



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118591377 A

(43) 申请公布日 2024. 09. 03

(21) 申请号 202380016345.3

(22) 申请日 2023.01.26

(30) 优先权数据

63/303,376 2022.01.26 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.07.05

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2023/011639 2023.01.26

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/146974 EN 2023.08.03

(71) 申请人 加利福尼亚大学董事会

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 K·Y·霍斯泰特勒 J·比德尔

N·瓦利亚爱娃 R·T·斯库利

(74) 专利代理机构 北京世峰知识产权代理有限公司

公司 11713

专利代理师 王建秀 刘小立

(51) Int.Cl.

A61K 31/7052 (2006.01)

A61K 31/7076 (2006.01)

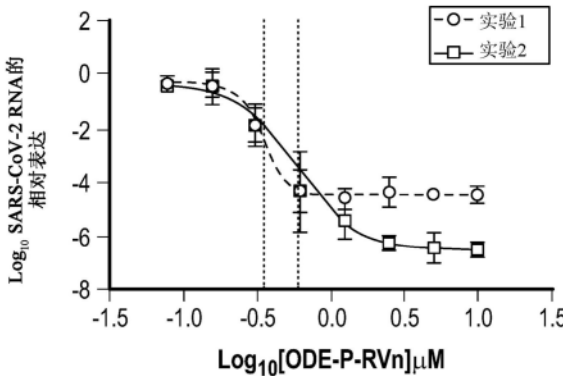
权利要求书19页 说明书92页 附图20页

(54) 发明名称

抗病毒前药、中效和长效制剂和方法

(57) 摘要

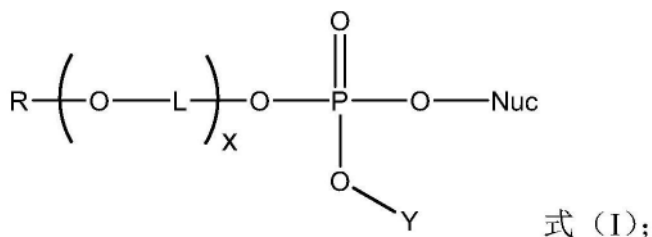
化合物和包括化合物和油的药物制剂,其可被配制用于中效或长效肌内注射。用于治疗哺乳动物中呼吸道合胞病毒(RSV)、人类免疫缺陷病毒(HIV)、冠状病毒、SARS CoV-2和其他RNA病毒感染的方法。



1. 一种药物制剂,其包含:

(i) 油,和

(ii) 式 (I) 的化合物或其药学上可接受的盐;



其中

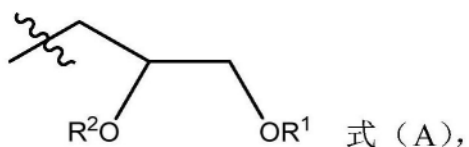
Nuc选自由以下组成的群组:抗病毒核苷和抗病毒核苷类似物;

Y独立地选自由以下组成的群组:氢、 C_1 - C_{30} 烃基、药学上可接受的阳离子和与所述抗病毒核苷或所述抗病毒核苷类似物的五碳糖部分的碳原子的共价键;

x为0或1;

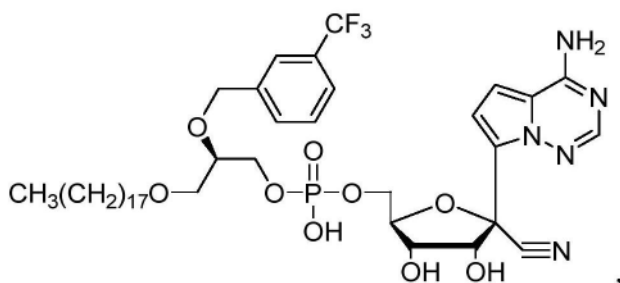
L独立地是 C_1 - C_{30} 烃基;并且

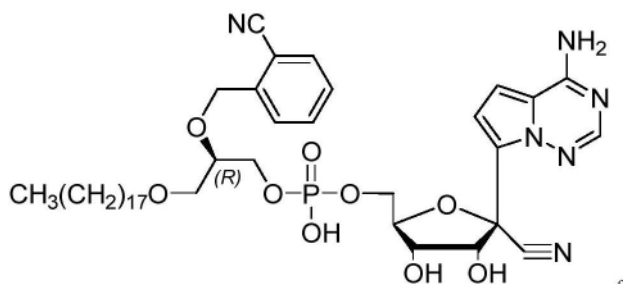
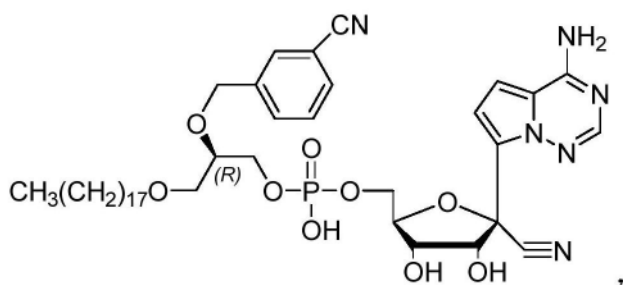
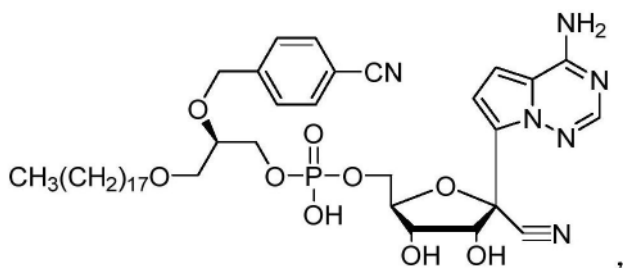
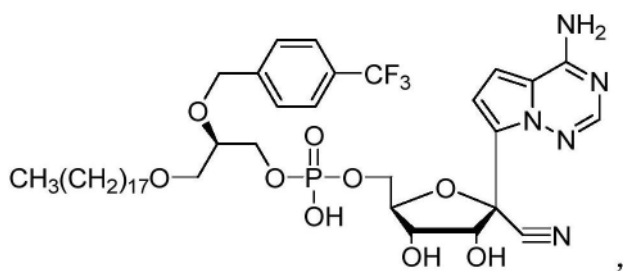
R独立地选自由以下组成的群组: C_{10} - C_{30} 烃基和式 (A) 的取代基;



其中 R^1 和 R^2 独立地选自由以下组成的群组:氢和 C_1 - C_{30} 烃基。

2. 根据权利要求1所述的药物制剂,其中所述式 (I) 的化合物是以下化合物中的一种或其药学上可接受的盐:

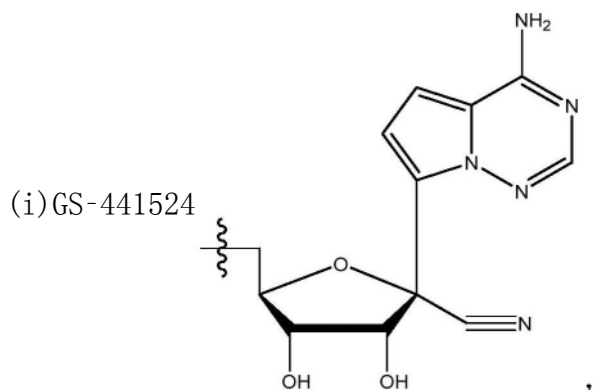


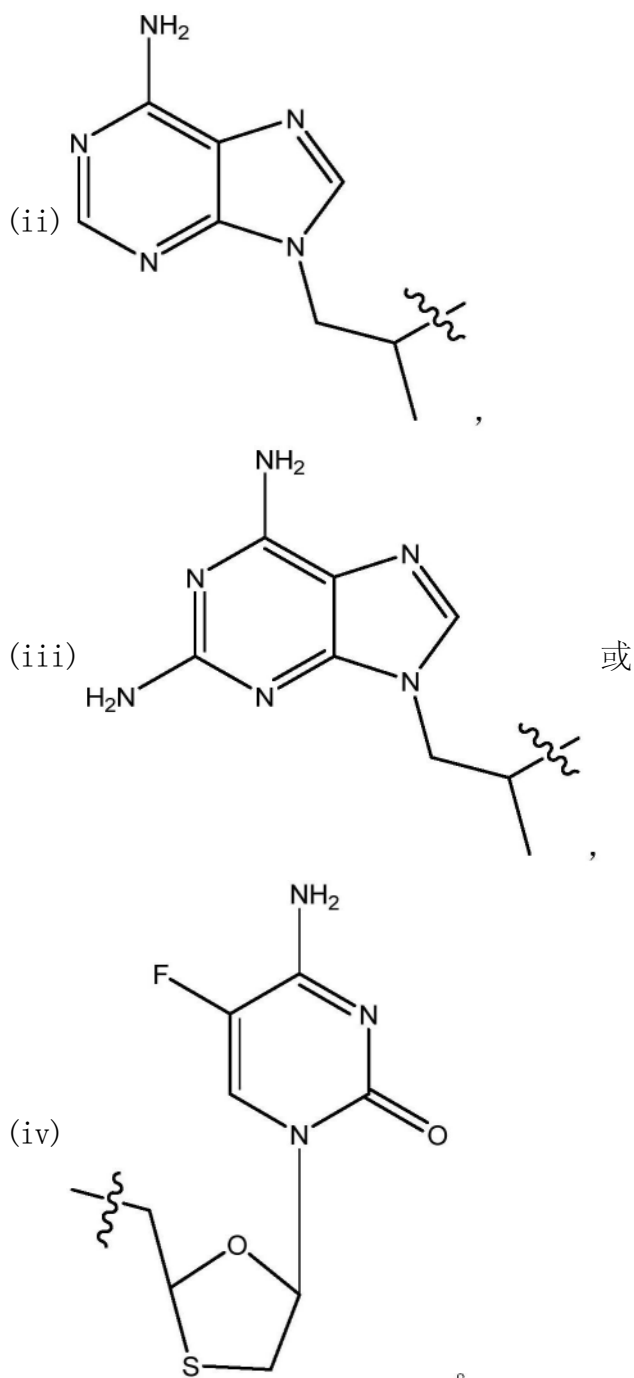


3. 根据权利要求1所述的药物制剂,其中所述抗病毒核苷或所述抗病毒核苷类似物分别是抗病毒核糖核苷或抗病毒核糖核苷类似物。

4. 根据权利要求1所述的药物制剂,其中Nuc选自由以下组成的群组:GS-441524、 β -D-N⁴-羟基胞苷(NHC)和(2'R)-2-氨基-2'-脱氧-2'-氟-N,2'-二甲基腺苷(AT-527)。

5. 根据权利要求1所述的药物制剂,其中Nuc是:





6. 根据权利要求1所述的药物制剂, 其中Y是 (i) 未取代的 C_1-C_6 烷基, (ii) Na^+ , 或 (iii) 与所述五碳糖部分的3'-碳的共价键。

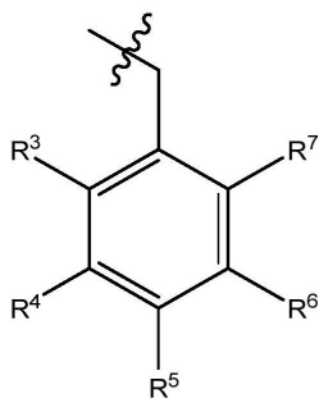
7. 根据权利要求1所述的药物制剂, 其中Y包含至少一个环状部分。

8. 根据权利要求7所述的药物制剂, 其中Y选自由以下组成的群组: 芳基、芳基烷基、杂芳基、杂芳基烷基和杂环烷基, 它们中的每一者是未取代或取代的。

9. 根据权利要求8所述的药物制剂, 其中所述杂芳基是未取代或取代的吡啶基。

10. 根据权利要求8所述的药物制剂, 其中所述芳基烷基是未取代或取代的苄基。

11. 根据权利要求10所述的药物制剂, 其中所述未取代或取代的苄基具有根据式 (B) 的结构:



式 (B),

其中 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 和 R^7 独立地选自由以下组成的群组：氢、烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、芳基、杂芳基、杂环基、芳基(烷基)、杂芳基(烷基)、(杂环基)

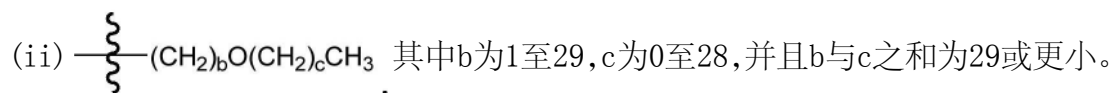
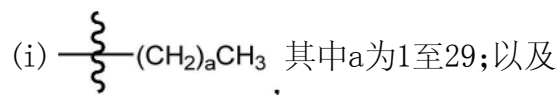
烷基、羟基、烷氧基、酰基、氰基、卤素、硫羰基、O-氨基甲酰基、N-氨基甲酰基、O-硫代氨基甲酰基、N-硫代氨基甲酰基、C-酰氨基、N-酰氨基、S-磺酰氨基、N-磺酰氨基、C-羧基、O-羧基、异氰酸基、硫代氰酸基、异硫氰基、硝基、叠氮基、甲硅烷基、亚氧硫基、亚硫酰基、磺酰基、卤代烷基、卤代烷氧基、三卤代甲烷磺酰基、三卤代甲磺酰氨基、氨基、单取代的氨基和二取代的氨基。

12. 根据权利要求11所述的药物制剂, 其中 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 和 R^7 中的至少两个是氢。

13. 根据权利要求1所述的药物制剂, 其中R: (i) 是未取代或取代的 C_{12} - C_{24} 烃基, (ii) 包含0至6个不饱和键, (iii) 包含环丙基部分, 或(iv) 其组合。

14. 根据权利要求1所述的药物制剂, 其中R: (i) 是未取代或取代的 C_{13} - C_{29} 杂烷基, (ii) 包含0至6个不饱和键, 或(iii) 其组合。

15. 根据权利要求1所述的药物制剂, 其中R选自由以下组成的群组:



16. 根据权利要求15所述的药物制剂, 其中(i) a为15至25, 或者(ii) b为1至4并且c为15至20。

17. 根据权利要求15所述的药物制剂, 其中(i) a为19, (ii) b为3并且c为15, 或者(iii) b为2并且c为17。

18. 根据权利要求15所述的药物制剂, 其中a为8。

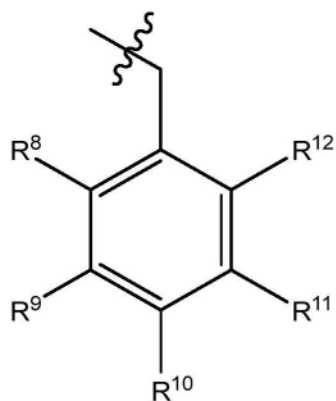
19. 根据权利要求1所述的药物制剂, 其中 R^1 : (i) 是未取代或取代的 C_{12} - C_{24} 烃基, (ii) 包含0至6个不饱和键, 或(iii) 其组合。

20. 根据权利要求1所述的药物制剂, 其中(i) R^1 、(ii) R^2 或者(iii) R^1 和 R^2 两者独立地选自包含至少一个环状部分的 C_1 - C_{30} 烃基。

21. 根据权利要求20所述的药物制剂, 其中(i) R^1 、(ii) R^2 或者(iii) R^1 和 R^2 两者独立地选自自由以下组成的群组: 芳基、芳基烷基、杂芳基、杂芳基烷基和杂环烷基, 它们中的每一者是未取代或取代的。

22. 根据权利要求21所述的药物制剂,其中所述芳基烷基是未取代或取代的苄基。

23. 根据权利要求22所述的药物制剂,其中所述未取代或取代的苄基具有根据式(C)的结构:



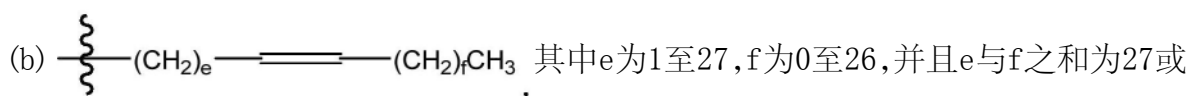
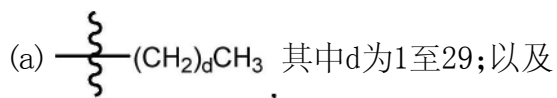
其中 R^8 、 R^9 、 R^{10} 、 R^{11} 和 R^{12} 独立地选自由以下组成的群组:氢、烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、芳基、杂芳基、杂环基、芳基(烷基)、杂芳基(烷基)、(杂环基)烷基、羟基、烷氧基、酰基、氰基、卤素、硫羰基、O-氨基甲酰基、N-氨基甲酰基、O-硫代氨基甲酰基、N-硫代氨基甲酰基、C-酰氨基、N-酰氨基、S-磺酰氨基、N-磺酰氨基、C-羧基、O-羧基、异氰酸基、硫代氰酸基、异硫氰基、硝基、叠氮基、甲硅烷基、亚氧硫基、亚硫酰基、磺酰基、卤代烷基、卤代烷氧基、三卤代甲烷磺酰基、三卤代甲磺酰氨基、氨基、单取代的氨基和二取代的氨基。

24. 根据权利要求23所述的药物制剂,其中 R^8 、 R^9 、 R^{10} 、 R^{11} 和 R^{12} 中的至少两个是氢。

25. 根据权利要求1所述的药物制剂,其中所述式(A)的取代基是外消旋体、sn-1立体异构体或sn-3立体异构体。

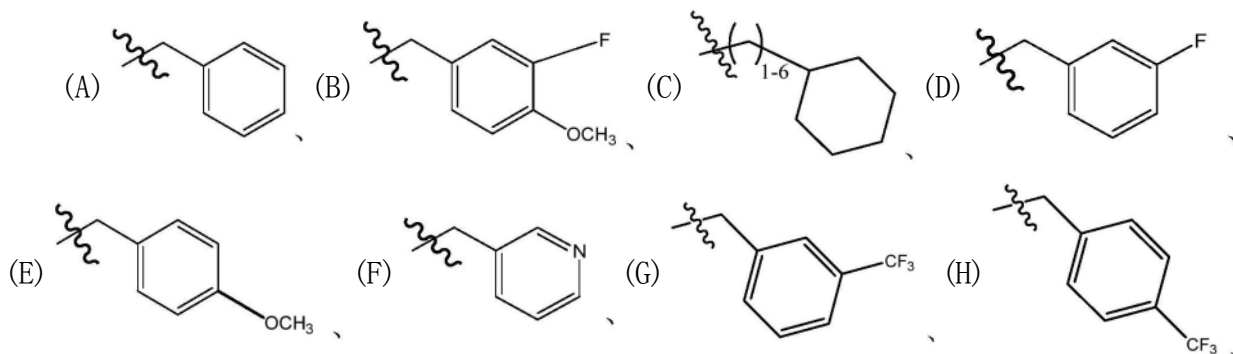
26. 根据权利要求1所述的药物制剂,其中:

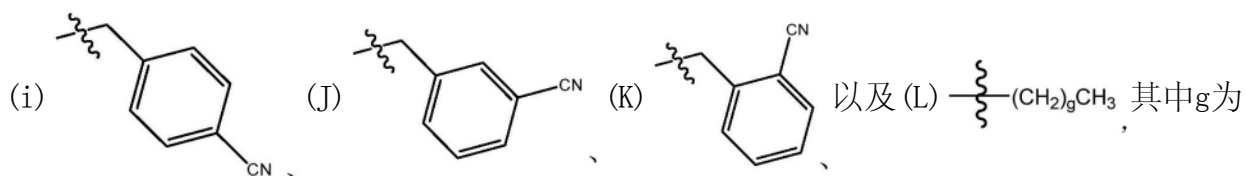
(i) R^1 选自由以下组成的群组:



更小;

(ii) R^2 选自由以下组成的群组:





1至29;或者

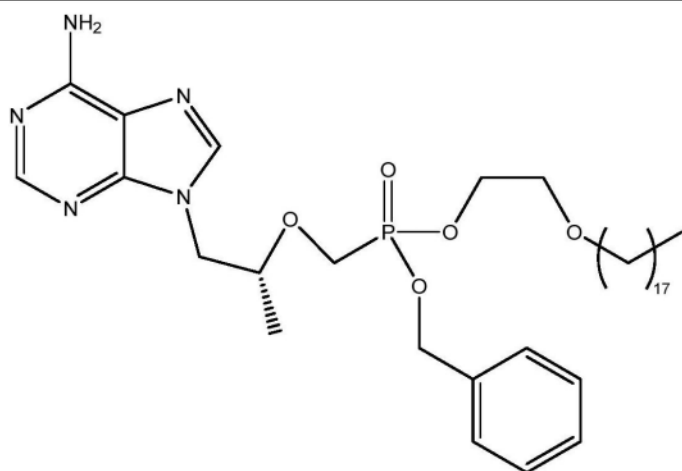
(iii) 其组合。

27. 根据权利要求26所述的药物制剂, 其中g为5至10。

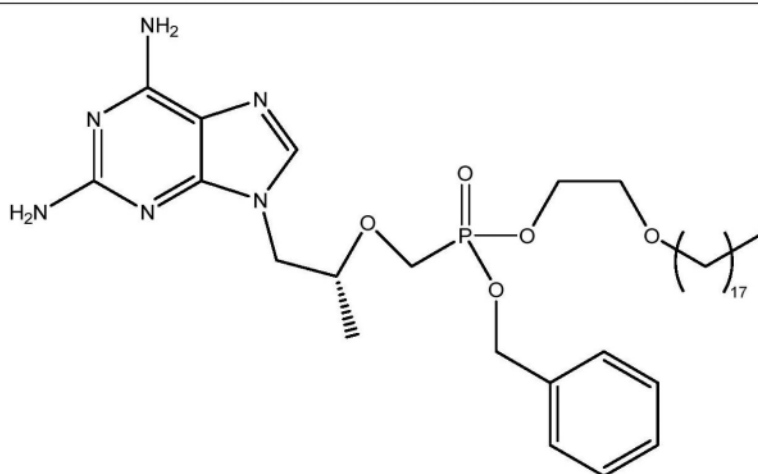
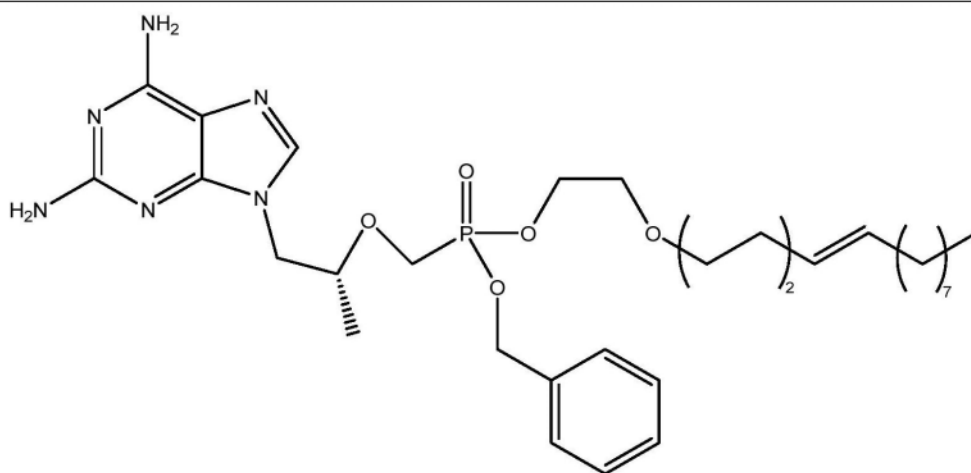
28. 根据权利要求1所述的药物制剂, 其中x为1, 并且L为未取代或取代的C₁-C₃烷基。

29. 根据权利要求28所述的药物制剂, 其中L选自由以下组成的群组: 未取代的甲基、未取代的乙基和未取代的丙基。

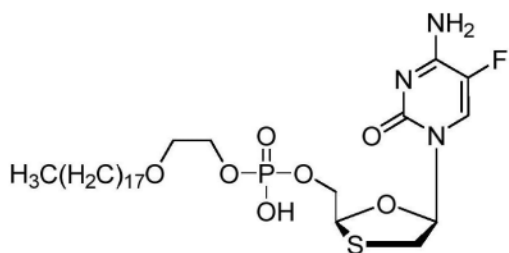
30. 根据权利要求1所述的药物制剂, 其中所述式(I)的化合物包含以下化合物中的至少一种或其药学上可接受的盐:



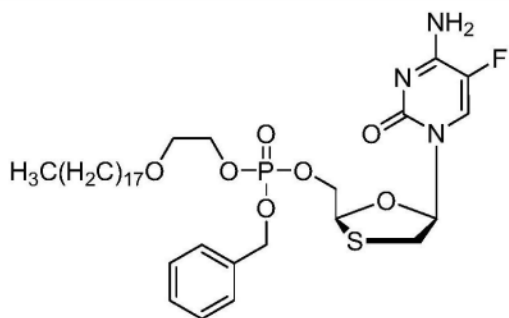
十八烷氧基乙基苄基替诺福韦 (ODE-Bn-TFV)

十八烷氧基乙基苄基 9-(*R*)-[(2-磷酸基甲氧基)丙基]-2,6-二氨基嘌呤 (ODE-Bn-PMPDAP)

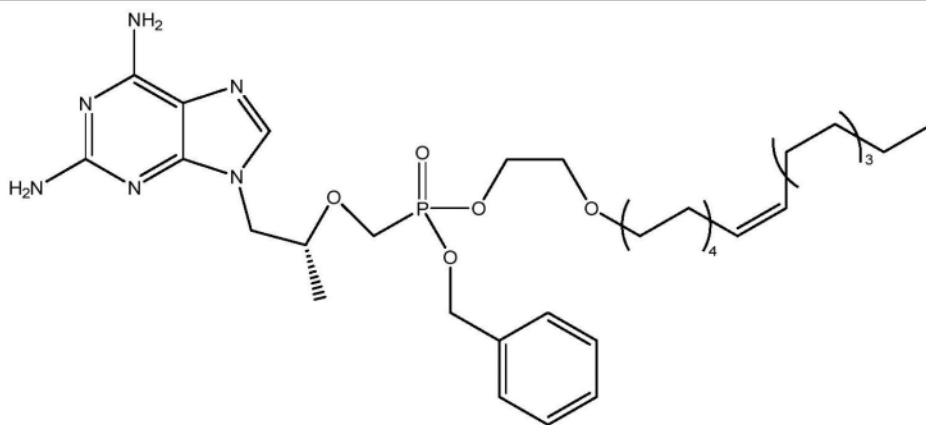
油氧乙基苄基 9-(*R*)-[2-膦酰基甲氧基]丙基]-2,6-二氨基嘌呤(OLE-Bn-PMPDAP)



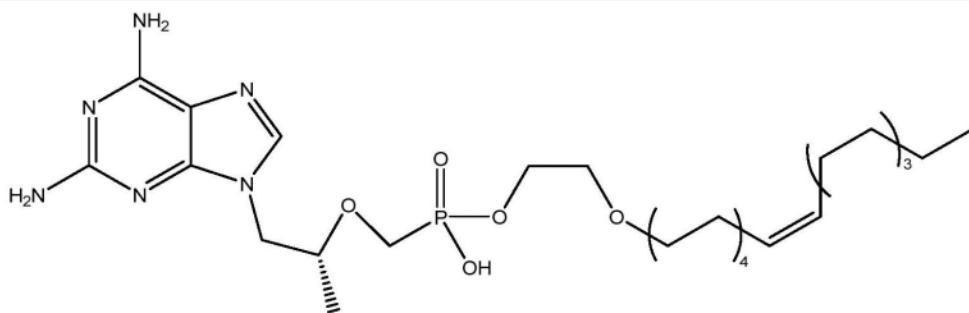
十八烷氧基乙基-磷酸基-恩曲他滨 (ODE-P-FTC)



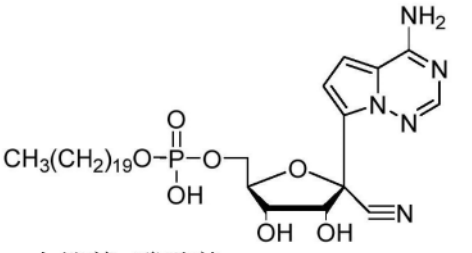
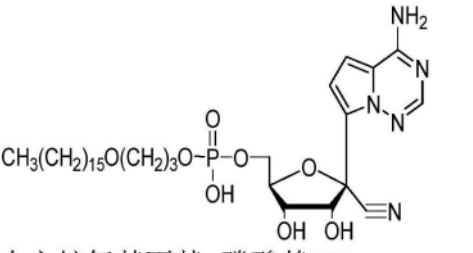
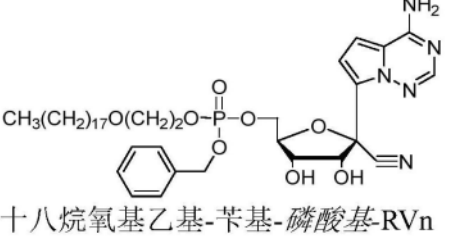
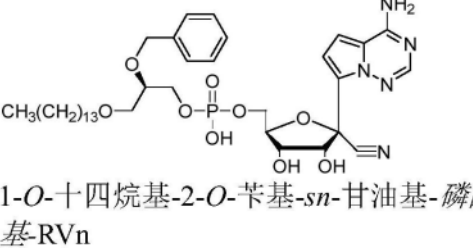
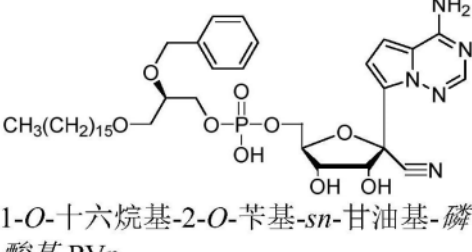
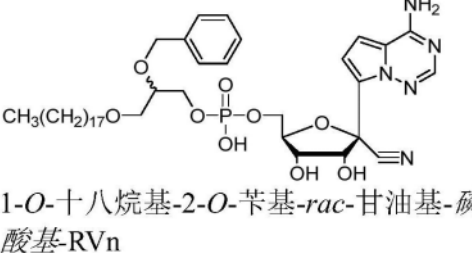
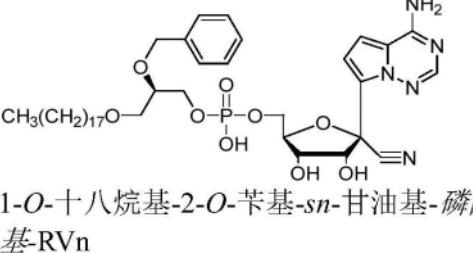
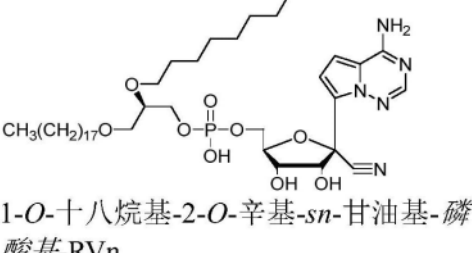
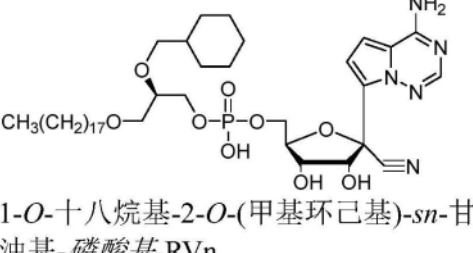
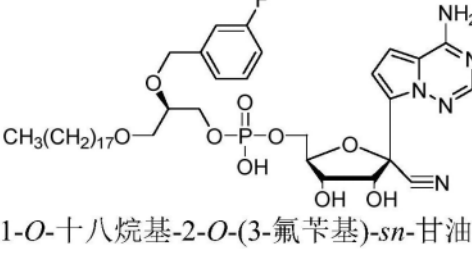
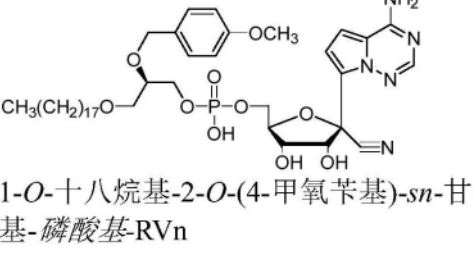
十八烷氧基乙基苄基-磷酸基-恩曲他滨 (ODE-Bn-P-FTC)

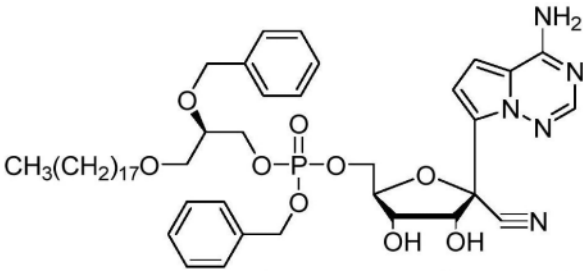
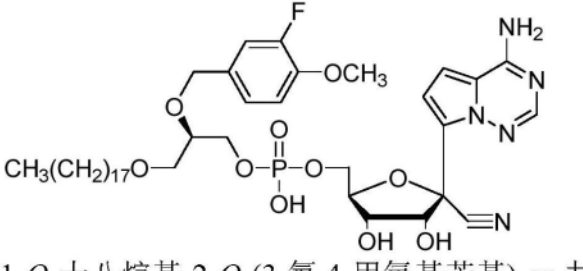
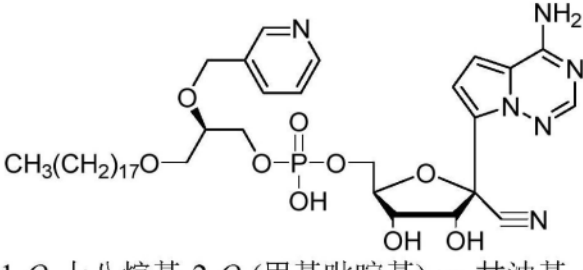
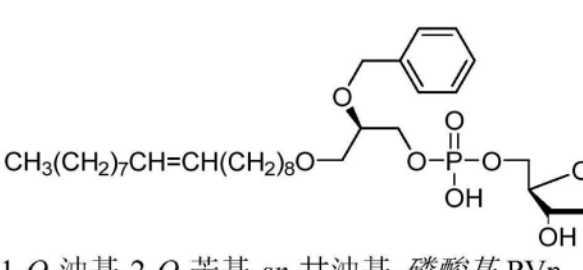
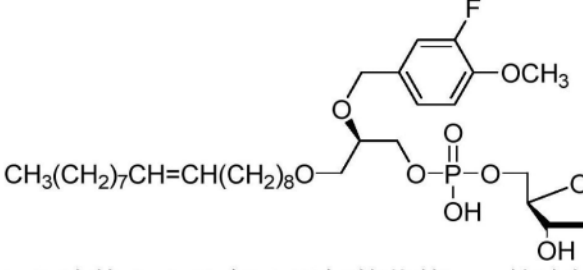


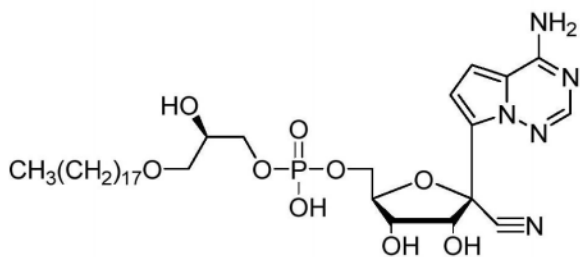
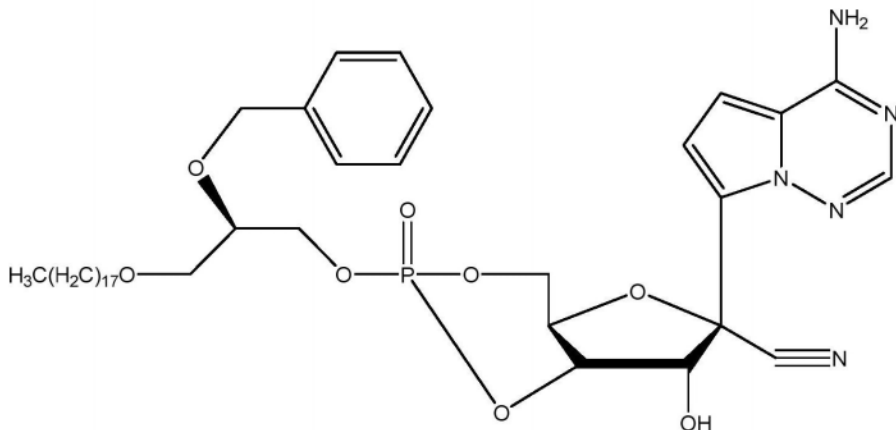
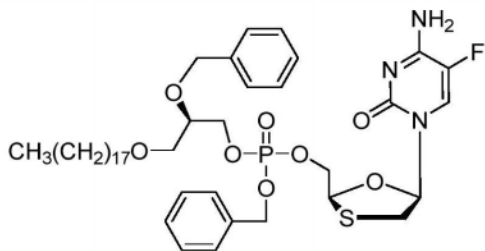
油氧乙基苄基 9-(*R*)-[2-膦酰基-甲氧基]丙基]-2,6-二氨基嘌呤(OLE-Bn-PMPDAP)



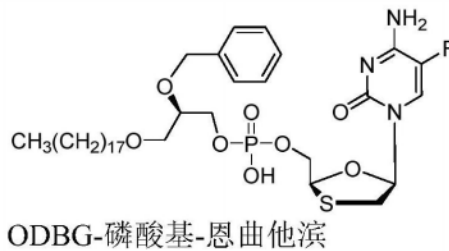
油氧乙基 9-(*R*)-[2-膦酰基甲氧基]丙基]-2,6-二氨基嘌呤 (OLE-(*R*)-PMPDAP)

 二十烷基-磷酸基-RVn	 十六烷氧基丙基-磷酸基-RVn
 十八烷氧基乙基-苄基-磷酸基-RVn	 1-O-十四烷基-2-O-苄基-<i>sn</i>-甘油基-磷酸基-RVn
 1-O-十六烷基-2-O-苄基-<i>sn</i>-甘油基-磷酸基-RVn	 1-O-十六烷基-2-O-(3-氟,4-甲氧基苄基)-<i>sn</i>-甘油基-磷酸基-RVn
 1-O-十八烷基-2-O-苄基-<i>rac</i>-甘油基-磷酸基-RVn	 1-O-十八烷基-2-O-苄基-<i>sn</i>-甘油基-磷酸基-RVn
 1-O-十八烷基-2-O-辛基-<i>sn</i>-甘油基-磷酸基-RVn	 1-O-十八烷基-2-O-(甲基环己基)-<i>sn</i>-甘油基-磷酸基-RVn
 1-O-十八烷基-2-O-(3-氟苄基)-<i>sn</i>-甘油基-磷酸基-RVn	 1-O-十八烷基-2-O-(4-甲氧基苄基)-<i>sn</i>-甘油基-磷酸基-RVn

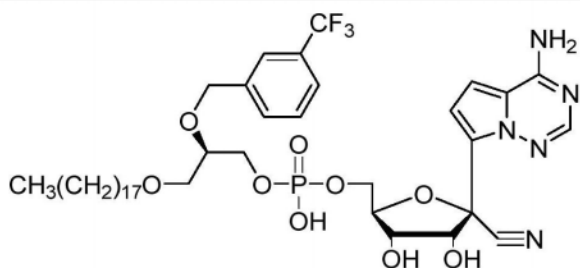
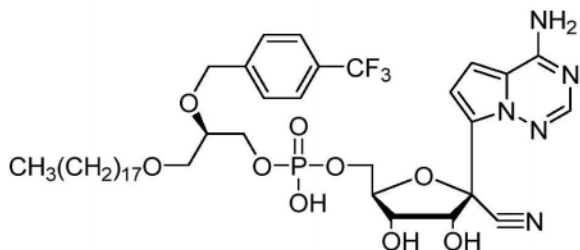
基-磷酸基-RVn	
 1-O-十八烷基-2-O-苄基-2'-脱氧-2'-氟腺苷-5'-磷酸基-RVn	
 1-O-十八烷基-2-O-(3-氟,4-甲氧基苄基)-2'-脱氧-2'-氟腺苷-5'-磷酸基-RVn	
 1-O-十八烷基-2-O-(4-吡啶基)-2'-脱氧-2'-氟腺苷-5'-磷酸基-RVn	
 1-O-十八烷基-2-O-苄基-2'-脱氧-2'-氟腺苷-5'-磷酸基-RVn	
 1-O-十八烷基-2-O-(3-氟,4-甲氧基苄基)-2'-脱氧-2'-氟腺苷-5'-磷酸基-RVn	

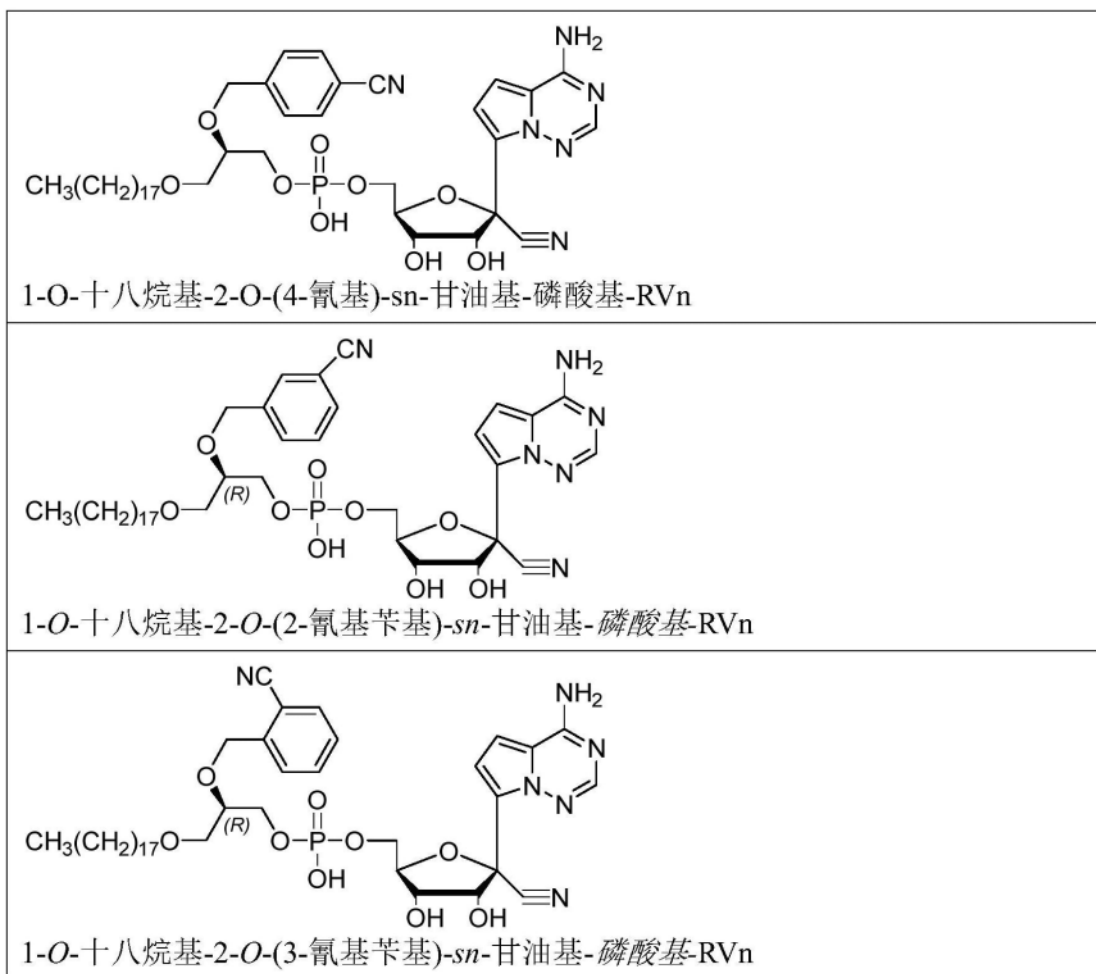
1-*O*-十八烷基-*sn*-甘油基-磷酸基-RVnGS-441524-3',5'-环状一磷酸酯, 1-*O*-十八烷基-2-*O*-苄基-*sn*-甘油酯

ODBG-苄基-磷酸基-恩曲他滨

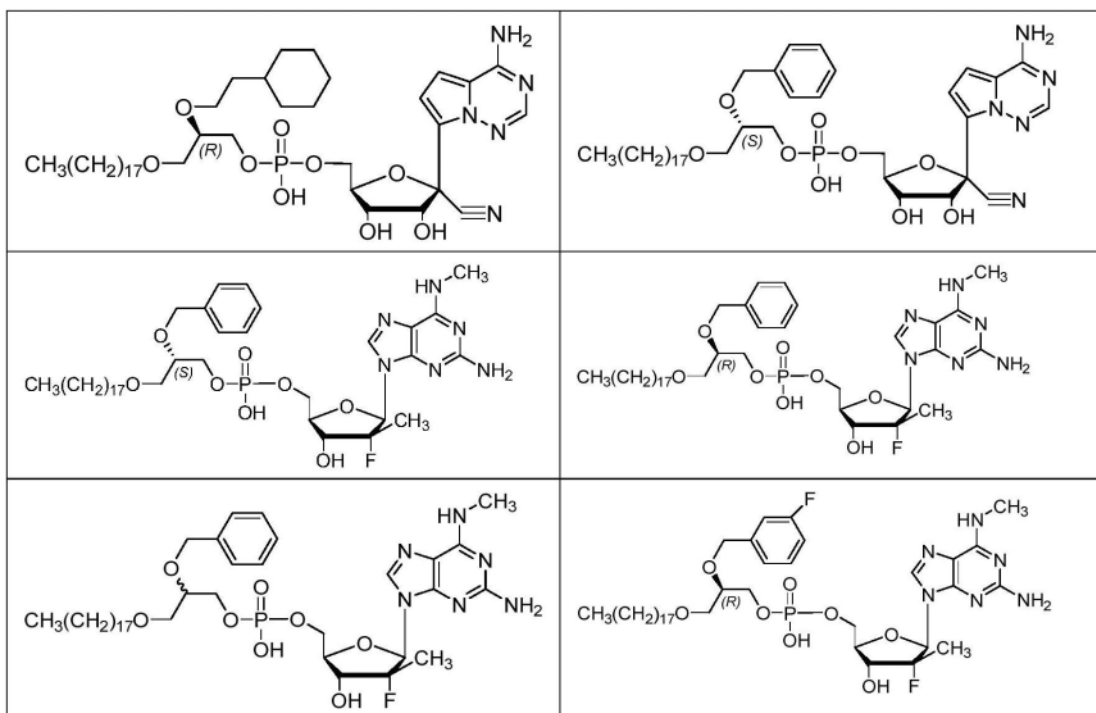


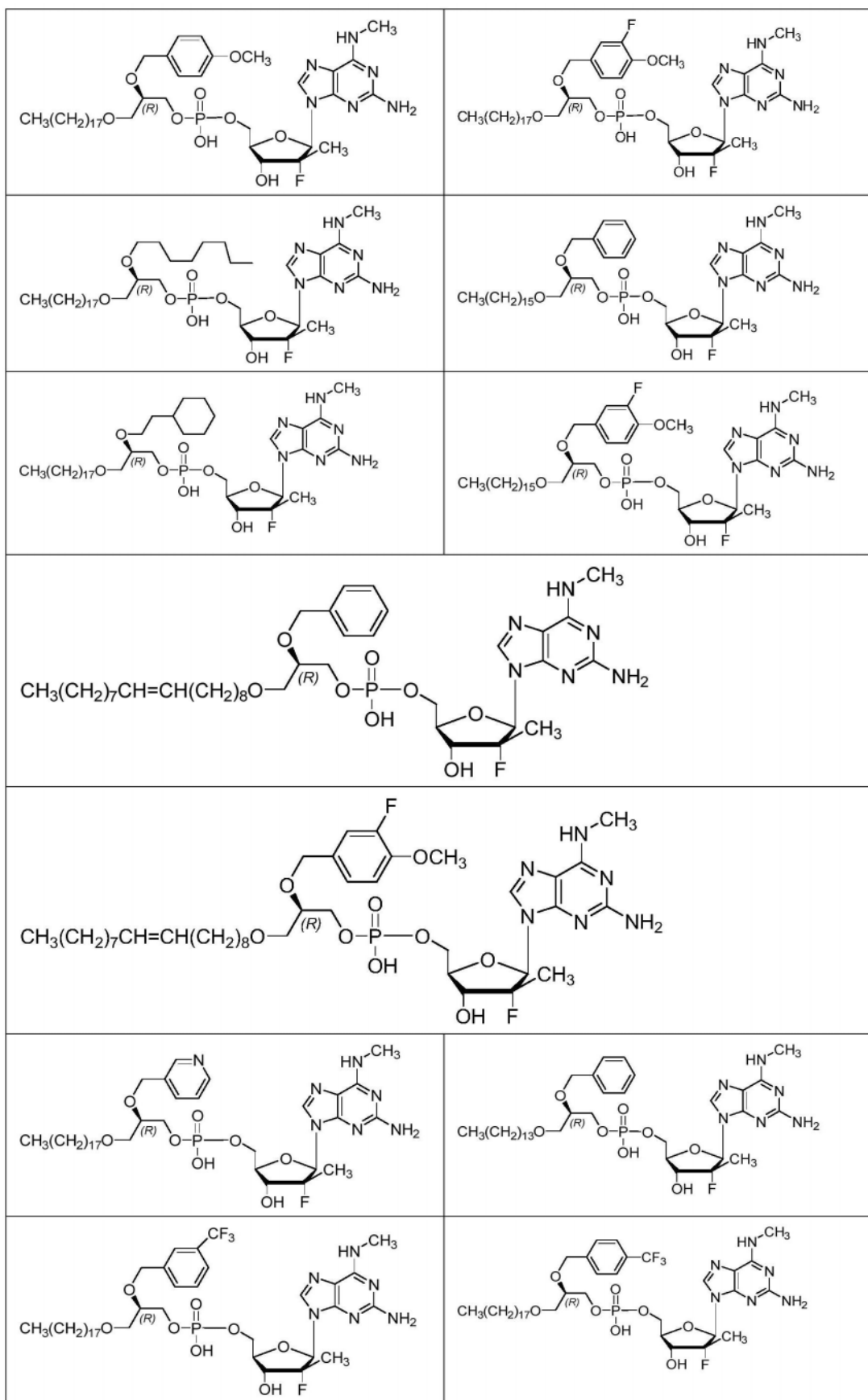
ODBG-磷酸基-恩曲他滨

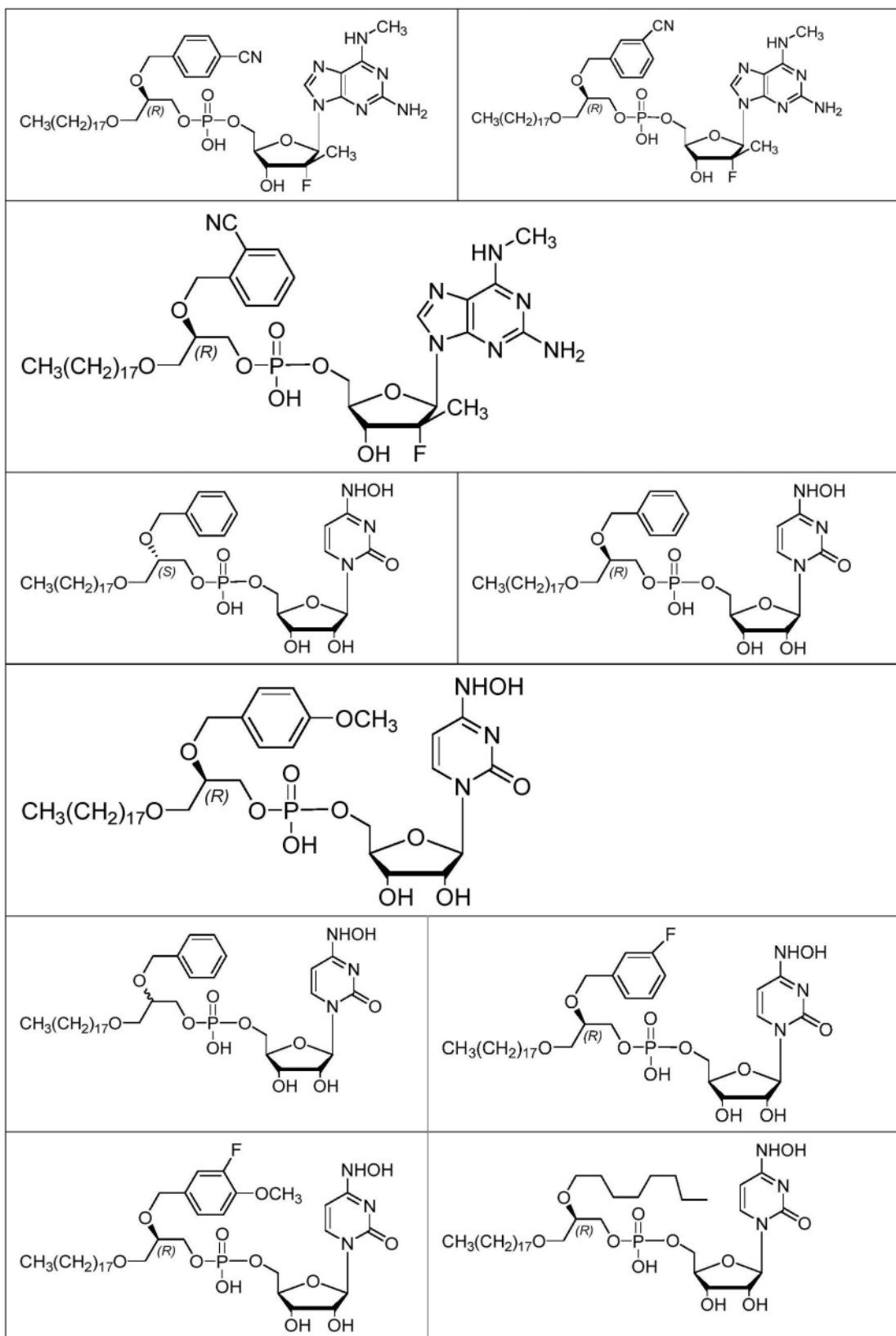
1-*O*-十八烷基-2-*O*-(3-三氟甲基)-*sn*-甘油基-磷酸基-RVn1-*O*-十八烷基-2-*O*-(4-三氟甲基)-*sn*-甘油基-磷酸基-RVn

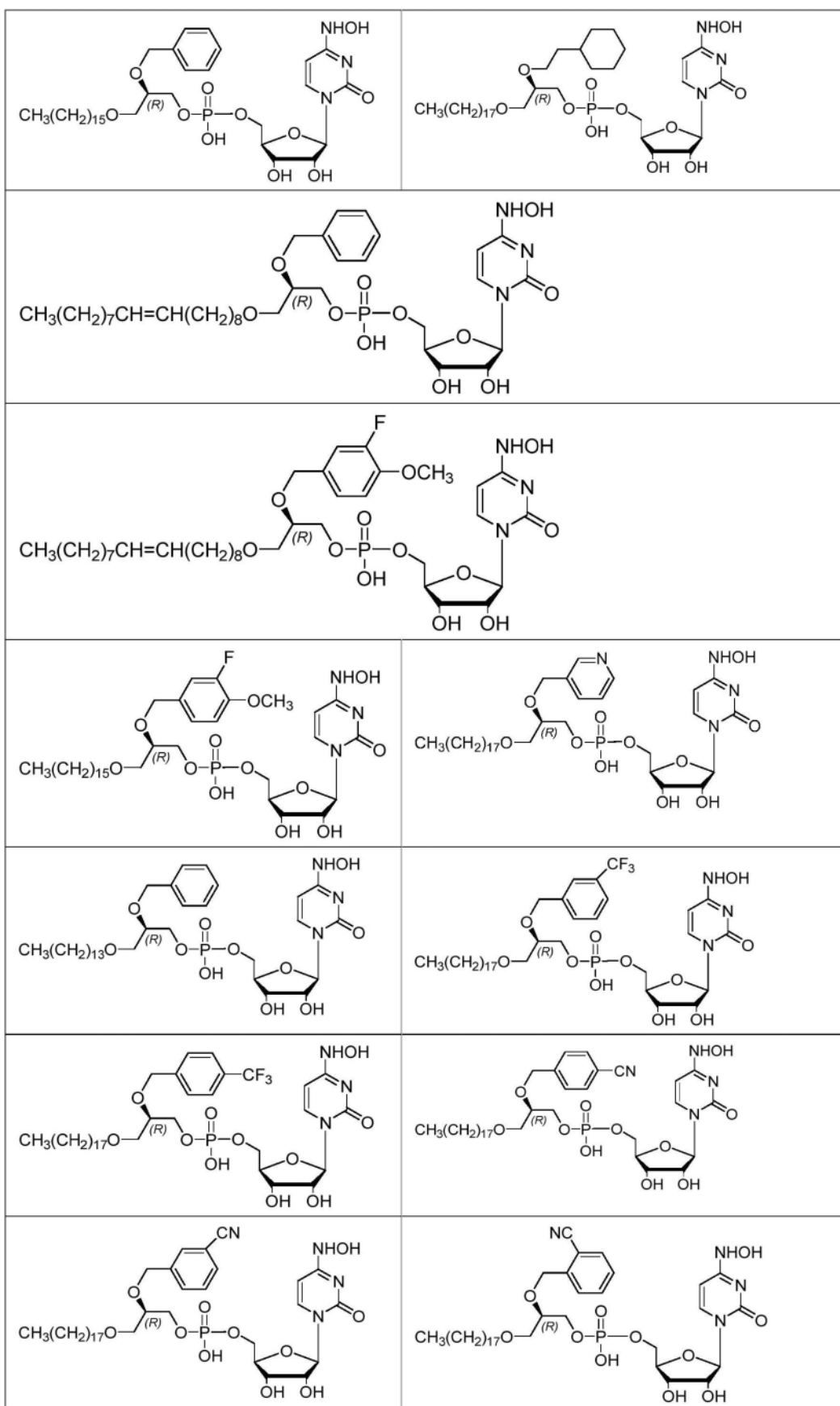


31. 根据权利要求1所述的药物制剂,其中所述式(I)的化合物包含以下化合物中的至少一种或其药学上可接受的盐:









32. 根据权利要求1所述的药物制剂,其中所述油选自由以下组成的群组:芝麻油、中链甘油三酯及其组合。

33. 根据权利要求32所述的药物制剂, 其中所述药物制剂还包含苯甲醇、苯甲酸苄酯、乙醇或其组合。

34. 根据权利要求1所述的药物制剂, 其中所述油以按所述药物制剂的重量计约60重量%至约95重量%的量存在于所述药物制剂中。

35. 根据权利要求1所述的药物制剂, 其中所述油以按所述药物制剂的重量计约65重量%至约95重量%的量存在于所述药物制剂中。

36. 根据权利要求1所述的药物制剂, 其中所述油以按所述药物制剂的重量计约70重量%至约95重量%的量存在于所述药物制剂中。

37. 根据权利要求1所述的药物制剂, 其中所述药物制剂被配制用于肌肉注射或皮下注射。

38. 一种用于治疗哺乳动物中冠状病毒感染的方法, 所述方法包含:

向所述哺乳动物施用有效量的根据权利要求1至37中任一项所述的药物制剂。

39. 根据权利要求38所述的方法, 其中所述药物制剂的所述有效量以单次剂量施用。

40. 根据权利要求38所述的方法, 如本文所述, 其中所述药物制剂包含制剂F8或制剂F7。

41. 一种用于治疗哺乳动物中HIV感染的方法, 所述方法包含:

向所述哺乳动物施用有效量的根据权利要求1至37中任一项所述的药物制剂。

42. 根据权利要求41所述的方法, 其中所述药物制剂是长效治疗。

43. 根据权利要求41所述的方法, 如本文所述, 其中所述药物制剂包含制剂F3或制剂F4。

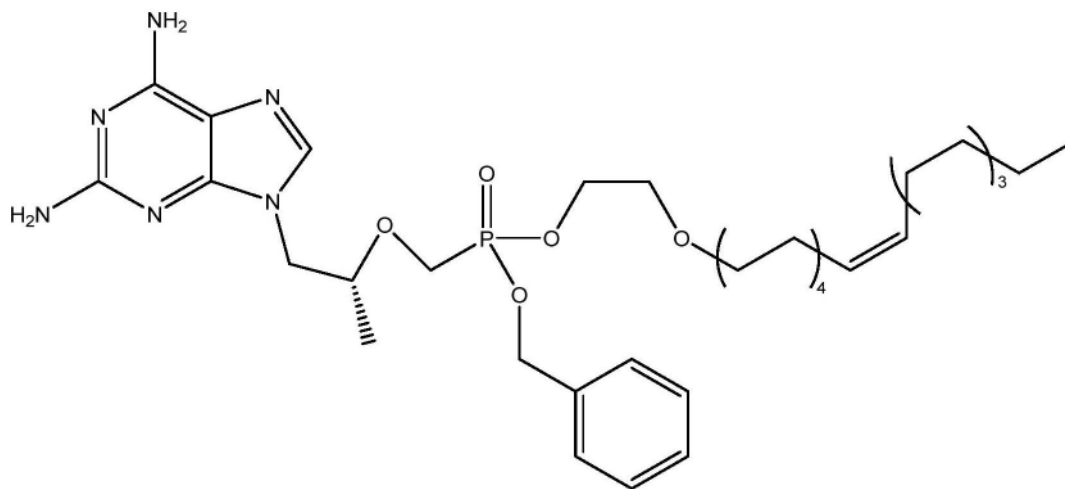
44. 一种用于治疗和/或抑制哺乳动物中呼吸道合胞病毒(RSV)复制的方法, 所述方法包含:

向所述哺乳动物施用有效量的根据权利要求1至37中任一项所述的药物制剂。

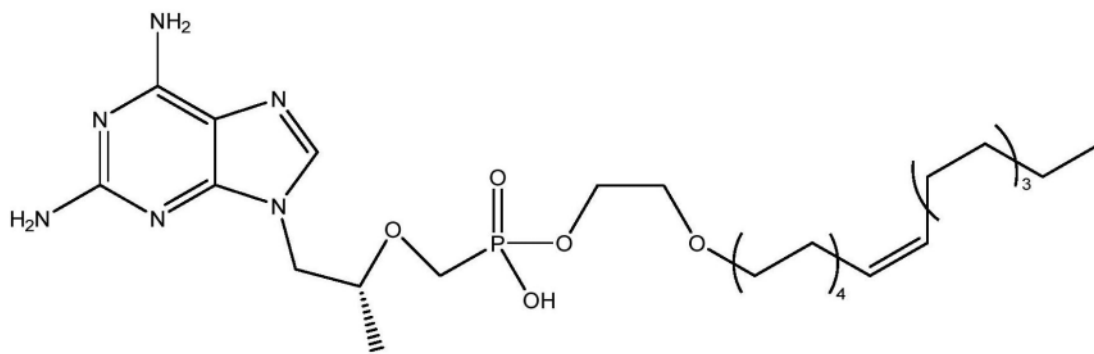
45. 一种用于治疗哺乳动物中病毒感染的方法, 所述方法包含:

向所述哺乳动物施用有效量的根据权利要求1至37中任一项所述的药物制剂, 其中所述病毒是选自由以下组成的群组中的病毒科的RNA病毒: 丝状病毒科、正粘病毒科、副粘病毒科、肺病毒科、白纤病毒科、内罗病毒科、沙粒病毒科、黄病毒科和冠状病毒科。

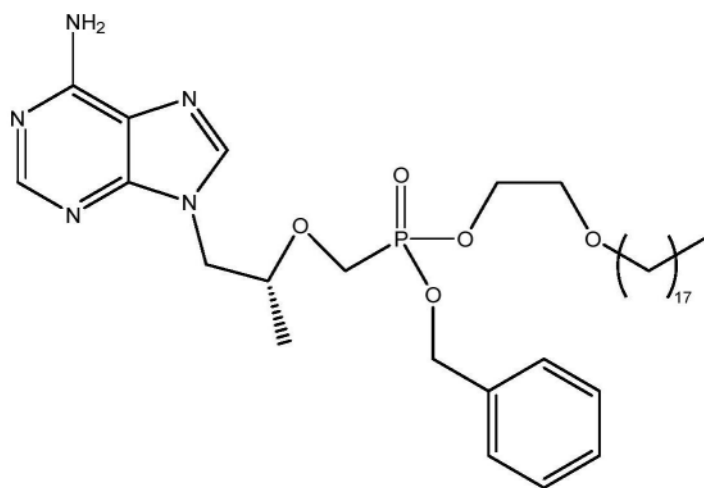
46. 一种具有以下结构的化合物或其药学上可接受的盐:

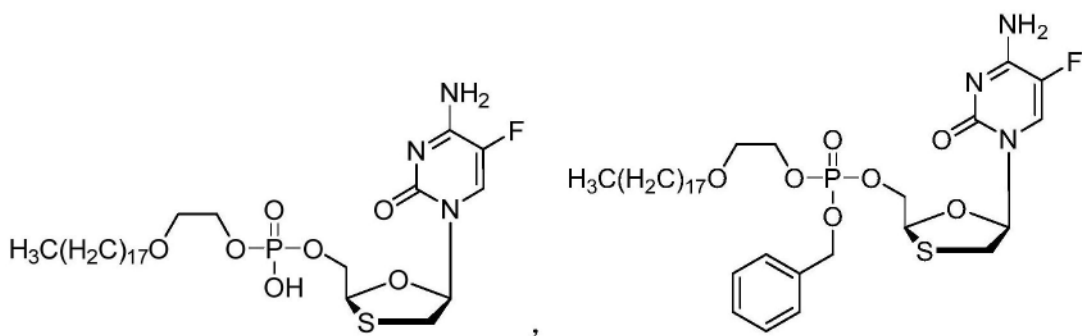
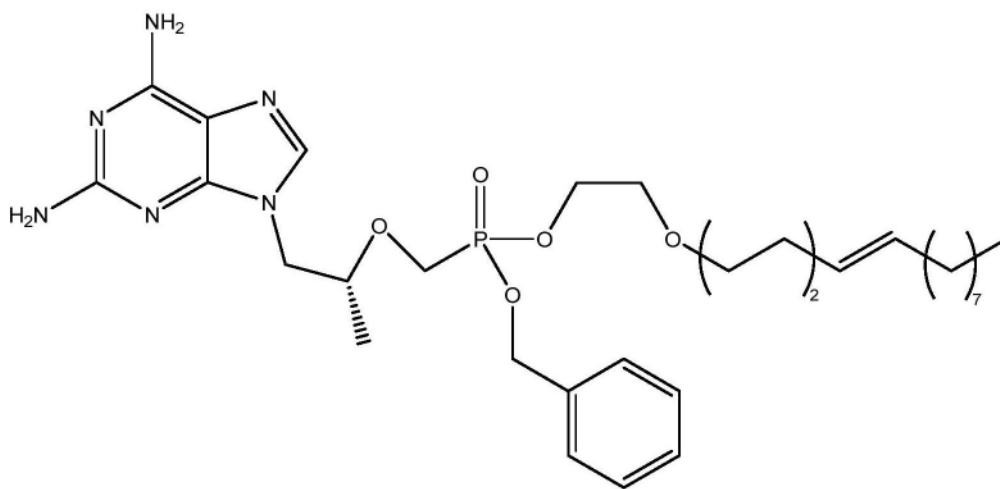
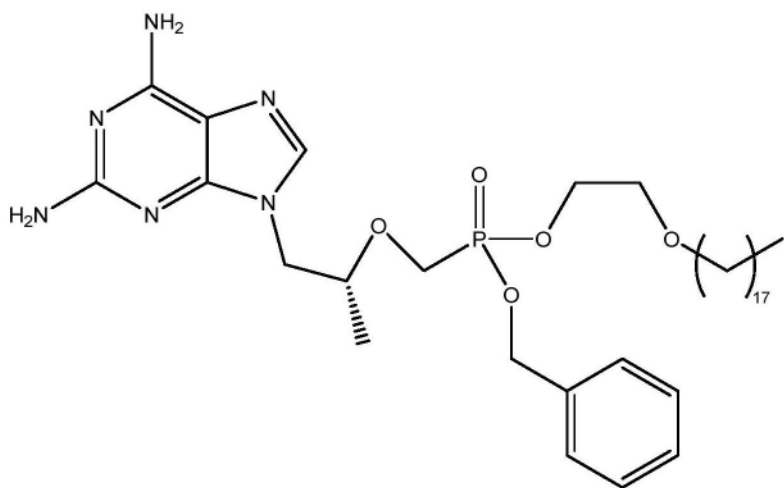


47. 一种具有以下结构的化合物或其药学上可接受的盐：

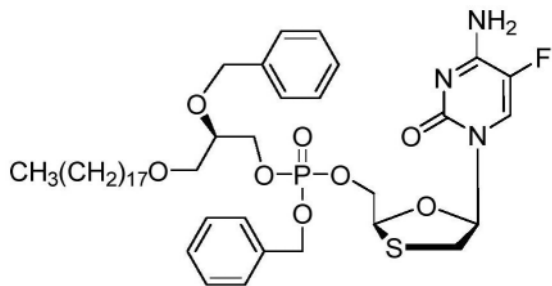


48. 一种具有以下结构中的一种的化合物或其药学上可接受的盐：

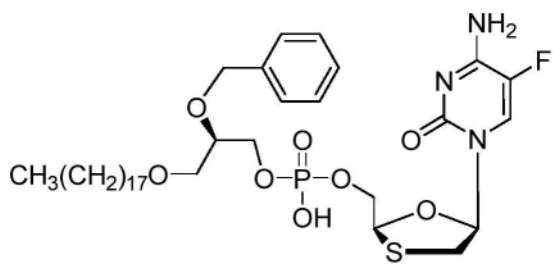




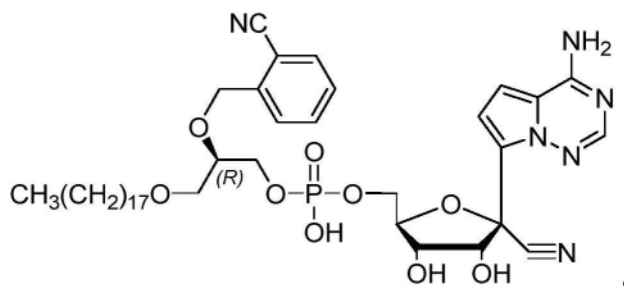
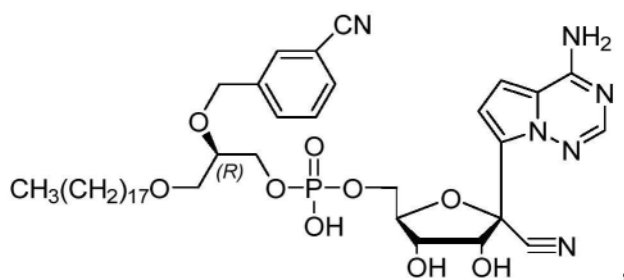
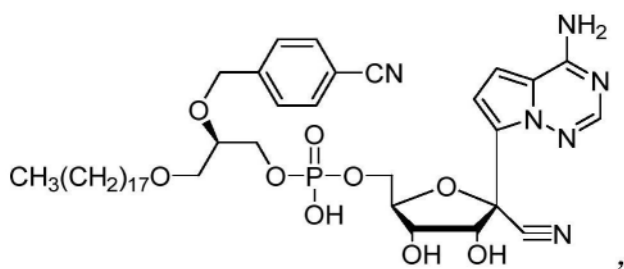
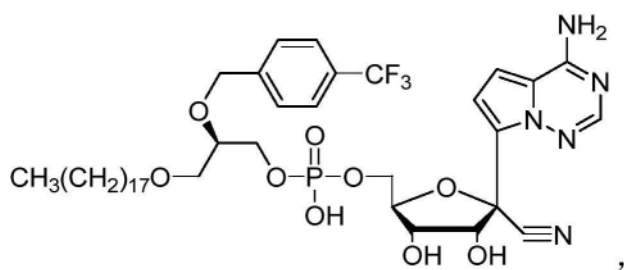
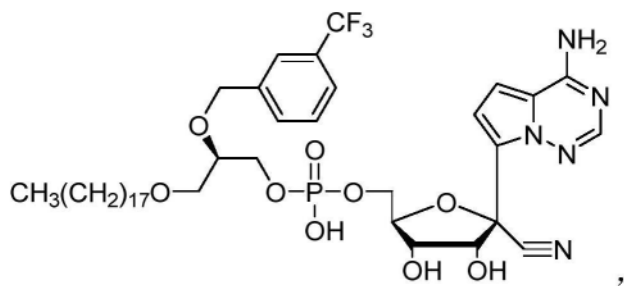
49. 一种具有以下结构的化合物或其药学上可接受的盐：



50. 一种具有以下结构的化合物或其药学上可接受的盐：



51. 一种具有以下结构中的一种的化合物或其药学上可接受的盐：



抗病毒前药、中效和长效制剂和方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2022年1月26日提交的美国临时专利申请第63/303,376号的优先权,其通过引用并入本文。

[0003] 政府赞助

[0004] 本发明是在美国国立卫生研究院(National Institutes of Health)授予的第AI131424号和第AI1161348号政府资助下完成的。政府享有本发明中的某些权利。

技术领域

[0005] 本公开涉及抗病毒前药、用于生产抗病毒前药的方法、治疗方法和药物制剂,如用于治疗哺乳动物中各种疾病如SARS CoV-2感染或人类免疫缺陷感染的抗病毒前药的长效或中效制剂。

背景技术

[0006] 在过去的18年里,溢出事件已将高传播性的 β -冠状病毒株SARS CoV、MERS CoV、SARS CoV-2引入到人类群体(参见,例如,Zhong N.S.等人《柳叶刀(Lancet)》2003;362:1353-1358;Zaki,A.M.,等人,《新英格兰医学杂志(N Engl J Med)》2012;367:1814-1820;以及Zhu N.等人《新英格兰医学杂志》.2020;382:727-733)。尽管病死率各不相同,但每一种都表现出导致相当高的发病率和死亡率——特别是在55岁以上的人群和/或有潜在合并症的人群中(参见,例如,Wu C.等人,《内科学纪要(JAMA Intern Med)》2020;180:934-943;以及Zhou F.等人《柳叶刀》2020;395:1054-1062)。虽然SARS CoV和MERS CoV在很大程度上通过流行病学干预而得以避免蔓延,但当前的疫情已演变为全球大流行,造成数亿人感染以及五百多万人死亡(参见,例如,约翰·霍普金斯大学冠状病毒资源中心(Johns Hopkins Coronavirus Resource Center)<https://coronavirus.jhu.edu/map.html>(访问时间:2022年1月16日)。为开发COVID疫苗而进行的强化努力已导致开发出许多高效的疫苗,这些疫苗提供了相当大的保护,避免了严重疾病和死亡(参见,例如,Polack F.P.等人《新英格兰医学杂志》2021;383:2603-2615,以及Baden L.R.《新英格兰医学杂志》.2021;384:403-416)。即使是最有效的疫苗,免疫力也会在5个月内开始减弱(参见,例如,Keekner J.等人,《新英格兰医学杂志》2021;384:1774-1775)。尽管疫苗有效,但人们普遍对疫苗犹豫不决,世界许多地区多达50%的人拒绝接种疫苗(参见,例如,Daniel C.N.等人《疫苗(Vaccine)》.2022:S0264-410X(21)01667-4)。人群中有相当一部分亚群免疫功能低下和/或存在限制疫苗有效性的潜在病况。因此,尽管在疫苗开发方面取得了重大成功,但SARS CoV-2感染率仍然很高,并且预计在没有有效的抗病毒疗法的情况下,COVID相关的发病率和死亡率将在未来几年持续存在。

[0007] 抗病毒治疗方面的努力包括了针对病毒刺突蛋白上的中和表位的单克隆抗体和针对病毒RNA依赖性RNA聚合酶或病毒3-CL样蛋白酶的小分子。瑞德西韦核苷三磷酸酯(RVn三磷酸酯)有效抑制了迄今为止测试的每种冠状病毒(包括SARS CoV-2)的聚合酶的酶活

性。瑞德西韦还抑制许多其他致病性RNA病毒的聚合酶,包括埃博拉病毒、尼帕病毒和呼吸道合胞病毒(参见,例如,Wang M.等人,《细胞研究(英文版)(Cell Res)》2020;30:269-271; Yan V.C,例如,《ACS药物化学快报(ACS Med Chem Lett)》.2020;11:1361-1366;以及 Mulangu S.等人,《新英格兰医学杂志》2019;381:2293-2303)。

[0008] 针对COVID-19的抗病毒剂(包括瑞德西韦)的临床试验表明在住院前使用可获得最大益处(参见,例如,Gottlieb RL《新英格兰医学杂志》,2021年12月22日:NEJMoa2116846)。住院前进行三次的每日静脉输注瑞德西韦,可减少85%至90%的住院治疗或死亡。这种方法虽然非常有效,但推广起来极具挑战性,因为它需要对SARS CoV-2感染的患者进行连续三天的静脉输注。然而,这种方法是概念性验证,即如果在病患中足够早地使用,则早期瑞德西韦可以对疾病产生相当大的影响。可以向有严重COVID-19疾病风险的SARS CoV-2门诊患者口服施用一周或单次肌肉注射瑞德西韦前药的可用性,将大大扩大这一药剂在COVID-19治疗方面的临床范围,并有可能用于治疗埃博拉、尼帕和RSV感染。瑞德西韦前药的缓释注射制剂引起了人们的兴趣,因为RDV在口服施用后生物利用度不高,必须静脉内施用,因此,在许多情况下,严重复杂化了患有相对晚期疾病的高风险患者住院前的施用。瑞德西韦核苷一磷酸酯的长效制剂将特别有用,所述制剂在单次肌肉或皮下剂量后可使血浆抗病毒活性在高于90%有效浓度持续至少约5至约10天。

[0009] 在美国和全球范围内,抗逆转录病毒治疗(ART)大幅降低了HIV-1相关的发病率和死亡率(参见,例如,Walensky R.P.等人,《传染病杂志(J Infect Dis)》2006;194:11-19;以及April M.D.等人《传染病杂志》.2014;209:491-9)。到2021年,3800万艾滋病毒感染者中有2800万人接受了抗逆转录病毒疗法(参见,例如,<https://www.unaids.org/en/resources/fact-sheet>(访问时间:2022年1月19日))。在接受抗逆转录病毒疗法的患者中,据估计,多达90%的患者在资源丰富的环境中可以完全抑制病毒。由于在撒哈拉以南非洲地区没有例行测量血浆HIV-1RNA水平,目前接受完全有效疗法的HIV-1感染群体的比例尚不清楚,但可能要低得多。预防HIV-1的传播也是紧迫的全球当务之急。有证据表明,HIV传播的可能性与HIV-1的血浆(以及延伸到生殖器)水平直接相关(参见,例如,Quinn T.C.等人,《新英格兰医学杂志》2000;342:921-929),人们越来越乐观地认为,通过在全球积极推广用于治疗 and 预防的抗逆转录病毒疗法,可能会终结这种流行病(参见,例如,Granich R.M.等人,《新英格兰医学杂志》2000;342:921-929)。事实上,在临床试验中和群体水平上都证明了与HIV-1感染个体治疗相关的感染事件有所减少(参见,例如,Cohen M.S.等人,《新英格兰医学杂志》2011;365:493-505;Montaner J.S.等人,《柳叶刀》2010;376:532-539;Montaner J.S.等人,《公共科学图书馆-综合(PLoS One)》2014;9:e87872;以及Tanser J.F.等人,《科学(Science)》2013.339:966-971)。2020年新增感染者一百五十万。尽管早期对有效AIDS疫苗的开发持乐观态度,但对于如何用可规模化的商业疫苗产品激发保护性应答,很少有真正的深入了解。对高风险的HIV-1未感染者的治疗(称为暴露前预防或“PrEP”)在一些群体中有效,但在另一些群体中无效,保护率在0%至62%之间(参见,例如,Grant R.M.《新英格兰医学杂志》2010;363:2587-2599;Baeten J.M.等人,《新英格兰医学杂志》2012;367:399-410;Thigpen M.C.《新英格兰医学杂志》2012;367:423-434;Choopanya K等人,《柳叶刀》2013;381:2083-90;Van Damme L等人,《新英格兰医学杂志》2012;367:411-22;以及Marrazzo J.M.等人,《新英格兰医学杂志》2015;372:509-18)。如果依从性高,则

PrEP是有效的,但是HIV-1感染风险最高的人通常是那些面临最大依从性障碍的人。尽管通过自我报告和返回的产品计数并行评估为88%至90%的依从性,但大型FEM PrEP和VOICE试验未能证明任何程度的保护,只是突出了口服PrEP带来的依从性挑战(参见,例如, Van Damme L等人,《新英格兰医学杂志》2012;367:411-22;以及Marrazzo J.M.等人,《新英格兰医学杂志》2015;372:509-18)。尽管如此,涉及TFV的口服和局部PrEP试验的结果可能看起来更一致:当暴露时存在活性浓度的药物时,可以实现高水平的保护。ART的双重益处包括改善接受疗法的HIV-1感染者的健康状况和降低病毒传播的可能性,使得迅速扩大抗逆转录病毒疗法成为全球的首要当务之急(参见,例如,联合国艾滋病联合规划署(UNAIDS).《90-90-90:帮助终结艾滋病流行的雄心勃勃的治疗目标(90-90-90An Ambitious Treatment Target to help end the AIDS epidemic)》.2014年瑞士日内瓦.可在以下网址获得:http://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/90-90-90_en_0.pdf)。

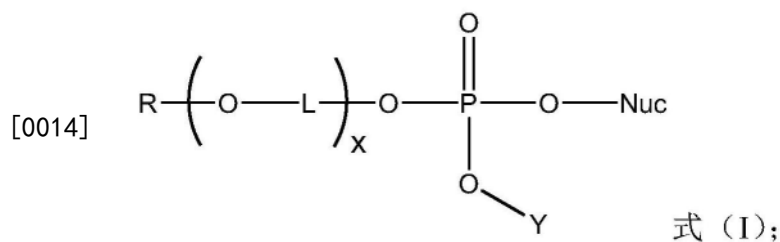
[0010] 随着数种目前可用的一天一次的单片复方方案(single tablet regimen,STR)缓解了第一代抗逆转录病毒药物的许多急性和慢性毒性,治疗依从性成为了长期治疗成功的最大障碍。虽然大多数患者可以依从于每日的方案,但许多最弱势的群体(对于预防和治疗而言)包括那些因精神健康问题、药物使用和病耻感而依从性受到冲击的群体。开发有效、廉价、耐受性良好、方便的方式,在病毒复制和暴露部位长时间保持活性浓度,将代表ART在治疗和预防方面的重大进步。长效可注射产品如卡博特韦、rilpivarin和依斯拉韦提供了对这种方法的概念性验证(参见,例如,Margolis D.A.等人,《柳叶刀:感染病学(Lancet Infect Dis)》.2015;15:1145-55;Verloes R等人,《艾滋病药物(HIV Med)》.2015;16:477-84;以及Mattthers R.P.等人,《自然医学(Nature Med)》.2021;27,1712-1717)。FDA最近决定暂停依斯拉韦的临床试验,因为部分患者出现白细胞减少症,这突现了如果要在易受不同毒性和不同药物敏感性病毒影响的患者群体中广泛使用长效抗逆转录病毒疗法,就需要开发多种类别的药剂。

[0011] 仍然需要能够以各种方式递送(如肌内递送)的药物制剂。还需要长效的药物制剂,如在非频繁施用(如每月一次)后能够长时间提供有效血浆水平的制剂。

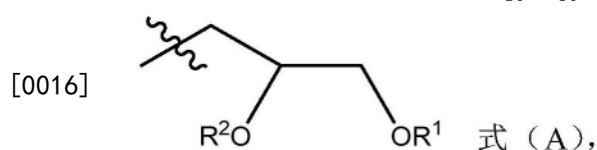
发明内容

[0012] 本文提供了化合物(如抗病毒前药)以及药物制剂,其克服了目前所使用的药物和/或制剂的一种或多种缺点。例如,本文提供的化合物和药物制剂的实施例包括口服有用的抗病毒前药,其可以特异性靶向病毒复制最大量的器官,并且在任何疾病阶段都可以方便地大规模施用。为了口服使用和增强肺部暴露,本文提供的RVn的前药或制剂的一些实施例可以实现以下中的一种或多种:1) 第一核苷磷酸化的激酶旁路,2) 提供增加的口服生物可利用性,3) 递送抗病毒方面显著的浓度至肺部和胃肠道,以及可以在单次注射后在血浆中提供持续5至30天的持久水平的制剂。本文还提供了用于化合物的合成和抗病毒评价的方法,包括在感染SARS-CoV-2的Vero E6细胞中明显比瑞德西韦更具活性的新型亲脂性RVn-一磷酸酯前药。不希望受任何特定理论的约束,本文化合物的实施例是可以允许在诊断SARS-CoV-2感染时进行更早和/或更有效治疗的前药。本文中的前药可以代表一种能够将抗病毒药物靶向肺部并远离肝脏的方法,瑞德西韦的主要剂量限制是针对肝脏。

[0013] 一方面,本文提供了化合物,包括抗病毒前药。在一些实施例中,所述化合物具有根据式(I)的结构:



[0015] 其中Nuc选自由以下组成的群组:抗病毒核苷和抗病毒核苷类似物;Y独立地选自由以下组成的群组:氢、 C_1 - C_{30} 烷基、药学上可接受的阳离子和与抗病毒核苷或抗病毒核苷类似物的五碳糖部分的碳原子的共价键;x为0或1;L独立地是 C_1 - C_{30} 烷基(如 C_1 - C_6 烷基);并且R独立地选自由以下组成的群组: C_{10} - C_{30} 烷基和式(A)的取代基;

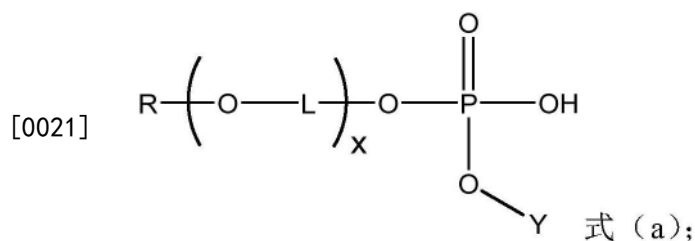


[0017] 其中 R^1 和 R^2 独立地选自由以下组成的群组:氢和 C_1 - C_{30} 烷基。

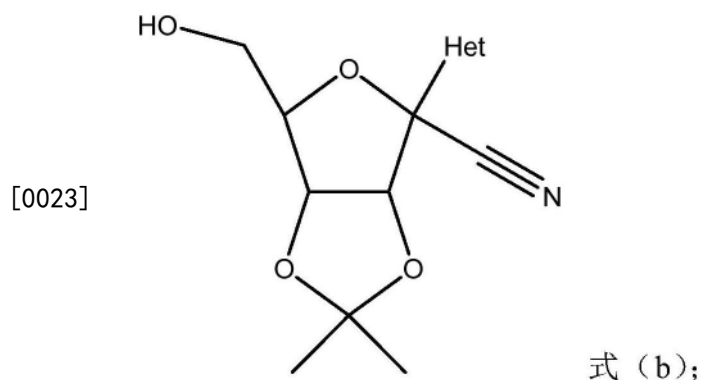
[0018] 另一方面,提供了药物制剂。在一些实施例中,药物制剂包括油和本文所描述的一种或多种化合物。药物制剂可以配制成用于注射,如肌肉注射或皮下注射。药物制剂可以是口服可生物利用的。

[0019] 另外一方面,提供了治疗的方法,如用于治疗病毒(例如,冠状病毒)的方法,包括哺乳动物中的病毒感染。在一些实施例中,方法包括施用有效量的本文所描述的化合物或者本文所描述的药物制剂。

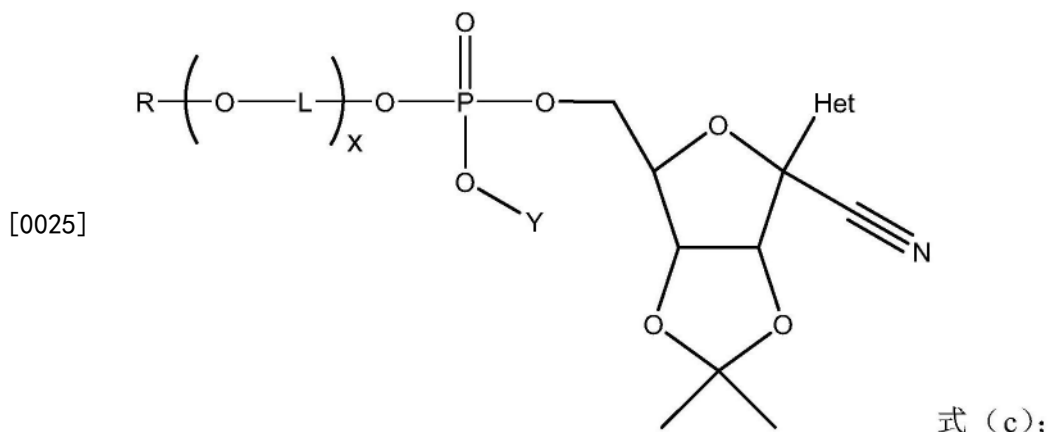
[0020] 还有另外一个方面,提供了生产化合物如前药的方法。在一些实施例中,所述方法包括:(i)提供式(a)的化合物:



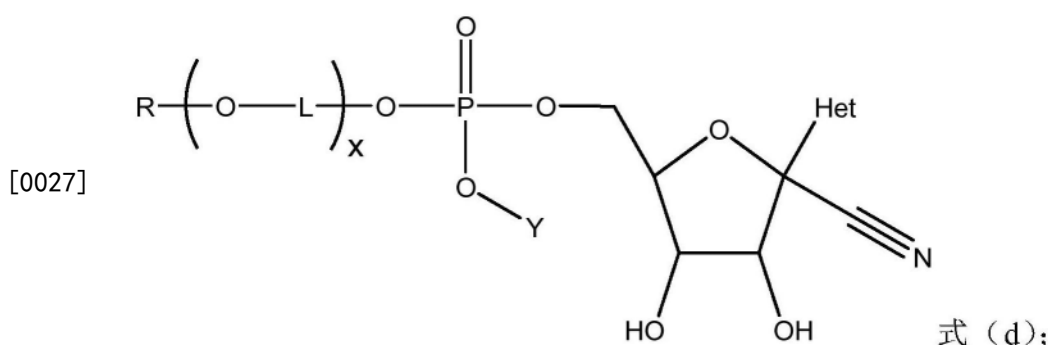
[0022] (ii)提供式(b)的化合物:



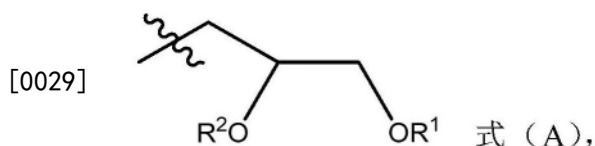
[0024] (iii) 使所述式 (a) 的化合物与所述式 (b) 的化合物接触以形成式 (c) 的化合物



[0026] 以及 (iv) 使 (c) 的化合物与酸接触以形成式 (d) 的化合物



[0028] 其中Het是包括至少一个杂原子的 C_1 - C_{30} 烃基;Y选自由以下组成的群组:氢、 C_1 - C_{30} 烃基和药学上可接受的阳离子;x为0或1;L为 C_1 - C_{30} 烃基(如 C_1 - C_6 烃基);并且R选自由以下组成的群组: C_{10} - C_{30} 烃基和式(A)的取代基;



[0030] 其中 R^1 和 R^2 独立地选自由以下组成的群组:氢和 C_1 - C_{30} 烃基。方法可以包括进行产物(如磷酸二酯)的分子内酯化反应,以形成环状磷酸酯,如3',5'-环状磷酸酯。

[0031] 又有另一方面,还提供了生产药物三磷酸酯的方法。在一些实施例中,方法包括:提供多个细胞,使所述多个细胞与一定量的药物接触,将所述多个细胞和所述一定量的药物孵育持续能有效形成药物三磷酸酯的时间段。

[0032] 在下面的描述中将在某种程度上对另外的方面进行阐述,并且所述另外的方面在某种程度上根据所述描述而显而易见,或者可以通过本文描述的方面的实践而获得教导。本文描述的优点可以通过在所附权利要求中特别指出的要素和组合来实现和获得。应当理解的是,前面的一般描述和下面的具体实施方式两者都只是示例性和解释性的,而不是限制性的。

附图说明

[0033] 图1A至图1F示出了在以两个重复进行的两个独立实验中,ODBG-P-RVn、ODE-P-RVn

和HDP-P-RVn(4b)、瑞德西韦(RDV)和瑞德西韦核苷(RVn)针对Vero E6细胞中的SARS-CoV-2感染的浓度-反应曲线。

[0034] 图2示出了通过CellTiter-Glo发光细胞活力测定法测量的经处理的Vero E6细胞的实施例的相对活力。

[0035] 图3示出了对细胞的LC/MS/MS分析,将所述细胞以1200rpm离心10分钟、吸出稀释剂并重悬于250μL甲醇/蒸馏水(70/30)中。

[0036] 图4A和图4B示出了在叙利亚仓鼠中进行的七天的口服药代动力学研究中ODBG-P-RVn(图4A)和RVn(图4B)的血药水平。

[0037] 图5A和图5B示出了ODE-P-RVn和ODBG-P-RVn在用K₂EDTA(图5A)或者肝素钠(图5B)作为抗凝血剂的人血浆中的稳定性。

[0038] 图6A和图6B分别示出了对大鼠肌内施用100mg/kg制剂F3后ODE-Bn-TFV和ODE-TFV的药代动力学。

[0039] 图7A和图7B是在对大鼠肌内施用100mg/kg后,4种不同制剂分别对ODE-Bn-TFV和ODE-TFV的药代动力学的影响的图。

[0040] 图8示出了使用制剂F3与F8在大鼠中进行的96mg/kg ODE-Bn-TFV的药代动力学比较。

[0041] 图9示出了在暴露于每月肌内注射的制剂F3中的ODE-BN-TFV的剂量3个月期间,ODE-Bn-TFV和ODE-TFV的大鼠血浆水平。

[0042] 图10示出了用100mg/kg制剂F3中的ODE-Bn-TFV处理的比格犬中ODE-Bn-TFV和ODE-TFV的血浆水平。

[0043] 图11A和图11B示出了ODE-TFV(图11A)和ODE-Et-TFV(图11B)在HFF细胞中的TFVpp持久性。

[0044] 图12A和图12B示出了含有ODE-Bn-TFV(图12A)或ODE-TFV(图12B)的制剂实施例的血浆浓度(ODE-Bn-TFV ED₉₀为10.9ng/mL;ODE-TFV ED₉₀为6.3nm/mL)。

[0045] 图12C和图12D示出了含有ODE-Bn-TFV(图12C)和ODE-TFV(图12D)的制剂实施例的血浆浓度。

[0046] 图12E和图12F示出了含有ODE-Bn-TFV(图12E)和ODE-TFV(图12F)的制剂实施例的血浆浓度。

[0047] 图12G和图12H示出了含有ODE-Bn-TFV(图12G)和ODE-TFV(图12H)的制剂实施例的血浆浓度。

[0048] 图12I示出了制剂实施例的平均血浆浓度。

[0049] 图13示出了在施用本文的制剂实施例后,大鼠血浆中存在的活性成分实施例每毫升的纳克数。

[0050] 图14示出了施用本文的制剂实施例后PBMC中二磷酸酯实施例的量。

具体实施方式

[0051] 一方面,本文提供了药物制剂。药物制剂可以包括(i)油,和(ii)如本文所描述的式(I)的化合物。在一些实施例中,药物制剂还包括苯甲醇、苯甲酸苄酯、乙醇或其组合。

[0052] 如本文所用,术语“油”是指不溶于水(例如,溶解度少于每升水1g)的非极性化合

物或者两种或多种非极性化合物的混合物,如包括至少部分饱和碳链的非极性化合物(例如,烃、脂肪酸等)。

[0053] 任何已知的油都可以在本文提供的药物制剂中使用。在一些实施例中,油选自由以下组成的群组:芝麻油、甘油三酯(例如,中链甘油三酯)及其组合。

[0054] 油可以以任何有效浓度存在于本文提供的药物制剂中。例如,油可以以按所述药物制剂的重量计约60重量%至约95重量%、约65重量%至约95重量%、约70重量%至约95重量%、约75重量%至约95重量%、约80重量%至约95重量%或约85重量%至约95重量%的量存在于所述药物制剂中。

[0055] 在一些实施例中,药物制剂还包括苯甲醇、苯甲酸苄酯、乙醇或其组合。当存在时,苯甲醇、乙醇、苯甲酸苄酯或其组合可以以按所述药物制剂的重量计约0.01重量%至约25重量%、约0.01重量%至约20重量%、约0.01重量%至约15重量%、约0.01重量%至约10重量%或约5重量%至约10重量%的总量存在。

[0056] 式(I)的化合物可以以任何有效浓度存在于本文提供的药物制剂中。例如,式(I)的化合物可以以按所述药物制剂的重量计约0.01重量%至约40重量%、约0.01重量%至约30重量%、约0.01重量%至约20重量%、约0.01重量%至约10重量%或约0.01重量%至约5重量%的量存在。

[0057] 本文提供的药物制剂可以配置用于任何施用途径。在一些实施例中,药物制剂被配置用于口服施用。在一些实施例中,药物制剂被配置用于注射,如肌肉注射或皮下注射。

[0058] 本文提供的药物制剂可以被配置为以单次剂量施用。例如,如本文所描述,药物制剂可以被配置为以单次长效治疗施用。单次剂量可以提供有效量的药物制剂,如存在于药物制剂中的式(I)的化合物。本文提供的药物制剂可被配置为以两次或更多次剂量的系列施用,其中每次剂量在前一次剂量后至少7天、至少14天、至少21天或至少28天施用。例如,如本文所描述,两次或更多次剂量中的每一次都可以是长效治疗。

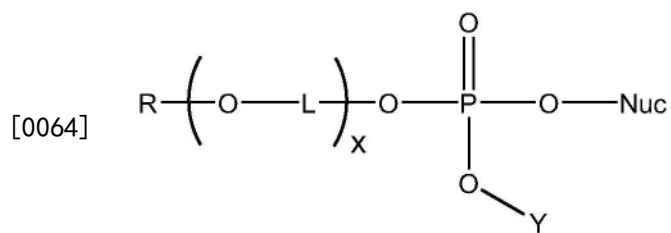
[0059] 在一些实施例中,药物制剂包括制剂F3、F4、F7或F8中任一种的组分中的一种或多种:

组分	F3	F4	F7	F8
芝麻油	92.65	73.67	-	-
中链甘油三酯	-	-	92.65	73.67
苯甲醇	1.22	10.67	1.22	10.67
苯甲酸苄酯	-	15.67	-	15.67
乙醇	6.12	-	6.12	-

[0061] 在一些实施例中,药物制剂是长效治疗。如本文所用,短语“长效治疗”、“长效剂量”等分别是指施用单次剂量后促使血浆抗病毒活性高于90%有效浓度持续约5天至约30天、约5天至约28天、约5天至约21天、约5天至约14天或约5天至约7天的治疗或剂量。

[0062] 本文描述的药物制剂可以包括一种或多种添加剂,其不会不良地影响药物制剂的一种或多种特征,如式(I)的化合物的活性、生物可利用性等。添加剂的非限制性实例包括:赋形剂、着色剂、调味剂、缓冲剂、防腐剂、表面活性剂、其他活性成分如抗炎剂、止痛药等。

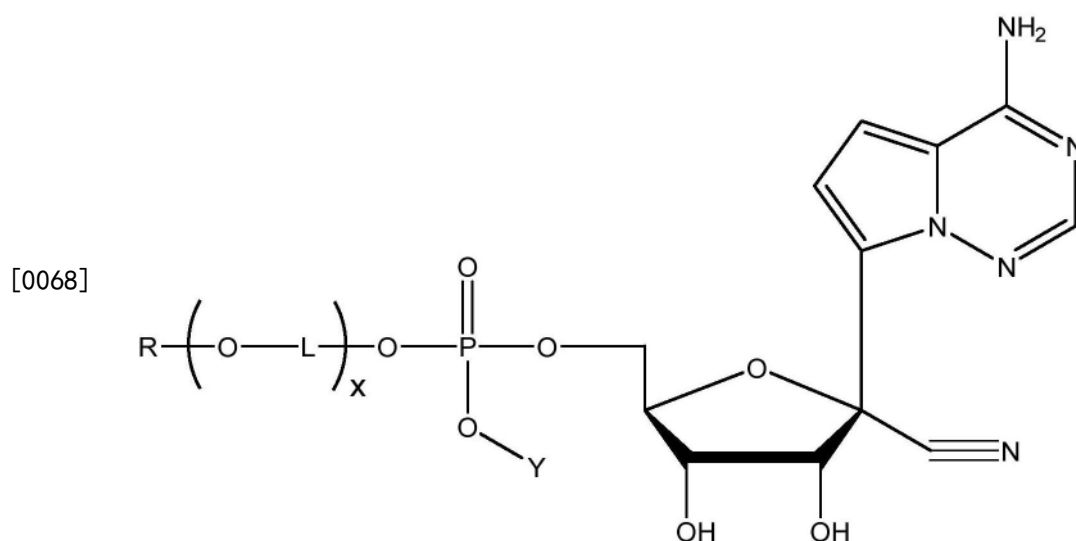
[0063] 一方面,本文提供了化合物,包括式(I)的化合物:



[0065] 式(I)的“Nuc”可以是任何合适的核苷。核苷可以以任何方式与化合物键合。例如,核苷的5'-羟基可以以酯键连接到磷酸酯部分。

[0066] 在一些实施例中,核苷是抗病毒核苷。抗病毒核苷可以是抗病毒核糖核苷。在一些实施例中,核苷是抗病毒核苷类似物。抗病毒核苷类似物可以是抗病毒核糖核苷类似物。

[0067] 在一些实施例中,Nuc是RVn(GS-441524), β -D-N⁴-羟基胞苷(NHC)或(2'R)-2-氨基-2'-脱氧-2'-氟-N,2'-二甲基腺苷(CAS号1998705-62-6)。在一些实施例中,Nuc是GS-441524,并且式(I)的化合物具有以下结构:

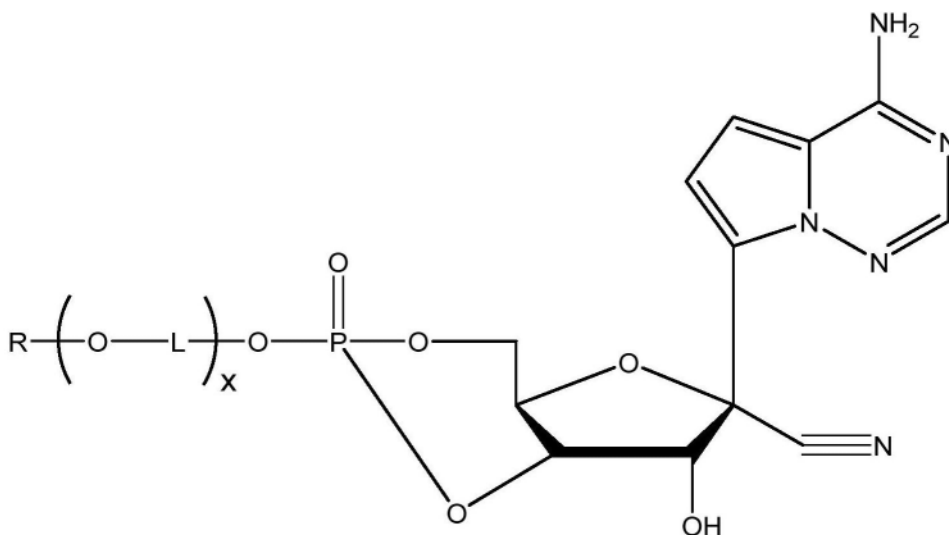


[0069] 用于冠状病毒感染的其他抗病毒剂也可以以本文提供的方式进行修饰。例如,N⁴-羟基胞苷(NHC)是进入临床I期评价的抗病毒候选药物。根据本公开,已知的抑制RNA病毒的其他核苷类似物也适合进行修饰。

[0070] 式(I)的“Y”可以是本文所描述的任何取代基。在一些实施例中,Y是氢、C₁-C₃₀烷基、药学上可接受的阳离子或者与抗病毒核苷或抗病毒核苷类似物的五碳糖部分的碳原子的共价键。

[0071] 当Y是与抗病毒核苷或抗病毒核苷类似物的五碳糖部分的碳原子的共价键时,所述共价键可以是与抗病毒核苷或抗病毒核苷类似物的五碳糖部分的任何碳原子的共价键(例如,1'碳、2'碳、3'碳或4'碳)。换句话说,共价键可以是(i)式(I)中Y与之键合的氧与(ii)抗病毒核苷或抗病毒核苷类似物的五碳糖部分的任何碳原子(例如,1'碳、2'碳、3'碳或4'碳)之间的共价键。例如,Nuc可以是GS-441524;共价键可以是式(I)中Y与之键合的氧与GS-441524的五碳糖部分的3'碳之间的共价键,式(I)的化合物具有以下结构:

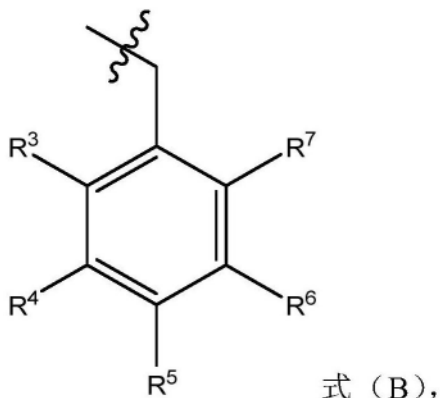
[0072]



[0073] 当Y是药理学上可接受的阳离子时,所述药理学上可接受的阳离子可以是 Na^+ 。

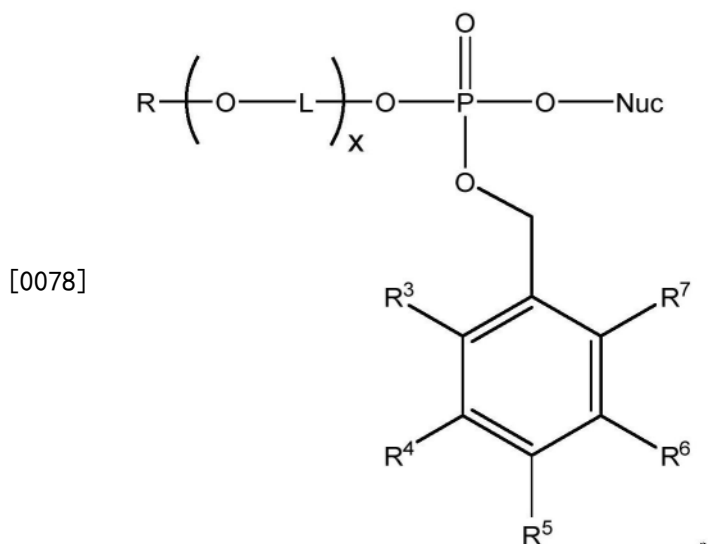
[0074] 在一些实施例中,Y是 C_1 - C_{20} 烷基、 C_1 - C_{10} 烷基或 C_1 - C_6 烷基。在一些实施例中,Y是 C_1 - C_6 烷基,所述烷基可以是未取代的。在一些实施例中,Y包括至少一个环状部分。所述至少一个环状部分可以是单环部分或多环部分,例如双环部分、螺环部分等。在一些实施例中,Y是芳基、芳基烷基、杂芳基、杂芳基烷基或杂环烷基,它们中的每一者都可以是未取代或取代的。在一些实施例中,Y是未取代或取代的吡啶基。在一些实施例中,Y是未取代或取代的苄基。所述未取代或取代的苄基可以具有根据式(B)的结构:

[0075]

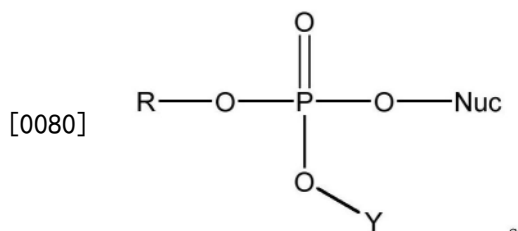


[0076] 其中 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 和 R^7 独立地选自由以下组成的群组:氢、烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、芳基、杂芳基、杂环基、芳基(烷基)、杂芳基(烷基)、(杂环基)烷基、羟基、烷氧基、酰基、氰基、卤素、硫羰基、O-氨基甲酰基、N-氨基甲酰基、O-硫代氨基甲酰基、N-硫代氨基甲酰基、C-酰氨基、N-酰氨基、S-磺酰氨基、N-磺酰氨基、C-羧基、O-羧基、异氰酸基、硫代氰酸基、异硫氰基、硝基、叠氮基、甲硅烷基、亚氧硫基、亚硫酰基、磺酰基、卤代烷基、卤代烷氧基、三卤代甲烷磺酰基、三卤代甲磺酰氨基(trihalomethanesulfonamido)、氨基、单取代的氨基和二取代的氨基。在一些实施例中, R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 和 R^7 是氢。在一些实施例中, R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 和 R^7 中的至少两个是氢。在一些实施例中, R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 和 R^7 中的至少三个是氢。在一些实施例中, R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 和 R^7 中的至少四个是氢。

[0077] 当Y是未取代或取代的式(B)的苄基时,式(I)的化合物具有以下结构:



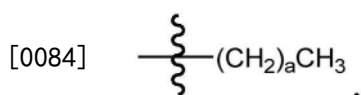
[0079] 在式(I)中,x可以是1或0。当x为1时,“-O-L-”部分存在于式(I)的化合物中。当x为0时,R直接键合到磷酸酯部分的氧上,如以下结构所示:



[0081] 当“L”存在于式(I)的化合物中时,“L”可以选自本文所描述的任何取代基。在一些实施例中,L为 C_1-C_{30} 烷基、 C_1-C_{20} 烷基、 C_1-C_{10} 烷基、 C_1-C_6 烷基、 C_1-C_5 烷基、 C_1-C_4 烷基、 C_1-C_3 烷基或 C_1-C_2 烷基。在一些实施例中,L为乙基,其可以是未取代的。在一些实施例中,L为甲基,其可以是未取代的。在一些实施例中,L为丙基,其可以是未取代的。

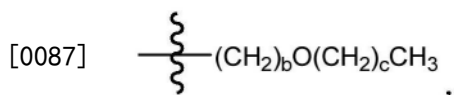
[0082] 式(I)的“R”可以选自本文所描述的取代基中的任一种。在一些实施例中,R是 C_1-C_{30} 烷基、 C_5-C_{30} 烷基、 $C_{10}-C_{30}$ 烷基、 $C_{12}-C_{24}$ 烷基、 $C_{13}-C_{29}$ 烷基、 $C_{15}-C_{24}$ 烷基或 $C_{20}-C_{24}$ 烷基。在一些实施例中,R是杂烷基。R可以包括0至6个不饱和键、1至6个不饱和键、2至6个不饱和键、3至6个不饱和键或4至6个不饱和键。本文所描述的“不饱和键”可以包括任何非单键,并且当存在超过一个不饱和键时,两个或更多个不饱和键可以独立地选自双键或三键。当存在一个或多个双键时,所述一个或多个双键可以是顺式、反式或其组合。R可以包括环丙基部分,如末端环丙基部分。

[0083] 在一些实施例中,R是:



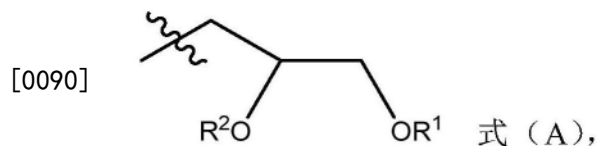
[0085] 其中a为1至29。在一些实施例中,a为15至25。在一些实施例中,a为18至22。在一些实施例中,a为19。在一些实施例中,a为6至10。在一些实施例中,a为8。

[0086] 在一些实施例中,R是:



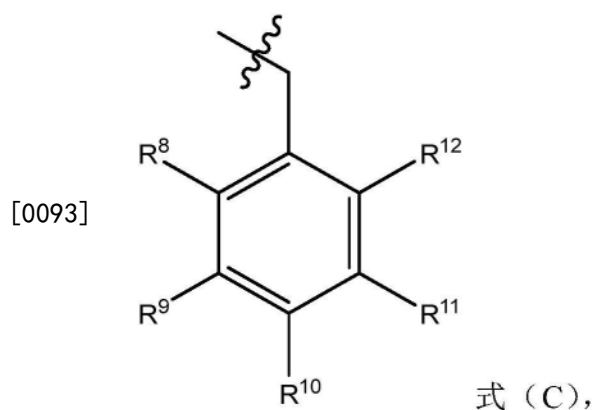
[0088] 其中b为1至29,c为0至28,并且b与c之和为29或更小。在一些实施例中,b为1至4并且c为15至20。在一些实施例中,b为3并且c为15。在一些实施例中,b为2并且c为17。

[0089] 在一些实施例中,R是式(A)的取代基;



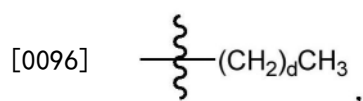
[0091] 其中 R^1 和 R^2 是氢或 C_1 - C_{30} 烷基,如 C_{10} - C_{30} 烷基或 C_{12} - C_{24} 烷基。 R^1 、 R^2 或者 R^1 和 R^2 两者可以包括至少一个环状部分,其可以是单环部分或多环部分,例如,双环部分、螺环部分等。 R^1 、 R^2 或者 R^1 和 R^2 两者可以包括0至6个不饱和键、1至6个不饱和键、2至6个不饱和键、3至6个不饱和键或4至6个不饱和键。当存在一个或多个双键时,所述一个或多个双键可以是顺式、反式或其组合。 R^1 、 R^2 或者 R^1 和 R^2 两者可以包括支链烷基,如倒数第二位的支链烷基。在一些实施例中, R^1 和 R^2 中的至少一个是氢。在一些实施例中, R^1 和 R^2 两者独立地选自 C_1 - C_{30} 烷基。

[0092] 在一些实施例中, R^1 、 R^2 或者 R^1 和 R^2 两者独立地选自由以下组成的群组:芳基、芳基烷基、杂芳基、杂芳基烷基和杂环烷基,它们中的每一者都可以是未取代或取代的。芳基烷基可以是未取代或取代的苄基。所述未取代或取代的苄基可以具有根据式(C)的结构:



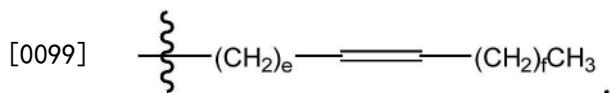
[0094] 其中 R^8 、 R^9 、 R^{10} 、 R^{11} 和 R^{12} 独立地选自由以下组成的群组:氢、烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、芳基、杂芳基、杂环基、芳基(烷基)、杂芳基(烷基)、(杂环基)烷基、羟基、烷氧基、酰基、氰基、卤素、硫羰基、O-氨基甲酰基、N-氨基甲酰基、O-硫代氨基甲酰基、N-硫代氨基甲酰基、C-酰氨基、N-酰氨基、S-磺酰氨基、N-磺酰氨基、C-羧基、O-羧基、异氰酸基、硫代氰酸基、异硫氰基、硝基、叠氮基、甲硅烷基、亚氧硫基、亚硫酰基、磺酰基、卤代烷基、卤代烷氧基、三卤代甲烷磺酰基、三卤代甲磺酰氨基、氨基、单取代的氨基和二取代的氨基。在一些实施例中, R^8 、 R^9 、 R^{10} 、 R^{11} 和 R^{12} 中的每一者都是氢。在一些实施例中, R^8 、 R^9 、 R^{10} 、 R^{11} 和 R^{12} 中的至少两个是氢。在一些实施例中, R^8 、 R^9 、 R^{10} 、 R^{11} 和 R^{12} 中的至少三个是氢。在一些实施例中, R^8 、 R^9 、 R^{10} 、 R^{11} 和 R^{12} 中的至少四个是氢。在一些实施例中, R^8 、 R^9 、 R^{10} 、 R^{11} 和 R^{12} 中的至少五个是氢。

[0095] 在一些实施例中, R^1 是:



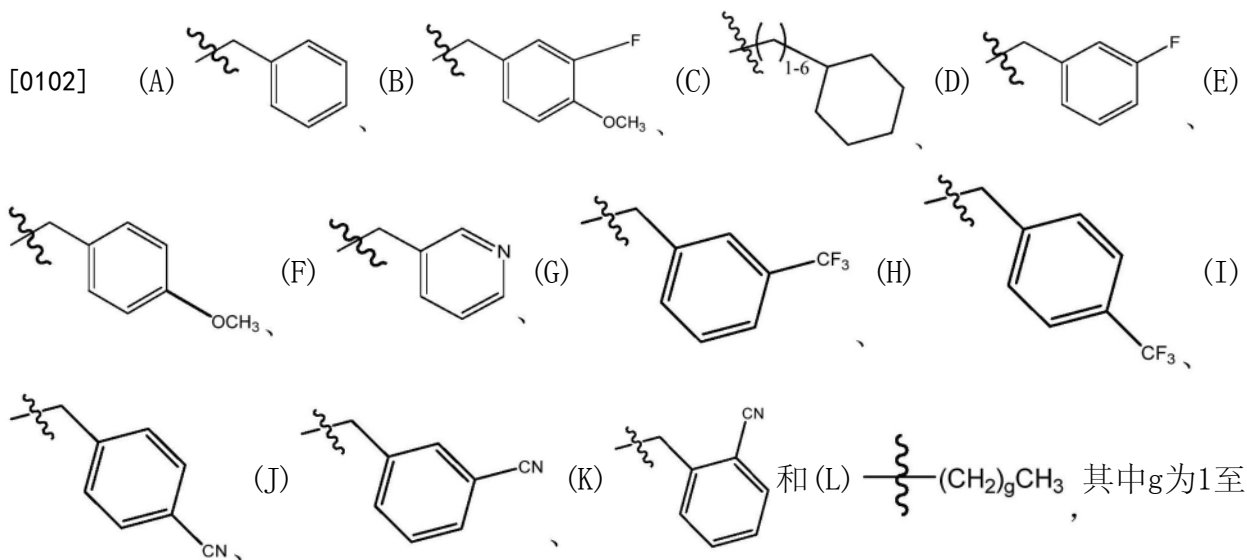
[0097] 其中d为1至29。在一些实施例中,d为5至29、10至29、15至29、20至29、25至29、1至25、1至20、1至15、1至10或1至5。

[0098] 在一些实施例中, R^1 是:



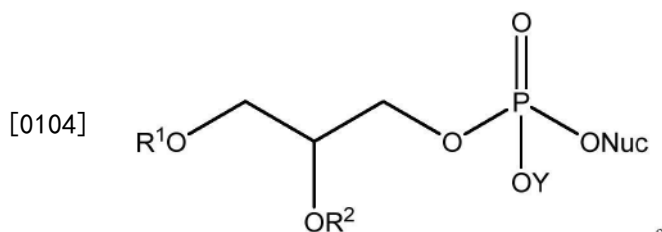
[0100] 其中 e 为 1 至 27, f 为 0 至 26, 并且 e 和 f 之和为 27 或更小。

[0101] 在一些实施例中, R^2 选自由以下组成的群组:

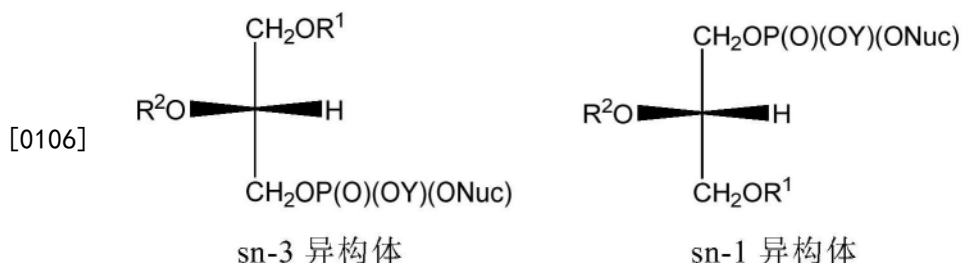


29。在一些实施例中, g 为 5 至 10。在一些实施例中, g 为 7。

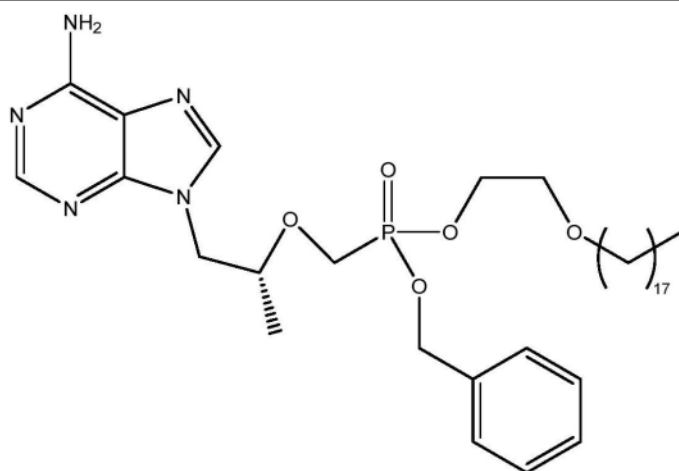
[0103] 式 (A) 的取代基可以是外消旋体、 sn -1 立体异构体或 sn -3 立体异构体。在整个本公开中, 当式 (A) 被描述为没有空间取向的指示时, 则所述式解读为所述式化合物的所有异构体, 例如立体异构体。例如, 在一些实施例中, 化合物可以具有根据式 (I) 的结构, 其中 x 为 0, 并且 R 是式 (A) 的取代基:



[0105] 这一式缺乏任何空间取向的指示, 因此解读为其 sn -3 异构体、其 sn -1 异构体、以及 sn -3 和 sn -1 异构体的混合物, 包括其外消旋体混合物:

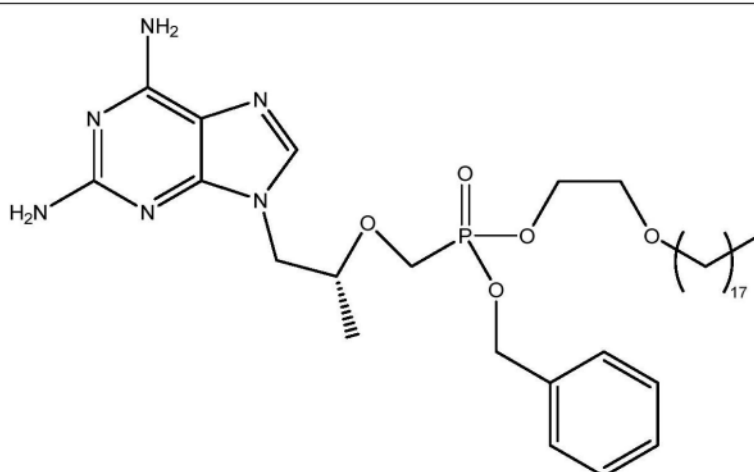


[0107] 下表提供了式 (I) 的化合物的其他非限制性实施例:

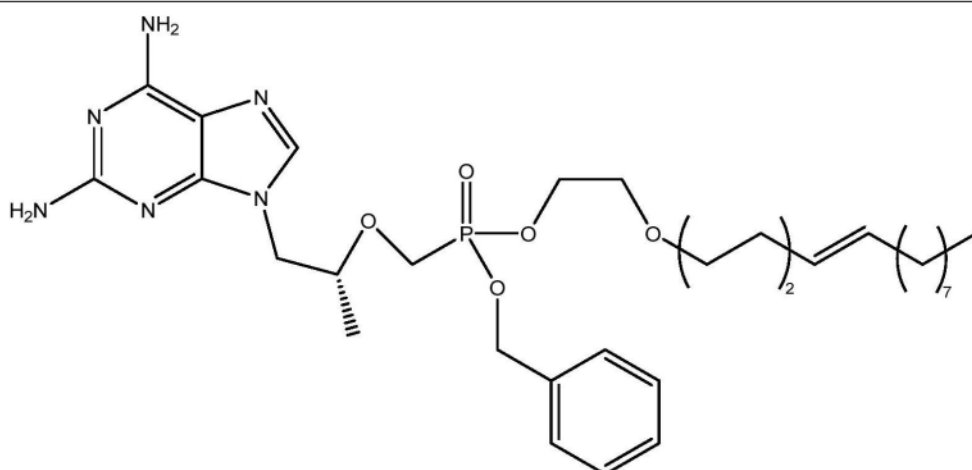


十八烷氧基乙基苄基替诺福韦 (ODE-Bn-TFV)

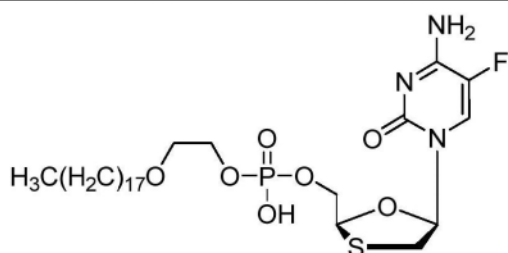
[0108]



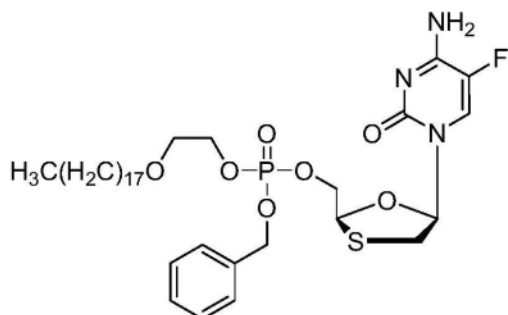
十八烷氧基乙基苄基 9-(R)-[(2-磷酸基甲氧基)丙基]-2,6-二氨基嘌呤 (ODE-Bn-PMPDAP)



油氧乙基苄基 9-(R)-[(2-磷酸基甲氧基)丙基]-2,6-二氨基嘌呤 (OLE-Bn-PMPDAP)

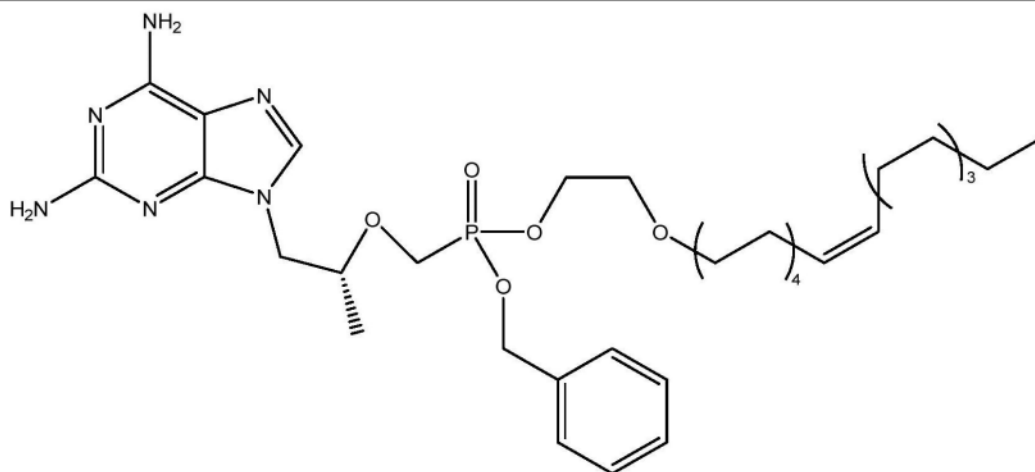


十八烷氧基乙基-磷酸基-恩曲他滨 (ODE-P-FTC)

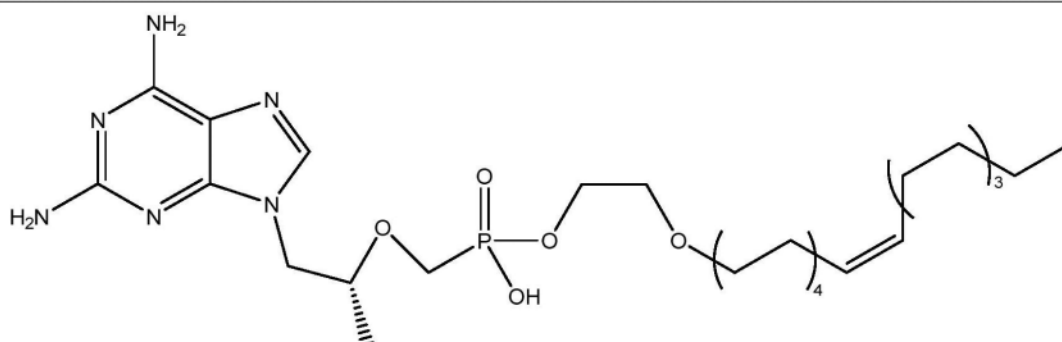


十八烷氧基乙基苄基-磷酸基-恩曲他滨 (ODE-Bn-P-FTC)

[0109]

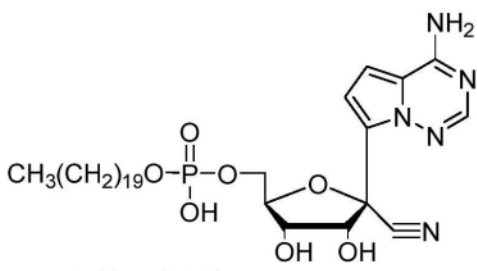
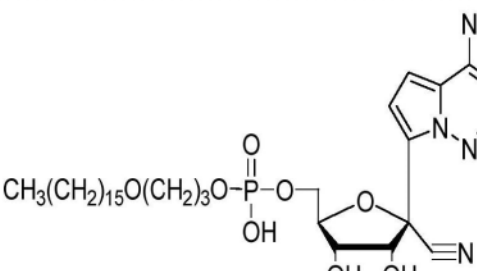
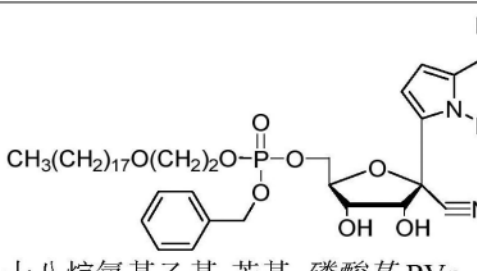
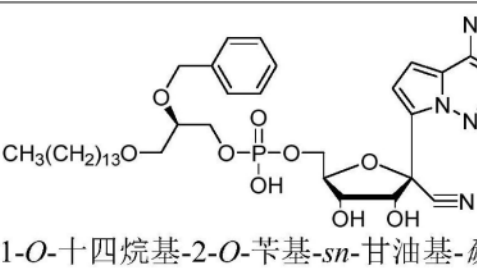
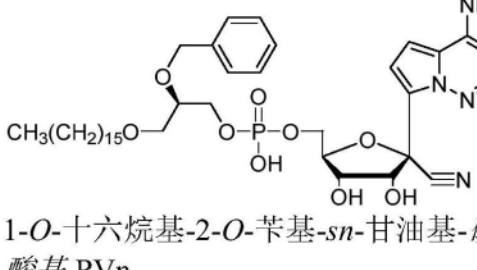
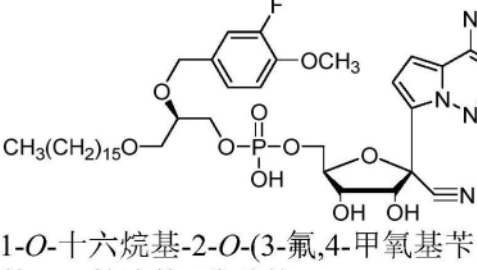
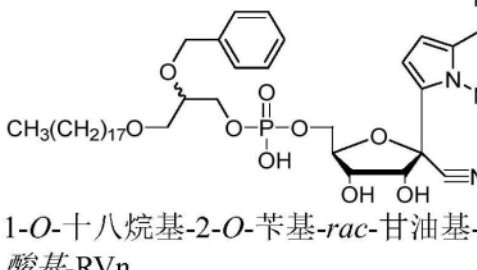
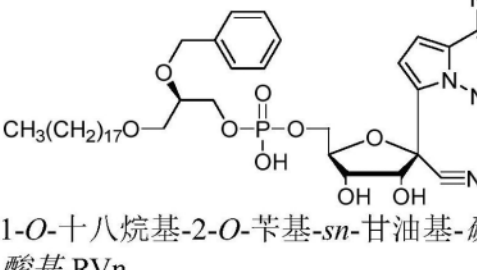
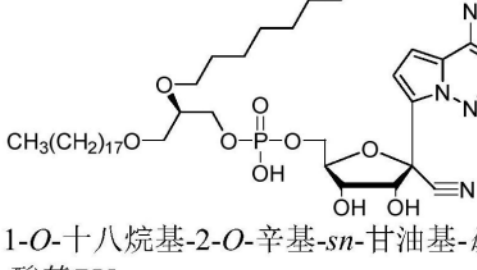
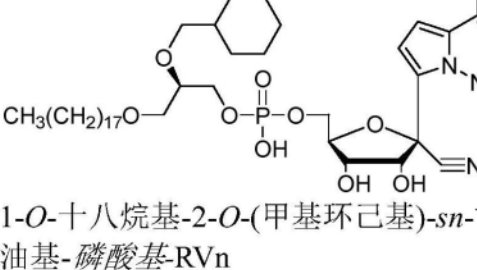


油氧乙基苄基 9-(R)-[2-磷酸基-甲氧基]丙基]-2,6-二氨基嘌呤 (OLE-Bn-PMPDAP)

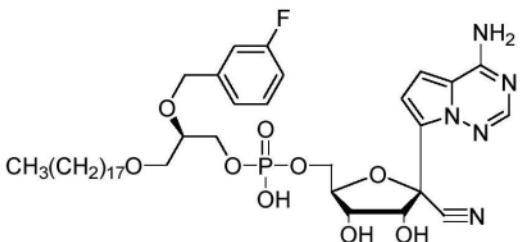
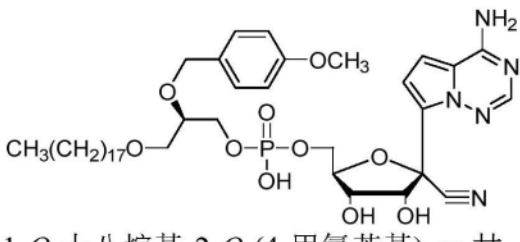
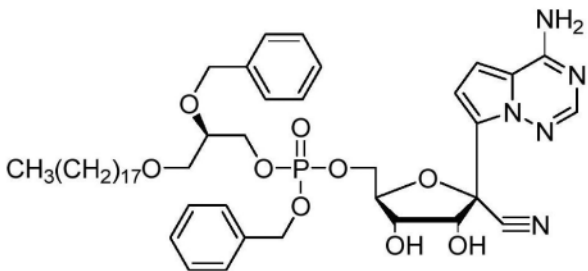
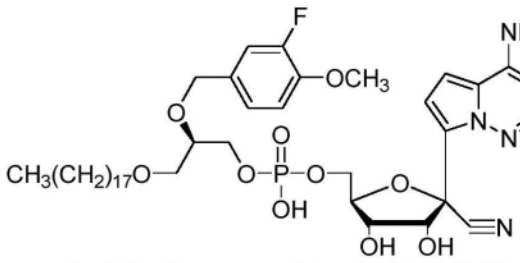
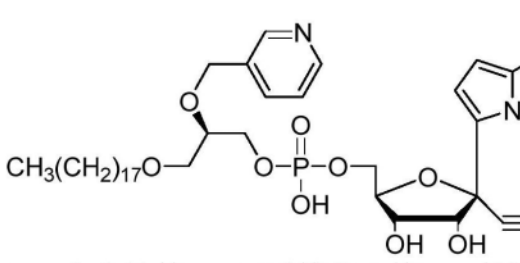
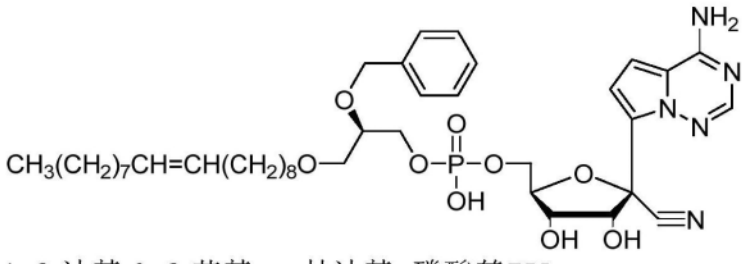


油氧乙基 9-(R)-[(2-磷酸基甲氧基)丙基]-2,6-二氨基嘌呤 (OLE-(R)-PMPDAP)

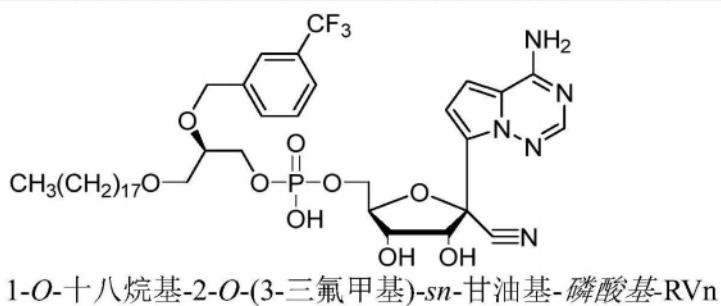
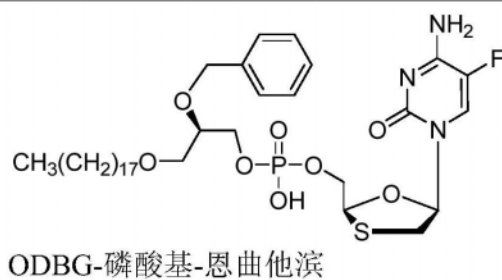
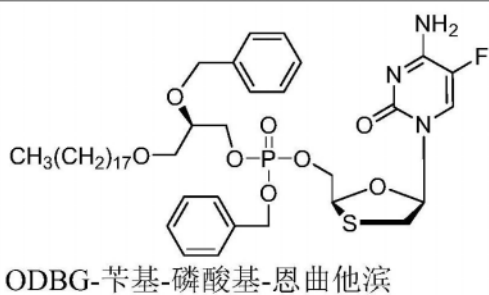
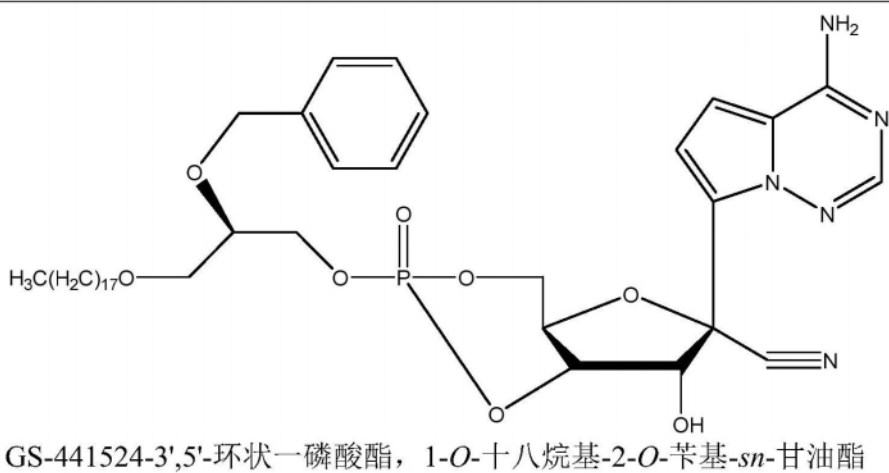
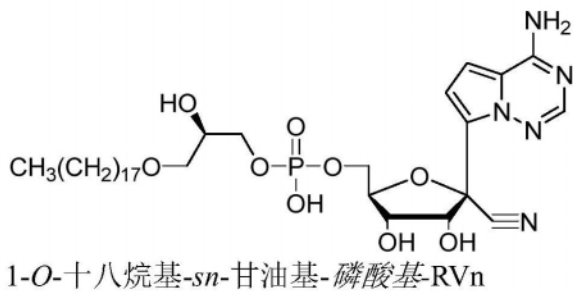
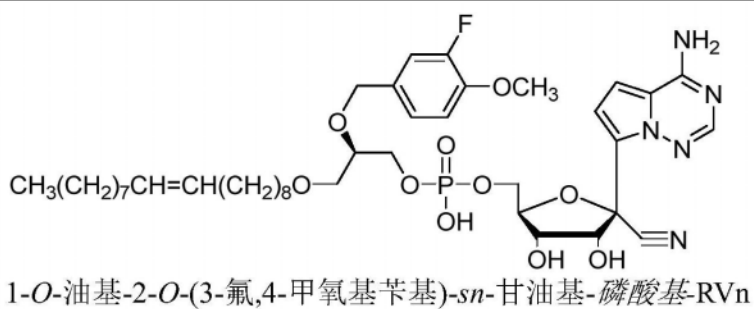
[0110]

 二十烷基-磷酸基-RVn	 十六烷氧基丙基-磷酸基-RVn
 十八烷氧基乙基-苄基-磷酸基-RVn	 1-O-十四烷基-2-O-苄基-<i>sn</i>-甘油基-磷酸基-RVn
 1-O-十六烷基-2-O-苄基-<i>sn</i>-甘油基-磷酸基-RVn	 1-O-十六烷基-2-O-(3-氟,4-甲氧基苄基)-<i>sn</i>-甘油基-磷酸基-RVn
 1-O-十八烷基-2-O-苄基-<i>rac</i>-甘油基-磷酸基-RVn	 1-O-十八烷基-2-O-苄基-<i>sn</i>-甘油基-磷酸基-RVn
 1-O-十八烷基-2-O-辛基-<i>sn</i>-甘油基-磷酸基-RVn	 1-O-十八烷基-2-O-(甲基环己基)-<i>sn</i>-甘油基-磷酸基-RVn

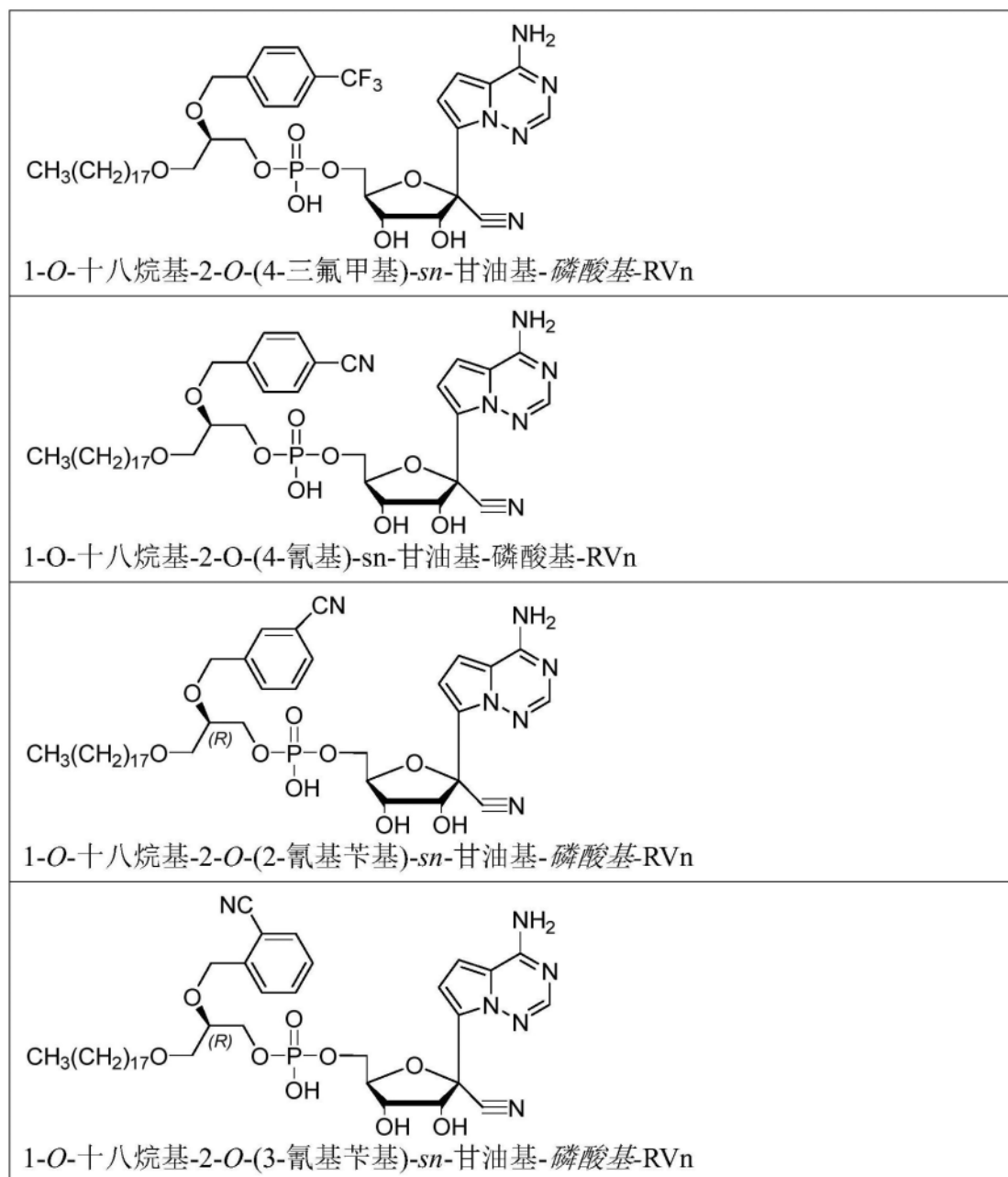
[0111]

 1-<i>O</i>-十八烷基-2-<i>O</i>-(3-氟苄基)-<i>sn</i>-甘油基-磷酸基-RVn	 1-<i>O</i>-十八烷基-2-<i>O</i>-(4-甲氧苄基)-<i>sn</i>-甘油基-磷酸基-RVn
 1-<i>O</i>-十八烷基-2-<i>O</i>-苄基-苄基-<i>sn</i>-甘油基-磷酸基-RVn	
 1-<i>O</i>-十八烷基-2-<i>O</i>-(3-氟,4-甲氧基苄基)-<i>sn</i>-甘油基-磷酸基-RVn	
 1-<i>O</i>-十八烷基-2-<i>O</i>-(甲基吡啶基)-<i>sn</i>-甘油基-磷酸基-RVn	
 1-<i>O</i>-油基-2-<i>O</i>-苄基-<i>sn</i>-甘油基-磷酸基-RVn	

[0112]



[0113]



[0114] 当就取代基的选择而在本文中使用时,术语“独立地”表示:(i)对于式的每个分子,特定位置处的取代基可以相同或不同(例如,(i)式(I)的化合物可以包括两个式(I)的分子,其中每个分子具有针对R而选择的相同或不同的 C_1 - C_{30} 烷基);和/或(ii)选自同一取代基库的两个不同标记的取代基可以相同或不同(例如,式(I)的化合物分子中的R和Y可以两者均选自“ C_1 - C_{30} 烷基”,并且针对R和Y而选择的 C_1 - C_{30} 烷基可以相同或不同))。

[0115] 如本文所用,短语“ C_1 - C_{30} 烷基”、“ C_{10} - C_{30} 烷基”等通常是指分别含有1至30个碳原子或者10至30个碳原子的脂族、芳基或芳基烷基,包括未取代的基团及其取代的衍生物,如本文所描述,其可包括但不限于杂芳基、杂芳基烷基、杂环烷基等。因此,当本文中的取代基被表征为例如“ C_1 - C_{30} 烷基”时,短语“ C_1 - C_{30} 烷基”是指并且包括未取代的和取代的 C_1 - C_{30} 烷基,除非另有明确说明。在每种情况下,脂族基团的实例包括但不限于烷基、环烷基、链烯基、环烯基、炔基、链二烯基、环状基团等,并且包括其所有取代的、未取代的、支链的和/或

线性类似物或衍生物,在每种情况下,对于“C₁-C₃₀烃基”和“C₁₀-C₃₀烃基”,分别具有1至30个总碳原子或者10至30个总碳原子。烷基的实例包括但不限于甲基、乙基、丙基、异丙基、正丁基、叔丁基、异丁基、戊基、己基、异己基、庚基、4,4-二甲基戊基、辛基、2,2,4-三甲基戊基、壬基、癸基、十一烷基和十二烷基。环烷基部分可以是单环或多环的,实例包括环丙基、环丁基、环戊基、环己基和金刚烷基,包括其任何杂原子取代的衍生物。烷基部分的其他实例具有直链、支链和/或环状部分(例如1-乙基-4-甲基-环己基)。代表性的烯基部分包括乙烯基、烯丙基、1-丁烯基、2-丁烯基、异丁烯基、1-戊烯基、2-戊烯基、3-甲基-1-丁烯基、2-甲基-2-丁烯基、2,3-二甲基-2-丁烯基、1-己烯基、2-己烯基、3-己烯基、1-庚烯基、2-庚烯基、3-庚烯基、1-辛烯基、2-辛烯基、3-辛烯基、1-壬烯基、2-壬烯基、3-壬烯基、1-癸烯基、2-癸烯基和3-癸烯基。代表性的炔基部分包括乙炔基、丙炔基、1-丁炔基、2-丁炔基、1-戊炔基、2-戊炔基、3-甲基-1-丁炔基、4-戊炔基、1-己炔基、2-己炔基、5-己炔基、1-庚炔基、2-庚炔基、6-庚炔基、1-辛炔基、2-辛炔基、7-辛炔基、1-壬炔基、2-壬炔基、8-壬炔基、1-癸炔基、2-癸炔基和9-癸炔基。芳基或芳基烷基部分的实例包括但不限于蒽基、天青基、联苯、茛基、茛满、茛基、萘基、菲苯基、苯基、1,2,3,4-四氢萘、甲苯基、二甲苯基、均三甲苯基、苄基等,包括其任何杂原子取代的衍生物。

[0116] 除非另有指示,术语“取代的”在用于描述化学结构或部分时是指此结构或部分的衍生物,其中(i)多价非碳原子(例如,氧、氮、硫、磷等)键合到所述化学结构或部分的一个或多个碳原子(例如,“取代的”C₄烃基可以包括但不限于嘧啶基部分、吡啶基部分、二噁烷基(dioxanyl)部分、二乙醚部分、丙酸甲酯部分、N,N-二甲基乙酰胺部分、丁氧基部分等,“取代的”芳基C₁₂烃基可以包括但不限于二苯醚部分、二苯甲酮部分等),或者(ii)其氢原子中的一个或多个(例如,氯苯一般可表征为被氯原子“取代”的芳基C₆烃基)利用化学部分或官能团被取代的,如:酰基、醇、烷氧基、烷酰氧基、烷氧基羰基、链烯基、烷基(例如,甲基、乙基、丙基、叔丁基)、炔基、烷基羰基氧基(-OC(O)烷基)、酰胺(-C(O)NH-烷基或-烷基NHC(O)烷基)、伯、仲和叔氨基(如烷基氨基、芳基氨基、芳基烷基、芳基烷基氨基)、芳基、芳基烷基、芳基氧基、偶氮、叠氮、氨基甲酰基(-NHC(O)O-烷基或-OC(O)NH-烷基)、氨基甲酰基(例如,CONH₂,以及CONH-烷基、CONH-芳基和CONH-芳基烷基)、羧基、羧酸、氰基、环烷基、环烯基、酯、醚(例如,甲氧基、乙氧基)、卤代、卤代烷基(例如,-CCl₃、-CF₃、-C(CF₃)₃)、卤代烷氧基、三卤代甲烷磺酰基、三卤代甲磺酰氨基、杂烷基、杂环烷基、杂芳基、杂芳烷基、异氰酸酯基、异硫氰酸酯基、腈、硝基、氧代、磷酸二酯基、甲硅烷基、硫化物、磺酰氨基(例如,SO₂NH₂)、砜、亚砜、亚硫基、亚硫酰基、磺酰基(包括烷基磺酰基、芳基磺酰基和芳基烷基磺酰基)、亚砷、硫羰基、硫代氨基甲酰基、氰硫基、硫醇(例如,硫氢基、硫醚)或尿素(-NHCONH-烷基-)。

[0117] 治疗方法

[0118] 本文还提供了治疗方法,包括治疗病毒感染如冠状病毒感染的方法。病毒感染可以是哺乳动物中的感染。

[0119] 在一些实施例中,方法包括向哺乳动物施用有效量的本文所描述的化合物或者本文所描述的药物制剂。

[0120] 病毒感染可以是RNA病毒感染。在一些实施例中,RNA病毒感染是由选自以下组成的群组中的病毒科的RNA病毒引起的:丝状病毒科(Filoviridae)、正粘病毒科(Orthomyxoviridae)、副粘病毒科(Paramyxoviridae)、肺病毒科(Pneumoviridae)、白纤病

毒科 (Phenuiviridae)、内罗病毒科 (Nairoviridae)、沙粒病毒科 (Arenaviridae)、黄病毒科 (Flaviviridae) 和冠状病毒科 (Coronaviridae)。

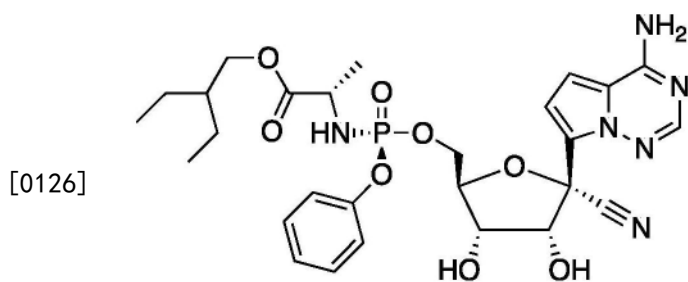
[0121] 可以使用用于评价抗冠状病毒活性和细胞毒性的常规技术, 筛查本文提供的化合物(包括前药)对SARS-CoV-2和相关冠状病毒(或其他病毒)的抑制活性。通常, 首先针对体外对冠状病毒的抑制来对化合物进行筛查, 然后对那些显示出显著抗病毒活性的药物进行体内的功效筛查。

[0122] 潜在有用的体外测定的非限制性实例包括以下: a) 使用人腺癌细胞系 (HCT-8 (ATCC CCL-244)) 中的OC43 β -冠状病毒株 (ATCC 1558), 或者使用MRC-5人肺成纤维细胞中的冠状病毒229E。终点可以包括半定量RT-PCR和通过三次连续稀释确定的pfu。b) 可以使用实验室和临床分离的SARS-CoV-2在Vero E6细胞、Caco-2、Calu-3、HPSC人肺细胞或Huh7.5细胞中研究化合物的活性。最初的SARS CoV-2生长抑制测定可以使用商业化鼠抗SARS CoV-2刺突蛋白检测抗体(货号40021-MM07, 义翘神州公司(SinoBiological.com))对在12孔板中生长的Vero细胞上的空斑减少进行量化。还可以通过在Vero细胞层(cell lawn)上连续稀释和RT-PCR来定量培养上清液中的病毒。可以使用例如可以从BEI资源获得的实验室株(毒株NR52281和NR52282), 以及可以从参与临床试验的患者中分离的临床毒株。细胞毒性可以通过商业化的MTT或Cell Titer Glo来测量。可以选择具有最低的90%抑制浓度和需要最高浓度诱导细胞毒性的化合物进行进一步评价。还可以在用于SARS CoV感染的肺外植体模型中对抗冠状病毒的化合物进行评价。为了确定在来自临床上受病毒影响最大的器官的原代细胞中的活性, 可以将Vero E6细胞中具有最高治疗性指数的候选分子进展到在人肺外植体中进行研究。

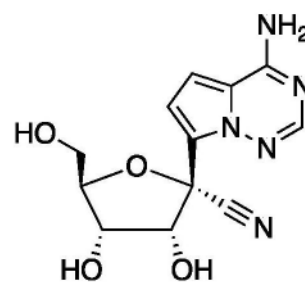
[0123] 生产化合物的方法

[0124] 本文还提供了生产化合物的方法, 如本文所描述的化合物, 其可以是前药。

[0125] 本文提供的化合物可以通过多种工艺来制备, 包括本文描述的工艺。在一些实施例中, 制备了瑞德西韦核苷, RVn, 2的受保护类似物, 然后与合适的烷氧基烷基磷酸酯偶联以形成磷酸二酯。移除保护基团可以得到式(I)的化合物。



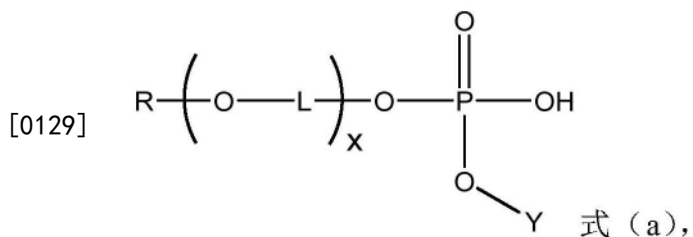
瑞德西韦, RDV, 1



瑞德西韦核苷, RVn, 2

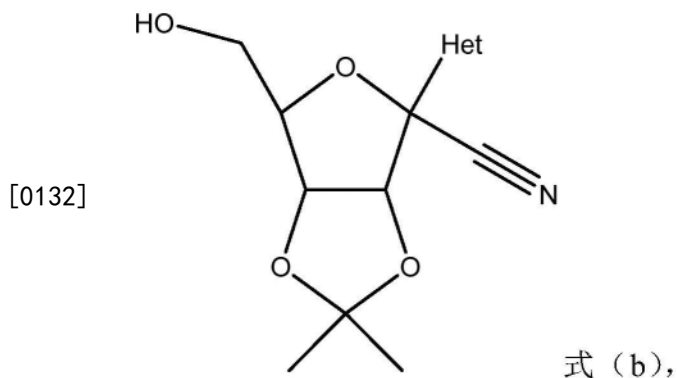
[0127] 在一些实施例中, 2-C-(4-氨基吡咯并[2,1-f][1,2,4]三嗪-7-基)-2,5-脱氢-D-丙腈 (2-C-(4-aminopyrrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-yl)-2,5-anhydro-D-altronitrile) (RVn, 2) 首先转化为其2',3'-亚异丙基衍生物。可以利用N,N-二环己基碳二亚胺(DCC)和N,N-二甲基氨基吡啶(DMAP)在适合制备磷酸二酯的条件下将烷氧基烷基磷酸酯和受保护的RVn的混合物进行处理。通过用稀HCl或其他合适的酸处理移除亚异丙基保护基团, 可以提供合适产率和纯度的式(I)的化合物。

[0128] 在一些实施例中,方法包括提供式 (a) 的化合物:

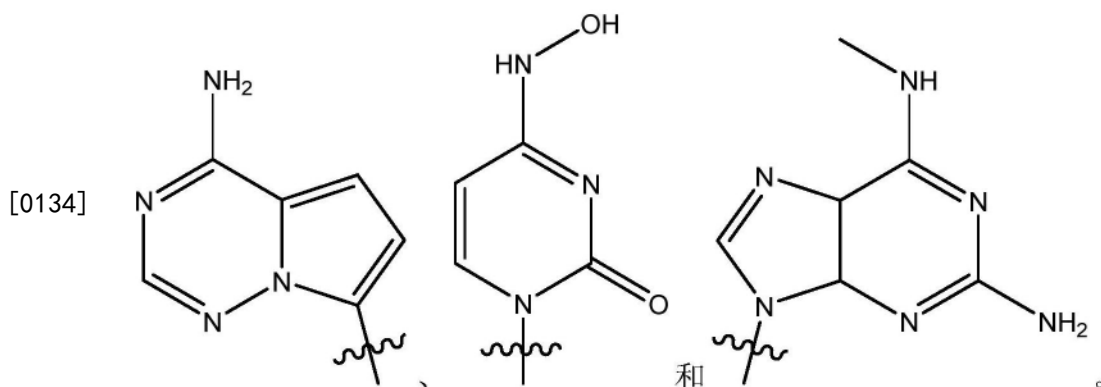


[0130] 其中 x 、R、L和Y按本文进行定义。

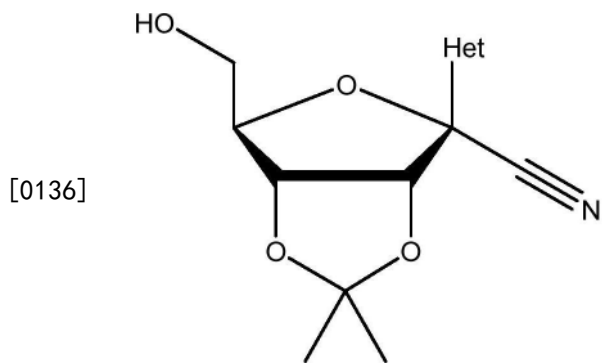
[0131] 在一些实施例中,方法包括提供式 (b) 的化合物:



[0133] 其中Het按本文进行定义。在一些实施例中,Het选自由以下组成的群组:

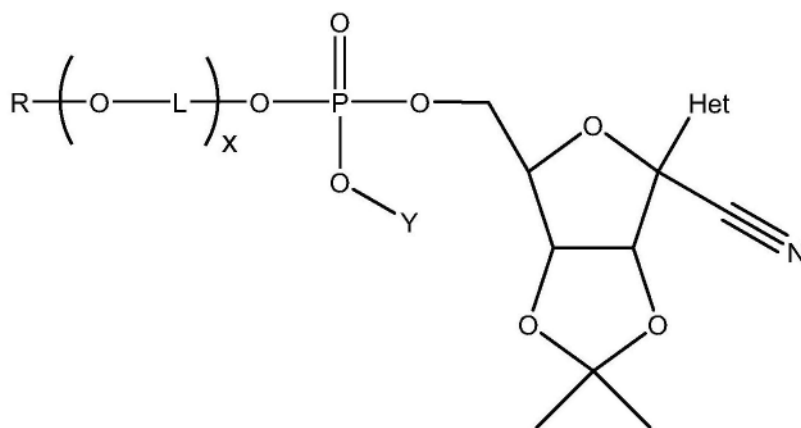


[0135] 此外,如本文所解释的,式 (b) 不包括任何立体化学指示,因此,至少解读为式 (b) 的以下立体异构体:



[0137] 在一些实施例中,方法包括使式 (a) 的化合物与式 (b) 的化合物接触以形成式 (c) 的化合物:

[0138]

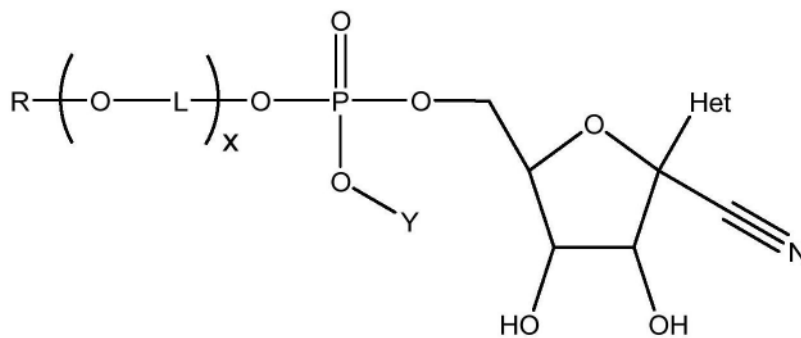


式 (c)。

[0139] 式 (a) 的化合物与式 (b) 的化合物的接触可以在任何温度或压力下进行,并且可以在任何合适的液体存在下进行。液体可以包括 C_1 - C_{30} 烃基,如包括至少一个环状部分、至少一个杂原子(如氮)或其组合的 C_1 - C_{30} 烃基。在一些实施例中,液体是N,N-二环己基碳二亚胺、4-二甲氨基吡啶或其组合。

[0140] 在一些实施例中,方法使式 (c) 的化合物与酸接触以形成式 (d) 的化合物:

[0141]



式 (d)。

[0142] 酸可以包括能够促使形成式 (d) 的化合物的任何酸。酸可以是有机酸或无机酸。酸可以包括卤化氢,如氯化氢。式 (c) 的化合物与酸的接触可以在任何合适的液体存在下进行。液体可以是 C_1 - C_{30} 烃基,如包括至少一个环状部分、至少一个杂原子或其组合的 C_1 - C_{30} 烃基。在一些实施例中,液体是四氢呋喃。

[0143] 在一些实施例中,方法包括进行式 (d) 的化合物的分子内酯化反应以形成环状磷酸酯,如3',5'-环状磷酸酯。

[0144] 生产药物三磷酸酯的方法

[0145] 本文还提供了生产药物三磷酸酯的方法。在一些实施例中,方法包括:提供多个细胞,使所述多个细胞与一定量的药物接触,将所述多个细胞和所述一定量的药物孵育持续能有效形成药物三磷酸酯的时间段。所述多个细胞可以包括任何合适的细胞。在一些实施例中,所述多个细胞包括Vero E6细胞、Calu-2细胞、Caco-2细胞、MRC5人肺成纤维细胞、Huh7.5细胞和PSC人肺细胞。在一些实施例中,药物包括瑞德西韦或瑞德西韦核苷(GS441524)。

[0146] 所有引用的出版物均通过引用整体并入本文。此外,在以引用的方式并入本文中的参考文献中的术语的定义或用法与本文中提供的所述术语的定义不一致或相反时,本文中提供的所述术语的定义适用,而参考文献中的所述术语的定义不适用。

[0147] 除非另外定义,否则本文使用的所有技术和科学术语和任何首字母缩写具有与本

发明所属领域的普通技术人员通常理解的含义相同的含义。虽然可以在本发明的实践中使用与本文所描述的那些类似或等效的任何方法和材料,但是本文中描述了示例性方法、装置和材料。

[0148] 除非另有指示,否则本发明的实践将采用在本领域技术范围内的常规分子生物学(包含重组技术)、微生物学、细胞生物学、生物化学和免疫学技术。此类技术在文献中有充分的解释,如:《分子克隆实验指南(Molecular Cloning:A Laboratory Manual)》(第2版)(Sambrook等人,1989);《寡核苷酸合成(Oligonucleotide Synthesis)》(M.J.Gait编著,1984);《动物细胞培养(Animal Cell Culture)》(R.I.Freshney编著,1987);《酶学方法(Methods in Enzymology)》(美国学术出版社(Academic Press,Inc.));《分子生物学现代方法(Current Protocols in Molecular Biology)》(F.M.Ausubel等人编著,1987,定期更新);《PCR:聚合酶链式反应(PCR:The Polymerase Chain Reaction)》(Mullis等人编著,1994);《雷明顿:药学科学与实践(Remington,The Science and Practice of Pharmacy)》第20版(利平科特·威廉斯·威尔金斯出版公司(Lippincott,Williams&Wilkins)2003),以及《雷明顿:药学科学与实践》第22版(医药出版社(Pharmaceutical Press)和费城科学大学药学院(Philadelphia College of Pharmacy at University of the Sciences),2012)。

[0149] 尽管已经讨论了常规技术的某些方面以促进各种实施例的公开,但是本申请人决不否认这些技术方面,并且可预期,本公开可涵盖本文中所讨论的一种或多种常规技术方面。

[0150] 本公开可以解决已知方法和工艺的一个或多个问题和缺陷。然而,可以预期,各实施例可以证明在解决许多技术领域中的其他问题和缺陷方面是有用的。因此,本公开不应被解读为局限于解决本文讨论的任何特定问题或缺陷。

[0151] 在本说明书中,当提及或讨论文件、法条或知识项时,这种提及或讨论并不承认文件、法条或知识项或其任何组合在优先权日是公开的、公众已知的、公共常识的一部分或根据适用的法定规定构成现有技术;或者已知与解决本说明书所涉及的任何问题的尝试相关。

[0152] 如本文所使用的,术语“包括(comprises)”、“包括(comprising)”、“包含(includes)”、“包含(including)”、“具有(has)”、“具有(having)”“含有(contains)”、“含有(containing)”、“特征在于”或其任何其他变体旨在涵盖所列举的组件的非排他性包含,经受以其他方式明确指出的任何限制。例如,融合蛋白、药物组合物和/或“包括”要素列表(例如,组分、特征或步骤)的方法不一定仅限于那些元件(或组分或步骤),而是可以包含融合蛋白未明确列出或固有的其他元件(或组分或步骤)、药物组成和/或方法。

[0153] 如本文所使用的,过渡短语“由……组成(consists of)”和“由……组成(consisting of)”不包括未指定的任何要素、步骤或组分。例如,权利要求中使用的“由……组成(consists of)”或“由……组成(consisting of)”将权利要求限制到权利要求中具体列举的组分、材料或步骤,除了通常与其相关的杂质(即,给定组分内的杂质)之外。当短语“由……组成(consists of)”或“由……组成(consisting of)”出现在权利要求主体的条款中,而不是紧接在序言之后时,短语“由……组成(consists of)”或“由……组成(consisting of)”仅限制所述条款中阐述的要素(或组分或步骤);其他要素(或组分)作

为整体未被排除在权利要求之外。

[0154] 如本文所用,过渡短语“基本上由……组成 (consists essentially of/consisting essentially of)”用于定义化合物、药物制剂和/或方法,其还包括除了字面上所公开的那些以外的材料、步骤、特征、组分或要素,前提是这些另外的材料、步骤、特征、组分或要素不会实质性地影响所要求保护的发明的基本的和新颖的特征。术语“基本上由…组成”占据介于“包括”与“由…组成”之间的中间地带。

[0155] 应理解,本文所述的本发明的方面和实施例包含“由方面和实施例组成”和/或“基本上由方面和实施例组成”。

[0156] 术语“一 (a/an)”以及“所述 (the)”意图包括复数个替代方式,例如至少一个/种。例如,除非另有规定,对“化合物”、“药物制剂”、“酸”等的公开意味着涵盖一种或者多于一种的化合物、药物制剂、酸等的混合物或组合。

[0157] 当在两个或更多个项目的列表中使用时,术语“和/或”意指所列出的项目中的任一个可以单独使用或与所列出的项目中的任一个或多个组合使用。例如,表述“A和/或B”旨在意指A和B中的一者或两者,即,单独A,单独B,或者A与B成组合。表达“A、B和/或C”旨在意指单独的A、单独的B、单独的C、组合的A和B、组合的A和C、组合的B和C,或组合的A、B和C。

[0158] 本文可以公开各种数值范围。除非另有规定,否则当申请人公开或要求保护任何类型的范围时,申请人的意图是单独地公开或要求保护这类范围可合理涵盖的每个可能性数值,包括所述范围的端点以及其中所涵盖的任何子范围和子范围组合。此外,本文中所公开的范围的所有端点值为近似值。作为代表性实例,申请人在一些实施例中公开了“a为15至25”。这一范围应解释为涵盖15和25,并进一步涵盖16、17、18、19、20、21、22、23和24中的每一个,包括任何这些值之间的任何范围和子范围。

[0159] 当表达这类值或范围时,公开的其他实施例包括所列举的特定值、从一个特定值和/或到其他特定值。类似地,当值被表示为近似值时,通过使用先行词“约”,将理解为特定值形成另一个实施例。将进一步理解,其中公开了多个值,并且每个值在本文还被公开为除了值本身之外的“约”所述特定值。在实施例中,“约”可以用于表示例如在所列举值的10%以内、在所列举值的5%以内或者在所列举值的2%以内。

[0160] 如本文所用,术语“药物组合物”是指药学上可接受的组合物,其中所述组合物包含药学活性剂,并且在一些实施例中进一步包含药学上可接受的载体。在一些实施例中,药物组合物可以是药物活性剂和载体的组合。

[0161] 术语“组合”是指采用一种剂量单位形式的固定组合或用于组合施用的成套试剂盒,其中一种或多种活性化合物和组合配偶体(例如,如下所述的另一种药物,也称为“治疗剂”或“辅剂”)可以同时或单独地在时间间隔内独立施用。在一些情况下,组合配偶体示出协作性,例如协同效应。如本文所使用的,术语“共同施用”或“组合施用”等意指涵盖向有需要的单个受试者(例如,患者)施用所选组合配偶体,并且旨在包含其中不一定通过相同的施用途径或同时施用药剂的治疗方案。如本文所使用的,术语“药物组合物”意指由多于一种活性成分混合或组合而成的产物,并且包含活性成分的固定和非固定组合两者。术语“固定组合”意指活性成分,例如化合物和组合配偶体,都以单一实体或剂量的形式同时施用于患者。术语“非固定组合”意指活性成分,例如化合物和组合配偶体,都作为单独的实体同时、并发或顺序施用于患者,没有特定的时间限制,其中此类施用在患者体内提供了治疗有

效水平的两种化合物。后者同样适用于鸡尾酒疗法,例如施用三种或更多种的活性成分。

[0162] 如本文所使用的,术语“药学上可接受的”意指除可安全用于动物并且更具体地可用于人和/或非人哺乳动物的其他制剂之外由联邦或州政府的监管机构批准或列于美国药典、其他公认的药典中。

[0163] 如本文所使用的,术语“药学上可接受的载体”是指与去甲基化化合物一起施用的赋形剂、稀释剂、防腐剂、增溶剂、乳化剂、佐剂和/或载剂。此类载体可以是无菌液体,如水和油,包含石油、动物、植物或合成来源的那些油,如花生油、大豆油、矿物油、芝麻油等,聚乙二醇、甘油、丙二醇或其他合成溶剂。抗菌剂,如苯甲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;以及用于调节渗透压的药剂,如氯化钠或葡萄糖也可以是载体。本领域技术人员已知用于产生与载体组合的组合物。在一些实施例中,语言“药学上可接受的载体”旨在包含与药物施用相容的任何和所有溶剂、分散介质、包衣、等渗剂以及吸收延迟剂等。此类介质和药剂用于药学上活性物质的用途是所属领域熟知的。参见,例如,《雷明顿:药学科学与实践》第20版(利平科特·威廉斯·威尔金斯出版公司2003)。除了任何常规介质或药剂与活性化合物不相容的情况之外,设想此类介质或药剂在组合物中的用途。

[0164] 如本文所用,“治疗有效量”是指足以治疗或改善或者以某种方式减轻与疾病和医学病况相关的症状的药学活性化合物的量。当参照一种方法使用时,所述方法足以有效地治疗或改善或以某种方式减少与疾病或病况相关的症状。例如,涉及疾病的有效量是足以阻止或防止发病的量;或者如果疾病病理学已经开始,则减轻、改善、稳定、逆转或减缓疾病的进展,或者以其他方式减少疾病的病理后果。在任何情况下,有效量可以单次剂量或分次剂量给药。

[0165] 如本文所用,术语“治疗(treat)”、“治疗(treatment)”或“治疗(treating)”包括至少对与患者疾病相关的症状的改善,其中改善在广义上用于指至少降低参数的幅度,例如与正在治疗的疾病或病况相关的症状。因此,“治疗”还包括使疾病、病症或病理病况或至少与其相关的症状完全抑制(例如,防止出现)或停止(例如,终止),使得患者不再遭受所述病况或至少表征所述病况的症状的情形。

[0166] 如本文所使用的,除非另有规定,术语“预防(prevent)”、“预防(preventing)”和“预防(prevention)”是指预防疾病或病症或其一种或多种症状发作、复发或扩散。在某些实施例中,所述术语是指在症状发作之前,使用具有一种或多种其他另外的活性剂的本文所提供的化合物或剂型进行治疗或具体地向有风险患有本文所提供的疾病或病症的受试者施用所述化合物或剂型。这些术语涵盖抑制或减少特定疾病的症状。在某些实施例中,具有家族疾病史的受试者是预防方案的潜在候选者。在某些实施例中,具有复发病史的受试者也是预防的潜在候选者。在这方面,术语“预防”可以与术语“预防性治疗”互换使用。

[0167] 如本文所用,除非另有规定,化合物的“预防有效量”是足以预防疾病或病症或者防止其复发的量。预防有效量的化合物意指在疾病预防中提供预防性益处的治疗剂单独或与一种或多种其他药剂组合的量。术语“预防有效量”可以涵盖改善整体预防或增强另一种预防剂的预防功效的量。如本文所用,除非另有规定,术语“受试者”在本文中被定义为包括动物,如哺乳动物,包括但不限于灵长类动物(例如,人类)、牛、绵羊、山羊、马、狗、猫、兔、大鼠、小鼠等。在具体实施例中,受试者是人。术语“受试者”和“患者”在本文中可互换使用,例

如指哺乳动物受试者,如人类。

[0168] 如本文所用,除非另有规定,本文所描述的化合物旨在涵盖所有可能的立体异构体,除非规定了特定的立体化学。在化合物的结构异构体能通过低能障相互转换的情况下,所述化合物可以以单一互变异构体或互变异构体的混合物存在。这可以采取质子互变异构的形式;或化合物中所谓的价键互变异构,例如含有芳族部分的化合物。

[0169] “核酸”或“核酸分子”是指包含两种或多种共价键合的核苷或具有含氮杂环碱基的核苷类似物或碱基类似物的多聚体化合物,其中核苷通过磷酸二酯键或其他键连接在一起形成多核苷酸。核酸包含RNA、DNA或嵌合DNA-RNA聚合物或寡核苷酸及其类似物。核酸骨架可以由多种键组成,包括糖-酸二酯键、肽-核酸键、硫代磷酸酯键、甲基膦酸酯键或其组合中的一种或多种。核酸的糖部分可以是核糖、脱氧核糖或具有已知取代基(例如2'-甲氧基取代基和2'-卤化物取代基)的类似化合物。含氮碱基可以是常规的碱基(A、G、C、T、U)或其类似物(例如,肌苷、5-甲基异胞嘧啶、异鸟嘌呤)。核酸可以仅包含在RNA和DNA中发现的常规糖、碱基和键,或者可以包括常规组分和取代基(例如,通过2'-甲氧基骨架连接的常规碱基,或者包括常规碱基和一种或多种碱基类似物的混合物的核酸)。核酸可以包括“锁核酸”(LNA),其中一个或多个核苷酸单体具有锁定在模拟糖构象的RNA中的双环呋喃糖单元,其增强了对单链RNA(ssRNA)、单链DNA(ssDNA)或双链DNA(dsDNA)中互补序列的杂交亲和力。核酸可以包括修饰的碱基以改变核酸的功能或行为(例如,添加3'-末端双脱氧核苷酸以阻止将额外的核苷酸添加到核酸中)。尽管可以使用常规技术从天然来源纯化核酸,但体外制备核酸的合成方法在本领域中是公知的。核酸可以是单链或双链。

[0170] 核酸通常是单链或双链,并且一般含有磷酸二酯键,尽管如本文所概述在某些情况下包括可能具有交替主链的核酸类似物,包括例如但不限于:磷酰胺(Beaucage等人.(1993)《四面体(Tetrahedron)》49(10):1925及其中的参考文献;Letsinger(1970)《有机化学杂志(J. Org. Chem.)》35:3800;Sprinzl等人.(1977)《欧洲生物化学杂志(Eur. J. Biochem.)》81:579;Letsinger等人.(1986)《核酸研究(Nucl. Acids Res.)》14:3487;Sawai等人.(1984)《化学快报(Chem. Lett.)》805;Letsinger等人.(1988)《美国化学会志(J. Am. Chem. Soc.)》110:4470;以及Pauwels等人.(1986)Chemica Scripta 26:1419,其各自通过引用并入),硫代磷酸酯(Mag等人.(1991)《核酸研究》19:1437;和美国专利第5,644,048号,这两者都通过引用并入)、二硫代磷酸酯(Briu等人.(1989)《美国化学会志》111:2321,其通过引用并入)、O-甲基磷酰胺(O-methylphosphoroamidite)键(参见Eckstein,《寡核苷酸和类似物实用方法(Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach)》,牛津大学出版社(1992),其通过引用并入)以及肽核酸主链和键(参见,Egholm(1992)《美国化学会志》114:1895;Meier等人(1992)《德国应用化学(Chem. Int. Ed. Engl.)》31:1008;Nielsen(1993)《自然》365:566;以及Carlsson等人(1996)《自然》380:207,每一个均通过引用并入)。其他类似物核酸包括带正电荷骨架的那些(Denpcy等人.(1995)《美国国家科学院院报(Proc. Natl Acad. Sci. USA)》92:6097,其通过引用并入);非离子型骨架(美国专利第5,386,023号、第5,637,684号、第5,602,240号、第5,216,141号和第4,469,863号;Angew(1991)Chem. Intl. Ed. English 30:423;Letsinger等人.(1988)《美国化学会志》110:4470;Letsinger等人.(1994)《核苷与核苷酸(Nucleoside&Nucleotide)》13:1597;《ASC研讨会系列580(ASC Symposium Series 580)》第2章和第3章,“反义研究中的碳水化合物修

饰 (Carbohydrate Modifications in Antisense Research)”, Y.S.Sanghvi 和 P.Dan Cook 编辑; Mesmaeker 等人 (1994) 《生物有机与药物化学快报 (Bioorganic&Medicinal Chem: Lett.)》4:395; Jeffs 等人. (1994) 《生物分子核磁共振杂志 (J.Biomolecular NMR)》34:17; 以及《四面体快报》37:743 (1996), 其各自通过引用并入) 以及非核糖主链, 包括以下文献中描述的那些: 美国专利第 5,235,033 号和第 5,034,506 号, 以及《ASC 研讨会系列 580 (ASC Symposium Series 580)》第 6 章和第 7 章, 反义研究中的碳水化合物修饰 (Carbohydrate Modifications in Antisense Research), Y.S.Sanghvi 和 P.Dan Cook 编辑, 所述引用文献各自均通过引用并入。含有一种或多种碳环糖的核酸也被包括在核酸的定义中 (参见 Jenkins 等人. (1995) 《化学学会评论 (Chem.Soc.Rev.)》第 169-176 页, 其通过引用并入)。几种核酸类似物也记载于例如 Rawls, 《化学与工程新闻 (C&E News)》1997 年 6 月 2 日第 35 页中, 其通过引用并入。核糖-磷酸骨架的这些修饰可以促使添加其他部分 (如标记) 或增加生理环境中这些分子的稳定性和半衰期。

[0171] 除了通常在核酸中发现的这些天然存在的杂环碱基 (例如, 腺嘌呤、鸟嘌呤、胸腺嘧啶、胞嘧啶和尿嘧啶), 核酸类似物还包括具有非天然存在的杂环或修饰碱基的那些, 其中许多在本文中进行了描述或以其他方式进行了提及。特别地, 许多非天然存在的碱基进一步记载于例如: Seela 等人. (1991) 《瑞士化学学报 (Helv.Chim.Acta)》74:1790, Grein 等人. (1994) 《生物有机与药物化学快报》4:971-976; 以及 Seela 等人. (1999) 《瑞士化学学报》82:1640, 每一个均通过引用并入。为了进一步说明, 任选地包括在核苷酸中用作解链温度 (T₀) 改良剂的某些碱基。例如, 这些中的一些包括 7-脱氮嘌呤 (例如, 7-脱氮鸟嘌呤、7-脱氮腺嘌呤等)、吡唑并 [3,4-d] 嘧啶、丙炔基-dN (例如, 丙炔基-dU、丙炔基-dC 等) 等等。参见, 例如, 1999 年 11 月 23 日授予 Seela 的名称为 “7-脱氮-2'-脱氧鸟苷核苷酸的合成 (SYNTHESIS OF 7-DEAZA-2'-DEOXYGUANOSINE NUCLEOTIDES)” 的美国专利第 5,990,303 号, 其通过引用并入本文。其他代表性的杂环碱基包括例如: 次黄嘌呤、肌苷、黄嘌呤; 2-氨基嘌呤、2,6-二氨基嘌呤、2-氨基-6-氯嘌呤、次黄嘌呤、肌苷和黄嘌呤的 8-氮杂衍生物; 腺嘌呤、鸟嘌呤、2-氨基嘌呤、2,6-二氨基嘌呤、2-氨基-6-氯嘌呤、次黄嘌呤、肌苷和黄嘌呤的 7-去氮-8-氮杂衍生物; 6-氮杂胞嘧啶; 5-氟胞嘧啶; 5-氯胞嘧啶; 5-碘胞嘧啶; 5-溴胞嘧啶; 5-甲基胞嘧啶; 5-丙炔基胞嘧啶; 5-溴乙烯基尿嘧啶; 5-氟尿嘧啶; 5-氯尿嘧啶; 5-碘尿嘧啶; 5-溴尿嘧啶; 5-三氟甲基尿嘧啶; 5-甲氧基甲基尿嘧啶; 5-乙炔基尿嘧啶; 5-丙炔基尿嘧啶等等。

[0172] 修饰碱基和核苷酸的实例还记载于例如: 1996 年 1 月 16 日授予 Froehler 等人的名称为 “含有 5-丙炔基嘧啶的寡核苷酸 (OLIGONUCLEOTIDES CONTAINING 5-PROPYNYL PYRIMIDINES)” 的美国专利第 5,484,908 号, 1997 年 7 月 8 日授予 Froehler 等人的名称为 “用含有修饰的嘧啶的低聚物增强三螺旋和双螺旋形成 (ENHANCED TRIPLE-HELIX AND DOUBLE-HELIX FORMATION WITH OLIGOMERS CONTAINING MODIFIED PYRIMIDINES)” 的美国专利第 5,645,985 号, 1998 年 11 月 3 日授予 Froehler 等人的名称为 “使用含有修饰嘧啶的寡聚物的方法” 的美国专利第 5,830,653 号, 2003 年 10 月 28 日授予 Kochkine 等人的名称为 “[2.2.1] 双环核苷的合成 (SYNTHESIS OF [2.2.1] BICYCLO NUCLEOSIDES)” 的美国专利第 6,639,059 号, 2001 年 10 月 16 日授予 Skouv 的名称为 “复杂生物样品中核酸的一步法样品制备与检测 (ONE STEP SAMPLE PREPARATION AND DETECTION OF NUCLEIC ACIDS IN COMPLEX BIOLOGICAL SAMPLES)” 的美国专利第 6,303,315 号, 以及 2003 年 5 月 15 日公开的 Kochkine 等

人的名称为“[2.2.1]双环核苷的合成 (SYNTHESIS OF [2.2.1]BICYCLO NUCLEOSIDES)”的美国专利申请公开第2003/0092905号,它们各自通过引用并入本文。

[0173] “寡核苷酸”或“寡聚物”是指包括至少两个核酸单体单元(例如,核苷酸)、通常多于三个单体单元、更通常多于十个单体单元的核酸。寡核苷酸的确切大小一般取决于各种因素,包括寡核苷酸最终的功能或用途。寡核苷酸任选通过任何合适的方法制备,包括但不限于:分离已有或天然的序列,DNA复制或扩增,对适当序列的逆转录、克隆和限制性消化,或者通过方法(如:Narang等人(1979)《酶学方法 (Meth.Enzymol.)》68:90-99中的磷酸三酯法;Brown等人(1979)《酶学方法》68:109-151中的磷酸二酯法;Beaucage等人(1981)《四面体快报》22:18 59-1862中的二乙基亚磷酰胺法;Matteucci等人(1981)《美国化学会志》103:3185-3191中的三酯法)进行的直接化学合成,自动化合成法,或者美国专利第4,458,066号中的固相载体法,或者本领域已知的其他方法。所有这些参考文献均通过引用并入。

[0174] 本公开的化合物和用于抑制RNA病毒的用途的方法包括以下病毒科:丝状病毒科、正粘病毒科、副粘病毒科、肺病毒科、白纤病毒科、内罗病毒科、沙粒病毒科、黄病毒科和冠状病毒科。下表中包括了每个科中的示例性病毒的名称。

[0175] 可被本公开的化合物抑制的RNA病毒科

[0176]

病毒科	病毒
丝状病毒科	埃博拉病毒
	苏丹型埃博拉病毒 (Sudan virus)
	本迪布焦型埃博拉病毒 (Bundibugyo virus)
	Bombali 型埃博拉病毒 (Bombali virus)
	莱斯顿型埃博拉病毒 (Reston virus)
	马尔堡病毒 (Marburg virus)
	拉夫病毒 (Ravn virus)
正粘病毒科	流感病毒
副粘病毒科	尼帕病毒
	亨德拉病毒
	人副流感病毒
	麻疹病毒
	流行性腮腺炎病毒
	索舒加病毒 (Sosuga virus)
肺病毒科 (Pneumoviridae)	呼吸道合胞病毒
	人偏肺病毒 (Human Metapneumovirus)
白纤病毒科	裂谷热病毒
	蓬托罗病毒 (Punta Toro phlebovirus)
内罗病毒科	克里米亚刚果出血热病毒
	杜贝病毒 (Dugbe virus)
沙粒病毒科	拉沙病毒
	胡宁病毒
	淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒
	瓜纳瑞托病毒
	马秋博病毒
黄病毒科	基萨那森林病病毒 (Kysanur Forest Disease virus)
	鄂木斯克出血热病毒
	黄热病病毒
	乙型脑炎病毒
	丙型肝炎病毒
	寨卡病毒
	登革热病毒
	西尼罗河病毒
	蜱传脑炎病毒
	墨累谷热脑炎病毒 (Murray Valley Fever encephalitis Virus)
	昆津病毒

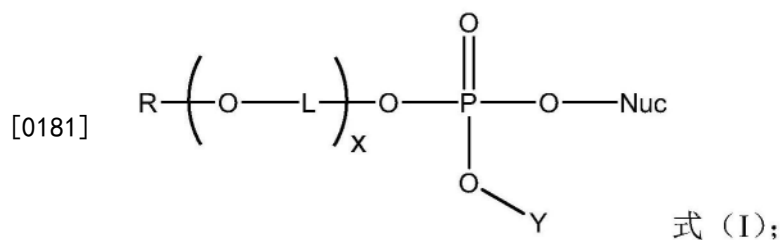
[0177]

病毒科	病毒
	圣路易斯脑炎病毒
	牛病毒性腹泻病毒
冠状病毒科	SARS-CoV-2
	MERS
	SARS CoV
	OC43
	229E
	NL43
	进化中的人畜共患和人冠状病毒
	猫传染性腹膜炎病毒

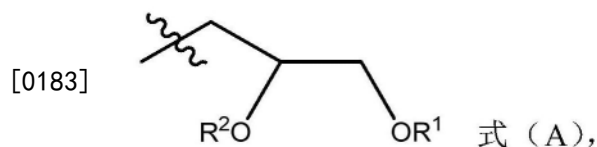
[0178] 实施例

[0179] 在以下列表中提供本文描述的化合物、药物制剂和方法的实施例：

[0180] 实施例1. 式 (I) 的化合物或其药学上可接受的盐:



[0182] 其中Nuc选自由以下组成的群组: 抗病毒核苷和抗病毒核苷类似物; Y独立地选自由以下组成的群组: 氢、 C_1 - C_{30} 烷基、药学上可接受的阳离子和与抗病毒核苷或抗病毒核苷类似物的五碳糖部分的碳原子的共价键; x为0或1; L独立地是 C_1 - C_{30} 烷基; 并且R独立地选自由以下组成的群组: C_{10} - C_{30} 烷基和式 (A) 的取代基;



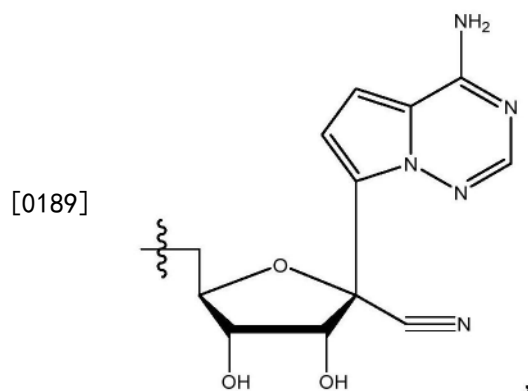
[0184] 其中 R^1 和 R^2 独立地选自由以下组成的群组: 氢和 C_1 - C_{30} 烷基;

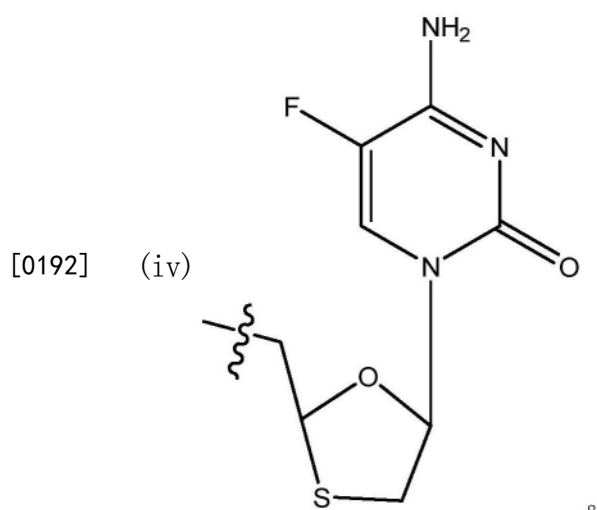
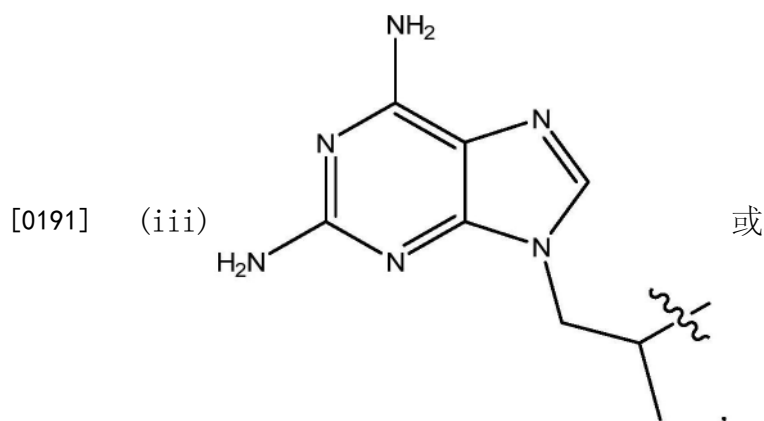
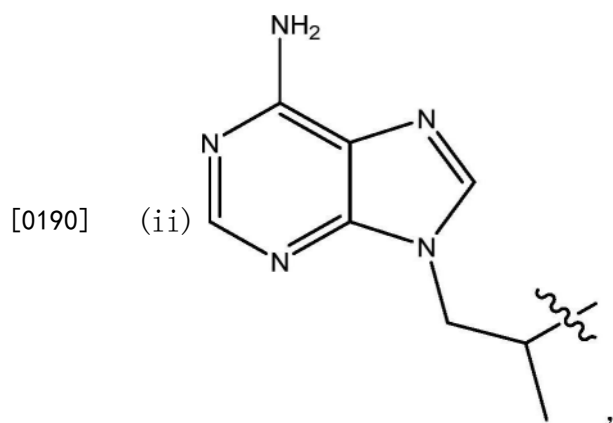
[0185] 其中任选地, 所述式 (I) 的化合物 (i) 实现第一核苷磷酸化的激酶旁路, (ii) 提供增加的口服可生物利用性, (iii) 向肺部和胃肠道递送抗病毒方面显著的浓度和制剂, (iv) 在(如血管内)施用单次剂量后在血浆中提供持续至少约5至约30天的持久水平, 或者 (v) 其组合。

[0186] 实施例2. 根据实施例1所述的化合物, 其中所述抗病毒核苷或所述抗病毒核苷类似物分别是抗病毒核糖核苷或抗病毒核糖核苷类似物。

[0187] 实施例3. 根据前述实施例中任一项所述的化合物, 其中Nuc选自由以下组成的群组: GS-441524、 β -D- N^4 -羟基胞苷 (NHC) 和 (2'R)-2-氨基-2'-脱氧-2'-氟-N,2'-二甲基腺苷。

[0188] 实施例4. 根据前述实施例中任一项所述的化合物, 其中Nuc是: (i) GS-441524;





[0193] 实施例5. 根据前述实施例中任一项所述的化合物, 其中Y是未取代的 C_1 - C_6 烷基、 C_1 - C_{20} 烃基、 C_1 - C_{10} 烃基、 C_1 - C_6 烃基或 Na^+ 。

[0194] 实施例6. 根据前述实施例中任一项所述的化合物, 其中Y包含至少一个环状部分。

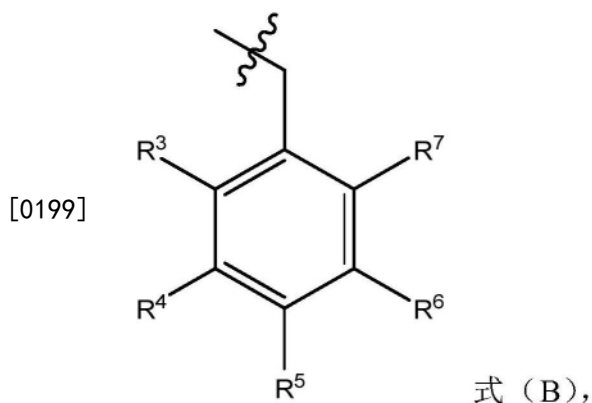
[0195] 实施例7. 根据前述实施例中任一项所述的化合物, 其中Y选自由以下组成的群组: 芳基、芳基烷基、杂芳基、杂芳基烷基和杂环烷基, 它们中的每一者是未取代或取代的。

[0196] 实施例8. 根据前述实施例中任一项所述的化合物, 其中所述杂芳基是未取代或取代的吡啶基。

[0197] 实施例9. 根据前述实施例中任一项所述的化合物, 其中所述芳基烷基是未取代或取代的苄基。

[0198] 实施例10. 根据前述实施例中任一项所述的化合物, 其中所述未取代或取代的苄

基具有根据式 (B) 的结构:



[0200] 其中 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 和 R^7 独立地选自由以下组成的群组:氢、烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、芳基、杂芳基、杂环基、芳基(烷基)、杂芳基(烷基)、(杂环基)烷基、羟基、烷氧基、酰基、氰基、卤素、硫羰基、O-氨基甲酰基、N-氨基甲酰基、O-硫代氨基甲酰基、N-硫代氨基甲酰基、C-酰氨基、N-酰氨基、S-磺酰氨基、N-磺酰氨基、C-羧基、O-羧基、异氰酸基、硫代氰酸基、异硫氰基、硝基、叠氮基、甲硅烷基、亚氧硫基、亚硫酰基、磺酰基、卤代烷基、卤代烷氧基、三卤代甲烷磺酰基、三卤代甲磺酰氨基、氨基、单取代的氨基和二取代的氨基。

[0201] 实施例11.根据前述实施例中任一项所述的化合物,其中 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 和 R^7 中的至少两个是氢。

[0202] 实施例12.根据前述实施例中任一项所述的化合物,其中R: (i) 是未取代或取代的 C_{12} - C_{24} 烃基, (ii) 包含0至6个不饱和键, (iii) 包含环丙基部分,或(iv) 其组合。

[0203] 实施例13.根据前述实施例中任一项所述的化合物,其中R: (i) 是未取代或取代的 C_{13} - C_{29} 杂烷基, (ii) 包含0至6个不饱和键,或(iii) 其组合。

[0204] 实施例14.根据前述实施例中任一项所述的化合物,其中R选自由以下组成的群组:

[0205] (i) $\text{---}(\text{CH}_2)_a\text{CH}_3$ 其中a为1至29;以及

[0206] (ii) $\text{---}(\text{CH}_2)_b\text{O}(\text{CH}_2)_c\text{CH}_3$ 其中b为1至29,c为0至28,并且b与c之和为29或更小。

[0207] 实施例15.根据前述实施例中任一项所述的化合物,其中(i) a为15至25,或者(ii) b为1至4并且c为15至20。

[0208] 实施例16.根据前述实施例中任一项所述的化合物,其中(i) a为19, (ii) b为3并且c为15,或者(iii) b为2并且c为17。

[0209] 实施例17.根据前述实施例中任一项所述的化合物,其中a为8。

[0210] 实施例18.根据前述实施例中任一项所述的化合物,其中 R^1 和/或 R^2 独立地: (i) 是未取代或取代的 C_{12} - C_{24} 烃基, (ii) 包含0至6个不饱和键,或(iii) 其组合。

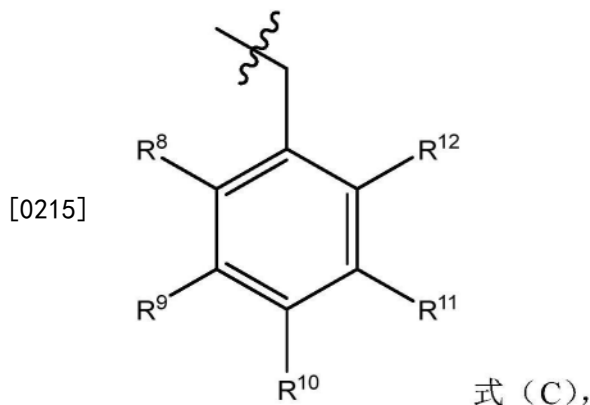
[0211] 实施例19.根据前述实施例中任一项所述的化合物,其中(i) R^1 、(ii) R^2 或者(iii) R^1 和 R^2 两者独立地选自包含至少一个环状部分的 C_1 - C_{30} 烃基。

[0212] 实施例20.根据前述实施例中任一项所述的化合物,其中(i) R^1 、(ii) R^2 或者(iii)

R^1 和 R^2 两者独立地选自由以下组成的群组:芳基、芳基烷基、杂芳基、杂芳基烷基和杂环烷基,它们中的每一者是未取代或取代的。

[0213] 实施例21.根据前述实施例中任一项所述的化合物,其中所述芳基烷基是未取代或取代的苄基。

[0214] 实施例22.根据前述实施例中任一项所述的化合物,其中所述未取代或取代的苄基具有根据式(C)的结构:



[0216] 其中 R^8 、 R^9 、 R^{10} 、 R^{11} 和 R^{12} 独立地选自由以下组成的群组:氢、烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、芳基、杂芳基、杂环基、芳基(烷基)、杂芳基(烷基)、(杂环基)烷基、羟基、烷氧基、酰基、氰基、卤素、硫羰基、O-氨基甲酰基、N-氨基甲酰基、O-硫代氨基甲酰基、N-硫代氨基甲酰基、C-酰氨基、N-酰氨基、S-磺酰氨基、N-磺酰氨基、C-羧基、O-羧基、异氰酸基、硫代氰酸基、异硫氰基、硝基、叠氮基、甲硅烷基、亚氧硫基、亚硫酰基、磺酰基、卤代烷基、卤代烷氧基、三卤代甲烷磺酰基、三卤代甲磺酰氨基、氨基、单取代的氨基和二取代的氨基。

[0217] 实施例23.根据前述实施例中任一项所述的化合物,其中 R^8 、 R^9 、 R^{10} 、 R^{11} 和 R^{12} 中的至少两个是氢。

[0218] 实施例24.根据前述实施例中任一项所述的化合物,其中所述式(A)的取代基是外消旋化合物、sn-1立体异构体(例如,甘油基-sn-1-磷酸基)或sn-3立体异构体(例如,甘油基-sn-3-磷酸基)。

[0219] 实施例25.根据前述实施例中任一项所述的化合物,其中:

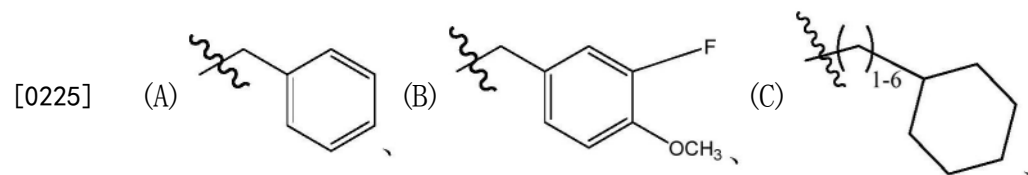
[0220] (i) R^1 和/或 R^2 独立地选自由以下组成的群组:

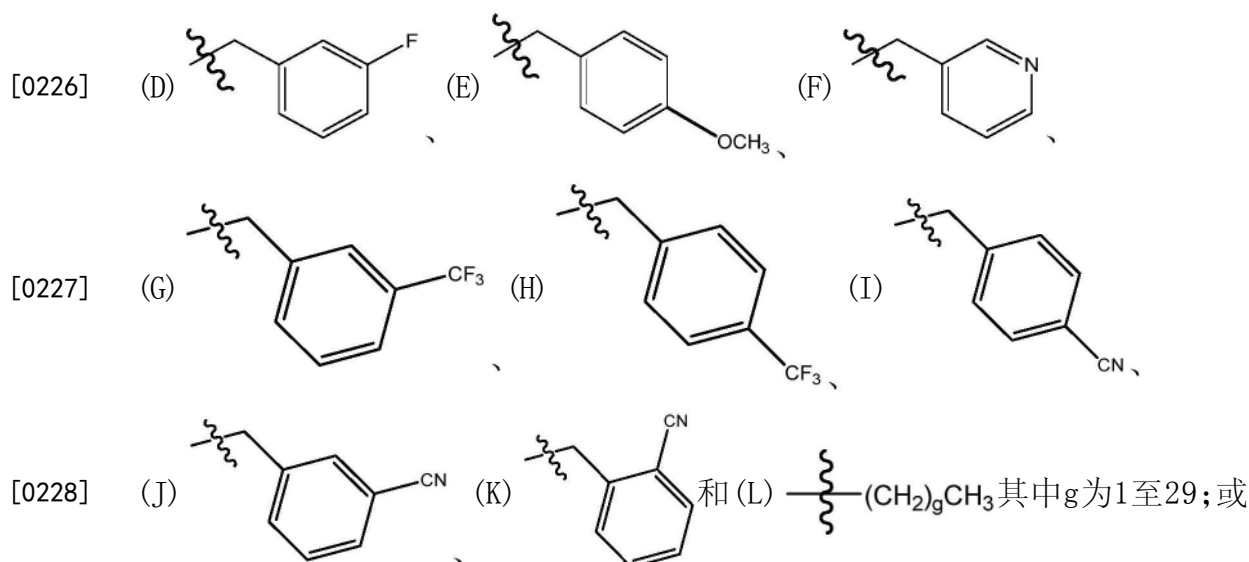
[0221] (a) 其中d为1至29;以及

[0222] (b) ,

[0223] 其中e为1至27,f为0至26,并且e与f之和为27或更小;

[0224] (ii) R^1 和/或 R^2 独立地选自由以下组成的群组:





(iii) 其组合。

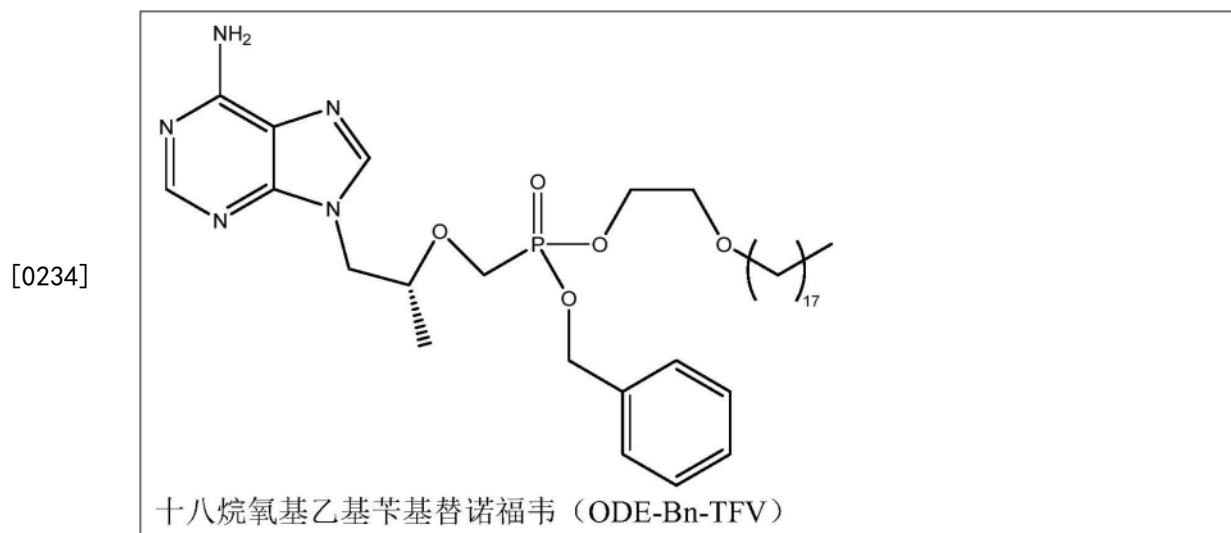
[0229] 实施例26. 根据前述实施例中任一项所述的化合物, 其中g为5至10。

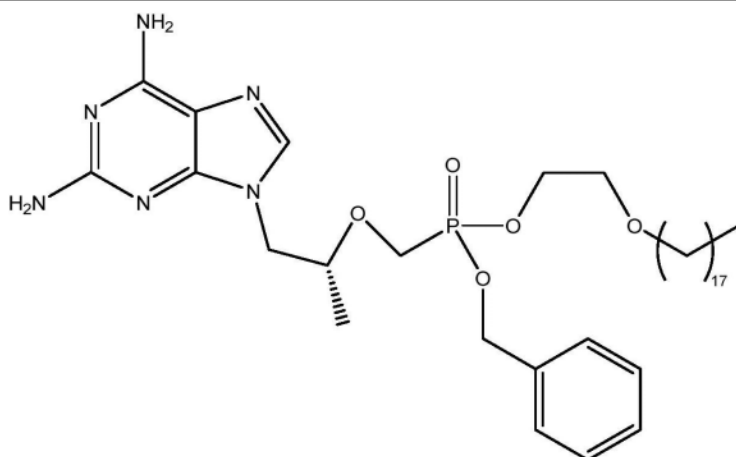
[0230] 实施例27. 根据前述实施例中任一项所述的化合物, 其中g为7。

[0231] 实施例28. 根据前述实施例中任一项所述的化合物, 其中x为1, 并且L为未取代或取代的C₁-C₃烷基。

[0232] 实施例29. 根据前述实施例中任一项所述的化合物, 其中L选自由以下组成的群组: 未取代的甲基、未取代的乙基和未取代的丙基。

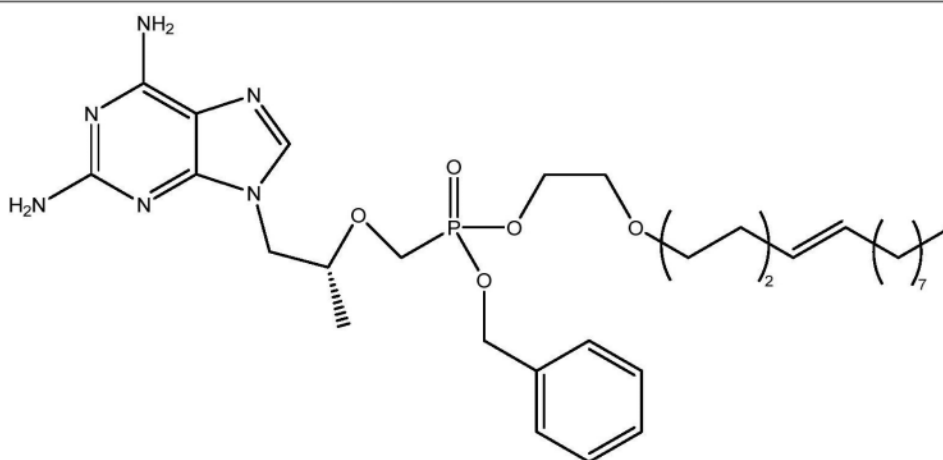
[0233] 实施例30. 根据前述实施例中任一项所述的化合物, 其中所述式(I)的化合物是以下化合物中的至少一种或其药学上可接受的盐:



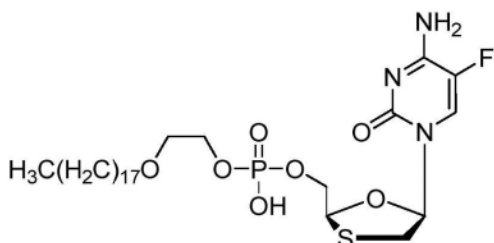


十八烷氧基乙基苄基 9-(R)-[(2-磷酸基甲氧基)丙基]-2,6-二氨基嘌呤
(ODE-Bn-PMPDAP)

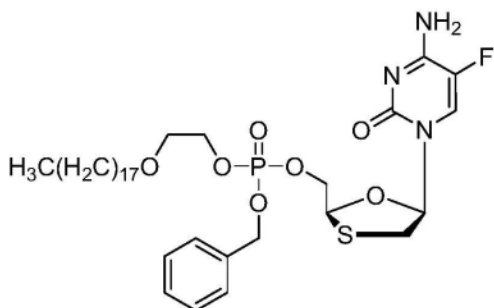
[0235]



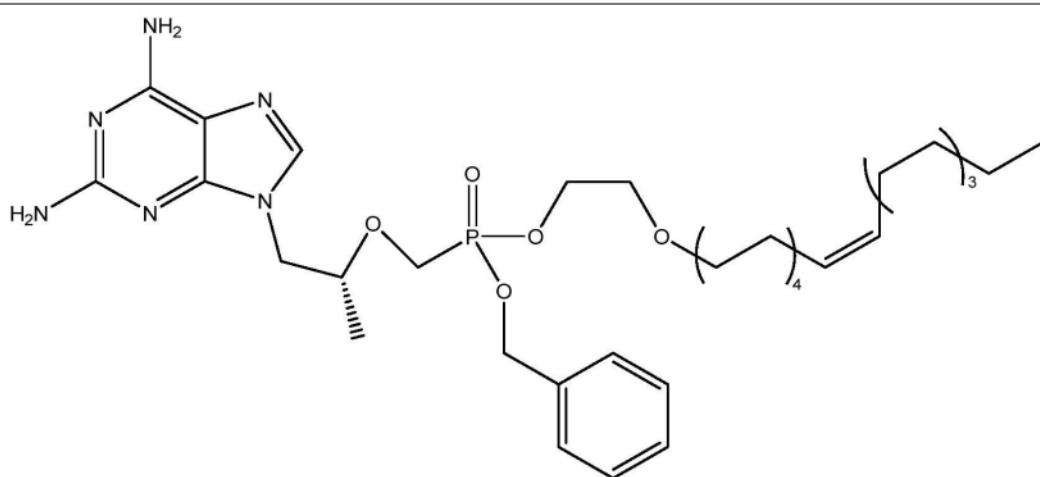
油氧乙基苄基 9-(R)-[(2-磷酸基甲氧基)丙基]-2,6-二氨基嘌呤(OLE-Bn-PMPDAP)



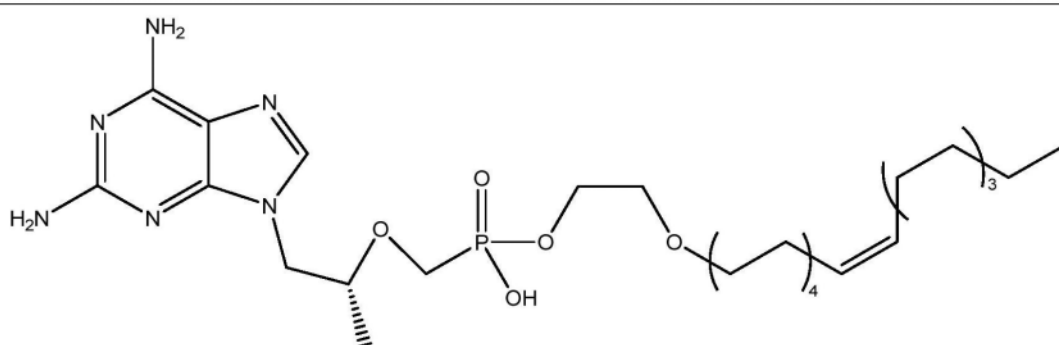
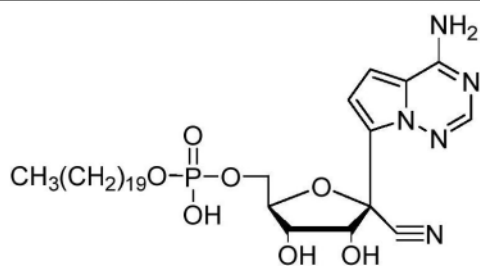
十八烷氧基乙基-磷酸基-恩曲他滨 (ODE-P-FTC)



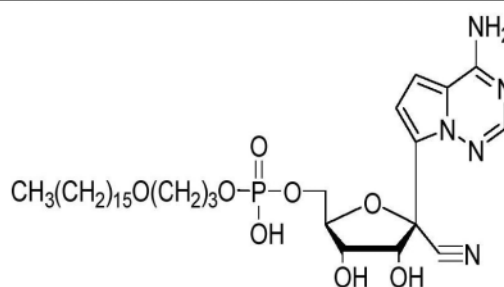
十八烷氧基乙基苄基-磷酸基-恩曲他滨 (ODE-Bn-P-FTC)

油氧乙基苄基 9-(*R*)-[2-磷酸基-甲氧基]丙基]-2,6-二氨基嘌呤(OLE-Bn-PMPDAP)

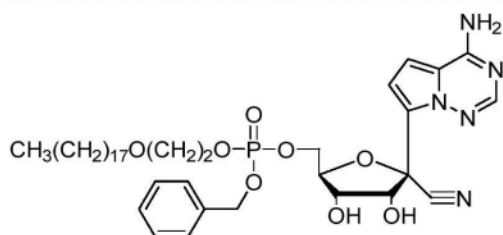
[0236]

油氧乙基 9-(*R*)-[2-磷酸基甲氧基]丙基]-2,6-二氨基嘌呤 (OLE-(*R*)-PMPDAP)

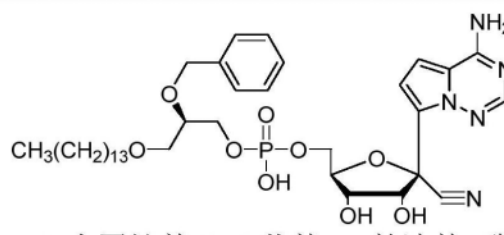
二十烷基-磷酸基-RVn



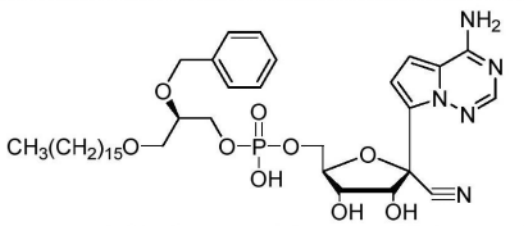
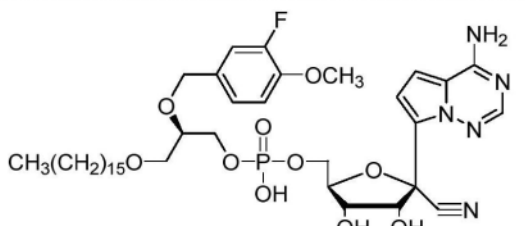
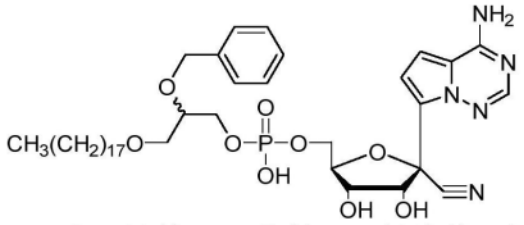
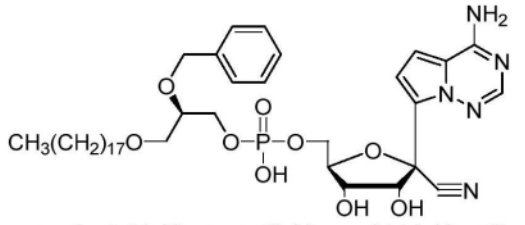
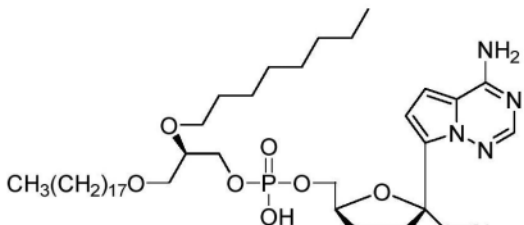
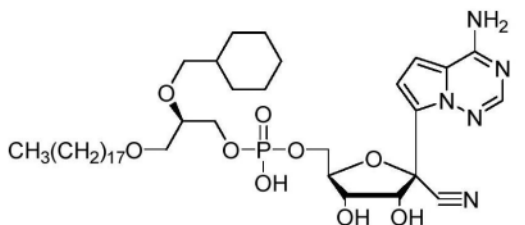
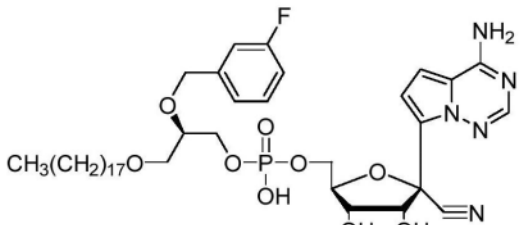
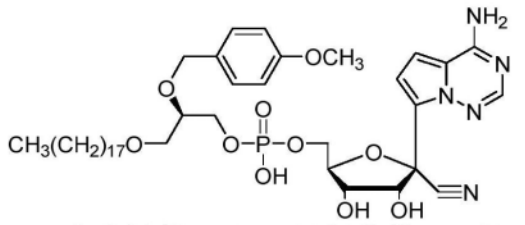
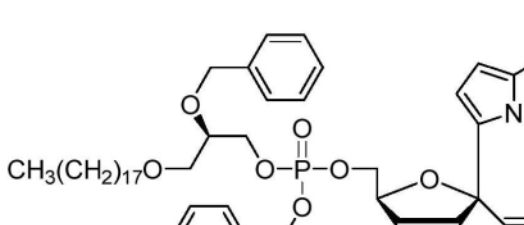
十六烷氧基丙基-磷酸基-RVn



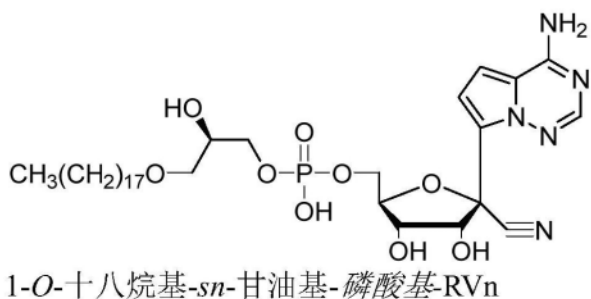
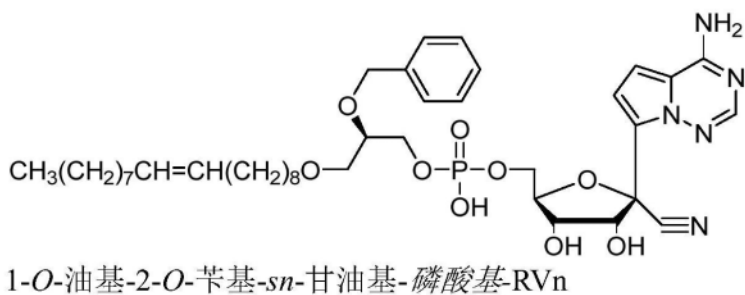
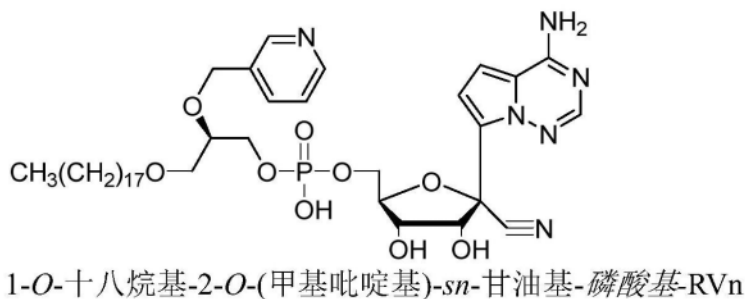
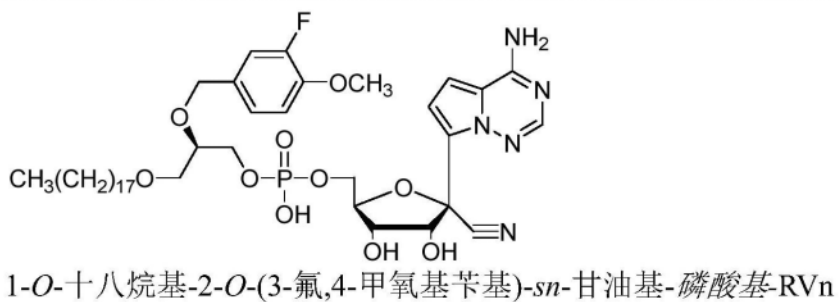
十八烷氧基乙基-苄基-磷酸基-RVn

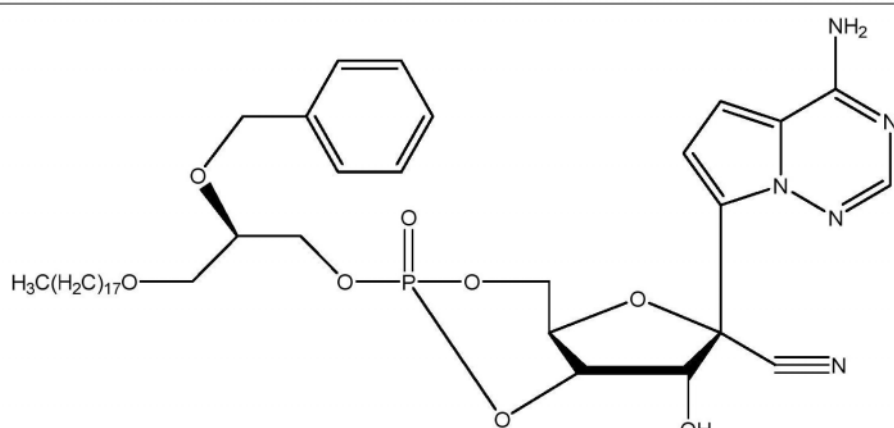
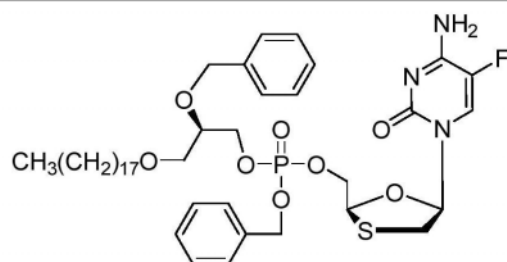
1-*O*-十四烷基-2-*O*-苄基-*sn*-甘油基-磷酸基-RVn

[0237]

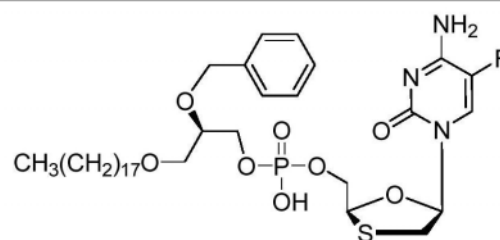
 1-<i>O</i>-十六烷基-2-<i>O</i>-苄基-<i>sn</i>-甘油基-磷酸基-RVn	 1-<i>O</i>-十六烷基-2-<i>O</i>-(3-氟,4-甲氧基苄基)-<i>sn</i>-甘油基-磷酸基-RVn
 1-<i>O</i>-十八烷基-2-<i>O</i>-苄基-<i>rac</i>-甘油基-磷酸基-RVn	 1-<i>O</i>-十八烷基-2-<i>O</i>-苄基-<i>sn</i>-甘油基-磷酸基-RVn
 1-<i>O</i>-十八烷基-2-<i>O</i>-辛基-<i>sn</i>-甘油基-磷酸基-RVn	 1-<i>O</i>-十八烷基-2-<i>O</i>-(甲基环己基)-<i>sn</i>-甘油基-磷酸基-RVn
 1-<i>O</i>-十八烷基-2-<i>O</i>-(3-氟苄基)-<i>sn</i>-甘油基-磷酸基-RVn	 1-<i>O</i>-十八烷基-2-<i>O</i>-(4-甲氧苄基)-<i>sn</i>-甘油基-磷酸基-RVn
 1-<i>O</i>-十八烷基-2-<i>O</i>-苄基-苄基-<i>sn</i>-甘油基-磷酸基-RVn	

[0238]



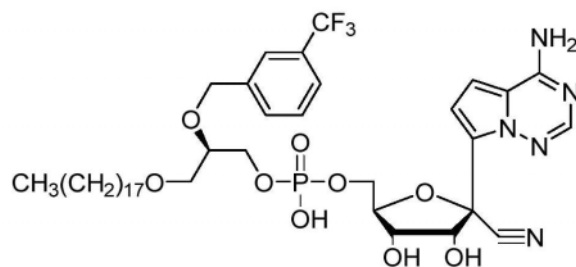
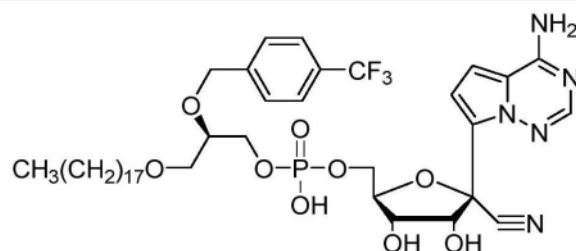
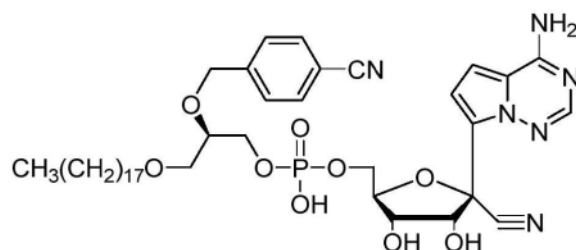
GS-441524-3',5'-环状一磷酸酯, 1-*O*-十八烷基-2-*O*-苄基-*sn*-甘油酯

ODBG-苄基-磷酸基-恩曲他滨

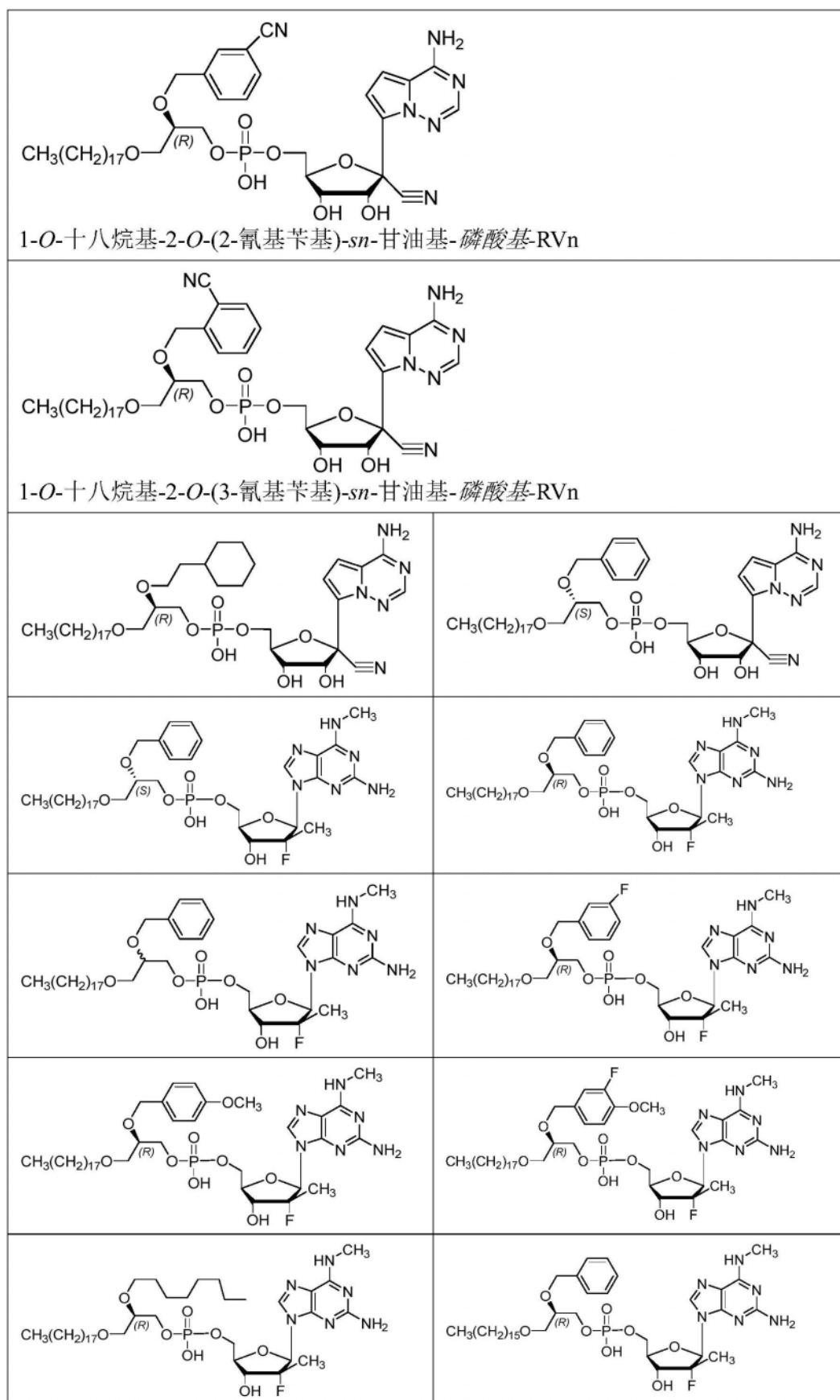


ODBG-磷酸基-恩曲他滨

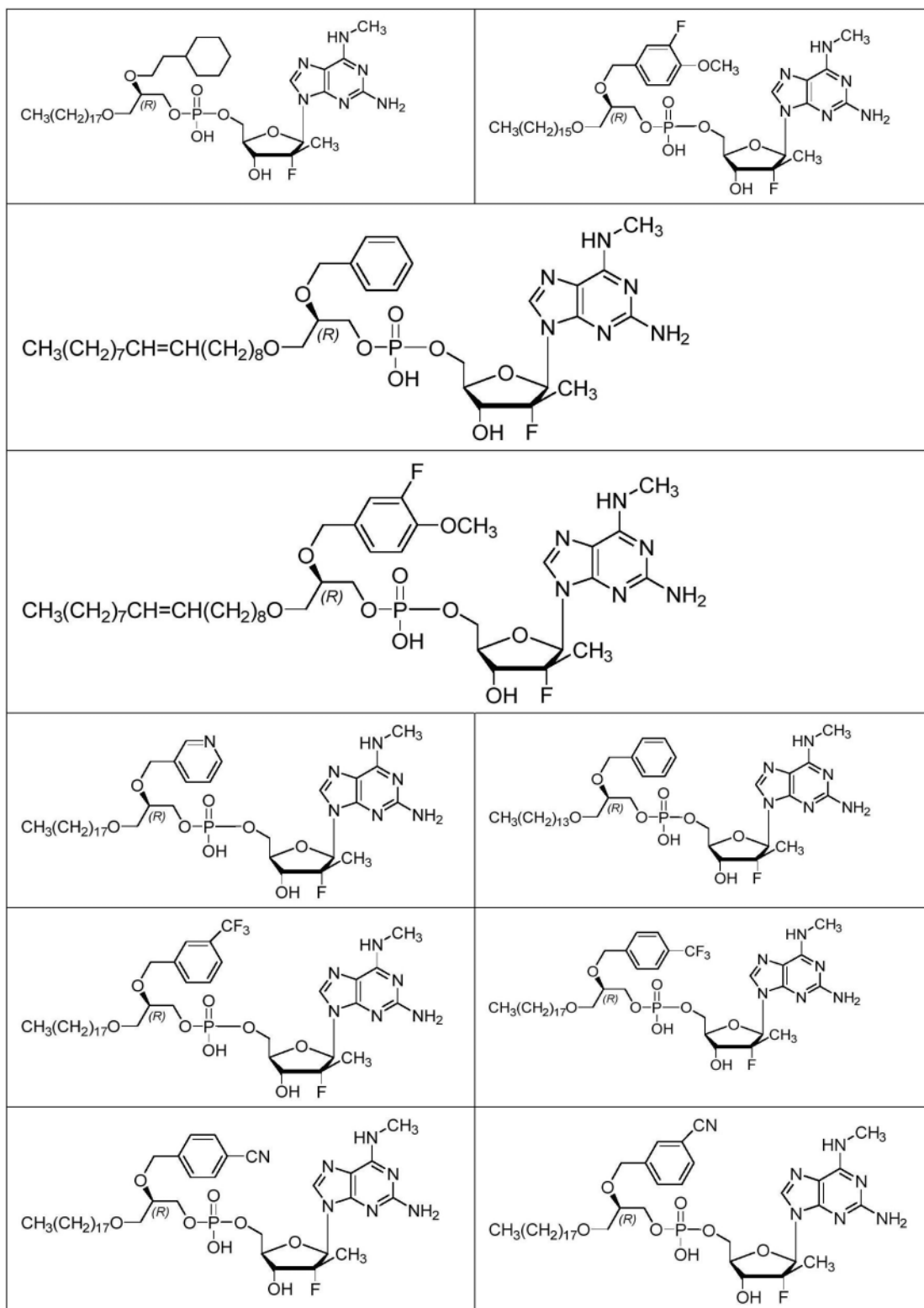
[0239]

1-*O*-十八烷基-2-*O*-(3-三氟甲基)-*sn*-甘油基-磷酸基-RVn1-*O*-十八烷基-2-*O*-(4-三氟甲基)-*sn*-甘油基-磷酸基-RVn1-*O*-十八烷基-2-*O*-(4-氰基)-*sn*-甘油基-磷酸基-RVn

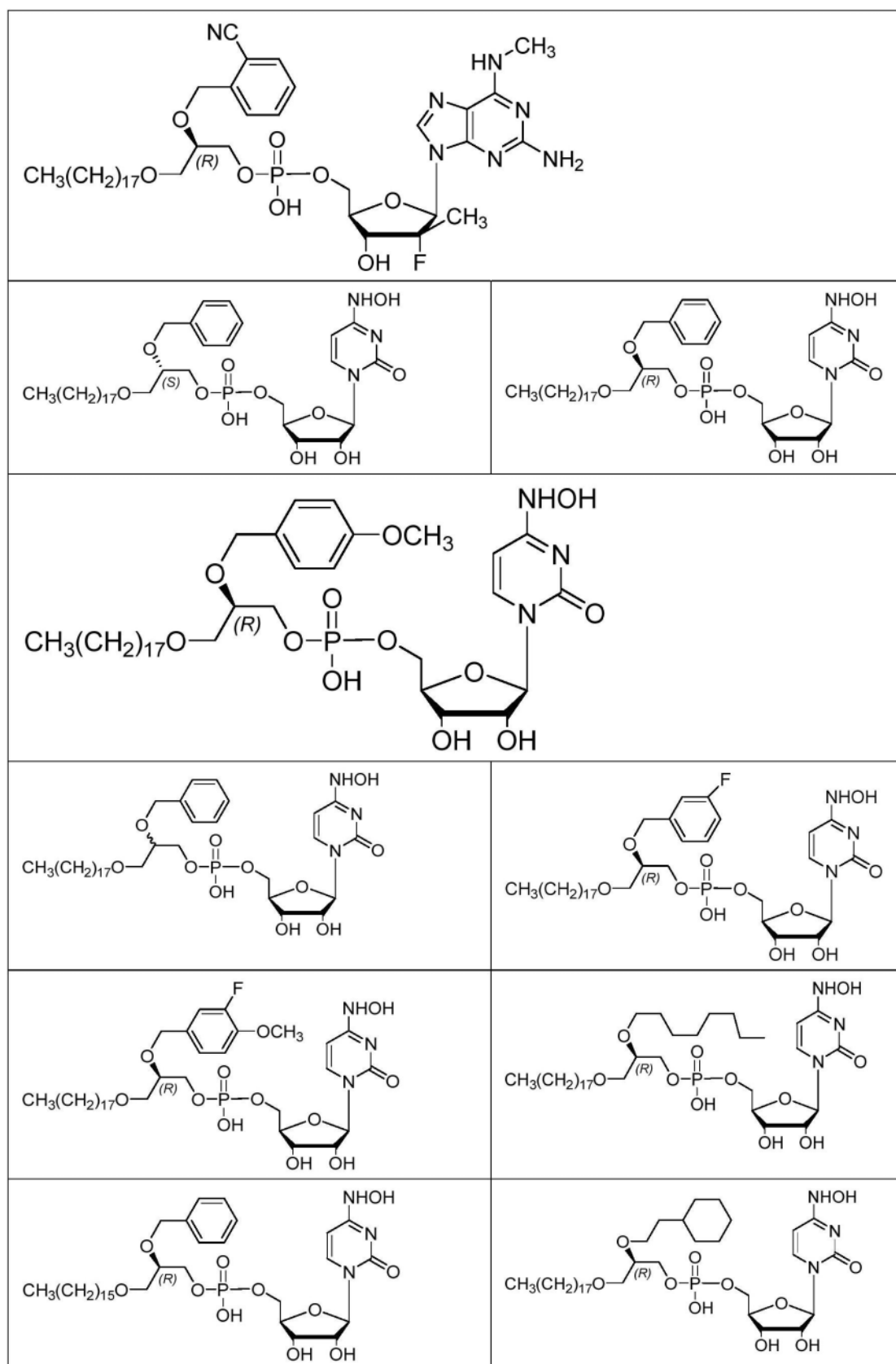
[0240]



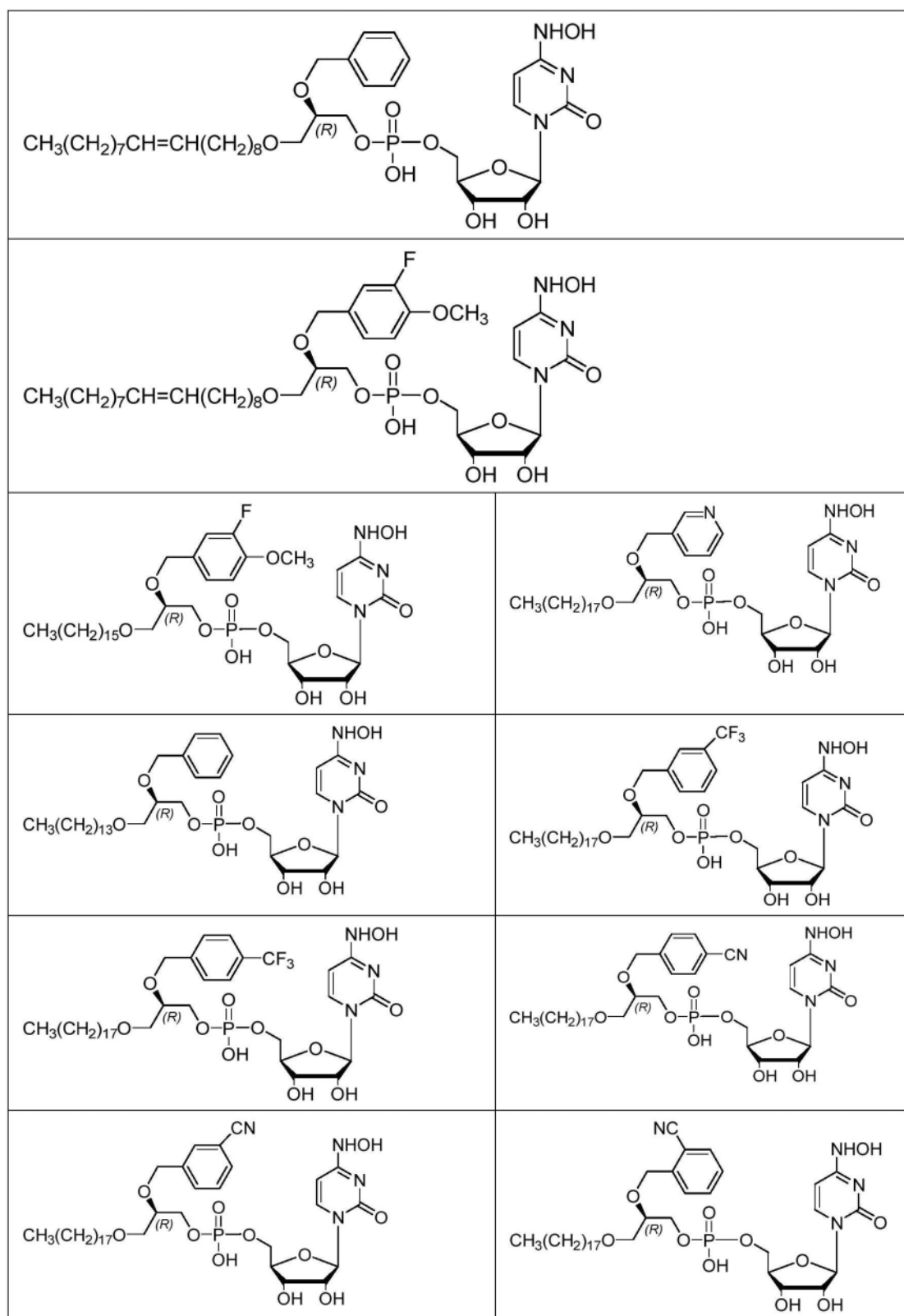
[0241]



[0242]



[0243]



[0244] 实施例31. 一种药物制剂, 其包含:

[0245] (i) 油, 和

[0246] (ii) 根据实施例1至30中任一项所述的化合物。

[0247] 实施例32. 根据实施例31所述的药物制剂, 其中所述油选自由以下组成的群组: 芝麻油、甘油三酯 (例如, 中链甘油三酯) 及其组合。

[0248] 实施例33.根据实施例31或32所述的药物制剂,其中(A)所述油以按所述药物制剂的重量计约60重量%至约95重量%、约65重量%至约95重量%、约70重量%至约95重量%、约75重量%至约95重量%、约80重量%至约95重量%或约85重量%至约95重量%的量存在于所述药物制剂中,(B)所述式(I)的化合物以按所述药物制剂的重量计约0.01重量%至约40重量%、约0.01重量%至约30重量%、约0.01重量%至约20重量%、约0.01重量%至约10重量%、约0.01重量%至约5重量%的量存在,或(C)其组合。

[0249] 实施例34.根据实施例31至33中任一项所述的药物制剂,其中所述药物制剂进一步包含苯甲醇、苯甲酸苄酯、乙醇或其组合;其中,任选地,当存在时,所述苯甲醇、乙醇、苯甲酸苄酯或所述其组合以按所述药物制剂的重量计约0.01重量%至约25重量%、约0.01重量%至约20重量%、约0.01重量%至约15重量%、约0.01重量%至约10重量%或约5重量%至约10重量%的总量存在。

[0250] 实施例35.根据实施例31至34中任一项所述的药物制剂,其中所述药物制剂(A)被配制用于注射,如肌内注射或皮下注射,(B)被配置为实现第一核苷磷酸化的激酶旁路,(C)将抗病毒作用明显的浓度递送至肺部和/或胃肠道,(D)在单次剂量施用(如通过肌内注射)后在血浆中提供持续约5至约30天、约5至约28天、约5至约21天、约5至约14天或约5至约7天的持久水平的活性成分,或(E)其组合。

[0251] 实施例36.一种用于治疗哺乳动物(例如,人)中冠状病毒感染的方法,所述方法包含向所述哺乳动物施用有效量的根据实施例31至35中任一项所述的药物制剂。

[0252] 实施例37.根据实施例36所述的方法,其中所述药物制剂的所述有效量以单次剂量施用。

[0253] 实施例38.根据实施例36或37所述的方法,其中如本文所描述,所述药物制剂包含中效油制剂,如制剂F8或制剂F7。

[0254] 实施例39.一种用于治疗哺乳动物中HIV感染的方法,所述方法包含向所述哺乳动物施用有效量的根据实施例31至35中任一项所述的药物制剂。

[0255] 实施例40.根据实施例39所述的方法,其中所述药物制剂是长效治疗。

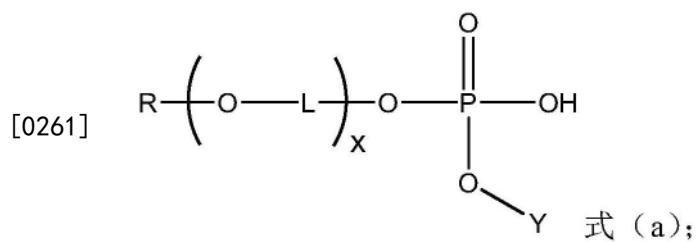
[0256] 实施例41.根据实施例39或40所述的方法,其中如本文所描述,所述药物制剂包含制剂F3或制剂F4。

[0257] 实施例42.一种用于治疗和/或抑制呼吸道合胞病毒(RSV)复制的方法,所述方法包含向哺乳动物施用有效量的根据实施例31至35中任一项所述的药物制剂。

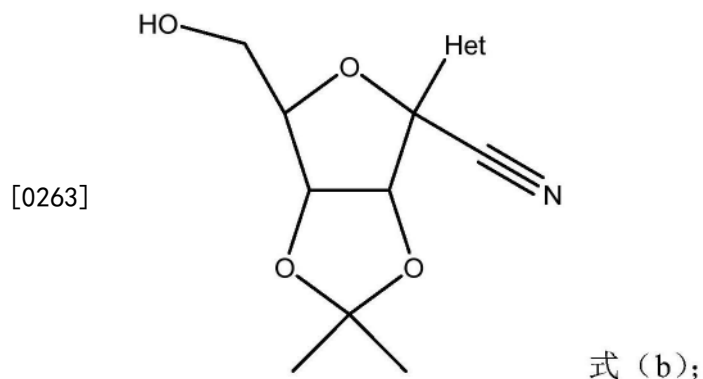
[0258] 实施例43.一种用于治疗哺乳动物中病毒感染的方法,所述方法包含向所述哺乳动物施用有效量的根据实施例31至35中任一项所述的药物制剂,其中所述病毒是选自由以下组成的群组中的病毒科的RNA病毒:丝状病毒科、正粘病毒科、副粘病毒科、肺病毒科、白纤病毒科、内罗病毒科、沙粒病毒科、黄病毒科和冠状病毒科。

[0259] 实施例44.一种用于生产前药的方法,所述方法包含:

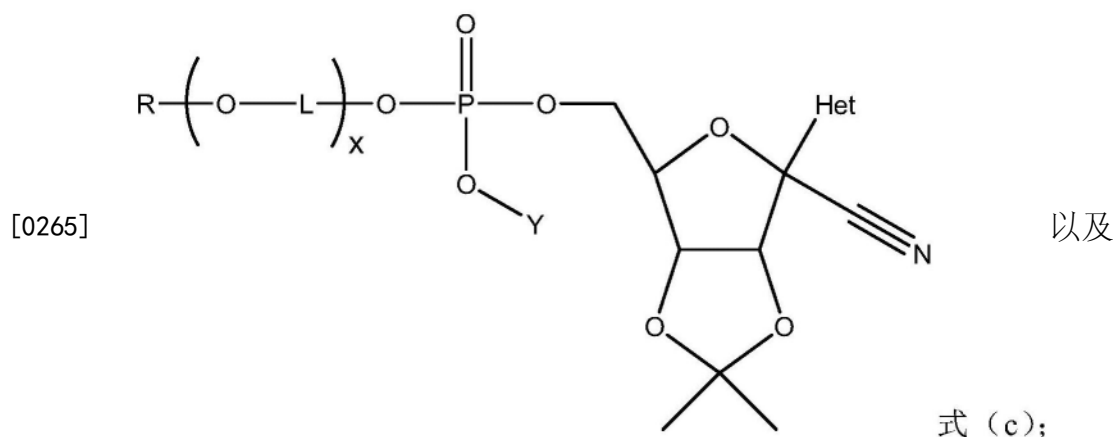
[0260] (i) 提供式(a)的化合物:



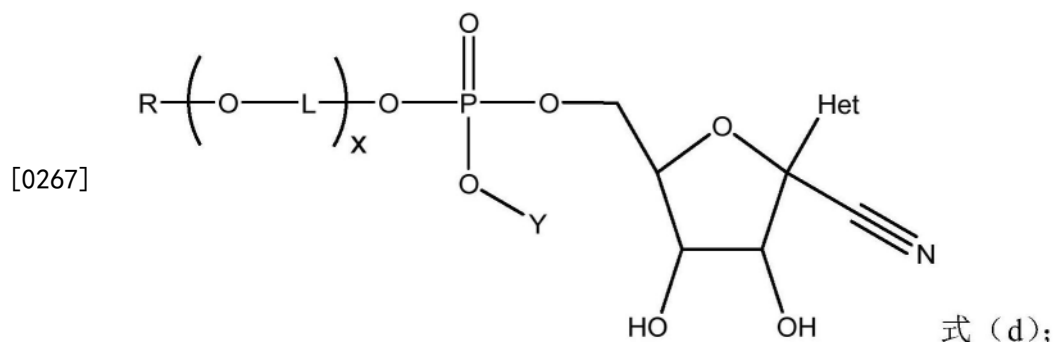
[0262] (ii) 提供式 (b) 的化合物:



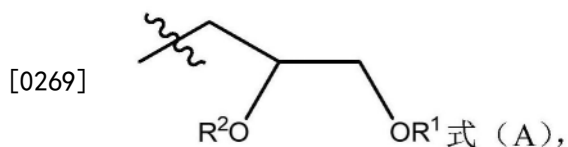
[0264] (iii) 使所述式 (a) 的化合物与所述式 (b) 的化合物接触以形成式 (c) 的化合物



[0266] (iv) 使所述式 (c) 的化合物与酸接触以形成式 (d) 的化合物



[0268] 其中Het是包含至少一个杂原子的 C_1 - C_{30} 烷基;Y选自由以下组成的群组:氢、 C_1 - C_{30} 烷基和药学上可接受的阳离子;x为0或1;L独立地是 C_1 - C_{30} 烷基;并且R选自由以下组成的群组: C_{10} - C_{30} 烷基和式(A)的取代基;



[0270] 其中 R^1 和 R^2 独立地选自由以下组成的群组:氢和 C_1-C_{30} 烷基。

[0271] 实施例45.根据前述实施例中任一项所述的用于生产前药的方法,其中所述式(a)的化合物与所述式(b)的化合物的接触在N,N-二环己基碳二亚胺、4-二甲基氨基吡啶或其组合的存在下进行。

[0272] 实施例46.根据前述实施例中任一项所述的用于生产前药的方法,其中所述酸包含HCl。

[0273] 实施例47.根据前述实施例中任一项所述的用于生产前药的方法,其中所述式(c)的化合物与所述酸的接触可以在任何合适的液体存在下进行。

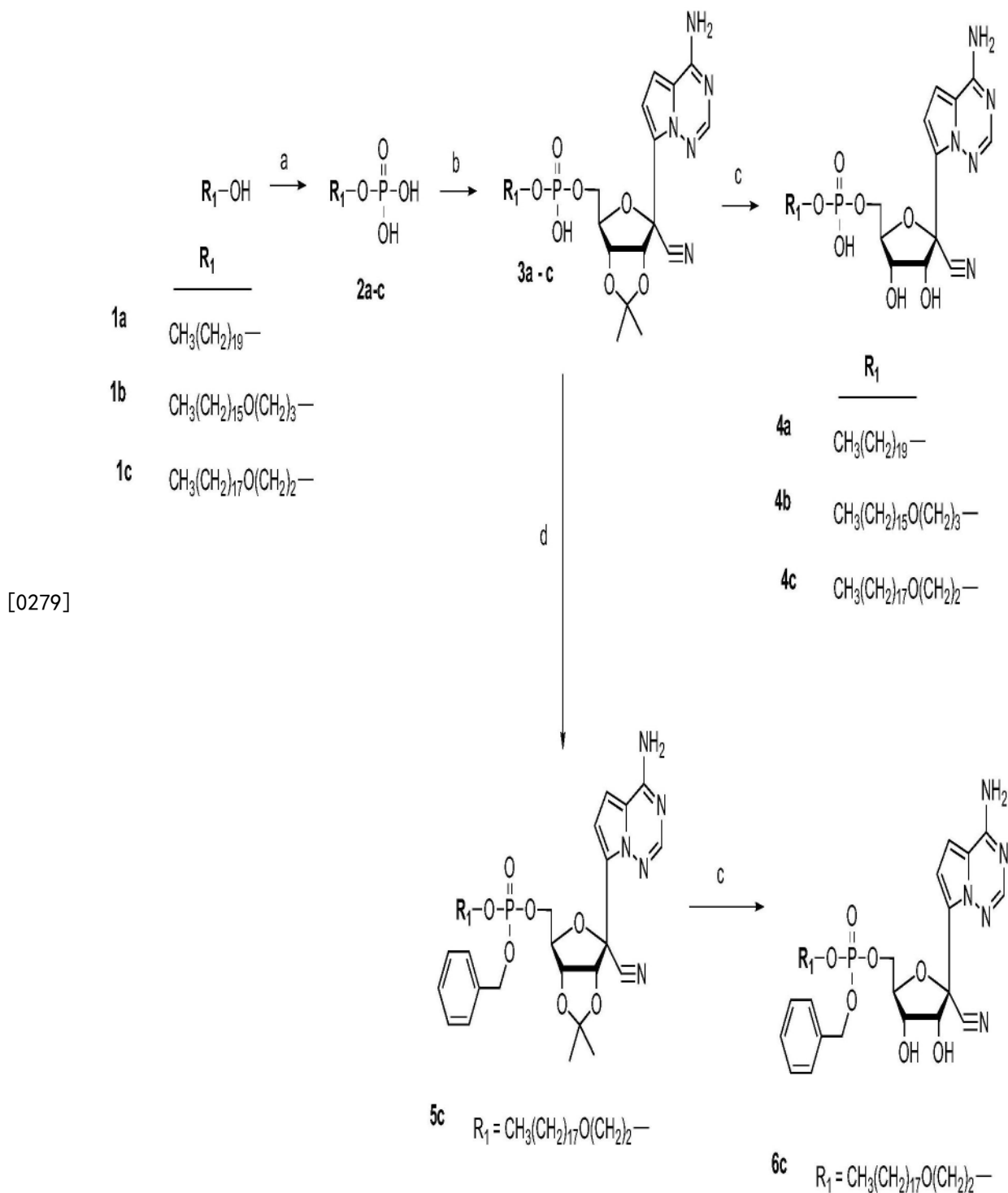
[0274] 实例

[0275] 通过以下实例另外说明本公开,所述实例不应以任何方式解释为对本公开的范围施加限制。相反,应当清楚理解的是,可以借助于各种其他方面、实施例、修改及其等价物,在阅读本文的描述之后,这些方面、实施例、修改及其等效物可以给本领域的普通技术人员提供教导。因此,通过考虑本文所公开的本公开的说明书和实践,本发明的其他方面对于所属领域的技术人员将是显而易见的。

[0276] 实例1——化合物的制备

[0277] 在本实例中,使用了数种一般方法来生产各种产物和/或中间体,但是也可以使用其他已知的合成技术。

[0278] A.GS-441524 5'-一磷酸酯的烷基和烷氧基烷基酯的合成



[0280] 方案1.GS-441524 5'-一磷酸酯的烷基和烷氧基烷基酯的合成。

[0281] 试剂:a) POCl_3 , TEA, THF; b) GS-441524丙酮化合物, DCC/DMAP或DIC/NMI, 吡啶; c) 甲酸, 室温或浓HCl/THF; d) PyBOP, DIEA, DMF

[0282] 烷基和烷氧基烷基磷酸酯的合成(方案1, 2a-c)

[0283] 一般方法A。将长链醇1a-c磷酸化以得到前面所描述的磷酸酯2a-c (Ruiz, J., Beadle, J.R., Aldern, K.A., Keith, K., Hartline, C., Kern, E., Hostetler, K.Y. (2007). 《西多福韦和阿德福韦的烷氧基烷基磷酸酯偶联物的合成及抗病毒评价 (Synthesis and antiviral evaluation of alkoxyalkyl-phosphate conjugates of cidofovir and

adefovir)》.《抗病毒研究(Antiviral Res.)》,75,87-90)。简而言之,在搅拌下将在无水四氢呋喃(THF)中的长链醇(1当量)与三乙胺(2当量)的溶液滴加到在THF中的磷酰氯(1.5当量)溶液中,同时保持温度低于20℃。在0℃下再继续搅拌一小时,然后加水,继续搅拌过夜,然后用乙醚进行提取。将醚层中的粗制固体用己烷重结晶,得到磷酸酯2a-c。

[0284] 2a二十烷基磷酸二氢酯¹H(400MHz,氯仿-d) δ8.30(s,1H),3.98(t,2H),1.61(m,1H),1.26(br s,16H),0.86(t,1H)。ESI-MS 650.38[M-H]⁻

[0285] 2b 3-(十六烷氧基)丙基磷酸二氢酯¹H NMR(400MHz,氯仿-d) δ4.03(dt,2H),3.49(t,2H),3.40(t,2H),1.94(p,2H),1.59-1.55(m,2H),1.26(br s,18H),0.86(t,3H)。

[0286] 2c 2-(十八烷氧基)乙基磷酸二氢酯¹H NMR(400MHz,氯仿-d) δ4.12(dt,2H),3.77(t,2H),3.42(t,2H),1.29(br s,20H),0.94-0.85(t,3H)。

[0287] 磷酸酯2a-c与GS-441524丙酮化合物(瑞德西韦核苷,RVn丙酮化合物)的偶联

[0288] 一般方法B。将N,N-二环己基碳二亚胺(DCC,1.5当量)加入到在无水吡啶(dry pyridine)中的GS-441524丙酮化合物(1当量,CAS号1191237-80-5,购自Ontario Chemicals)、长链磷酸二氢酯(1.0当量)与4-二甲氨基吡啶(DMAP,1.0当量)的混合物中,然后将混合物加热至90℃并搅拌24小时。加入水猝灭反应,并在真空下蒸发吡啶。将残余物吸附到硅胶上,并在硅胶60上通过快速柱色谱进行纯化。梯度洗脱(CH₂Cl₂/甲醇10%至20%)得到受保护的磷酸二酯化合物。

[0289] 一般方法C。将N,N-二异丙基碳二亚胺(DIC,3.3mmol)加入到无水吡啶(30mL)中的GS-441524丙酮化合物(1.65mmol)、脂质磷酸酯(1.65mmol)与1-甲基咪唑(NMI,406mg,4.95mmol)的混合物中,然后将混合物在室温下搅拌48小时,直到通过TLC对反应混合物的分析指示大量形成偶联产物。然后加入水(5mL),将混合物在旋转蒸发器上浓缩。将残余物吸附到硅胶上,并在硅胶60上通过快速柱色谱进行纯化。梯度洗脱(100% CH₂Cl₂至CH₂Cl₂/20%甲醇)得到受保护的磷酸二酯类似物。

[0290] 3a二十烷基-磷酸基-RVn丙酮化合物。根据一般方法C将GS-441524丙酮化合物与2a偶联。通过ESI-MS 690.50[M-H]⁻对结构进行了证实。

[0291] 3b 3-(十六烷氧基)丙基-磷酸基-RVn丙酮化合物。根据一般方法B将GS-441524丙酮化合物与2b偶联。将N,N-二环己基碳二亚胺(DCC,619mg,3mmol)加入到在25mL无水吡啶中的GS-441524丙酮化合物(300mg,0.91mmol)、3-(十六烷氧基)丙基磷酸酯(2b,414mg,1.10mmol)与4-二甲氨基吡啶(DMAP,122mg,1.0mmol)的混合物中,然后将混合物加热至90℃并搅拌24小时。然后将吡啶蒸发,将残余物在硅胶60上通过快速柱色谱纯化。梯度洗脱(CH₂Cl₂/甲醇10%至20%)得到423mg(67%产率)的化合物3b。¹H NMR(500MHz,氯仿-d) δ8.42(s,1H),7.98(s,1H),7.70(s,2H),6.22(d,J=6.0Hz,1H),5.68(d,J=6.2Hz,1H),5.15(d,J=1.0Hz,1H),4.70(dd,J=3.8,0.9Hz,1H),4.48-4.42(m,1H),4.26(ddd,J=11.2,8.5,2.6Hz,1H),4.15(ddd,J=11.1,8.5,2.6Hz,1H),4.02(dt,J=8.5,6.3Hz,2H),3.49(t,J=6.1Hz,2H),3.40(t,J=6.1Hz,2H),1.95(p,J=6.2Hz,2H),1.54(tt,J=7.4,6.1Hz,2H),1.31(s,3H),1.32-1.24(m,26H),0.94-0.85(m,3H)。ESI-MS 691.6[M-H]⁻。

[0292] 3c 2-(十八烷氧基)乙基-磷酸基-RVn丙酮化合物。根据一般方法B将GS-441524丙酮化合物与2c偶联。将N,N-二环己基碳二亚胺(DCC,0.3g,1.4mmol)加入到在10mL无水吡啶中的GS-441524丙酮化合物(0.23g,0.7mmol)、磷酸酯2c(0.27g,0.68mmol)与4-二甲氨基吡

啉 (DMAP, 0.07g, 0.6mmol) 的混合物中, 然后将混合物加热至 90℃ 并搅拌 3 天。然后将吡啶蒸发, 将残余物在硅胶 60 上通过快速柱色谱纯化。梯度洗脱 (CH_2Cl_2 /甲醇 10% 至 20%) 得到 0.22g (45% 产率) 的磷酸二酯 3c。

[0293] 4a-c 的合成: 丙酮化合物保护基团的移除

[0294] 一般方法 D。(HCl /THF) 在室温下, 将在四氢呋喃 (THF, 1mL) 中的浓 HCl (0.1mL) 加入到搅拌的在 THF (10mL) 中的受丙酮化合物保护的 (2', 3'-亚异丙基) 磷酸二酯 (0.25mmol) 溶液中。将混合物搅拌 3 小时, 然后加入碳酸氢钠 (50mg) 和水 (2mL)。再搅拌 15 分钟后, 将溶剂蒸发, 向残余物中加入冷水 (10mL)。通过真空过滤收集粗制产物并在真空下干燥。通过快速柱色谱纯化 (100% CH_2Cl_2 至 CH_2Cl_2 /35% 甲醇) 得到纯的磷酸二酯类似物。

[0295] 一般方法 E。在室温下将丙酮化合物类似物 (1mmol) 加入到甲酸 (25mL) 中并搅拌。通过 TLC 监测反应, 直至大约 4 小时时完成脱保护。通过旋转蒸发去除甲酸, 将残余物与 EtOH ($2 \times 25\text{mL}$) 共蒸发, 然后吸附到硅胶上, 并通过快速柱色谱纯化。梯度洗脱 (100% CH_2Cl_2 至 CH_2Cl_2 /35% 甲醇) 得到产物。

[0296] 4a 二十烷基-磷酸基-RVn——根据一般方法 E 由 3a 进行制备。通过 ESI-MS 650.38 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 对结构进行了证实。

[0297] 4b 3-(十六烷氧基)丙基-磷酸基-RVn。根据一般方法 D 由 3b 进行制备。在室温下, 将在四氢呋喃 (THF, 1mL) 中的浓 HCl (0.1mL) 加入到搅拌的在 THF (10mL) 中的 3b (100mg, 0.14mmol) 溶液中。将混合物搅拌 3 小时, 然后加入碳酸氢钠 (50mg) 和水 (2mL)。再搅拌 15 分钟后, 将溶剂蒸发, 向残余物中加入冷水 (10mL)。通过真空过滤收集固体产物, 并在真空下干燥得到 4b (79mg, 87% 产率), 为灰白色固体。 ^1H NMR (500MHz, CDCl_3 -甲醇- d_4) δ 8.42 (s, 1H), 7.98 (s, 1H), 7.70 (s, 1H), 6.22 (d, $J=6.0\text{Hz}$, 1H), 5.70 (d, $J=6.0\text{Hz}$, 1H), 5.12 (d, $J=4.2\text{Hz}$, 1H), 4.55 (ddd, $J=5.5, 2.7, 0.9\text{Hz}$, 1H), 4.40 (dtd, $J=6.8, 2.6, 0.8\text{Hz}$, 1H), 4.33-4.27 (m, 2H), 4.25 (ddd, $J=11.1, 8.4, 2.6\text{Hz}$, 1H), 4.16 (ddd, $J=11.3, 8.5, 2.6\text{Hz}$, 1H), 4.02 (dt, $J=8.5, 6.3\text{Hz}$, 2H), 3.49 (t, $J=6.1\text{Hz}$, 2H), 3.40 (t, $J=6.1\text{Hz}$, 2H), 1.95 (p, $J=6.2\text{Hz}$, 2H), 1.59-1.50 (m, 1H), 1.34-1.24 (m, 23H), 0.94-0.85 (m, 3H)。ESIMS: 652.39 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 。HPLC 纯度: 99.7%。

[0298] 4c 2-(十八烷氧基)乙基-磷酸基-RVn。根据一般方法 D 由 3c 进行制备。在 0℃ 下将浓 HCl (0.3mL) 缓慢加入到搅拌的在 THF (10mL) 中的 3c (0.2g, 0.28mmol) 溶液中。将混合物回温至室温过夜, 然后用水 (2mL) 稀释, 并通过加入饱和碳酸氢钠调节至 $\text{pH}=8$ 。用氯仿 ($3 \times 30\text{mL}$) 提取产物, 并在减压下浓缩有机层。在硅胶上通过快速色谱纯化残余物。用 20% MeOH/ CH_2Cl_2 洗脱, 得到 0.10g (55% 产率) 的化合物 4c。 ^1H NMR (400MHz, CDCl_3 -甲醇- d_4) ppm 7.89 (s, 1H), 6.94 (d, $J=4.65\text{Hz}$, 1H), 6.89 (d, $J=4.65\text{Hz}$, 1H), 4.40 (d, $J=4.65\text{Hz}$, 2H), 4.21-4.28 (m, 1H), 4.12-4.20 (m, 1H), 4.04-4.12 (m, 1H), 3.91 (d, $J=4.89\text{Hz}$, 2H), 3.46-3.57 (m, 2H), 3.42 (td, $J=6.85, 1.96\text{Hz}$, 2H), 3.34 (dt, $J=3.18, 1.59\text{Hz}$, 2H), 1.53 (d, $J=6.85\text{Hz}$, 2H), 1.20-1.37 (m, 30H), 0.89 (t, $J=6.97\text{Hz}$, 3H)。ESIMS: 666.43 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 。HPLC 纯度: 98.4%。

[0299] B.2-(十八烷氧基)乙基苄基磷酸基-RVn (长效制剂) 的合成 (方案 1, 6c)

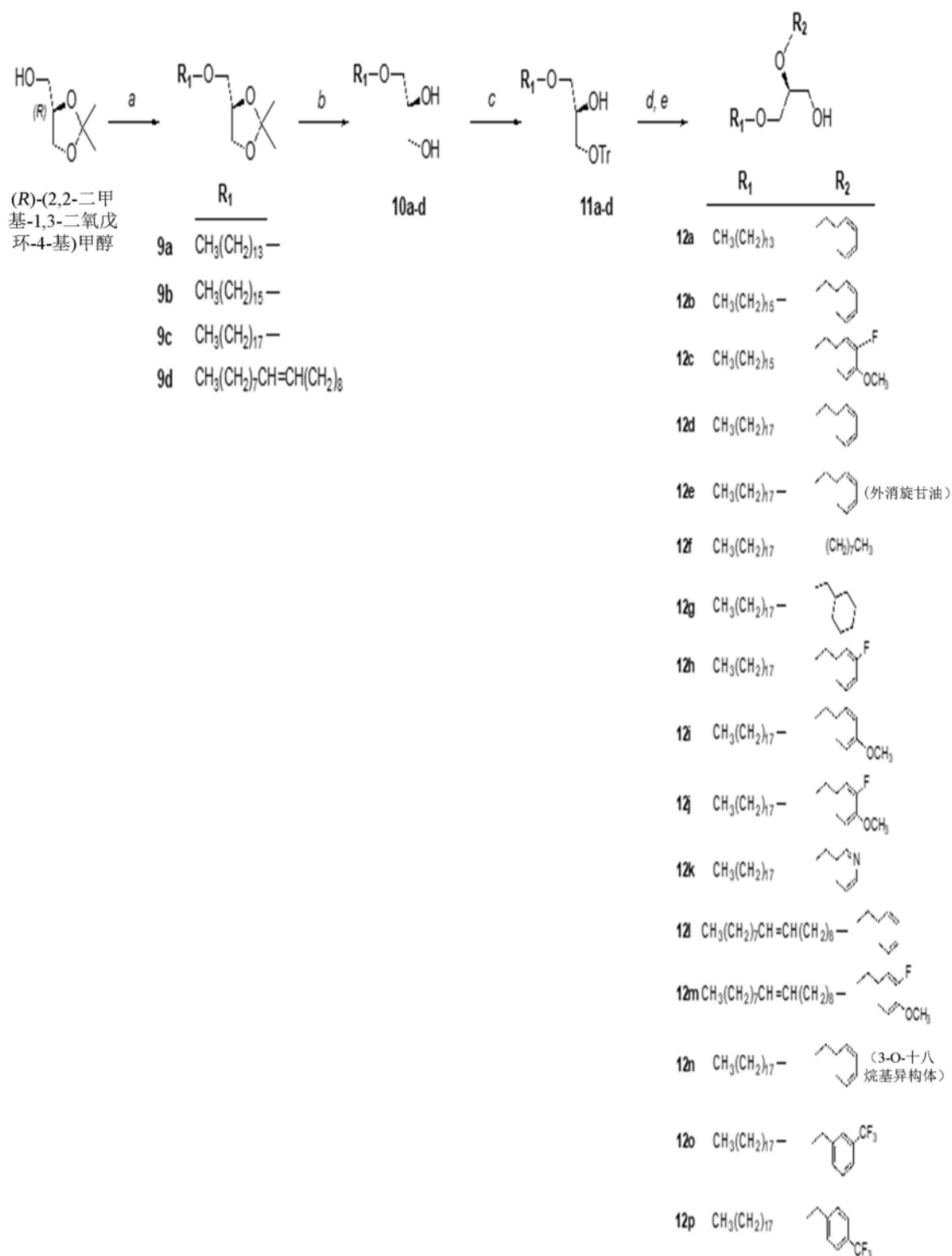
[0300] 将在无水 DMF (5mL) 中的化合物 3c (160mg, 0.22mmol)、苯甲醇 (48mg, 0.45mmol)、二异丙基乙胺 (DIEA, 58mg, 0.45mmol) 和六氟磷酸 (1H-苯并三唑-1-基-氧基)-三吡咯烷基磷

(PyBOP, 230mg, 0.45mmol) 在室温下搅拌3小时。然后将DMF蒸发,将残余物溶解于乙酸乙酯(50mL)并用饱和NaHCO₃洗涤(3×10mL)。将有机层在MgSO₄上干燥并浓缩。将残余物在硅胶上通过柱色谱纯化,用氯仿/甲醇(0%至15%)洗脱得到5c(60mg, 35%产率)。¹H NMR(400MHz, CDCl₃-CD₃OD) δppm 7.87(d, J=4.03Hz, 1H), 7.27-7.37(m, 5H), 6.91-6.95(m, 1H), 6.83-6.89(m, 1H), 5.41(d, J=6.97Hz, 1H), 4.92-5.06(m, 3H), 4.54-4.60(m, 1H), 4.24-4.31(m, 2H), 4.07-4.15(m, 2H), 3.53-3.60(m, 2H), 3.38-3.51(m, 2H), 3.32-3.37(m, 2H), 1.78-1.96(m, 2H), 1.75(s, 3H), 1.50-1.60(m, 2H), 1.42(s, 3H), 1.15-1.38(m, 30H), 0.89(t, J=6.54Hz, 3H)。ESIMS: 798.51[M+H]⁺, 820.56[M+Na]⁺。

[0301] 在0℃向在THF(2mL)中的5c(60mg, 0.075mmol)溶液加入浓HCl(0.1mL)。20分钟后,移除冰浴,并通过TLC监测反应。3小时后,返回冰浴,并用饱和NaHCO₃对混合物进行中和。将混合物在真空下浓缩,通过柱色谱(硅胶,二氯甲烷/甲醇10%至20%)纯化残余物,得到35mg(62%产率)的6c。¹H NMR(400MHz, CDCl₃+甲醇d₄) δppm 7.84-7.90(m, 1H), 7.29-7.38(m, 5H), 6.89-6.93(m, 1H), 6.82-6.86(m, 1H), 5.03(d, J=11.36Hz, 2H), 4.76-4.81(m, 1H), 4.40-4.45(m, 1H), 4.30-4.37(m, 1H), 4.17-4.31(m, 2H), 4.06-4.14(m, 2H), 3.54-3.60(m, 2H), 3.39-3.47(m, 2H), 3.33-3.37(m, 2H), 3.12-3.18(m, 2H), 1.82-1.91(m, 2H), 1.49-1.59(m, 2H), 1.20-1.37(m, 30H), 0.89(t, J=6.60Hz, 3H)。ESIMS: 758.32[M+H]⁺, 780.43[M+Na]⁺。

[0302] C.GS-441524 5'-一磷酸酯的1-O-烷基-2-O-取代的-sn-甘油酯的合成

[0303] 以下方案(方案2)示出了用于生产以下GS-441524 5'-一磷酸酯的1-O-烷基-2-O-取代的-sn-甘油酯的实施例的合成方法的实施例。



[0304]

[0305] 方案2.1-0-烷基-2-0-取代的-sn-甘油的合成。试剂：a) R_1 溴化物或甲磺酸酯、NaH、DMF；b) 80% CH_3COOH ，回流；c) 三苯甲基氯、TEA、DMAP、 CH_2Cl_2 ；d) R_2 溴化物或甲磺酸酯、NaH、DMF；) 酸性脱保护。

[0306] 1-0-烷基-sn-甘油的合成(方案2,10a-d)

[0307] 一般方法F。在本实施例中，使用烷基甲磺酸酯按以下文献中所描述的进行2,3-亚异丙基甘油的烷基化：(Fernández, D.M.; Contreras, L.J.; Moreno, B.M.; Silva, E.G.; Mayorga, H.W.《天然烷基甘油的对映体合成及其抗菌和抗生物膜活性 (Enantiomeric synthesis of natural alkylglycerols and their antibacterial and antibiofilm

activities)》.《天然产物研究(Nat.Prod.Res.)》2019,1-7.)。

[0308] 将氢化钠和DMF在烧瓶中搅拌。由于预期的氢析出,缓慢加入亚异丙基甘油,同时冷却(如有必要)以保持温度低于35℃。再搅拌30分钟后,一次性加入烷基甲磺酸酯,并剧烈搅拌5小时。将反应混合物倒在碎冰上并轻轻搅拌。将固体收集在玻璃漏斗上,然后用水洗涤。为了实现脱保护,将滤饼加入到80%乙酸中,并在80℃下加热1小时。将烧瓶冷却,产物结晶,通过真空过滤进行收集并干燥。将粗制产物在己烷中重结晶或者在硅胶60上通过快速柱色谱纯化。

[0309] 一般方法G。(使用1-溴代烷烃/烯烃按文献中描述所进行的烷基化:(Halldorsson,A.等人.《四面体:不对称(Tetrahedron:Asymmetry)》,2004,15,2893-2899))。

[0310] 将亚异丙基甘油(1当量)、1-溴代烷烃/烯烃(1当量)和四丁基溴化铵(0.2当量)在圆底烧瓶中剧烈搅拌。缓慢加入研磨的氢氧化钾(2当量),并将混合物在油浴中于35至40℃下搅拌约15小时。将烷基化产物提取到己烷中,用H₂O洗涤有机相,然后蒸发得到1-O-烷基-2,3-亚异丙基-sn-甘油。

[0311] 脱保护:利用对甲苯磺酸(10mol%)将产物在THF/水中回流过夜。真空浓缩后,将残余物溶解于乙醚中,用水和盐水溶液洗涤,在无水硫酸镁上干燥,在旋转蒸发器上实现真空移除溶剂以提供1-O-烷基-sn-甘油。

[0312] 10a.1-O-十四烷基-sn-甘油。按照一般方法F进行合成。分析数据与文献值一致(Barragán,C.A.;Silva,E.G.;Moreno,B.M.;Mayorga,H.W.《来自两种沙蚕科物种的化合物和合成的饱和烷基甘油对群体感应的抑制(Inhibition of quorum sensing by compounds from two Eunicia species and synthetic saturated alkylglycerols)》.Vita 2018,25,92-103.)

[0313] 10b.1-O-十六烷基-sn-甘油购自Bachem America

[0314] 10c.1-O-十八烷基-sn-甘油购自Bachem America

[0315] 10d.1-O-油基-sn-甘油。根据一般方法G进行合成。将油基溴化物(541mg,1.63mmol)、Bu₄NBr(0.2当量)、2,3-亚异丙基-sn-甘油(1当量)与KOH(粉末,2.5当量)的混合物在40℃搅拌过夜。随后继续处理得到了583mg粗制的9d,为油。用p-TsOH·H₂O(0.15当量)在回流的THF(6mL)和H₂O(2.5mL)中将粗制的9d处理过夜。通过快速柱色谱(DCM 0%至8%中的MeOH)纯化粗制的油(540mg)得到420mg 1-O-油基-sn-甘油10d,为油。产率75%(两步)。¹H NMR(CDCl₃) δ5.36-5.33(m,2H),3.86-3.85(m,1H),3.72(dd,1H),3.62(dd,1H),3.52(dd,1H),3.46(dd,1H),3.50-3.42(m,2H),2.02-1.99(m,4H),1.59-1.55(五重峰,2H),1.35-1.26(m,22H),0.88(t,3H)ESI-MS:343.67[M+H]⁺,365.61[M+Na]⁺。

[0316] 1-O-烷基-2-O-取代的-sn-甘油的合成(方案2,12a-p)

[0317] 一般方法H。按文献中所描述的进行对1-O-取代的-sn-甘油的3-羟基的保护(例如,Kini,G.D.,Hostetler,S.E.,Beadle,J.R.,Aldern,K.A.《1-O-十八烷基-2-O-烷基-sn-甘油-3-膦甲酸盐缀合物在人巨细胞病毒感染的细胞中的合成和抗病毒活性(Synthesis and antiviral activity of 1-O-octadecyl-2-O-alkyl-sn-glycero-3-foscarnet conjugates in human cytomegalovirus-infected cells)》,《抗病毒研究》,1997,36,115;以及Huang,Z.,Szoka,Z.(2008);《甾醇修饰的磷脂:具有改进的生物膜特性的胆固醇

与磷脂嵌合体 (Sterol-Modified Phospholipids:Cholesterol and Phospholipid Chimeras with Improved Biomembrane Properties)》.《美国化学会志》,130,15702-15712)。将三乙胺 (1.5当量) 加入到在无水二氯甲烷中的1-0-烷基-sn-甘油 (1当量)、N,N-二甲氨基吡啶 (DMAP,0.1当量) 与三苯基氯化物 (TrCl,1.5当量) 的溶液中,并将混合物搅拌18小时。然后反应混合物用水猝灭、蒸发,并吸附到硅胶上,在硅胶上通过快速柱色谱纯化。递增的己烷中的乙酸乙酯梯度 (0%至20%) 洗脱出正确的级分。

[0318] 11a 1-0-十四烷基-3-0-三苯甲基-sn-甘油——按文献中所描述的进行制备 (Huang,Z.,Szoka,Z. (2008).《甾醇修饰的磷脂:具有改进的生物膜特性的胆固醇与磷脂嵌合体》.《美国化学会志》,130,15702-15712)。

[0319] 11b 1-0-十六烷基-3-0-三苯甲基-sn-甘油——按文献中所描述的进行制备 (Huang,Z.,Szoka,Z. (2008).《甾醇修饰的磷脂:具有改进的生物膜特性的胆固醇与磷脂嵌合体》.《美国化学会志》,130,15702-15712)。

[0320] 11c 1-0-十八烷基-3-0-三苯甲基-sn-甘油。根据一般方法D由10c进行制备。产率87%。¹H NMR (CDCl₃): δ 0.9 (t,3H),1.3 (bs,30H),1.55 (m,4H) 3.2 (m,2H),3.4-3.6 (m,3H),3.95 (m,1H) 7.2-7.5 (m,15H)。

[0321] 11d 1-0-油基-3-0-三苯甲基-sn-甘油。根据一般方法D由10d进行制备。产率77%。¹H NMR (CDCl₃): δ 0.88 (t,J=7.2,3H);1.27 (br,22H);1.55 (m,2H);2.0 (m,4H);2.40 (br,1H);3.20 (m,2H);3.41-3.56 (m,4H);3.95 (m,1H);5.35 (m,2H);7.25 (m,9H);7.45 (m,6H)。ESI-MS 607.75 [M+Na]⁺

[0322] 一般方法I。如前面所描述的进行1-0-烷基-3-0-三苯甲基-sn-甘油的烷基化和脱保护 (Kini,G.D.,Hostetler,S.E.,Beadle,J.R.,Aldern,K.A.《1-0-十八烷基-2-0-烷基-sn-甘油-3-膦酸盐缀合物在人巨细胞病毒感染的细胞中的合成和抗病毒活性》,《抗病毒研究》,1997,36,115)。简而言之,在0℃下将氢化钠 (2.5当量) 加入到搅拌的在DMF中的1-0-烷基-3-0-三苯甲基-sn-甘油 (1当量) 溶液中。20分钟后,加入R₂-的溴或甲磺酸酯衍生物 (1.8当量)。然后将反应混合物在室温下搅拌5小时,或者直至通过TLC表明反应基本完成。继续处理和柱色谱得到了1-0-烷基-2-0-取代的-3-0-三苯甲基-sn-甘油,利用酸对其进行去三苯甲基化。继续处理和柱色谱得到了1-0-烷基-2-0-取代的-sn-甘油。

[0323] 12a 1-0-十四烷基-2-0-苄基-sn-甘油——根据一般方法I由11a和苄基溴进行制备。通过ESI-MS:401.51 [M+Na]⁺对结构进行了证实。

[0324] 12b 1-0-十六烷基-2-0-苄基-sn-甘油——根据一般方法I由11b和苄基溴进行制备。¹H NMR (300MHz,CDCl₃): δ 7.36-7.27 (m,5H),4.65 (m,2H),3.79-3.59 (m,5H),3.55 (t,2H),1.57-1.51 (m,2H),1.29 (br s,26H),0.89 (t,3H)。

[0325] 12c 1-0-十六烷基-2-0-(3-氟-4-甲氧基苄基)-sn-甘油是根据一般方法I由11b和3-氟-4-甲氧基苄基溴进行制备的。

[0326] 12d 1-0-十八烷基-2-0-苄基-sn-甘油,

[0327] 12e 1-0-十八烷基-2-0-苄基-rac-甘油,

[0328] 12f 1-0-十八烷基-2-0-辛基-sn-甘油,

[0329] 12g 1-0-十八烷基-2-0-(环己基甲基)-sn-甘油,

[0330] 12h 1-0-十八烷基-2-0-(3-氟苄基)-sn-甘油,

[0331] 12i 1-0-十八烷基-2-0-(4-甲氧基苄基)-sn-甘油,

[0332] 12j 1-0-十八烷基-2-0-(3-氟-4-甲氧基苄基)-sn-甘油,和

[0333] 12k 1-0-十八烷基-2-0-(吡啶-3-基-甲基)-sn-甘油是根据一般方法I由11c和适当溴化物进行制备的。

[0334] 12l 1-0-油基-2-0-苄基-sn-甘油。在0℃下将氢化钠(1.3当量)加入到在DMF(4mL)中的11d(531mg,0.91mmol)中。在加入苄基溴(1.3当量)之前,将所得混合物在室温下搅拌1小时。将反应混合物在室温下搅拌过夜。继续处理和柱色谱得到354mg粗制产物,还回收了200mg的11d。进行脱保护得到了12l。¹H NMR(300MHz,氯仿-d) δ 7.35-7.26(m,4H),5.36-5.32(m,2H),3.84-3.62(m,5H),3.54-3.46(m,2H),3.44(t,2H),2.88-2.75(m,2H),2.02(m,4H),1.54-1.50(五重峰2H),1.29(br s,22H),0.88(t,3H)。455.73[M+Na]⁺

[0335] 12m 1-0-油基-2-0-(3-氟-4-甲氧基苄基)-sn-甘油。根据一般方法I由11d和的3-氟-4-甲氧基苄基溴进行制备。¹H NMR(300MHz,氯仿-d) δ 7.12(m,2H),6.95(t,1H),5.36-5.32(m,2H),4.65-4.52(dd,2H),3.75-3.70(m,2H),3.67-3.60(m,2H),3.57-3.55(m,2H),3.45(t,2H),2.01-1.97(m,2H),1.28(br s,16H),0.87(t,3H)。ESI-MS:503.79[M+Na]⁺

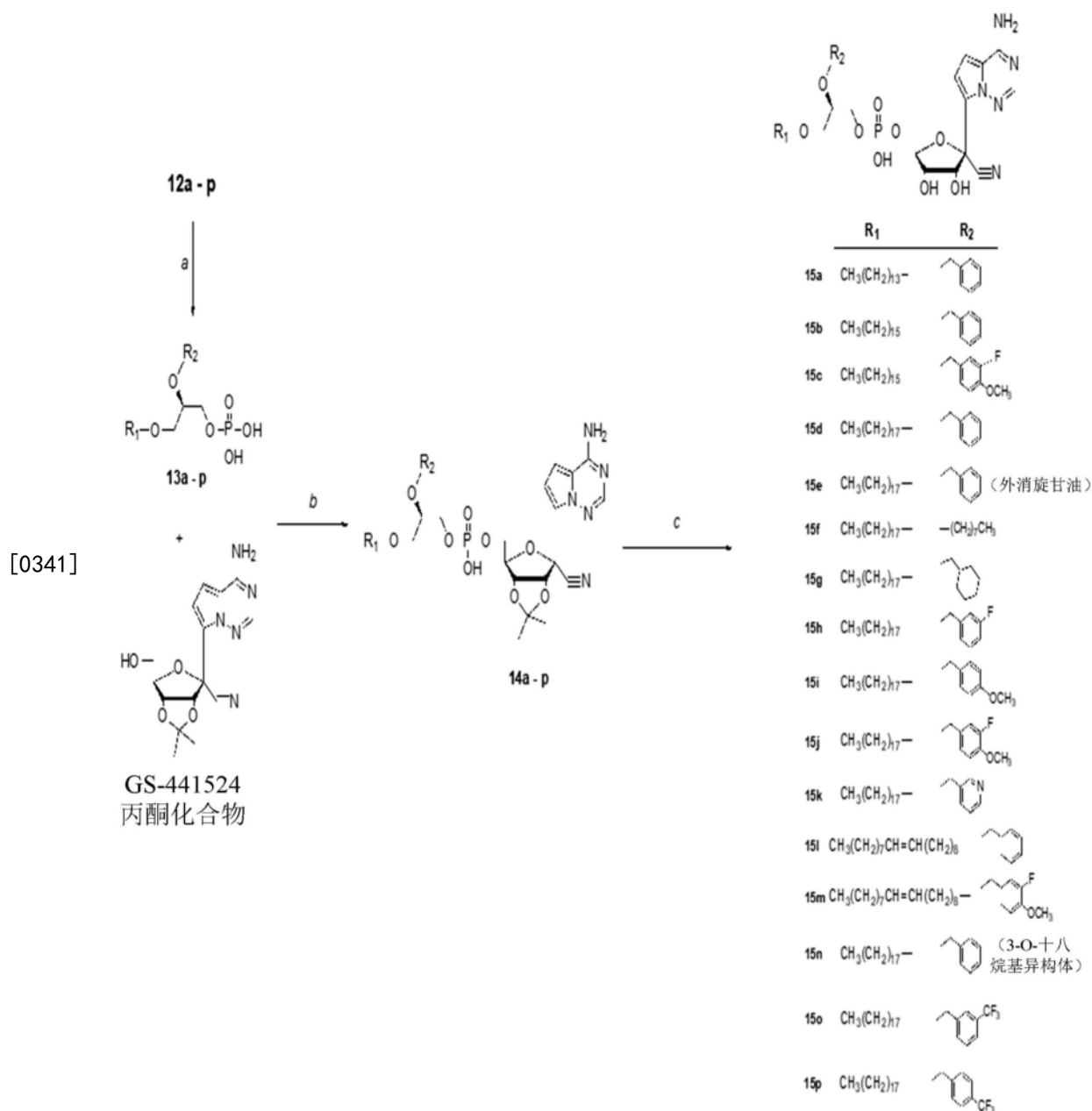
[0336] 12n 3-0-十八烷基-2-0-苄基-sn-甘油。

[0337] 12o 1-0-十八烷基-2-0-(3-三氟甲基)苄基)-sn-甘油ESI-MS 525.47[M+Na]⁺。

[0338] 12p 1-0-十八烷基-2-0-(4-三氟甲基)苄基)-sn-甘油。ESI-MS 503.35[M+H]⁺。

[0339] GS-4415245'-一磷酸酯的1-0-烷基-2-0-取代的-sn-甘油酯的合成(方案3,15a-p)

[0340] 以下方案描述了用于生产GS-441524 5'-一磷酸酯的1-0-烷基-2-0-取代的-sn-甘油酯的合成步骤的实施例。



[0342] 方案3.GS-441524 5'-一磷酸酯的1-O-烷基-2-O-取代的-sn-甘油酯的合成试剂：
a) POCl₃或双(三氯乙基)磷酰氯/锌粉；b) DCC/DMAP或DIC/NMI,吡啶；c) 甲酸或浓HCl/THF。

[0343] 一般方法J.按文献中所描述的完成对1-O-烷基-2-O-取代-sn-甘油的磷酸化(Kates, M., Adams, G.A., Blank, M.L., Snyder, F.M. (1991), 《血小板活化因子磺鎓类似物的化学合成和生理活性(Chemical synthesis and physiological activity of sulfonium analogues of platelet activating factor)》.《脂类(Lipids)》,26,1095-1101)。将1-O-烷基-2-O-取代的-sn-甘油(11.5mmol)和1-甲基咪唑(14.4mmol)溶解于无水吡啶(100mL)中,并在室温下搅拌。在10分钟内滴加在乙醚(20mL)中的双(三氯乙基)磷酰氯(5.5g, 14.4mmol)溶液,然后将混合物搅拌过夜。TLC分析显示完全磷酸化。加入水(10mL)以猝灭过量的试剂,然后将混合物通过旋转蒸发浓缩,并与甲苯共蒸发以移除吡啶。将残余物吸附到硅胶60(ca.30g)并通过快速柱色谱纯化。使用100%己烷至25% EtOAc/己烷的梯度洗脱来分离受保护的磷酸化产物。

[0344] 将产物(9.65mmol)溶解在氯仿(50mL)与冰醋酸(90mL)的混合物中,然后剧烈搅拌并用冰水浴冷却。向混合物中加入锌粉(5g),搅拌1小时,然后除去冰水浴,再继续搅拌2小时。通过真空过滤除去剩余的锌,将澄清的滤液通过旋转蒸发浓缩。将残余物溶于20% MeOH/CH₂Cl₂(250mL)中并用1M HCl(3×50mL)进行萃取,然后将有机层浓缩并与乙醇(2×50mL)共蒸发。将蜡状残余物溶于1,4-二噁烷、冷冻,然后在真空中冻干(18小时)以提供甘油基磷酸酯。

[0345] 化合物13a、13b、13c、13d、13e、13f、13g、13h、13i、13j和13k按照一般方法J进行制备。

[0346] 13l 1-0-油基-2-0-苄基-sn-甘油基-3-磷酸酯。按照一般方法A进行制备。¹H NMR(300MHz,氯仿-d) δ7.36-7.23(m,5H),5.36-5.32(m,2H),4.69(d,J=11.9Hz,1H),4.62(d,J=11.8Hz,1H),4.11-4.09(m,2H),3.80-3.77(m,2H),3.76-3.69(m,1H),3.53-3.47(m,1H),3.42(t,2H),2.00(tq,J=7.1,3.7Hz,4H),1.50(m,2H),1.26(br s,22H),0.87(t,3H)。ESI-MS:513.72[M+1]⁺

[0347] 13m 1-0-油基-2-0-(3-氟-4-甲氧基苄基)-sn-甘油基-3-磷酸酯。按照一般方法A进行制备。

[0348] 13n 3-0-十八烷基-2-0-苄基-sn-甘油基-1-磷酸酯。按照一般方法A进行制备。

[0349] 13o 1-0-十八烷基-2-0-(3-三氟甲基)苄基-sn-甘油基-3-磷酸酯。按照一般方法A进行制备。ESI-MS 581.49[M-H]⁻。

[0350] 13p 1-0-十八烷基-2-0-(4-三氟甲基)苄基-sn-甘油基-3-磷酸酯。按照一般方法A进行制备。ESI-MS 581.47[M-H]⁻。

[0351] 磷酸酯13a-p与GS-441524丙酮化合物(瑞德西韦核苷,RVn丙酮化合物)的偶联

[0352] 14a 1-0-十四烷基-2-0-苄基-sn-甘油基-磷酸基-RVn丙酮化合物——根据一般方法C由GS-441524丙酮化合物和13a进行制备。通过ESI-MS 770.50[M-H]⁻对结构进行了证实。

[0353] 14b 1-0-十六烷基-2-0-苄基-sn-甘油基-磷酸基-RVn丙酮化合物——根据一般方法C由GS-441524丙酮化合物和13b进行制备。

[0354] 14c 1-0-十六烷基-2-0-(3-氟-4甲氧基-苄基)-sn-甘油基-磷酸基-RVn丙酮化合物——根据一般方法C由GS-441524丙酮化合物和13c进行制备。

[0355] 14d 1-0-十八烷基-2-0-苄基-sn-甘油基-磷酸基-RVn丙酮化合物——根据一般方法B由GS-441524丙酮化合物和13d进行制备。将N,N-二环己基碳二亚胺(DCC,310mg,1.5mmol)加入到在25mL无水吡啶中的丙酮化合物(300mg,0.91mmol)、磷酸酯13d(515mg,1.0mmol)与4-二甲氨基吡啶(DMAP,122mg,1.0mmol)的混合物中,然后将混合物加热至90℃并搅拌24小时。然后将吡啶蒸发,将残余物在硅胶60上通过快速柱色谱纯化。梯度洗脱(CH₂Cl₂/甲醇10%至20%)得到210mg(28%产率)的化合物14d。ESIMS 826.58[M-H]⁻。

[0356] 14e 1-0-十八烷基-2-0-苄基-rac-甘油基-磷酸基-RVn丙酮化合物——根据一般方法C由GS-441524丙酮化合物和13e进行制备。

[0357] 14f 1-0-十八烷基-2-0-辛基-sn-甘油基-磷酸基-RVn丙酮化合物——根据一般方法C由GS-441524丙酮化合物和13f进行制备。

[0358] 14g 1-0-十八烷基-2-0-(环己基甲基)-sn-甘油基-磷酸基-RVn丙酮化合物——

可以根据一般方法C由GS-441524丙酮化合物和13g进行制备。

[0359] 14h 1-0-十八烷基-2-0-(3-氟-苄基)-sn-甘油基-磷酸基-RVn丙酮化合物——根据一般方法C由GS-441524丙酮化合物和13h进行制备。

[0360] 14i 1-0-十八烷基-2-0-(4-甲氧基-苄基)-sn-甘油基-磷酸基-RVn丙酮化合物——可以根据一般方法C由GS-441524丙酮化合物和13i进行制备。

[0361] 14j 1-0-十八烷基-2-0-(3-氟-4-甲氧基-苄基)-sn-甘油基-磷酸基-RVn丙酮化合物——根据一般方法C由GS-441524丙酮化合物和13j进行制备。

[0362] 14k 1-0-十八烷基-2-0-(吡啶-3-基-甲基)-sn-甘油基-磷酸基-RVn丙酮化合物——可以根据一般方法C由GS-441524丙酮化合物和13k进行制备。

[0363] 14l 1-0-油基-2-0-苄基-sn-甘油基-磷酸基-RVn丙酮化合物。根据一般方法B由GS-441524丙酮化合物和13l进行制备。

[0364] 14m 1-0-油基-2-0-(3-氟-4-甲氧基-苄基)-sn-甘油基-磷酸基-RVn丙酮化合物。根据一般方法B由GS-441524丙酮化合物和13m进行制备。

[0365] 14n 3-0-十八烷基-2-0-苄基-sn-甘油基-1-磷酸基-RVn丙酮化合物。根据一般方法B由GS-441524丙酮化合物和13n进行制备。

[0366] 14o 1-0-十八烷基-2-0-(3-三氟甲基)-sn-甘油基-磷酸基-RVn丙酮化合物。根据一般方法B由GS-441524丙酮化合物和13o进行制备。ESI-MS 894.66[M-H]⁻。

[0367] 14p 1-0-十八烷基-2-0-(4-三氟甲基)苄基-sn-甘油基-磷酸基-RVn丙酮化合物。根据一般方法B由GS-441524丙酮化合物和13p进行制备。ESI-MS 894.53[M-H]⁻。

[0368] 丙酮化合物保护基团的移除

[0369] 15a 1-0-十四烷基-2-0-苄基-sn-甘油-磷-RVn——根据一般方法E由化合物14a进行制备,并分离为灰白色粉末。通过ESI-MS[M-H]⁻=730.41对结构进行了证实。

[0370] 15b 1-0-十六烷基-2-0-苄基-sn-甘油基-磷酸基-RVn。根据一般方法E由化合物14b进行制备。¹H NMR (500MHz, DMSO-d₆) δ7.94(s, 1H), 7.89(s, 1H), 7.81(s, 1H), 7.32-7.25(m, 3H), 7.22(ddd, J=8.7, 5.4, 2.6Hz, 1H), 6.88(d, J=4.5Hz, 1H), 6.80(d, J=4.5Hz, 1H), 6.24(s, 1H), 5.95(d, J=4.0Hz, 1H), 4.55(q, J=12.1, 12.1, 12.1Hz, 3H), 4.09(dt, J=6.7, 4.3, 4.3Hz, 1H), 3.92(d, J=4.5Hz, 1H), 3.78(dtt, J=24.4, 7.8, 7.8, 4.4, 4.4Hz, 2H), 3.66-3.55(m, 3H), 3.43(dd, J=10.6, 3.5Hz, 1H), 3.32-3.28(m, 2H), 1.42(q, J=6.5, 6.5, 6.0Hz, 2H), 1.20(d, J=7.7Hz, 24H), 0.83(t, J=7.0, 7.0Hz, 3H)。LC/MS纯度为99.8%; [M+H]⁺760.6。

[0371] 15c 1-0-十六烷基-2-0-(3-氟,4-甲氧基苄基)-sn-甘油基-磷酸基-RVn。根据一般方法E由化合物14c进行制备。¹H NMR (500MHz, DMSO-d₆) δ7.89(s, 1H), 7.80(s, 1H), 7.11(d, J=12.3Hz, 1H), 7.04(d, J=6.1Hz, 2H), 6.87(d, J=4.6Hz, 1H), 6.81(d, J=4.5Hz, 1H), 6.17(s, 1H), 4.56(d, J=5.0Hz, 1H), 4.52-4.41(m, 2H), 4.10(s, 1H), 3.93(q, J=5.4, 5.2, 5.2Hz, 1H), 3.78(s, 3H), 3.63(s, 2H), 3.57(d, J=4.6Hz, 1H), 3.41(dd, J=10.4, 3.5Hz, 1H), 3.29(s, 3H), 1.41(d, J=6.5Hz, 2H), 1.25-1.17(m, 24H), 0.83(t, J=7.0, 7.0Hz, 3H)。LC/MS纯度为99.8%; [M+H]⁺808.9。

[0372] 15f 1-0-十八烷基-2-0-辛基-sn-甘油基-磷酸基-RVn丙酮化合物——根据一般方法E由化合物14f进行制备。¹H NMR (500MHz, DMSO-d₆) δ7.89(s, 1H), 7.79(s, 1H), 6.88(d, J

=4.5Hz, 1H), 6.80 (d, J=4.5Hz, 1H), 6.10 (s, 1H), 5.92 (s, 1H), 4.56 (t, J=5.2, 5.2Hz, 1H), 4.08 (t, J=5.7, 5.7Hz, 1H), 3.91 (q, J=5.0, 4.9, 4.9Hz, 1H), 3.79 (d, J=18.1Hz, 3H), 3.54 (d, J=19.3Hz, 3H), 3.46-3.35 (m, 5H), 3.33 (s, 2H), 3.27-3.23 (m, 1H), 1.41 (dt, J=16.0, 7.4, 7.4Hz, 4H), 1.21 (d, J=4.5Hz, 36H), 0.83 (td, J=7.1, 7.0, 5.7Hz, 6H)。LC/MS纯度为99.7%; [M+H]⁺810.7。

[0373] 15g 1-0-十八烷基-2-0-(乙基环己基)-sn-甘油基-磷酸基-RVn——可以根据一般方法E由化合物14g进行制备。

[0374] 15h 1-0-十八烷基-2-0-(3-氟-苄基)-sn-甘油基-磷酸基-RVn——根据一般方法E由化合物14h进行制备。¹H NMR (500MHz, DMSO-d₆) δ8.47 (s, 2H), 7.88 (s, 2H), 7.36-7.26 (m, 1H), 7.12 (q, J=8.4, 6.9, 6.9Hz, 2H), 7.03 (td, J=8.5, 8.4, 2.9Hz, 1H), 6.88 (d, J=4.5Hz, 1H), 6.80 (d, J=4.5Hz, 1H), 6.30 (s, 1H), 5.97 (s, 1H), 4.64-4.50 (m, 3H), 4.13-4.07 (m, 1H), 3.92 (t, J=5.8, 5.8Hz, 1H), 3.79 (dddd, J=33.7, 12.0, 7.6, 4.3Hz, 2H), 3.63 (dtt, J=14.0, 10.1, 10.1, 5.7, 5.7Hz, 3H), 3.43 (dd, J=10.7, 3.4Hz, 2H), 1.43 (p, J=6.5, 6.5, 6.5, 6.5Hz, 2H), 1.20 (d, J=11.1Hz, 30H), 0.83 (t, J=6.9, 6.9Hz, 3H)。LC/MS纯度为98.7%; [M+H]⁺806.8。

[0375] 15i 1-0-十八烷基-2-0-(4-甲氧基苄基)-sn-甘油基-磷酸基-RVn——可以根据一般方法E由化合物14i进行制备。

[0376] 15j 1-0-十八烷基-2-0-(3-氟-4-甲氧基-苄基)-sn-甘油基-磷酸基-RVn——根据一般方法E由化合物14j进行制备。¹H NMR (500MHz, DMSO-d₆) δ8.43 (d, J=6.7Hz, 2H), 7.99-7.73 (m, 2H), 7.04 (d, J=5.5Hz, 1H), 6.87 (q, J=3.7, 3.7, 3.2Hz, 1H), 6.82 (dd, J=7.3, 4.3Hz, 1H), 6.17-5.74 (m, 1H), 4.59 (t, J=4.9, 4.9Hz, 1H), 4.53-4.41 (m, 1H), 4.11 (q, J=4.9, 4.9, 4.9Hz, 1H), 3.93 (q, J=5.4, 5.4, 5.4Hz, 1H), 3.84 (dq, J=11.3, 6.5, 5.1, 5.1Hz, 1H), 3.80-3.70 (m, 3H), 3.61 (ddd, J=27.7, 10.9, 5.2Hz, 3H), 3.30 (dd, J=6.6, 3.0Hz, 3H), 3.21 (dq, J=9.8, 5.1, 5.1, 4.9Hz, 1H), 1.43 (p, J=6.6, 6.6, 6.5, 6.5Hz, 2H), 1.27-1.16 (m, 30H), 0.83 (t, J=6.8, 6.8Hz, 3H)。LC/MS纯度为94.7%; [M+H]⁺836.8。

[0377] 15k 1-0-十八烷基-2-0-(吡啶-3-基-苄基)-sn-甘油基-磷酸基-RVn——可以根据一般方法E由化合物14k进行制备。

[0378] 15l 1-0-油基-2-0-苄基-sn-甘油基-磷酸基-RVn。根据一般方法D由化合物14l进行制备,并分离为灰白色固体,产率84%。¹H NMR (300MHz, CDCl₃+CD₃OD) δ7.79 (s, 1H), 7.38 (s, 2H), 7.27-7.21 (m, 5H), 6.92 (d, J=6.0Hz, 1H), 6.90 (d, J=6.0Hz, 1H), 5.30 (t, J=6.0Hz, 2H), 4.70 (d, J=11Hz, 1H), 4.62 (d, J=5Hz, 1H), 4.34-4.49 (m, 1H), 4.20 (m, 1H), 3.90-3.87 (m, 2H), 4.18-4.06 (m, 2H), 3.71-3.69 (m, 2H), 3.52 (ddd, J=11.7, 3.1, 1.3Hz, 1H), 3.35 (t, 2H), 1.96-1.93 (m, 4H), 1.49-1.47 (m, 2H), 1.33-1.23 (m, 20H), 0.83 (t, 2H)。LC/MS纯度为99%; [M+H]⁺786.78。

[0379] 15m 1-0-油基-2-0-(3-氟,4-甲氧基苄基)-sn-甘油基-磷酸基-RVn。根据一般方法D由化合物14m进行制备,并分离为灰白色固体。产率为92%。¹H NMR (300MHz, CD₃OD) δ7.74 (s, 1H), 7.32 (s, 2H), 6.99 (d, J=6.0Hz, 1H), 6.92-6.77 (m, 3H), 5.23 (t, J=6.0Hz, 2H), 4.67 (d, J=11Hz, 1H), 4.49 (d, J=5Hz, 2H), 4.30 (m, 1H), 4.20 (m, 1H), 3.83-3.81 (m, 2H), 3.75 (s, 3H), 3.63 (m, 1H), 3.31 (t, 2H), 1.91-1.89 (m, 4H), 1.44 (m, 2H), 1.18 (br s, 22H),

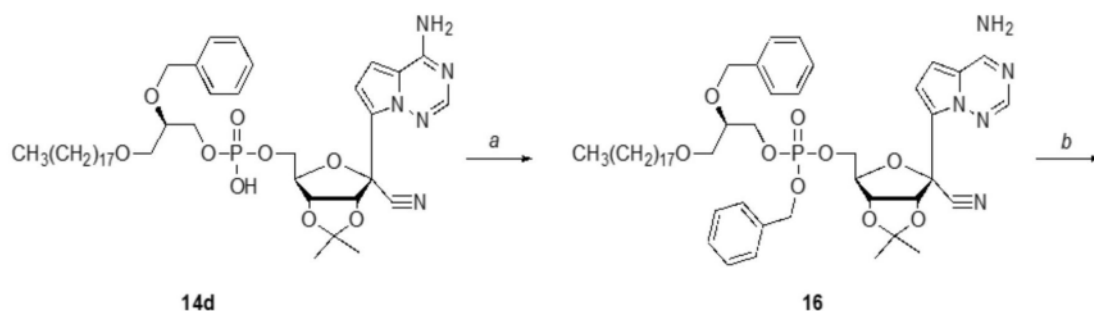
0.77 (t, 2H)。LC/MS纯度为99%； $[M+H]^+$ 834.87。

[0380] 15n 3-O-十八烷基-2-O-苄基-sn-甘油基-1-磷酸基-RVn。根据一般方法D由化合物14n进行制备,并分离为灰白色固体。

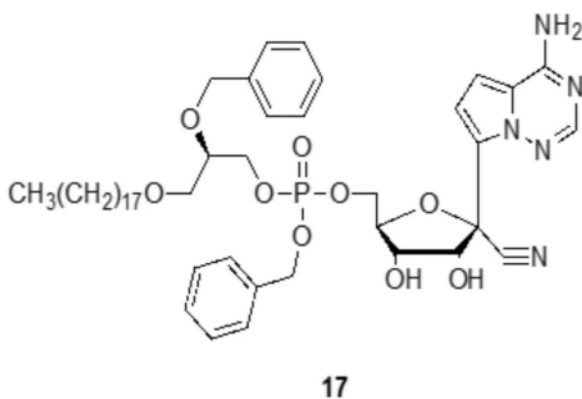
[0381] 15o 1-O-十八烷基-2-O-(3-三氟甲基)苄基-sn-甘油基-磷酸基-RVn。根据一般方法D由化合物14o进行制备,并分离为灰白色固体。ESI-MS 854.48 $[M-H]^-$ 。

[0382] 15p 1-O-十八烷基-2-O-(4-三氟甲基)苄基-sn-甘油基-磷酸基-RVn。根据一般方法D由化合物14p进行制备,并分离为灰白色固体。ESI-MS 854.46 $[M-H]^-$ 。

[0383] D.1-O-十八烷基-2-O-苄基-sn-甘油基-苄基-磷酸基-RVn的合成



[0384]



[0385] 方案4. 试剂:a) 苯甲醇、PyBOP、DIEA、DMF;b) 甲酸, 室温

[0386] 将在无水DMF (5mL) 中的化合物14d (160mg, 0.22mmol)、苯甲醇 (48mg, 0.45mmol)、二异丙基乙胺 (DIEA, 58mg, 0.45mmol) 和六氟磷酸 (1H-苯并三唑-1-基-氧基)-三吡咯烷基磷 (PyBOP, 230mg, 0.45mmol) 在室温下搅拌3小时。然后将DMF蒸发,将残余物溶解于乙酸乙酯 (50mL) 并用饱和NaHCO₃洗涤 (3×10mL)。将有机层在MgSO₄上干燥并浓缩。将残余物在硅胶上通过柱色谱纯化,用氯仿/甲醇 (0%至15%) 洗脱得到16。ESI-MS 918.33 $[M-H]^-$ 。

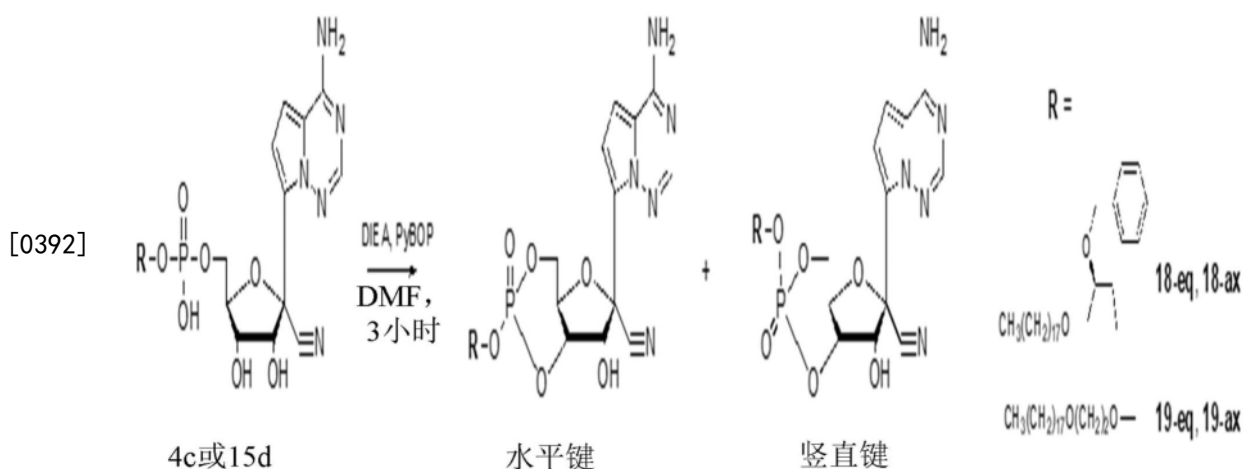
[0387] 将化合物16加入到甲酸中,通过TLC监测脱保护作用。将混合物在真空下浓缩,通过柱色谱 (硅胶, 二氯甲烷/甲醇10%至20%) 纯化残余物,得到化合物17。通过ESI-MS: 878.35 $[M+H]^+$, 900.43 $[M+Na]^+$ 对结构进行了证实。

[0388] E.GS-441524-3',5'-环状一磷酸酯、十八烷氧基乙基和1-O-十八烷基-2-O-苄基-sn-甘油酯的合成

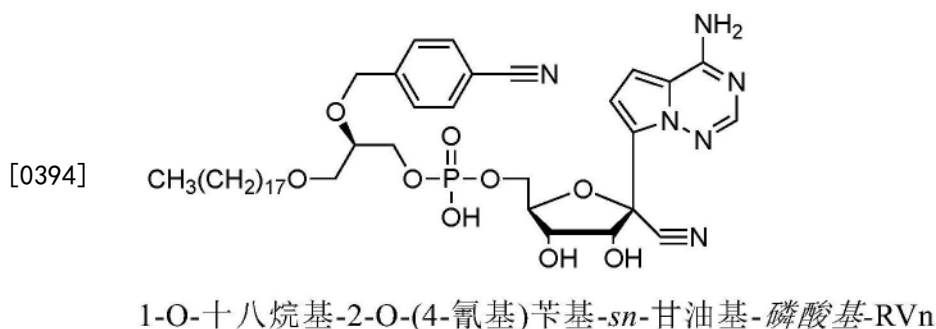
[0389] 在另一个实施例中,本公开的化合物是3',5'-环状磷酸酯。按照有机合成领域技术人员已知的方法,由已知的或容易制备的起始原料制备3',5'-环状磷酸酯。例如,由磷酸二酯15d和4c通过分子内酯化反应制备3',5'-环状磷酸酯18-eq、18-ax、19-eq和19-ax:

[0390] 将在无水DMF (5mL) 中的1-O-十八烷基-2-O-苄基-sn-甘油基-磷酸基-RVn (15d, 1mmol) 溶液加入到在无水DMF (5mL) 中的二异丙基乙胺 (DIEA, 58mg, 0.45mmol) 与六氟磷酸 (1H-苯并三唑-1-基-氧基)-三吡咯烷基磷 (PyBOP, 230mg, 0.45mmol) 的溶液中, 并在室温下搅拌3小时直到TLC表明基本转化为3', 5'-环状磷酸酯。加入水 (mL) 并在真空下将溶剂蒸发。将残余物在硅胶上通过柱色谱纯化, 得到化合物18-eq (ESI-MS: 770.18 [M+H]⁺), 以及18-ax (ESI-MS: 770.29 [M+H]⁺)。

[0391] 类似地, 将在无水DMF (5mL) 中的十八烷氧基乙基-磷酸基-RVn (4c, 1mmol) 溶液加入到在无水DMF (5mL) 中的二异丙基乙胺 (DIEA, 160mg, 1.5mmol) 与六氟磷酸 (1H-苯并三唑-1-基-氧基)-三吡咯烷基磷 (PyBOP, 780mg, 1.5mmol) 的溶液中, 并在室温下搅拌3小时直到TLC表明基本转化为3', 5'-环状磷酸酯。加入水 (1mL) 并在真空下将溶剂蒸发。将残余物在硅胶上通过柱色谱纯化, 得到化合物19-eq (ESI-MS: 650.41 [M+H]⁺) 以及19-ax (ESI-MS: 650.42 [M+H]⁺)。

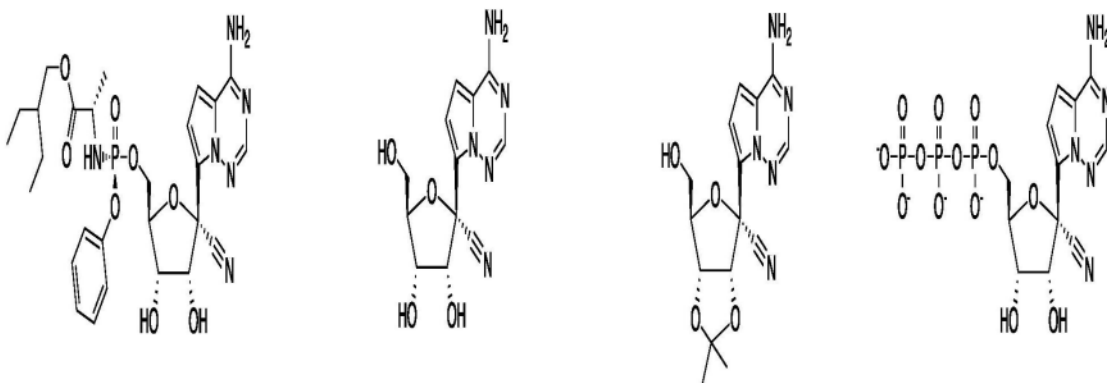


[0393] F. 1-O-十八烷基-2-O-(4-氰基)-sn-甘油基-磷酸基-RVn的合成。使用上述小节C中概述的方法制备OD-4-CN-Bn-P-RVn。用4-氰基苄氯将1-O-十八烷基-3-O-三苯甲基-sn-甘油烷基化并移除三苯甲基 (方法I), 以提供1-O-十八烷基-2-O-(4-氰基)苄基-sn-甘油。然后将醇磷酸化 (方法A), 并与GS-441524丙酮化合物偶联 (方法C) 和脱保护 (方法E), 得到题述化合物。



[0395] 实例2——Vero E6细胞中抗冠状病毒活性的测定

[0396] 在本实例中, 涉及以下化合物, 其包括瑞德西韦核苷类似物和相关中间体:



瑞德西韦, RDV, **1** 瑞德西韦核苷, RVn, **2** 2,3-亚异丙基-RVn, RVa, **2a** RVn 三磷酸酯, **3**

[0397] 在Vero E6细胞中与瑞德西韦(RDV)和瑞德西韦核苷(RVn)相比地测定本实例的化合物的抗冠状病毒活性。在96孔板中,将一万个Vero E6细胞接种在100微升的培养基中。第二天,将连续两倍稀释的抗病毒化合物或含DMSO的载剂加入到每个孔中。三十分钟后,将SARS CoV-2的美国WA-01株以0.1的感染复数加入到每个孔中。将细胞孵育48小时,在PBS中洗涤两次,并用TRIzol裂解。使用Directzol微型RNA柱提取RNA。将RNA制成cDNA,并通过qPCR测定SARS CoV-2刺突蛋白和看家基因(RPLP0) RNA。数据代表重复孔的平均值。还在VERO E6细胞中测量了细胞毒性。如下文,与瑞德西韦或瑞德西韦核苷相比,所合成的化合物中的每一种均表现出增强的抗SARS CoV-2活性,选择性指数范围为22.8至>227。使用可商购获得的MTT测定法评估细胞毒性(CC₅₀)。

[0398] 如下表所示,ODE-P-RVn (4c) 和ODBG-P-RVn (15d) 在Vero E6细胞中对SARS-CoV-2019的美国WA-1株的活性多9至15倍。同样,HDP-P-RVn (4b) 的活性比瑞德西韦多3.3倍。

[0399] 感染有SARS-CoV-2的Vero E6细胞中的抗病毒活性

化合物	EC ₅₀ (μM)	EC ₉₀ (μM)	CC ₅₀ (μM)	选择性指数
RDV	3.16	5.50	>50	>15,8
ODE-P-RVn (4c)	0.35	0.53	>50	>143
ODBG-P-RVn (15d)	0.21	0.56	>50	>238
HDP-P-RVn (4b)	0.84	1.58	21	25.0
RVn	1.56	2.69	>50	>32.0

[0401] 缩写语:EC₅₀, 50%有效浓度;EC₉₀, 90%有效浓度;CC₅₀, 50%细胞毒性浓度。选择性指数=CC₅₀/EC₅₀。

[0402] 实例3. RVn一磷酸酯前药另外的合成与测试。

[0403] 抗病毒活性:在以两个重复进行的两个独立实验中,还生成了ODBG-P-RVn (15d)、ODE-P-RVn (4c) 和HDP-P-RVn (4b)、瑞德西韦(RDV)和瑞德西韦核苷(RVn)对Vero E6细胞中SARS-CoV-2感染的浓度-反应曲线(图1A至图1F)。三种瑞德西韦类似物(图1A、图1B和图1C)、瑞德西韦(GS-5734)(图1D)和瑞德西韦核苷(GS-441524)(图1E)在Vero E6细胞中抗SARS-CoV-2感染的剂量反应曲线。将Vero E6细胞用标示剂量的标示药物预处理三十分钟,然后用SARS-CoV-2分离物USA-WA1/2020感染48小时。通过qRT-PCR确定SARS-CoV-2刺突RNA的相对表达。在2个独立的场合同时对所有药物进行每种剂量反应的比较。图1A至图1F中显示了两个实验的数据。数据点表示重复孔的平均相对表达。误差线代表标准偏差(SD)。黑色

竖直虚线表示存在50%抑制时的浓度(EC_{50})。(图1F)。将所有五种化合物和DMSO的抑制曲线合并并在单个图上。DMSO是所有化合物的载剂,其在所用浓度下对SARS-CoV-2复制没有影响。RVn-一磷酸酯的三种脂质酯均明显比RDV和RVn更具活性。

[0404] 下表显示了有效浓度(EC_{50} , EC_{90})、50%细胞毒性浓度(CC_{50})和化合物的选择性指数,平均值 $\pm$ SD。使用Cell Titer Glo评估细胞毒性(CC_{50})。RDV和RVn的 EC_{50} 值分别为4.6和1.7 μ M。脂质前药更具活性, EC_{50} 的范围为 0.19 ± 0.023 至 0.96 ± 0.17 。ODBG-P-RVn和ODE-P-RVn是最具活性和选择性的化合物。基于 EC_{50} 值,最具活性的化合物ODBG-P-RVn的活性比RDV多24倍,比RVn多8.9倍($p < 0.001$ 和 0.005),选择性指数为240。

[0405] 化合物在Vero E6细胞中的抗病毒活性、细胞毒性及选择性

化合物	EC_{50} (μ M)	EC_{90} (μ M)	CC_{50} (μ M)	选择性	与 RDV、RVn 相比的 p 值
[0406] 瑞德西韦	4.6 ± 2.1	8.9 ± 4.9	>100	>21.7	-
瑞德西韦核苷	1.7 ± 0.13	3.2 ± 0.77	>100	>58.8	-
HDP-P-RVn, 5a	0.96 ± 0.17	2.1 ± 0.78	51	52	0.02、0.59
ODE-P-RVn, 5b	0.47 ± 0.18	1.1 ± 0.80	>100	>212	0.004、0.047
ODBG-P-RVn, 5c	0.19 ± 0.023	0.56 ± 0.0002	46	240	<0.001、0.005
[0407]	补充材料中显示了显示通过 Cell Titer Glo 测得的 CC_{50} 结果的图。缩略语: RDV, 瑞德西韦 (GS-5734); RVn, 瑞德西韦核苷 (GS-441524); HDP-P-, 十六烷氧基丙基-P-; ODE-P-, 十八烷氧基乙基-P-; ODBG-P-, 1-O-十八烷基-2-O-苄基-甘油-3-P-; 选择性指数, CC_{50}/EC_{50} ; 统计分析通过单因素方差分析比较来自独立实验的 LogIC_{50} 值。				

[0408] 由于RDV的所有已知缺点,在本实例中选择设计可提供口服生物利用性的RVn前药,因为有效的口服药将允许对被诊断患有SARS-CoV-2感染的人进行更早的治疗。如本实例中所示,这是通过构建类似于通常在胃肠道中吸收的溶血磷脂的RVn的脂质核苷酸来实现的。RVn脂质核苷酸在血浆中不发生迅速代谢,但能迅速进入细胞,常表现出抗病毒活性大大增加。

[0409] 与需要四次转化的RDV活化截然不同,当脂质酯部分在酸性磷脂酶C或酸性鞘磷脂酶(鞘磷脂磷酸二酯酶I)催化的单一反应中被切下时,利用这种化合物的细胞内激酶旁路产生核苷一磷酸酯。

[0410] 其中一种化合物——ODBG-P-RVn (15d) 可能向肺部递送相对更多的药物,而向肝递送更少的药物,如先前在致死性鼠痘感染中所显示的(Hostetler KY, Beadle JR等人《口服的1-O-十八烷基-2-O-苄基-sn-甘油-3-西多福韦靶向肺部并且对脱脚病病毒在小鼠中的致命呼吸道攻击有效(Oral 1-O-octadecyl-2-O-benzyl-sn-glycero-3-cidofovir targets the lung and is effective against a lethal respiratory challenge with ectromelia virus in mice)》;《抗病毒研究》2007年3月;73(3):212-8)。

[0411] 本实例的脂质前药的合成比RDV简单得多,并且易于规模化。

[0412] 在本实例中,合成了RVn的三种脂质前药,它们在Vero E6细胞中明显比RDV或RVn更具活性。两种最具活性的化合物ODBG-P-RVn和ODE-P-RVn的活性分别比RDV多24倍和9.8倍。预计这些化合物具有口服可生物利用性,在血浆中稳定,并对感染SARS-CoV-2的所有组织提供显著的暴露和抗病毒活性。

[0413] 化合物:瑞德西韦(GS-5734)和瑞德西韦核苷(GS-441524)分别购自AA Blocks(加利福尼亚州圣地亚哥(San Diego, CA))和Mason-Chem(加利福尼亚州帕罗奥图(Palo Alto,

CA))。

[0414] 细胞:Vero E6是从ATCC获得的,在有10% FBS和青霉素-链霉素(Gibco)的DMEM(康宁公司(Corning))中生长。

[0415] SARS-CoV-2感染:使用Vero E6(ATCC)细胞对SARS-CoV-2分离株USA-WA1/2020(BEI Resources)进行增殖,并通过空斑测定定量感染单位。在96孔板中,每孔接种约 10^4 个Vero E6细胞并孵育过夜。在感染前30分钟以标示浓度加入化合物或对照,随后以等于0.01的感染复数加入SARS-CoV-2。在37℃和5% CO₂下孵育48小时后,将细胞用PBS洗涤两次,并在200μl TRIzol(赛默飞世尔公司(ThermoFisher))中裂解。

[0416] RNA提取、cDNA合成和qPCR:根据包括DNase处理在内的制造商建议,使用直接Direct-zol RNA Microprep试剂盒(Zymo Research)从TRIzol裂解物中纯化RNA。使用iScript cDNA合成试剂盒(BioRad)将RNA转化为cDNA,并使用iTaq通用型SYBR green超混合液(BioRad)和ABI 7300实时PCR系统进行qPCR。使用以下引物扩增cDNA:RPLP0 F-GTGTTCGACAATGGCAGCAT(SEQ ID NO:1);RPLP0 R-GACACCCTCCAGGAAGCGA(SEQ ID NO:2);SARS-CoV-2刺突F-CCTACTAAATTAAATGATCTCTGCTTTACT(SEQ ID NO:3);SARS-CoV-2刺突R-CAAGCTATAACGCAGCCTGTA(SEQ ID NO:4)。通过 $\Delta\Delta C_t$ 计算SARS-CoV-2刺突RNA的相对表达,首先归一化为看家基因RPLP0,然后与未处理的SARS-CoV-2感染的Vero E6细胞进行比较(参考对照)。拟合曲线,使用Prism 8计算50%和90%有效浓度EC₅₀和EC₉₀值。

[0417] CellTiter-glo发光细胞活力测定:在不透明壁的96孔细胞培养板中,每孔接种约 10^4 个Vero E6细胞并孵育过夜。以标示浓度加入化合物或对照。在37℃和5% CO₂下孵育48.5小时后加入等体积的CellTiter-Glo试剂(目录号G7570,普洛麦格公司(Promega),威斯康星州麦迪逊(Madison,WI)),混合并根据制造商的建议在EnSpire多功能酶标仪(EnSpire Multimode Plate Reader)(珀金埃尔默公司(PerkinElmer))上记录发光情况。计算与未处理的对照相比时的活力,并使用Prism 8计算CC₅₀值。

[0418] 细胞毒性的确定:根据制造商的说明用Cell Titer Glo(目录号G7570,普洛麦格公司,威斯康星州麦迪逊)确定50%细胞毒性浓度(CC₅₀)。前面表格中显示了计算出的CC₅₀值。

[0419] 将Vero E6细胞用浓度递增的瑞德西韦类似物、瑞德西韦(GS-5734)、瑞德西韦核苷(GS441524)或DMSO载剂(对照)处理48.5小时。通过CellTiter-Glo发光细胞活力测定法测量相对活力,如图2所示。

[0420] 实例4——Vero E6细胞中瑞德西韦三磷酸酯的生成

[0421] 在本实例中,将Vero E6细胞按每孔约 3.4×10^5 个细胞铺在6孔板中的2mL培养基(DMEM,10%FBS)中。

[0422] 然后将细胞在37℃下孵育24小时。然后吸出培养基,并用2mL对照培养基(新鲜的达尔伯克改良伊格尔培养基(Dulbecco's Modified Eagle's Medium,DMEM),10% FBS)或2mL含有浓度为1μM的药物的培养基进行更换。将细胞与各种药物一起孵育48小时。吸出培养基,将细胞用磷酸盐缓冲盐水(PBS)漂洗两次,用1mL ATV胰酶消化5分钟,研磨并移至15mL离心管中,用1mL PBS漂洗,然后同样移至15mL离心管中,再次研磨细胞。使用两份10μL样品在Reichert血细胞计数器中对细胞进行计数,并确定每份样品中的细胞数。

[0423] 将细胞以1200rpm离心10分钟,吸出稀释剂,将沉淀重悬于250μL的甲醇/蒸馏水

(70/30) 中,并通过LC/MS/MS进行分析。图3所示的结果以微微摩尔/ 10^6 个细胞为单位并且是两次或三次测定结果的平均值。图3中的缩略词:RDV,瑞德西韦;RVn,瑞德西韦核苷(GS-441524);ODE-P-RVn,十八烷氧基乙基-磷酸基-RVn(4c);ODBG-P-RVn,1-O-十八烷基-2-O-苄基-甘油-sn-3-磷酸基-RVn(15d)

[0424] 如图3所示,在Vero E6细胞中,在暴露于1微摩尔ODE-P-RVn和ODBG-P-RVn的情况下,瑞德西韦三磷酸酯(RVn-TP)的合成逐渐增加至48小时。在为RVn的情况下,RVn-TP的水平在8小时时达到峰值,之后下降。在为RDV的情况下,RVn-TP的水平在8小时和24小时时低于定量水平。

[0425] 实例5——人冠状病毒229E感染

[0426] 在本实例中,将人冠状病毒229E(ATCC)增殖,并且使用MRC-5细胞通过TCID₅₀对感染单位进行定量。为了进行抗病毒测试,每孔接种约104个MRC-5细胞于37℃的EMEM(10% FCS)中,在96孔板中过夜。移除每个孔中的培养基,用100TCID₅₀的病毒在100μL培养基中感染细胞两个小时。

[0427] 将细胞用培养基洗涤一次,然后以标示浓度加入化合物或对照。三天后,在显微镜下观察CPE,并使用MTT细胞增殖测定试剂盒(Abcam)在ELx800全自动酶标仪(ELx800, Universal Microplate reader)(美国伯腾仪器有限公司(BIO-TEK Instruments, INC.))读数来进行定量。

[0428] 化合物对MRC-5细胞中HCoV-229E复制的影响

条目	化合物	R ₁	R ₂	MRC-5 细胞中的 HCoV-229E			
				EC ₅₀ (μM)	EC ₉₀ (μM)	CC ₅₀ (μM)	
[0429]	1	4a	二十烷基	H	±0.91 ± 1.21	±1.80 ± 1.87	±>50
	2	4b	十六烷氧基丙基	H	3.02 ± 0.36	6.60 ± 1.14	32.1 ± 17.9
	3	4c	十八烷氧基乙基	H	0.41 ± 0.012	0.84 ± 0.095	>50
	4	6c	十八烷氧基乙基	苄基	0.22 ± 0.056	0.44 ± 0.085	>50
	5	15a	1-O-十四烷基-2-O-苄基- <i>sn</i> -甘油基	H	0.76 ± 0.34	±3.25 ± 2.18	±>50

	6	15b	1- <i>O</i> -十六烷基-2- <i>O</i> -苄基- <i>sn</i> -甘油基	H	0.56 ± 0.27	0.98 ± 0.38	>50
	7	15c	1- <i>O</i> -十六烷基-2- <i>O</i> -(3-F,4-MeO-Bn)- <i>sn</i> -甘油基	H	0.36 ± 0.054	1.12 ± 0.10	>50
	8	15d	1- <i>O</i> -十八烷基-2- <i>O</i> -苄基- <i>sn</i> -甘油基	H	0.10 ± 0	0.28 ± 0.013	43.1 ± 18.9
	9	15e	1- <i>O</i> -十八烷基-2- <i>O</i> -苄基- <i>rac</i> -甘油基	H	0.21 ± 0.004	0.35 ± 0.006	30.9 ± 7.7
	10	15f	1- <i>O</i> -十八烷基-2- <i>O</i> -辛基- <i>sn</i> -甘油基	H	0.12 ± 0.057	0.29 ± 0.058	$\pm >50$
	11	15g	1- <i>O</i> -十八烷基-2- <i>O</i> -(甲基环己基)- <i>sn</i> -甘油基	H	nd	nd	nd
	12	15h	1- <i>O</i> -十八烷基-2- <i>O</i> -(3-F-Bn)- <i>sn</i> -甘油基	H	1.40 ± 0.058	2.80 ± 0.04	22.9 ± 0.1
[0430]	13	15i	1- <i>O</i> -十八烷基-2- <i>O</i> -(4-MeO-Bn)- <i>sn</i> -甘油基	H	nd	nd	nd
	14	15j	1- <i>O</i> -十八烷基-2- <i>O</i> -(3-F,4-MeO-Bn)- <i>sn</i> -甘油基	H	0.074 ± 0.01	0.17 ± 0.014	>50
	15	15k	1- <i>O</i> -十八烷基-2- <i>O</i> -甲基吡啶基- <i>sn</i> -甘油基	H	nd	nd	nd
	16	15l	1- <i>O</i> -油基-2- <i>O</i> -苄基- <i>sn</i> -甘油基	H	0.13 ± 0.029	0.26 ± 0.0037	>50
	17	15m	1- <i>O</i> -油基-2- <i>O</i> -(3-F,4-MeO-Bn)- <i>sn</i> -甘油基	H	0.06 ± 0.014	0.11 ± 0.02	>50
	18	17	1- <i>O</i> -十八烷基-2- <i>O</i> -苄基- <i>sn</i> -甘油基	苄基	1.50 ± 0.93	4.27 ± 0.88	>50
	19	15o	1- <i>O</i> -十八烷基-2- <i>O</i> -(3-CF ₃ -Bn)- <i>sn</i> -甘油基	H	0.16 ± 0.046	0.46 ± 0.27	16.0 ± 2.8
	20	15p	1- <i>O</i> -十八烷基-2- <i>O</i> -(4-CF ₃ -Bn)- <i>sn</i> -甘油基	H	0.16 ± 0.078	0.33 ± 0.039	13.9 ± 8.8

[0431] nd=未确定

[0432] 抑制百分比计算为 $(Atv - Acv) / (Acd - Acv) \times 100\%$, 其中Atv表示有病毒感染细胞的情况下测试化合物的吸光度, Acv和Acd分别表示病毒对照的吸光度和细胞对照的吸光度。平均半数有效浓度 (EC₅₀) 被定义为对病毒诱导的细胞病变效应实现50%抑制时的浓度。

[0433] 实例6——SARS-CoV-2感染测定

[0434] 在透明平底黑色96孔板中, 每孔接种约12e3个TMPRSS2-Vero细胞或20e3个Huh7.5细胞, 并孵育过夜。在以针对TMPRSS2-Vero时等于0.01或针对Huh7.5时等于0.1的感染复数 (FFU/细胞) 加入SARS-CoV-2的情况下, 在感染前约30至约60分钟以标示浓度加入化合物或对照。

[0435] 在37℃和5% CO₂下将TMPRSS2-Vero孵育32小时或者将Huh7.5孵育48小时之后, 移除培养基, 将细胞在4%甲醛中室温孵育30分钟。将甲醛固定的细胞用PBS洗涤, 并在含有1%牛血清白蛋白 (BSA) 级分V (Millipore-Sigma) 的PBS中的0.1% Triton-X100中透化以进行免疫荧光, 并用抗核衣壳一抗 (GeneTex GTX135357) 随后AlexaFluor594二抗 (赛默飞世尔科技公司 (Thermo Fisher Scientific) A-11012), 用核反染Sytox Green (赛默飞世尔科技公司) 对SARS-CoV-2进行染色。

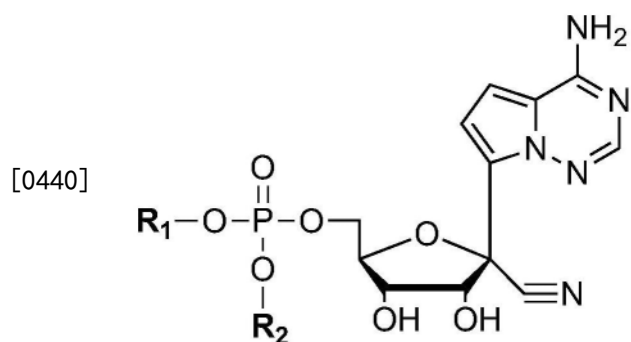
[0436] 使用Incucyte S3 (赛多利斯公司 (Sartorius)) 在10倍放大下对每个孔获取五个图像。使用Incucyte S3的内置图像分析工具计算感染细胞的百分比和细胞核计数。使用GraphPad Prism 9中的非线性回归分析进行EC₅₀、EC₉₀和CC₅₀的计算, 底部和顶部参数分别约束为0和100。

[0437] 化合物对Huh7.5和TMPRSS2-Vero细胞中SARS CoV-2复制的影响

条目	化合物	R ₁	R ₂	Huh7.5 细胞			TMPRSS2-Vero 细胞		
				EC ₅₀ (μM)	EC ₉₀ (μM)	CC ₅₀ (μM)	EC ₅₀ (μM)	EC ₉₀ (μM)	CC ₅₀ (μM)
1	4a	二十烷基	H	1.411 ± 0.089	4.746 ± 0.626	>20	1.171 ± 0.060	2.185 ± 0.201	>20
2	4b	十六烷氧基丙基	H	0.19 ^a	0.40 ^a	>20	nd	nd	nd
3	4c	十八烷氧基乙基	H	0.19 ^a	0.37 ^a	>20	nd	nd	nd
4	6c	十八烷氧基乙基	苄基	nd	nd	nd	nd	nd	nd
5	15a	1-O-十四烷基 -2-O-苄基- <i>sn</i> -甘油基	H	0.156 ± 0.008	0.493 ± 0.051	>20	0.901 ± 0.022	1.694 ± 0.131	>20
6	15b	1-O-十六烷基 -2-O-苄基- <i>sn</i> -甘油基	H	0.130 ± 0.020	0.309 ± 0.092	>20	0.395 ± 0.021	0.810 ± 0.079	>20
7	15c	1-O-十六烷基 -2-O-(3-F,4-MeO-Bn)- <i>sn</i> -甘油基	H	0.049 ± 0.005	0.113 ± 0.019	>20	0.397 ± 0.026	0.869 ± 0.106	>20

[0438]	8	15d	1- <i>O</i> -十八烷基 -2- <i>O</i> -苄基- <i>sn</i> -甘油基	H	0.138 ± 0.018	0.377 ± 0.098	>20	0.205 ± 0.016	0.432 ± 0.075	>20
	9	15e	1- <i>O</i> -十八烷基 -2- <i>O</i> -苄基- <i>rac</i> -甘油基	H	0.163 ± 0.026	0.514 ± 0.172	>20	0.242 ± 0.020	0.642 ± 0.133	>20
	10	15f	1- <i>O</i> -十八烷基 -2- <i>O</i> -辛基- <i>sn</i> -甘油基	H	0.710 ± 0.028	1.713 ± 0.183	>20	1.326 ± 0.052	2.349 ± 0.123	>20
	11	15g	1- <i>O</i> -十八烷基 -2- <i>O</i> -(甲基环己基)- <i>sn</i> -甘油基	H	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	12	15h	1- <i>O</i> -十八烷基 -2- <i>O</i> -(3-F-Bn)- <i>sn</i> -甘油基	H	0.182 ± 0.018	0.444 ± 0.083	>20	0.270 ± 0.016	0.629 ± 0.106	>20
	13	15i	1- <i>O</i> -十八烷基 -2- <i>O</i> -(4-MeO-Bn)- <i>sn</i> -甘油基	H	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	14	15j	1- <i>O</i> -十八烷基 -2- <i>O</i> -(3-F,4-MeO-Bn)- <i>sn</i> -甘油基	H	0.056 ± 0.008	0.222 ± 0.070	>20	0.174 ± 0.016	0.341 ± 0.044	>20
	15	15k	1- <i>O</i> -十八烷基 -2- <i>O</i> -甲基吡啶基- <i>sn</i> -甘油基	H	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	16	15l	1- <i>O</i> -油基-2- <i>O</i> -苄基- <i>sn</i> -甘油基	H	0.100 ± 0.010	0.246 ± 0.062	>20	0.295 ± 0.013	0.568 ± 0.080	>20
	17	15m	1- <i>O</i> -油基 -2- <i>O</i> -(3-F,4-MeO-Bn)- <i>sn</i> -甘油基	H	0.054 ± 0.006	0.102 ± 0.013	>20	0.296 ± 0.019	0.524 ± 0.115	>20
	18	17	1- <i>O</i> -十八烷基 -2- <i>O</i> -苄基- <i>sn</i> -甘油基	苄基	3.537 ± 0.583	16.44 ± 5.98	>20	7.443 ± 0.818	15.263 ± 5.912	>20

[0439] nd=未确定;^a来自实例7的数据



[0441] 化合物对Calu-3细胞中SARS CoV-2复制的影响

条目	化合物	R ₁	R ₂	Calu-3 细胞		
				EC ₅₀ (μ M)	EC ₉₀ (μ M)	CC ₅₀ (μ M)
1	4a	二十烷基	H	0.178 $\pm$ 0.035	1.316 $\pm$ 0.566	>20
2	4b	十六烷氧基丙基	H	nd	nd	nd
3	4c	十八烷氧基乙基	H	nd	nd	nd
4	6c	十八烷氧基乙基	苄基	nd	nd	nd
5	15a	1- <i>O</i> -十四烷基-2- <i>O</i> -苄基- <i>sn</i> -甘油基	H	0.212 $\pm$ 0.025	0.536 $\pm$ 0.150	>20
6	15b	1- <i>O</i> -十六烷基-2- <i>O</i> -苄基- <i>sn</i> -甘油基	H	0.101 $\pm$ 0.020	0.623 $\pm$ 0.272	88.23 $\pm$ 8.89
7	15c	1- <i>O</i> -十六烷基-2- <i>O</i> -(3-F,4-MeO-Bn)- <i>sn</i> -甘油基	H	0.051 $\pm$ 0.006	0.221 $\pm$ 0.058	75.63 $\pm$ 3.96
8	15d	1- <i>O</i> -十八烷基-2- <i>O</i> -苄基- <i>sn</i> -甘油基	H	0.164 $\pm$ 0.020	0.536 $\pm$ 0.138	>20
9	15e	1- <i>O</i> -十八烷基-2- <i>O</i> -苄基- <i>rac</i> -甘油基	H	0.210 $\pm$ 0.062	0.763 $\pm$ 0.490	>20
10	15f	1- <i>O</i> -十八烷基-2- <i>O</i> -辛基- <i>sn</i> -甘油基	H	0.410 $\pm$ 0.060	2.314 $\pm$ 0.738	>20
11	15g	1- <i>O</i> -十八烷基-2- <i>O</i> -(甲基环己基)- <i>sn</i> -甘油基	H	0.147 $\pm$ 0.032	1.660 $\pm$ 0.798	>20
12	15h	1- <i>O</i> -十八烷基-2- <i>O</i> -(3-F-Bn)- <i>sn</i> -甘油基	H	0.216 $\pm$ 0.062	0.548 $\pm$ 0.368	>20
13	15i	1- <i>O</i> -十八烷基-2- <i>O</i> -(4-MeO-Bn)- <i>sn</i> -甘油基	H	nd	nd	nd
14	15j	1- <i>O</i> -十八烷基-2- <i>O</i> -(3-F,4-MeO-Bn)- <i>sn</i> -甘油基	H	0.080 $\pm$ 8.741	0.101 $\pm$ 4.554	50.63 $\pm$ 5.42
15	15k	1- <i>O</i> -十八烷基-2- <i>O</i> -甲基吡啶基- <i>sn</i> -甘油基	H	nd	nd	nd
16	15l	1- <i>O</i> -油基-2- <i>O</i> -苄基- <i>sn</i> -甘油基	H	0.198 $\pm$ 0.077	0.294 $\pm$ 0.093	78.96 $\pm$ 6.95
17	15m	1- <i>O</i> -油基-2- <i>O</i> -(3-F,4-MeO-Bn)- <i>sn</i> -甘油基	H	0.075 $\pm$ 4.752	0.090 $\pm$ 3.487	58.53 $\pm$ 6.28
18	17	1- <i>O</i> -十八烷基-2- <i>O</i> -苄基- <i>sn</i> -甘油基	苄基	5.320 $\pm$ 1.393	10.92 $\pm$ 5.485	>20
19	18-eq	1- <i>O</i> -十八烷基-2- <i>O</i> -苄基- <i>sn</i> -甘油基	环状 eq	>20	>20	>20

[0442]

	20	18-ax	1- <i>O</i> -十八烷基-2- <i>O</i> -苄基- <i>sn</i> -甘油基	环状 ax	>20	>20	>20
	21	19-eq	十八烷氧基乙基	环状 eq	2.758 ± 0.808	19.163 ± 12.666	>20
[0443]	22	19-ax	十八烷氧基乙基	环状 ax	8.147 ± 8.420	>20	>20
	23	15n	3- <i>O</i> -十八烷基-2- <i>O</i> -苄基- <i>sn</i> -甘油基	H	0.163 ± 0.022	0.623 ± 0.183	>20
	24	15o	1- <i>O</i> -十八烷基-2- <i>O</i> -(3-三氟甲基)苄基- <i>sn</i> -甘油基	H	0.166 ± 0.068	0.278 ± 0.109	>20

[0444] SARS-CoV-2感染测定:在透明平底黑色96孔板(康宁公司#3904)中,每孔接种约20k个Calu-3细胞,并孵育48至72小时。在以等于0.01的感染复数(FFU/细胞)加入了SARS-CoV-2的情况下,在感染前30至60分钟以标示浓度加入化合物或对照。在37℃和5% CO₂下孵育44小时后,移除培养基,将细胞在4%甲醛中室温孵育30分钟。将甲醛固定的细胞用PBS洗涤,并在含有1%牛血清白蛋白(BSA)级分V(Millipore-Sigma)的PBS中的0.1%Triton-X 100中透化以进行免疫荧光,并用抗核衣壳一抗(GeneTex GTX135357)随后AlexaFluor 594二抗(赛默飞世尔科技公司A-11012),用核反染Sytox Green(赛默飞世尔科技公司)对SARS-CoV-2进行染色。使用Incucyte S3(赛多利斯公司(Sartorius))在10倍放大下对每个孔获取五个图像。

[0445] 使用Incucyte S3的内置图像分析工具计算感染细胞的百分比和细胞核计数。使用GraphPad Prism 9中的非线性回归分析进行针对EC₅₀、EC₉₀和CC₅₀的计算,底部和顶部参数分别约束为0和100。所有利用真实SARS-CoV-2的工作都是在加州大学圣地亚哥分校的生物安全3级条件下进行的。

[0446] 细胞活力测定:对于选定的化合物,使用CellTiter-Glo计算的CC50的最大值为100μM。对于这些实验,在不透明的白色96孔板(目录号655073,格瑞纳公司(Greiner Bio-One),北卡罗莱纳州门罗(Monroe, North Carolina))中,每孔接种大约20k个Calu-3细胞中,并孵育48至72小时。加入化合物或对照,并在37℃和5% CO₂下孵育44小时。之后加入等体积的CellTiter-Glo试剂(目录号G7570,普洛麦格公司,威斯康星州麦迪逊),混合并根据制造商的建议在Veritas微孔板光度计(Microplate Luminometer)(Turner BioSystems)上记录发光情况。

[0447] 实例7——感染有SARS-CoV-2的不同细胞类型中的抗病毒活性

[0448] Vero E6、Caco-2和Calu-3细胞系获自ATCC。Huh7.5细胞获自Apath LLC。将Calu-3和Caco-2细胞在MEM(康宁)(含10% FBS、青霉素-链霉素(Gibco))中增殖。将Vero E6和Huh7.5细胞在有10%FBS和青霉素-链霉素(Gibco)的DMEM(康宁公司)中增殖。按前文所描述的进行人PSC-肺细胞生成、生成肺类器官(Leibel SL, McVicar RN, Winquist AM, Niles WD, Snyder EY《从人胚胎和患者特异性诱导多能干细胞生成完整的多细胞型肺类器官用于传染病建模和治疗学验证(Generation of complete multi-cell type lung organoids from human embryonic and patient-specific induced pluripotent stem cells for infectious disease modeling and therapeutics validation)》《干细胞生物学实验室指南(Curr. Protoc. Stem Cell Biol.)》, 54(1) (2020年9月), 文章e118)。将H9胚胎干细胞(WiCell)在无饲养者的条件下在Matrigel(康宁公司#354230)包被的板上于

mTeSR培养基 (StemCellTech#85850) 中培养。每天更换培养基, 并使用无酶解离试剂 ReLeSR™ (Stem Cell Tech#05872) 将干细胞传代。在37℃、5% CO₂培养箱中, 将培养物维持在未分化状态。

[0449] 对于近侧肺类器官生成, 将人PSC解离成单细胞, 然后第1天在包被了基质胶凝胶的板 (BD Biosciences) 上以 5.3×10^4 个细胞/cm²的密度接种在补充有100ng/mL人激活素A (R&D公司)、5μM CHIR99021 (Stemgent公司) 和10μM ROCK抑制剂Y-27632 (R&D Systems公司) 的定型内胚层 (DE) 诱导培养基 (RPMI1640, 2% B27补充剂, 1% HEPES, 1% 谷氨酰胺, 50U/mL青霉素/链霉素) 中。在第2天和第3天, 将细胞在仅含有100ng/mL人激活素A的DE诱导培养基中培养。在第4至6天通过补充含有10μM SB431542 (R&D公司) 和2μM多索吗啡 (StemGent公司) 的无血清基础培养基 (3份IMDM:1份F12, B27+N2补充剂, 50U/mL青霉素/链霉素, 0.25% BSA, 0.05mg/mL L-抗坏血酸、0.4mM硫代甘油) 生成前部前肠内胚层 (AFE)。在第7天, 将AFE培养基更换为肺祖细胞 (LPC) 诱导培养基, 含有补充有10ng/mL人重组BMP4 (R&D公司)、0.1μM全反式维甲酸 (西格玛奥德里奇公司 (Sigma-Aldrich)) 和3μM CHIR99021的无血清基础培养基。每隔一天更换一次培养基, 持续9至11天。为了生成3D人近侧肺类器官, 我们修改了先前发表的方案 (K.B.McCauley, F.Hawkins, M.Serra, D.C.Thomas, A.Jacob, 和 D.N.Kotton. (2017)《通过对Wnt信号传导的时间调节从多能干细胞有效衍生功能性人气道上皮 (Efficient Derivation of Functional Human Airway Epithelium from Pluripotent Stem Cells via Temporal Regulation of Wnt Signaling)》.《细胞·干细胞 (Cell Stem Cell)》;20(6):844-857)。

[0450] 将LPC在accutase中解离10分钟, 并以 5.0×10^4 个细胞/200μl基质胶凝胶重悬于12孔、0.4μm孔径的转移小室 (Transwell) (康宁公司) 培养插入件中的基质胶中。使用补充有250ng/mL FGF2、100ng/mL rhFGF10、50nM地塞米松 (Dex)、100μM 8-溴腺苷3',5'-环状一磷酸钠盐 (Br-cAMP)、100μM 3-异丁基-1-甲基黄嘌呤 (IBMX) 和10μM ROCK抑制剂 (Y-27632) 的无血清基础培养基, 将细胞在近侧肺类器官成熟培养基中培养。近侧肺类器官培养基每隔一天更换一次, 持续3周。将人PSC衍生的肺类器官解离成单细胞, 并在转染前一天以每孔20,000个细胞接种基质胶凝胶包被的96孔板。在37℃下将含有在基质凝胶中的近侧类器官的转移小室在2U/ml分散酶中孵育30分钟向混合物中加入冷PBS, 然后以400×g离心5分钟。

[0451] 在37℃下小心移除上清液, 并重悬于2至3ml的TrypLE Express (Gibco#12605010) 中, 持续20分钟。用DMEM/F12中的2% FBS猝灭反应, 然后以400×g离心5分钟。吸出上清液, 将细胞沉淀重悬于1ml补充有10μM ROCK抑制剂 (Y-27632) 的猝灭培养基中。进行细胞计数, 将相应体积的细胞转移到试剂储存槽中并重悬于近侧肺类器官成熟培养基中, 通过多通道移液管以每孔100μl的单层铺入96孔板中。

[0452] SARS-CoV-2感染: 使用Vero E6 (ATCC) 细胞对SARS-CoV-2分离株USA-WA1/2020 (BEI Resources) 进行增殖, 并通过空斑测定定量感染单位。在96孔板中, 每孔接种来自每个细胞系的大约12,000个细胞。在处理/感染前大约24小时接种Vero E6和Huh7.5。在处理/感染前大约48小时接种Calu-3和Caco-2。当细胞达到100%融合时, 进行人PSC肺细胞感染和细胞毒性实验。在感染前30分钟以标示浓度加入化合物或对照, 随后以等于0.01的感染复数加入SARS-CoV-2。在37℃和5% CO₂下孵育48小时后, 将细胞用PBS洗涤两次, 并在200μl TRIzol (赛默飞世尔公司) 中裂解。所有利用SARS-CoV-2的工作都是在得到生物安全制度

委员会(Institutional Biosafety Committee)批准的情况下在加州大学圣地亚哥分校的生物安全3级条件下进行的。

[0453] RNA提取、cDNA合成和qPCR:根据包括脱氧核糖核酸酶处理在内的制造商建议,使用直接Direct-zol RNA Microprep试剂盒(Zymo Research)从TRIzol裂解物中纯化RNA。使用iScript cDNA合成试剂盒(BioRad)将RNA转化为cDNA,并使用iTaq通用型SYBR green超混合液(BioRad)和ABI 7300实时PCR系统进行qPCR。使用以下引物扩增cDNA:RPLP0 F-GTGTTTCGACAATGGCAGCAT (SEQ ID NO:1);RPLP0 R-GACACCCTCCAGGAAGCGA (SEQ ID NO:2);SARS-CoV-2刺突F-CCTACTAAATTAAATGATCTCTGCTTTACT (SEQ ID NO:3);SARS-CoV-2刺突R-CAAGCTATAACGCAGCCTGTA (SEQ ID NO:4)。通过 $\Delta\Delta C_t$ 计算SARS-CoV-2刺突RNA的相对表达,首先归一化为看家基因RPLP0,然后与未处理的SARS-CoV-2感染的Vero E6细胞进行比较(参考对照)。使用Prism 9使用非线性回归——log(抑制剂)与反应(四参数)模型拟合曲线。为了计算有效浓度 EC_{50} 和 EC_{90} ,将qRT-PCR值归一化为抑制百分比,并使用20非线性回归——log(激动剂)与反应(四参数)模型拟合曲线,使用Prism 9将底部和顶部分别限制为0和100。

[0454] 细胞活力测定:根据SARS-CoV-2感染研究,将细胞类型接种在不透明壁的96孔细胞培养板中,或者根据229E感染研究将细胞接种在透明的96孔细胞培养板中,并孵育过夜。以标示浓度加入化合物或对照。对于SARS-CoV-2相关研究,将细胞在37℃且5%CO₂下孵育48.5小时,加入等体积的CellTiter-Glo试剂(目录号G7570,普洛麦格公司,威斯康星州麦迪逊),混合并根据制造商的建议在Veritas微孔板光度计(Turner BioSystems)上记录发光情况。对于229E相关,将细胞在37℃且5%CO₂下孵育72小时,移除上清,向每个孔中加入50μL的无血清培养基和50μL MTT试剂(Abcam ab211091),并在37℃下孵育3小时。根据制造商的建议在ELx800全自动酶标仪(ELx800,Universal Microplate reader)(美国伯腾仪器有限公司(BIO-TEK Instruments,INC.))上测量吸光度。计算与未处理的对照相比的活力百分比,并使用Prism 9计算 CC_{50} 值。

[0455] 化合物在五种细胞类型中的抗病毒活性、细胞毒性及选择性

化合物	EC ₅₀ (μM)	EC ₉₀ (μM)	CC ₅₀ (μM)	选择性	与 RDV、RVn 相比的 <i>p</i> 值 EC ₅₀
Vero E6 细胞					
RDV	1.13	7.05	101	89.4	-
RVn	0.38	0.77	>100	>263	-
HDP-P-RVn, 4b	0.63	0.73	>100	>158	NS
ODE-P-RVn, 4c	0.30	0.33	>100	>333	NS
ODBG-P-RVn, 15d	0.14	0.16	97.9	699	0.010, 0.311
PSC-人肺细胞					
RDV	0.14	0.23	32.7 *	234	-
RVn	0.74	2.62	>100 *	>135	-
HDP-P-RVn *	0.35	0.94	ND		-
ODE-P-RVn	0.22	0.70	>100 *	>454	0.791, 0.006
ODBG-P-RVn	0.15	0.26	61.5 *	410	>0.999, 0.002
Calu-3 细胞					
RDV	0.23	0.31	>100	>434	-
RVn	0.15	0.18	>100	>666	-
ODE-P-RVn	0.34	0.64	98.7	290	NS
ODBG-P-RVn	0.30	0.33	98.2	327	NS
Huh7.5 细胞					
RDV	0.06	0.12	15.2	253	-
RVn	0.32	0.73	>100	>312	-
HDP-P-RVn	0.19	0.40	>100	>526	NS
ODE-P-RVn	0.19	0.37	>100	>526	NS
ODBG-P-RVn	0.14	0.15	62.9	449	NS
Caco-2 细胞					
RDV	0.17	0.28	>100	>588	-
RVn	0.96	1.75	>100	>104	-
ODE-P-RVn	0.77	1.25	>100	>129	0.007, 0.971
ODBG-P-RVn	0.30	0.33	88.4	295	0.968, 0.007

[0457] 缩略语: RDV, 瑞德西韦 (GS-5734); RVn, 瑞德西韦核苷 (GS-441524); HDP-P-, 十六烷氧基丙基-P-; ODE-P-, 十八烷氧基乙基-P-; ODBG-P-, 1-O-十八烷基-2-O-苄基-甘油-3-P-; EC₅₀: 半数有效浓度; CC₅₀: 50%细胞毒性浓度, 选择性指数 CC₅₀/EC₅₀; 统计分析通过单因素方差分析比较来自独立实验 LogEC₅₀ 值。通过 CellTiter-Glo 得到的 CC₅₀ 结果。除了标有星号 (*) 的以两个重复进行了两次外, 所有实验以两个重复进行了三次。

[0458] 在所有细胞系中, ODBG-P-RVn、ODE-P-RVn、HDP-P-RVn、瑞德西韦 (RDV) 和瑞德西韦核苷 (RVn) 对病毒RNA的抑制作用呈剂量依赖性。在Vero E6细胞中, ODBG-P-RVn的平均半数最大有效浓度 (EC₅₀) 和平均90%有效浓度 (EC₉₀) 分别为0.14μM和0.16μM。ODBG-P-RVn在Vero E6细胞中的EC₅₀显著低于RDV。ODE-P-RVn和HDP-P-RVn同样在Vero E6中具有强抗病毒作用, EC₅₀值为0.3μM和0.63μM。ODBG-P-RVn和ODE-P-RVn在PSC-肺和Calu-3 (两者都是人肺部感染的模型) 中的EC₅₀均小于0.35μM。ODBG-P-RVn和ODE-P-RVn在PSC-肺细胞中的抗病毒活性显著好于RVn。ODBG-P-RVn、ODE-P-RVn和HDP-P-RVn在Huh7.5细胞中表现出强抗病毒活性, EC₅₀少于0.2μM, 与RDV或RVn无显著差异。在Caco-2细胞系中, ODBG-P-RVn的EC₅₀为0.3μM, 显著低于RVn, 但与RDV相似。在同一细胞系中, ODE-P-RVn的EC₅₀为0.77μM, 显著高于RDV。

[0459] 通过将细胞系中的每一种与1.23μM至100μM的系列稀释的每种化合物一起孵育48小时而测定的每种化合物的细胞毒性。所有化合物在所有细胞系中的平均50%细胞毒性浓度 (CC₅₀) 均大于60μM, 除了RDV在PSC-肺细胞中的CC₅₀为32.7μM, 在人肝细胞系Huh7.5中为15.2μM。在本实例测试的五种细胞类型中, ODBG-P-RV的选择性指数范围为295至699)。

ODBG-P-RVn的抗病毒活性和细胞毒性的范围(EC_{50} 为0.14 μ M至0.30 μ M并且 CC_{50} 为61.5 μ M至98.2 μ M)在不同细胞类型间比RDV(EC_{50} 为0.06 μ M至1.13 μ M并且 CC_{50} 为15.2 μ M至>100 μ M)更为一致(见上表)。总之,这些数据表明脂质RVn—磷酸酯前药是体外抗SARS-CoV-2的强效抗病毒剂,具有低毒性和优异的选择性指数。

[0460] 实例8——抗病毒剂在人冠状病毒229E感染细胞中的影响

[0461] 将人冠状病毒229E(ATCC)增殖,并使用MRC-5细胞通过 $TCID_{50}$ 对感染单位进行定量。为了进行抗病毒测试,在96孔板中,每孔接种约 10^4 个MRC-5细胞于37C的EMEM(10% FCS)中过夜。移除每个孔中的培养基,用100 $TCID_{50}$ 的病毒在100 μ L培养基中感染细胞两个小时。

[0462] 将细胞用培养基洗涤一次,然后以标示浓度加入化合物或对照。三天后,在显微镜下观察CPE,并使用MTT细胞增殖测定试剂盒(Abcam)在ELx800全自动酶标仪(ELx800, Universal Microplate reader)(美国伯腾仪器有限公司(BIO-TEK Instruments, INC.))读数来进行定量。抑制百分比计算为 $(A_{tv} - A_{cv}) / (A_{cd} - A_{cv}) \times 100\%$,其中 A_{tv} 表示有病毒感染细胞的情况下测试化合物的吸光度, A_{cv} 和 A_{cd} 分别表示病毒对照的吸光度和细胞对照的吸光度。平均半数有效浓度(EC_{50})被定义为对病毒诱导的细胞病变效应实现50%抑制时的浓度。

[0463] 如本文所描述,本公开的各种化合物抑制了人甲型冠状病毒229E(human Alphacoronavirus 229E)。用229E感染细胞2小时,然后用标示剂量的标示药物处理72小时。通过使用MTT测定法测量细胞活力来确定相对CPE。示出了在标示浓度的标示药物存在下孵育72小时的MRC-5细胞中的细胞毒性,之后通过CellTiter-Glo测定法测量细胞活力。数据点表示以两个重复进行的3次独立实验的平均值。误差线代表标准误差平均值(SEM)。ODBG-P-RVn和RDV两者都表现出对细胞病变效应(CPE)的剂量依赖性抑制。ODBG-P-RVn和RDV的 EC_{50} 值分别为0.15 μ M和0.04 μ M, EC_{90} 分别为0.54mM和0.26mM。ODBG-P-RVn和RDV在MRC-5细胞中的 CC_{50} 均大于50 μ M。最具活性的化合物是具有3-氟,4-甲氧基取代基的化合物。结合针对SARS-CoV-2的抗病毒数据,这表明ODBG-P-RVn相关类似物对两种遗传上不同的人致病性冠状病毒具有抗病毒活性。

[0464] 实例9——口服施用的ODBG-P-RVn(15d)在叙利亚仓鼠中达到治疗性血浆水平

[0465] 将0.1M碳酸钠/碳酸氢盐缓冲液(pH 9.0)中的ODBG-P-RVn每12小时通过经口灌胃施用于叙利亚仓鼠,持续七天。ODBG-P-RVn以钠盐的形式存在。耐受性良好,未发现不良临床症状。ODBG-P-RVn的血浆水平在1小时达到峰值,并在约5小时内下降50%。

[0466] 第1天和第7天的血浆曲线基本相似,除了以16.9mg/kg时第7天的值略高于第1天的水平。在第1天和第7天,12小时时ODBG-P-RVn水平高于ODBG-P-RVn在研究的所有细胞系包括Vero E6细胞和PSC肺细胞中的 EC_{90} 。ODBG-P-RVn的核苷代谢产物RVn在施用后3小时达到峰值,此后下降。RVn的血浆浓度低于RVn在PSC肺细胞和Vero E6细胞两者中的 EC_{90} 。观察到的低水平或RVn表明,可归因于这种代谢产物的抗病毒活性会是最小的,并且也与人血浆中ODBG-P-RVn稳定性的发现一致。总之,这些结果表明ODBG-P-RVn将有效地抑制病毒在体内多种组织类型中的复制。

[0467] 图4A和图4B示出了叙利亚仓鼠中七天的口服药代动力学。每12小时通过经口灌胃给予叙利亚仓鼠载剂或ODBG-P-RVn,持续7天。每组3只动物以16.9mg/kg和13.2mg/kg的剂

量接受载剂或药物。每天给动物称重,并监测临床症状。在第1天和第7天,获取1、3、6和12小时的血浆样品,并冷冻用于通过LC/MS/MS分析ODBG-P-RVn(图4A)和RVn(图4B)。

[0468] 分析方法:ODBG-P-RVn:将含有ODBG-P-RVn和作为抗凝剂的K₂EDTA的仓鼠血浆样品(10 μ L)加入到含有以下的聚丙烯管中:水(100 μ L)、内标溶液(10 μ L;在ACN:DMF(1:1,v/v)中的1,000ng/mL的ODE-P-RVn)和10 μ L的ACN:DMF(1:1,v/v)。将溶液混合,然后用磷酸(85% w/v):水(1:19,v/v;10 μ L)酸化,混合,然后用200 μ L IPA进行稀释、混合,然后用500 μ L水稀释并混合。将样品用Sep-Pak®tC18 96孔固相提取板(25mg;沃特世公司(Waters),马萨诸塞州米尔福德(Milford,MA))进行提取。使用氮气在正压条件下进行提取。将样品用1mL的水:乙腈:甲酸(475:25:0.5,v/v/v)和0.4mL的水:乙腈:甲酸(350:150:0.5,v/v/v)连续洗涤,然后用100 μ L和150 μ L的水:{乙腈:异丙醇(1:1,v/v)}:甲酸:甲酸铵:柠檬酸溶液(2%w/v)(15:85:0.1:0.1:0.1,v/v/v/v)连续洗脱。将柠檬酸溶液制备为水:柠檬酸一水合物(20:0.4,v/w)。洗脱后,向每个样品中加入100 μ L的水。使用与API5500质谱分析仪(SCIEX,加利福尼亚州福斯特城(Foster City,CA))偶联的安捷伦1200HPLC系统(安捷伦公司(Agilent),加利福尼亚州圣克拉拉(Santa Clara,CA))对ODBG-P-RVn提取物进行分析。使用Dacapo DX-C18 MF柱(100 $\times$ 2mm,2.5 μ m;ImtaktUSA,Portland,OR)利用由流动相A(水:甲酸:[水:甲酸铵:柠檬酸(25:5:0.5,v/w/w)](1,000:1:1,v/v/v))和流动相B(乙腈:异丙醇:甲酸:[水:甲酸铵:柠檬酸(25:5:0.5,v/w/w)](800:200:1:1,v/v/v/v))组成的流动相体系对分析物进行色谱分离。总的分析运行时间为4.5分钟。将流动相在设置为电喷雾正离子模式的Turbo-V源/界面中使用加热的氮气进行雾化。使用多反应监测对离子化的化合物进行检测,跃迁m/z为788.4>229(V2043)和668.4>467.2(V2041)。这一方法适用于使用10.0 μ L用于提取的血浆测量范围在6.25至3,000ng/mL的ODBG-P-RVn浓度。使用Analyst v.1.6.2(SCIEX,Framingham,MA)获得ODBG-P-RVn和RVn的峰面积。使用Analyst,通过将分析物/I.S.与标准浓度的峰面积比拟合到1/x²加权的线性方程来获得校准曲线。然后使用校准曲线方程,利用其峰面积比插值样品中分析物的浓度。用于计算的峰面积没有进行四舍五入。

[0469] 分析方法:RVn(GS-441524):将含有GS-441524和作为抗凝剂的K₂EDTA的仓鼠血浆样品(20 μ L)加入到含有乙腈(300 μ L)和水:乙腈(2:8,v/v;60 μ L)的艾本德低吸附离心管中。将溶液混合并以16,000g离心五分钟。然后将上清液(300 μ L)过滤通过Ostro蛋白沉淀和磷脂去除板(25mg;沃特世公司,马萨诸塞州米尔福德(Milford,MA))。使用氮气在正压条件下进行过滤。将收集的过滤样品加盖、混合并储存在10 $^{\circ}$ C,等待分析。使用与G2-S QToF质谱分析仪(沃特世公司,马萨诸塞州米尔福德)偶联的Acquity UPLC系统(沃特世公司,马萨诸塞州米尔福德)对GS-441524提取物进行分析。使用Unison-UK Amino HT柱(100 $\times$ 2mm,3 μ m;ImtaktUSA,Portland,OR)利用由流动相A(在水中的0.008%氢氧化铵,0.012%乙酸,v/v/v)和流动相B(在乙腈中的0.008%氢氧化铵,0.012%乙酸,v/v/v)组成的流动相体系对分析物进行色谱分离。总的分析运行时间为12.5分钟。将流动相在设置为电喷雾正离子模式的Z-spray源/界面中使用加热的氮气进行雾化。使用ToF MS扫描监测在范围为50.0至700m/z的灵敏度模式扫描下对离子化的化合物进行检测。这一方法适用于使用20.0 μ L用于提取的血浆测量范围在1.00至1,000ng/mL的GS-441524浓度。使用MassLynx V4.2(沃特世公司,马萨诸塞州米尔福德)来获得GS-441524的峰面积。使用MassLynx,通过将分析物与标准浓度的峰面积比拟合到1/x²加权的线性方程来获得校准曲线。然后使用校准曲线方程,

利用其峰面积插值样品中分析物的浓度。用于计算的峰面积没有进行四舍五入。

[0470] 实例10——ODE-P-RVn(4c)和ODBG-P-RVn(15d)在人血浆中的稳定性

[0471] 瑞德西韦的缺点之一是在血浆中不稳定,据报道,静脉输注后保持为病毒学显著水平持续的时间少于2小时。(1,2)。瑞德西韦在人血浆中的离体稳定性也有限,据报道 $t_{1/2}$ 为69分钟(Siegel D,Hui HC,Doerffler E,Clarke MO,Chun K,Zhang L,Neville S,Carra E,Lew W,Ross B,Wang Q,Wolfe L,Jordan R,Soloveva V,Knox J,Perry J,Perron M,Stray KM,Barauskas O,Feng JY,Xu Y,Lee G,Rheingold AL,Ray AS,Bannister R,Strickley R,Swaminathan S,Lee WA,Bavari S,Cihlar T,Lo MK,Warren TK,Mackman RL.《发现并合成用于治疗埃博拉病毒和新发病毒的吡咯并[2,1-f][三嗪-4-氨基]腺嘌呤C-核苷(GS-5734)的磷酸酯前药(Discovery and Synthesis of a Phosphoramidate Prodrug of a Pyrrolo[2,1-f][triazin-4-amino]Adenine C-Nucleoside(GS-5734) for the Treatment of Ebola and Emerging Viruses)》.《药物化学期刊(J Med Chem.)》2017年3月9日;60(5):1648-1661)。

[0472] 对在 K_2 EDTA或者肝素钠作为抗凝血剂的情况下ODE-P-RVn和ODBG-P-RVn在人血浆中的稳定性进行了评价。

[0473] 血浆掺入浓度为2微克/毫升的ODE-P-RVn或ODBG-P-RVn,并在37℃孵育。在0.5、1、2、4、8和24小时时采集样品,并冷冻用于后续通过实例C中所示的方法通过LC/MS/MS进行分析。图5A和图5B显示,ODE-P-RVn和ODBG-P-RVn两者在 K_2 EDTA(图5A)或肝素钠(图5B)作为抗凝血剂的情况下在人血浆中均能稳定至少24小时。(参见,例如,Warren T.K.等人,《自然》.2016年3月17日;531(7594):381-5;和Tempestilli,M.等人,《抗菌化疗杂志(J.Antimicrob Chemother)》.2020年10月1日;75(10):2977-2980)。

[0474] 实例11——抗病毒剂对呼吸道合胞病毒复制的影响

[0475] 方法:RSV的SRV A2株获自ATCC。在96孔板中,将一万个Hep-2细胞接种到每个孔中有10%胎牛血清以及1%青霉素和链霉素的EMEM中。每孔接种100TCID₅₀的病毒。两小时后,将孔用培养基洗涤一次,并加入连续四倍稀释的候选抗病毒药物。观察细胞培养物72至96小时的细胞病变效应。使用PRISM 7软件计算使CPE减少50%或90%的药物浓度,并分别表示为EC₅₀和EC₉₀。

[0476] 细胞活力测定:对于选定的化合物,使用CellTiter-Glo计算的CC50的最大值为100μM。为了进行这些实验,在不透明的白色96孔板(目录号655073,格瑞纳公司,北卡罗莱纳州门罗)中,每孔接种大约20k个Calu-3细胞中,并孵育48至72小时。加入化合物或对照,并在37℃和5% CO₂下孵育44小时。之后加入等体积的CellTiter-Glo试剂(目录号G7570,普洛麦格公司,威斯康星州麦迪逊),混合并根据制造商的建议在Veritas微孔板光度计(Microplate Luminometer)(Turner BioSystems)上记录发光情况。

[0477] 本公开的化合物在Hep-2细胞中抗RSV感染的抗病毒作用

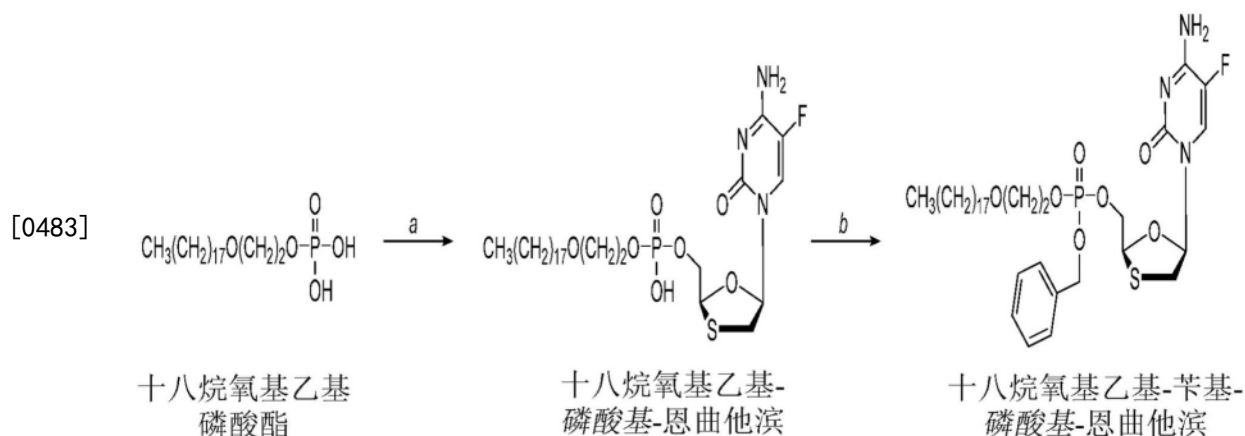
化合物	R ₁	R ₂	Hep-2 细胞		
			EC ₅₀ (μ M)	EC ₉₀ (μ M)	CC ₅₀ (μ M)
15d	1- <i>O</i> -十八烷基-2- <i>O</i> -苄基- <i>sn</i> -甘油基	H	0.010	0.019	14.7
[0478] 15j	1- <i>O</i> -十八烷基	H	0.010	0.019	9.6
	-2- <i>O</i> -(3-F,4-MeO-Bn)- <i>sn</i> -甘油基				
15m	1- <i>O</i> -油基-2- <i>O</i> -(3-F,4-MeO-Bn)- <i>sn</i> -甘油基	H	0.005	0.0094	12.5
15c	1- <i>O</i> -十六烷基	H	0.034	0.068	20.6
	-2- <i>O</i> -(3-F,4-MeO-Bn)- <i>sn</i> -甘油基				

[0479] 不希望受任何特定理论的束缚,认为化合物15j、15m和15c的活性可以比化合物15d多至少2至3倍。例如,化合物15m可以比瑞德西韦更具活性。

[0480] 本公开的化合物在感染RSV A2的Hep-2细胞中具有非常显著的抗病毒活性。细胞毒性中等,选择性(CC₅₀/EC₅₀)范围为605至2,500。

[0481] 实例12——制剂的制备

[0482] HIV抗病毒剂的合成: ((2S,5R)-5-(4-氨基-5-氟-2-氧代-3,4-二氢嘧啶-1(2H)-基)-1,3-氧硫杂环戊烷-2-基)甲基苄基(2-(十八烷氧基)乙基)磷酸酯(ODE-苄基磷酸基-恩曲他滨)的合成



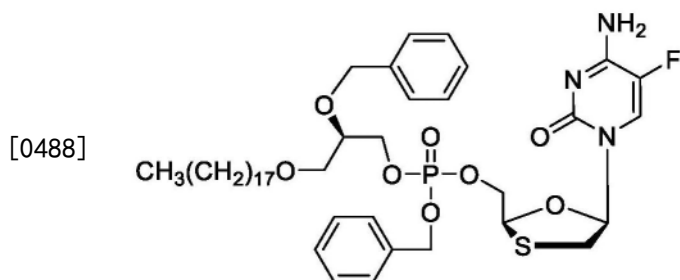
[0484] 方案5.用于合成本公开的恩曲他滨5'-一磷酸酯类似物的实例工艺。试剂和条件: a) 恩曲他滨,DCC,DMAP,吡啶,80℃,72h;b) 苯甲醇,PyBOP,DIEA,DMF,室温,3小时。

[0485] 将N,N-二环己基碳二亚胺(DCC,410mg,2.0mmol)加入到在10mL无水吡啶中的恩曲他滨(230mg,0.9mmol)、十八烷氧基乙基磷酸酯(320mg,0.74mmol)与4-二甲氨基吡啶(DMAP,110mg,0.9mmol)的溶液中,然后将混合物加热至80℃并搅拌3天。然后将吡啶蒸发,将残余物在硅胶60上通过快速柱色谱纯化。梯度洗脱(CH_2Cl_2 /甲醇10%至20%)得到220mg(47%产率)的十八烷氧基乙基-磷酸基-恩曲他滨:ESIMS:622.29[M-H]⁻;624.10[M+H]⁺,646.30[M+Na]⁺,662.26[M+K]⁺。

[0486] 将在无水DMF(10mL)中的十八烷氧基乙基-磷酸基-恩曲他滨(220mg,0.35mmol)、苯甲醇(76mg,0.70mmol)、二异丙基乙胺(DIEA,0.12mL、0.70mmol)和六氟磷酸(1H-苯并三唑-1-基-氧基)-三吡咯烷基磷(PyBOP,360mg,0.70mmol)在室温下搅拌。3小时后,将DMF在真空下蒸发。将残余物溶解于乙酸乙酯(50mL)并用饱和 NaHCO_3 洗涤(3×10mL)。将有机层在 MgSO_4 上干燥并将乙酸乙酯蒸发。使用乙酸乙酯和乙醇(0%至4%)通过硅胶柱色谱纯化残

留物,得到130mg (52%产率)的十八氧乙基苄基磷酸基-恩曲他滨。¹H NMR (400MHz, CDCl₃-CD₃OD) δppm 7.91 (d, J=5.87Hz, 1H), 7.40-7.48 (m, 4H), 6.27-6.34 (m, 1H), 5.35-5.41 (m, 1H), 5.19 (d, J=8.43Hz, 2H), 4.33-4.48 (m, 2H), 4.21-4.28 (m, 2H), 3.65-3.71 (m, 2H), 3.48-3.61 (m, 3H), 3.37-3.42 (m, 2H), 3.06-3.18 (m, 1H), 1.53-1.64 (m, 2H), 1.25-1.40 (m, 30H), 0.93 (t, sCJ=6.23Hz, 3H)。ESIMS: 714.32 [M+H]⁺, 736.43 [M+Na]⁺。

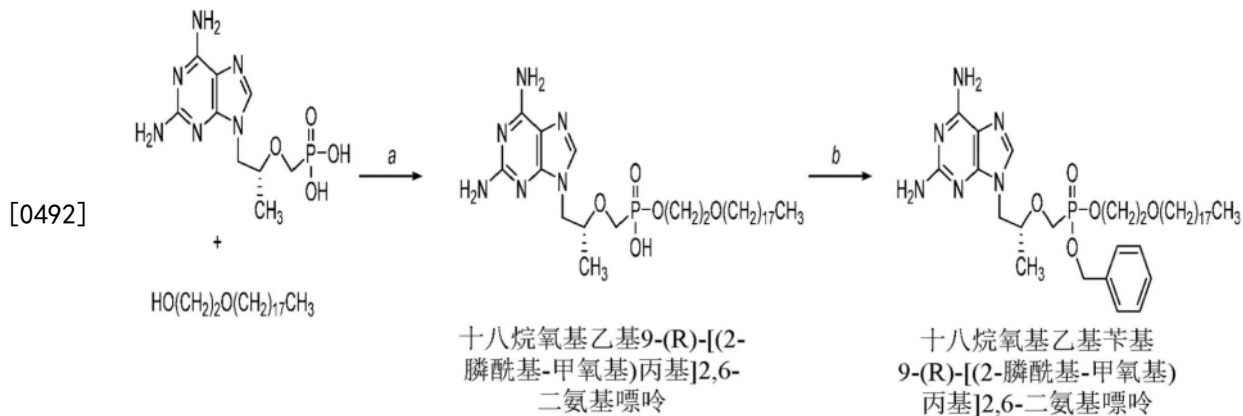
[0487] ((2S,5R)-5-(4-氨基-5-氟-2-氧代-3,4-二氢嘧啶-1(2H)-基)-1,3-氧硫杂环戊烷-2-基)甲基苄基((R)-2-(苄氧基)-3-(十八烷氧基)丙基)磷酸酯(ODBG-苄基磷酸基-恩曲他滨)的合成



[0489] ODBG-苄基-磷酸基-恩曲他滨

[0490] 如方案5中所述,在吡啶中使用DCC/DMAP将1-O-十八烷基-2-O-苄基-sn-甘油基磷酸酯(ODBG-P-)与恩曲他滨偶联,得到ODBG-磷酸基-恩曲他滨。像方案5中一样使用PyBOP/DIEA完成磷酸二酯与苯甲醇的酯化反应,得到磷酸三酯——ODBG-苄基-磷酸基-恩曲他滨。

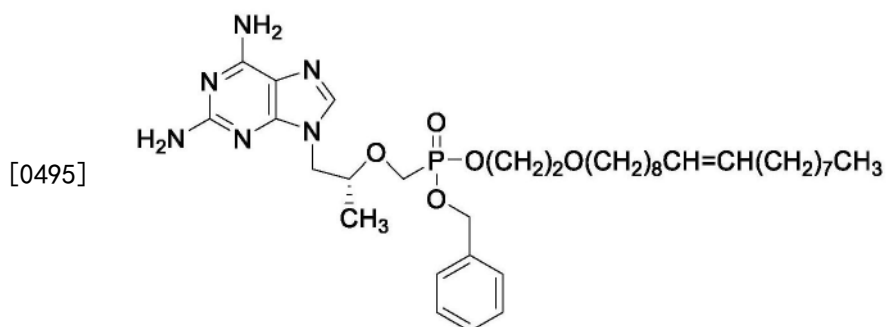
[0491] 苄基(2-(十八烷氧基)乙基)((R)-1-(2,6-二氨基-9H-嘌呤-9-基)丙烷-2-基)氧基)甲基)磷酸酯(ODE-苄基9-(R)-[2-(磷酸基甲氧基)-丙基]2,6-二氨基嘌呤)的合成



[0493] 方案6.用于合成本公开的9-(R)-[2-(磷酸基甲氧基)丙基]2,6-二氨基嘌呤类似物的实例工艺。试剂和条件:a) DCC, DMAP, 吡啶, 80℃, 72h; b) 苯甲醇, PyBOP, DIEA, DMF, 室温, 3小时。将N,N-二环己基碳二亚胺(3当量)加入到在无水吡啶中的以下项的混合物中: 9-(R)-[2-(磷酸基甲氧基)丙基]-2,6-二氨基嘌呤((R)-PMPDAP(1当量)(参见: Krečmerová, M., Jansa, P., Dračinský, M., Sázelová, P., Kašička, V., Neyts, J., Auwerx, J., Kiss, E., Goris, N., Stepan, G., Janeba, Z.《9-[2-(R)-[2-(磷酸基甲氧基)丙基]-2,6-二氨基嘌呤(R)-PMPDAP及其前药:优化制备,包括所形成的副产物的鉴定和体外抗病毒评价(9-[2-(R)-(Phosphonomethoxy)propyl]-2,6-diaminopurine(R)-PMPDAP and its prodrugs: Optimized preparation, including identification of by-products formed, and

antiviral evaluation in vitro)》,《生物有机与药物化学(Bioorganic&Medicinal Chemistry)》,2013,21:1199-1208)、十八烷氧基乙-1-醇(octadecyloxyethan-1-ol)(1当量)和4-二甲氨基吡啶(DMAP,1当量),并将混合物加热至80℃,直至完全转化为酯化产物。柱色谱后分离出单酯(ODE-(R)-PMPDAP)。向在无水DMF中的ODE-(R)-PMPDAP(1当量)、苯甲醇(1.5当量)与二异丙基乙胺(DIEA,1.5当量)的混合物中加入六氟磷酸(苯并三唑-1-基-氧基)-三吡咯烷基磷(PyBOP,1.5当量),并将混合物在室温下搅拌,直至完全形成二酯。通过柱色谱法分离出纯的产物ODE-苄基-(R)-PMPDAP。

[0494] 苄基(2-(十八-9-烯-1-基氧基)乙基)(((R)-1-(2,6-二氨基-9H-嘌呤-9-基)丙烷-2-基)氧基)甲基)磷酸酯(OLE-苄基9-(R)-[2-(磷酰基甲氧基)-丙基]2,6-二氨基嘌呤)的合成

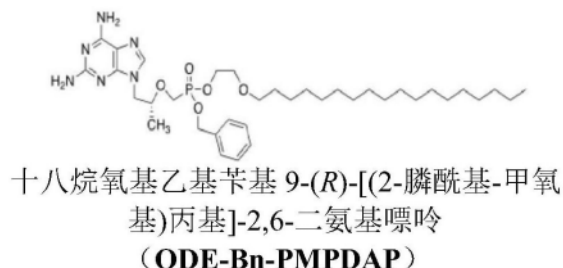
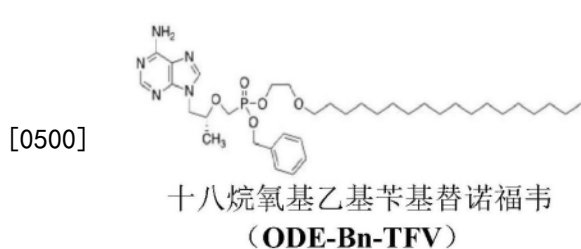


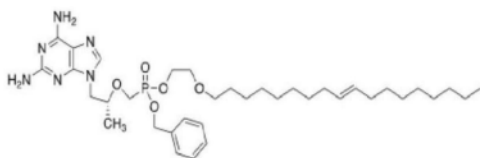
[0496] 油氧乙基-苄基9-(R)-[2-(磷酰基-甲氧基)丙基]2,6-二氨基嘌呤

[0497] 像方案6中一样利用DCC/DMAP对在吡啶中的(R)-PMPDAP与油氧乙基乙-1-醇(oleyloxyethan-1-ol)的混合物进行处理,得到单酯——OLE-(R)-PMPDAP。使用苯甲醇、PyBOP和DIEA进一步酯化OLE-(R)-PMPDAP。柱色谱后分离出OLE-苄基-(R)-PMPDAP。

[0498] 长效HIV抗病毒剂:对于长效肌内治疗人免疫缺陷病毒感染中的用途,适合使用的抗病毒化合物在本申请中和美国专利8,835,630中进行了描述,并且包括以下:

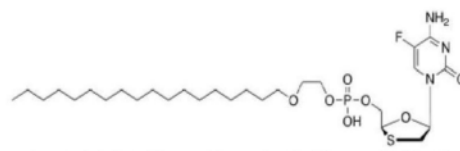
[0499] 可用作长效HIV抗病毒剂的化合物



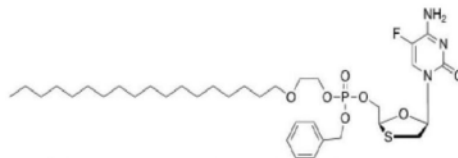


油氧乙基苄基 9-(*R*)-[(2-磷酸基-甲氧基)丙基]-2,6-二氨基嘌呤 (OLE-Bn-PMPDAP)

[0501]



十八烷氧基乙基-磷酸基-恩曲他滨 (ODE-P-FTC)



十八烷氧基乙基苄基-磷酸基-恩曲他滨 (ODE-Bn-P-FTC)

[0502] HIV感染的人PBMC中的抗病毒活性

化合物	EC ₅₀ , nM	CC ₅₀ , μM	选择性指数
ODE-Bn-替诺福韦	1.7±1.5	8.72	5130
ODE-PMPDAP	0.09 ± 0.05	7.0 ± 7.1	77,700
OLE-PMPDAP	0.10 ± 0.03	15.0 ± 12.3	150,000
ODE-Bn-PMPDAP	有活性		
OLE-Bn-PMPDAP	有活性		
ODE-P-恩曲他滨	9.6 ± 3.1	35.6 ± 12.9	3708
ODE-Bn-P-恩曲他滨	18.3 ± 8.7	54.7 ± 45.3	2989

缩略语: EC₅₀, 50%有效浓度; CC₅₀, 50%细胞毒性浓度; SI, 选择性指数 (CC₅₀/EC₅₀)。方法: 如 Beadle 等人《抗病毒研究》第 171 卷 (2019): 104614 中所报道的在感染 HIV-1 的人 PBMC 中测量对抗病毒活性的抑制。

[0503]

[0504] 本实例的化合物具有活性, EC₅₀ 值在 0.09 至 18 纳摩尔的范围内。

[0505] 药物制剂: 本文还提供了药物制剂。药物制剂包括如本文所描述的化合物, 如式 (I) 的化合物。在一些实施例中, 药物制剂具有口服生物可利用性。在一些实施例中, 药物制剂被配制用于注射, 如肌肉注射。

[0506] 药物制剂包括本文所描述的一种化合物, 或者本文所描述的化合物中的多于一种 (例如, 两种、三种等)。药物制剂包括任何一种或多种药学上可接受的赋形剂。用于本公开的化合物的油基制剂具有按重量计的以下组合物 (w/w%) :

[0507] 用于治疗冠状病毒或 HIV 感染的化合物的中效和长效制剂的组合物

组分	F3	F4	F7	F8
芝麻油	92.65	73.67	-	-
中链甘油三酯	-	-	92.65	73.67
苯甲醇	1.22	10.67	1.22	10.67
苯甲酸苄酯	-	15.67	-	15.67
乙醇	6.12	-	6.12	-

[0509] 上表的制剂中使用了以下材料:

[0510]	材料和等级	来源和批次	%测定
	超精制芝麻油, NF	禾大公司 (Croda), 0001095029	无法提供
	中链甘油三酯, USP	IOI 油脂化工公司 (IOI Oleochemical), 190104	无法提供
	苯甲醇, USP	EMD, K43136587447	98.0-100.5
	苯甲酸苄酯	西格玛-奥尔德里奇公司 (Sigma-Aldrich), MKBQ9481V	99.5
	乙醇, USP 200 proof	德康实验室 (Decon labs)	100

[0511] 在一些实施例中,本文所描述的化合物中的一种或多种,如式(I)的化合物,可溶于油,如制剂F3、F4、F7和F8中的一种。当一定量的本文所描述的一种或多种化合物(如式(I)的化合物)可溶于油时,则所得的药物制剂可用于本文的方法中的任一种,包括利用单次剂量的药物制剂治疗冠状病毒的方法。

[0512] 使用本公开的化合物制备了上表的制剂。在制剂中可以利用本公开的抗病毒前药,所述抗病毒前药采用PCT/US2021/043094中描述的HIV抗病毒剂或RNA病毒抗病毒化合物。作为非限制性实例,使用ODE-Bn-替诺福韦作为抗病毒前药进行了以下药代动力学实验。

[0513] 在大鼠中单次IM施用后对制剂F3、F4、F7和F8的比较——组别:载剂对照,10mg/kg、30mg/kg和100mg/kg的制剂3、4、7、8。

[0514] 程序:在计时零点,向大鼠肌肉内注射100微升的载剂和所述制剂。观察动物的一般健康状况,并在开始时和之后每周两次获取体重。在6、24和48小时以及7、14、28、35和42天时获取血液,并通过LC/MS/MS确定ODE-Bn-TFV和ODE-TFV(第一代代谢产物,也是有活性的抗HIV化合物)的血浆水平。

[0515] 图6A和图6B分别示出了对大鼠肌肉内施用100mg/kg制剂F3后ODE-Bn-TFV和ODE-TFV的药代动力学。

[0516] 结果:在第零天对大鼠进行IM注射,每周两次获取体重和进行临床观察,持续42天。载剂和药物治疗的大鼠的体重增加相同,并且没有发现临床症状。研究结束时,全面代谢检查未显示肝或肾功能测试方面的任何异常。CBC为正常对照组和所有药物剂量组。施用后,ODE-Bn-TFV代谢成更具活性的代谢产物ODE-TFV。从ODE-Bn-TFV曲线(左)和活性第一代代谢产物ODE-TFV的曲线(右)可以清楚地看出,10mg/kg和30mg/kg的剂量(第2组和第3组)不足以提供持续30天及更久的抗病毒显著水平的化合物。只有100mg/kg剂量(第4组)提供了持续28天的处于病毒显著水平的ODE-Bn-TFV和ODE-TFV水平。

[0517] 下面的两个 $\log_{10}$ 图显示了剂量为100mg/kg(制剂药物浓度为200mg/ml)的各种制剂。左图是ODE-Bn-TFV,右图显示了ODE-TFV的血浆水平(nM/L)。以100mg/kg给予的所有四种制剂允许在6至48小时达到ODE-Bn-TFV的最大血浆水平,随后逐渐下降为2.87ng/ml(F8)至6.95(F3)。在第28天时最高值出现在F3中,ODE-Bn-TFV为6.95ng/ml(10.3nM),ODE-TFV为1.78ng/ml(3.05nM)。这些值高于这两种化合物的 EC_{50} (1.7nM和1.1nM)。

[0518] 图7A和图7B是在对大鼠肌肉内施用100mg/kg后,4种不同制剂分别对ODE-Bn-TFV和ODE-TFV的药代动力学的影响的图。

[0519] 药代动力学参数

[0520]

药代动力学参数				
	F3	F4	F7	F8
C _{max} , nM	130	139	76	187
T _{1/2} 小时	142	171	168	278
AUC (0-inf) nM. 小时	35200	33800	21400	48100
AUC (14-28 小时) nM.小时	10900	6900	3640	5420

[0521] 下图显示了在大鼠中肌肉施用的制剂F3中的ODE-Bn-TFV与制剂F8中的ODE-Bn-TFV之间的比较。与F8相比,F3中的ODE-Bn-TFV提供更低的早期药物水平,但水平持续时间更长,持续28天保持在高于HIV EC₉₀。F8制剂在第15天之前产生较高的药物水平,更适合用于5至14天的治疗疗程。

[0522] 图8示出了使用制剂F3与F8在大鼠中进行的96mg/kg ODE-Bn-TFV的药代动力学比较。

[0523] 下表显示了第一个和第二个14天期间计算的曲线下面积 (AUC) 百分比,显示了释放规律 (release profile)。

[0524] 释放规律:第一个14天与第二个14天。

[0525]

制剂	第一个14天的%AUC	第二个14天的%AUC
F3	69	31
F4	79	21
F7	83	17
F8	89	11

[0526] 制剂F3在第二个14天期间提供了最大的暴露。在第一个14天期间,制剂F8和F7显示出最高的暴露百分比,分别为89%和83%。

[0527] 每月IM注射ODE-BN-TFV后在15天和30天时测量血浆水平的情况下进行的在大鼠中对制剂F3为期3个月的研究——由于初始血浆值非常高(约100ng/ml),并在第28天逐渐下降至略低于最佳值,因此认为在更长时间的多剂量研究中了解PBMC TFV_{pp}水平是重要的。设计了一项为期3个月的研究,以测试雄性Sprague Dawley大鼠每月IM注射含有ODE-Bn-TFV的F3后ODE-Bn-TFV和ODE-TFV的中谷血浆水平 (mid and trough plasma levels)。

[0528] 在第0、30和60天给每组3只大鼠进行100微升的最大体积IM注射。有3组对照动物,每月接受注射F3载体。通过LC/MS/MS分析血浆药物水平。对在3个月期间的体重进行评估。在105天研究结束时,大鼠的体重从355gm增加到705mg。因为给予了100微升的恒定(最大)IM体积,所以初始剂量为90mg/kg,由于大鼠体重增加,随后在第30天和第60天时的两次注射剂量较低,为62mg/kg。在为期3个月的研究中,没有显著的临床观察结果,第105天时的代谢检查和CBC没有显示出异常。

[0529] 图9示出了在暴露于每月肌肉注射剂量的制剂F3中的ODE-BN-TFV 3个月期间ODE-Bn-TFV和ODE-TFV的大鼠血浆水平。

[0530] 血浆药物水平:第一次剂量后15天,ODE-Bn-TFV水平很高,第一代谢产物ODE-TFV是母体化合物的约30%。然而,随着3个月研究的进行,ODE-TFV水平逐渐成为血浆中的主要活性化合物。在60天时的最后一次剂量后,ODE-TFV的水平保持显著,直至第105天,此时为

11纳摩尔。ODE-TFV的 EC_{90} 为10nM(Beadle JR,Aldern KA,Zhang XQ,Valiaeva N,Hostetler KY,Schooley RT.《十八烷氧基乙基苄基替诺福韦:提供持续的细胞内替诺福韦二磷酸水平的新型替诺福韦二酯(Octadecyloxyethyl benzyl tenofovir:A novel tenofovir diester provided sustained intracellular levels of tenofovir diphosphate)》.《抗病毒研究》2019年11月;171:104614)。在0、30和60天时进行的3次每月一次IM剂量后,ODE-Bn-TFV和ODE-TFV的治疗性水平维持至105天。大鼠接受了100微升的最大(体积)剂量。由于它们的体重在治疗期间翻了一番,第二次和第三次的剂量仅为62mg/kg。即使是在更低的第2次和第3次药物的剂量的情况下,药物的治疗性水平仍维持了105天。ODE-TFV代谢产物的治疗性水平持续了105天。

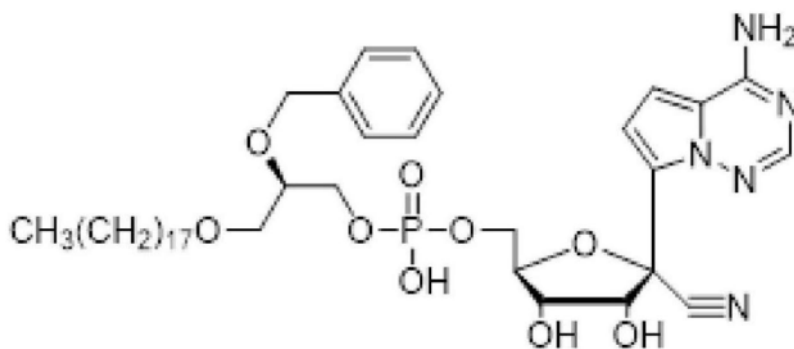
[0531] 制剂F3中的ODE-Bn-TFV的犬药代动力学——利用30mg/kg IM剂量的制剂F3中的ODE-Bn-TFV在比格犬中进行了30天的研究。图10显示了血浆中ODE-Bn-TFV(圆圈)和ODE-TFV(正方形)的水平。

[0532] EC_{90} 值以三角形显示,以指示血浆药物水平何时低于90%有效水平。制剂F3中以30mg/kg肌肉注射的ODE-Bn-TFV提供了30至34天高于ODE-Bn-TFV及其活性代谢产物ODE-TFV的 EC_{90} 值。

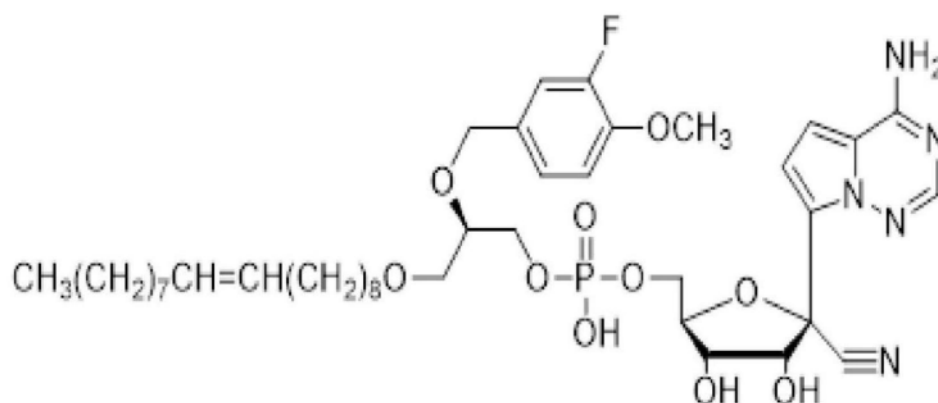
[0533] 图10示出了用100mg/kg制剂F3中的ODE-Bn-TFV处理的比格犬中ODE-Bn-TFV和ODE-TFV的血浆水平。

[0534] 除了注射部位处的一些短暂肿胀外,没有不良反应。研究前和研究后的CBC和代谢检查未显示任何异常。值得注意的是,没有发现肝或肾功能测试异常。本公开的其他化合物可在制剂F3中使用,以提供对HIV感染的长期保护。

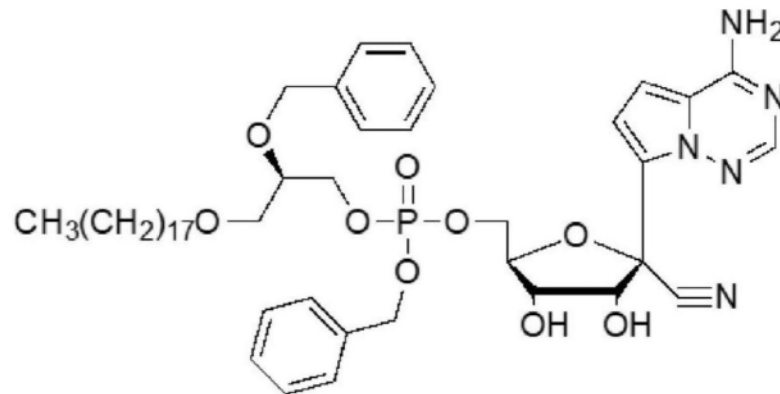
[0535] 用于肌肉治疗冠状病毒感染的抗病毒化合物和制剂——在SARS-CoV-2感染中,活跃的病毒复制通常持续5至10天。为了用肌肉剂量进行治疗,制剂F8中200mg/ml至400mg/ml的抗病毒前药预计可提供至少7天的有效药物水平。瑞德西韦核苷一磷酸酯的有效抗病毒前药的非限制性实例可以选自以下所示的结构:

1-*O*-十八烷基-2-*O*-苄基-*sn*-甘油基-磷酸基-RVn

[0536]

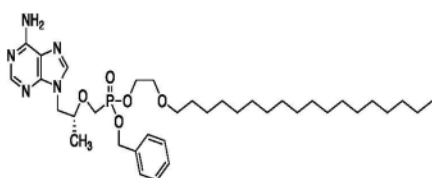
1-*O*-油基-2-*O*-(3-氟,4-甲氧基苄基)-*sn*-甘油基-磷酸基-RVn

[0537]

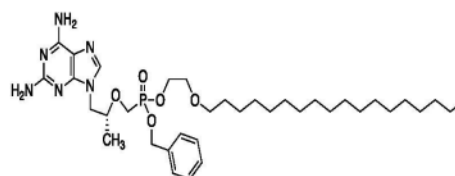
1-*O*-十八烷基-2-*O*-苄基-*sn*-甘油基-苄基-磷酸基-RVn

[0538] 用于肌内治疗人类免疫缺陷感染的抗病毒化合物和制剂——对于在长效肌内治疗人类免疫缺陷病毒感染中的用途,适合使用的抗病毒化合物在美国专利8,835,630中进行了描述。这些化合物可以在制剂F3或F4中使用。

[0539] 可以在本文所描述的制剂中使用的非限制性实例包括以下化合物:

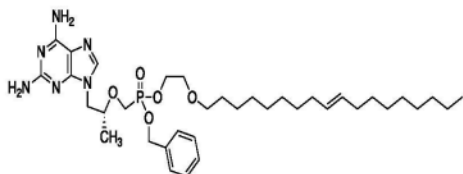


十八烷氧基乙基苄基替诺福韦
(ODE-Bn-TFV)

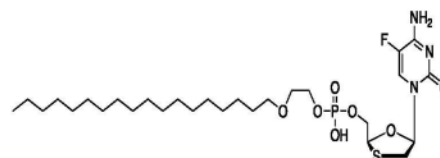


十八烷氧基乙基苄基 9-(R)-[(2-膦酰基-甲氧基)丙基]-2,6-二氨基嘌呤
(ODE-Bn-PMPDAP)

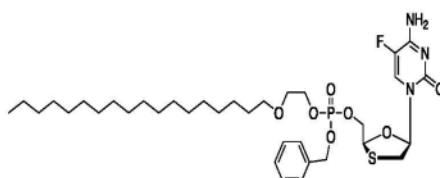
[0540]



油氧乙基苄基 9-(R)-[(2-膦酰基-甲氧基)丙基]-2,6-二氨基嘌呤 (OLE-Bn-PMPDAP)



十八烷氧基乙基-磷酸基-恩曲他滨
(ODE-P-FTC)



十八烷氧基乙基苄基-磷酸基-恩曲他滨 (ODE-Bn-P-FTC)

[0541] 适合在长效制剂中使用的化合物在感染有HIV-1的人PBMC中的抗病毒活性

[0542]

化合物	EC ₅₀ , nM	CC ₅₀ , μM	选择性指数
ODE-Bn-替诺福韦	1.7±1.5	8.72	5130
ODE-PMPDAP	0.09 ± 0.05	7.0 ± 7.1	77,700
OLE-PMPDAP	0.10 ± 0.03	15.0 ± 12.3	150,000

[0543]

ODE-Bn-PMPDAP	有活性		
OLE-Bn-PMPDAP	有活性		
ODE-P-恩曲他滨	9.6 ± 3.1	35.6 ± 12.9	3708
ODE-Bn-P-恩曲他滨	18.3 ± 8.7	54.7 ± 45.3	2989

缩略语: ODE-, 十八烷氧基乙基; OLE-, 油氧乙基; PMP-, 膦酰基丙氧基; DAP, 2,6-二氨基嘌呤; EC₅₀, 50%有效浓度; CC₅₀, 50%细胞毒性浓度。方法: 如 Beadle 等人《抗病毒研究》第 171 卷 (2019): 104614 中所报道的在感染有 HIV-1 的人 PBMC 中测量抗病毒活性的抑制。

[0544] 如本文和本实例中所解释的,合成了22种ODE-TFV类似物,以确定与ODE-Bn-TFV中的苄基相比有效的二酯取代基。在HIV感染的人PBMC中确定抗病毒活性在HFF细胞中确定28天的时间段内TFVpp的药代动力学。

[0545] 下表示出了二酯取代基在ODE-TFV的抗HIV活性方面的变化:

[0546]

取代基	EC ₅₀ nM	CC ₅₀ nM	选择性指数
H	1.1	1284	1170
苄基	1.7	8720	5130
苯基	2.4	3930	1640
4-甲基苄基	2.1	3410	1620
3-甲基苄基	3.2	3860	1210
2-甲基苄基	2.7	1440	532

甲基	5.2	2980	677
乙基	57	5365	95
异丙基	183	1730	94
环丙基	413	5280	13

[0547] 图11A和图11B示出了ODE-TFV(图11A)和ODE-Et-TFV(图11B)在HFF细胞中的TFV_{pp}持久性。

[0548] 下表示出了暴露3天后HFF细胞中的TFV_{pp}持久性。将HFF细胞暴露于1微摩尔的药物,持续3天。在第0、1、2、4、7、14、21和28天,将细胞进行胰蛋白酶消化、计数和处理,用于对TFV_{pp}进行LC/MS测量。数据以ftg/细胞表示。nm=没有意义;ftg——毫微微克(gemtogram)。

[0549]

化合物	C _{max} ,ftg/细胞	T _{max} ,d	T _{1/2}	T _{1/10}	AUC
ODE-TFV	189	0	1.2	2.1	323
ODE-Bn-TFV	72.5	2	3.7	8.7	324
ODE-4MeBN-TFV	49.5	0	3.1	11.8	233
HDP-Bn-TFV	15.0	0	1.8	10.2	66.3
ODE-Me-TFV	9.3	0	2.0	11.3	37.2
ODE-Ph-TFV	8.1	1	3.0	15.1	49.2
ODE-Et-TFV	0.91	0	nm	nm	4.2
ODE-iPr-TFV	0.69	0	nm	nm	2.0

[0550] 在本实例中,制备了6种用于ODE-Bn-TFV的油基制剂。确定了20mg/mL制剂的加速稳定性。评估了API负荷。

[0551] 在本实例中,制备了用于IM用途的ODE-Bn-TFV的制剂(20mg/mL制剂),并且包括了下表的组分(w/w%):

[0552]

组分	F3V	F4V	F5V
芝麻油	92.65	73.67	89.765
苯甲醇	1.22	10.67	10.20
苯甲酸苄酯	0	15.67	0
醇	6.12	0	0
BHT	0	0	0.0306

[0553] 在本实例中,进行了两个月的加速稳定性研究。在下表提供了这项研究的结果和观察结果:

[0554]

2至8℃	外观	浓度(mg/g)	T ₀ 之后的回收
F3	无色透明	20.09	99.0
F4	淡黄透明	20.45	102.1
F5	无色透明	19.85	100.7

[0555]

25℃	外观	浓度(mg/g)	T ₀ 之后的回收
F3	无色透明	20.52	101.1
F4	黄色透明	19.57	97.7

	F5	无色透明	19.79	100.3
[0556]	40℃	外观	浓度 (mg/g)	T ₀ 之后的回收
	F3	无色透明	20.56	101.3
	F4	黄色透明	19.08	95.3
	F5	无色透明	19.15	97.10

[0557] 制备了用于测试的其他制剂,如下表所提供的(w/w%) :

[0558]	组分	F3V	F4V	F7V	F8V
	芝麻油	92.65	73.67	-	-
	中链甘油三酯	-	-	92.65	73.67
	苯甲醇	1.22	10.67	1.22	10.67
	苯甲酸苄酯	-	15.67	-	15.67
	醇	6.12	-	6.12	-

[0559] 在大鼠中对本实例的制剂3、4、7和8进行了42天的药代动力学研究。在所述研究中,将100mg/kg、30mg/kg和10mg/kg的每种制剂通过肌内(IM)注射施用于雄性Sprague Dawley比率中(100微升)。在注射后0.25、1、2、7、14、21、28、35和42天时采血,并确定ODE-Bn-TFV和ODE-TFV的血浆水平。对大鼠进行每周两次的临床观察,并收集体重数据。

[0560] 图12A和图12B示出了含有ODE-BN-TFV(图12A)或ODE-TFV(图12B)的制剂F3V的血浆浓度(ODE-Bn-TFV ED₉₀为10.9ng/mL;ODE-TFV ED₉₀为6.3nm/mL)。

[0561] 图12C和图12D示出了含有ODE-Bn-TFV(图12C)和ODE-TFV(图12D)的制剂F4V的血浆浓度。

[0562] 图12E和图12F示出了含有ODE-Bn-TFV(图12E)和ODE-TFV(图12F)的制剂F7V的血浆浓度。

[0563] 图12G和图12H示出了含有ODE-Bn-TFV(图12G)和ODE-TFV(图12H)的制剂F8V的血浆浓度。

[0564] 图12I示出了制剂F3V、F4V、F7V和F8V的平均血浆浓度。

[0565] 下表提供了本实例的API药代动力学参数:

[0566]

	F3	F4	F7	F8
C _{max} , nm	130	139	76	187
T1/2 小时	142	171	168	278
AUC (0-inf) nM. 小时	35200	33800	21400	48100
AUC (14-28 小时) nM.小时	10900	6900	3460	5420

[0567] 在下表中至少部分地汇总了在本实例中观察到的所提供的ODE-BN-TFV释放:

[0568]	第一个 14 天与第二个 14 天		
	制剂	第一个 14 天的%AUC	第二个 14 天的%AUC
	F3	69	31
	F4	79	21
	F7	83	17
	F8	89	11

[0569] 本实例的结果是,通过化学和制剂改变,TFV转化成了长效抗HIV状态。本实例的制

剂F3和F4在第一个14天释放了例如69%和79%的先导化合物,但是这种释放规律可以如本文所述进行修改。使用制剂F3,在大鼠中进行了3个月的研究,每月IM注射100微升,测量TFVpp的血浆药物水平和PBMC水平。

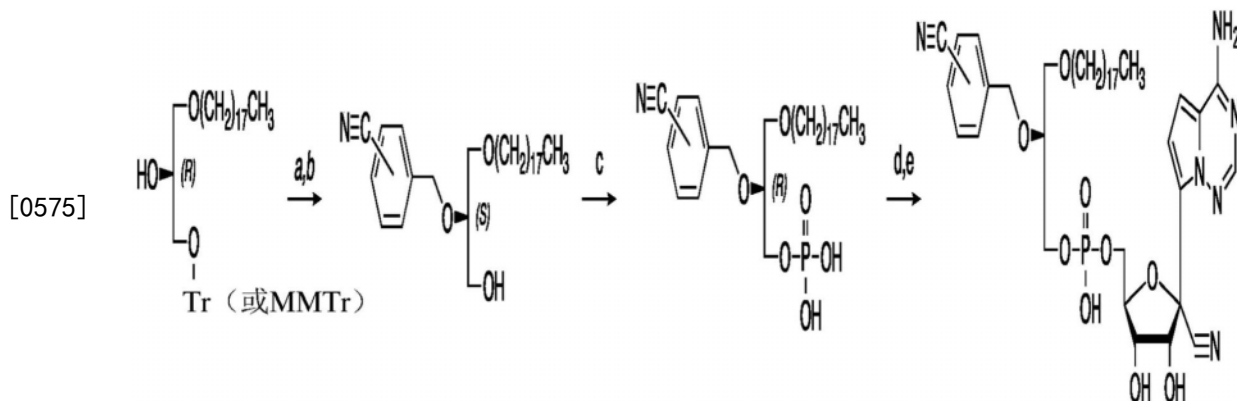
[0570] 105天药代动力学研究(每月在大鼠中IM注射F3):每月通过IM注射给雄性Sprague Dawley大鼠施用100微升制剂3的API。由于大鼠在105天期间体重显著增加,基于体重的实际剂量如下:90mg/kg、62mg/kg和60mg/kg。在第15、30、45、60、75、90、98和105天时采集血液。确定ODE-Bn-TFV和ODE-TFV的血浆水平。在前述日期还获取了PBMC,并确定每 10^6 个细胞的 $f_{mo}1$ ($f_{mo}1/10^6$ cells)。

[0571] 图13示出了血浆中ODE-Bn-TFV和ODE-TFV每毫升的纳克数。图14示出了PBMC中的TFV二磷酸酯。

[0572] 本实例的大鼠在105天的研究中体重增加了;大约350克到大约670克。对照组和治疗组大鼠的生长曲线没有差异。两组都没有报告的临床观察结果。治疗组和对照组动物的CBC正常。两组的全面代谢检查均正常。重要的是,BUN或肌酐没有变化。

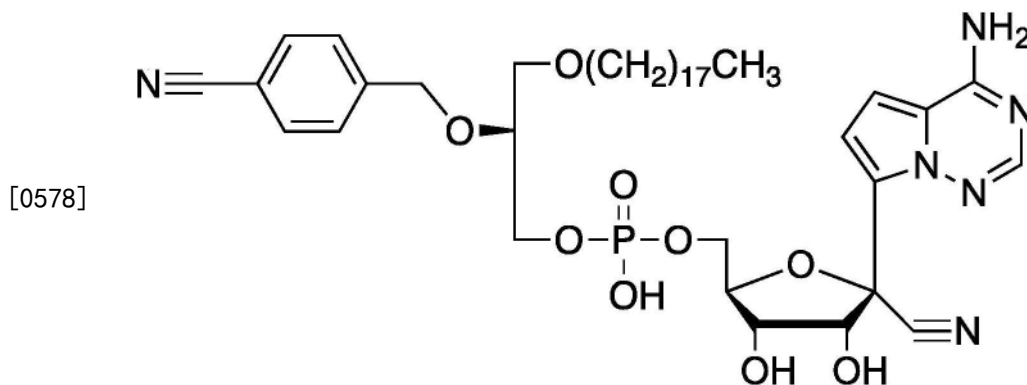
[0573] 实例13——2-、3-和4-氰基苄基类似物的合成

[0574] 以下是示出合成2-、3-和4-氰基苄基类似物的实施例的方案。



[0576] 方案7.2-氰基苄基、3-氰基苄基和4-氰基苄基类似物的合成。试剂:a) 氢化钠,2-(溴甲基苯甲腈、3-(溴甲基苯甲腈或4-(溴甲基苯甲腈,四丁基碘化铵,THF;b) p-TsOH(目录), CH_2Cl_2 ,MeOH;c) i) $POCl_3$ 、三乙胺,ii) 丙酮/冰水;d) RVn(GS-441524) 丙酮化合物,DIC/NMI,吡啶,35°C;e) 甲酸,室温。

[0577] 实例13a.1-0-十八烷基-2-0-(4-氰基苄基)-sn-甘油基-磷酸基-RVn(OD(4-CN-Bn)G-P-RVn)的合成



[0579] 将氢化钠(440mg,11mmol)加入到在无水THF(30mL)中的(R)-1-((4-甲氧基苯基)

二苯基甲氧基)-3-(十八烷氧基)丙烷-2-醇(3.39g, 5.5mmol)与四丁基碘化铵(600mg, 1.65mmol)的冷却(0℃)溶液中。剧烈搅拌20分钟后,加入4-(溴甲基)苯甲腈(1.61g, 8.2mmol),将混合物回温至环境温度并搅拌过夜。然后用冰(25mL)猝灭反应,用乙醚(75mL)进行稀释,用H₂O洗涤(2×25mL)并用无水MgSO₄干燥。将残余物吸附到硅胶上,并通过快速柱色谱进行纯化(梯度:0%至50%在己烷中的EtOAc),以得到(R)-4-(((1-((4-甲氧基苯基)二苯基甲氧基)-3-(十八烷氧基)丙烷-2-基)氧基)甲基)苯甲腈(610mg, 15%),为白色固体。MS (ESI) m/z [M+Na]⁺ 754.54。

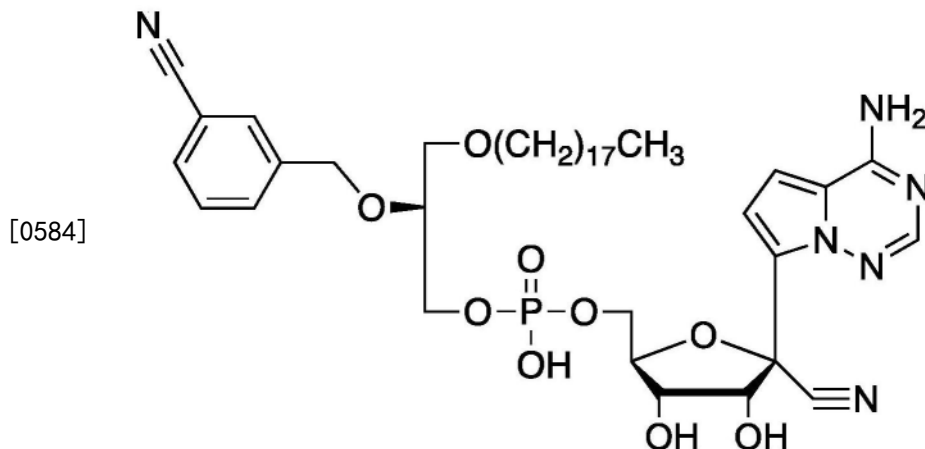
[0580] 向在1:1CH₂Cl₂/MeOH(30mL)中的(R)-4-(((1-((4-甲氧基苯基)二苯基甲氧基)-3-(十八烷氧基)丙烷-2-基)氧基)甲基)苯甲腈(400mg, 0.54mmol)溶液中加入对甲苯磺酸一水合物(5mg, 0.03mmol),并在室温下搅拌混合物直至根据TLC分析表明脱保护完成(约3小时)。加入饱和aq NaHCO₃(200mg),将溶剂在真空下蒸发。将残余物吸附到硅胶上,并通过快速柱色谱进行纯化(梯度:0%至10%在己烷中的EtOAc),以得到(S)-4-(((1-羟基-3-(十八烷氧基)丙烷-2-基)氧基)甲基)苯甲腈,为透明油(80mg, 32%)。MS (ESI) m/z [M+Na]⁺ 482.55。

[0581] 将(S)-4-(((1-羟基-3-(十八烷氧基)丙烷-2-基)氧基)甲基)苯甲腈(80mg, 0.17mmol)与三乙胺(0.08mg, 0.8mmol)的溶液加入到在CH₂Cl₂(3mL)中的POCl₃(30mg, 0.20mmol)冷却(0℃)溶液中,并搅拌3小时。将混合物加入丙酮/冰水中,搅拌1小时,然后用CH₂Cl₂进行提取。分离出(R)-2-((4-氰基苄基)氧基)-3-(十八烷氧基)丙基磷酸二氢酯(80mg, 87%),无需进一步纯化即可使用。MS (ESI) m/z [M-H]⁻ 538.47。

[0582] 使用二异丙基碳二亚胺(DIC, 100mg, 0.80mmol)、在吡啶(10mL)中的N-甲基咪唑(NMI, 98mg, 1.2mmol)将所述磷酸酯(200mg, 0.37mmol)与RVn(GS-441524)-丙酮化合物(132mg, 0.40mmol)偶联,产生((3aR, 4R, 6R, 6aR)-6-(4-氨基吡咯并[2,1-f][1,2,4]三嗪-7-基)-6-氰基-2,2-二甲基四氢呋喃并[3,4-d][1,3]二噁吩-4-基)甲基((R)-2-((4-氰基苄基)氧基)-3-(十八烷氧基)丙基)磷酸氢酯(60mg, 19%, MS m/z [M-H]⁻ 851.55),然后用甲酸(1mL)对其进行处理并搅拌6小时。蒸发溶剂,并通过快速色谱纯化得到((2R, 3S, 4R, 5R)-5-(4-氨基吡咯并[2,1-f][1,2,4]三嗪-7-基)-5-氰基-3,4-二羟基四氢呋喃-2-基)甲基((R)-2-((4-氰基苄基)氧基)-3-(十八烷氧基)丙基)磷酸氢酯(20mg, 35%),为灰白色固体。¹H NMR(400MHz, CD₃OD+CDCl₃) δ7.76(s, 1H, H2), 7.60(d, J=8.0Hz, 2H, -CH₂-芳基-H3+H5), 7.49(d, J=7.9Hz, 2H, -CH₂-芳基-H2+H6), 6.96(d, J=4.4Hz, 1H, H9), 6.86(d, J=4.5Hz, 1H, H8), 4.80(d, J=5.3Hz, 1H, H2'), 4.77-4.63(m, 2H, -CH₂-芳基), 4.37(d, J=4.7Hz, 1H, H4'), 4.25(t, J=5.4Hz, 1H, H3'), 4.11(d, J=18.7Hz, 2H, H5'), 3.90(s, 2H, H3''), 3.80-3.68(m, 1H, H2''), 3.49(qd, J=10.6, 4.9Hz, 2H, H1''), 3.39(tt, J=6.0, 3.0Hz, 2H, -OCH₂CH₂(CH₂)₁₅-), 1.52(p, J=6.9Hz, 2H, -OCH₂CH₂(CH₂)₁₅-), 1.26(br s, J=5.7Hz, 30H, -OCH₂CH₂(CH₂)₁₅-), 0.89(t, J=6.8Hz, 3H)。¹³C NMR(101MHz, CD₃OD+CDCl₃) δ156.63(C6), 145.57(C2), 132.62, (-CH₂-芳基-C1), 128.47(-CH₂-芳基-C3+C5), 125.14(-CH₂-芳基-C2+C6), 119.38(-CN), 117.29(C7), 111.95(C5), 111.28(-CN'), 84.60(C4'), 80.18(C1'), 75.38(C2'), 72.24(C2''), 71.57(-CH₂-芳基), 71.40(-OCH₂CH₂(CH₂)₁₄-), 71.12(C1''), 65.75(C3''), 65.20(C5'), 32.57(-OCH₂CH₂(CH₂)₁₄-), 30.89-29.57(m, -OCH₂CH₂(CH₂)₁₄-), 26.75(-CH₂CH₂CH₃), 23.26(-CH₂CH₂CH₃), 14.21(-CH₃)。HRMS (ESI) m/z [M-H]⁻

$C_{41}H_{60}N_6O_9P$ 的计算值为811.4165,实测值为811.4178。HPLC纯度为98.6%。

[0583] 实例13b.1-0-十八烷基-2-0-(3-氰基苄基)-sn-甘油基-磷酸基-RVn(OD(3-CN-Bn)G-P-RVn)的合成



[0585] 将氢化钠(60mg, 2.5mmol)加入到在无水THF(30mL)中的(R)-1-(十八烷氧基)-3-(三苯甲基)丙烷-2-醇(540mg, 0.92mmol)与四丁基碘化铵(180mg, 0.5mmol)的冷却(0℃)溶液中。将混合物剧烈搅拌20分钟后,加入3-(溴甲基)苯甲腈(480mg, 2.6mmol),然后将混合物回温至环境温度并搅拌过夜。然后用冰(25mL)猝灭反应,用乙醚(75mL)进行稀释,用 H_2O 洗涤($2 \times 25mL$)并用无水 $MgSO_4$ 干燥。将残余物吸附到硅胶上,并通过快速柱色谱进行纯化(梯度:0%至50%在己烷中的EtOAc),以得到(R)-3-(((1-(十八烷氧基)-3-(三苯甲基)丙烷-2-基)氧基)甲基)苯甲腈(600mg, 93%),为白色固体。MS(ESI) m/z $[M+Na]^+$ 724.57。

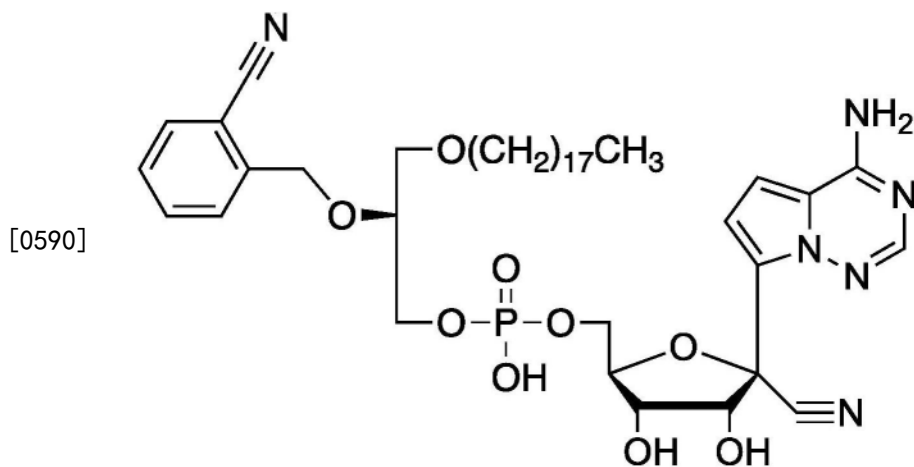
[0586] 向在1:1 CH_2Cl_2 /MeOH(30mL)中的(R)-3-(((1-(十八烷氧基)-3-(三苯甲基)丙烷-2-基)氧基)甲基)苯甲腈(600mg, 0.85mmol)溶液中加入对甲苯磺酸一水合物(8mg, 0.04mmol),并在室温下搅拌混合物直至根据TLC分析确定脱保护完成(约3小时)。加入饱和aq $NaHCO_3$ (200mg),将溶剂在真空下蒸发。将残余物吸附到硅胶上,并通过快速柱色谱进行纯化(梯度:0%至10%在己烷中的EtOAc),以得到(S)-3-(((1-羟基-3-(十八烷氧基)丙烷-2-基)氧基)甲基)苯甲腈,为透明油(380mg, 97%)。MS(ESI) m/z $[M+H]^+$ 460.57, $[M+Na]^+$ 482.52。

[0587] 将(S)-3-(((1-羟基-3-(十八烷氧基)丙烷-2-基)氧基)甲基)苯甲腈(360mg, 0.78mmol)与三乙胺(340mg, 3.0mmol)的溶液加入到在 CH_2Cl_2 (5mL)中的 $POCl_3$ (140mg, 2.0mmol)冷却(0℃)溶液中,并搅拌3小时。将混合物加入丙酮/冰水中,搅拌1小时,然后用 CH_2Cl_2 进行提取。蒸发有机相,得到(R)-2-((3-氰基苄基)氧基)-3-(十八烷氧基)丙基磷酸二氢酯(850mg, 1.57mmol, MS(ESI) m/z $[M-H]^-$ 538.46),然后使用在吡啶(30mL)中的DIC(450mg, 3.6mmol)、NMI(440mg, 5.4mmol)将其与RVn(GS-441524)-丙酮化合物(600mg, 1.8mmol)偶联。在35℃下反应过夜,随后通过色谱纯化得到((3aR, 4R, 6R, 6aR)-6-(4-氨基吡咯并[2,1-f][1,2,4]三嗪-7-基)-6-氰基-2,2-二甲基四氢呋喃并[3,4-d][1,3]二噁吩-4-基)甲基((R)-2-((3-氰基苄基)氧基)-3-(十八烷氧基)丙基)磷酸氢酯(360mg, 26%)。MS(ESI) m/z $[M+Na]^+$ 875.49。

[0588] 在室温下将丙酮化合物(340mg, 0.39mmol)加入到甲酸(7mL)中并搅拌3小时。蒸发溶剂,并通过快速柱色谱纯化得到((2R, 3S, 4R, 5R)-5-(4-氨基吡咯并[2,1-f][1,2,4]三

噻-7-基)-5-氰基-3,4-二羟基四氢呋喃-2-基)甲基((R)-2-((3-氰基苄基)氧基)-3-(十八烷氧基)丙基)磷酸氢酯(290mg,90%),为灰白色固体。 ^1H NMR(400MHz, $\text{CD}_3\text{OD}+\text{CDCl}_3$) δ 7.71(s, 1H, H2), 7.70(s, 1H, $-\text{CH}_2$ -芳基-H2), 7.62(d, $J=7.8\text{Hz}$, 1H, $-\text{CH}_2$ -芳基-H4), 7.56(d, $J=7.8\text{Hz}$, 1H, $-\text{CH}_2$ -芳基-H5), 7.44(t, $J=7.6\text{Hz}$, 1H, $-\text{CH}_2$ -芳基-H6), 6.96(d, $J=4.5\text{Hz}$, 1H, H9), 6.86(d, $J=4.5\text{Hz}$, 1H, H8), 4.72(d, $J=5.3\text{Hz}$, 1H, H2'), 4.72(d, $J=12.4\text{Hz}$, 1H, $-\text{CH}_2$ -芳基), 4.65(d, $J=12.4\text{Hz}$, 1H, $-\text{CH}_2$ -芳基), 4.39(q, $J=4.4\text{Hz}$, 1H, H4'), 4.27(t, $J=5.5\text{Hz}$, 1H, H3'), 4.10(d, $J=11.5\text{Hz}$, 1H, H5'), 3.89(d, $J=11.2\text{Hz}$, 1H, H5'), 3.78(m, 2H, H3''), 3.71(q, $J=5.0\text{Hz}$, 1H, H2''), 3.51-3.40(m, 2H, H1''), 3.41(tt, $J=5.5, 2.7\text{Hz}$, 2H, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{15}-$), 1.54(p, $J=6.6\text{Hz}$, 2H, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{15}-$), 1.26(br s, 30H, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{15}-$), 0.89(t, 3H, $-\text{CH}_3$)。 ^{13}C NMR(101MHz, $\text{CD}_3\text{OD}+\text{CDCl}_3$) δ 156.64(C6), 147.68(C2), 141.50($-\text{CH}_2$ -芳基-C1), 132.77($-\text{CH}_2$ -芳基-C2), 131.73($-\text{CH}_2$ -芳基-C4), 131.57($-\text{CH}_2$ -芳基-C6), 129.88($-\text{CH}_2$ -芳基-C5), 125.25(C7), 119.50(C5), 117.41($-\text{CN}$), 112.62($-\text{CN}'$), 111.98(C8), 102.47(C9), 84.91(C4'), 80.07(C1'), 75.57(C2''), 72.40($-\text{CH}_2$ -芳基), 71.58($-\text{OCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{14}-$), 71.44(C1''), 71.23(C3'), 65.73(C3''), 65.21(C5'), 32.67($-\text{OCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{14}-$), 31.02-29.33(m, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{14}-$), 26.85($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 23.37($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 14.39($-\text{CH}_3$)。 HRMS(ESI) m/z $[\text{M}-\text{H}]^-$ $\text{C}_{41}\text{H}_{60}\text{N}_6\text{O}_9\text{P}$ 的计算值为811.4165, 实测值为811.4178。HPLC纯度为98.6%。

[0589] 实例13c.1-0-十八烷基-2-0-(2-氰基苄基)-sn-甘油基-磷酸基-RVn(OD(2-CN-Bn)G-P-RVn)的合成



[0591] 将氢化钠(60mg, 2.5mmol)加入到在无水THF(30mL)中的(R)-1-(十八烷氧基)-3-(三苯甲基)丙烷-2-醇(587mg, 1.0mmol)与四丁基碘化铵(180mg, 0.5mmol)的冷却(0℃)溶液中。将混合物剧烈搅拌20分钟后,加入2-(溴甲基)苯甲腈(455mg, 2.5mmol),然后将溶液回温至环境温度过夜。然后用冰(25mL)猝灭反应,用乙醚(75mL)进行稀释,用 H_2O 洗涤($2 \times 25\text{mL}$)并用无水 MgSO_4 干燥。将残余物吸附到硅胶上,并通过快速柱色谱进行纯化(梯度:0%至50%在己烷中的 EtOAc),以得到(R)-2-(((1-(十八烷氧基)-3-(三苯甲基)丙烷-2-基)氧基)甲基)苯甲腈(580mg, 83%),为白色固体。MS(ESI) m/z $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 724.62。

[0592] 向在1:1 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (15mL)中的(R)-2-(((1-(十八烷氧基)-3-(三苯甲基)丙烷-2-基)氧基)甲基)苯甲腈(580mg, 0.83mmol)溶液中加入对甲苯磺酸一水合物(8mg, 0.04mmol),并在室温下搅拌混合物直至根据TLC分析确定脱保护完成(约3小时)。加入饱和

aq NaHCO_3 (200mg), 将溶剂在真空下蒸发。将残余物吸附到硅胶上, 并通过快速柱色谱进行纯化(梯度: 0%至10%在己烷中的EtOAc), 以得到化合物(S)-2-(((1-羟基-3-(十八烷氧基)丙烷-2-基)氧基)甲基)苯甲腈, 为透明油(380mg, 97%)。MS (ESI) m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ 460.57, $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 482.52。

[0593] 将(S)-2-(((1-羟基-3-(十八烷氧基)丙烷-2-基)氧基)甲基)苯甲腈(360mg, 0.78mmol)与三乙胺(340mg, 3.0mmol)的溶液加入到在 CH_2Cl_2 (5mL)中的 POCl_3 (140mg, 2.0mmol)冷却(0℃)溶液中, 并搅拌3小时。将混合物加入冰水中, 搅拌1小时, 然后用 CH_2Cl_2 进行提取。蒸发有机相, 得到磷酸酯(R)-2-((2-氰基苄基)氧基)-3-(十八烷氧基)丙基磷酸二氢酯(850mg), 其无需进一步纯化即可使用。MS (ESI) m/z $[\text{M}-\text{H}]^-$ 538.46。

[0594] 使用在无水吡啶(15mL)中的DIC(210mg, 1.7mmol)、NMI(140mg, 1.7mmol)将所述磷酸酯(460mg, 0.85mmol)与RVn(GS-441524)-丙酮化合物(280mg, 0.85mmol)偶联。在35℃下反应23小时, 随后通过色谱纯化得到((3aR, 4R, 6R, 6aR)-6-(4-氨基吡咯并[2,1-f][1,2,4]三嗪-7-基)-6-氰基-2,2-二甲基四氢呋喃并[3,4-d][1,3]二噁吩-4-基)甲基((R)-2-((2-氰基苄基)氧基)-3-(十八烷氧基)丙基)磷酸氢酯(190mg, 22%)。MS (ESI) m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ 851.47。

[0595] 将偶联的丙酮化合物(190mg, 0.22mmol)加入甲酸(5mL)中并搅拌3小时。将甲酸蒸发, 并通过快速柱色谱纯化残余物得到((2R, 3S, 4R, 5R)-5-(4-氨基吡咯并[2,1-f][1,2,4]三嗪-7-基)-5-氰基-3,4-二羟基四氢呋喃-2-基)甲基((R)-2-((2-氰基苄基)氧基)-3-(十八烷氧基)丙基)磷酸氢酯, 为灰白色固体(120mg, 67%)。 ^1H NMR (400MHz, $\text{CD}_3\text{OD}+\text{CDCl}_3$) δ 7.73 (s, 1H, H2), 7.65 (d, $J=7.6$, Hz, 2H, $-\text{CH}_2$ -芳基-H3+H5), 7.59 (td, $J=7.6$, 1.3Hz, 1H, H4), 7.39 (td, $J=7.6$, 1.3Hz, 1H, H6), 6.97 (d, $J=4.6$ Hz, 1H, H9), 6.86 (d, $J=4.5$ Hz, 1H, H8), 4.81 (d, $J=5.7$ Hz, 1H, H2'), 4.38 (q, $J=4.2$ Hz, 1H, H4'), 4.28 (t, $J=5.3$ Hz, 1H, H3'), 4.19-3.84 (m, 2H, H5'), 3.93 (tp, $J=10.7$, 4.7Hz, 2H, H3''), 3.85-3.70 (m, 1H, H2''), 3.54 (qd, $J=10.6$, 5.0Hz, 2H, H1''), 3.41 (td, $J=6.6$, 2.7Hz, 2H, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{15}-$), 1.52 (p, $J=6.6$ Hz, 2H, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{15}-$), 1.26 (m, $J=7.2$ Hz, 30H, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{15}-$), 0.89 (t, 3H, $-\text{CH}_3$)。 ^{13}C NMR (101MHz, $\text{CD}_3\text{OD}+\text{CDCl}_3$) δ 156.53 (C6), 147.49 (C2), 142.96 ($-\text{CH}_2$ -芳基-C1), 133.62, ($-\text{CH}_2$ -芳基-C3), 133.23, ($-\text{CH}_2$ -芳基-C6), 129.66, ($-\text{CH}_2$ -芳基-C5), 128.68, ($-\text{CH}_2$ -芳基-C4), 125.15, (C7), 117.85, (C5), 117.26, ($-\text{CN}$), 111.84, ($-\text{CN}'$), 111.58, (C8), 102.35, (C9), 84.75, (C4'), 79.89 (C1'), 78.99 (C2'), 75.45 (C2''), 72.21 ($-\text{CH}_2$ -芳基), 71.30 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{14}-$), 71.09 (C1''), 70.45 (C3'), 65.73 (C3''), 65.03 (C5'), 32.51 ($-\text{OCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{14}-$), 31.09-29.39 (m, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{14}-$), 26.67, ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 23.21 ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 14.19 ($-\text{CH}_3$)。HRMS (ESI) m/z $[\text{M}-\text{H}]^-$ $\text{C}_{41}\text{H}_{62}\text{N}_6\text{O}_9\text{P}$ 的计算值为813.4310, 实测值为8813.4302。HPLC纯度为99.4%。

[0596] 实例13d. 氰基苄基类似物的抗病毒评价

[0597]

化合物	Calu 3				Huh7.5			
	EC ₅₀ (μ M)	EC ₉₀ (μ M)	CC ₅₀ (μ M)	SI	EC ₅₀ (μ M)	EC ₉₀ (μ M)	CC ₅₀ (μ M)	SI
OD(4-CN-Bn) G-P-RVn	0.043 $\pm$ 0.013	0.082 $\pm$ 0.022	60.20	1400	0.024 $\pm$ 0.002	0.070 $\pm$ 0.010	47.2	1966
OD(3-CN-Bn) G-P-RVn	0.034 $\pm$ 0.007	0.065 $\pm$ 0.036	61.55	1810	0.024 $\pm$ 0.006	0.077 $\pm$ 0.017	49.6	2066
OD(2-CN-Bn) G-P-RVn	0.091 $\pm$ 0.025	0.186 $\pm$ 0.047	*82.8	909	0.0102 $\pm$ 0.017	0.281 $\pm$ 0.030	>100	>980

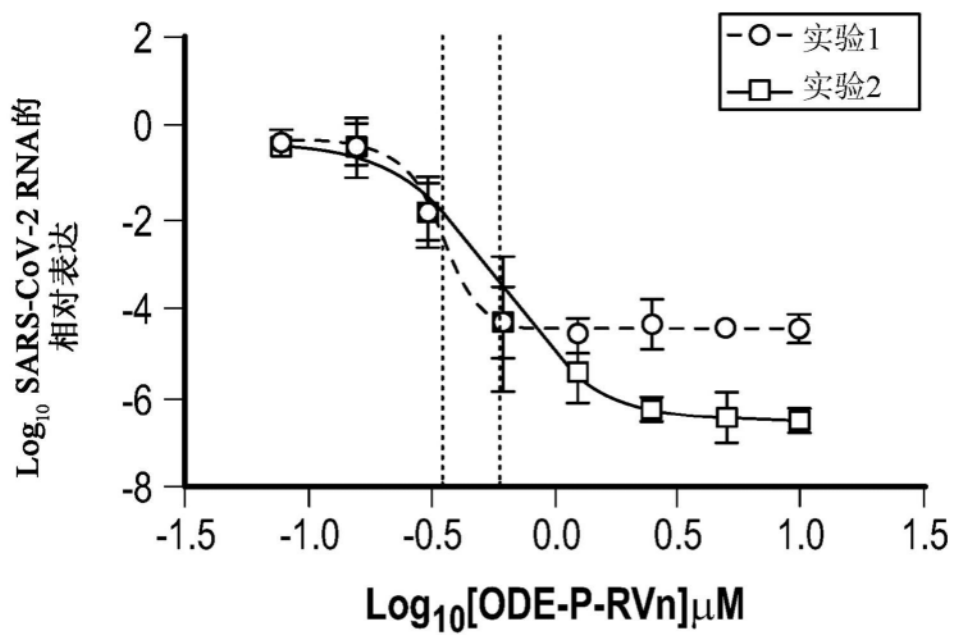


图1A

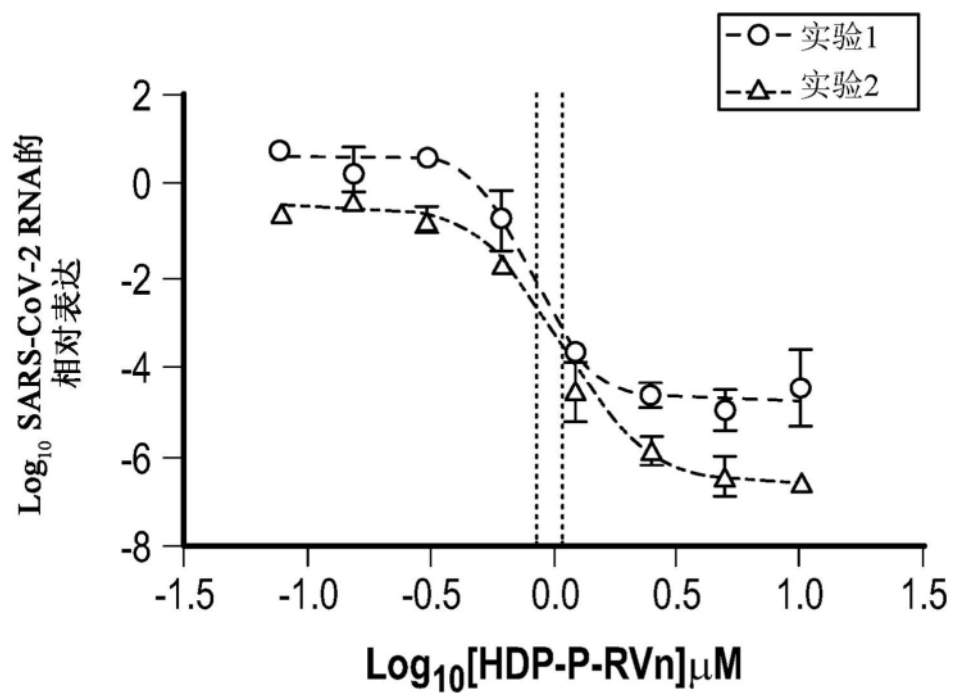


图1B

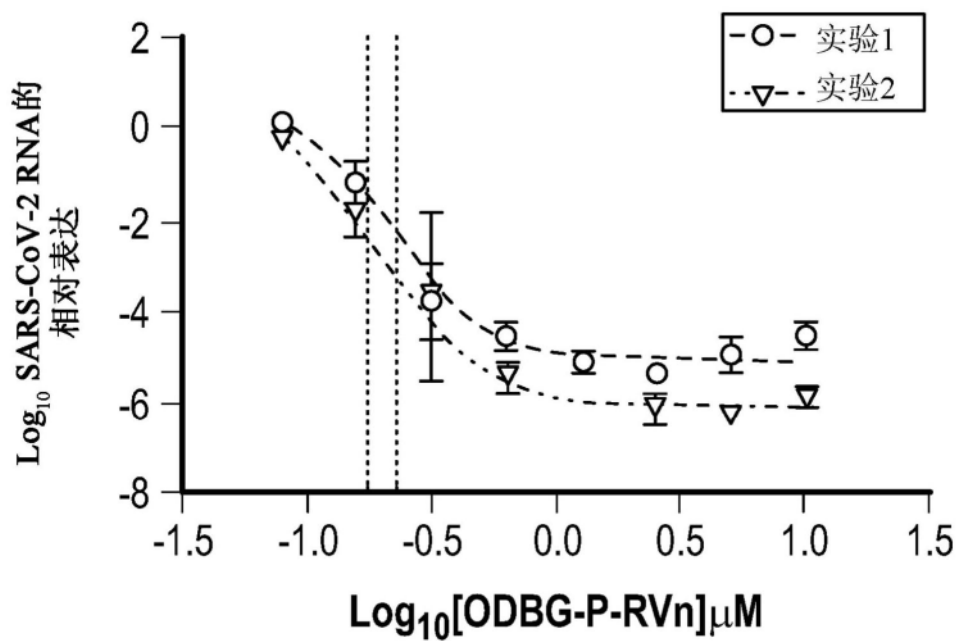


图1C

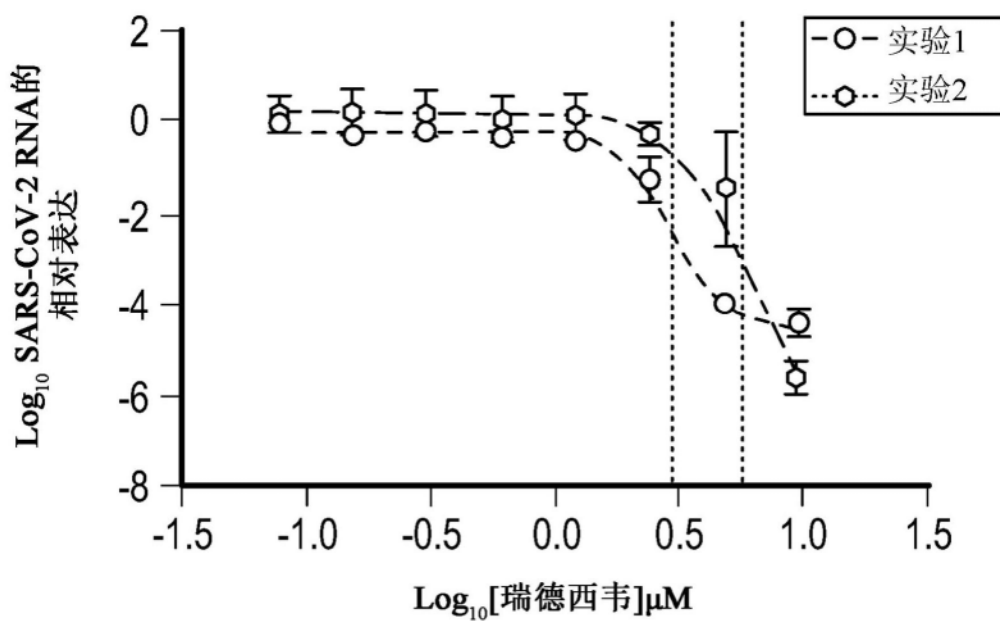


图1D

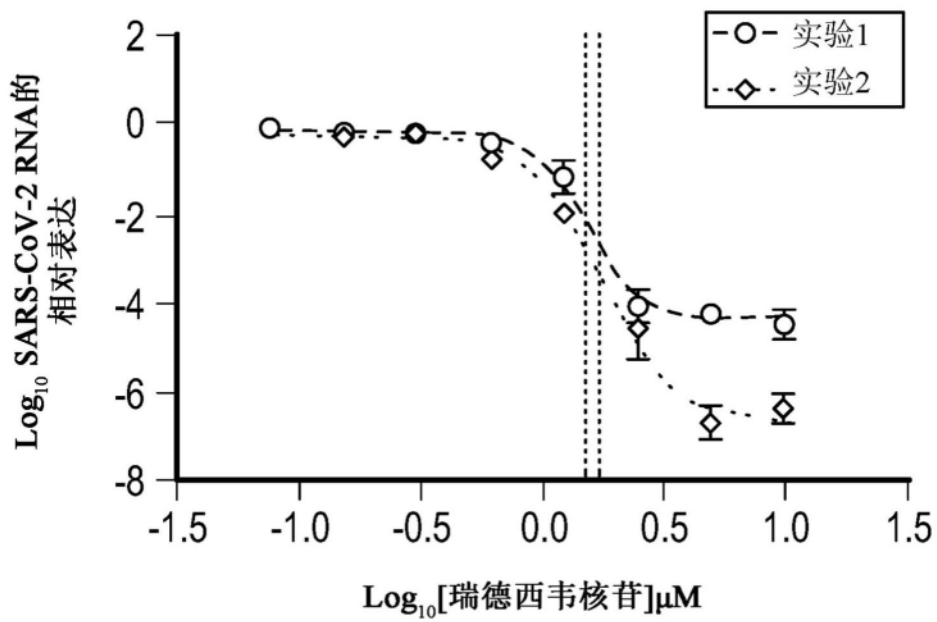


图1E

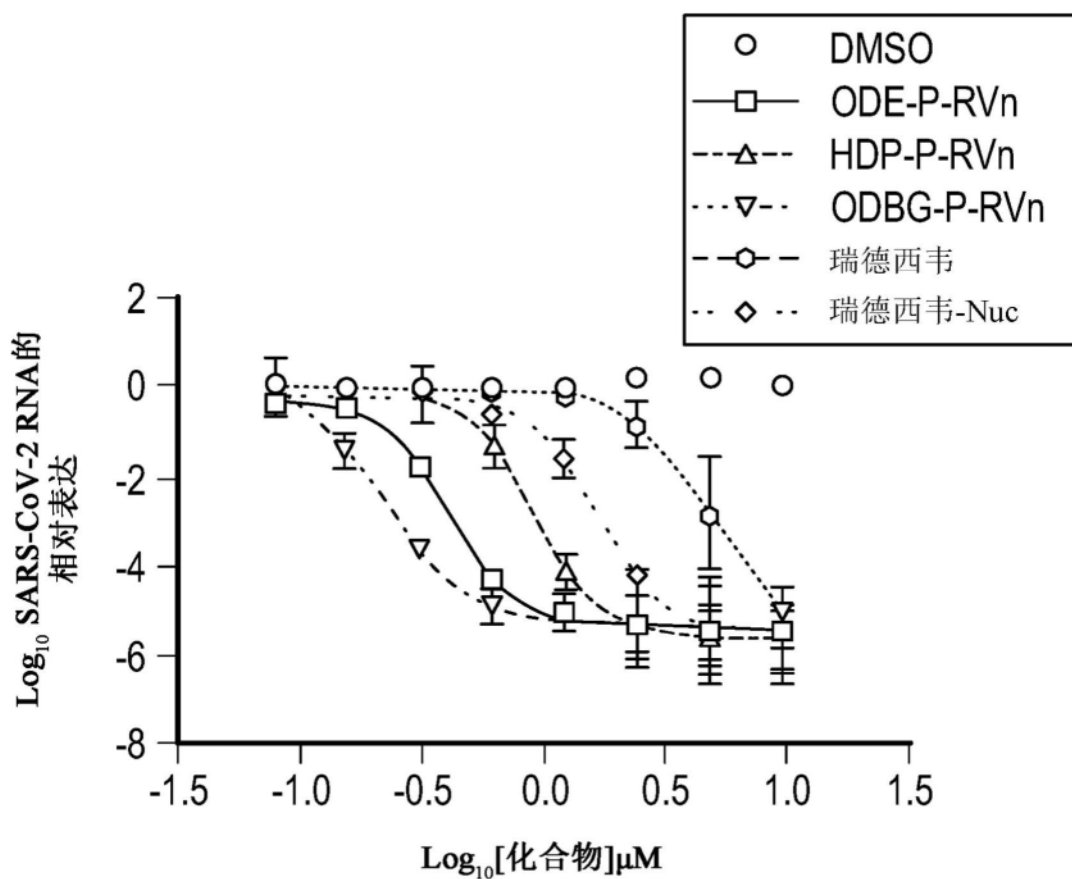


图1F

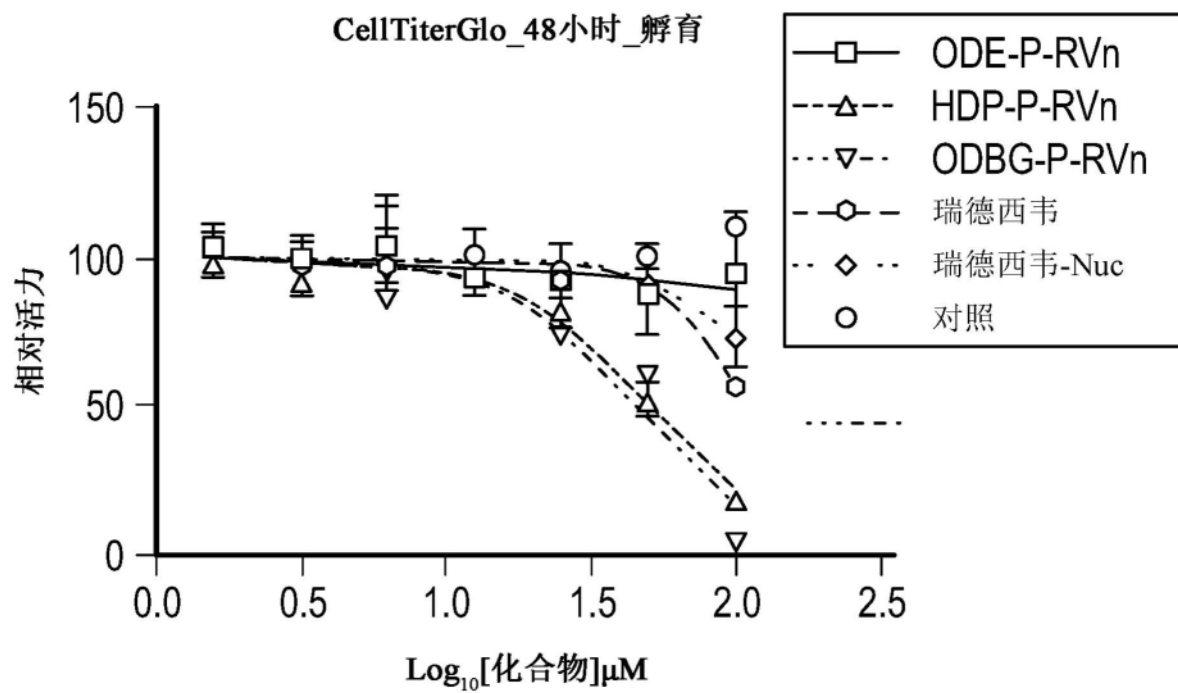


图2

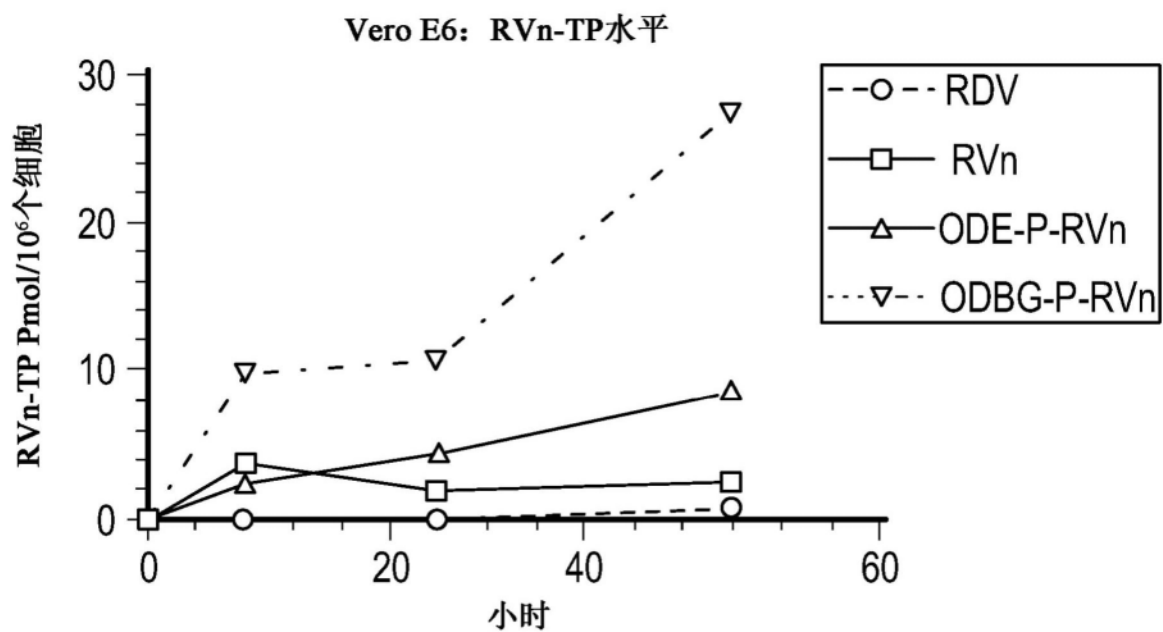


图3

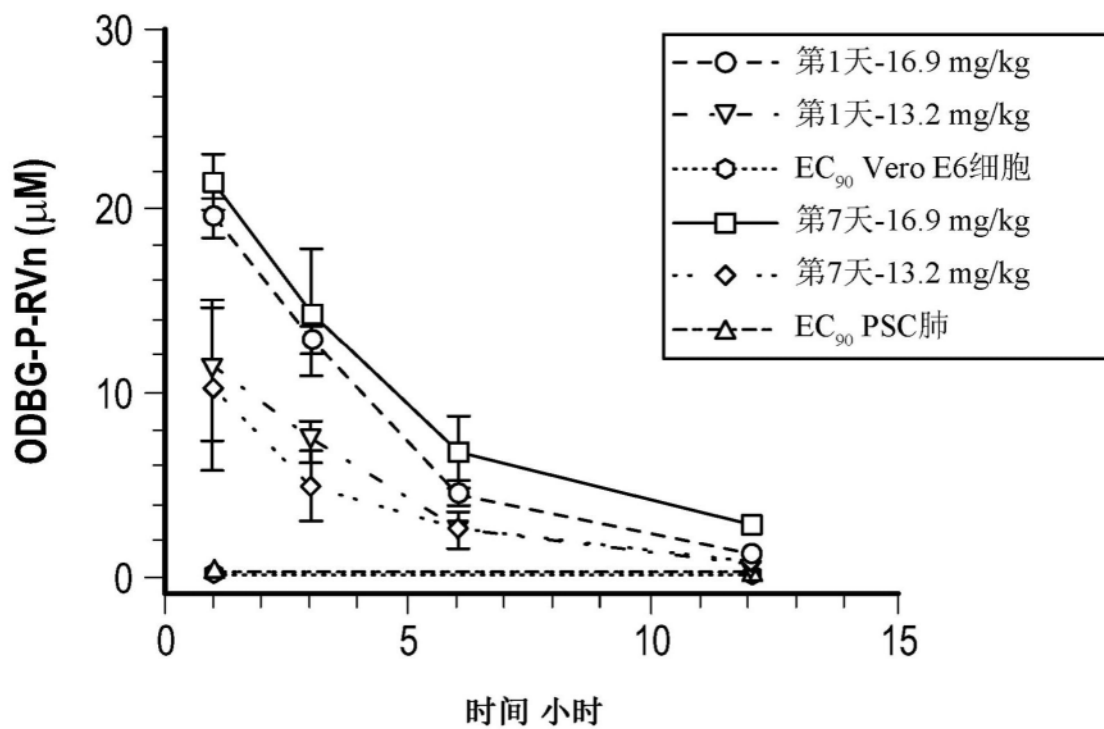


图4A

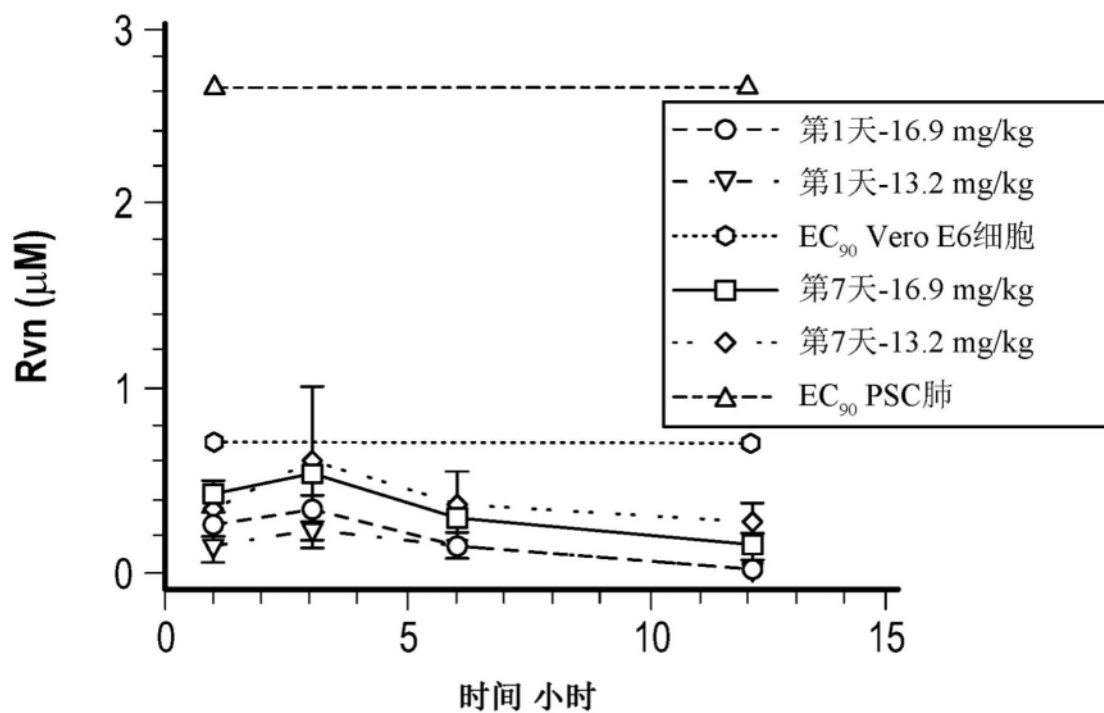


图4B

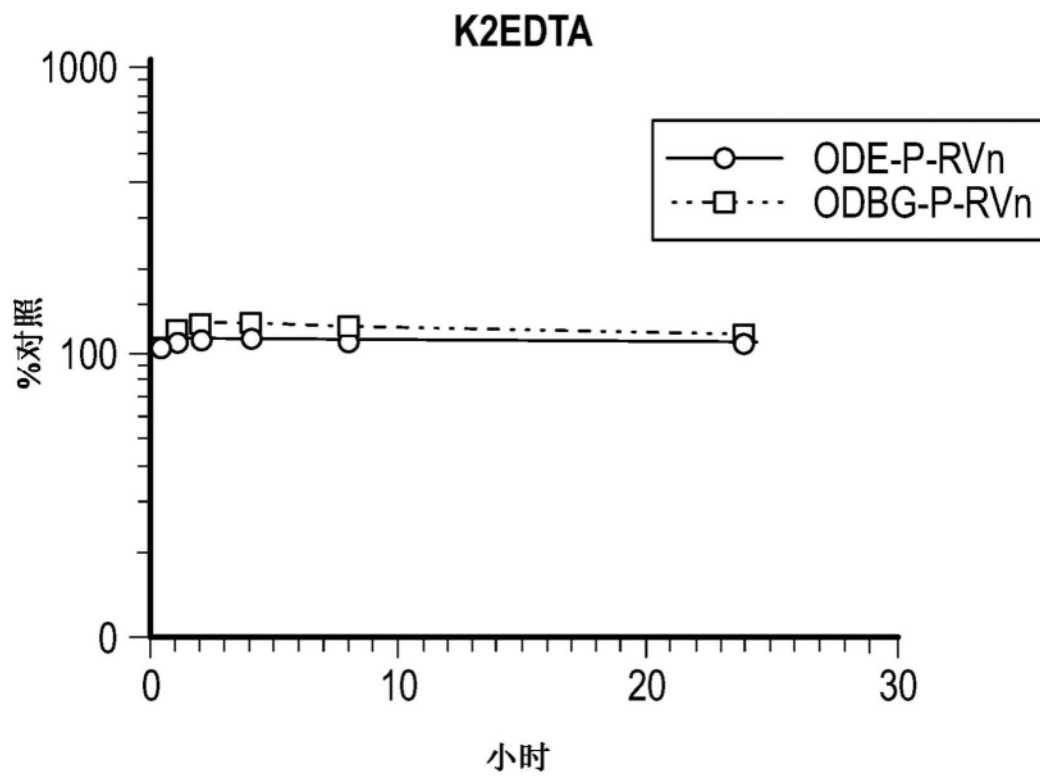


图5A

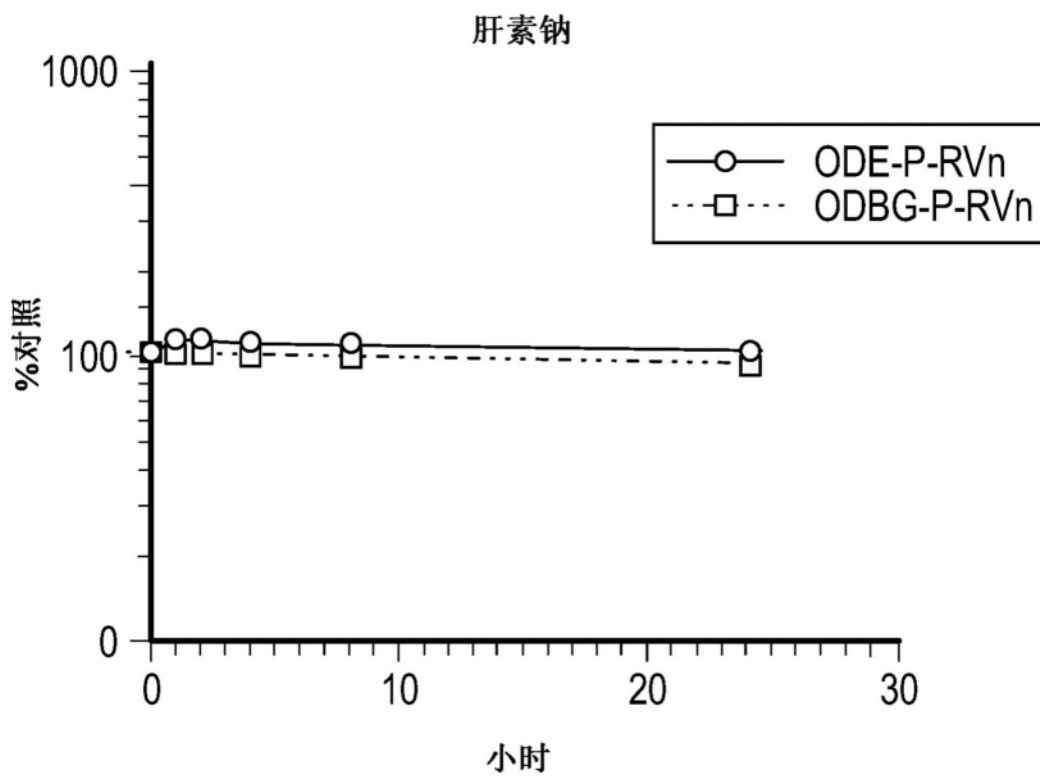


图5B

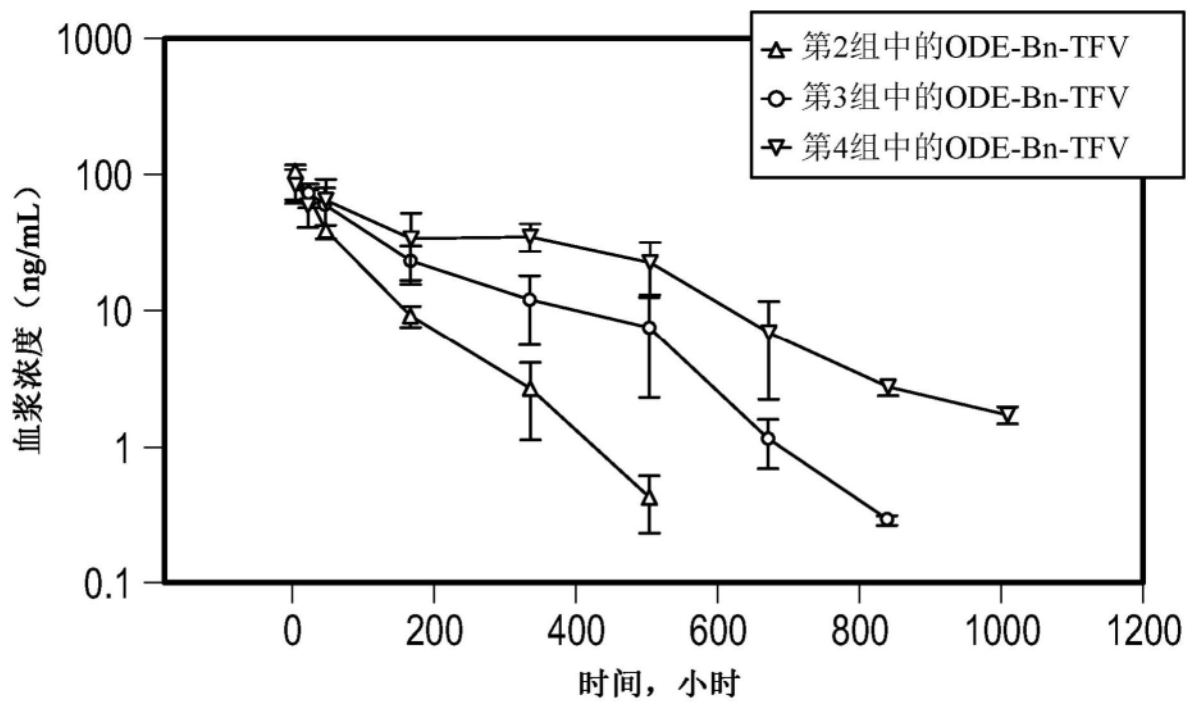


图6A

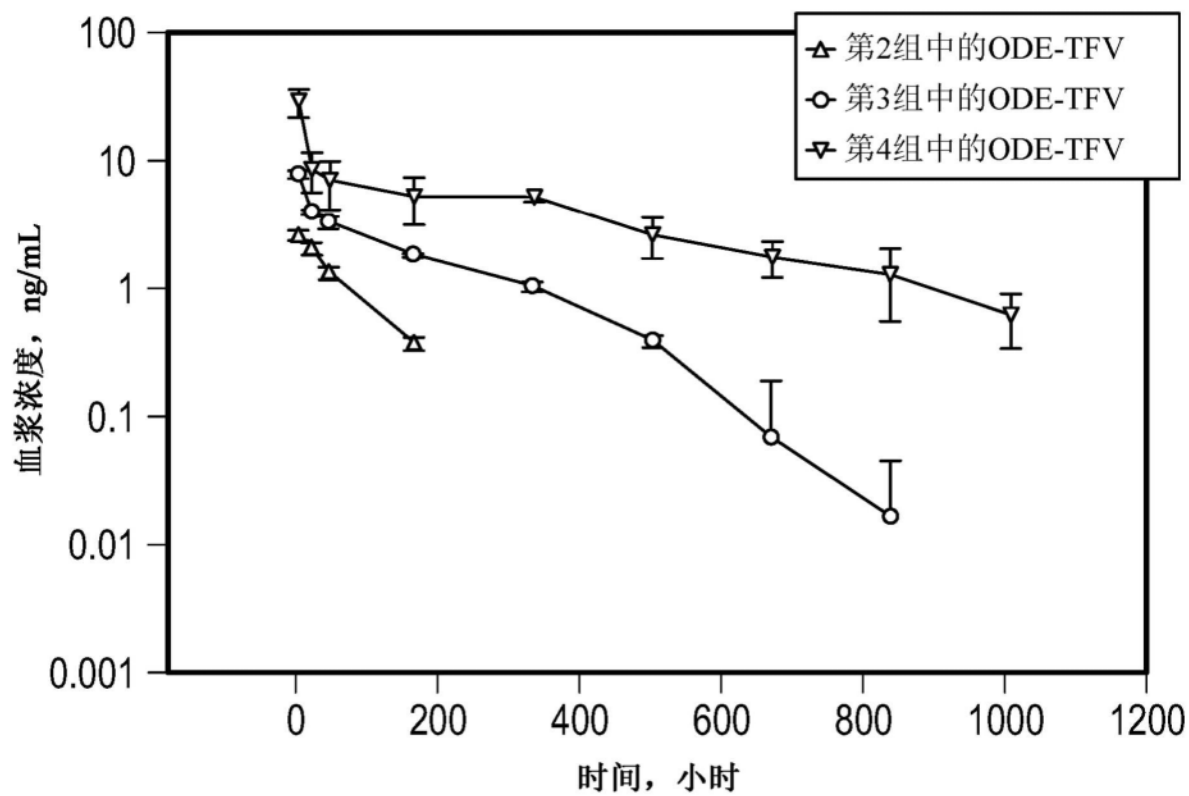


图6B

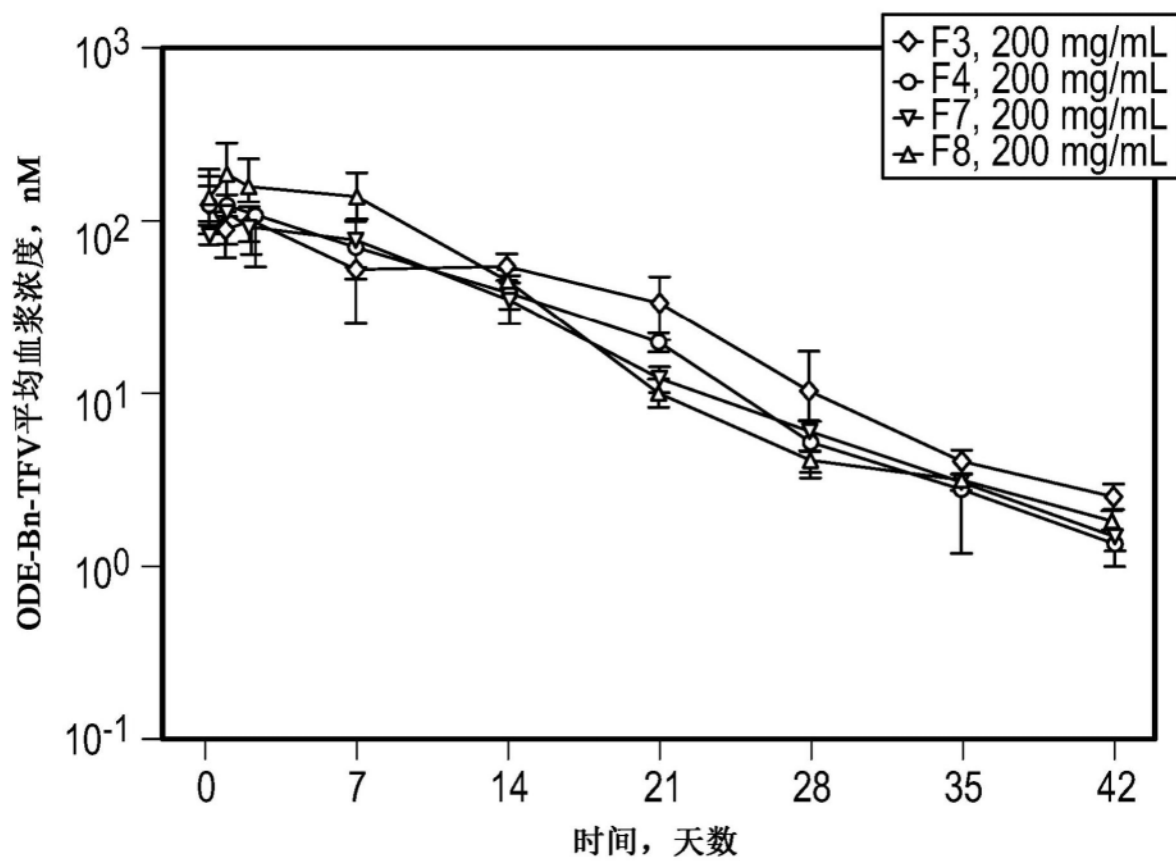


图7A

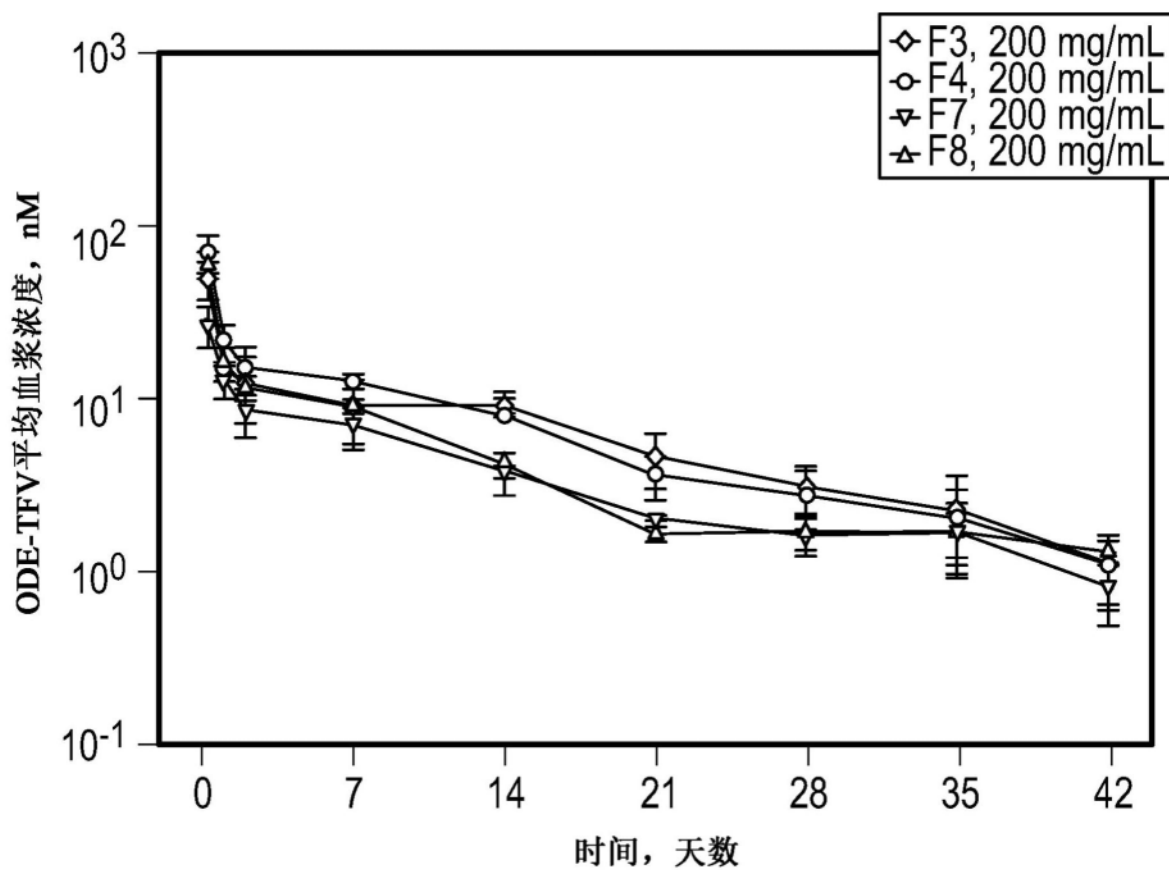


图7B

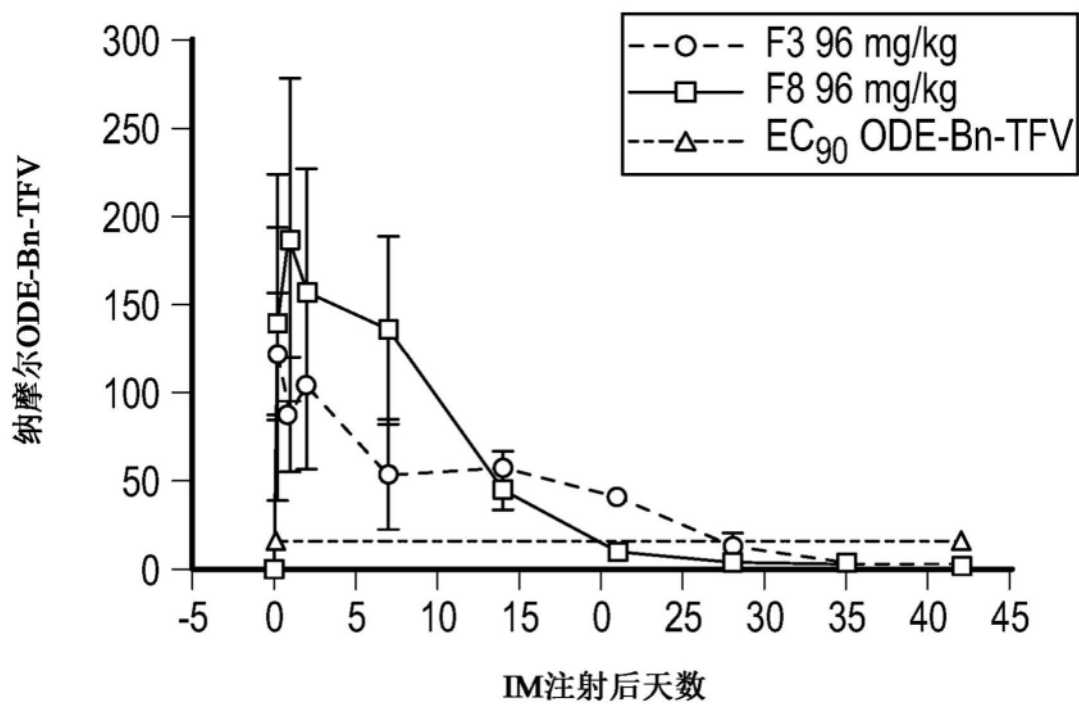


图8

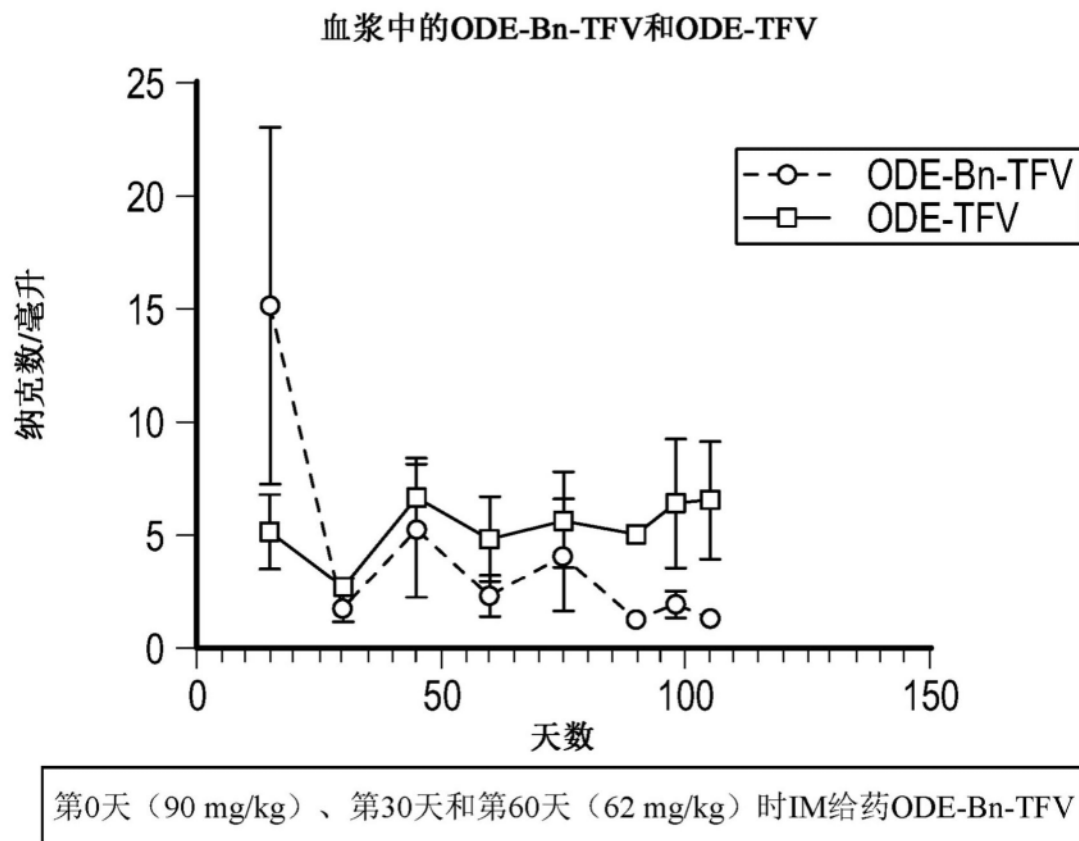


图9

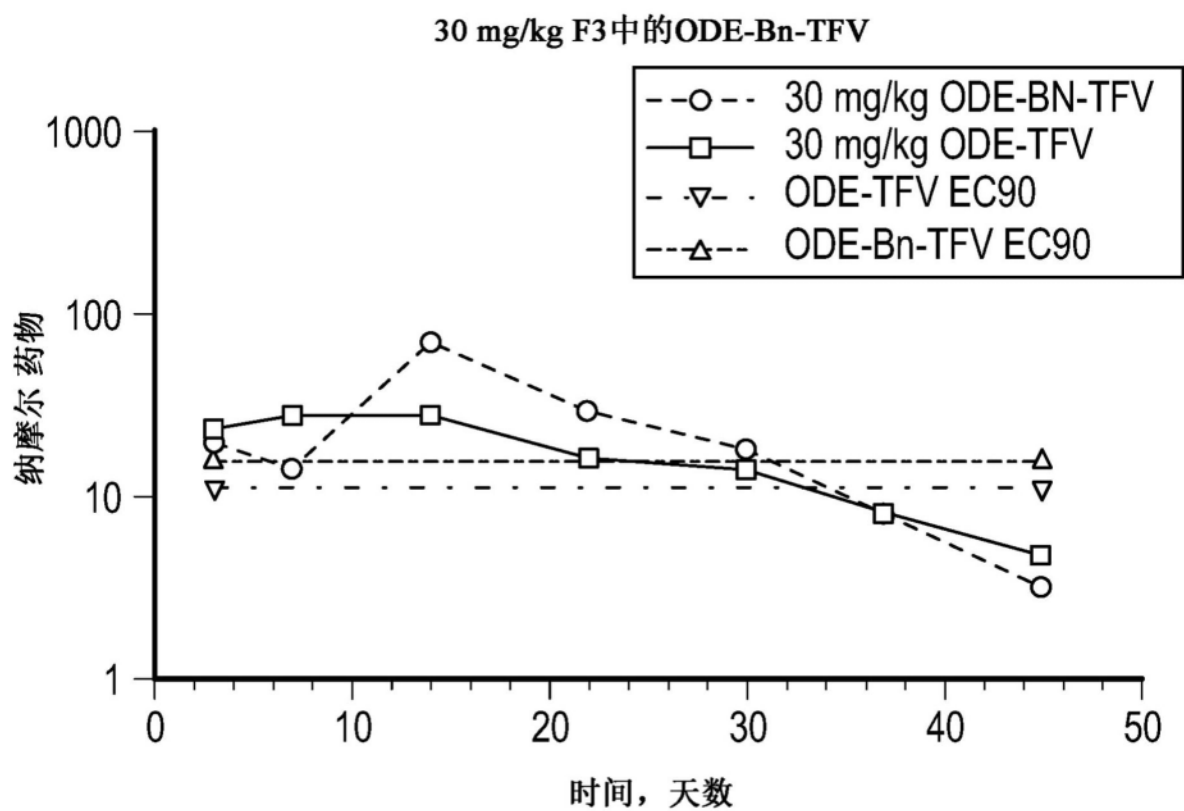


图10

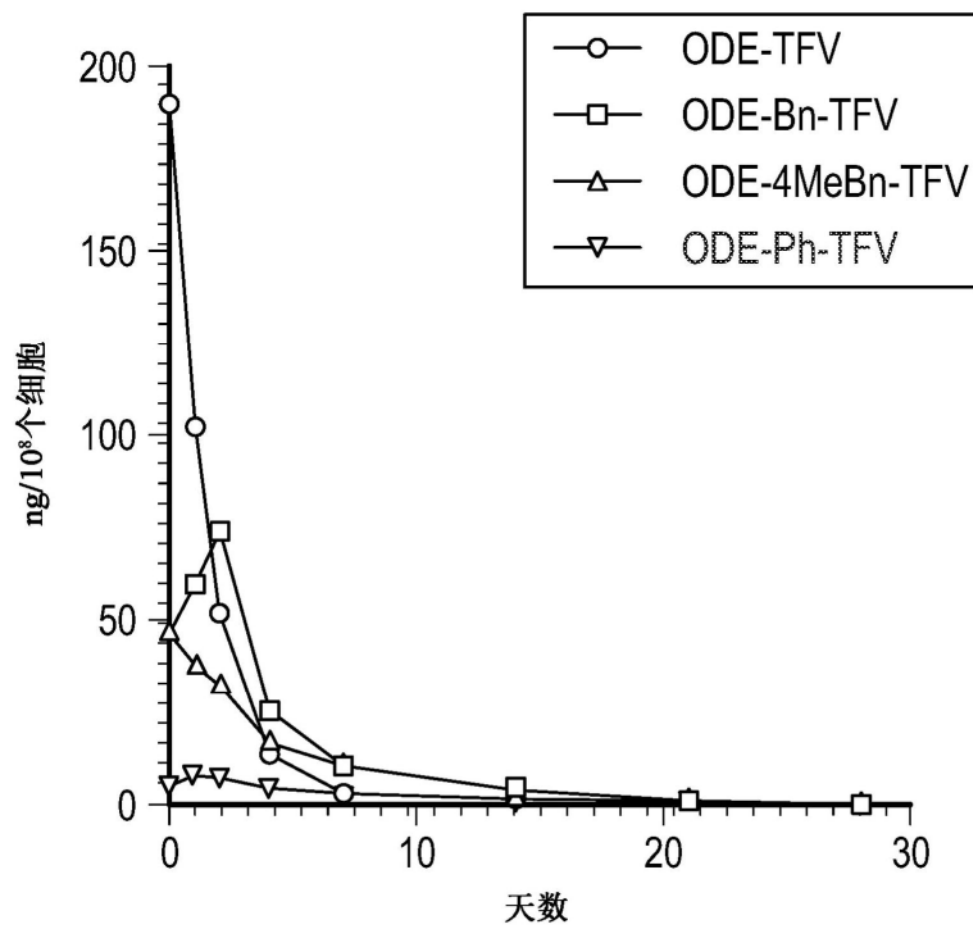


图11A

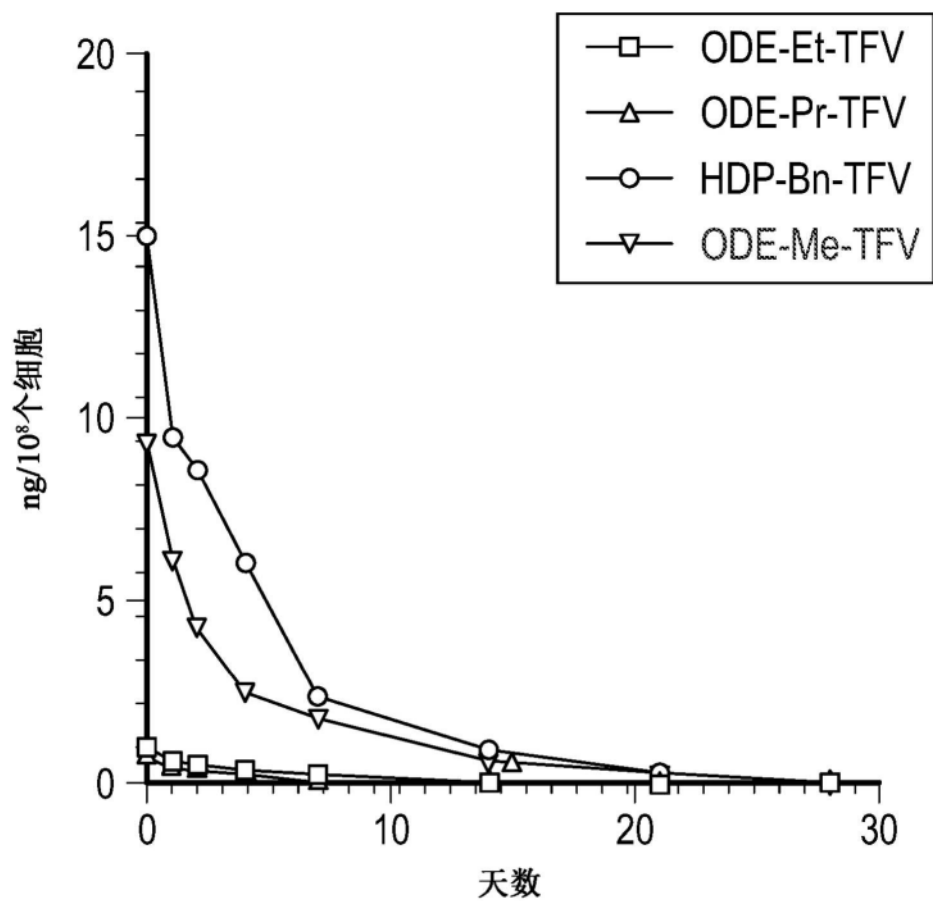


图11B

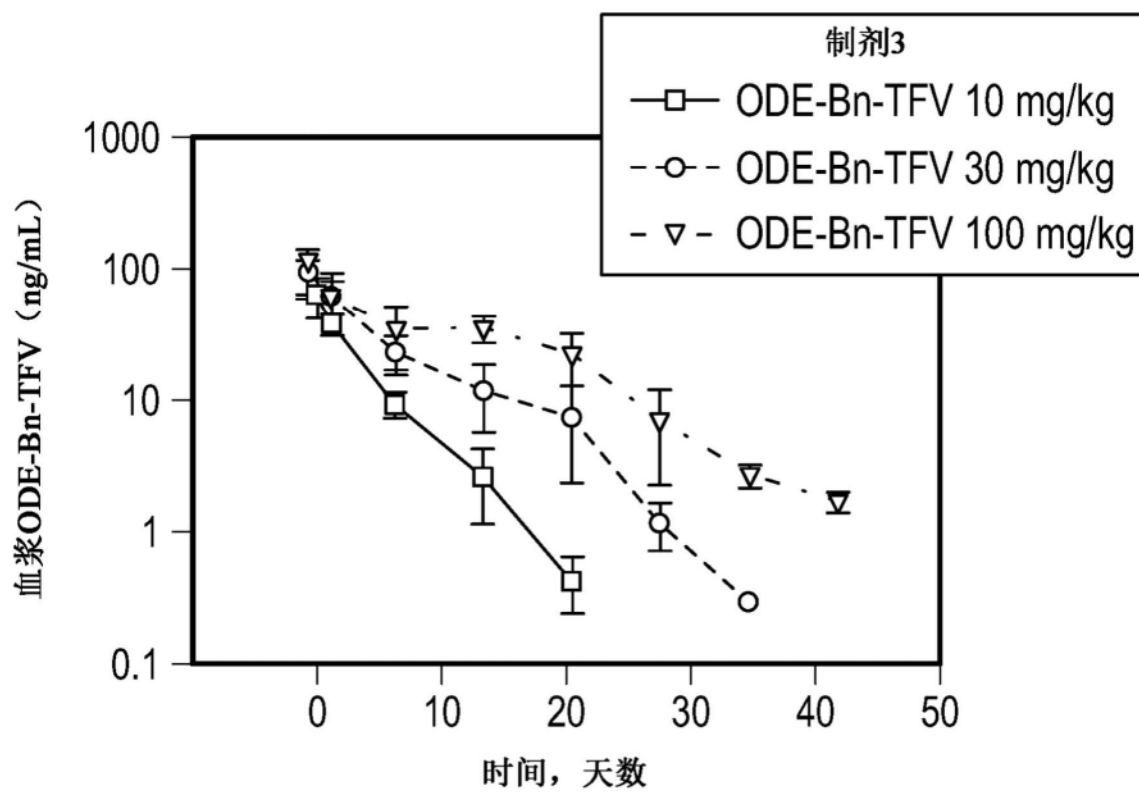


图12A

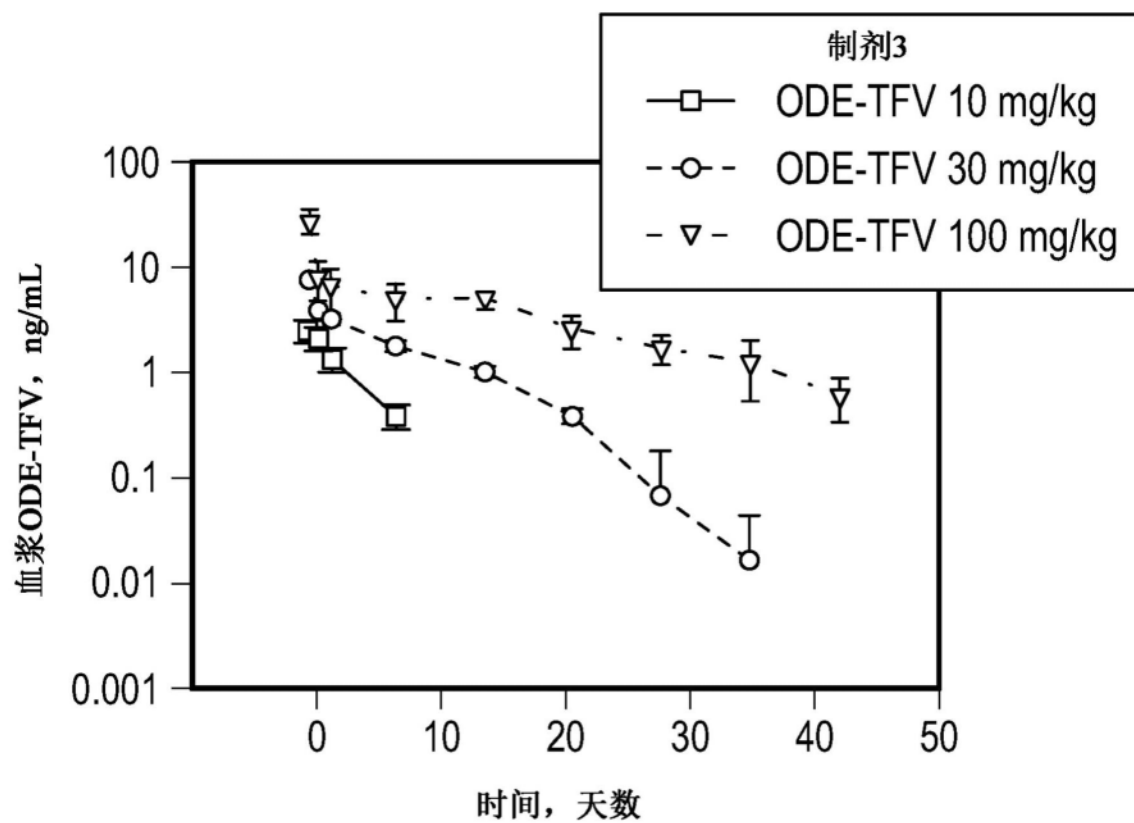


图12B

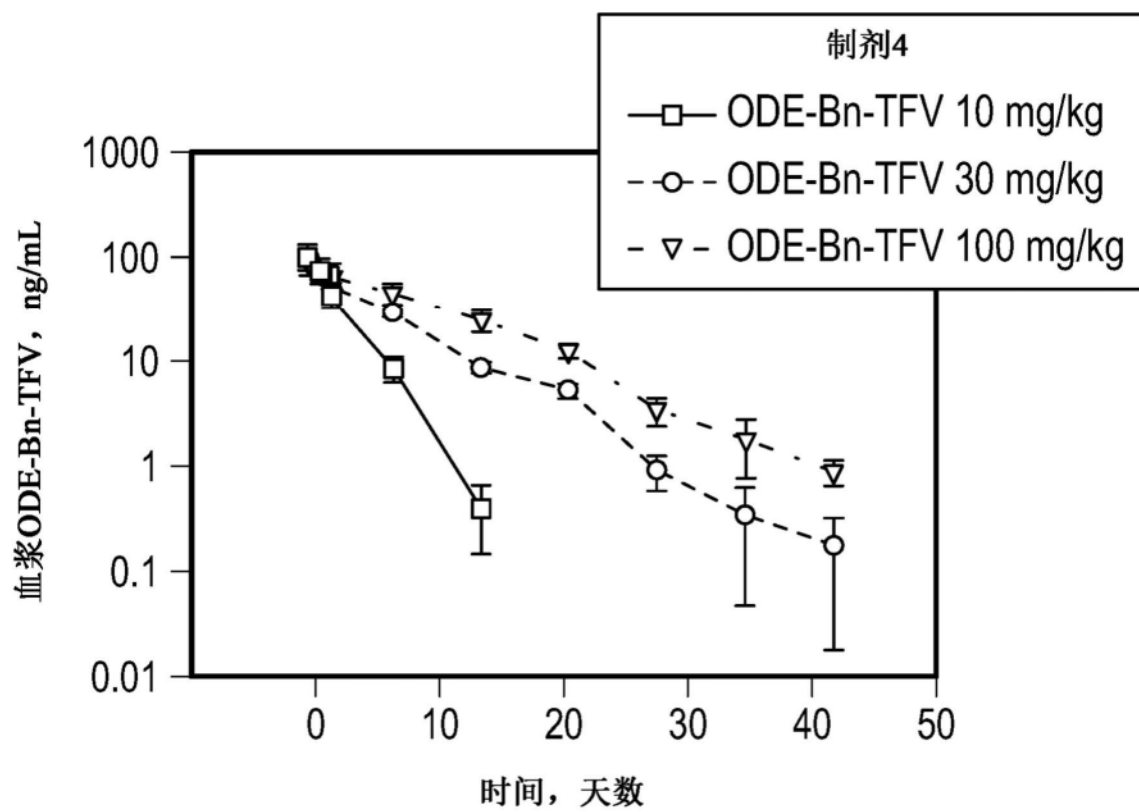


图12C

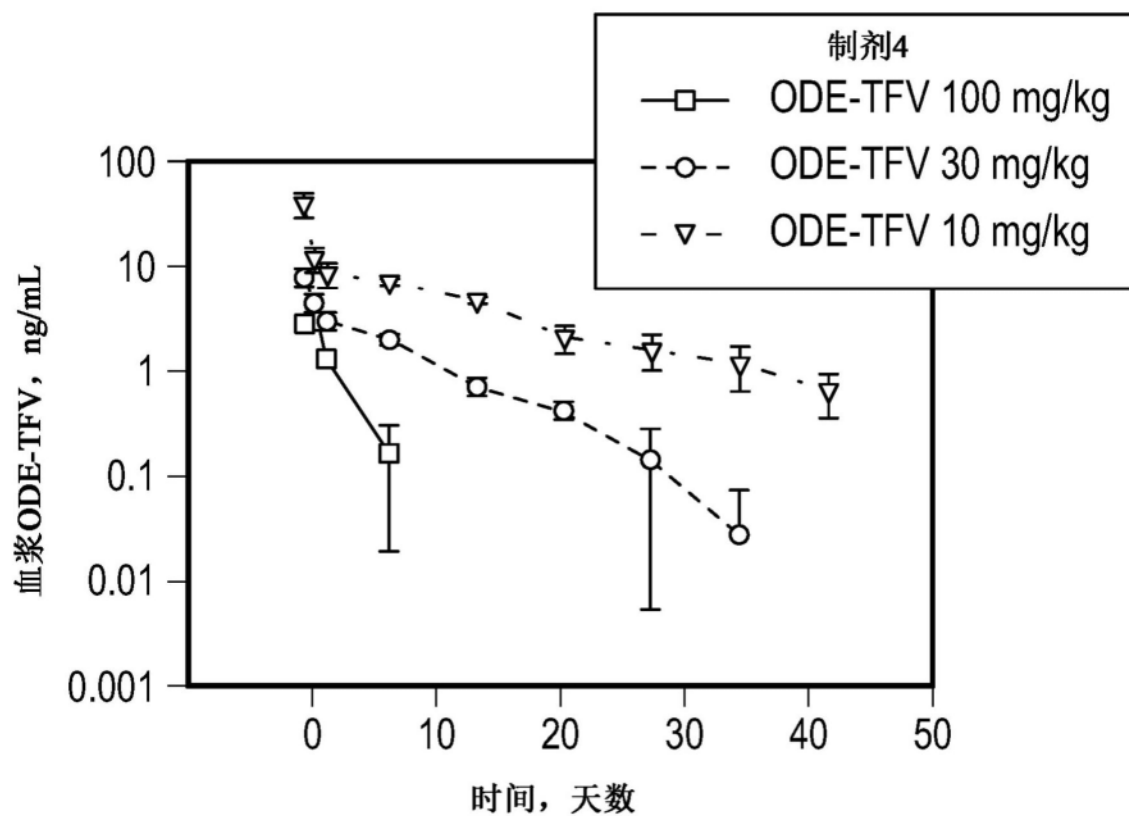


图12D

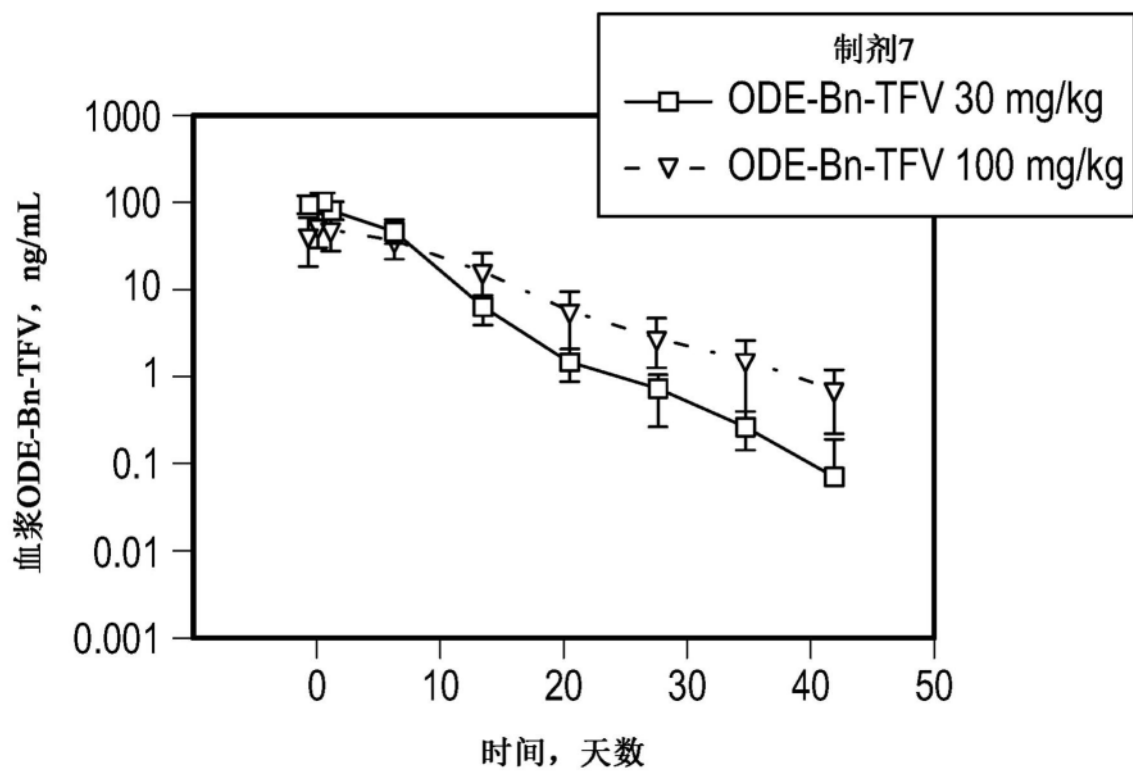


图12E

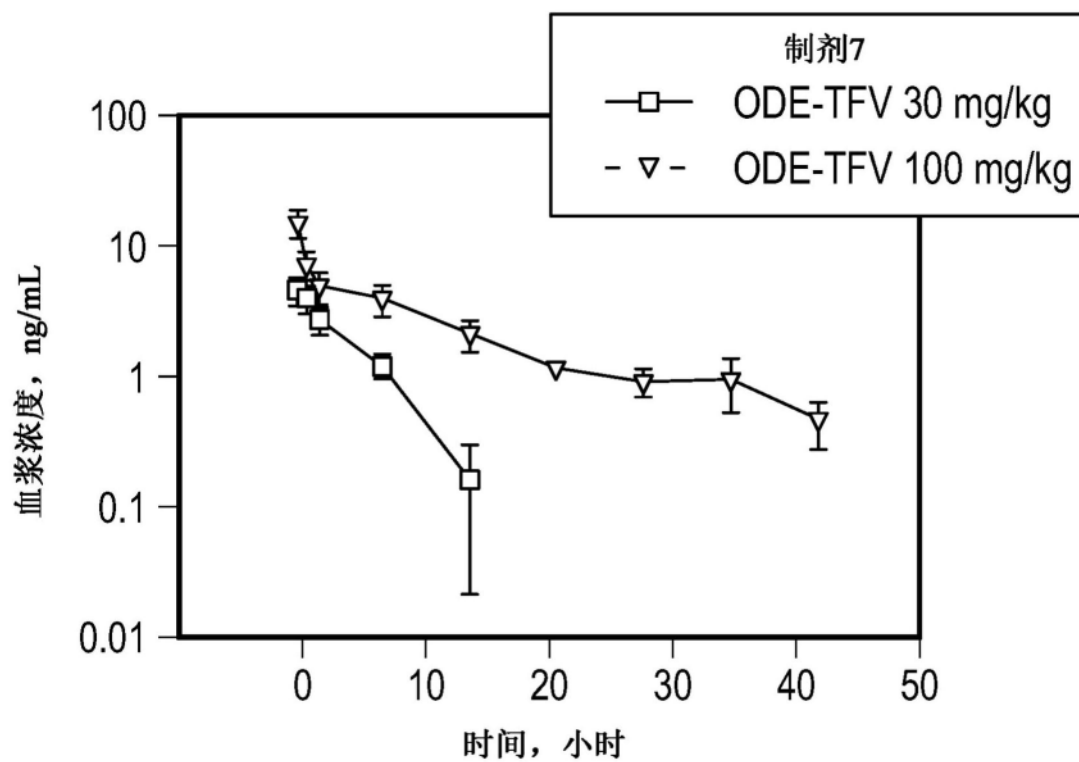


图12F

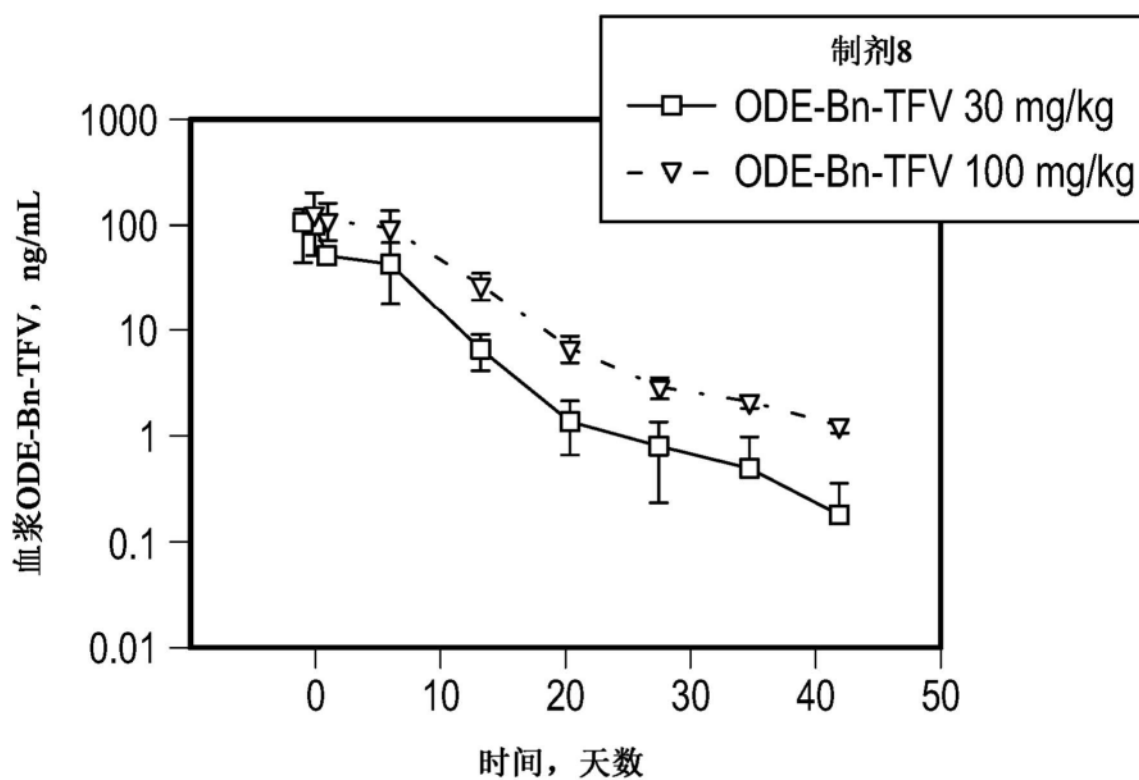


图12G

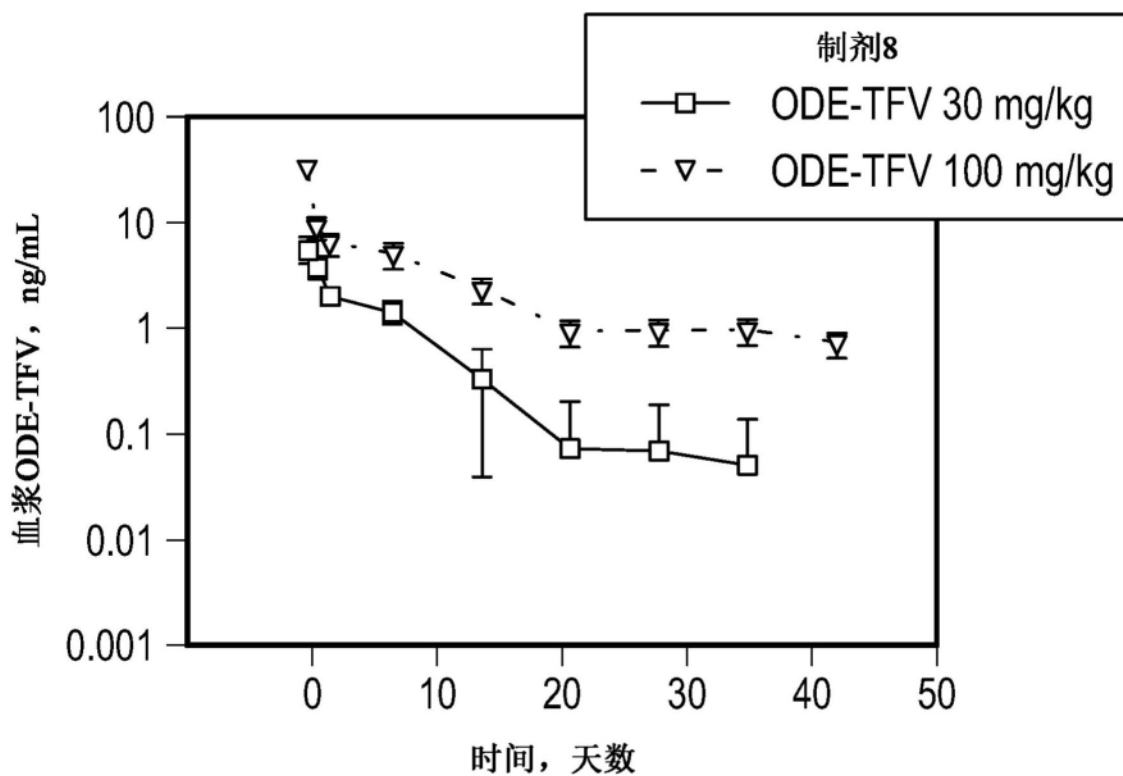


图12H

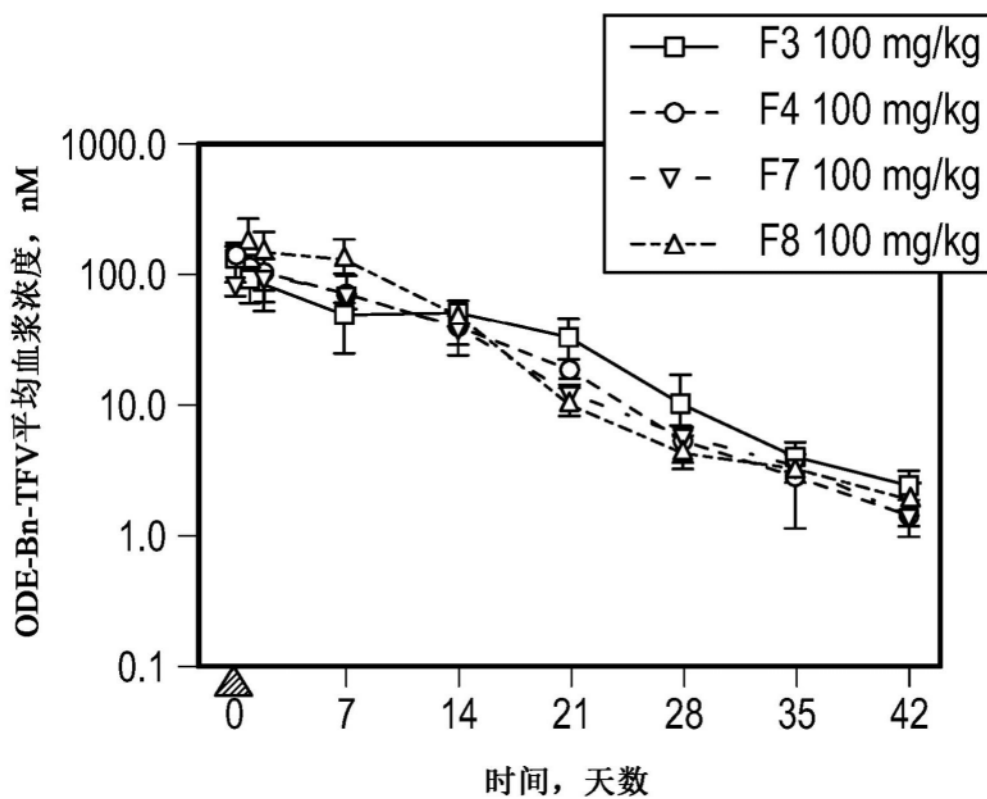


图12I

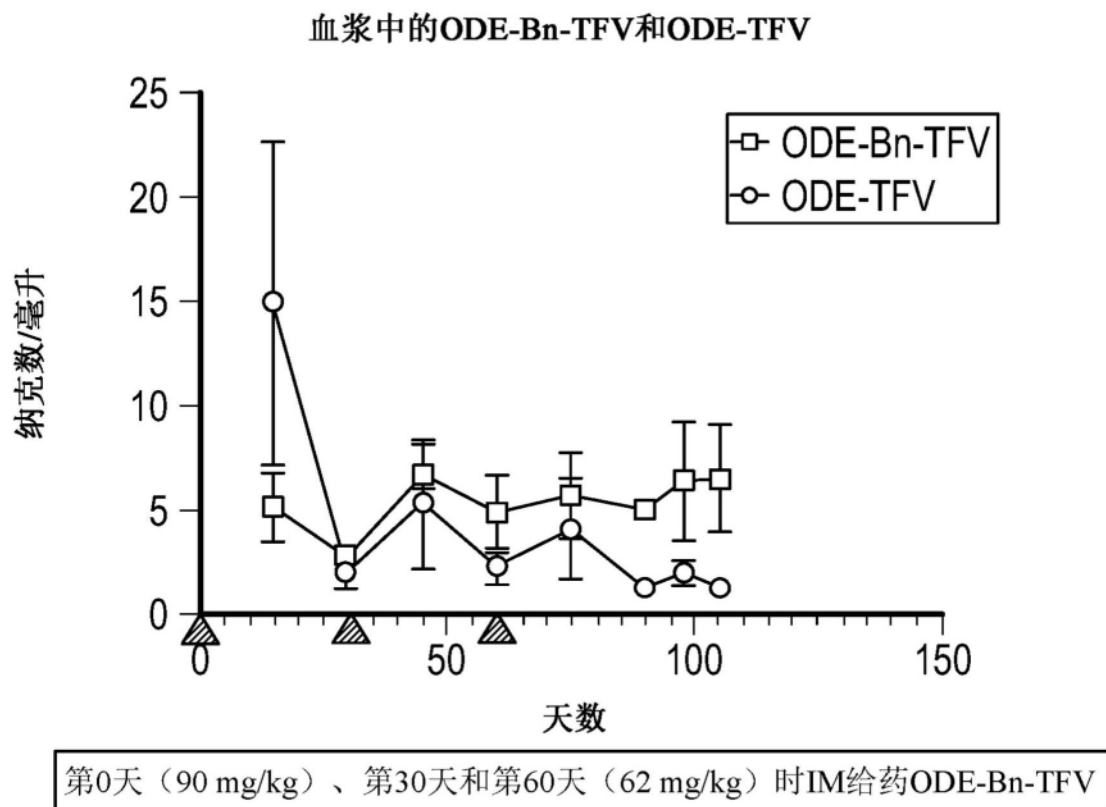


图13

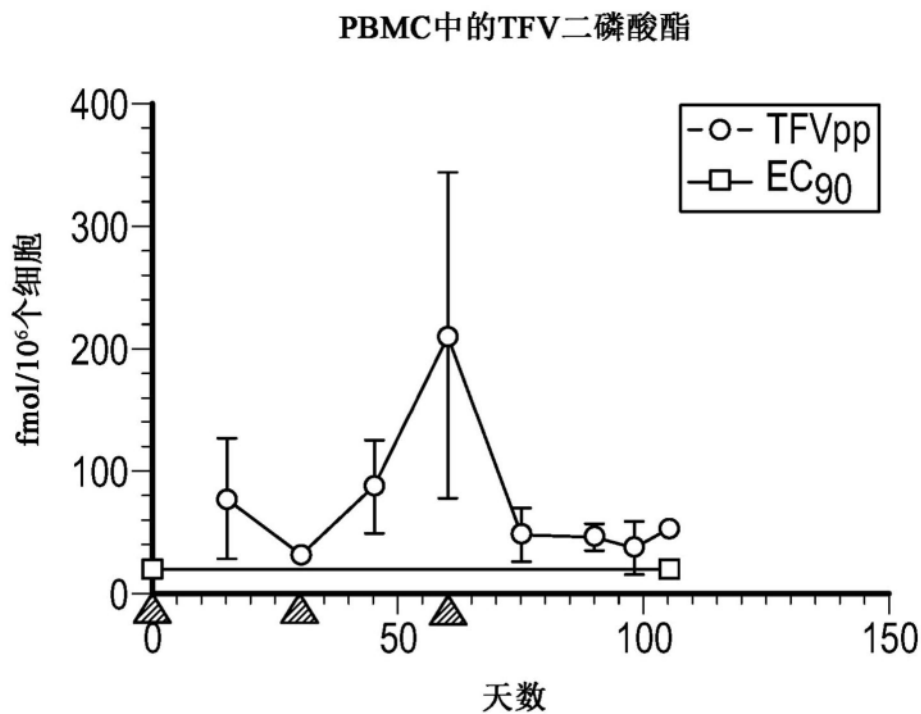


图14