核苷前药 44 的合成方法。

[0540] 流程 18 是合成本发明活性化合物的一个非限制性实例,且特别是 N⁴-羟基胞苷 2'-C-Me 核苷前药 48 的合成方法。

[0541] 流程 19 是合成本发明活性化合物的一个非限制性实例,且特别是 N⁴-羟基胞苷 2'-脱氧-2'-α-氟-2'-β-C-Me 核苷前药 51 的合成方法。

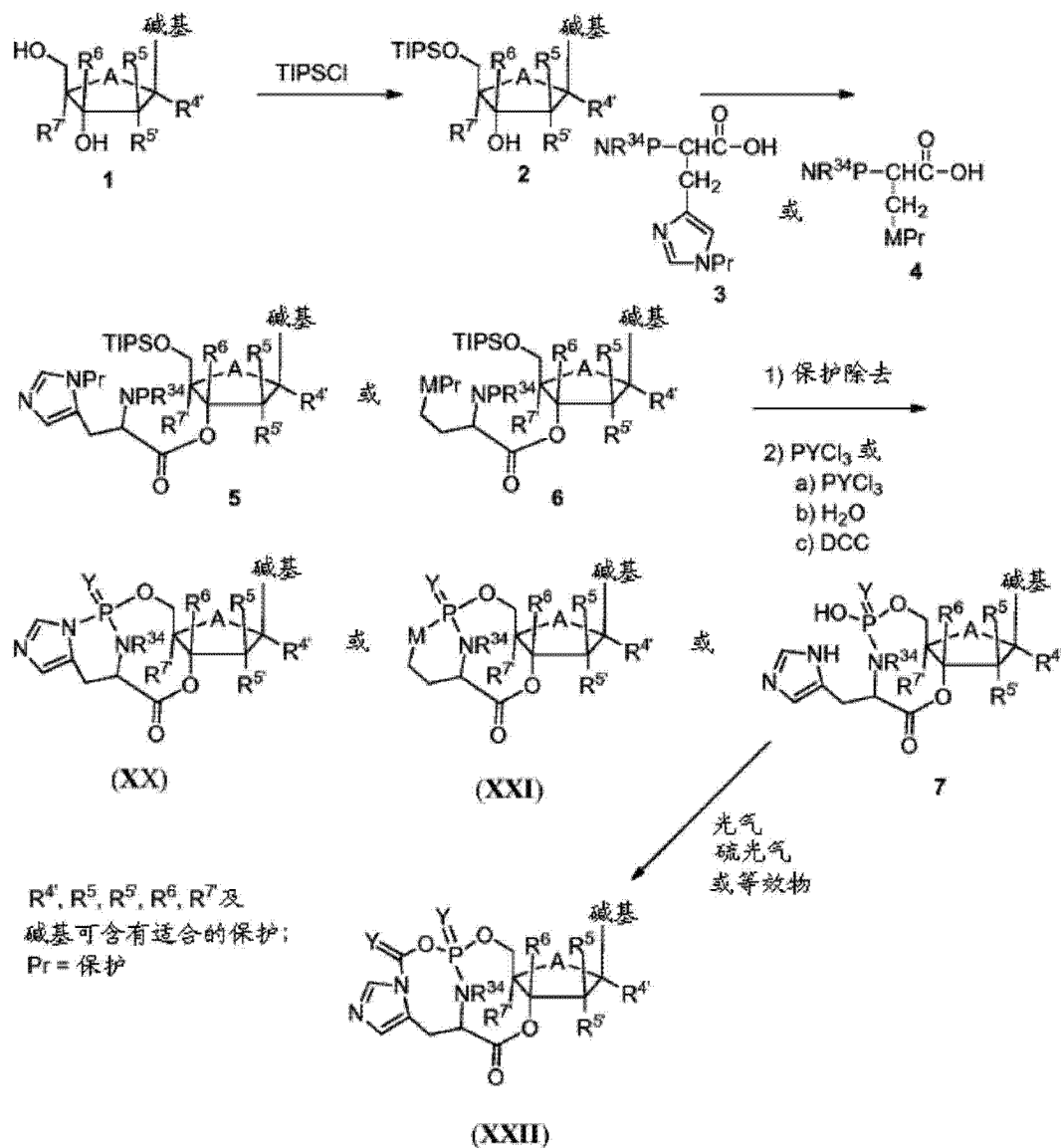
[0542] 流程 20 是合成本发明活性化合物的一个非限制性实例,且特别是本发明活性化合物的合成方法,且特别是 N⁴-羟基胞苷 2'-C-Me 核苷前药 54 和 56 的合成方法。

[0543] 流程 21 是合成本发明活性化合物的一个非限制性实例,且特别是单磷酸酯前药 35 的合成方法。

[0544] 流程 22 是合成本发明活性化合物的一个非限制性实例,且特别是单磷酸酯前药 35 的合成方法。

[0545] 在一个实施方案中,式 XX、XXI 或 XXII 的核苷通过由如 TIPS 的基团保护化合物 1 以提供在糖的 3'-位处具有游离的 α-羟基的 2 来制备(流程 1)。化合物 1 的制备是由本领域的普通技术人员通过在以下文献中所概述的方法以及通过一般流程 9-10 来完成:(a)Rajagopalan, P.;Boudinot, F. D;Chu, C. K.;Tennant, B. C;Baldwin, B. H.;Antiviral Nucleosides:Chiral Synthesis and Chemotheraphy:Chu, C. K.;编著 Elsevier:2003; b)Recent Advances in Nucleosides:Chemistry and Chemotherapy:Chu, C. K.;编著 Elsevier:2002;c)Frontiers in Nucleosides&Nucleic Acids, 2004, 编著 R. F. Schinazi&D. C. Liotta, IHL Press, Tucker, GA, USA, 第 319-37 页;d)Handbook of Nucleoside Synthesis:Vorbruggen H. &Ruh-Pohlenz C. John Wiley&sons 2001)。2 与酸 3 或 4 的偶合可由试剂如 EDC、EDC/HOBt、TBTU 或 CDI 来完成以得到酯 5 或 6。除去保护基之后,所得的氨基醇可通过暴露于磷酸氯或三氯硫磷 (POCl₃或 PSCl₃) 而转化为单磷酸酯前药 XX 或 XXI,或替代地,在磷酸氯或三氯硫磷反应的水处理之后,可在 XX 或 XXI 的形成中利用偶合剂如 DCC。化合物 7 可在磷酸氯或三氯硫磷反应的水处理之后获得且随后暴露于光气或光气等效物如 CDI 或三光气,从而得到单磷酸酯前药 XXII。

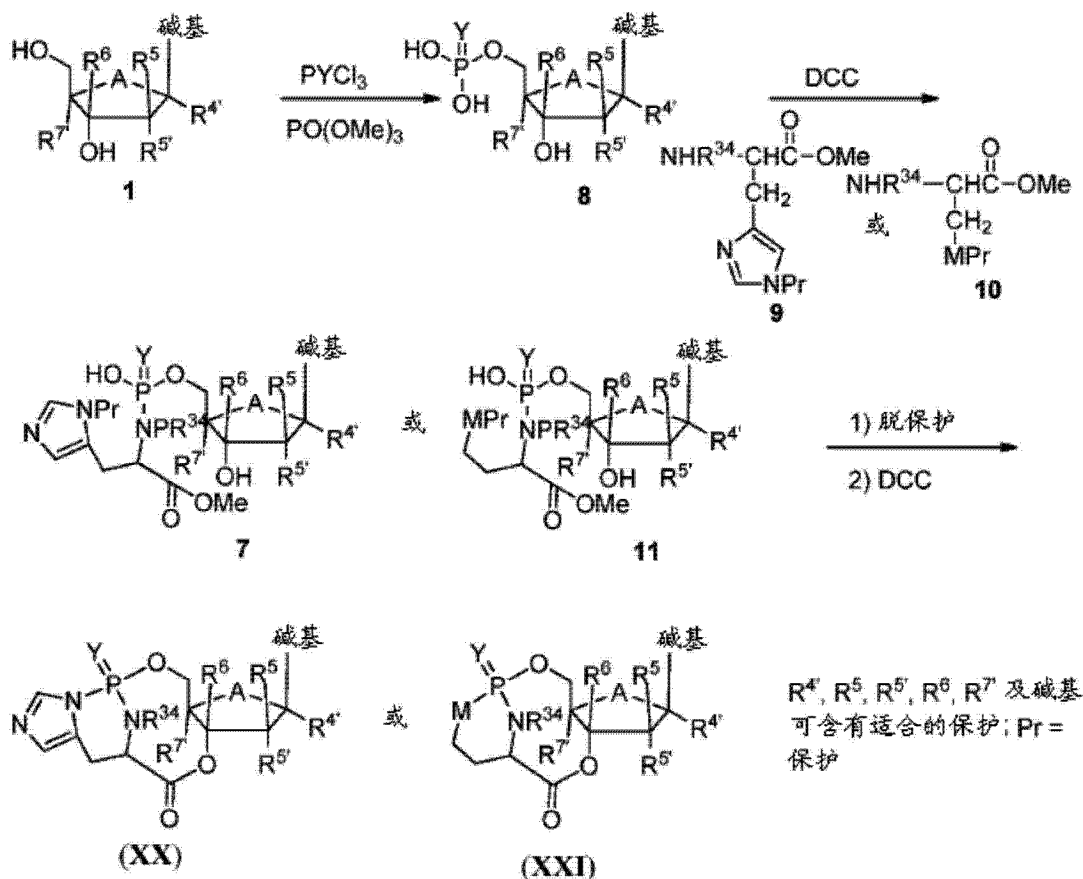
[0546]



[0547] 流程 1 单磷酸酯前药 XX、XXI、XXII 的合成方法。(碱基是天然或非天然核苷碱基; $\text{R}^{4'}$ 、 R^5 、 $\text{R}^{5'}$ 、 R^6 、Y、M、 R^{34} 及 $\text{R}^{7'}$ 如在活性化合物部分中所定义)

[0548] 或者,单磷酸酯前药 XX、XXI、XXII 可如流程 2 中所概述来合成,即核苷 1 可通过在磷酸三甲酯中的磷酰氯或三氯硫磷(phosphorothioyl trichloride)的作用直接转化为单磷酸酯 8。偶合至氨基酯 9 或 10 可用标准偶合剂如 DCC 完成以得到氨基磷酸酯 7 和 11。脱保护且随后 7 或 11 与试剂如 EDC、EDC/HOBt、TBTU 或 CDI 的偶合提供单磷酸酯前药 XX 和 XXI。单磷酸酯前药 XXII 可如流程 1 中所述从 7 处获得。

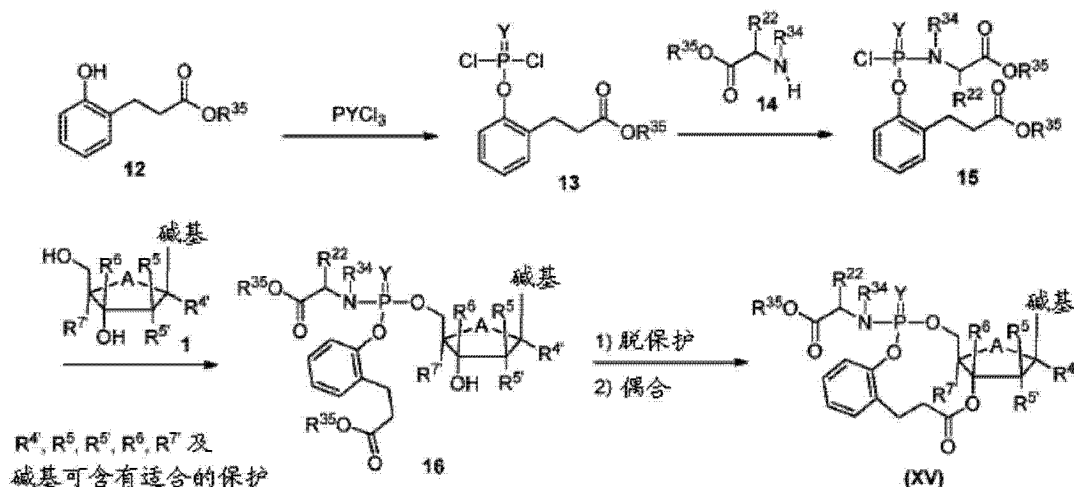
[0549]



[0550] 流程 2 单磷酸酯前药 XX、XXI、XXII 的替代合成方法。(碱基是天然或非天然核苷碱基; $R^{4'}$ 、 $R^{5'}$ 、 $R^{5''}$ 、 R^6 、 Y 、 M 、 R^{34} 及 $R^{7'}$ 如在活性化合物部分中所定义)

[0551] 单磷酸酯前药 XXIII 可如流程 3 所概述从苯酚 12 开始制备(流程 3)。12 暴露于磷酰氯或三氯硫磷提供 13, 随后允许 13 与氨基酯 14 反应以得到氨基磷酸酯 15。核苷 1 可接着通过 5'-羟基与丙酸氯磷酰基氨基酯 15 的反应转化为单磷酸酯类似物 16。脱保护且随后 16 与试剂如 EDC、EDC/HOBt、TBTU 或 CDI 的偶合提供单磷酸酯前药 XXIII。

[0552]

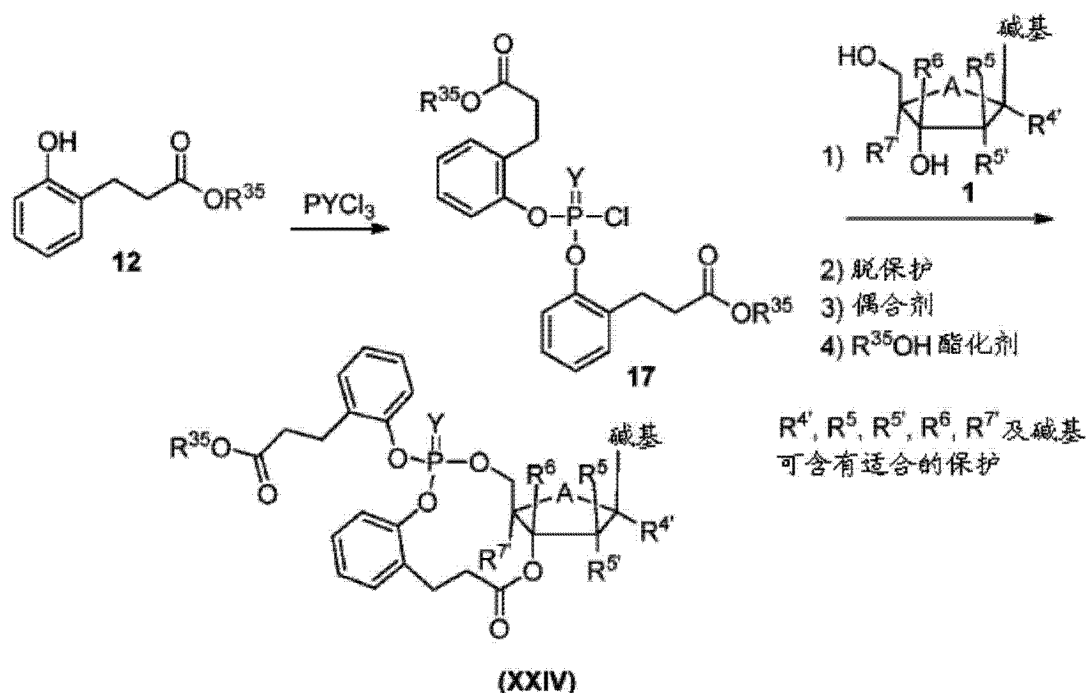


[0553] 流程 3 单磷酸酯前药 XXIII 的合成方法。(碱基是天然或非天然核苷碱基; $R^{4'}$ 、 $R^{5'}$ 、 $R^{5''}$ 、 R^6 、 Y 、 R^{34} 、 R^{35} 、 R^{22} 及 $R^{7'}$ 如在活性化合物部分中所定义)

[0554] 单磷酸酯前药 XXIV 可通过苯酚 12 与磷酰氯或三氯硫磷的反应以提供氯磷酸二苯

酯 17 来制备 (流程 4)。核苷 1 可接着通过 5'-羟基与氯磷酸二苯酯 17 的反应转化为中间单磷酸酯类似物。脱保护且随后 3'-羟基与试剂如 EDC、EDC/HOBt、TBTU 或 CDI 的酯形成, 接着与 $R^{35}OH$ 的再酯化提供单磷酸酯前药 XXIV。

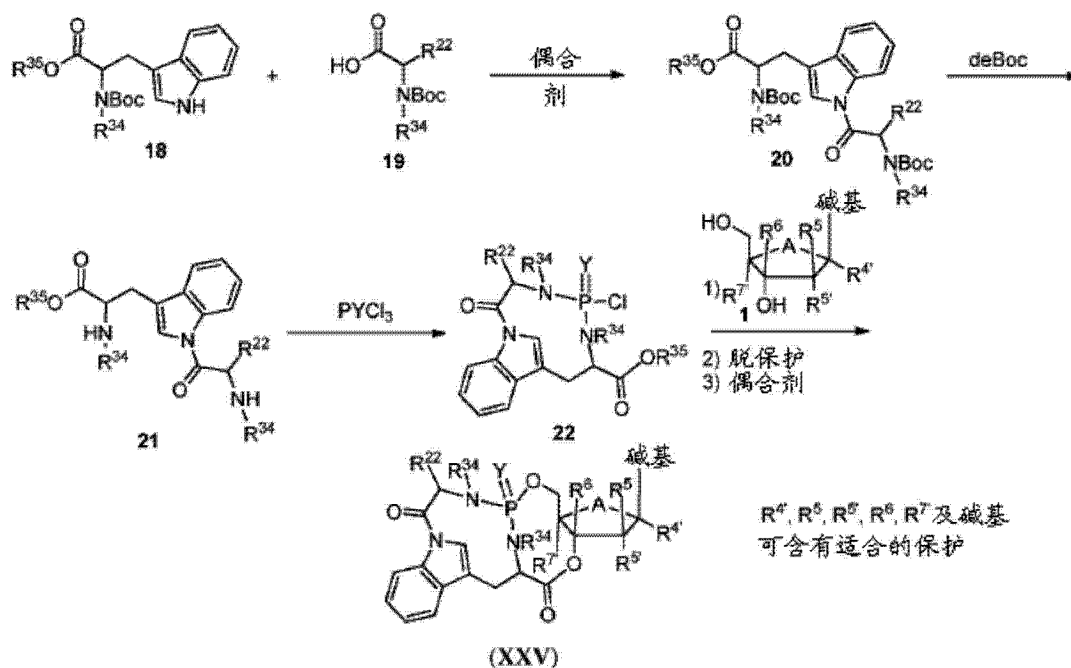
[0555]



[0556] 流程 4 单磷酸酯前药 XXIV 的合成方法。(碱基是天然或非天然核苷碱基; $R^{4'}$ 、 R^5 、 $R^{5'}$ 、 R^6 、Y、 R^{35} 及 R^7 如在活性化合物部分中所定义)

[0557] 单磷酸酯前药 XXV 可通过受保护的色氨酸 18 和受保护的氨基酸 19 与偶合剂如 EDC、EDC/HOBt、TBTU 或 CDI 的初始反应以得到二肽 20 来制备 (流程 5)。胺保护的除去然后得到二胺 21, 其可接着与磷酰氯或三氯硫磷反应以得到环状磷酰氯二胺 22。核苷 1 可接着通过 5'-羟基与环状磷酰氯二胺 22 的反应转化为单磷酸酯类似物。脱保护且随后 22 与试剂如 EDC、EDC/HOBt、TBTU 或 CDI 的偶合提供单磷酸酯前药 XXV。

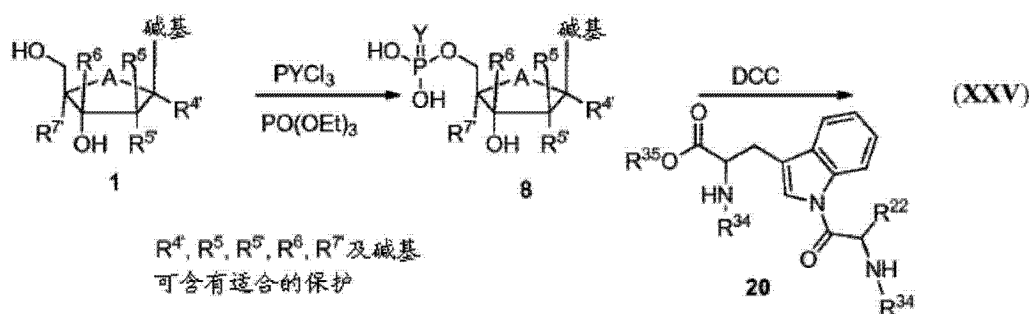
[0558]



[0559] 流程 5 单磷酸酯前药 XXV 的合成方法。(碱基是天然或非天然核苷碱基; $R^{4'}$ 、 R^5 、 $R^{5'}$ 、 R^6 、Y、 R^{34} 、 R^{35} 、 R^{22} 及 $R^{7'}$ 如在活性化合物部分中所定义)

[0560] 或者,单磷酸酯前药 XXV 可通过单磷酸酯类似物 8 与二肽 20 的偶合来制备(流程 6)。

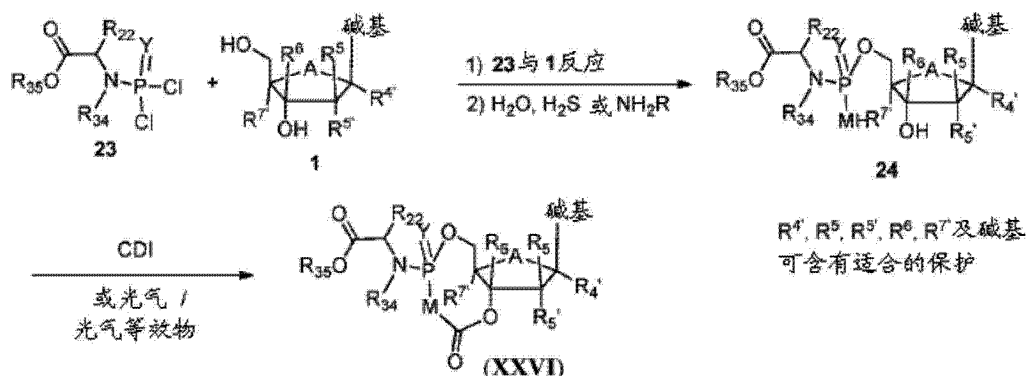
[0561]



[0562] 流程 6 单磷酸酯前药 XXV 的替代合成方法。(碱基是天然或非天然核苷碱基; $R^{4'}$ 、 R^5 、 $R^{5'}$ 、 R^6 、Y、 R^{34} 、 R^{35} 、 R^{22} 及 $R^{7'}$ 如在活性化合物部分中所定义)

[0563] 单磷酸酯前药 XXVI 可通过磷酰二氯 23 与核苷 1 的初始反应来制备(流程 7)。所产生的中间体与水、硫化氢或胺的随后反应提供单磷酸酯类似物 24(流程 7)。双亲核试剂 24 暴露于光气或光气等效物如 CDI 提供单磷酸酯前药 XXVI。

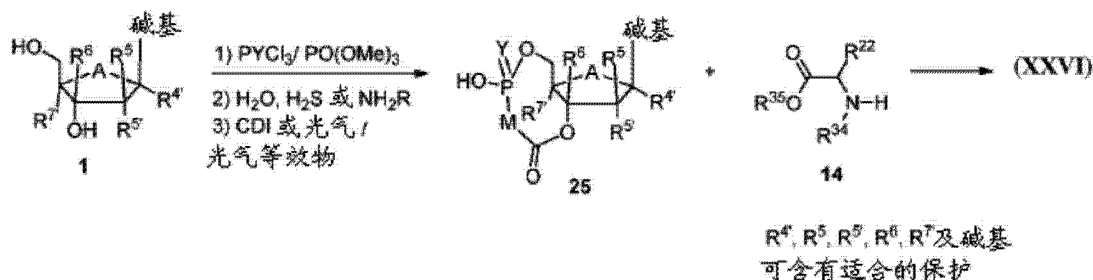
[0564]



[0565] 流程 7 单磷酸酯前药 XXVI 的合成方法。(碱基是天然或非天然核苷碱基; $R^{4'}$ 、 $R^{5'}$ 、 $R^{5''}$ 、 R^6 、 Y 、 M 、 R^{34} 、 R^{35} 、 R^{22} 及 $R^{7'}$ 如在活性化合物部分中所定义)

[0566] 或者,单磷酸酯前药 XXVI (其中 M 不是 NR) 可通过如流程 8 所示核苷 1 与磷酰氯或三氯硫磷的初始反应来制备。所产生的中间体与水或硫化氢的随后反应,接着与光气或光气等效物如 CDI 的反应提供单磷酸酯前药 XXVI。(流程 8)。

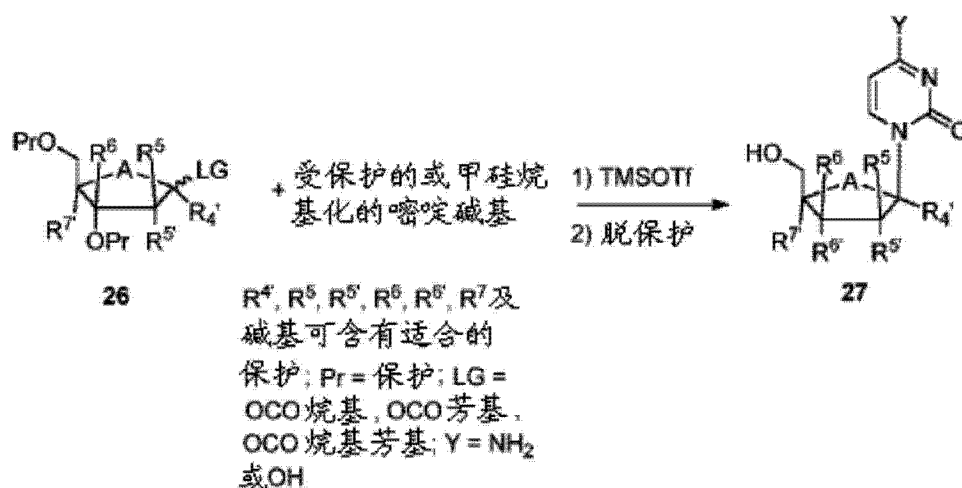
[0567]



[0568] 流程 8 单磷酸酯前药 XVIII 的替代合成方法。(碱基是天然或非天然核苷碱基; $R^{4'}$ 、 $R^{5'}$ 、 $R^{5''}$ 、 R^6 、 Y 、 R^{34} 、 R^{35} 、 R^{22} 及 $R^{7'}$ 如在活性化合物部分中所定义)

[0569] 核苷 27 可通过在路易斯酸如 TMSOTf 存在下将糖 26 与受保护的或甲硅烷基化的嘧啶碱基偶合来制备。5'-羟基脱保护得到核苷 27。(流程 9)。

[0570]

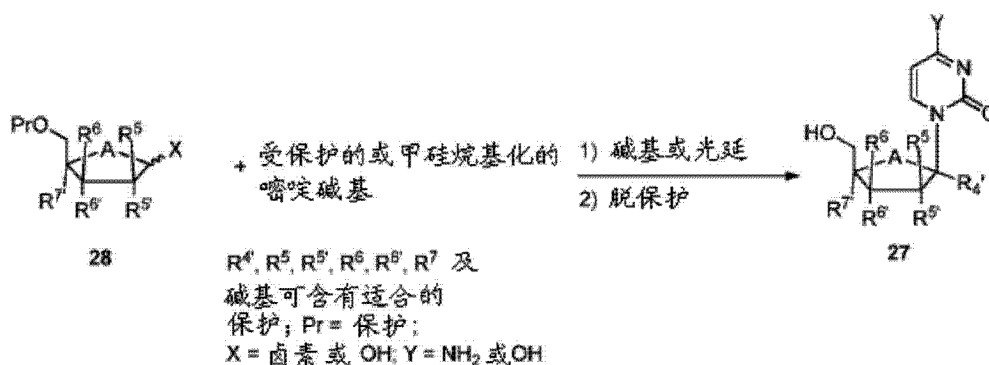


[0571] 流程 9 核苷 27 的合成方法。($R^{4'}$ 、 $R^{5'}$ 、 $R^{5''}$ 、 R^6 、 Y 、 A 及 $R^{7'}$ 如在活性化合物部分中所定义)

[0572] 或者,核苷 27 可从 1'-卤基或 1'-羟基化合物 28 来制备。对于 1'-卤基的情况,

在碱如三乙胺或氢氧化钠存在下保护的或游离的嘧啶碱基,接着脱保护将得到核苷 27。对于 1'-羟基的情况,在光延偶合剂如偶氮二甲酸二异丙酯存在下保护的或游离的嘧啶碱基,接着脱保护将得到核苷 27(流程 10)。

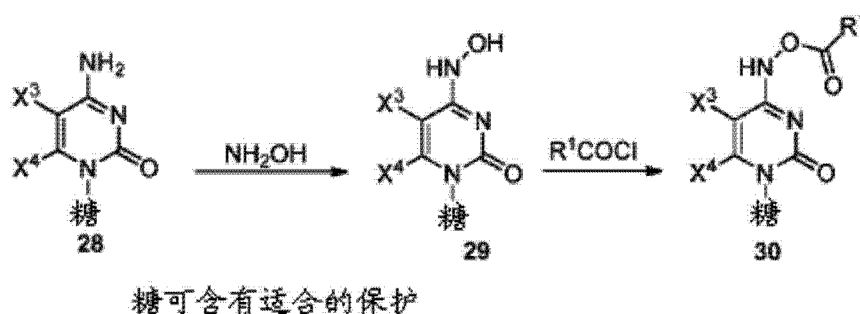
[0573]



[0574] 流程 10 核苷 27 的替代合成方法。(R^{4'}、R⁵、R^{5'}、R⁶、Y、R^{6'} 及 R⁷ 如在活性化合物部分中所定义)

[0575] N⁴-羟基胞苷核苷 29 可通过化合物 28 与羟胺的反应来制备(流程 11)。与各种酰氯的随后反应提供相应的 N⁴-酰氧基衍生物 30。

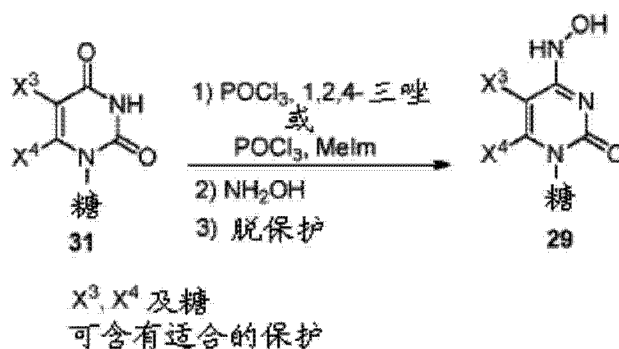
[0576]



[0577] 流程 11 核苷 29 和 30 的合成方法。(X³、X⁴、R¹及糖如在活性化合物部分中所定义)

[0578] 或者,核苷 29 可如流程 12 所示通过核苷 31 与磷酸氯和 1,2,4-三唑或甲基咪唑的初始反应来制备。所产生的中间体与羟胺的随后反应,接着糖部分的脱保护得到核苷 29。

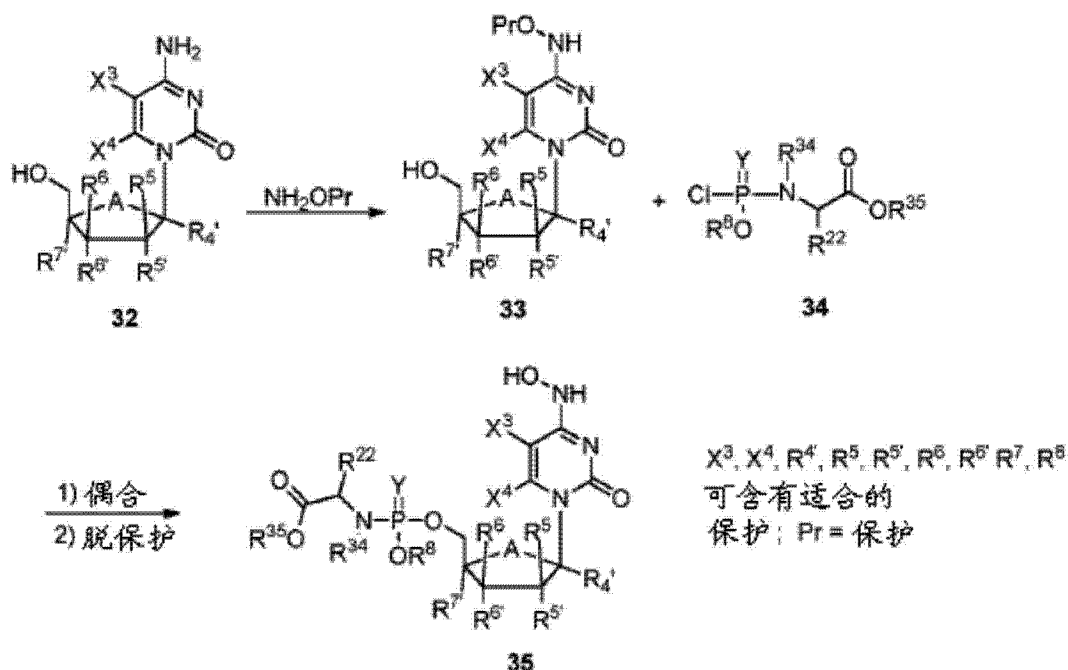
[0579]



[0580] 流程 12 核苷 29 的替代合成方法。(X³、X⁴、R¹及糖如在活性化合物部分中所定义)

[0581] 单磷酸酯前药 35 可通过适当保护的羟胺衍生物与核苷 32 的初始反应来制备(流程 13)。33 与氨基磷酸酯氯化物 34 的随后反应,接着必需的脱保护提供单磷酸酯前药 35。

[0582]



[0583] 流程 13 单磷酸酯前药 35 的方法。(X³、X⁴、Y、R^{4'}、R⁵、R^{5'}、R⁶、Y、R³⁴、R³⁵、R²²及 R⁷ 如在活性化合物部分中所定义)

[0584] 在一些情况下,磷原子可以是手性的,在本文中被称为“P*”或“P”,这意味着并且是指其具有对应于对于这种指配的 Cahn-Ingold-Prelog 规则的所接受的含义的“R”或“S”名称。式 A 的前药可由于在磷中心处的手性而作为非对映异构体的混合物存在。当在磷中心处存在手性时,其可能全部或部分为 R_p 或 S_p 或其任何混合物。

[0585] 本发明进一步在以下实施例中说明。流程 14-19 和实施例 1-6 显示用于合成 N⁴-羟基胞苷核苷衍生物和修饰的单磷酸酯前药类似物的制备方法,并且实施例 7-35 显示用于 N⁴-羟基胞苷核苷衍生物和修饰的单磷酸酯前药类似物的生物学评价的方法。本领域普通技术人员应当理解这些实施例决非是限制性的而且在不脱离本发明的精神和范围的情况下可以对这些实施例进行各种具体改变。

具体实施例

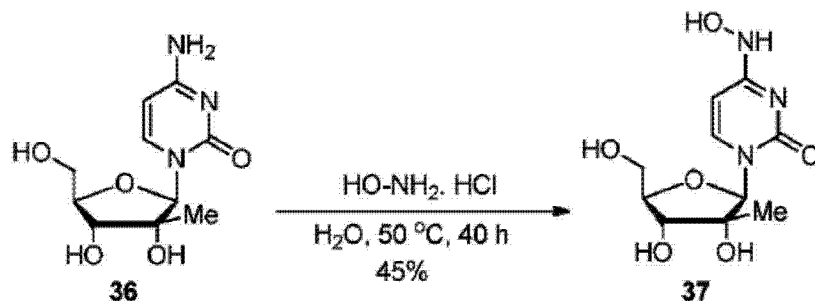
[0586] 按照以下实施例和反应顺序制备本发明代表性的具体化合物;作为说明,提供实施例和描述反应顺序的示意图,以帮助理解本发明,但不能将其解释为以任何方式限制随后的权利要求书中叙述的本发明。本发明化合物也可用作随后的实施例中的中间体以产生本发明另外的化合物。没有必要试图对任何反应中获得的产率进行优化。本领域技术人员应知道如何通过反应时间、温度、溶剂和 / 试剂的常规改变来提高所述产率。

[0587] 无水溶剂是购自 Aldrich Chemical Company, Inc. (Milwaukee)。试剂是购自商业来源。除非另外指出,否则在实施例中使用的材料得自易于获取的商业供应商,或者通过化学合成领域技术人员已知的标准方法合成。熔点 (mp) 是在电热数字熔点仪上测定,并且未校正。¹H 和 ¹³C NMR 光谱用 Varian Unity Plus 400 光谱仪在室温下测定,且以距离内标四甲基硅烷的 ppm 低磁场报道。使用氘交换、去耦实验或 2D-COSY 以确定质子的归属。通过以下符号表示信号的多重度:s(单峰),d(双重峰),dd(两个双重峰),t(三重峰),q(四重峰),br(宽峰),bs(宽单峰),m(多重峰)。所有 J 值都以 Hz 为单位。质谱是在 Micromass

Platform LC 分光计上使用电喷雾技术测定的。元素分析是通过 Atlantic Microlab Inc. (Norcross, GA) 进行。在 Whatman LK6F 硅胶板上进行分析 TLC, 且在 Whatman PK5F 硅胶板上进行制备 TLC。柱色谱法在硅胶上或经由反相高效液相色谱法进行。

[0588] 实施例 1

[0589]



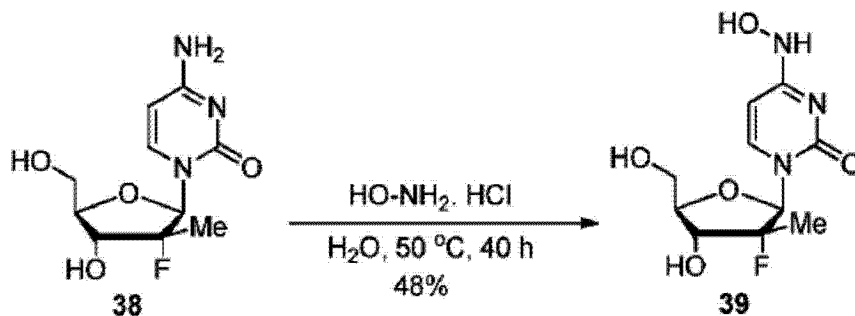
[0590] 流程 14. N^4 -羟基胞苷 2'-C-Me 核苷 37 的合成

[0591] 1-((2R, 3R, 4R, 5R)-3, 4-二羟基-5-(羟基甲基)-3-甲基四氢呋喃-2-基)-4-(羟基氨基)嘧啶-2(1H)-酮 37

[0592] 向 36 (0.175g, 0.68mmol) 在 2mL H_2O 中的溶液中添加羟胺盐酸盐 (0.24g, 3.4mmol)。反应混合物在 50°C 下搅拌且通过 TLC 和 / 或 LC/MS 监测。16h 之后, 添加羟胺盐酸盐 (0.24g, 3.4mmol) 且在 50°C 下额外搅拌反应混合物 24h。在起始材料完全消耗之后, 用 AcOEt (3×5mL) 萃取水溶液。将合并的有机层经 Na_2SO_4 干燥, 过滤且在减压下浓缩。通过硅胶柱色谱法 (CH_2Cl_2 :MeOH = 95:5 至 90:10v/v) 纯化残余物以得到 45% 产率的 37 (0.83g, 0.30mmol)。LCMS (ESI) $C_{10}H_{15}N_3O_6$ 的计算值: 273.2, 观测值: (M+1) 274.1。

[0593] 实施例 2

[0594]



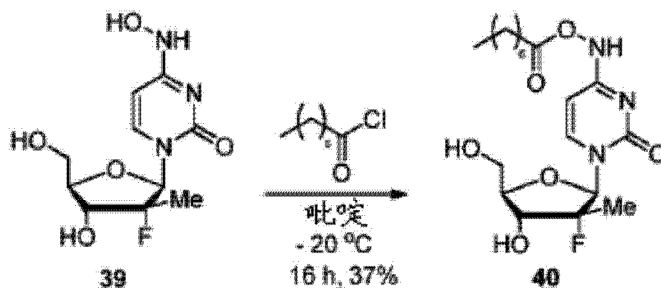
[0595] 流程 15. N^4 -羟基胞苷 2'-脱氧-2'-α-氟-2'-β-C-Me 核苷 39 的合成

[0596] 1-((2R, 3R, 4R, 5R)-3-氟-4-羟基-5-(羟基甲基)-3-甲基四氢呋喃-2-基)-4-(羟基氨基)嘧啶-2(1H)-酮 39

[0597] 向 38 (1g, 3.86mmol) 在 10mL H_2O 中的溶液中添加羟胺盐酸盐 (1.34g, 19mmol)。反应混合物在 50°C 下搅拌且通过 TLC 和 / 或 LC/MS 监测。16h 之后, 添加羟胺 (1.34g, 19mmol) 且在 50°C 下额外搅拌反应混合物 24h。在起始材料完全消耗之后, 用 AcOEt (3×25mL) 萃取水溶液。将合并的有机层经 Na_2SO_4 干燥, 过滤且在减压下浓缩。通过硅胶柱色谱法 (CH_2Cl_2 :MeOH = 95:5 至 90:10v/v) 纯化残余物以得到 48% 产率的 39 (0.51g, 1.85mmol)。LCMS (ESI) $C_{10}H_{14}FN_3O_5$ 的计算值: 275.2, 观测值: (M+1) 274.3

[0598] 实施例 3

[0599]



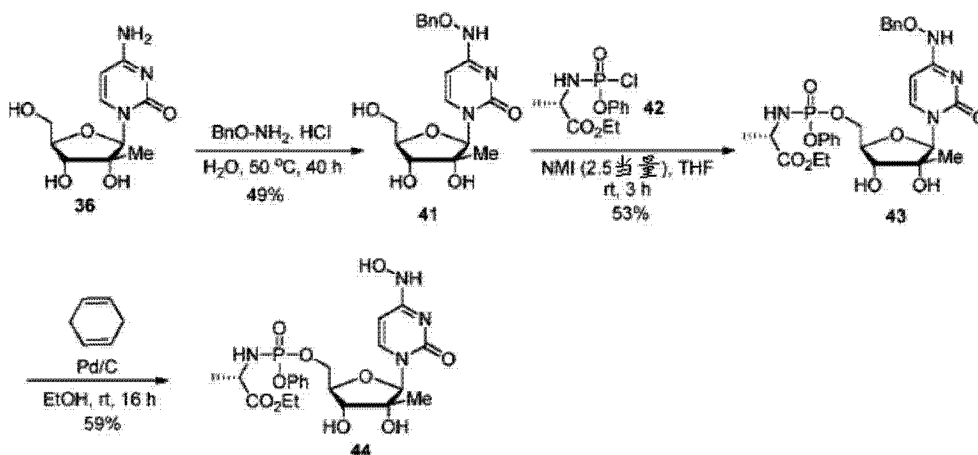
[0600] 流程 16. N^4 -(辛酰氧基)胞苷 2'-脱氧-2'- α -氟-2'- β -C-Me 核苷 40 的合成

[0601] 1-((2R, 3R, 4R, 5R)-3-氟-4-羟基-5-(羟基甲基)-3-甲基四氢呋喃-2-基)-4-((辛酰氧基)氨基)嘧啶-2(1H)-酮 40

[0602] 向 39 (0.06g, 0.23mmol) 在 2mL 无水吡啶的预冷却 (-20°C) 溶液中添加辛酰氯 ($44\text{ }\mu\text{L}$, 0.26mmol)。在 4°C 下搅拌混合物 16h 之后, 将反应用 MeOH (2mL) 终止且在减压下浓缩溶液。然后添加 AcOEt (10mL) 且将混合物用水 ($3\times 5\text{mL}$) 洗涤。将有机层经 Na_2SO_4 干燥, 过滤且在减压下浓缩。通过硅胶柱色谱法 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH} = 95:5$ 至 $85:15\text{v/v}$) 纯化残余物以得到 37% 产率的 40 (0.04g, 0.09mmol)。LCMS (ESI) $\text{C}_{18}\text{H}_{28}\text{FN}_3\text{O}_6$ 的计算值: 401.4, 观测值: (M+1) 402.3

[0603] 实施例 4

[0604]



[0605] 流程 17. N^4 -羟基胞苷 2'-C-Me 核苷前药 44 的合成

[0606] 4-((苄氧基)氨基)-1-((2R, 3R, 4R, 5R)-3, 4-二羟基-5-(羟基甲基)-3-甲基四氢呋喃-2-基)嘧啶-2(1H)-酮 41

[0607] 向 36 (0.175g, 0.68mmol) 在 2mL H_2O 中的溶液中添加 O-苄基羟基胺盐酸盐 (0.70g, 4.38mmol)。反应混合物在 50°C 下搅拌且通过 TLC 和 / 或 LC/MS 监测。16h 之后, O-苄基羟基胺盐酸盐 (0.30g, 1.88mmol) 添加且在 50°C 下额外搅拌反应混合物 24h。在起始材料完全消耗之后, 用 AcOEt ($3\times 5\text{mL}$) 萃取水溶液。将合并的有机层经 Na_2SO_4 干燥, 过滤且在减压下浓缩。通过硅胶柱色谱法 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH} = 95:5$ 至 $90:10\text{v/v}$) 纯化残余物以得到 49% 产率的 41 (0.12g, 0.33mmol)。LCMS (ESI) $\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_6$ 的计算值: 363.4, 观测值: (M+1) 364.3

[0608] (2S)-2-((((2R, 3R, 4R, 5R)-5-(4-((苄氧基)氨基)-2-氧代嘧

啉-1(2H)-基)-3,4-二羟基-4-甲基四氢呋喃-2-基)甲氧基)(苯氧基)磷酰基)氨基)丙酸乙酯 43

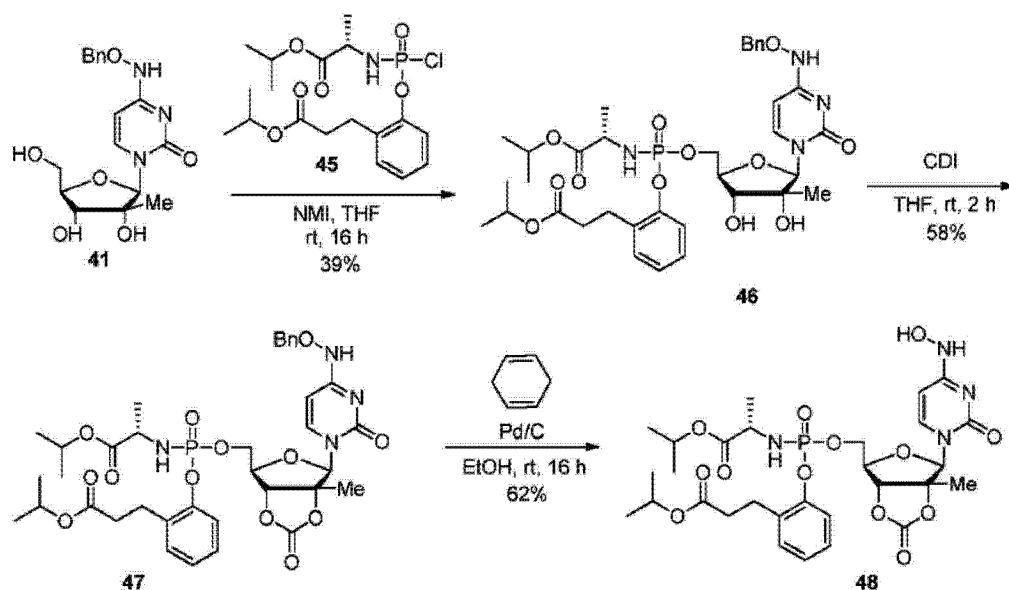
[0609] 在氩气氛围下向 41(0.04g, 0.12mmol) 在 2mL 中的溶液中添加 1-甲基咪唑(0.15mL, 0.3mmol) 和 0.3mL 苯基-(乙氧基-L-丙氨酰基)-氯磷酸酯 42 在 THF 中的 1M 溶液。在室温下搅拌 3h 之后, 添加 AcOEt(10mL) 且将反应混合物用 (3×3mL) 水洗涤。将有机层经 Na₂SO₄ 干燥, 过滤且在减压下浓缩。通过硅胶柱色谱法 (CH₂Cl₂:MeOH = 95:5 至 90:10v/v) 纯化残余物以得到 53% 产率的 43(0.04g, 0.06mmol)。LCMS(ESI)C₂₈H₃₅N₄O₁₀P 的计算值: 618.6, 观测值: (M+1) 619.7

[0610] (2S)-2-((((2R, 3R, 4R, 5R)-3,4-二羟基-5-(4-(羟基氨基)-2-氧代嘧啶-1(2H)-基)-4-甲基四氢呋喃-2-基)甲氧基)(苯氧基)磷酰基)氨基)丙酸乙酯 44

[0611] 在 rt 下向 43(0.04g, 0.06mmol) 在 2mL EtOH 中的溶液中添加 1,4-环己二烯(0.1mL) 和 Pd/C(0.01g, 10% Pd/活性炭)。在 rt 下搅拌 16h 之后, 在硅藻土垫上过滤悬浮液且将收集的溶液在减压下浓缩。通过硅胶柱色谱法 (CH₂Cl₂:MeOH = 90:10) 纯化残余物以得到 59% 产率的 44(0.02g, 0.04mmol)。LCMS(ESI)C₂₁H₂₉N₄O₁₀P 的计算值: 528.4, 观测值: (M+1) 528.3

[0612] 实施例 5

[0613]



[0614] 流程 18. N⁴-羟基胞苷 2'-C-Me 核苷前药 48 的合成

[0615] 3-(2-((((2R, 3R, 4R, 5R)-5-(4-((苯氧基)氨基)-2-氧代嘧啶-1(2H)-基)-3,4-二羟基-4-甲基四氢呋喃-2-基)甲氧基)((S)-1-异丙氧基-1-氧代丙-2-基)氨基)磷酰基)氧基)苯基)丙酸异丙酯 46

[0616] 在氩气氛围下向 41(0.15g, 0.41mmol) 在 7mL 无水 THF 中的溶液中添加 1-甲基咪唑(0.07mL, 0.83mmol) 和 0.83mL 氨基磷酸酯氯化物 45 在 THF 中的 1M 溶液。在室温下搅拌 16h 之后, 添加 AcOEt(20mL) 且将反应混合物用水 (3×5mL) 洗涤。将有机层经 Na₂SO₄ 干燥, 过滤且在减压下浓缩。通过硅胶柱色谱法 (CH₂Cl₂:MeOH = 95:5 至 90:10v/v) 纯化残余物以得到 39% 产率的 46(0.12g, 0.16mmol)。LCMS(ESI)C₃₅H₄₇N₄O₁₂P 的计算值: 746.7, 观测值: (M+1) 747.5

[0617] 3-(2-((((3aR, 4R, 6R, 6aR)-6-(4-((苄氧基)氨基)-2-氧代嘧啶-1(2H)-基)-6a-甲基-2-氧代四氢呋喃并[3,4-d][1,3]间二氧杂环戊烯-4-基)甲氧基) (((S)-1-异丙氧基-1-氧代丙-2-基)氨基)磷酸基)氧基)苯基)丙酸异丙酯 47

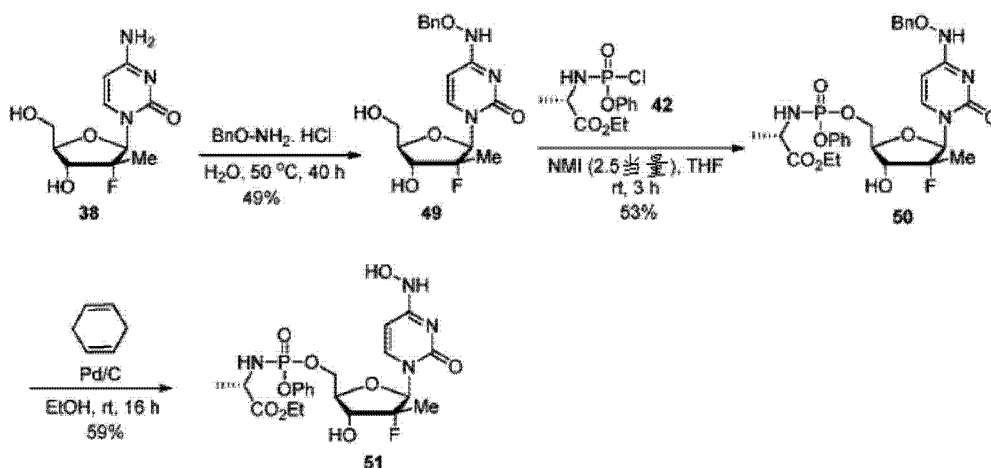
[0618] 在 0℃ 下向 46 (0.04g, 0.05mmol) 在 0.25mL THF 中的溶液中添加 N, N'-羰基二咪唑 (0.02mg, 0.12mmol)。在 rt 下搅拌 2h 之后, 在减压下浓缩溶液。通过硅胶柱色谱法 (己烷:EtOAc = 5:5) 纯化残余物以得到 58% 产率的 47 (0.02g, 0.03mmol)。LCMS (ESI) $C_{36}H_{45}N_4O_{13}P$ 的计算值: 772.7, 观测值: (M+1) 772.5

[0619] 3-(2-((((3aR, 4R, 6R, 6aR)-6-(4-(羟基氨基)-2-氧代嘧啶-1(2H)-基)-6a-甲基-2-氧代四氢呋喃并[3,4-d][1,3]间二氧杂环戊烯-4-基)甲氧基) (((S)-1-异丙氧基-1-氧代丙-2-基)氨基)磷酸基)氧基)苯基)丙酸异丙酯 48

[0620] 在 rt 下向 47 (0.02g, 0.06mmol) 在 2mL EtOH 中的溶液中添加 1,4-环己二烯 (0.1mL) 和 Pd/C (0.01g, 10% Pd/活性炭)。在 rt 下搅拌 16h 之后, 在硅藻土垫上过滤悬浮液且将收集的溶液在减压下浓缩。通过硅胶柱色谱法 (CH_2Cl_2 :MeOH = 90:10) 纯化残余物以得到 62% 产率的 48 (0.02g, 0.04mmol)。LCMS (ESI) $C_{29}H_{39}N_4O_{13}P$ 的计算值: 682.6, 观测值: (M+1) 683.4

[0621] 实施例 6

[0622]



[0623] 流程 19. N^4 -羟基胞苷 2'-脱氧-2'- α -氟-2'- β -C-Me 核苷前药 51 的合成

[0624] 4-((苄氧基)氨基)-1-((2R, 3R, 4R, 5R)-3-氟-4-羟基-5-(羟基甲基)-3-甲基四氢呋喃-2-基)嘧啶-2(1H)-酮 49

[0625] 向 38 (0.2g, 0.77mmol) 在 2mL H_2O 中的溶液中添加 O-苄基羟基胺盐酸盐 (0.37g, 2.31mmol)。将反应混合物在 50℃ 下搅拌且通过 TLC 和 / 或 LC/MS 监测。16h 之后, 添加 O-苄基羟基胺盐酸盐 (0.37g, 2.31mmol) 且在 50℃ 下额外搅拌反应混合物 24h。在起始材料完全消耗之后, 用 AcOEt (3×10mL) 萃取水溶液。将合并的有机层经 Na_2SO_4 干燥, 过滤且在减压下浓缩。通过硅胶柱色谱法 (CH_2Cl_2 :MeOH = 95:5 至 90:10v/v) 纯化残余物以得到 39% 产率的 49 (0.11g, 0.30mmol)。LCMS (ESI) $C_{17}H_{20}N_3O_5F$ 的计算值: 365.4, 观测值: (M+1) 366.3

[0626] (2S)-2-((((2R, 3R, 4R, 5R)-5-(4-((苄氧基)氨基)-2-氧代嘧啶-1(2H)-基)-4-氟-3-羟基-4-甲基四氢呋喃-2-基)甲氧基)(苄氧基)磷酸基)氨基)丙酸乙酯 50

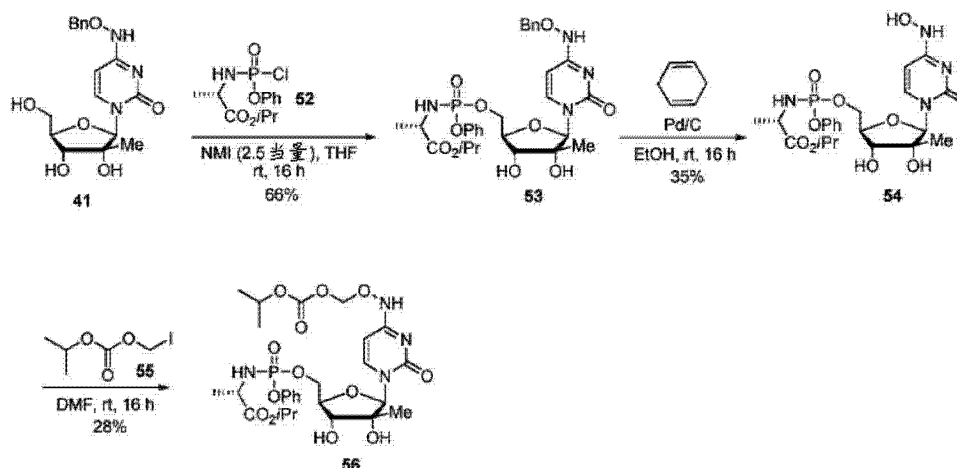
[0627] 在氩气氛围下向 49 (0.15g, 0.41mmol) 在 3mL 中的溶液中添加 1-甲基咪唑 (0.10mL, 1.23mmol) 和 1.23mL 苯基-(乙氧基-L-丙氨酰基)-氯磷酸酯 42 在 THF 中的 1M 溶液。在室温下搅拌 16h 之后, 添加 AcOEt (10mL) 且将反应混合物用水 (3×3mL) 洗涤。将有机层经 Na₂SO₄ 干燥, 过滤且在减压下浓缩。通过硅胶柱色谱法 (CH₂Cl₂:MeOH = 95:5 至 90:10v/v) 纯化残余物以得到 13% 产率的 50 (0.03g, 0.05mmol)。LCMS (ESI) C₂₈H₃₄N₄O₉PF 的计算值: 620.6, 观测值: (M+1) 621.3

[0628] (2S)-2-((((((2R, 3R, 4R, 5R)-4-氟-3-羟基-5-(4-(羟基氨基)-2-氧代嘧啶-1(2H)-基)-4-甲基四氢呋喃-2-基)甲氧基)(苯氧基)磷酸基)氨基)丙酸乙酯 51

[0629] 在 rt 下向 50 (0.03g, 0.06mmol) 在 2mL EtOH 中的溶液中添加 1,4-环己二烯 (0.1mL) 和 Pd/C (0.01g, 10% Pd/活性炭)。在 rt 下搅拌 16h 之后, 在硅藻土垫上过滤悬浮液且将收集的溶液在减压下浓缩。通过硅胶柱色谱法 (CH₂Cl₂:MeOH = 95:5) 纯化残余物以得到 40% 产率的 51 (0.01g, 0.04mmol)。LCMS (ESI) C₂₁H₂₈N₄O₉PF 的计算值: 530.4, 观测值: (M+1) 531.3

[0630] 实施例 7

[0631]



[0632] 流程 20. N⁴-羟基胞苷 2'-C-Me 核苷前药 54 和 56 的合成

[0633] (2S)-2-((((((2R, 3R, 4R, 5R)-5-(4-(苄氧基)氨基)-2-氧代嘧啶-1(2H)-基)-3,4-二羟基-4-甲基四氢呋喃-2-基)甲氧基)(苯氧基)磷酸基)氨基)丙酸异丙酯 53

[0634] 在氩气氛围下向 41 (0.13g, 0.36mmol) 在 5mL THF 中的溶液中添加 1-甲基咪唑 (0.07mL, 0.9mmol) 和 0.9mL (2S)-异丙基 2-((氯(苯氧基)磷酸基)氨基)丙酸酯 52 在 THF 中的 1M 溶液。在室温下搅拌 3h 之后, 添加 AcOEt (15mL) 且将反应混合物用水 (3×5mL) 洗涤。将有机层经 Na₂SO₄ 干燥, 过滤且在减压下浓缩。通过硅胶柱色谱法 (CH₂Cl₂:MeOH = 95:5 至 90:10v/v) 纯化残余物以 66% 产率得到 53 (0.15g, 0.24mmol)。

[0635] (2S)-2-((((((2R, 3R, 4R, 5R)-3,4-二羟基-5-(4-(羟基氨基)-2-氧代嘧啶-1(2H)-基)-4-甲基四氢呋喃-2-基)甲氧基)(苯氧基)磷酸基)氨基)丙酸乙酯 54

[0636] 在 rt 下向 53 (0.06g, 0.1mmol) 在 1.5mL iPrOH 中的溶液中添加 1,4-环己二烯 (0.2mL) 和 Pd/C (0.01g, 10% Pd/活性炭)。在 rt 下搅拌 16h 之后, 在硅藻土垫上过滤悬浮液且将收集的溶液在减压下浓缩。通过硅胶柱色谱法 (CH₂Cl₂:MeOH = 90:10) 纯化残余物

以得到 35% 产率的 54 (0.02g, 0.04mmol)

[0637] (2S)-2-((((2R, 3R, 4R, 5R)-3, 4-二羟基-5-(4-((((异丙氧基羰基)氧基)甲氧基)氨基)-2-氧代嘧啶-1(2H)-基)-4-甲基四氢呋喃-2-基)甲氧基)(苯氧基)磷酸基)氨基)丙酸乙酯 56

[0638] 向 54 (0.03g, 0.055mmol) 在 0.6mL DMF 中的溶液中添加 Cs_2CO_3 (0.054g, 0.165mmol) 和碘甲基异丙基碳酸酯 55 (0.027g, 0.11mmol)。在室温下搅拌 16h 之后, 添加 CH_2Cl_2 (5mL) 且将反应混合物用水 ($3 \times 3\text{mL}$) 洗涤。将有机层经 Na_2SO_4 干燥, 过滤且在减压下浓缩。通过硅胶柱色谱法 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH} = 95:5\text{v/v}$) 纯化残余物以 28% 产率得到 56 (0.01g, 0.015mmol)。

[0639] (2S)-2-((氯(苯氧基)磷酸基)氨基)丙酸异丙酯 52

[0640] 在氩气氛围下向苯基二氯磷酸酯 (7.88g, 51.4mmol) 在 40mL CH_2Cl_2 中的溶液中添加 L-丙氨酸异丙酯盐酸盐 (8.58g, 51.4mmol)。将混合物冷却降至 -78°C 且经 2h 逐滴添加 Et_3N (14mL, 102.8mmol) 在 40mL CH_2Cl_2 中的溶液。在室温下搅拌所得的溶液 16h 之后, 将所形成的白色固体在硅藻土垫上过滤且用无水 Et_2O (40mL) 洗涤。将有机层在减压下浓缩且通过硅胶柱色谱法纯化残余物 ($\text{EtOAc}:\text{己烷} = 1:0$ 至 $1:1\text{v/v}$) 以得到 50% 产率的呈无色油状的 52 (7.86g, 26mmol)。

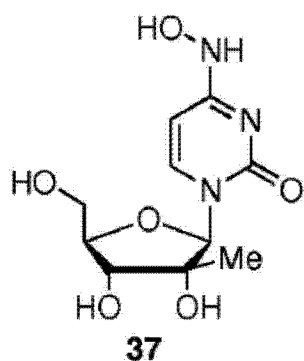
[0641] 实施例 8

[0642] 以下显示在 $50 \mu\text{M}$ MN^4 -羟基胞苷核苷和 N^4 -羟基胞苷单磷酸酯前药在 Huh-7 细胞中温育 4h 之后形成的核苷酸的 LC/MS 定性分析的两个实施例。

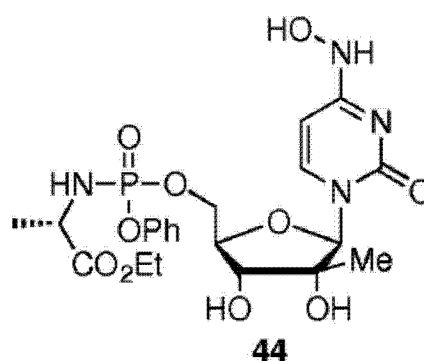
[0643] 37 在 Huh-7 细胞中的温育使得仅检测到极低水平的 37-TP (表 1)。然而, 单磷酸酯前药 44 在 Huh-7 细胞中的温育使得检测到高水平的 37-MP、37-DP 及 37-TP (表 1), 以及极低水平的 36-DP、36-TP 及 2'-脱氧- β -C-Me-U-TP。

[0644] 表 1. MP 前药 44 和母体核苷 37 的 HCV 和毒性数据

[0645]



HCV $\text{EC}_{50} = > 10 \mu\text{M}$
 PBM $\text{IC}_{50} = > 100 \mu\text{M}$
 CEM $\text{IC}_{50} = > 100 \mu\text{M}$
 Vero $\text{IC}_{50} = > 100 \mu\text{M}$
 Huh-7 $\text{IC}_{50} = > 10 \mu\text{M}$



HCV $\text{EC}_{50} = 0.8 \mu\text{M}$
 PBM $\text{IC}_{50} = > 100 \mu\text{M}$
 CEM $\text{IC}_{50} = > 100 \mu\text{M}$
 Vero $\text{IC}_{50} = > 100 \mu\text{M}$
 Huh-7 $\text{IC}_{50} = > 10 \mu\text{M}$

[0646] 在 MP 前药 44 的温育之后产生的这些高水平的细胞内 37-MP、37-DP 及 37-TP 指示 MP 前药绕过第一磷酸化步骤, 使得形成 37-TP。结果显示于下表 2 中:

[0647] 表 2. 在 50 μ M 37 和 44 在 Huh-7 细胞中温育 4 小时之后形成的核苷酸的 LC/MS 分析

[0648]

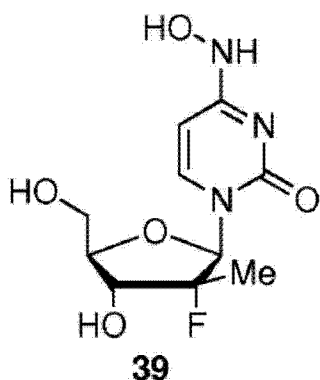
药物 代谢物 (pmol/10 ⁶ 个细胞)	37	44
2'-OH-2'-Me-U	BLOQ	BLOQ
2'-OH-2'-Me-UMP	BLOQ	BLOQ
2'-OH-2'-Me-UDP	BLOQ	BLOQ
2'-OH-2'-Me-UTP	BLOQ	4.84 $\pm$ 0.23
36	BLOQ	BLOQ
36-MP	BLOQ	BLOQ
36-DP	BLOQ	1.75 $\pm$ 0.19
36-TP	BLOQ	33.3 $\pm$ 0.15
37	BLOQ	BLOQ
37-MP	BLOQ	239.2 $\pm$ 35.2
37-DP	BLOQ	451.4 $\pm$ 31.1
37-TP	3.20 $\pm$ 1.30	3,075 $\pm$ 98.5
44	-	13.3 $\pm$ 1.7

[0649] BLOQ 意指低于定量限

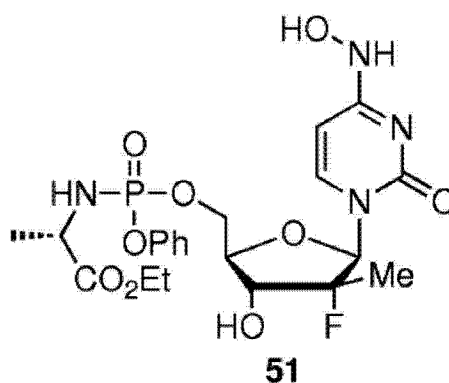
[0650] MP 前药 39 和母体核苷 51 的 HCV 和毒性数据显示在下表 3 中。

[0651] 表 3：

[0652]



HCV EC₅₀ = > 10 μM
 PBM IC₅₀ = >100 μM
 CEM IC₅₀ = >100 μM
 Vero IC₅₀ = >100 μM
 Huh-7 IC₅₀ = >10 μM



HCV EC₅₀ = 2.6 μM
 PBM IC₅₀ = >100 μM
 CEM IC₅₀ = >100 μM
 Vero IC₅₀ = >100 μM
 Huh-7 IC₅₀ = >33 μM

[0653] 39 在 Huh-7 细胞中的温育使得检测到高水平的 39 以及低水平的 2'-脱氧-2'-α-氟-2'-β-C-Me-U-TP、38-DP 及 38-TP。未检测到 39-MP、DP、-TP。(表 4)

[0654] 然而,单磷酸酯前药 51 在 Huh-7 细胞中的温育使得检测到高水平的 39、39-MP、39-DP 及 39-TP(表 2)。还观测到低水平的 38、38-MP、38-DP、38-TP 及 2'-脱氧-2'-α-氟-2'-β-C-Me-U-TP。

[0655] 在 MP 前药 51 的温育之后产生的这些高水平的细胞内 39-DP 和 39-TP 指示 MP 前药允许绕过第一磷酸化步骤,使得形成 39-TP。

[0656] 表 4 在 50 μM 39 和 51 在 Huh-7 细胞中温育 4 小时之后形成的核苷酸的 LC/MS 分析

[0657]

药物	39	51
代谢物		

[0658]

(pmol/10 ⁶ 个细胞)		
2'-F-2'-Me-U	BLOQ	BLOQ
2'-F-2'-Me-UMP	BLOQ	BLOQ
2'-F-2'-Me-UDP	BLOQ	BLOQ
2'-F-2'-Me-UTP	0.68 ± 0.07	6.25 ± 0.17
38	BLOQ	5.00 ± 0.34

38-MP	BLOQ	3.24±0.26
38-DP	0.42±0.019	3.01±0.39
38-TP	2.17±0.13	20.3±1.54
39	188.8±15.3	144.6±21.9
39-MP	BLOQ	3,452±247
39-DP	BLOQ	31.6±7.7
39-TP	BLOQ	364.5±10.6
51	—	71.5±2.3

[0659] BLOQ 意指低于定量限

[0660] 实施例 9

[0661] 抗 HIV (在 PBM 细胞中) 测定

[0662] 化合物的抗 HIV-1 活性如先前所述在人周围血液单核 (PBM) 细胞中测定 (参见 Schinazi R.F., McMillan A., Cannon D., Mathis R., Lloyd R.M. Jr., Peck A., Sommadossi J.-P., St. Clair M., Wilson J., Furman P.A., Painter G., Choi W.-B., Liotta D.C. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1992, 36, 2423; Schinazi R.F., Sommadossi J.-P., Saalman V., Cannon D., Xie M.-Y., Hart G., Smith G., Hahn E. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1990, 34, 1061)。化合物的储备溶液 (20–40mM) 在无菌 DMSO 中制备, 然后在生长培养基中稀释至所需浓度。用原型 HIV-1LAI 在 0.01 的感染复数下感染细胞。从细胞上清液处获得的病毒在感染之后第 6 天使用 (rA)_n • (dT)12–18 作为模板 – 引物通过逆转录酶测定来定量。存在于稀释溶液中的 DMSO (<0.1%) 对病毒产量没有影响。AZT 作为阳性对照包括在内。抗病毒 EC₅₀ 和 EC₉₀ 是使用先前所述的半数有效方法从浓度 – 反应曲线中获得 (参见 Chou T.-C. & Talalay P. *Adv. Enzyme Regul.* 1984, 22, 27–55; Belen'kii M.S. & Schinazi R.F. *Antiviral Res.* 1994, 25, 1–11)。

[0663] 实施例 10

[0664] 通过 HIV-1 RT 评定核苷-TP 的掺入

[0665] i) 蛋白质表达和纯化: 使用 p6HRT-PROT 表达载体在细菌中过表达 HIV-1 RT (xxLAI 背景) (参见 Shi C, Mellors JW. A recombinant retroviral system for rapid in vivo analysis of human immunodeficiency virus type 1 susceptibility to reverse transcriptase inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997; 41:2781–5) 并且如先前所述纯化至均质 (参见 Le Grice SF, Gruninger-Leitch F. Rapid purification of homodimer and heterodimer HIV-1 reverse transcriptase by metal chelate affinity chromatography. *Eur J Biochem.* 1990; 187:307–14; Le Grice SF, Cameron CE, Benkovic SJ. Purification and characterization of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *Methods Enzymol.* 1995;

262:130-44)。使用 260450M-1cm-1 的消光系数 (ϵ 280) 在 280nm 下用分光光度法测定纯化的酶的蛋白质浓度。RT 的活性位点浓度是如先前所述由预稳态破裂实验来计算 (参见 Kati WM, Johnson KA, Jerva LF, Anderson KS. Mechanism and fidelity of HIV reverse transcriptase. J Biol. Chem. 1992 ;267:25988-97)。如下所述的所有反应均使用活性位点浓度进行。

[0666] ii) 预稳态动力学分析:退火至 57 个核苷酸 DNA 模板 (5'-CTCAGACCCTTTTAGTCA GAATGGAAANTCTCTAGCAGTGGCGCCCG AACAGGGACA-3') 的 [γ 32 P]-ATP 5'-末端标记的 20 个核苷酸 DNA 引物 (5'-TCGGGCGCCACTGCTAGAGA-3') 被用于所有实验中。DNA 模板含有在位置 30(N) 处的 T 或 C, 这允许使用相同的 20 个核苷酸引物评价单个核苷酸掺入的动力学。快速淬火实验是使用 Kintek RQF-3 仪器 (Kintek Corporation, Clarence, PA) 进行。在所有实验中, 300nM RT 和 60nM DNA 模板 / 引物 (T/P) 在反应缓冲液 (50mM Tris-HCl pH 7.5, 50mM KCl) 中预温育, 之后在含有 20mM $MgCl_2$ 的相同反应缓冲液中与相等体积的核苷酸混合。反应通过用 0.5M EDTA, pH 8.0 淬火在从 10ms 至 30min 的时间范围内终止。将淬火的样品与相等体积的凝胶加样缓冲液 (98% 去离子甲酰胺、10mM EDTA 和 1mg/mL 溴酚蓝和二甲苯胺 (xylene cyanol) 的每一者) 混合, 在 85°C 下变性 5min, 并且将产物在 7M 尿素 -16% 聚丙烯酰胺凝胶上与底物分离。使用 Bio-Rad GS525 分子成像器 (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA) 分析产物形成。

[0667] iii) 数据分析:将从动力学测定中获得的数据使用 Sigma 绘图软件 (Jandel Scientific) 通过非线性回归与适当的方程拟合 (参见 Johnson KA. Rapid quench kinetic analysis of polymerases, adenosinetriphosphatases, and enzyme intermediates. Methods Enzymol. 1995 ;249:38-61)。dNTP 的每个具体浓度的表观破裂速率常数 (k_{obs}) 是通过将产物形成的时程拟合至方程来确定: $[产物] = A[1 - \exp(-k_{obs}t)]$, 其中 A 代表破裂幅度。dNTP 的转换数 (k_{pol}) 和表观电离常数 (K_d) 是通过针对 dNTP 浓度绘制表观催化速率 k_{obs} 并将数据与以下双曲线方程拟合而获得: $k_{obs} = (k_{pol}[dNTP]) / ([dNTP] + K_d)$ 。

[0668] 实施例 11

[0669] 评定 N^4 -羟基胞苷核苷衍生物、修饰的单磷酸酯及磷酸酯前药类似物的抗 HIV 活性和细胞毒性

[0670] i) 病毒:病毒原种可使用 xxHIV-1LAI 克隆 75 通过将 5 至 10 μ g 的质粒 DNA 电穿孔 (Gene Pulser ;Bio-Rad) 到 1.3×10^7 个 MT-2 细胞中来制备。转染后 7 天, 可收获不含细胞的上清液并储存在 -80°C 下。病毒原种的基因型可通过以下操作来确认:从病毒粒子提取 RNA, 用 DNA 酶 I 处理提取物, 通过 RT-PCR 扩增 RT 的全长编码区 (氨基酸 1 至 560), 纯化 PCR 产物并且使用 Big Dye 终止剂试剂盒 (v. 3.1) 在 ABI 3100 自动 DNA 测序仪 (Applied Biosystems, Foster City, Calif.) 上测定序列。可通过三倍终点稀释测定 (每份稀释液 6 个孔) 测定 MT-2 细胞、P4/R5 细胞或 PBM 细胞的病毒原种的 50% 组织培养感染剂量 ($TCID_{50}$) 并且使用 Reed 和 Muench 方程来计算 (参见 Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. Am. J. Hyg. 1938 ;27:493-497)。

[0671] ii) 单个复制周期的药物敏感性测定:在 96 孔板中, 将抑制剂的两倍或三倍连续稀释液一式三份添加至 P4/R5 细胞中。将细胞用在无药物的病毒感染对照孔中产生 100 的相对光单位值的量的病毒来感染。感染后 48h, 将细胞溶解缓冲液和发光

底物 (Gal-Screen ;Tropix/Applied Biosystems) 添加至每个孔中, 并且使用光度计 (ThermoLabSystems, Waltham, Mass) 测定相对光单位值。病毒复制的抑制计算为抑制 50% 病毒复制所需的化合物浓度 (EC_{50})。

[0672] iii) 多个复制周期的药物敏感性测定: 在 96 孔板中, 可将抑制剂的三倍连续稀释液一式三份添加至 MT-2 细胞中。细胞可如在 MT-2 细胞中的终点稀释所测定在 0.01 的感染复数下被感染。感染后 7 天, 将培养上清液收集并且用 0.5% Triton X-100 处理。在上清液中的 p24 抗原浓度可使用商用的酶联免疫吸附测定 (DuPont, NEN Products, Wilmington, Del.) 来测定。 EC_{50} 值可如上所述来计算。

[0673] iv) 在 PBM 细胞中的药物敏感性测定: PBM 细胞是如先前所述通过 Ficoll-Hypaque 不连续梯度离心从健康的血清阴性供体中分离 (参见 Schinazi RF, Cannon DL, Arnold BH, Martino-Saltzman D. Combinations of isoprinosine and 3'-azido-3'-deoxythymidine in lymphocytes infected with human immunodeficiency virus type 1. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1988 ;32:1784-1787 ; Schinazi RF, Sommadossi JP, Saalman V, Cannon DL, Xie MY, Hart GC, Smith GA. Hahn E.F. Activities of 3'-azido-3'-deoxythymidine nucleotide dimers in primary lymphocytes infected with human immunodeficiency virus type 1. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1990 ;34:1061-1067)。在使用之前细胞用植物凝集素 A (PHA, Difco, Sparks, MD) 刺激 2-3 天。感染是大量进行持续 1h, 对于烧瓶 (T25) 测定用 $100TCID_{50}/1 \times 10^7$ 个细胞或对于 24 孔板测定用 $200TCID_{50}/6 \times 10^7$ 个细胞。将细胞添加至含有测试化合物的 10 倍连续稀释液的板或烧瓶中。感染后 5 天, 将培养上清液收集并且用 0.5% Triton X-100 处理。上清液中的 p24 抗原浓度如上所述来测定。 EC_{50} 和倍数抗性值如上所述来计算。

[0674] v) 细胞毒性测定: 核苷及核苷单磷酸酯前药可就其对 P4/R5 细胞、MT-2 细胞及未感染的 PHA 刺激的人 PBM 细胞的可能毒性作用进行评价。可将对数期 P4/R5、MT-2 及 PHA 刺激的人 PBM 细胞以 5×10^3 至 5×10^4 个细胞 / 孔接种于含有测试化合物的 10 倍连续稀释液的 96 孔细胞培养板中。可培养培养物 2-4 天, 之后可将溴化 3-(4, 5- 二甲基噻唑 -2- 基) -2, 5- 二苯基四唑 (MTT) 染料溶液 (Promega, Madison, WI) 添加至每个孔中并且培养过夜。将反应终止用终止增溶溶液 (Promega, Madison, WI) 来终止并且可在 570nm 的波长下读取板。中值 50% 细胞毒性浓度 (CC_{50}) 可使用中值效果方法从浓度 - 反应曲线中测定。

[0675] 实施例 12

[0676] 评定 N^4 - 羟基胞苷核苷衍生物、修饰的单磷酸酯及磷酸酯前药类似物针对耐药性 HIV 的活性

[0677] 如上所鉴定与母体类似物相比具有改善的活性和较小细胞毒性的类似物可进一步就针对一组耐药性病毒的活性进行评价。在此研究中使用的耐药性病毒可包括 HIV-1_{K65R}、HIV-1_{K70E}、HIV-1_{L74V}、HIV-1_{M184V}、HIV-1_{AZT2}、HIV-1_{AZT3}、HIV-1_{AZT7}、HIV-1_{AZT9}、HIV-1_{Q151M} 及 HIV-1₆₉ 插入。所有这些突变病毒都可在 HIV-1_{XX} LAI 克隆中生成。

[0678] 实施例 13

[0679] 评定 N^4 - 羟基胞苷核苷衍生物、修饰的单磷酸酯及磷酸酯前药类似物针对耐药性 HIV 的活性

[0680] i) 病毒和药物敏感性测定 :可如上所述制备病毒原液。药物敏感性测定可使用也如上所述的单个和多个复制周期测定来进行。病毒复制的抑制可计算为抑制 50% 病毒复制所需的化合物浓度 (EC_{50})。抗性倍数值可通过将突变的 HIV-1 的 EC_{50} 除以 WT HIV-1 的 EC_{50} 来确定。

[0681] ii) 统计分析 :为了确定倍数抗性值是否在统计上是显著的,可将来自至少三个独立实验的 EC_{50} 值进行 $\log_{10}$ 转换并且使用两样品 Student's t 检验用 Sigma Stat 软件 (Jandel Scientific) 来比较。小于 0.05 的 P 值被认为在统计上是显著的。

[0682] 实施例 14

[0683] 通过突变的 HIV-1 RT 评定核苷酸的掺入和切除

[0684] i) 酶 :以下突变的 HIV-1 RT 酶可用于此研究中 :K65R RT、K70E RT、L74V RT、M184V RT、AZT2RT、AZT3RT、Q151M RT 及 69 插入 RT。可以开发用于这些突变型 RT 的每一个的大肠杆菌蛋白质表达载体,并且可如先前所述进行蛋白质表达和纯化。蛋白质浓度和活性位点浓度可如上所述来测定。

[0685] ii) 核苷酸掺入的动力学分析 :预稳态动力学分析可用于确定 K65R、K70E RT、L74V RT、M184V RT 及 Q151M RT 的每种新型核苷 -TP 的动力学参数 K_d 和 k_{pol} 。试验设计和数据分析可如上所述进行。

[0686] iii) 切除测定 :来自链终止模板 / 引物的新型类似物的 ATP 介导的磷酸分解切除可使用 WT RT、AZT2RT、AZT3RT 及 69Insert RT 来进行。如上所述的 20 个核苷酸 DNA 引物可用 [γ ^{32}P]-ATP 在 5' - 末端标记,然后退火至适当的 57 个核苷酸 DNA 模板。引物的 3' - 末端可通过用 WT RT 和 100 μ M 适当修饰的核苷酸类似物在 37°C 下温育 30min 来进行链终止。 ^{32}P 标记的链终止的 21 核苷酸引物可进一步通过在 7M 尿素 -16% 丙烯酰胺变性凝胶电泳之后提取适当的条带来纯化。纯化的链终止的引物然后可与适当的 DNA 模板重退火以供在磷酸分解实验中使用。核苷 -MP 的磷酸分解去除可通过将 300nM (活性位点) WT 或突变型 RT 与 60nM 感兴趣的链终止的 T/P 复合物在 50mM Tris-HCl pH 8.0、50mM KCl 中温育来实现。反应可通过添加 3.0mM ATP 和 10mM $MgCl_2$ 来开始。无机焦磷酸酶 (0.01U) 可在反应自始至终都存在。在限定的温育期之后,等分试样可从反应试管中除去并且用相等体积的凝胶加样染料 (98% 去离子甲酰胺、10mM EDTA 及 1mg/mL 溴酚蓝和二甲苯胺的每一者) 淬灭。产物可通过变性凝胶电泳分离,并且可使用 Bio-Rad GS525 分子成像器分析与产物形成相一致的底物消失。数据可拟合至以下单一指数方程以测定 ATP 介导的切除的表观速率 (k_{ATP}) : $[产物] = A[\exp(-k_{ATP}t)]$, 其中 A 代表产物形成的幅度。终端复合物形成可如先前所述来测定 (参见 Meyer PR, Matsuura SE, Mian AM, So AG, Scott WA. A mechanism of AZT resistance: an increase in nucleotide-dependent primer unblocking by mutant HIV-1 reverse transcriptase. Mol Cell. 1999 ;4:35-43 ;Sluis-Cremer N, Arion D, Parikh U, Koontz D, Schinazi RF, Mellors JW, Parniak MA. The 3' -azido group is not the primary determinant of 3' -azido-3' -deoxythymidine (AZT) responsible for the excision phenotype of AZT-resistant HIV-1. J Biol Chem. 2005 ;280:29047-52)。

[0687] 实施例 15

[0688] 在 HepG2 细胞中的线粒体毒性测定 :

[0689] i) 核苷及核苷单磷酸酯前药对细胞生长和乳酸产生的影响 :对 HepG2 细胞生长的

影响可通过在 0 μ M、0.1 μ M、1 μ M、10 μ M 及 100 μ M 药物存在下温育细胞来确。定可将细胞 (5×10^4 /孔) 涂于 12 孔细胞培养集落中的具有补充有 10% 胎牛血清、1% 丙酮酸钠及 1% 青霉素 / 链霉素的非必需氨基酸的最小必需培养基中并且在 37°C 下温育 4 天。温育期结束时, 细胞数量可使用血球计来测定。还由 Pan-Zhou X-R, Cui L, Zhou X-J, Sommadossi J-P, Darley-Usmer VM. "Differential effects of antiretroviral nucleoside analogs on mitochondrial function in HepG2 cells" *Antimicrob. Agents Chemother.* 2000 ; 44:496-503 所教导。为了测量核苷类似物对乳酸产生的影响, 来自储备培养物的 HepG2 细胞可被稀释并以 2.5×10^4 个细胞 / 孔涂于 12 孔培养板中。可添加各种浓度 (0 μ M、0.1 μ M、1 μ M、10 μ M 及 100 μ M) 的核苷类似物, 并且可将培养物在 37°C 下在湿润的 5% CO_2 气氛中温育 4 天。在第 4 天, 可测定每个孔中的细胞数量并收集培养基。可将培养基过滤, 并且使用比色乳酸测定 (Sigma-Aldrich) 来测定培养基中的乳酸含量。因为乳酸产物可被视为减弱的线粒体功能的标记物, 所以在 N^4 - 羟基胞苷核苷衍生物、修饰的单磷酸酯及磷酸酯前药类似物存在下生长的细胞中检测到的升高水平的乳酸产生可用于指示药物诱导的细胞毒性效应。

[0690] ii) N^4 - 羟基胞苷核苷衍生物、修饰的单磷酸酯及磷酸酯前药类似物对线粒体 DNA 合成的影响: 已开发了精确地定量线粒体 DNA 含量的实时 PCR 测定 (参见 Stuyver LJ, Lostia S, Adams M, Mathew JS, Pai BS, Grier J, Tharnish PM, Choi Y, Chong Y, Choo H, Chu C K, Otto MJ, Schinazi RF. *Antiviral activities and cellular toxicities of modified 2', 3'-dideoxy-2', 3'-didehydrocytidine analogs.* *Antimicrob. Agents Chemother.* 2002 ;46:3854-60)。此测定可用于本申请中所述的所有研究, 所述研究确定核苷类似物对线粒体 DNA 含量的影响。在此测定中, 低传代数的 HepG2 细胞可以 5,000 个细胞 / 孔接种于涂布胶原的 96 孔板中。核苷单磷酸酯类似物可添加至培养基中以获得 0 μ M、0.1 μ M、10 μ M 及 100 μ M 的最终浓度。在培养第 7 天, 细胞核酸可通过使用可商购获得的柱 (RNeasy 96 试剂盒 ; Qiagen) 来制备。这些试剂盒共同纯化 RNA 和 DNA, 且因此将总核酸从柱上洗脱。线粒体细胞色素 C 氧化酶亚基 II (COXII) 基因及 β -肌动蛋白或 rRNA 基因可使用多重 Q-PCR 方案从 5 μ l 洗脱的核酸来扩增, 其中适合的引物和探针用于靶标和参考扩增两者。对于 COXII, 可分别使用以下有义、探针及反义引物: 5'-TGCCCGCCATCATCCTA-3'、5'-四氯-6-羧基荧光素-TCTCATCGCCCTCCCATCCC-TAMRA-3' 及 5'-CGTCT GTTATGTAAAGGATGCGT-3'。对于 β -肌动蛋白基因 (GenBank 登录号 E01094) 的外显子 3, 有义、探针及反义引物分别是 5'-GCGCGGC TACAGCTTCA-3'、5'-6-FAMCACCACG GCCGAGCGGGATAMRA-3' 及 5'-TCTCCTTA ATGTCACGCACGAT-3'。rRNA 基因的引物和探针可从 Applied Biosystems 商购获得。因为相等的扩增效率可对于所有基因获得, 所以比较 CT 方法可用于研究线粒体 DNA 合成的可能抑制。比较 CT 方法使用以下算术公式, 其中靶标 (COXII 基因) 的量对内源参照物 (β -肌动蛋白或 rRNA 基因) 的量进行归一化并且相对于定标物 (在第 7 天时没有药物的对照)。用于此方法的算术公式是由 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 给出, 其中 $\Delta\Delta CT$ 是 (平均靶标测试样品的 CT- 靶标对照的 CT) - (平均参照测试的 CT- 参照对照的 CT) (参见 Johnson MR, K Wang, J B Smith, MJ Heslin, RB Diasio. *Quantitation of dihydropyrimidine dehydrogenase expression by real-time reverse transcription polymerase chain reaction.* *Anal. Biochem.* 2000 ;278:175-184)。在药物存在下生长的

细胞中的线粒体 DNA 含量的下降指示线粒体毒性。

[0691] iii) 电子显微镜形态学评价:已显示 NRTI 诱发的毒性在线粒体(例如,嵴丧失、基质溶解和溶胀以及脂类小滴形成)中引起形态变化,这可使用透射电子显微术用超微结构分析来观测(参见 Cui L, Schinazi RF, Gosselin G, Imbach JL, Chu CK, Rando RF, Revankar GR, Sommadossi JP. Effect of enantiomeric and racemic nucleoside analogs on mitochondrial functions in HepG2 cells. *Biochem. Pharmacol.* 1996, 52, 1577-1584; Lewis W, Levine ES, Griniuvienė B, Tankersley KO, Colacino JM, Sommadossi JP, Watanabe KA, Perrino FW. Fialuridine and its metabolites inhibit DNA polymerase gamma at sites of multiple adjacent analog incorporation, decrease mtDNA abundance, and cause mitochondrial structural defects in cultured hepatoblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996; 93:3592-7; Pan-Zhou XR, L Cui, XJ Zhou, JP Sommadossi, VM Darley-Usmar. Differential effects of antiretroviral nucleoside analogs on mitochondrial function in HepG2 cells. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2000, 44, 496-503)。例如,用 10 μ M 非阿尿苷(FIAU; 1, 2'-脱氧-2'-氟-1-D-阿拉伯呋喃糖基-5-碘-尿嘧啶)温育的 HepG2 细胞的电子显微照片可显示存在扩大的线粒体,其具有与线粒体功能障碍一致的形态变化。为了确定核苷及核苷单磷酸酯前药是否促进线粒体中的形态变化,可将 HepG2 细胞 (2.5×10^4 个细胞/mL) 在 0 μ M、0.1 μ M、1 μ M、10 μ M 及 100 μ M 核苷类似物存在下接种于组织培养盘 (35 $\times$ 10mm) 中。在第 8 天,可将细胞固定,脱水并且如先前所述包埋入 Eponas 中。可制备薄切片,用醋酸铀酰和柠檬酸铅染色,然后使用透射电子显微术来检验。

[0692] 实施例 16

[0693] 在 Neuro2A 细胞中的线粒体毒性测定

[0694] 为了估计核苷类似物产生神经元毒性的可能性,小鼠 Neuro2A 细胞(美国典型培养物保藏中心 131)可用作模型系统(参见 Ray AS, Hernandez-Santiago BI, Mathew JS, Murakami E, Bozeman C, Xie MY, Dutschman GE, Gullen E, Yang Z, Hurwitz S, Cheng YC, Chu CK, McClure H, Schinazi RF, Anderson KS. Mechanism of anti-human immunodeficiency virus activity of beta-D-6-cyclopropylamino-2', 3'-didehydro-2', 3'-dideoxyguanosine. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005, 49, 1994-2001)。抑制 50% 细胞生长所必需的浓度(CC₅₀)可使用基于溴化 3-(4, 5-二甲基-噻唑-2-基)-2, 5-二苯基四唑染料的测定如所述来测量。细胞乳酸和线粒体 DNA 水平在限定的药物浓度下的扰动可如上所述进行。在所有实验中,ddC 和 AZT 可用作对照核苷类似物。

[0695] 实施例 17

[0696] 核苷酸类似物对线粒体 DNA 聚合酶 γ 的 DNA 聚合酶和核酸外切酶活性的影响

[0697] i) 人聚合酶 γ 的纯化:聚合酶 γ 的重组大和小亚基可如先前所述进行纯化(参见 Graves SW, Johnson AA, Johnson KA. Expression, purification, and initial kinetic characterization of the large subunit of the human mitochondrial DNA polymerase. *Biochemistry.* 1998, 37, 6050-8; Johnson AA, Tsai Y, Graves SW, Johnson KA. Human mitochondrial DNA polymerase holoenzyme: reconstitution and characterization. *Biochemistry* 2000; 39:1702-8)。蛋白质浓度可在 280nm 下对聚合酶

γ 的大和小亚基分别是 234, 420 和 71, 894 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 的消光系数用分光光度法来测定。

[0698] ii) 核苷酸掺入的动力学分析: 可进行预稳态动力学分析以测定核苷-TP 及天然 dNTP 底物的 DNA 聚合酶 γ 的掺入的催化效率 (k/K)。这允许确定此酶掺入修饰的类似物和预测毒性的相对能力。核苷酸类似物通过 DNA 聚合酶 γ 掺入的预稳态动力学分析可基本上如先前所述进行 (参见 Murakami E, Ray AS, Schinazi RF, Anderson KS. Investigating the effects of stereochemistry on incorporation and removal of 5-fluorocytidine analogs by mitochondrial DNA polymerase gamma: comparison of D- and L-D4FC-TP. Antiviral Res. 2004, 62, 57-64; Feng JY, Murakami E, Zorca SM, Johnson AA, Johnson KA, Schinazi RF, Furman PA, Anderson KS. Relationship between antiviral activity and host toxicity: comparison of the incorporation efficiencies of 2', 3'-dideoxy-5-fluoro-3'-thiacytidine-triphosphate analogs by human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase and human mitochondrial DNA polymerase. Antimicrob Agents Chemother. 2004, 48, 1300-6)。简言之, 聚合酶 γ 和 60nM DNA 模板 / 引物的大 (250nM) 和小 (1.25mM) 亚基在 50mM Tris-HCl、100mM NaCl, pH 7.8 中的预温育混合物可添加至含有 MgCl_2 (2.5mM) 及各种浓度的核苷酸类似物的溶液中。可对反应进行淬灭并且如先前所述来分析。数据可如上所述拟合至同一方程。

[0699] iii) 人聚合酶 γ 3' 5' 核酸外切酶活性的测定: 人聚合酶 γ 核酸外切酶活性可通过在 dNTP 不存在下测量裂解产物的形成率来研究。反应可通过添加 MgCl_2 (2.5mM) 至聚合酶 γ 大亚基 (40nM)、小亚基 (270nM) 及 1,500nM 链终止模板 / 引物在 50mM Tris-HCl、100mM NaCl, pH 7.8 的预温育混合物中开始, 并且在指定的时点用 0.3M EDTA 淬灭。所有反应混合物都可在 20% 变性聚丙烯酰胺测序凝胶 (8M 尿素) 上分析, 在 Bio-Rad GS-525 分子图像系统上成像, 并且用 Molecular Analyst (Bio-Rad) 定量。对由早期时点形成的产物以时间函数进行绘图。数据可通过线性回归与 Sigma Plot (Jandel Scientific) 拟合。可将线的斜率除以反应中的活性酶浓度以计算核酸外切酶活性的 kexo (参见 Murakami E, Ray AS, Schinazi RF, Anderson KS. Investigating the effects of stereochemistry on incorporation and removal of 5-fluorocytidine analogs by mitochondrial DNA polymerase gamma: comparison of D- and L-D4FC-TP. Antiviral Res. 2004; 62: 57-64; Feng JY, Murakami E, Zorca SM, Johnson AA, Johnson KA, Schinazi RF, Furman PA, Anderson KS. Relationship between antiviral activity and host toxicity: comparison of the incorporation efficiencies of 2', 3'-dideoxy-5-fluoro-3'-thiacytidine-triphosphate analogs by human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase and human mitochondrial DNA polymerase. Antimicrob Agents Chemother. 2004; 48: 1300-6)。

[0700] 实施例 18

[0701] 骨髓细胞毒性的测定

[0702] 初级人骨髓单核细胞可从 Cambrex Bioscience (Walkersville, MD) 商购获得。CFU-GM 测定可在 50 单位 / mL 人重组粒细胞 / 巨噬细胞集落刺激因子存在下使用双层软琼脂进行, 而 BFU-E 测定使用含有 1 单位 / mL 促红细胞生成素的甲基纤维素基质 (参见 Sommadossi JP, Carlisle R. Toxicity of 3'-azido-3'-deoxythymidine and 9-(1,3-dih

ydroxy-2-propoxymethyl)guanine for normal human hepatopoietic progenitor cells in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1987 ;31:452-454 ;Sommadossi, JP, Schinazi, RF, Chu, CK, and Xie, MY. Comparison of Cytotoxicity of the(-)and(+)enantiomer of 2',3'-dideoxy-3'-thiacytidine in normal human bone marrow progenitor cells. *Biochem. Pharmacol.* 1992 ;44:1921-1925)。每个实验都在来自三个不同供体的细胞中一式两份进行。AZT 可用作阳性对照。细胞可在化合物存在下在 37℃ 和 5% CO₂ 下温育 14-18 天, 并且大于 50 个细胞的集落可使用倒置显微镜计数以测定 IC₅₀。50% 抑制浓度 (IC₅₀) 可通过药物浓度对 BFU-E 存活分数的对数的最小二乘回归分析来获得。统计分析可用 Student's t 检验针对独立的非成对样品进行。

[0703] 实施例 19

[0704] 抗 HBV 测定

[0705] 化合物的抗 HBV 活性可通过在四环素的控制下处理携带野生型 HBV 的 AD-38 细胞系来确定 (参见 Ladner S. K., Otto M. J., Barker C. S., Zaifert K., Wang G. H., Guo J. T., Seeger C. & King R. W. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1997, 41, 1715-20)。从培养基 [Tet(-)] 除去四环素使得产生 HBV。HBV 在来自用化合物处理的细胞的培养上清液中的水平可与未处理的对照物相比较。用四环素 [Tet(+)] 的对照培养物也可以维持以确定 HBV 表达的基础水平。3TC 作为阳性对照包括在内。

[0706] 实施例 20

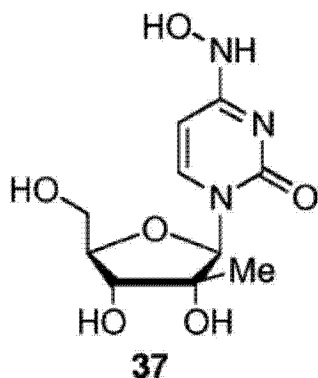
[0707] 细胞毒性测定

[0708] 化合物的毒性是在 Vero、人 PBM、CEM(人淋巴母细胞)中评定, 并且可以如先前所述在 MT-2 和 HepG2 细胞中评定 (参见 Schinazi R. F., Sommadossi J. -P., Saalman V., Cannon D. L., Xie M. -Y., Hart G. C., Smith G. A. & Hahn E. F. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1990, 34, 1061-67)。放线菌酮作为阳性细胞毒性对照包括在内, 并且暴露于溶剂的未处理的细胞作为阴性对照包括在内。细胞毒性 (IC₅₀) 是使用先前所述的半数有效方法从浓度 - 反应曲线中获得 (参见 Chou T. -C. & Talalay P. *Adv. Enzyme Regul.* 1984, 22, 27-55 ; Belen'kii M. S. & Schinazi R. F. *Antiviral Res.* 1994, 25, 1-11)。

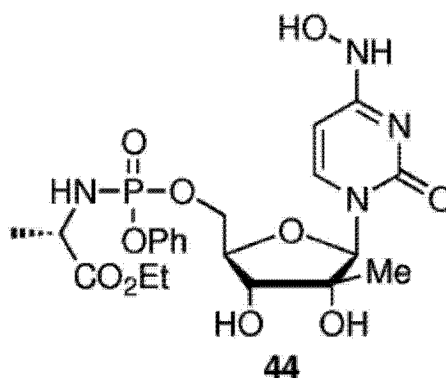
[0709] 关于 Vero、人 PBM 及 CEM(人淋巴母细胞)细胞的数据显示于下表 5 中:

[0710] 表 5: 所选化合物的 HCV EC₅₀、PBM IC₅₀、CEM IC₅₀、Vero IC₅₀ 及 Huh-7 IC₅₀ 数据

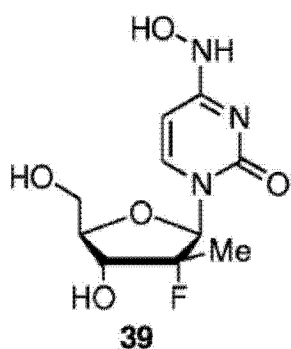
[0711]



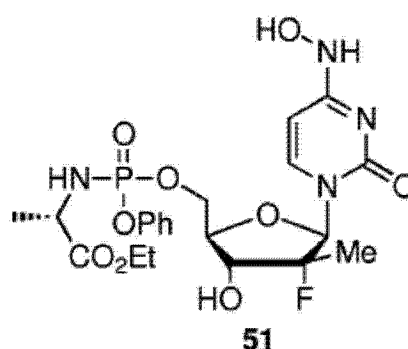
HCV EC₅₀ = > 10 μM
 PBM IC₅₀ = >100 μM
 CEM IC₅₀ = >100 μM
 Vero IC₅₀ = >100 μM
 Huh-7 IC₅₀ = >10 μM



HCV EC₅₀ = 0.8 μM
 PBM IC₅₀ = >100 μM
 CEM IC₅₀ = >100 μM
 Vero IC₅₀ = >100 μM
 Huh-7 IC₅₀ = >10 μM



HCV EC₅₀ = > 10 μM
 PBM IC₅₀ = >100 μM
 CEM IC₅₀ = >100 μM
 Vero IC₅₀ = >100 μM
 Huh-7 IC₅₀ = >10 μM



HCV EC₅₀ = 2.6 μM
 PBM IC₅₀ = >100 μM
 CEM IC₅₀ = >100 μM
 Vero IC₅₀ = >100 μM
 Huh-7 IC₅₀ = >33 μM

[0712] 实施例 21

[0713] 抗药性病毒对核苷酸单磷酸酯前药的选择

[0714] 周围血液单核 (PBM) 细胞¹可例如以 1×10^7 个细胞的浓度接种于含有 100mL 热灭活的胎牛血清 (Hyclone, Logan, Utah)、83.3IU/mL 青霉素、83.3 μg/mL 链霉素 (Mediatech Inc., Herndon, VA)、1.6mM L-谷氨酰胺 (Mediatech Inc., Herndon, VA)、0.0008% DEAE-右旋糖酐 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)、0.047% 碳酸氢钠及 26IU/mL 重组白介素-2 (Chiron Corporation, Emeryville, CA) 的总共 5mL 的 RPMI-1640 (Mediatech Inc., Herndon, VA) 中, 用两个 T25 烧瓶, 一个是对照 (未处理的) 且一个是用药物处理的。

[0715] 原生 PBM 细胞可在用在 $100 \times \text{TCID}_{50}$ 下的 HIV-1_{LAI}² 接种之前用在 $0.1 \mu\text{M}$ 下的核苷酸单磷酸酯前药处理 1 小时。处理过的 PBM 细胞群及对照未处理的 PBM 细胞群可允许感染例如 1 小时。另外的 5mL RTU 培养基可添加至每个烧瓶中并且可在 37°C 下温育细胞例如

6 天。

[0716] 在第 6 天,来自每个烧瓶的 1mL 上清液可被移除并且在 4℃ 下以 9,740g 旋转 2 小时。所得的病毒沉淀然后可再悬浮于病毒增溶缓冲液中用于 RT 分析。总 RNA 可使用商用 QIAmp 病毒 RNA 迷你试剂盒 (Quiagen) 从培养中分离上清液。测序可在对照病毒与核苷酸单磷酸酯前药处理过的病毒之间并行进行以确定施加的药物压力是否在病毒似乎具有抗药性的数周内制造任何突变。

[0717]

[0718] ¹PBM 细胞可通过 ficoll-hypaque (Histopaque 1077:Sigma) 密度梯度离心从由 American Red Cross (Atlanta, GA) 处获得的血沉棕黄层中分离。血沉棕黄层可来源于健康的、血清阴性供体。细胞可在使用之前 2-3 天用在含有 100mL 热灭活胎牛血清 (Hyclone, Logan, Utah)、83.3IU/mL 青霉素、83.3 μg/mL 链霉素、1.6mM L-谷氨酰胺 (Mediatech Inc., Herndon, VA) 的 500mL RPMI-1640 (Mediatech Inc., Herndon, VA) 中的 3 μg/mL 植物凝集素 A (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 来活化。

[0719] ²HIV-1/LAI 可从 Center for Disease Control and Prevention 处获得并用作抗药性池的病毒并且如通过在 PBM 细胞中的限制稀释法所测定的 0.1 的感染复数 (MOI) 可被选出以便开始感染池。

[0720] 可以计算处理过的病毒池相对于未处理的病毒池的抑制百分比并且在处理之前每周密切监测。病毒池的选择压力可在长达 47 周或更长期间内从 0.1 μM 增加到 3.5 μM (40 倍的 EC₅₀值)。

[0721] 实施例 22

[0722] 核苷类似物三磷酸酯的合成

[0723] 核苷类似物三磷酸酯是使用 Ludwig 和 Eckstein 的方法从适当保护的核苷来合成。(Ludwig J, Eckstein F. "Rapid and efficient synthesis of nucleoside 5'-O-(1-thiotriphosphates), 5'-triphosphates and 2',3'-cyclophosphorothioates using 2-chloro-4H-1,3,2-benzodioxaphosphorin-4-one" J. Org. Chem. 1989, 54631-5)。天然核苷类似物三磷酸酯可例如通过 FPLC 使用 HiLoad 26/10Q Sepharose Fast Flow Pharmacia 柱和 TEAB 缓冲液 (pH 7.0) 的梯度来纯化。产物将通过 UV 光谱学、质子和磷 NMR、质谱学及 HPLC 来表征。

[0724] 所得的三磷酸酯可用作如上所述的细胞药理学测定的对照并且用于 HIV-RT、HCV 聚合酶及其它病毒和人聚合酶的动力学研究。

[0725] 实施例 23

[0726] 针对 HSV-1 和 HSV-2 的活性的筛选测定

[0727] 在 CPE 抑制测定中,药物可在感染之前 1h 添加,这样测定系统将具有最高灵敏度并检测早期复制步骤如吸附或渗透以及稍后事件的抑制剂。为了排除结合至细胞的病毒的非特异性抑制,在 CPE 测定中显示合理活性的所有化合物将使用其中药物在感染之后 1h 添加的经典噬斑减少测定来确认。在化合物阻断连接的情况下,其在 CPE 测定中显示阳性,但可通过噬斑测定呈现阴性。功效:最少将使用六个药物浓度,覆盖 100mg/ml 至 0.03mg/ml 的范围,以 5 倍的增量。从这些数据将计算出抑制 50% 病毒复制的剂量 (有效浓度 50%; EC₅₀)。毒性:用于测定功效的相同的药物浓度也可在测定每种实验化合物的毒性的每个测

定中针对未感染的细胞使用。如通过其不能消除极重要的毒株中性红 (neutral red) 所测定, 药物浓度对细胞具有细胞毒性。

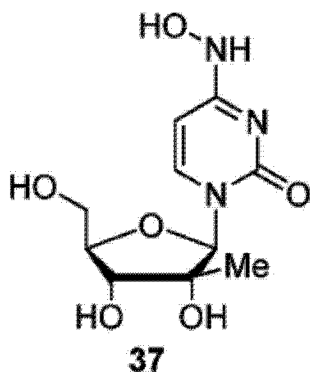
[0728] HSV-1 药物敏感性测定也可如先前在以下文献中所述来进行: Schinazi, R. F., Peters, J., Williams, C. C., Chance, D., Nahmias, A. J. "Effect of combinations of acyclovir with vidarabine or its 5'-monophosphate on herpes simplex virus in cell culture and in mice." *Antimicrob. Agents Chemother.* 1982, 22, 499-507。

[0729] 实施例 24

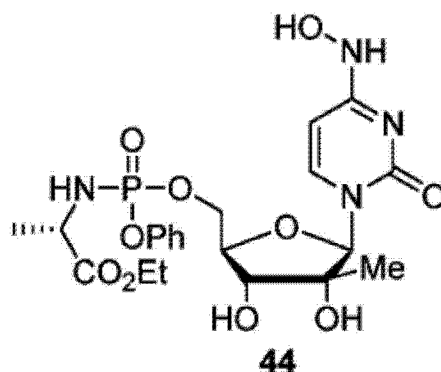
[0730] HCV 复制子测定¹

[0731] 将含有 HCV 复制子 RNA 的 Huh 7Clone B 细胞以 5000 个细胞 / 孔接种于 96 孔板中, 并且在接种之后立即一式三份在 $10 \mu\text{M}$ 下测试化合物。五天温育 (37°C , $5\% \text{CO}_2$) 之后, 通过使用来自 Gentra 的 versaGene RNA 纯化试剂盒分离总细胞 RNA。在单步多重实时 RT-PCR 测定中扩增复制子 RNA 和内部对照 (TaqMan rRNA 对照试剂, Applied Biosystems)。化合物的抗病毒有效性通过将无药物的对照 ($\Delta\text{Ct HCV}$) 的阈值 RT-PCR 周期减去测试化合物的阈值 RT-PCR 周期来计算。3.3 的 ΔCt 等于复制子 RNA 水平的 $1-\log$ 减少 (等于 90% 较少的起始材料)。化合物的细胞毒性还通过使用 $\Delta\text{Ct rRNA}$ 值来计算。(2'-Me-C) 被用作对照。为了测定 EC_{90} 和 IC_{50} 值², ΔCt 值首先被转换为起始材料³的分率, 然后用于计算抑制%。

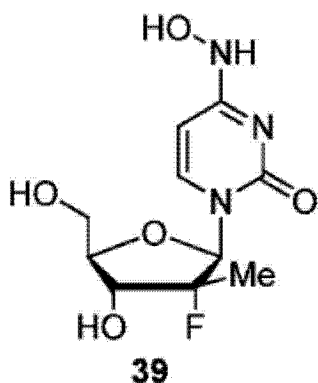
[0732]



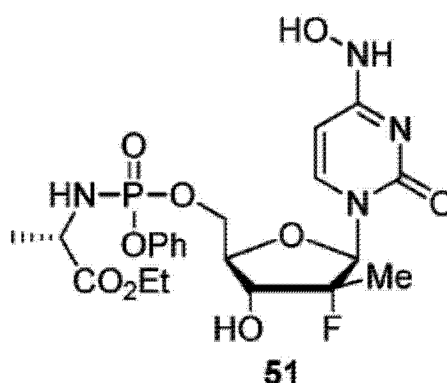
HCV EC₅₀ = > 10 μM
 PBM IC₅₀ = >100 μM
 CEM IC₅₀ = >100 μM
 Vero IC₅₀ = >100 μM
 Huh-7 IC₅₀ = >10 μM



HCV EC₅₀ = 0.8 μM
 PBM IC₅₀ = >100 μM
 CEM IC₅₀ = >100 μM
 Vero IC₅₀ = >100 μM
 Huh-7 IC₅₀ = >10 μM



HCV EC₅₀ = > 10 μM
 PBM IC₅₀ = >100 μM
 CEM IC₅₀ = >100 μM
 Vero IC₅₀ = >100 μM
 Huh-7 IC₅₀ = >10 μM



HCV EC₅₀ = 2.6 μM
 PBM IC₅₀ = >100 μM
 CEM IC₅₀ = >100 μM
 Vero IC₅₀ = >100 μM
 Huh-7 IC₅₀ = >33 μM

[0733] 参考文献：

[0734] 1. Stuyver L et al., Ribonucleoside analogue that blocks replication of bovine viral diarrhoea and hepatitis C viruses in culture. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2003, 47, 244-254.

[0735] 2. Reed IJ & Muench H, A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am. J. Hyg.* 27 :497, 1938.

[0736] 3. Applied Biosystems Handbook

[0737] 实施例 25

[0738] 西尼罗病毒药物敏感性也可以如先前在以下文献中所述来测定：Song, G. Y., Paul, V., Choo, H., Morrey, J., Sidwell, R. W., Schinazi, R. F., Chu, C. K. Enantiomeric synthesis of D- and L-cyclopentenyl nucleosides and their antiviral activity against HIV and West Nile virus. *J. Med. Chem.* 2001, 44, 3985-3993.

[0739] 实施例 26

[0740] 黄热病药物敏感性也可如先前在以下文献中所述来测定: Julander, J. G., Furuta, Y., Shafer, K., Sidwell, R. W. Activity of T-1106 in a Hamster Model of Yellow Fever Virus Infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2007, 51, 1962-1966。

[0741] 实施例 27

[0742] 人及登革热病毒聚合酶测定可例如通过 Replizyme Ltd 来进行。简言之, 每个酶/化合物组合可在 0.8mM 至 100mM 浓度范围内一式两份来测试。化合物可与对照(无抑制剂)、溶剂稀释物(例如 0.016% 至 2% DMSO)及有关的 Replizyme 参考抑制剂平行进行。

[0743] 用于鉴定具有针对登革热的活性的化合物的代表性高通量测定在 Lim 等人, A scintillation proximity assay for dengue virus NS5 2'-O-methyltransferase-kinetic and inhibition analyses, *Antiviral Research*, 第 80 卷, 第 3 期, 2008 年 12 月, 第 360-369 页中公开。

[0744] 登革热病毒 (DENV) NS5 在其 N 末端氨基酸序列处具有甲基转移酶 (MTase) 活性并且使得在病毒基因组 RNA 中形成 1 型帽结构 m7GpppAm2'-O。对于 DENV22'-O-MTase 活性的最佳体外条件可使用纯化重组蛋白及短的生物素化 GTP-带帽 RNA 模板来表征。衍生自初始速度的稳态动力学参数可用于确立针对化合物测试的稳固的闪烁亲近测定。通过 Lim 等人, *Antiviral Research*, 第 80 卷, 第 3 期, 2008 年 12 月, 第 360-369 页的预温育研究显示 MTase-AdoMet 和 MTase-RNA 复合物具有同样的催化能力并且所述酶支持随机的 bi bi 动力学机制。Lim 验证用竞争性抑制剂 S-腺苷-同型半胱氨酸及两个同系物西萘芬净和脱氢西萘芬净的测定。存在于 DENV2MTase 的 N 末端处的 GTP-结合袋先前被假定为帽结合位点。此测定允许快速且高灵敏度的检测 2'-O-MTase 活性并且可容易地适于抑制性化合物的高通量筛选。其适用于测定广泛多种 RNA 带帽 MTase 的酶促活性。

[0745] 此测定可用于就抗登革热活性对本文所述的化合物进行筛选。

[0746] 实施例 28

[0747] 抗诺瓦克病毒活性

[0748] 化合物可通过抑制诺瓦克病毒聚合酶和/或解旋酶, 通过抑制在复制周期中所需的其它酶或通过其它途径展现抗诺瓦克病毒活性。

[0749] 目前没有被批准用于诺瓦克病毒感染的药物治疗, 并且这大概至少部分是由于缺乏细胞培养系统的可用性。近来, 已经开发用于原始的诺瓦克 G-I 毒株的复制子系统 (Chang, K. O., 等人 (2006) *Virology* 353:463-473)。

[0750] 诺瓦克病毒复制子和丙型肝炎复制子都需要病毒解旋酶、蛋白酶和聚合酶的作用以便进行复制子的复制。最近, 已经报道利用诺瓦克病毒基因组 I 和 II 接种体的体外细胞培养传染性测定 (Straub, T. M. 等人 (2007) *Emerg. Infect. Dis.* 13(3):396-403)。此测定在利用在微载体珠上的小肠上皮细胞的旋转壁式生物反应器中进行。传染性测定可用于筛选进入抑制剂。

[0751] 实施例 29

[0752] 在 HepG2 细胞中核苷至活性三磷酸酯的磷酸化测定

[0753] 为了测定化合物的细胞代谢, HepG2 细胞可从美国典型培养物保藏中心 (Rockville, MD) 处获得, 并且在 225cm²组织培养烧瓶中在补充有非必需氨基酸、1% 青霉

素-链霉素的最低必需培养基中生长。培养基可每三天更新一次,并且细胞可每隔一周传代培养。在以暴露于 30mL 胰蛋白酶-EDTA 10 分钟分离贴壁单层且用培养基连续洗涤三次之后,汇合的 HepG2 细胞可以 2.5×10^6 个细胞/孔的密度接种于 6 孔板中并且暴露于 $10 \mu\text{M}$ [^3H] 标记的活性化合物 (500dpm/pmol) 达规定的时间段。

[0754] 细胞被维持在 37°C 和 5% CO_2 气氛下。在选定的时间点,将细胞用冰冷的磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 洗涤三次。

[0755] 细胞内活性化合物及其各自的代谢物是通过在 -20°C 下用 60% 甲醇温育细胞沉淀过夜来提取。然后将提取物合并,在轻柔过滤的空气流下干燥并储存于 -20°C 直到 HPLC 分析。

[0756] 实施例 30

[0757] 在猕猴中的生物利用率测定

[0758] 以下工序可用于确定化合物是否是生物学可利用的。在研究开始之前 1 周内,猕猴可用留置静脉导管和皮下静脉入口 (VAP) 通过手术植入以便于血液收集并且可经历体格检查,包括血液学和血清化学评价及体重记录。每个猴子 (总计六只) 经由静脉内快速浓注 (3 只猴子, IV) 或经由口服管饲法 (3 只猴子, PO) 接受大约 $250 \mu\text{Ci}$ 的 ^3H 活性,每个剂量的活性化合物在 10mg/kg 的剂量水平下在 5mg/mL 的剂量浓度下。在给药之前为每个给药注射器称重以通过重量分析法测定所施用制剂的量。经由在指定的间隔时间下 (给药前大约 18-0 小时、给药后 0-4、4-8 及 8-12 小时) 经由盘收集器收集尿样品并且处理。同样经由留置静脉导管和 VAP 或 (如果留置静脉导管工序不可能的话) 从外周血管收集血液样品 (给药前、给药后 0.25、0.5、1、2、3、6、8、12 及 24 小时)。分析血液和尿样品的最大浓度 (C_{max})、达到最大浓度时的时间 (T_{max})、曲线下面积 (AUC)、剂量浓度的半衰期 (TV)、清除率 (CL)、稳态容量和分布 (V_{ss}) 以及生物利用率 (F)。

[0759] 实施例 31

[0760] 细胞保护测定 (CPA)

[0761] 所述测定可基本上如以下文献所述来进行:Baginski, S. G.; Pevear, D. C.; Seipel, M.; Sun, S. C. C.; Benetatos, C. A.; Chunduru, S. K.; Rice, C. M. 及 M. S. Collett "Mechanism of action of a pestivirus antiviral compound" PNAS USA 2000, 97 (14), 7981-7986。在使用之前 24 小时将 MDBK 细胞 (ATCC) 接种于 96 孔培养板上 (每孔 4,000 个细胞)。在用 BVDV (毒株 NADL, ATCC) 在每细胞 0.02 噬斑形成单位 (PFU) 的感染复数 (MOI) 下感染之后,测试化合物的连续稀释液以在生长培养基中 0.5% DMSO 的最终浓度被添加至感染的和未感染的细胞中。每个稀释液一式四份地测试。细胞密度和病毒接种体被调节以确保整个实验中细胞的连续生长并在感染后 4 天之后实现在未处理的对照中超过 90% 病毒诱导的细胞破坏。4 天之后,将板用 50% TCA 固定并用磺酰罗丹明 B 染色。在 550nm 下在微板读取器中读取孔的光密度。

[0762] 50% 有效浓度 (EC_{50}) 值被定义为化合物实现病毒的细胞病变效应减少 50% 的浓度。

[0763] 实施例 32

[0764] 噬斑减少测定

[0765] 对于给定的化合物,有效浓度可通过噬斑减少测定在 24 孔板中一式两份来测定。

细胞单层用 100PFU/ 孔的病毒感染。然后,将测试化合物在补充有 2%灭活血清和 0.75%甲基纤维素的 MEM 中的连续稀释液添加至单层中。将培养物在 37℃下进一步温育 3 天,然后用 50%乙醇和 0.8%结晶紫固定,洗涤并风干。然后对噬斑进行计数以测定获得 90%病毒抑制的浓度。

[0766] 实施例 33

[0767] 产量减少测定

[0768] 对于给定的化合物,获得病毒载量的 6-log 减少的浓度可以通过产量减少测定在 24 孔板中一式两份进行测定。所述测定如以下文献所述来进行:Baginski, S. G. ; Pevear, D. C ;Seipel, M. ;Sun, S. C. C ;Benetatos, C. A. ;Chunduru, S. K. ;Rice, C. M. 及 M. S. Collett "Mechanism of action of a pestivirus antiviral compound"PNAS USA 2000, 97 (14), 7981-7986,其中有细微修改。

[0769] 简言之,在用 BVDV (NADL 毒株) 以 0.1PFU 每细胞的感染复数 (MOI) 感染之前 24 小时将 MDBK 细胞接种于 24 孔板 (2×10^5 个细胞 / 孔) 上。将测试化合物的连续稀释液以在生长培养基中 0.5% DMSO 的最终浓度添加至细胞中。每份稀释液一式三份测试。三天之后,将细胞培养物 (细胞单层和上清液) 通过三个冷冻-融化循环溶解,并且病毒产量通过噬斑测定来定量。简言之,在使用之前 24h 将 MDBK 细胞接种于 6 孔板 (5×10^5 个细胞 / 孔) 上。将细胞用 0.2mL 测试裂解物接种 1 小时,洗涤并且用在生长培养基中的 0.5% 琼脂糖覆盖。3 天之后,将细胞单层用 3.5% 甲醛固定并且用 1% 结晶紫 (在 50% 乙醇中的 w/v) 染色以目测检验噬斑。对噬斑进行计数以测定获得病毒载量的 6-log 减少的浓度。

[0770] 实施例 34

[0771] 诺瓦克病毒感染的诊断

[0772] 可以通过使用逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 测定检测受影响的人的粪便中的病毒 RNA 来诊断诺瓦克病毒感染。病毒可从在症状开始之后 48 至 72 时间内采集的粪便样本中鉴定,但也可使用 RT-PCR 对在症状开始之后长达 7 天时采集的样品获得令人满意的结果。其它诊断方法包括电子显微镜和血清学测定;至少三周时收集的双份血清中的滴度有升高。还可利用酶联免疫测定法,但它们倾向于具有相对较低的灵敏度,这限制了其对爆发的病因学诊断的使用。经常使用诺瓦克病毒感染的临床诊断,特别是当肠胃炎的其它病原体已被排除时。

[0773] 实施例 35

[0774] 体外抗病毒活性

[0775] 在下列细胞系中评估体外抗病毒活性:

[0776] 诺瓦克 G-I 毒株 (Chang, K. O., 等人 (2006) Virology 353:463-473)、GIT4 毒株复制子以及其它诺瓦克病毒复制子可用于测定本文所述的化合物或其它化合物或化合物文库的体外抗病毒活性的测定中。在一些实施方案中,复制子系统是亚基因组,且因此允许评价非结构蛋白质的小分子抑制剂。这可向诺瓦克病毒药物发现提供相同益处,丙型肝炎复制子有助于发现适用于治疗病毒的治疗剂 (Stuyver, L. J., 等人 (2006) Antimicrob. Agents Chemother. 47:244-254)。诺瓦克病毒复制子和丙型肝炎复制子都需要病毒解旋酶、蛋白酶和聚合酶的作用以便进行复制子的复制。据信本文所述的化合物抑制病毒聚合酶和 / 或病毒解旋酶。

[0777] 使用诺瓦克病毒基因组 I 和 II 接种体所报道的体外细胞培养传染性测定 (Straub, T. M. 等人 (2007) *Emerg. Infect. Dis.* 13(3):396-403) 也可以使用。此测定可在利用在微载体珠上的小肠上皮细胞的旋转壁式生物反应器中进行。感染性测定可用于就其抑制所需病毒的能力对化合物进行筛选。

[0778] 本申请中所鉴定的每一参考文献出于所有目的以引用的方式整体并入本文中。

[0779] 虽然出于说明的目的, 上述说明书通过实施例教导了本发明的原理, 但应当理解本发明的实施包括落入以下权利要求及其等价物的范围内的所有常用的变化、改变和 / 或修改。