



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101600726 B

(45) 授权公告日 2013. 03. 27

(21) 申请号 200880003104. 0

A61P 31/12(2006. 01)

(22) 申请日 2008. 02. 07

(56) 对比文件

(30) 优先权数据

07102027. 5 2007. 02. 09 EP

08150003. 5 2008. 01. 02 EP

W0 2004028481 A2, 2004. 04. 08, 第 89 至 91 页权利要求 1.

US 2004259934 A1, 2004. 12. 23, 第 12 页第 0179 段, 第 16 页权利要求 1, 第 10 页第 0160 段至第 0161 段.

(85) PCT 申请进入国家阶段日

2009. 07. 24

W0 03093290 A2, 2003. 11. 13, 第 157 页至

(86) PCT 申请的申请数据

PCT/EP2008/051527 2008. 02. 07

166 页权利要求 1.

(87) PCT 申请的公布数据

W02008/095993 EN 2008. 08. 14

W0 03068244 A1, 2003. 08. 21, 第 88 至 89 页权利要求 1.

审查员 李冰

(73) 专利权人 诺瓦提斯公司

地址 瑞士巴塞尔

(72) 发明人 尹正 J·杜赖斯瓦米 Y·L·陈

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所
11247

代理人 黄革生 林柏楠

(51) Int. Cl.

C07H 19/23(2006. 01)

A61K 31/7064(2006. 01)

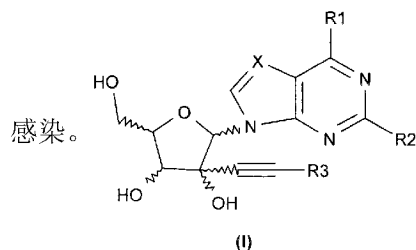
权利要求书 1 页 说明书 46 页

(54) 发明名称

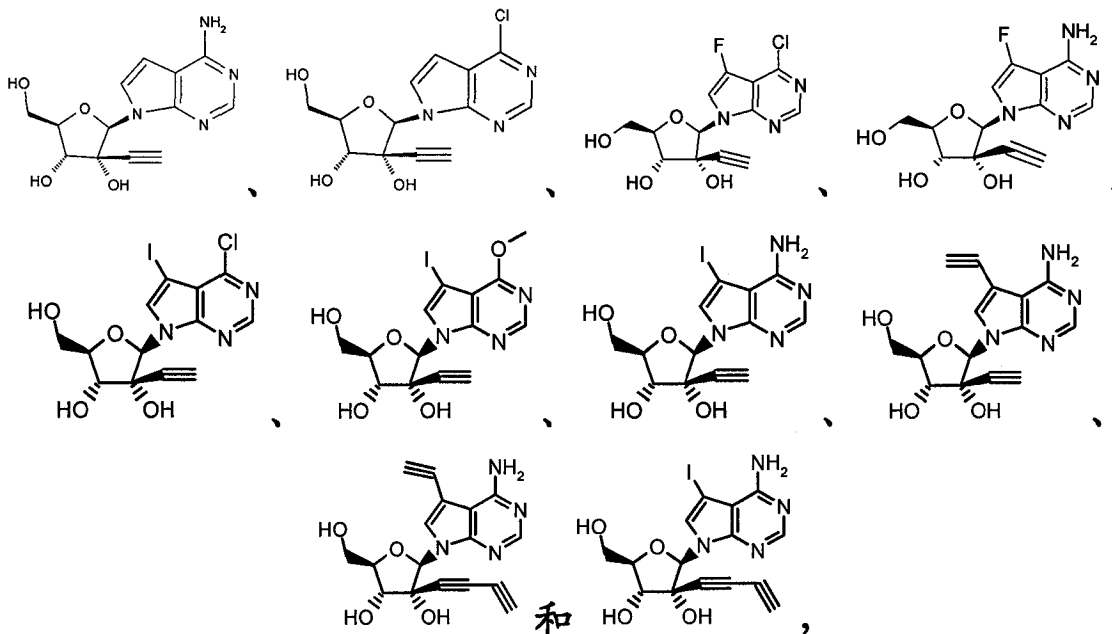
用于治疗病毒感染的核苷类似物

(57) 摘要

本发明涉及新的式 (I) 的核苷化合物, 其具有多种医药应用, 例如用于治疗 and / 或预防病毒



1. 化合物,其选自:



或其可药用盐。

2. (2R,3R,4R,5R)-2-(4-氨基-吡咯并[2,3-d]嘧啶-7-基)-3-乙炔基-5-羟基甲基-四氢呋喃-3,4-二醇或其可药用盐。

3. (2R,3R,4R,5R)-2-(4-氨基-5-乙炔基-吡咯并[2,3-d]嘧啶-7-基)-3-乙炔基-5-羟基甲基-四氢呋喃-3,4-二醇或其可药用盐,或者(2R,3R,4R,5R)-2-(4-氨基-5-氟-吡咯并[2,3-d]嘧啶-7-基)-3-乙炔基-5-羟基甲基-四氢呋喃-3,4-二醇或其可药用盐。

4. 药物组合物,该药物组合物包含权利要求1至3中任意一项要求的化合物或者其可药用盐,与可药用赋形剂或载体组合。

5. 权利要求1至3中任意一项要求的化合物或者其可药用盐在制备用于治疗 and / 或预防由病毒感染引起的疾病的药物中的用途。

6. 权利要求5中要求的用途,其中病毒感染是由选自以下的病毒引起的:登革病毒、黄热病病毒、西尼罗河病毒、日本脑炎病毒、蜱媒脑炎病毒、昆金病毒、墨累谷脑炎、圣路易斯脑炎、奥马斯克出血热病毒、牛病毒性腹泻病毒、齐卡病毒和丙型肝炎病毒。

用于治疗病毒感染的核苷类似物

技术领域

[0001] 本发明涉及新的化合物,其用于治疗病毒感染。本发明还涉及包含该化合物的药物组合物、制备它们的方法以及化合物在多种医药应用中的用途,例如治疗或预防病毒感染,特别是登革病毒 (dengue virus)、黄热病病毒 (yellow fever virus)、西尼罗河病毒 (West Nile virus)、日本脑炎病毒 (Japanese encephalitis virus)、蜱媒脑炎病毒 (tick-borne encephalitis virus)、昆金病毒 (Kunjin virus)、墨累谷脑炎 (Murray Valley encephalitis)、圣路易斯脑炎 (St Louis encephalitis)、奥马斯克出血热病毒 (Omsk hemorrhagic fever virus)、牛病毒性腹泻病毒 (bovine viral diarrhea virus)、齐卡病毒 (Zika virus) 和丙型肝炎病毒 (Hepatitis C virus),更特别是登革病毒和丙型肝炎病毒。

[0002] 背景

[0003] 登革热是由四种登革病毒血清型 DEN-1、DEN-2、DEN-3 和 DEN-4 (其属于黄病毒科 (Flaviviridae)) 中的一种引起的发热疾病。该病毒最初由埃及斑蚊 (*Aedes aegypti*) (一种吸食人的蚊子) 传染给人。

[0004] 感染产生一系列临床表现,从较弱的流行性感冒样症状至更加严重并且有时致命的出血性疾病。典型的症状包括发烧、剧烈头痛、肌肉和关节疼痛和疹。该疾病的更严重的形式是登革出血热 (DHF) 和登革热休克综合征 (DSS)。根据 WHO, DHF 存在四个主要的临床表现: (1) 高烧 (2) 出血现象 (3) 血小板减少和 (4) 血浆泄漏。DSS 被定义为 DHF 加上弱的疾脉以及脉压窄或寒冷引起的低血压、冷湿皮肤和多动。DHF 的严重程度可以通过早期检测和干涉来降低,但是休克的患者处于死亡高风险中。

[0005] 登革热在热带地区,特别是在亚洲、非洲和拉丁美洲流行,估计 25 亿人生活在处于感染危险的区域中。每年发生约 4 千万例登革热病和数十万例 DHF。在新加坡,2005 年的流行导致超过 12000 例登革热。

[0006] 尽管是有规律的爆发,但是先前受感染的人仍然易受到感染侵袭,因为存在四种不同血清型的登革病毒,并且由这些血清型中的一种引起感染仅对该血清型提供免疫力。相信 DHF 更可能发生在第二次登革热感染的患者中。正在寻找登革热、DHF 和 DSS 的有效疗法。

[0007] 黄热病病毒 (YFV)、西尼罗河病毒 (WNV)、日本脑炎病毒 (JEV)、蜱媒脑炎病毒、昆金病毒、墨累谷脑炎、圣路易斯脑炎、奥马斯克出血热病毒、牛病毒性腹泻病毒、齐卡病毒和丙型肝炎病毒 (HCV) 也属于黄病毒科。

[0008] WNV 可以是对称的,或者其在某些个体中可以导致流行性感冒样症状。在某些病例中,其导致神经学障碍、脑炎,并且在严重的病例中可以导致死亡。WNV 也是通过蚊子传播的。YFV 是另一种蚊子传播的病毒,其在感染的个体中可以导致严重的症状。JEV 也是通过蚊子传播的,并且或者是对称的,或者导致流行性感冒样症状,在某些病例中发展成脑炎。该疾病的急性脑炎期的特征在于惊厥、颈强直和其它症状。

[0009] HCV 是血液传播的病毒,其通过血液-血液接触而传播。在该疾病的初(急性)期,

大多数患者将不表现出任何症状。甚至在慢性期（即疾病持续超过6个月），患者与患者的症状的严重程度可以不同。在长期，某些感染的人可能发展成肝硬化和肝癌。对于HCV，目前的治疗包括干扰素 α 和利巴韦林（一种抗病毒药）的组合。

[0010] 同样，正在寻找由这些黄病毒科病毒引起的感染的有效的疗法。

[0011] 目前令人惊奇地发现某些核苷类似物用于治疗病毒感染，例如由黄病毒科病毒引起的那些感染，所述的黄病毒科病毒特别是登革病毒、黄热病病毒、西尼罗河病毒、日本脑炎病毒、蜱媒脑炎病毒、昆金病毒、墨累谷脑炎、圣路易斯脑炎、奥马斯克出血热病毒、牛病毒性腹泻病毒、齐卡病毒和丙型肝炎病毒，以及本文描述的其它黄病毒科病毒。

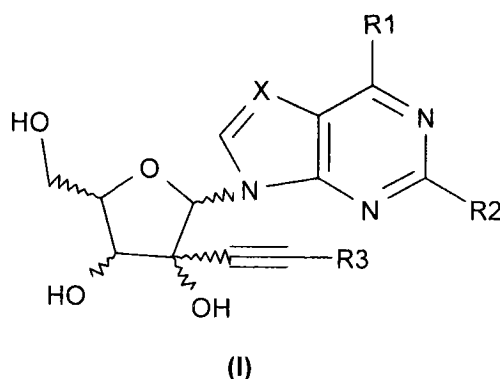
[0012] 本发明的目的是提供新的化合物。提供此类化合物例如在治疗病毒感染中的用途也是本发明的目的。

[0013] 发明的公开内容

[0014] 本发明提供了化合物及其药物组合物，其用于治疗病毒感染。

[0015] 第一方面，本发明提供了式(I)化合物或其可药用盐或前药：

[0016]



[0017] 其中：

[0018] X是CH或CR₄；

[0019] R₁是卤素、NR₅R₆或OR₇；

[0020] R₂是H、卤素或NR₅R₆；

[0021] R₃是H、烷基、链烯基、炔基、芳基、环烷基、杂环烷基或杂芳基，它们每个任选被一个或多个取代基取代；

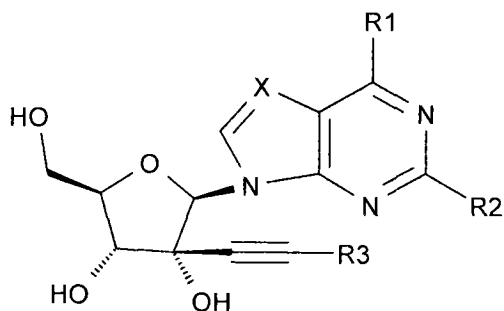
[0022] R₄是烷基、链烯基、炔基、芳基、环烷基、杂环烷基、杂芳基、卤素、氰基、硝基、羟基、烷氧基、烷基硫代、氨基、烷基氨基、羧基、酰胺或烷基氧基羰基，它们每个任选被一个或多个取代基取代；

[0023] R₅和R₆独立地选自H、烷基、链烯基、炔基、芳基、环烷基、杂环烷基、杂芳基、氨基、烷基氨基、芳基氨基、羟基、烷氧基、芳基羰基和烷基羰基，它们每个任选被一个或多个取代基取代；并且

[0024] R₇是H、烷基、链烯基、炔基、芳基、环烷基、杂环烷基、杂芳基、烷基羰基或芳基羰基，它们每个任选被一个或多个取代基取代。

[0025] 第二方面，本发明提供了式(II)化合物或其可药用盐或前药：

[0026]



(III)

[0027] 其中：

[0028] X 是 CH 或 CR4；

[0029] R1 是卤素、NR5R6 或 OR7；

[0030] R2 是 H、卤素或 NR5R6；

[0031] R3 是 H、烷基、链烯基、炔基、芳基、环烷基、杂环烷基或杂芳基，它们每个任选被一个或多个取代基取代；

[0032] R4 是烷基、链烯基、炔基、芳基、环烷基、杂环烷基、杂芳基、卤素、氰基、硝基、羟基、烷氧基、烷基硫代、氨基、烷基氨基、羧基、酰胺或烷基氧基羰基，它们每个任选被一个或多个取代基取代；

[0033] R5 和 R6 独立地选自 H、烷基、链烯基、炔基、芳基、环烷基、杂环烷基、杂芳基、氨基、烷基氨基、芳基氨基、羟基、烷氧基、芳基羰基和烷基羰基，它们每个任选被一个或多个取代基取代；并且

[0034] R7 是 H、烷基、链烯基、炔基、芳基、环烷基、杂环烷基、杂芳基、烷基羰基或芳基羰基，它们每个任选被一个或多个取代基取代。

[0035] 在以上式 (I) 和 (II) 的某些实例中，X 是 CH。在其它实例中，X 是 CR4。

[0036] 在以上式 (I) 和 (II) 中，R3 可以是例如 H、烷基、环烷基、芳基、链烯基或炔基。在某些实例中，R3 是 H、低级烷基、低级链烯基或低级炔基，在某些实例中，R3 是 H、低级烷基或低级炔基。在某些实例中，R3 是 H 或乙炔基。

[0037] 在以上式 (I) 和 (II) 中，R4 可以是例如卤素、烷基、环烷基、芳基、链烯基或炔基。在某些实例中，R4 是卤素、低级烷基、低级链烯基或低级炔基。在某些实例中，R4 是 F、I 或低级炔基，例如乙炔基。

[0038] 在以上式 (I) 和 (II) 中，R2 可以是例如 H 或 NR5R6，其中 R5 和 R6 独立地选自 H、烷基、链烯基和炔基。在某些实例中，R2 是 H。在其它实例中，R2 是 NH₂。在其它实例中，R2 是卤素。在其它实例中，R5 和 R6 之一是 H 并且另一个选自烷基、链烯基和炔基。

[0039] 在以上式 (I) 和 (II) 中，R1 可以是例如卤素、NR5R6 或 OR7，其中 R7 选自 H、烷基、链烯基和炔基。在某些实例中，R7 是低级烷基，例如甲基、乙基、丙基或丁基。在某些实例中，R7 是甲基。在某些实例中，R5 和 R6 各自独立地选自烷基、链烯基和炔基。在某些实例中，R1 是卤素、NR5R6 或 OR7，其中 R7 是 H 或烷基；R5 和 R6 各自独立地选自 H 和烷基；R3 是 H 或低级炔基并且 R4 是卤素或低级炔基。

[0040] 其中 R1 是卤素，其可以是例如 Cl 或 Br。在某些实例中，R1 是 Cl。其中 R1 是 OR7，

R7 可以是 H 或低级烷基。在某些实例中, R7 是甲基。其中 R1 是 NR⁵R⁶, 其可以是例如 NH₂ 或 NHR⁵, 其中 R⁵ 是低级烷基, 例如甲基。

[0041] X 可以是例如 CH 并且 R1 可以是 NH₂ 或 Cl。在某些实施方案中, X 是 CH, R1 是 NH₂ 或 Cl, 并且 R2 是 H。

[0042] X 可以是例如 CR⁴ 并且 R1 可以是 NH₂。在某些实施方案中, X 是 CR⁴ 并且 R1 是 NH₂, 其中 R⁴ 是炔基, 例如低级炔基, 例如乙炔基。

[0043] 以上定义的式 (I) 或 (II) 化合物中的任何烷基或环烷基可以被一个或多个取代基取代, 所述的取代基选自卤素、羟基、氨基、烷基氨基、二烷基氨基、烷基羰基、芳基羰基、氰基、硝基和叠氮基。

[0044] 以上定义的式 (I) 或 (II) 化合物中的任何链烯基或炔基可以被一个或多个取代基取代, 所述的取代基选自卤素、羟基、氨基、烷基氨基、二烷基氨基、烷基羰基、芳基羰基、氰基、硝基和叠氮基。

[0045] 以上定义的式 (I) 或 (II) 化合物中的任何芳基、杂芳基或杂环基可以被一个或多个取代基取代, 所述的取代基选自卤素、羟基、氨基、烷基氨基、二烷基氨基、烷基羰基、芳基羰基、氰基、硝基和叠氮基。

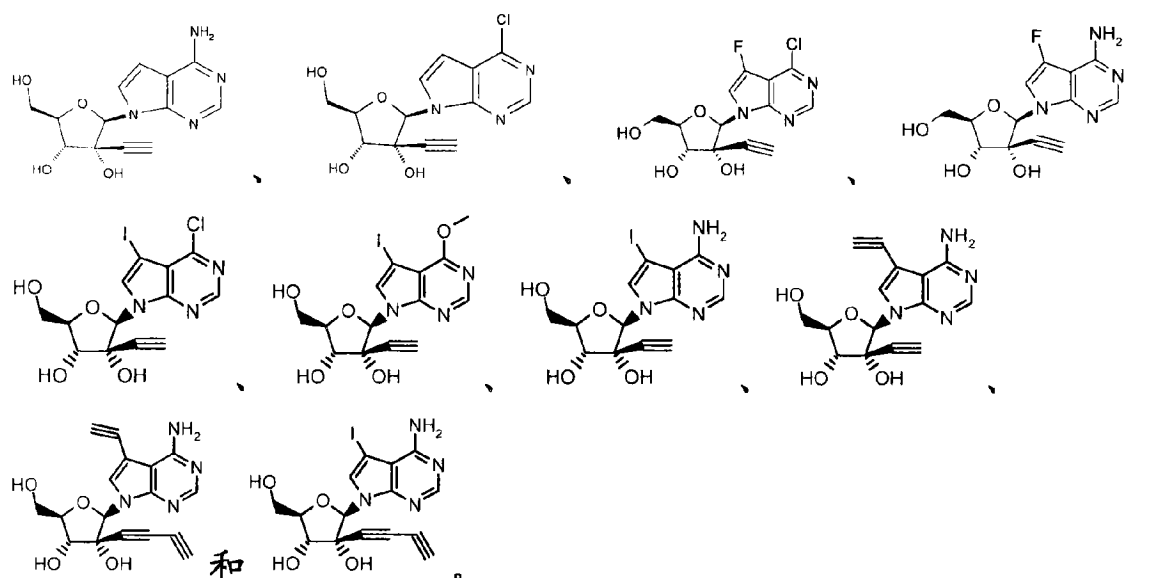
[0046] 在某些实例中, 式 (I) 或 (II) 化合物中的任何烷基、链烯基或炔基是低级烷基、链烯基或炔基。在某些实例中, 式 (I) 或 (II) 化合物中的任何芳基是苯基。

[0047] 一组化合物包括基本上纯的旋光异构体, 其中关于所有不对称碳中心上的取代基, 四氢呋喃基的立体化学 (即四氢呋喃环的四个碳) 与实施例 1 的相同。

[0048] 一组化合物包括基本上纯的旋光异构体, 其中关于所有不对称碳中心上的取代基, 四氢呋喃基的立体化学 (即四氢呋喃环的四个碳) 与实施例 1 的相反。

[0049] 在一个实施方案中, 本发明提供了选自以下的化合物:

[0050]



[0051] 在另一个实施方案中, 本发明提供了 (2R, 3R, 4R, 5R)-2-(4-氨基-吡咯并 [2,3-d] 嘧啶-7-基)-3-乙炔基-5-羟基甲基-四氢呋喃-3,4-二醇。

[0052] 在另一个实施方案中, 本发明提供了 (2R, 3R, 4R, 5R)-2-(4-氨基-5-乙炔基-吡

咯并 [2,3-d] 嘧啶 -7- 基)-3- 乙炔基 -5- 羟基甲基 - 四氢呋喃 -3,4- 二醇。

[0053] 在另一个实施方案中,本发明提供了 (2R,3R,4R,5R)-2-(4- 氨基 -5- 氟 - 吡咯并 [2,3-d] 嘧啶 -7- 基)-3- 乙炔基 -5- 羟基甲基 - 四氢呋喃 -3,4- 二醇。

[0054] 另一方面,本发明提供了药物组合物,该药物组合物包含以上定义的式 (I) 或 (II) 化合物,以及至少一种可药用赋形剂,例如适合的稀释剂和 / 或载体,例如包括填充剂、粘合剂、崩解剂、流动调节剂、润滑剂、糖或甜味剂、芳香剂、防腐剂、稳定剂、润湿剂和 / 或乳化剂、增溶剂、用于调节渗透压的盐和 / 或缓冲剂。

[0055] 另一方面,本发明提供了以上定义的式 (I) 或 (II) 化合物,其用作药物。

[0056] 另一方面,本发明提供了以上定义的式 (I) 或 (II) 化合物,其用于制备药物。

[0057] 另一方面,本发明提供了式 (I) 或 (II) 化合物在制备用于治疗 and / 或预防病毒感染的药物、例如药物组合物中的用途。

[0058] 另一方面,本发明提供了式 (I) 或 (II) 化合物作为药物在例如治疗和 / 或预防病毒感染中的用途。

[0059] 另一方面,本发明提供了以上定义的式 (I) 或 (II) 化合物,其用于治疗和 / 或预防病毒感染。

[0060] 另一方面,本发明提供了以上定义的式 (I) 或 (II) 化合物在制备用于治疗 and / 或预防由病毒感染引起的疾病的药物中的用途。

[0061] 另一方面,本发明提供了治疗和 / 或预防由病毒感染引起的疾病的方法,该方法包括给需要的患者施用有效量的以上定义的式 (I) 或 (II) 化合物。

[0062] 另一方面,本发明提供了用于治疗 and / 或预防由病毒感染引起的疾病的药物组合物,该药物组合物包含以上定义的式 (I) 或 (II) 化合物。

[0063] 病毒感染是例如由黄病毒科的病毒引起的,所述的黄病毒科的病毒是例如登革病毒、黄热病病毒、西尼罗河病毒、日本脑炎病毒、蜱媒脑炎病毒、昆金病毒、墨累谷脑炎、圣路易斯脑炎、奥马斯克出血热病毒、牛病毒性腹泻病毒、齐卡病毒、Gadgets Gully 病毒 (Gadgets Gully virus)、科萨努尔丛林病病毒 (Kysanur Forest disease virus)、兰加特病毒 (Langatvirus)、跳跃病病毒 (Louping ill virus)、波瓦生病毒 (Powassan virus)、罗亚尔农场病毒 (Royal Farm virus)、卡尔希病毒 (Karshi virus)、凯丹姆病毒 (Kadam virus)、Meaban 病毒 (Meaban virus)、索马勒兹礁病毒 (Saumarez Reef virus)、秋列尼病毒 (Tyuleny virus)、Aroa 病毒 (Aroa virus)、巴苏夸拉病毒 (Bussuquara virus)、Iguape 病毒 (Iguape virus)、Naranjal 病毒 (Naranjal virus)、凯多各病毒 (Kedougou virus)、Cacipacore 病毒 (Cacipacore virus)、库坦戈病毒 (Koutango virus)、阿尔福病毒 (Alfuyvirus)、乌苏土病毒 (Usutu virus)、雅温德病毒 (Yaounde virus)、克科贝拉病毒 (Kokobera virus)、斯特拉特福德病毒 (Stratford virus)、巴加扎病毒 (Bagaza virus)、伊列乌斯病毒 (Ilheus virus)、罗西欧病毒 (Rocio virus)、以色列土耳其脑脊膜脑脊髓炎病毒 (Israeli turkey meningoencephalomyelitis virus)、恩他耶病毒 (Ntaya virus)、坦布苏病毒 (Tembusu virus)、Sponweni 病毒 (Sponweni virus)、斑齐病毒 (Banzi virus)、Bouboui 病毒 (Boubouivirus)、埃杰山病毒 (Edge Hill virus)、朱格拉病毒 (Jugra virus)、Potiskum 病毒 (Potiskum virus)、萨博亚病毒 (Saboya virus)、塞皮克病毒 (Sepikvirus)、乌干达病毒 (Uganda virus)、威塞尔斯布隆病毒 (Wesselsbron

virus)、恩德培蝙蝠病毒 (Entebbe bat virus)、索科洛克病毒 (Sokoluk virus)、Yokose 病毒 (Yokose virus)、阿普瓦病毒 (Apoi virus)、考博恩里奇病毒 (CowboneRidge virus)、朱蒂亚帕病毒 (Jutiapa virus)、莫多克病毒 (modoc virus)、SalVieja 病毒 (Sal Vieja virus)、San Perlita 病毒 (San Perlita virus)、布卡拉沙蝙蝠病毒 (Bukalasa bat virus)、卡勒岛病毒 (Carey Island virus)、达喀尔蝙蝠病毒 (Dakar bat virus)、蒙大拿鼠耳蝙蝠白细胞脑炎病毒 (Mantanamyotis leukoencephalitis virus)、巴士穴病毒 (Batu Cave virus)、粉判蝙蝠病毒 (Phnom Penh bat virus)、里奥布拉伏病毒 (Rio Bravo virus)、细胞融合剂病毒 (Cell fusing agent virus)、塔玛纳蝙蝠病毒 (Tamana bat virus) 和丙型肝炎病毒,特别是登革病毒、黄热病病毒、西尼罗河病毒、日本脑炎病毒、蜱媒脑炎病毒、昆金病毒、墨累谷脑炎、圣路易斯脑炎、奥马斯克出血热病毒、牛病毒性腹泻病毒、齐卡病毒和丙型肝炎病毒,特别是登革病毒和丙型肝炎病毒。

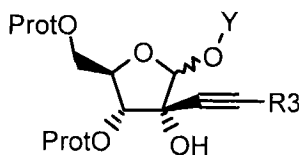
[0064] 另一方面,本发明提供了式 (I) 或 (II) 化合物与至少一种第二种药物的组合。

[0065] 另一方面,本发明提供了药物组合,例如药盒,包含 a) 第一种药物,其是游离形式或可药用盐形式的式 (I) 或 (II) 化合物,和 b) 至少一种共同药物。该药盒可以包含用于其施用的说明书。

[0066] 在以上应用本发明化合物的方法中,式 (I) 或 (II) 化合物可以施用于包括细胞或组织的系统。在其它实施方案中,式 (I) 或 (II) 化合物可以施用于人或动物患者。

[0067] 制备以上定义的式 (I) 或 (II) 化合物的方法,该方法包括将式 (i) 化合物或相应的环氧化物与式 (ii) 化合物偶联

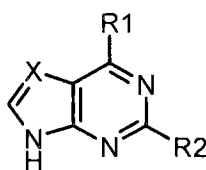
[0068]



(i)

[0069] 在式 (i) 化合物中,基团 -OY 和邻近的 -OH 被 -O- 代替,

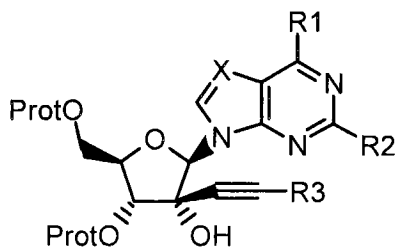
[0070]



(ii)

[0071] 得到式 (iii) 化合物

[0072]



(iii)

[0073] 其中 X、R1、R2 和 R3 如以上定义的，Y 表示 H 或烷基，例如低级烷基，例如甲基，并且 Prot 表示保护基，优选苄基（其任选被一个或多个卤素取代）或苯甲酰基或甲苯酰基或甲硅烷基。如果需要，可以将式 (I) 化合物转化为式 (I) 的其它化合物。式 (i) 和式 (ii) 化合物是已知的化合物或者可以根据已知方法、例如类似于本文描述的方法制备。

[0074] 本发明提供的化合物在下文中被定义为“本发明化合物”。本发明化合物包括任何形式的化合物，例如游离形式、盐形式、溶剂化物形式以及盐和溶剂化物形式。

[0075] 本文所用的术语“烷基”指的是优选包含 1 至 15 个碳原子的支链或直链烃基。相同的术语适用于烷基芳基的非芳族部分。烷基的实例包括但不限于甲基、乙基、丙基、丁基、戊基、己基、庚基、壬基、癸基等。烷基可以是未取代的或者任选被一个或多个取代基取代，所述的取代基选自卤素、羟基、氨基、烷基氨基、二烷基氨基、烷基羰基、芳基羰基、氰基、硝基和叠氮基。典型地，它是未取代的。

[0076] 本文所用的术语“低级烷基”指的是包含 1 至 6 个碳原子、优选 1 至 4 个碳原子的支链或直链烷基。低级烷基的实例包括但不限于甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、仲丁基、叔丁基、戊基和己基。低级烷基可以是未取代的或者任选被一个或多个取代基取代，所述的取代基选自卤素、羟基、氨基、烷基氨基、二烷基氨基、烷基羰基、芳基羰基、氰基、硝基和叠氮基。典型地，它是未取代的。

[0077] 术语“环烷基”指的是优选包含 3 至 8 个碳原子的饱和的或部分饱和的（非芳族）环。实例包括但不限于环丙基、环丁基、环戊基、环己基和环庚基。环烷基优选是 3、5 或 6 元环。环烷基可以是未取代的或者任选被一个或多个取代基取代，所述的取代基选自卤素、羟基、氨基、烷基氨基、二烷基氨基、烷基羰基、芳基羰基、氰基、硝基和叠氮基。典型地，它是未取代的。

[0078] 本文所用术语“链烯基”指的是优选包含 2 至 15 个碳原子、更优选 2 至 6 个碳原子、甚至更优选 2 或 3 个碳原子并且包含一个或多个双键的支链或直链基团。链烯基的实例包括但不限于乙烯基、丙烯基、丁烯基、戊烯基、己烯基、庚烯基、壬烯基、癸烯基等。链烯基可以是未取代的或者任选被一个或多个取代基取代，所述的取代基选自卤素、羟基、氨基、烷基氨基、二烷基氨基、烷基羰基、芳基羰基、氰基、硝基和叠氮基。典型地，它是未取代的。

[0079] 本文所用术语“炔基”指的是优选包含 2 至 15 个碳原子、更优选 2 至 6 个碳原子、甚至更优选 2 或 3 个碳原子、并且最优选 2 个碳原子并且包含一个或多个三键的支链或直链基团。炔基的实例包括但不限于乙炔基、丙炔基、丁炔基、戊炔基、己炔基、庚炔基、壬炔基、癸炔基等。炔基可以是未取代的或者任选被一个或多个取代基取代，所述的取代基选自卤素、羟基、氨基、烷基氨基、二烷基氨基、烷基羰基、芳基羰基、氰基、硝基和叠氮基。典型地，它是未取代的。

[0080] 术语“低级链烯基”和“低级炔基”具有与以上定义的术语“低级烷基”相应的含义。低级链烯基和低级炔基的实例包括但不限于乙烯基、丙烯基、丁烯基、乙炔基、丙炔基和丁炔基。低级链烯基或炔基可以是未取代的或者任选被一个或多个取代基取代,所述的取代基选自卤素、羟基、氨基、烷基氨基、二烷基氨基、烷基羰基、芳基羰基、氰基、硝基和叠氮基。典型地,它是未取代的。

[0081] 本文所用的术语“烷氧基”指的是-OR, 其中R是以上定义的烷基。术语“低级烷氧基”具有与以上定义的术语“低级烷基”相应的含义。低级烷氧基的实例包括但不限于甲氧基、乙氧基、正丙氧基、异丙氧基、正丁氧基、异丁氧基、仲丁氧基和叔丁氧基。低级烷氧基的典型实例包括甲氧基、乙氧基和叔丁氧基。

[0082] 本文所用的术语“卤素”指的是F、Cl、Br或I,优选Br或Cl。

[0083] 本文所用的术语“芳基”指的是具有 6 至 18 个碳原子的芳族环,并且包括单环基团和多环基团,例如稠合的基团,例如二环和三环基团。优选的芳基是包含 6 至 12 个碳原子(对于单环优选 6 个碳原子,对于稠合的二环优选 9 或 10 个碳原子)的那些。实例包括但不限于苯基、萘基和蒽基,特别是苯基。芳基可以是未取代的或者在一个或多个环位置上被一个或多个取代基取代,所述的取代基选自卤素、羟基、氨基、烷基氨基、二烷基氨基、烷基羰基、芳基羰基、氰基、硝基和叠氮基。典型地,它是未取代的。

[0084] 术语“杂芳基”表示具有 5 至 18 个原子、优选 5 或 6 个原子的芳族环,环中包含至少一个杂原子,例如但不限于 N、O 和 S。术语“杂芳基”包括单环基团和多环基团,例如稠合的基团,例如二环和三环基团。杂芳基可以任选与一个或多个苯环和 / 或另外的杂芳基环和 / 或脂环稠合或桥连。

[0085] 术语“杂环”、“杂环烷基”或“杂环的”表示具有 5 至 18 个原子、优选 5 或 6 个原子的饱和的或部分饱和的（非芳族）环，环中包含至少一个杂原子，例如但不限于 N、O 和 S。杂环可以任选与一个或多个苯环和 / 或另外的杂环和 / 或脂环稠合或桥连。

[0086] 杂环和杂芳基的实例包括但不限于吗啉基、哌嗪基、哌啶基、吡啶基、吡咯烷基、吡嗪基、嘧啶基、嘌呤基、苯并咪唑基、苯并噁唑基、苯并噻唑基、苯并呋喃基、苯并呋喃基、苯并吡唑基、苯并三唑基、苯并噻吩基、呋唑基、呋啉基、噻吩基、噻啉基、噻唑基、indolaziny、吲唑基、吗啉基、喹啉基、喹啉基、异喹啉基、喹啉基、1,2,3,4-四氢喹啉基、四氢吡喃基、四唑并吡啶基、噻二唑基、噻吩基、氮杂环丁烷基、1,4-二噁烷基、六氢氮杂革基、吡啶-2-酮、硫代吗啉基、二氢苯并咪唑基、二氢苯并呋喃基、二氢苯并噻吩基、二氢苯并噁唑基、二氢呋喃基、二氢咪唑基、二氢异噁唑基、二氢异噻唑基、二氢噁二唑基、二氢噁唑基、二氢吡嗪基、二氢吡唑基、二氢吡啶基、二氢嘧啶基、二氢吡咯基、二氢喹啉基、二氢四唑基、二氢噻二唑基、二氢噻唑基、二氢噻吩基、二氢三唑基、二氢氮杂环丁烷基、亚甲基二氧基苄基、四氢呋喃基、四氢噻吩基、噻唑基、异噻唑基、异噁唑基、咪唑基、茛满基、萘吡啶基 (naphthpyridinyl)、噁二唑基、噁唑基、噁唑啉、异噁唑啉、氧杂环丁烷基、吡喃基、吡嗪基、吡啶并吡啶基、哒嗪基、吡咯基、吡唑基、吡咯基、菲啶基、三唑基、噻吩基、呋喃基、异苯并呋喃基或四唑基,特别是含 N 杂环,例如吡啶基、哌啶基、嘧啶基、吡咯烷基、哌嗪基、异喹啉基、喹啉基、2,2,6,6-四甲基哌啶基和吗啉基。

[0087] 术语“烷基羰基”和“芳基羰基”包括其中羰基的碳原子与烷基或芳基部分的碳原子键合的基团。

[0088] 术语“取代的”旨在描述具有取代基取代分子的一个或多个原子（例如 C、O 或 N）上的氢的部分。

[0089] 术语“一个或多个取代基”意指至多例如 3 个取代基、优选一个取代基。两个或多个取代基可以是独立选择的。

[0090] 多环部分包括具有两个或多个环的那些，例如环烷基、芳基、杂芳基和杂环，其中两个或多个碳是两个邻近环共有的（“稠合的”环）或其中环是通过非邻近 / 共有原子相连的（“桥连的”环）。

[0091] 本文所用的术语“前药”表示式 (I) 或 (II) 化合物的药理学上可接受的衍生物，以便衍生物的体内生物转化产生式 (I) 或 (II) 中定义的化合物。式 (I) 和 (II) 化合物的前药可以通过修饰化合物中存在的功能团（例如羟基或酸基）制备，从而将修饰的基团在体内裂解，得到母体化合物。适合的前药包括例如酯或酰胺。

[0092] 术语“盐”包括衍生自式 (I) 和 (II) 化合物的治疗活性的、无毒性的酸加成盐。酸加成盐可以通过用适合的酸处理化合物的碱形式来获得。适合的酸包括无机酸，例如氢卤酸，特别是盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸和磷酸；和有机酸，例如乙酸、羟乙酸、丙酸、乳酸、丙酮酸、草酸、丙二酸、琥珀酸、马来酸、富马酸、苹果酸、酒石酸、柠檬酸、甲磺酸、乙磺酸、苯磺酸、对甲苯磺酸、环己烷氨基磺酸、水杨酸、对氨基水杨酸、双羟萘酸 (pamoic acid)、己酸、环戊烷丙酸、羟乙酸、丙酮酸、乳酸、酒石酸、苯甲酸、3-(4-羟基苯甲酰基) 苯甲酸、肉桂酸、扁桃酸、1,2-乙二磺酸、2-羟基乙磺酸、4-氯苯磺酸、2-萘磺酸、樟脑磺酸、3-苯基丙酸、三甲基乙酸、叔丁基乙酸、月桂基磺酸、葡糖酸、谷氨酸、羟基萘酸和硬脂酸。

[0093] 术语“保护基”表示封闭分子中官能团，以便在反应中化学选择性是可能的。适合的保护基优选是易于引入、对相关反应条件稳定并且易于除去。此类保护基是本领域技术人员已知的，并且在 Theodora W Greene 编写的 *Protective Groups in Organic Synthesis* (有机合成中的保护基) (John Wiley & Sons Canada, Ltd) 中描述。适合的保护基包括例如苄基，其任选被一个或多个卤素取代（例如二氯苄基），或苯甲酰基或甲苯酰基或甲硅烷基。

[0094] 术语“治疗”包括消除或减轻至少一种与所治疗的状态、疾病或障碍相关的或者由所治疗的状态、疾病或障碍引起的症状。例如，治疗可以包括消除一种或多种以下：患者的病毒血症或发烧。

[0095] 术语“预防”包括预防至少一种与所治疗的状态、疾病或障碍相关的或者由所治疗的状态、疾病或障碍引起的症状。例如，预防可以包括预防一种或多种以下：患者的病毒血症或发烧。

[0096] 术语“患者”包括能够患有病毒感染或受到病毒感染的折磨或感染病毒感染的有机体，例如哺乳动物例如人、猿、猴子、母牛、马、猪、绵羊、猫、狗、山羊、小鼠、兔子、大鼠和转基因非人动物。在某些实施方案中，患者是人，例如能够患有本文描述的疾病或病症或受到本文描述的疾病或病症的折磨的人，所述的疾病或病症例如由黄病毒科的病毒引起的感染，例如由登革病毒、黄热病病毒、西尼罗河病毒、日本脑炎病毒、蜱媒脑炎病毒、昆金病毒、墨累谷脑炎、圣路易斯脑炎、奥马斯克出血热病毒、牛病毒性腹泻病毒、齐卡病毒和丙型肝炎病毒以及本文描述的其它黄病毒科病毒引起的感染。

[0097] 登革病毒旨在包括任何登革病毒血清型 1、2、3 和 4。

[0098] “由病毒感染引起的疾病”包括患者与病毒活性相关的障碍和状态,例如病毒感染,例如在患者中由黄病毒科的病毒引起的感染,例如由登革病毒、黄热病病毒、西尼罗河病毒、日本脑炎病毒、蜱媒脑炎病毒、昆金 病毒、墨累谷脑炎、圣路易斯脑炎、奥马斯克出血热病毒、牛病毒性腹泻病毒、齐卡病毒和丙型肝炎病毒以及本文描述的其它黄病毒科病毒引起的感染。

[0099] 本发明化合物的“有效量”是治疗或预防由病毒感染引起的疾病的所需或足够的量,所述的病毒感染例如由黄病毒科的病毒引起的感染,例如由登革病毒、黄热病病毒、西尼罗河病毒、日本脑炎病毒、蜱媒脑炎病毒、昆金病毒、墨累谷脑炎、圣路易斯脑炎、奥马斯克出血热病毒、牛病毒性腹泻病毒、齐卡病毒和丙型肝炎病毒以及本文描述的其它黄病毒科病毒引起的感染,例如有效量是治疗或预防一种或多种病毒感染的症状所需的量。有效量可以取决于所用的化合物、施用方式、所需的治疗和指定的疾病以及其它因素(例如患者年龄、体重、一般健康状况和性别)而不同。例如,本发明化合物的选择可以影响“有效量”的制定。本领域的普通技术人员将能够研究本文所描述的因素并且在没有过度的试验下确定关于本发明化合物的有效量。施用方案可以影响有效量的制定。本发明化合物可以在由病毒感染引起疾病的发作之前或之后(例如在黄病毒科的病毒引起的感染之前或之后)施用于患者。另外,数个分剂量和交错剂量可以是每天或连续施用,或者剂量可以是连续输注的,或者可以是推注的。另外,本发明化合物的剂量可以是如治疗或预防情况的紧急性所指示的按比例增加或减少。具有本领域一般技术的医师或兽医能够容易地确定并且开出所需的量。例如,医师或兽医开始施用的药物组合物中所用的本发明化合物的剂量水平低于获得所需的治疗效果所需的剂量水平,并且逐渐增加剂量直至获得所需的效果。

[0100] 术语“药物组合物”包括适合施用于哺乳动物、例如人的制剂,例如药物。

[0101] 通过用适合的有机和无机碱处理还可以将包含酸性质子的本发明化合物转化为它们的治疗活性的、无毒性碱加成盐形式。适合的碱盐形式包括例如铵盐、碱金属和碱土金属盐,特别是锂、钠、钾、镁和钙盐,与有机碱的盐,例如 N, N' - 二苄基亚乙基二胺(benzathine)、N- 甲基 -D- 葡萄糖胺和羟基胺盐(hybramine),以及与氨基酸的盐,所述的氨基酸例如精氨酸和赖氨酸。

[0102] 通过用适合的碱或酸处理可以方便地将酸或碱加成盐形式转化为游离形式。

[0103] 本文中所用的术语加成盐还包括本发明化合物及其盐能够形成的溶剂化物。此类溶剂化物包括例如水合物和醇化物。

[0104] 应当理解的是,本发明化合物可以以旋光异构体、外消旋体或非对映异构体的形式存在。本发明的范围包括化合物的所有立体化学异构体形式。因此,本文所用的术语“立体化学异构体形式”表示本发明化合物可以具有的所有可能的异构体形式。特别是,不对称碳可以具有 R- 或 S- 构型。例如,本发明化合物的四氢呋喃基的不对称碳可以具有 R- 或 S- 构型。

[0105] 还应当理解的是,本发明化合物可以以互变异构体存在。例如,本发明化合物(其中 R1 是 OH 或 NH₂,或者其中 R2 是 NH₂)可以以互变异构体形式存在。本发明的范围包括所有此类互变异构体形式。

[0106] 游离或可药用加成盐形式的本发明化合物,特别是列举的,显示出药理学活性并且用作药物,特别用于治疗 and / 或预防病毒感染,例如由黄病毒科成员引起的那些感染。化

合物特别用于治疗 and / 或预防感染,例如由登革病毒、黄热病病毒、西尼罗河病毒、日本脑炎病毒、蜱媒脑炎病毒、昆金病毒、墨累谷脑炎、圣路易斯脑炎、奥马斯克出血热病毒、牛病毒性腹泻病毒、齐卡病毒和丙型肝炎病毒以及本文描述的其它黄病毒科病毒引起的那些感染。

[0107] 实施例 1-10 的化合物是优选的本发明化合物。例如已经确定本发明化合物(包括实施例 1-10 的化合物)在基于细胞的黄病毒免疫(CFI)试验、基于细胞的黄病毒细胞病变效应(CPE)试验和 HCV 复制子试验以及体内登革病毒感染的小鼠模型中显示出活性。这些试验如实施例部分描述的那样进行。

[0108] 在登革病毒的 CFI 试验中,本发明化合物显示出 EC_{50} 值小于 $14\mu M$ 、优选小于 $5\mu M$ 、优选小于 $3\mu M$ 、更优选小于 $2\mu M$ 、甚至更优选小于 $1\mu M$ 、最优选小于 $0.8\mu M$ 。例如,实施例 1 的化合物的 EC_{50} 值为约 $0.2\mu M$ (例如用登革病毒血清型 1 和登革病毒血清型 4),实施例 4 的化合物的 EC_{50} 值为约 $0.4\mu M$ (例如用登革病毒血清型 2),实施例 8 的化合物的 EC_{50} 值为约 $0.6\mu M$ (例如用登革病毒血清型 2)。

[0109] 在黄热病病毒的 CFI 试验中,本发明化合物显示出 EC_{50} 值小于 $5\mu M$ 、优选小于 $3\mu M$ 、更优选小于 $2\mu M$ 、甚至更优选小于 $1.5\mu M$ 、最优选小于 $0.9\mu M$ 。例如,实施例 1 的化合物的 EC_{50} 值为约 $0.9\mu M$ 。

[0110] 在西尼罗河病毒的 CPE 试验中,本发明化合物显示出 EC_{50} 值小于 $5\mu M$ 、优选小于 $3\mu M$ 、优选小于 $2\mu M$ 、更优选小于 $1.5\mu M$ 、最优选小于 $1.3\mu M$ 。例如,实施例 1 的化合物的 EC_{50} 值为约 $3.75\mu M$ 。

[0111] 在日本脑炎病毒的 CPE 试验中,本发明化合物显示出 EC_{50} 值小于 $5\mu M$ 、更优选小于 $4\mu M$ 。例如,实施例 1 的化合物的 EC_{50} 值为约 $1.3\mu M$ 。

[0112] 在 HCV 复制子试验中,本发明化合物显示出 EC_{50} 值小于 $5\mu M$ 、优选小于 $2\mu M$ 、更优选小于 $1\mu M$ 、更优选小于 $0.7\mu M$ 、甚至更优选小于 $0.5\mu M$ 、甚至更优选小于 $0.3\mu M$ 、甚至更优选小于 $0.2\mu M$ 、最优选小于 $0.1\mu M$ 。例如,实施例 1 的化合物的 EC_{50} 值为约 $0.1\mu M$ 。

[0113] CFI 试验是以病毒包膜蛋白质 E 的定量免疫检测为基础的,作为靶细胞中病毒载量的读数。在 CFI 试验中,本发明化合物显示出对抗登革病毒和黄热病病毒的活性。另外,本发明化合物在 CPE 试验中显示出对抗日本脑炎病毒的活性。在该试验中,本发明化合物的活性是通过评价抑制靶细胞中病毒诱导的 CPE 来确定的。本发明化合物在 HCV 复制子试验中也显示出对抗 HCV 活性。

[0114] 因此,其表明对于治疗病毒感染,例如由黄病毒科的病毒引起的那些感染,例如登革病毒、黄热病病毒、西尼罗河病毒、日本脑炎病毒、蜱媒脑炎病毒、昆金病毒、墨累谷脑炎、圣路易斯脑炎、奥马斯克出血热病毒、牛病毒性腹泻病毒、齐卡病毒和丙型肝炎病毒以及本文描述的其它黄病毒科病毒引起的感染,本发明化合物可以通过常规所用的类似的施用方式以类似的剂量施用于更大的哺乳动物,例如人。

[0115] 另外,应当理解的是,用于治疗 and / 或预防病毒感染的本发明化合物的剂量范围取决于本领域技术人员已知的因素,包括所治疗的宿主、性质和病症的严重程度、施用方式和所用的特别物质。

[0116] 本发明化合物的日剂量将根据所用的化合物、施用方式、所需的治疗和指定的疾病以及其它因素(例如患者年龄、体重、一般健康状况、病症、先前的医疗史和性别以及医

学领域中已知的因素)而不同。例如,本发明化合物以日剂量范围约 0.5mg/kg 体重至约 15mg/kg 体重、例如约 1mg/kg 体重至约 10mg/kg 体重施用。典型的是,对于 70kg 的人,当本发明化合物以日剂量约 0.001g 至约 1.5g、例如不超过约 1g、例如约 0.1g 至约 0.5g,每天至多 4 次施用时,可以获得满意的结果。

[0117] 例如,对于实施例 1 的化合物,对于 70kg 的人,用于治疗登革病毒感染的指定的日剂量是约 200-400mg,优选每天施用一次。

[0118] 对于药物用途,可以应用一种或多种本发明化合物,例如应用一种、或者两种或多种本发明化合物的组合,优选一种本发明化合物。

[0119] 当本发明化合物作为药物施用于患者、例如施用于哺乳动物、例如人时,它们可以以本身施用或者作为药物组合物施用。可以将本发明化合物配制成多种药物形式,用于这些施用目的。对于全身施用的药物,可以应用通常所用的任何适合的组合物。可以将本发明化合物配制用于通过任何适合途径施用,例如口服施用、非肠道施用、通过吸入喷雾剂施用、经皮施用、鼻内施用(例如通过喷雾剂)、局部施用(例如通过散剂、软膏剂或滴剂)、直肠施用、阴道施用、舌下施用、含服或经过植入的储库施用。在某些实例中,本发明化合物是口服施用的。

[0120] 为了制备本发明的药物组合物,将有效量的任选加成盐形式的本发明化合物(作为活性成分)与可药用载体以直接混合物混合。通常,制剂是通过均匀并且直接将本发明化合物与液体载体或精制分开的固体载体或两者混合来制备的,然后,如果需要,将产物成型。可药用载体包括适合将本发明化合物施用于患者的可药用材料、组合物或载体。载体包括液体或固体填充剂、稀释剂、赋形剂、溶剂或包囊材料,其参与将本发明化合物从机体的一个器官或部分携带或转运至机体的另一个器官或部分。取决于施用所需的制剂形式,载体可以采用多种形式。在一定意义上与制剂的其它成分相容并且对患者没有危害的载体是可接受的。适合的载体包括但不限于糖类,例如乳糖、葡萄糖和蔗糖;淀粉,例如玉米淀粉和马铃薯淀粉;纤维素及其衍生物,例如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素和醋酸纤维素;西黄蓍胶粉;麦芽;明胶;滑石粉;赋形剂,例如可可脂和栓剂石蜡;油类,例如花生油、棉籽油、红花油、芝麻油、橄榄油、玉米油和大豆油;二醇类,例如丙二醇;多元醇,例如甘油、山梨醇、甘露醇和聚乙二醇;酯类,例如油酸乙酯和月桂酸乙酯;琼脂;缓冲剂,例如氢氧化镁和氢氧化铝;海藻酸;无热原的水;等渗盐水;林格氏溶液;乙醇;磷酸盐缓冲溶液;在口服液体制剂的情况中,水、二醇类、油类、醇类等;固体载体例如高岭土;其它稀释剂、润滑剂、粘合剂、崩解剂和药物制剂中所用的其它无毒相容物质。

[0121] 在组合物中还可以存在润湿剂、乳化剂和润滑剂,例如月桂基硫酸钠和硬脂酸镁,以及着色剂、释放剂、包衣剂、甜味剂、矫味剂和芳香剂、防腐剂和抗氧化剂。

[0122] 可药用抗氧化剂的实例包括:水溶性抗氧化剂,例如抗坏血酸、盐酸半胱氨酸、硫酸氢钠、焦亚硫酸钠、亚硫酸钠等;油溶性抗氧化剂,例如抗坏血酸棕榈酸酯、丁羟茴醚(BHA)、丁羟甲苯(BHT)、卵磷脂、没食子酸丙酯、 α -生育酚等;以及金属螯合剂,例如柠檬酸、乙二胺四乙酸(EDTA)、山梨醇、酒石酸、磷酸等。

[0123] 优选的药物组合物包括适合口服施用或非肠道注射施用的单位剂型的那些。

[0124] 对于口服施用,可以将化合物配制为固体或液体制剂,例如片剂、胶囊剂、散剂、丸剂、溶液剂、混悬剂、糖浆剂、酏剂、乳剂和分散剂。在制备这些口服剂型中,可以应用任何通

常的药物介质,例如在口服液体剂型的情况中,可以应用水、二醇类、油类、醇类等,或者固体载体,例如淀粉、糖类、高岭土、稀释剂、润滑剂、粘合剂、崩解剂等。可以加入其它组分,例如着色剂、甜味剂或矫味剂。由于它们易于施用,片剂和胶囊剂代表了最有利的口服剂量单位形式,在这种情况下可以应用固体药物载体。

[0125] 适合口服施用的本发明制剂可以是胶囊剂、扁囊剂、丸剂、片剂、锭剂(应用矫味的基质,通常是蔗糖和阿拉伯胶或黄蓍胶)、散剂、颗粒剂、或在水或非水液体中的溶液剂或混悬剂,或者水包油或油包水的液体乳剂,或者酏剂或糖浆剂,或者软锭剂(应用惰性基质,例如明胶和甘油,或蔗糖和阿拉伯胶)和/或漱口剂等形式,每个包含预定量的本发明化合物作为活性成分。本发明化合物还可以作为大丸剂、药糖剂(electuary)或糊剂施用。

[0126] 在口服施用的本发明固体剂型(胶囊剂、片剂、丸剂、糖锭剂、散剂、颗粒剂等)中,将活性成分与一种或多种可药用载体(例如柠檬酸钠或磷酸二钙)和/或任选以下物质混合:填充剂或膨胀剂,例如淀粉、乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露醇和/或硅酸;粘合剂,例如羧甲基纤维素、藻酸盐、明胶、聚乙烯吡咯烷酮、蔗糖和/或阿拉伯胶;保湿剂,例如甘油;崩解剂,例如琼脂、碳酸钙、马铃薯或木薯淀粉、海藻酸、某些硅酸盐类和碳酸钠;溶液阻滞剂,例如石蜡;吸收促进剂,例如季胺类化合物;润湿剂,例如鲸蜡醇和单硬脂酸甘油酯;吸收剂,例如高岭土和皂粘土;润滑剂,例如滑石粉、硬脂酸钙、硬脂酸镁、固体聚乙二醇、月桂基硫酸钠以及它们的混合物;以及着色剂。在胶囊剂、片剂和丸剂的情况中,药物组合物还可以包含缓冲剂。类似类型的固体组合物在软和硬填充的明胶胶囊剂中还作为填充剂应用,应用这些赋形剂,例如乳糖或牛奶糖以及高分子量聚乙二醇等。

[0127] 片剂可以通过任选与一种或多种附加成分压制或模制来制备的。压制片可以是应用粘合剂(例如明胶或羟丙基甲基纤维素)、润滑剂、惰性稀释剂、防腐剂、崩解剂(例如羟乙酸淀粉钠或交联羧甲基纤维素钠)、表面活性或分散剂来制备的。模制片可以通过在适合的装置中模制用惰性液体稀释剂润湿的粉末化合物的混合物来制备的。

[0128] 可以将片剂和本发明的药物组合物的其它固体剂型(例如糖锭剂、胶囊剂、丸剂和颗粒剂)任选压痕或与包衣和外壳、例如肠溶包衣和药物配制领域中众所周知的其它包衣一起制备。还可以将它们配制成能够提供其中的活性成分的缓释或控释,应用例如多种比例的羟丙基甲基纤维素以提供所需的释放特性,其它聚合物基质、脂质体和/或微球。可以将它们通过例如经滤菌器过滤或者通过引入无菌固体组合物形式的灭菌剂(可以将其溶于无菌水中)或者在应用前立即引入某些其它无菌可注射介质来灭菌。这些组合物还可以任选包含遮光剂并且可以是仅释放活性成分的组合物,或者优选在胃肠道的某部分,任选以延缓的方式来释放活性成分的组合物。可以应用的包埋组合物的实例包括聚合物和石蜡。活性成分还可以是微囊形式,如果适合,其与一种或多种上述的赋形剂组合。

[0129] 用于本发明化合物口服施用的液体剂型包括可药用乳剂、微乳剂、溶液剂、混悬剂、糖浆剂和酏剂。除了活性成分,液体剂型可以包含本领域常用的惰性稀释剂,例如水或其它溶剂、增溶剂和乳化剂,例如乙醇、异丙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、苯甲醇、苯甲酸苄酯、丙二醇、1,3-丁二醇、油类(特别是棉籽油、花生油、玉米油、胚芽油、橄榄油、蓖麻油和芝麻油)、甘油、四氢呋喃醇、聚乙二醇和脱水山梨醇脂肪酸酯以及它们的混合物。

[0130] 除了惰性稀释剂,口服组合物还可以包含佐剂,例如润湿剂、乳化剂和助悬剂、甜味剂、矫味剂、着色剂、芳香剂和防腐剂。

[0131] 除了活性化合物,混悬剂可以包含助悬剂,例如乙氧基化异硬脂醇、聚氧乙烯山梨醇和脱水山梨醇酯、微晶纤维素、偏氢氧化铝、皂粘土、琼脂和黄蓍胶以及它们的混合物。

[0132] 用于直肠或阴道施用的本发明药物组合物的制剂可以作为栓剂存在,其是通过将一种或多种本发明化合物与一种或多种适合的、无刺激性的赋形剂或载体(包括例如可可脂、聚乙二醇、栓剂石蜡或水杨酸脂)混合来制备的,并且其在室温下是固体,但是在体温下是液体,因此其在直肠或阴道腔内将熔化并且释放活性化合物。

[0133] 适用于阴道施用的本发明制剂还包括包含本领域已知适合的此类载体的阴道环、卫生栓、乳膏剂、凝胶剂、糊剂、泡沫剂或喷雾制剂。

[0134] 用于局部或经皮施用本发明化合物的剂型包括散剂、喷雾剂、软膏剂、糊剂、乳膏剂、洗剂、凝胶剂、溶液剂、贴剂和吸入剂。可以将活性化合物在无菌条件下与可药用载体以及任何可能需要的防腐剂、缓冲剂或抛射剂混合。

[0135] 除了本发明活性化合物,软膏剂、糊剂、乳膏剂和凝胶剂可以包含赋形剂,例如动物和植物脂肪、油类、蜡类、石蜡、淀粉、黄蓍胶、纤维素衍生物、聚乙二醇、硅酮、皂粘土、硅酸、滑石粉和氧化锌或它们的混合物。

[0136] 除了本发明化合物,散剂和喷雾剂可以包含赋形剂,例如乳糖、滑石粉、硅酸、氢氧化铝、硅酸钙和聚酰胺粉末或者这些物质的混合物。喷雾剂还可以包含常规的抛射剂,例如氯氟烃和挥发性未取代的烃类,例如丁烷和丙烷。

[0137] 经皮贴剂具有额外的优势,能将本发明化合物可控地递送进入机体。此类剂型可以通过将化合物溶于或分散于适合的介质中来制备。还可以应用吸收增强剂以增加穿过皮肤的化合物通量。该通量的速率可以通过提供速率控制膜或者将活性化合物分散在聚合物基质或凝胶中来控制。

[0138] 眼用制剂、眼膏剂、散剂、溶液剂等也包括在本发明范围内。

[0139] 适用于非肠道施用的本发明药物组合物包含一种或多种本发明化合物,与一种或多种可药用无菌等渗水或非水溶液、分散液、混悬液或乳液,或无菌粉末(其可以仅在教育前重新配制成无菌可注射溶液剂或分散剂)组合,其可以包含抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂、能使制剂与预期受试者的血液等渗的溶质或者助悬剂或增稠剂。对于非肠道组合物,载体通常将包含无菌水,尽管有其它成分,但是至少包括大部分,例如以有助于溶解度。例如可以制备可注射溶液剂,其中载体包括盐溶液、葡萄糖溶液或者盐和葡萄糖溶液的混合物。还可以制备可注射混悬剂,在这种情况下,可以应用适合的液体载体、助悬剂等。还包括固体形式制剂,在教育前将其转化为液体形式制剂。

[0140] 可以应用于本发明药物组合物的适合的水和非水载体的实例包括水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇、聚乙二醇等)和它们适合的混合物、植物油(例如橄榄油)以及可注射有机酯(例如油酸乙酯)。适合的流动性可以例如通过应用包衣材料(例如卵磷脂)、在分散剂的情况中通过维持所需的粒径以及通过应用表面活性剂来维持。

[0141] 这些组合物还可以包含佐剂,例如防腐剂、润湿剂、乳化剂和分散剂。防止微生物的作用可以通过包含多种抗菌剂和抗真菌剂(例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚山梨酸等)来保证。组合物还需要包含等渗剂,例如糖、氯化钠等。另外,可注射药物形式的延长吸收可以通过包含延缓吸收的试剂(例如单硬脂酸铝和明胶)来实现。

[0142] 在某些情况中,为了延长药物的作用,需要延缓皮下或肌肉注射的药物的吸收。这

可以通过应用具有弱水溶性的结晶或无定形物质的液体混悬液来实现。然后药物的吸收速率取决于其溶出速率,相反,其可能取决于晶体大小和结晶形式。可选择的是,延缓非肠道施用的药物形式的吸收通过将药物溶于或悬浮于油性载体中而实现。

[0143] 可注射储库形式通过将目标化合物的微囊基质在生物可降解聚合物(例如聚乳酸-乙醇酸交酯)中成型来制备。取决于药物与聚合物的比例和所用的特别聚合物的性质,可以控制药物释放速率。其它生物可降解的聚合物的实例包括聚(原酸酯)和聚(酸酐)。储库可注射制剂还通过将药物包埋于与机体组织相容的脂质体或微乳中来制备。

[0144] 本文所用的术语“非肠道施用”或类似的表示除了肠内和局部施用之外的施用方式,通常通过注射施用,并且包括但不限于静脉内、肌内、动脉内、鞘内、囊内、眶内、心内、真皮内、腹膜内、经气管、皮下、表皮下、关节内、囊下、蛛网膜下、脊柱内和胸骨内注射和输注。

[0145] 取决于施用方式,药物组合物将优选包含 0.05 至 99.5%重量、更优选 0.1 至 70%重量、更优选 30 至 70%重量的活性成分,和 0.05 至 99.95%重量、更优选 0.1 至 70%重量、更优选 30 至 70%重量的可药用载体,所有百分数基于总的组合物。

[0146] 药物组合物还可以包含本领域已知的多种其它成分,例如润滑剂、稳定剂、缓冲剂、乳化剂、粘度调节剂、表面活性剂或防腐剂。

[0147] 为了便于施用和剂量均匀,配制单位剂型的药物组合物是特别有利的。本文所用的单位剂型指的是适合作为单一剂量的物理上分离的单位,每个单位包含预定量的活性成分,计算该量以与所需的药物载体组合产生所需的治疗效果。此类单位剂型的实例是片剂(包括刻痕片或包衣片)、胶囊剂、丸剂、散剂包、糯米纸囊剂、栓剂、可注射溶液剂或混悬剂等,以及它们分开的多组分。

[0148] 本发明化合物可以单独施用或与第二种药物组合施用。

[0149] 另一方面,本发明提供了:

[0150] - 本发明化合物与至少一种第二种药物的组合;

[0151] - 药物组合,该药物组合包含本发明化合物与至少一种第二种药物组合;

[0152] - 药物组合物,该药物组合物包含本发明化合物与至少一种第二种药物以及一种或多种可药用赋形剂组合;

[0153] - 本发明化合物与至少一种第二种药物组合,例如以药物组合或组合物的形式,用于本文定义的任何方法,例如:

[0154] - 组合、药物组合或药物组合物,其包含本发明化合物和至少一种第二种药物,用作药物;

[0155] - 作为本发明化合物与至少一种第二种药物组合应用,例如以药物组合或组合物的形式;

[0156] - 在需要的患者中用于治疗和/或预防病毒感染的方法,该方法包括共同施用、相伴或依次施用治疗有效量的本发明化合物和至少一种第二种药物,例如以药物组合或组合物的形式;

[0157] - 本发明化合物与至少一种第二种药物组合,例如以药物组合或组合物的形式,用于制备用于治疗 and / 或预防病毒感染的药物。

[0158] 本文所用的术语“共同施用”或类似的表示包括将所选的第二种药物施用于单个患者,并且旨在包括治疗方案,其中第二种药物不必通过相同的施用途径或在相同时间施

用。可以将本发明化合物和任何第二种药物配制在分开的剂型中。可选自的是,为了减少施用于患者的剂型数量,可以将本发明化合物和任何第二种药物一起配制在任何组合中。例如,可以将本发明化合物配制成一种剂型并且可以将第二种药物一起配制成另一种剂型。任何分开的剂型可以在相同时间或不同时间施用。

[0159] 组合包括固定组合,其中本发明化合物和至少一种第二种药物在相同制剂中;药盒,其中在相同包装中提供了在分开的制剂中的本发明化合物和至少一种第二种药物,例如带有用于共同施用的说明书;以及游离组合,其中本发明化合物和至少一种第二种药物是分开包装的,但是给出相伴或依次施用的说明书。

[0160] 另一方面,本发明提供了:

[0161] - 药物包装,除了用于组合施用的说明书之外,该药物包装包含第一种药物(其是本发明化合物)和至少一种第二种药物;

[0162] - 药物包装,除了用于组合施用的说明书之外,该药物包装包含本发明化合物和至少一种第二种药物;

[0163] - 药物包装,除了用于组合施用的说明书之外,该药物包装包含至少一种第二种药物和本发明化合物。

[0164] 与单一治疗相比,用本发明的组合的治疗可以提供改善。

[0165] 另一方面,本发明提供了:

[0166] - 药物组合,该药物组合包含一定量的本发明化合物和一定量的第二种药物,其中一定量是适合产生协同治疗作用的;

[0167] - 改善本发明化合物的治疗功效的方法,该方法包括共同施用(例如相伴或依次)治疗有效量的本发明化合物和第二种药物;

[0168] - 改善第二种药物的治疗功效的方法,该方法包括共同施用(例如相伴或依次)治疗有效量的本发明化合物和第二种药物。

[0169] 本发明化合物和第二种药物的组合(作为组合伴侣)可以通过任何常规途径(例如本文对于本发明化合物所述的)施用。第二种药物可以以适合的剂量施用,例如剂量范围类似于单独治疗所用的那些,或者例如在协同的情况中,低于常规剂量范围。

[0170] 可以适当地,例如根据,例如类似于常规方法,或者本文对于本发明组合物所描述的那样提供本文所描述的包含本发明组合的药物组合物和包含第二种药物的药物组合物。

[0171] 两种或多种药物(例如本发明化合物和第二种药物)的有效剂量是一起施用的,或者在可选择的或序列步骤治疗中施用,其中每个药物的有效剂量是连续或依次施用的。通常,第一种选择典型地优于可选择的的治疗,因为其对病毒诱导多重同时存在的应激。给定的剂量将取决于药物的吸收、失活和排泄速度以及其它因素。应当注意的是,剂量值还将随所减轻的病症的严重程度而不同。应当进一步理解的是,对于任何特别的患者,特别剂量方案和时间表可以根据个体需要和施用或指导组合物施用的人的职业判断随时间而调整。

[0172] 在实施这些方法中所需的日剂量将取决于例如所用的本发明化合物、宿主、施用方式、所治疗的病症的严重程度而不同。以上描述了口服施用于患者的适合的日剂量和单位剂型。在剂型中第二种药物的量可以变化很大,并且可以通过常规试验来确定。例如,取决于所需的药理作用,本发明化合物和第二种药物的剂量指定为大约相同数量级,例如对于相同化合物,施用一半,例如单独或与另一种化合物施用。

[0173] 术语“第二种药物”表示化学治疗药物,其可能是或可能不是式(I)或(II)化合物,特别是除了式(I)或(II)化合物之外的任何化学治疗药物。

[0174] 例如,本文所用的第二种药物包括例如具有抗病毒活性、特别是抗黄病毒科活性、最特别是抗登革热或丙型肝炎活性的药物,例如蛋白酶抑制剂、核苷/核苷酸类似物、病毒进入抑制剂、病毒聚合酶抑制剂、免疫调节剂、抗体和逆转录酶抑制剂。此类抗病毒药物包括但不限于利巴韦林、阿糖腺苷、阿昔洛韦、更昔洛韦、扎那米韦、磷酸奥司他韦、泛昔洛韦、阿扎那韦、金刚烷胺、去羟肌苷、依法韦伦、膦甲酸、茚地那韦、拉米夫定、奈非那韦、利托那韦、沙奎那韦、司他夫定、伐昔洛韦、缙更昔洛韦、齐多夫定、替比夫定(telbivudine)、干扰素,例如干扰素- α -2a或干扰素- α -2b,例如 **Intron® A**、**Roferon®**、**Avonex®**、**Rebif®**或**Betaferon®**,复合干扰素、淋巴细胞样干扰素、干扰素 τ 或结合水溶性聚合物或人白蛋白的干扰素,例如 α -干扰素白蛋白(albuferon);拉米夫定,美国专利第6,812,219号和WO 2004/002422 A2中公开的化合物(将该公开的全部内容并入本文作为参考);抗纤维化药物,例如N-苯基-2-噻啉-胺衍生物,例如伊马替尼;免疫调节剂,例如麦考酚酸、其盐或前药,例如麦考酚酸钠或麦考酚酸吗乙酯;或S1P受体激动剂,例如FTY720或其任选磷酸化的类似物,例如EP627406A1、EP778263A1、EP1002792A1、W002/18395、W002/76995、W002/06268、JP2002316985、W003/29184、W003/29205、W003/62252和W003/62248中公开的(将该公开的全部内容并入本文作为参考)。

[0175] 其它第二种药物包括但不限于镇痛药和抗炎化合物,例如NSAID。其它第二种药物的实例包括但不限于对乙酰氨基酚、阿司匹林、双水杨酯、二氟尼柳、布洛芬、酮洛芬、萘丁美酮、吡罗昔康、萘普生、双氯芬酸、吲哚美辛、舒林酸、托美丁、依托度酸、酮咯酸、奥沙普秦和塞来昔布;呋噻米;维生素K;碳酸氢盐;钙;止吐药,例如多潘立酮、甲氧氯普胺、溴必利和阿立必利;雷尼替丁;西咪替丁;法莫替丁;尼扎替丁;雷尼替丁;罗沙替丁;米索前列醇;恩前列素;埃索美拉唑;兰索拉唑;奥美拉唑;泮托拉唑;雷贝拉唑;替那拉唑;甘珀酸;硫酸铝;哌仑西平;抗惊厥药,例如乙酰唑胺、阿普唑仑、异戊巴比妥、卡马西平、加巴喷丁、氯氮、氯巴占、氯美噻唑、氯硝西泮、卡马西平、地西泮、苯妥英、双丙戊酸钠、丙戊酸钠、乙琥胺、氟桂利嗪、磷苯妥英、左乙拉西坦、拉莫三嗪、劳拉西泮、普瑞巴林、硫酸镁、苯巴比妥、咪达唑仑、奥卡西平、扑米酮、氨己烯酸、托吡酯、丙戊酸、丙戊酰胺、唑尼沙胺、佐匹克隆;和雌激素,例如倍美力。

[0176] 本发明化合物可以例如与另外的丙型肝炎病毒调节化合物(其是或不是式(I)或(II))组合用于治疗患者的丙型肝炎病毒相关障碍。

[0177] WO 2005/042020(将其全部内容并入本文作为参考)描述了多种丙型肝炎病毒抑制剂和细胞色素P450(“CYP”)抑制剂的组合。任何适合的CYP抑制剂可以与本发明化合物组合应用。这些CYP抑制剂包括但不限于利托那韦(WO 94/14436,将其全部内容并入本文作为参考)、酮康唑、醋竹桃霉素、4-甲基吡唑、环孢菌素、氯美噻唑、西咪替丁、伊曲康唑、氟康唑、咪康唑、氟伏沙明、氟西汀、奈法唑酮、舍曲林、茚地那韦、奈非那韦、氨普那韦、呋山那韦、沙奎那韦、洛匹那韦、地拉韦啉、红霉素、VX-944和VX-497。优选的CYP抑制剂包括利托那韦、酮康唑、醋竹桃霉素、4-甲基吡唑、环孢菌素和氯美噻唑。

[0178] 测量化合物抑制CYP活性的能力的方法是已知的(参见例如US6,037,157和Yun

等人, Drug Metabolism & Disposition (药物代谢与分布), 第 21 卷, 第 403-407 页 (1993); 将其并入本文作为参考)。例如, 可以将用于评价的化合物与 0.1、0.5 和 1.0mg 蛋白质 /mL 或者其它适合浓度的人肝微粒体 (例如可商购获得的混合的特征肝微粒体) 在产生 NADPH 体系的存在下培养 0、5、10、20 和 30 分钟或其它适合的时间。对照培养是在没有肝微粒体的存在下进行 0 和 30 分钟 (三份)。样品可以在化合物的存在下分析。产生化合物代谢线性速率的培养条件将被用作其它研究的指导。可以应用本领域已知的试验来确定化合物代谢的动力学 (K_m 和 V_{max})。可以确定化合物的消除速率并且根据 Michaelis-Menten 动力学, 通过应用 Lineweaver-Burk、Eadie-Hofstee 或非线性回归分析来分析数据。

[0179] 然后进行代谢抑制试验。例如, 可以将化合物 (一个浓度, $\leq K_m$) 与混合的人肝微粒体在 CYP 抑制剂 (例如利托那韦) 不存在或存在下、在以上确定的条件下培养。正如所公认的, 对照培养可以包含与用 CYP 抑制剂培养相同浓度的有机溶剂。可以定量样品中的化合物的浓度, 并且可以确定母体化合物的消除速率, 速率表示为对照活性的百分数。

[0180] 评价个体中共同施用本发明化合物和 CYP 抑制剂的影响的方法也是已知的 (参见例如 US2004/0028755; 将其并入本文作为参考)。任何此类方法可以与本发明结合用于确定组合的药物代谢动力学影响。然后选择将从本发明的治疗中获益的个体。

[0181] 因此, 本发明的一个实施方案提供了施用 CYP3A4 的抑制剂和本发明化合物的方法。本发明的另一个实施方案提供了施用同工酶 3A4 (“CYP3A4”)、同工酶 2C19 (“CYP2C19”)、同工酶 2D6 (“CYP2D6”)、同工酶 1A2 (“CYP1A2”)、同工酶 2C9 (“CYP2C9”) 或同工酶 2E1 (“CYP2E1”) 的抑制剂的方法。

[0182] 应当理解的是, 在人体内能广泛观察到 CYP3A4 活性。因此, 涉及抑制同工酶 3A4 的本发明的实施方案将预期可应用于大范围的患者。

[0183] 因此, 本发明提供了以下方法, 其中 CYP 抑制剂与本发明化合物在相同的剂型或分开的剂型中一起施用。

[0184] 如以上所示, 所用的关于第二种药物的日剂量将取决于例如所用的化合物、宿主、施用方式和所治疗的病症的严重程度而不同。例如, 拉米夫定可以以日剂量 100mg 施用。聚乙二醇化的干扰素可以每周 1 至 3 次、优选每周 1 次以总的周剂量范围 200 至 1000 万 IU、更优选 500 至 1000 万 IU、最优选 800 至 1000 万 IU 非肠道施用。由于可以应用的第二种药物的不同类型, 量可以变化很大, 并且可以通过上述的常规试验确定。

[0185] 目前治疗丙型肝炎的护理标准是聚乙二醇化的干扰素 α 和利巴韦林的组合, 其中推荐剂量是 1.5 μ g/kg/wk 聚乙二醇化的干扰素 α -2b 或 180 μ g/wk 聚乙二醇化的干扰素 α -2a, 对于基因型 1 的患者, 每天加上 1000 至 1200mg 利巴韦林, 施用 48 周; 或者对于基因型 2/3 的患者, 每天加上 800mg 利巴韦林, 施用 24 周。

[0186] 本发明化合物和第二种药物可以通过任何常规途径施用, 特别是肠内施用, 例如口服, 例如以饮用的溶液剂、片剂或胶囊的形式, 或者非肠道施用, 例如以可注射溶液剂或混悬剂的形式。

[0187] 干扰素与水溶性聚合物的结合物意指特别包括与聚环氧烷均聚物例如聚乙二醇 (PEG) 或聚丙二醇、聚氧乙烯化的多元醇、它们的共聚物和它们的嵌段共聚物的结合物。作为可选择的基于聚环氧烷的聚合物, 可以应用有效的无抗原材料, 例如右旋糖苷、聚乙烯吡咯烷酮、聚丙烯酰胺、聚乙烯醇、基于碳水化合物的聚合物等。此类干扰素-聚合物的结合

物在美国专利第 4,766,106、4,917,888 号、欧洲专利申请第 0 236 987 号、欧洲专利申请第 0 510 356 号和国际申请公布第 WO 95/13090 号中描述,将其公开的全部内容并入本文作为参考。由于聚合物修饰充分地降低了抗原响应,因此外来干扰素无需完全是自体的。用于制备聚合物结合物的干扰素可以由哺乳动物提取物(例如人、反刍动物或牛干扰素)制备,或者重组制备。优选的是干扰素与聚乙二醇的结合物,也称为聚乙二醇化的干扰素。

[0188] 特别优选的干扰素结合物是聚乙二醇化的 α -干扰素,例如聚乙二醇化的干扰素- α -2a、聚乙二醇化的干扰素- α -2b;聚乙二醇化的复合干扰素或聚乙二醇化的纯化的干扰素 α 产品。聚乙二醇化的干扰素- α -2a 例如在欧洲专利 593,868(将其全部内容并入本文作为参考)中描述并且是可商购获得的,例如商品名为 **PEGASYS[®]**(Hoffmann-La Roche)。聚乙二醇化的干扰素- α -2b 例如在欧洲专利 975,369(将其全部内容并入本文作为参考)中描述并且是可商购获得的,例如商品名为 PEG-**INTRON A[®]**(Schering Plough)。聚乙二醇化的复合干扰素在 WO 96/11953(将其全部内容并入本文作为参考)中描述。优选的聚乙二醇化的 α -干扰素是聚乙二醇化的干扰素- α -2a 和聚乙二醇化的干扰素- α -2b。还优选聚乙二醇化的复合干扰素。

[0189] 其它优选的第二种药物包括干扰素的融合蛋白,例如干扰素- α -2a、干扰素- α -2b、复合干扰素或纯化的干扰素- α 产品的融合蛋白,它们每种是与另一种蛋白质融合的。某些优选的融合蛋白包括美国专利 6,973,322 和国际公布 W002/60071、W005/003296 和 W005/077042(Human GenomeSciences)中描述的干扰素(例如干扰素- α -2b)和白蛋白。优选的与人白蛋白结合的干扰素是 α -干扰素白蛋白(Human Genome Sciences)。

[0190] 环孢菌素类(其强力地与亲环蛋白结合,但是没有免疫抑制)包括美国专利 5,767,069 和 5,981,479 中叙述的那些环孢菌素类,并且将其并入本文作为参考。[MeIle]⁴⁻环孢菌素是优选的非免疫抑制的环孢菌素。某些其它环孢菌素衍生物在 W02006039668(Scynexis)和 W02006038088(Debiopharm SA)中描述,并且将其并入本文作为参考。当环孢菌素在混合淋巴细胞反应(MLR)中的活性不超过环孢菌素 A 的活性的 5%,优选不超过 2%时,环孢菌素被认为是非免疫抑制的。混合淋巴细胞反应是由 T. Meo 在“Immunological Methods(免疫学方法)”,L. Lefkovits 和 B. Peris 编辑,Academic Press, N. Y. 第 227-239 页(1979)中描述。将 Balb/c 小鼠(雌性,8-10 周)的脾细胞(0.5×10^6 个)与 0.5×10^6 个辐照的(2000 rads)或丝裂霉素 C 处理的 CBA 小鼠(雌性,8-10 周)的脾细胞共同培养。辐射的同种异型细胞诱导 Balb/c 脾细胞的增殖响应,其可以通过掺入 DNA 中的标记前体测量。由于刺激细胞是受辐射的(或丝裂霉素 C 处理的),因此它们对 Balb/c 细胞的增殖没有响应,但是保留了它们的抗原性。将试验化合物在 MLR 中测得的 IC₅₀ 与环孢菌素 A 在平行试验中测得的进行比较。另外,非免疫抑制的环孢菌素缺乏抑制 CN 和下游 NF-AT 通路的能力。[MeIle]⁴⁻环孢菌素是本发明优选应用的非免疫抑制结合亲环蛋白的环孢菌素。

[0191] 利巴韦林(1- β -D-呋喃核糖基-1- β -D-三唑-3-甲酰胺)是合成的、非干扰素诱导的、广谱抗病毒核苷类似物,商品名为 Virazole(The Merck Index,第 11 版,编辑: Budavar, S, Merck & Co., Inc., Rahway, NJ,第 1304 页,1989)。美国专利第 3,798,209 和 RE29,835 号(将其全部内容并入本文作为参考)公开和要求了利巴韦林。利巴韦林在结

构上与鸟苷类似,并且具有体外对抗数种 DNA 和 RNA 病毒(包括黄病毒科)的活性(Gary L. Davis, Gastroenterology 118 :S104-S114, 2000)。

[0192] 其它组合包括本发明化合物与非免疫抑制的结合亲环蛋白的环孢菌素、与麦考酚酸、其盐或前药和/或与 S1P 受体激动剂(例如 FTY720)的那些组合。

[0193] 可以与本发明化合物组合应用的第二种药物的另外的实例包括:

[0194] (1) 干扰素,包括干扰素 α -2a 或 2b 和聚乙二醇化的(PEG)干扰素 α -2a 或 2b, 例如:

[0195] (a) **Intron-A®**, 干扰素 α -2b (Schering Corporation, Kenilworth, NJ);

[0196] (b) **PEG-Intron®**, 聚乙二醇化的干扰素 α -2b (Schering Corporation, Kenilworth, NJ);

[0197] (c) **Roferon®**, 重组干扰素 α -2a (Hoffmann-La Roche, Nutley, NJ);

[0198] (d) **Pegasys®**, 聚乙二醇化的干扰素 α -2a (Hoffmann-La Roche, Nutley, NJ);

[0199] (e) **Berefor®**, 可获得的干扰素 α -2 (Boehringer Ingelheim Pharmaceutical, Inc., Ridgefield, CT);

[0200] (f) **Sumiferon®**, 纯化的天然 α 干扰素的混合物 (Sumitomo, Japan);

[0201] (g) **Wellferon®**, 淋巴细胞样干扰素 α n1 (GlaxoSmithKline);

[0202] (h) **Infergen®**, 复合 α 干扰素 (InterMune Pharmaceuticals, Inc., Brisbane, CA)

[0203] (i) **Alferon®**, 天然 α 干扰素的混合物 (Interferon Sciences, and PurdueFrederick Co., CT);

[0204] (j) **Viraferon®**;

[0205] (k) 复合 α 干扰素, 来自 Amgen, Inc., Newbury Park, CA。

[0206] 其它形式的干扰素包括: 干扰素 β 、 γ 、 τ 和 ω , 例如 Serono 的 Rebif(干扰素 β -1a)、Viragen 的 Omniferon(天然干扰素)、Ares-Serono 的 REBIF(干扰素 β -1a)、BioMedicines 的 ω 干扰素、Amarillo Biosciences 的口服干扰素 α 、与水溶性聚合物或人白蛋白结合的干扰素, 例如 α -干扰素白蛋白 (Human Genome Sciences)、抗病毒药物、复合干扰素、羊或牛干扰素- τ 。

[0207] 干扰素与水溶性聚合物的结合物指的是特别包括与聚环氧烷均聚物例如聚乙二醇 (PEG) 或聚丙二醇、聚氧乙烯化多元醇、其共聚物和其嵌段共聚物的结合物。作为可选择的基于聚环氧烷的聚合物, 可以应用有效的无抗原材料, 例如右旋糖苷、聚乙烯吡咯烷酮、聚丙烯酰胺、聚乙烯醇、基于碳水化合物的聚合物等。由于聚合物修饰充分地降低了抗原反应, 因此外来干扰素无需完全是自体的。用于制备聚合物结合物的干扰素可以由哺乳动物提取物(例如人、反刍动物或牛干扰素)制备, 或者重组制备。优选的是, 干扰素与聚乙二醇的结合物, 也称为聚乙二醇化的干扰素。

[0208] (2) 利巴韦林, 例如来自 Valeant Pharmaceuticals, Inc., Costa Mesa 的利巴韦林 (1- β -D-呋喃核糖基-1H-1,2,4-三唑-3-甲酰胺); 来自 Schering Corporation,

Kenilworth, NJ 的 **Rebetol®**和来自 Hoffmann-La Roche, Nutley, NJ 的 **Copegus®**;以及在研的新利巴韦林类似物,例如 Valeant 的 Levovirin 和 Viramidine。

[0209] (3) 噻唑烷衍生物,其在用 NS3/4A 融合蛋白和 NS5A/5B 底物的反相 HPLC 试验中显示出相关抑制 (Sudo K. 等人, Antiviral Research, 1996, 32, 9-18), 特别是化合物 RD-1-6250 (具有被长烷基链取代的稠合的肉桂酰基)、RD4 6205 和 RD4 6193。

[0210] (4) 噻唑烷和苯甲酰苯胺,其在 Kakiuchi N. 等人, J. FEBS Letters 421, 217-220; Takeshita N. 等人, Analytical Biochemistry, 1997, 247, 242-246 中鉴定。

[0211] (5) 菲醌,其在 SDS-PAGE 和放射自显影试验中具有对抗蛋白酶的活性,其是从链霉菌属物种 (*Streptomyces* sp.) 的发酵培养基中分离的, Sch68631 (Chu M. 等人, Tetrahedron Letters, 1996, 37, 7229-7232) 和 Sch351633, 其是从灰黄青霉菌 (*Penicillium griseofulvum*) 中分离的,其在闪烁逼近试验中显示出活性 (Chu M. 等人, Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters 9, 1949-1952)。

[0212] (6) 蛋白酶抑制剂;实例包括基于底物的 NS3 蛋白酶抑制剂 (Attwood 等人, Antiviral peptide derivatives (抗病毒肽衍生物), PCT WO 98/22496, 1998; Attwood 等人, Antiviral Chemistry and Chemotherapy (抗病毒化学和化学治疗) 1999, 10, 259-273; Attwood 等人, Preparation and use of amino acid derivatives as anti-viral agents (作为抗病毒药物的氨基酸衍生物的制备和用途), 德国专利公布 DE 19914474; Tung 等人, Inhibitors of serine proteases, particularly hepatitis C virus NS3 protease (丝氨酸蛋白酶、特别是丙型肝炎病毒 NS3 蛋白酶的抑制剂); PCT WO 98/17679), 包括 α 酮酰胺类和胍基脲类,以及能终止亲电子物质 (例如硼酸和磷酸酯) 的抑制剂 (Llinas-Brunet 等人, Hepatitis C inhibitor peptide analogues (丙型肝炎抑制剂肽类似物), PCT WO 99/07734) 正在研究之中。

[0213] 基于非底物的 NS3 蛋白酶抑制剂,例如 2,4,6-三羟基-3-硝基-苯甲酰胺衍生物 (Sudo K. 等人, Biochemical and Biophysical Research Communications, 1997, 238 643-647; Sudo K. 等人, Antiviral Chemistry and Chemotherapy, 1998, 9, 186), 包括 RD3-4082 和 RD3-4078, 前者在酰胺上被 14 碳链取代和后者具有对苯氧基苯基也正在研究之中。

[0214] Sch 68631 (菲醌) 是丙型肝炎病毒蛋白酶抑制剂 (Chu M 等人, Tetrahedron Letters 37:7229-7232, 1996)。在同一个作者的另一个实例中, Sch 351633 (从真菌灰黄青霉菌中分离的) 鉴定为蛋白酶抑制剂 (Chu M. 等人, Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters 9:1949-1952)。通过设计基于高分子水蛭蛋白酶抑制剂 c 的选择性抑制剂,已经获得对抗丙型肝炎病毒 NS3 蛋白酶的纳摩尔能力。水蛭蛋白酶抑制剂 c (从水蛭中分离) 是数种丝氨酸蛋白酶例如灰色链霉菌 (*S. griseus*) 蛋白酶 A 和 B、 ∇ -胰凝乳蛋白酶、类胰凝乳蛋白酶和枯草杆菌蛋白酶) 的有效的抑制剂 (Qasim M. A. 等人, Biochemistry 36:1598-1607, 1997)。

[0215] 公开用于治疗丙型肝炎病毒的蛋白酶抑制剂的美国专利包括例如美国专利第 6,004,933 号, Spruce 等人 (将其全部内容并入本文作为参考), 其公开了一类用于抑制丙型肝炎病毒内肽酶 2 的半胱氨酸蛋白酶抑制剂; 美国专利第 5,990,276 号, Zhang 等人 (将其全部内容并入本文作为参考), 其公开了丙型肝炎病毒 NS3 蛋白酶的合成抑制剂; 美国专

利第 5, 538, 865 号, Reyes 等人 (将其全部内容并入本文作为参考)。作为丙型肝炎病毒的 NS3 丝氨酸蛋白酶抑制剂的肽类公开于 WO 02/008251 (Corvas International, Inc.) 以及 WO 02/08187 和 WO 02/008256 (Schering Corporation) 中, (将其全部内容并入本文作为参考)。丙型肝炎病毒抑制剂三肽公开于美国专利第 6, 534, 523、6, 410, 531 和 6, 420, 380 号 (Boehringer Ingelheim) 以及 W002/060926 (Bristol Myers Squibb) 中, (将其全部内容并入本文作为参考)。作为丙型肝炎病毒的 NS3 丝氨酸蛋白酶抑制剂的二芳基肽类公开于 W002/48172 (Schering Corporation) 中, (将其并入本文作为参考)。作为丙型肝炎病毒的 NS3 丝氨酸蛋白酶抑制剂的咪唑啉酮公开于 W002/18198 (Schering Corporation) 和 WO 02/48157 (Bristol Myers Squibb) 中, (将其全部内容并入本文作为参考)。WO 98/17679 (Vertex Pharmaceuticals) 和 WO 02/48116 (Bristol Myers Squibb) 也公开了丙型肝炎病毒蛋白酶抑制剂 (将其全部内容并入本文作为参考)。

[0216] 丙型肝炎病毒 NS3-4A 丝氨酸蛋白酶抑制剂, 包括 BoehringerIngelheim 的 BILN 2061、Vertex 的 VX-950、Schering-Plough 的 SCH 6/7 以及目前处于临床前研究的其它化合物。

[0217] 基于底物的 NS3 蛋白酶抑制剂, 包括 α 酮酰胺类和胍基脲类, 以及能终止亲电子物质 (例如硼酸和磷酸酯) 的抑制剂; 基于非底物的 NS3 蛋白酶抑制剂, 例如 2, 4, 6- 三羟基 -3- 硝基 - 苯甲酰胺衍生物, 包括 RD3-4082 和 RD3-4078, 前者在酰胺上被 14 碳链取代并且后者具有对苯氧基苯基; 以及 Sch68631、菲醌、丙型肝炎病毒蛋白酶抑制剂。

[0218] Sch 351633 (从真菌灰黄青霉菌中分离) 被鉴定为蛋白酶抑制剂。水蛭蛋白酶抑制剂 c (从水蛭中分离) 是数种丝氨酸蛋白酶 (例如灰色链霉菌蛋白酶 A 和 B、 α - 胰凝乳蛋白酶、类胰凝乳蛋白酶和枯草杆菌蛋白酶) 的有效的抑制剂。

[0219] 美国专利第 6004933 号 (将其全部内容并入本文作为参考) 公开了一类用于抑制丙型肝炎病毒内肽酶 2 的半胱氨酸蛋白酶抑制剂; 丙型肝炎病毒 NS3 蛋白酶的合成抑制剂; 丙型肝炎病毒抑制剂三肽; 二芳基肽, 例如丙型肝炎病毒的 NS3 丝氨酸蛋白酶抑制剂; 作为丙型肝炎病毒的 NS3 丝氨酸蛋白酶抑制剂的咪唑啉二酮。

[0220] 噻唑烷和苯甲酰苯胺。噻唑烷衍生物, 其在用 NS3/4A 融合蛋白和 NS5A/5B 底物的反相 HPLC 试验中显示出相关抑制, 特别是化合物 RD-16250 (具有被长烷基链取代的稠合的肉桂酰基)、RD4 6205 和 RD4 6193。

[0221] 菲醌, 其在 SDS-PAGE 和放射自显影试验中具有对抗蛋白酶的活性, 其是从链霉菌属物种的发酵培养基中分离的, Sch 68631 和 Sch 351633, 其是从灰黄青霉菌中分离的, 其在闪烁逼近试验中显示出活性。

[0222] (7) 丙型肝炎病毒 NS5B RNA- 依赖性 RNA 聚合酶的核苷或非核苷抑制剂, 例如 WO 2004/002422 A2 中公开的 2' -C- 甲基 -3' -O-L- 缬氨酸酯呋喃核糖基胞苷 (Idenix) (将其全部内容并入本文作为参考)、R803 (Rigel)、JTK-003 (Japan Tobacco)、HCV-086 (ViroPharma/Wyeth) 和目前处于临床前研究的其它化合物;

[0223] 胶霉毒素和天热产物浅蓝菌素;

[0224] 2' - 氟核苷;

[0225] WO 02/057287 A2、WO 02/057425 A2、WO 01/90121、WO 01/92282 和美国专利第 6, 812, 219 号公开的其它核苷类似物, 将其公开的全部内容并入本文作为参考。

[0226] Idenix Pharmaceuticals 在国际公布第 WO 01/90121 和 WO 01/92282 号中公开了支链核苷在治疗虫媒病毒（包括丙型肝炎病毒）和瘟病毒中的用途（将其全部内容并入本文作为参考）。特别是，Idenix 公布中公开了治疗人和其它宿主动物的丙型肝炎感染（以及虫媒病毒和瘟病毒）的方法，该方法包括施用有效量的生物活性 1'、2'、3' 或 4' - 支链 β -D 或 β -L 核苷或其可药用盐或前药，单独施用或与另一种抗病毒药物组合施用，任选在可药用载体中。某些优选的生物活性 1'、2'、3' 或 4' - 支链 β -D 或 β -L 核苷（包括替比夫定）在美国专利 6,395,716 和 6,875,751 中描述，将每个并入本文作为参考。

[0227] 其它公开了某些核苷类似物在治疗丙型肝炎病毒中的用途的专利申请包括 BioChem Pharma, Inc.（现在为 Shire Biochem, Inc.）提交的 PCTCA00/01316 (WO 01/32153; 2000 年 11 月 3 日提交) 和 PCT/CA01/00197 (WO 01/60315; 2001 年 2 月 19 日提交); Merck & Co., Inc. 提交的 PCT/US02/01531 (WO 02/057425; 2002 年 1 月 18 日提交) 和 PCT/US02/03086 (WO 02/057287; 2002 年 1 月 18 日提交); Roche 提交的 PCT/EP01/09633 (WO 02/18404; 2001 年 8 月 21 日公布); 以及 Pharmasset, Ltd 的 PCT 公布第 WO 01/79246 (2001 年 4 月 13 日提交)、W002/32920 (2001 年 10 月 18 日提交) 和 WO 02/48165,（将其公开的全部内容并入本文作为参考）。

[0228] Emory University 的 PCT 公布第 WO 99/43691 号（将其公开的全部内容并入本文作为参考），标题为“2'-氟核苷”，公开了某些 2'-氟核苷在治疗丙型肝炎病毒中的用途。

[0229] Eldrup 等人 (Oral Session V, Hepatitis C Virus, Flaviviridae; 16th International Conference on Antiviral Research (2003 年 4 月 27 日, Savannah, GA)) 描述了 2'-修饰的核苷在抑制丙型肝炎病毒中的结构活性关系。

[0230] Bhat 等人 (Oral Session V, Hepatitis C Virus, Flaviviridae, 2003 (Oral Session V, Hepatitis C Virus, Flaviviridae; 16th International conference on Antiviral Research (2003 年 4 月 27 日, Savannah, Ga); p A75) 描述了作为丙型肝炎病毒 RNA 复制的可能的抑制剂的核苷类似物的合成和药物代谢动力学性质。作者报道了 2'-修饰的核苷在基于细胞的复制子试验中显示出有效的抑制活性。

[0231] Olsen 等人 (Oral Session V, Hepatitis C Virus, Flaviviridae; 16th International Conference on Antiviral Research (2003 年 4 月 27 日, Savannah, Ga) p A76) 还描述了 2'-修饰的核苷对丙型肝炎病毒 RNA 复制的作用。

[0232] (8) 核苷酸聚合酶抑制剂和胶霉毒素 (Ferrari R 等人, Journal of Virology, 1999, 73, 1649-1654), 和天然产物浅蓝菌素 (Lohmann V. 等人, Virology, 1998, 249, 108-118)。

[0233] (9) 丙型肝炎病毒 NS3 解旋酶抑制剂, 例如 ViroPharma 的 VP_50406 和 Vertex 的化合物。其它解旋酶抑制剂 (Diana G.D. 等人, Compounds, compositions and methods for treatment of hepatitis C (治疗丙型肝炎的化合物、组合物和方法), 美国专利第 5,633,358 号 (将其全部内容并入本文作为参考); Diana G.D. 等人, Piperidine derivatives, pharmaceutical compositions thereof and their use in the treatment of hepatitis C (哌啶衍生物、其药物组合物以及它们在治疗丙型肝炎中的用途), WO 97/36554)。

[0234] (10) 反义硫代磷酸寡脱氧核苷酸 (S-ODN), 与病毒的 5' 非编码区 (NCR) 中的伸

展序列 (Alt M. 等人, Hepatology, 1995, 22, 707-717), 或核苷酸 326-348 (包括 NCR 的 3' 末端) 和位于丙型肝炎病毒 RNA 的核心编码区的核苷酸 371-388 (Alt M. 等人, Archives of Virology, 1997, 142, 589-599; Galderisi U. 等人, Journal of Cellular Physiology, 199, 181, 251-257) 互补; 例如 Isis Pharm/Elan 的 ISIS 14803、Hybridon 的反义序列、AVI bioPharma 的反义序列。

[0235] (11) IRES- 依赖性翻译的抑制剂 (Ikeda N 等人, Agent for the prevention and treatment of hepatitis C (预防和治疗丙型肝炎的药物), 日本专利公布 JP-08268890; Kai Y 等人, Prevention and treatment of viral diseases (病毒疾病的预防和治疗), 日本专利公布 JP-10101591); 例如 Isis Pharm/Elan 的 ISIS 14803、Anadys 的 IRES 抑制剂、Immusol 的 IRES 抑制剂、PTC Therapeutics 的靶向的 RNA 化学。

[0236] (12) 核酶, 例如核酸酶抵抗的核酶 (Maccjak, D. J. 等人, Hepatology 1999, 30, 摘要 995) 和美国专利第 6,043,077 号 (Barber 等人) 和美国专利第 5,869,253 和 5,610,054 号 (Draper 等人) 中指出的那些 (将其全部内容并入本文作为参考), 例如 RPI 的 HEPTAZYME。

[0237] (13) 直接对抗丙型肝炎病毒基因组的 siRNA。

[0238] (14) 任何其它机制的丙型肝炎病毒复制抑制剂, 例如 ViroPharma/Wyeth 的 VP50406、Achillion, Arrow 的抑制剂。

[0239] (15) 丙型肝炎病毒生命周期中的其它靶标 (包括病毒进入、组装和成熟) 的抑制剂。

[0240] (16) 免疫调节剂, 例如 IMPDH 抑制剂、麦考酚酸、其盐或前药、麦考酚酸钠或麦考酚酸吗乙酯或美泊地布 (Merimebodib) (VX-497); 胸腺素 α -1 (SciClone 的日达仙); 或 S1P 受体激动剂, 例如 FTY720 或其类似物, 任选磷酸化。

[0241] (17) 抗纤维化药物, 例如 N- 苯基 -2- 嘧啶 - 胺衍生物, 伊马替尼 (Glivec)、Indevus 的 IP-501 和 InterMune 的干扰素 γ -1b。

[0242] (18) Intercell, Epimmune/Genecor, Merix, Tripep (Chron-VacC) 的治疗疫苗; Avant 的免疫疗法 (Therapore); CellExSys 的 T 细胞疗法; STL 的单克隆抗体 XTL-002、Anadys 的 ANA 246 和 ANA 246。

[0243] (19) 其它各种化合物, 包括 1-氨基-烷基环己烷 (美国专利第 6,034,134 号, Gold 等人)、烷基类脂 (美国专利第 5,922,757 号, Chojkier 等人)、维生素 E 和其它抗氧化剂 (美国专利第 5,922,757 号, Chojkier 等人)、金刚烷胺、胆酸 (美国专利第 5,846,999 号, Ozeki 等人)、N-(磷酸基乙酰基)-L- 天冬氨酸 (美国专利第 5,830,905 号, Diana 等人)、苯二甲酰胺 (美国专利第 5,633,388 号, Diane 等人)、聚腺苷酸衍生物 (美国专利第 5,496,546 号, Wang 等人)、2',3'- 双脱氧肌苷 (美国专利第 5,026,687 号, Yarchoan 等人)、苯并咪唑类 (美国专利第 5,891,874 号, Colacino 等人)、植物提取物 (美国专利第 5,837,257 号, Tsai 等人; 美国专利第 5,725,859 号, Omer 等人; 和美国专利第 6,056,961 号) 和嘧啶类 (美国专利第 5,830,905 号, Diana 等人); 将其全部内容并入本文作为参考。还包括角鲨烯、替比夫定、N-(磷酸基乙酰基)-L- 天冬氨酸、苯二甲酰胺、聚腺苷酸衍生物、糖基化抑制剂和非特异细胞保护药 (能阻止由病毒感染引起的细胞损伤)。

[0244] (20) 目前在临床前或临床研究中用于治疗丙型肝炎病毒的任何其它化合物, 包

括白细胞介素-10(Schering-Plough)、Endo Labs Solvay 的金刚烷胺(盐酸金刚烷胺制剂(Symmetrel))、Idun Pharma 的胱天蛋白酶抑制剂 IDN-6556、Chiron 的 HCV/MF59、NABI 的 CIVACIR(丙型肝炎免疫球蛋白)、Maxim 的 CEPLANE(组胺二氯化物)、Idun PHARM 的 IDN-6556、Tularik 的 T67(β -微管蛋白抑制剂)、Innogenetics 的针对 E2 的治疗疫苗、Fujisawa Helathcare 的 FK788、Trimeris 的 IdB1016(Siliphos,口服水飞蓟宾-磷脂酰胆碱磷脂复合物(phytosome))(融合抑制剂)、Immtech 的 Dication、Aethlon Medical 的 hemopurifier、United Therapeutics 的 UT231B。

[0245] (21) T1R7(tol1 样受体)的嘌呤核苷类似物拮抗剂,由 Anadys 开发,例如 Isotorabine(ANA245)和它的前药(ANA975),其在欧洲申请 EP348446 和 EP636372、国际公布 W003/045968、W005/121162 和 W005/25583 以及美国专利 6/973322 中描述,将每个并入本文作为参考。

[0246] (21) 非核苷抑制剂,由 Genelabs 开发并且在国际公布 W02004/108687、W02005/12288 和 W02006/076529 中描述,将每个并入本文作为参考。

[0247] (22) 其它第二种药物(例如,非免疫调节或免疫调节化合物),其可以与本发明化合物组合应用,包括但不限于 W0 02/18369 中说明的那些,将其并入本文作为参考。

[0248] 另一方面,本发明提供了方法,该方法包括施用本发明化合物和另一种抗病毒药物、优选抗黄病毒科、例如抗登革热或抗丙型肝炎病毒药物。此类抗病毒药物包括但不限于免疫调节剂,例如 α 、 β 和 δ 干扰素、聚乙二醇化的衍生的干扰素-a 化合物和胸腺素;其它抗病毒药物,例如利巴韦林、金刚烷胺和替比夫定;其它丙型肝炎蛋白酶抑制剂(NS2-NS3 抑制剂和 NS3-NS4A 抑制剂);黄病毒科生命周期中的其它靶标的抑制剂,包括解旋酶、聚合酶和金属蛋白酶抑制剂;内部核糖体进入抑制剂;广谱病毒抑制剂,例如 IMPDH 抑制剂(例如,美国专利 5,807,876、6,498,178、6,344,465、6,054,472、W0 97/40028、W0 98/40381、W0 00/56331 的化合物,以及麦考酚酸及其衍生物,并且包括但不限于 VX-497、VX-148 和 / 或 VX-944);或任何以上的组合。

[0249] 本发明组合的每个组分可以是分开、一起或以其任何组合来施用的。技术从业人员所公认的是,干扰素的剂量典型地以 IU 来测量(例如,约 400 万 IU 至约 1200 万 IU)。

[0250] 每个组分可以以一个或多个剂型施用。每个剂型可以以任何顺序施用于患者。

[0251] 应当理解的是,本文公开的任何亚范围(例如关于 X、R1、R2、R3、R4、R5、R6 和 / 或 R7)可以与本文公开的任何其它亚范围组合,以产生进一步的亚范围。

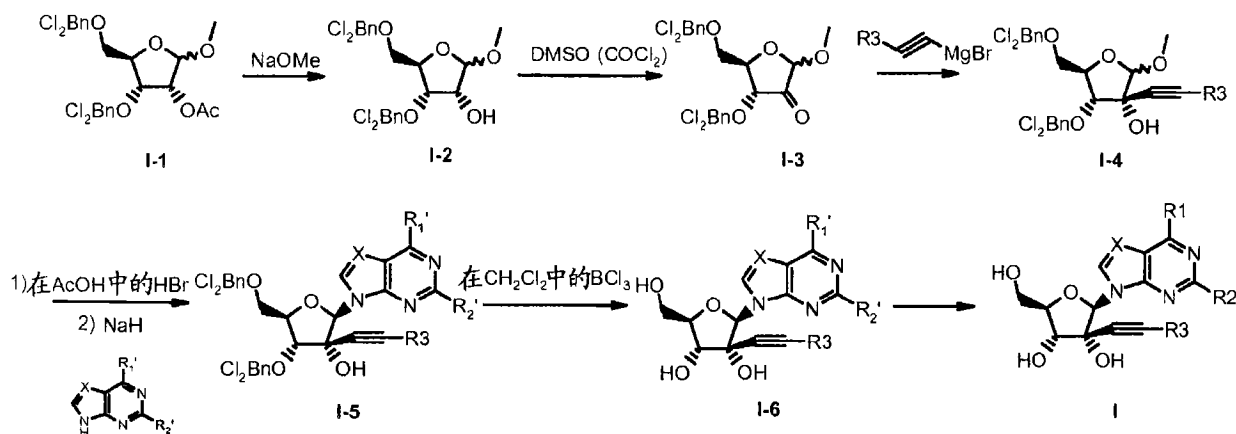
[0252] 以下通用方法可以用于制备式(I)和(II)化合物。参考以下描述的特别实施例,本发明的特别化合物的制备对于本领域技术人员来说是显而易见的。对于本文没有特别描述的任何特别方法,其可以以常规或已知的方法或以与已知方法类似的方法来进行。

[0253] 通用方法 1

[0254] 中间体化合物 1-4 可以根据通用方法 1 制备,并且与任何适合的碱基团偶联以获得本发明化合物。通用方法 1 应用二保护的(在 4-羟基和 5-羟基甲基取代基)4-羟基-5-羟基甲基-2-甲氧基-四氢呋喃-3-乙酸酯,例如 (3R,4R,5R)-4-(2,4-二氯苄基氧基)-5-(2,4-二氯苄基氧基甲基)-2-甲氧基-四氢呋喃-3-乙酸酯作为原料。乙酸酯基团是在碱性条件下除去的,例如应用 NaOMe 或另一种适合的碱,例如醇钠或碳酸钾。氧化步骤可以应用任何适合的氧化剂/条件(例如 Swern 氧化、TEMPO 或 Dess-Martin 过碘烷)

进行,以获得呋喃-3-酮。转化为亚炔基可以应用适合的格氏试剂(例如炔基卤化镁,例如炔基溴化镁,例如乙炔基溴化镁)或用有机锂试剂(例如炔基锂试剂,例如乙炔基锂)来完成。可以将化合物 1-4 与任何适合的碱基团偶联,所述的碱基团例如腺嘌呤或鸟嘌呤衍生物,其中 $X = N$ 、 CH 或 CR_4 , $R_1' =$ 卤素、 NR_5R_6 或 OR_7 , $R_2' = H$ 、卤素或 NR_5R_6 , 并且 R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 和 R_7 如本文定义的。在某些实例中, X 可以是 CH 。在其它实例中, X 可以是 CR_4 。在某些实例中, R_4 可以是卤素,例如 F 或 I 。在其它实例中, R_4 可以是炔基,例如乙炔基。在某些实例中, R_1' 可以是卤素,例如 Cl 。在其它实例中, R_1' 可以是氨基或烷氧基,例如甲氧基。在某些实例中, R_2' 可以是 H 。碱/碱类似物的其它实例包括例如 4-氯-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶、4-氯-5-氟-吡咯并[2,3-d]嘧啶、4-氯-5-碘-吡咯并[2,3-d]嘧啶、7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基-异吲哚-1,3-二酮和 4-氯-5-乙炔-吡咯并[2,3-d]嘧啶。保护基可以例如应用适合的路易斯酸(例如 BCl_3)除去,以获得所需的核苷类似物。

[0255]

[0256] R_1 , R_2 和 R_3 如本文定义的

[0257] 通用方法 1 步骤 1:(3R,4S,5R)-5-(2,4-二氯苄基氧基甲基)-4-(2,4-二氯苄基氧基)-2-甲氧基-四氢呋喃-3-醇(I-2)

[0258] 在(3R,4R,5R)-5-(2,4-二氯-苄基氧基甲基)-4-(2,4-二氯苄基氧基)-2-甲氧基-四氢呋喃-3-乙酸酯 I-1(10g, 19.1mmol) 的 MeOH(150mL) 溶液中加入 30% NaOMe 的 MeOH 溶液(5.37mL, 28.6mmol, 1.5 当量), 并且将反应在室温下搅拌 30 分钟。将反应混合物浓缩并且溶于乙酸乙酯(180mL) 中, 用 1N HCl 溶液和饱和的盐水洗涤, 干燥(无水 Na_2SO_4) 并且浓缩, 获得(3R,4S,5R)-5-(2,4-二氯苄基氧基甲基)-4-(2,4-二氯苄基氧基)-2-甲氧基-四氢呋喃-3-醇 I-2, 为淡黄色油状物。将获得的粗化合物用于下一步而无需进一步纯化。

[0259] 通用方法 1 步骤 2:(4R,5R)-5-(2,4-二氯苄基氧基甲基)-4-(2,4-二氯苄基氧基)-2-甲氧基-二氢呋喃-3-酮(I-3)

[0260] 在 $-78^\circ C$ 下, 在冷却的草酰氯(2.15mL, 25.1mmol, 1.3 当量) 的 DCM(20mL) 溶液中加入 DMSO(2.85mL, 36.5mmol, 1.9 当量) 的 DCM(30mL) 溶液, 并且在 $-78^\circ C$ 下搅拌 30 分钟。然后缓慢加入(3R,4S,5R)-5-(2,4-二氯苄基氧基甲基)-4-(2,4-二氯苄基氧基)-2-甲氧基-四氢呋喃-3-醇 I-2(9.6g, 18.8mmol, 1 当量) 的 DCM(50mL) 溶液, 并且在 $-78^\circ C$ 下搅拌约 2 小时。然后, 将三乙胺(15.8mL, 114mmol, 6.0 当量) 加入至反应混合物中并且缓慢达

到室温并且搅拌 1 小时。反应完成后,将混合物用水 (100mL) 和 DCM (50mL) 稀释。将 DCM 层分离并且用 1N HCl 溶液和饱和的盐水洗涤,干燥 (无水 Na_2SO_4)、浓缩并且通过快速色谱 (己烷:乙酸乙酯=70:30) 纯化,得到 (4R,5R)-5-(2,4-二氯苄基氧基甲基)-4-(2,4-二氯苄基氧基)-2-甲氧基-二氢呋喃-3-酮 I-3,为淡黄色油状物。

[0261] 通用方法 1 步骤 3:(3R,4R,5R)-5-(2,4-二氯苄基氧基甲基)-4-(2,4-二氯苄基氧基)-3-乙炔基-2-甲氧基-四氢呋喃-3-醇 (I-4)

[0262] 在冷的 (0℃) 0.5M 乙炔基溴化镁 ($\text{R}_3 = -\text{H}$) 的 THF 溶液 (137.5mL, 68.5mmol, 5 当量) 中加入 (4R,5R)-5-(2,4-二氯苄基氧基甲基)-4-(2,4-二氯苄基氧基)-2-甲氧基-二氢呋喃-3-酮 I-3 (6.6g, 13.7mmol, 1 当量) 的 THF (15mL) 溶液,并且在相同温度下搅拌 3 小时。将反应混合物用冷的饱和的 NH_4Cl (50mL) 猝灭并且用乙酸乙酯 (2×60mL) 萃取。将有机层用 1N HCl 溶液和饱和的盐水洗涤,干燥 (无水 Na_2SO_4)、浓缩并且通过快速色谱 (己烷:乙酸乙酯=85:15) 纯化,得到 (3R,4R,5R)-5-(2,4-二氯苄基氧基甲基)-4-(3,5-二氯苄基氧基)-3-乙炔基-2-甲氧基-四氢呋喃-3-醇 I-4,为淡黄色形式。

[0263] 通用方法 1 步骤 4:(2R,3R,4R,5R)-2-(4-氯-吡咯并 [2,3-d] 嘧啶-7-基)-4-(2,4-二氯苄基氧基)-5-(2,4-二氯苄基氧基甲基)-3-乙炔基-四氢呋喃-3-醇 (I-5)

[0264] 在 (3R,4R,5R)-5-(2,4-二氯苄基氧基甲基)-4-(2,4-二氯苄基氧基)-3-乙炔基-2-甲氧基-四氢呋喃-3-醇 I-4 (500mg, 1mmol, 1 当量) 的干燥的 DCM (5mL) 溶液中加入 33% HBr-AcOH (0.88mL, 5mmol, 5 当量) 溶液,并且在室温下搅拌 1.5 小时。原料消耗后,将反应混合物真空蒸发 (1mbar, 35℃),获得溴化物中间体,为稠的油状物。然后将其溶于干燥的乙腈 (10mL) 中。在另一个烧瓶中,在先前在室温下搅拌 0.5 小时的 4-氯吡咯并 [2,3-d] 嘧啶 ($\text{R}_1' = \text{Cl}, \text{R}_2' = \text{H}, \text{X} = \text{CH}$) (153.0mg, 1mmol, 1 当量) 和 NaH (200mg, 5mmol, 5 当量) 在乙腈 (15mL) 中的混合物中加入以上获得的溴化物中间体溶液,并且将反应混合物在室温下搅拌 18 小时。将溶剂除去并且用乙酸乙酯 (60mL) 稀释,用水、盐水洗涤,干燥 (无水 Na_2SO_4) 并且浓缩,获得稠的液体。将粗产物通过快速色谱 (己烷:乙酸乙酯=80:20) 纯化,得到 (2R,3R,4R,5R)-2-(4-氯-吡咯并 [2,3-d] 嘧啶-7-基)-4-(2,4-二氯苄基氧基)-5-(2,4-二氯苄基氧基甲基)-3-乙炔基-四氢呋喃-3-醇 I-5,为淡黄色固体。

[0265] 通用方法 1 步骤 5:(2R,3R,4R,5R)-2-(4-氯-吡咯并 [2,3-d] 嘧啶-7-基)-3-乙炔基-5-羟基甲基-四氢-呋喃-3,4-二醇 (I-6)

[0266] 在冷的 (-78℃) (2R,3R,4R,5R)-2-(4-氯-吡咯并 [2,3-d] 嘧啶-7-基)-4-(2,4-二氯苄基氧基)-5-(2,4-二氯苄基氧基甲基)-3-乙炔基-四氢呋喃-3-醇 I-5 (150mg, 0.24mmol, 1 当量) 的干燥 DCM (20mL) 溶液中滴加入 1M BCl_3 的 DCM 溶液 (2.4mL, 2.4mmol, 10 当量),并且在 -78℃ 下搅拌约 5 小时。将反应混合物在 0℃ 下用 MeOH (15mL) 猝灭,并且搅拌 30 分钟。将溶剂蒸发并且和硅胶 (4mL) 一起干燥,将在硅胶上的粗产物通过快速色谱 (DCM:甲醇=90:10) 纯化,得到 (2R,3R,4R,5R)-2-(4-氯-吡咯并 [2,3-d] 嘧啶-7-基)-3-乙炔基-5-羟基甲基-四氢呋喃-3,4-二醇 I-6,为棕色泡沫状物。

[0267] 通用方法 1 步骤 6:(2R,3R,4R,5R)-2-(4-氨基-吡咯并 [2,3-d] 嘧啶-7-基)-3-乙炔基-5-羟基甲基-四氢呋喃-3,4-二醇 (I)

[0268] 将 (2R,3R,4R,5R)-2-(4-氯-吡咯并 [2,3-d] 嘧啶-7-基)-3-乙炔基-5-羟基甲基-四氢呋喃-3,4-二醇 I-6 (96mg, 0.31mmol, 1 当量) 和 $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ($\text{R}_1 = \text{NH}_2$) (10mL 的

28-30%氨水)的混合物在玻璃压力管中在100℃下加热5小时。将反应混合物浓缩至干燥,并且通过制备 HPLC 纯化,梯度为在水中的乙腈30分钟内从0%至35%。将纯的级分合并并且冻干,获得(2R,3R,4R,5R)-2-(4-氨基-吡咯并[2,3-d]嘧啶-7-基)-3-乙炔基-5-羟基甲基-四氢呋喃-3,4-二醇(X=CH, R1=NH₂, R2=H, R3=H)I,为淡黄色泡沫状物。

[0269] 通用方法2:制备中间体二保护的(在4-羟基和5-羟基甲基取代基)-(3R,4R,5R)-3-炔基-5-羟基甲基-四氢呋喃-2,3,4-三醇(II-1)

[0270] 中间体化合物II-1可以根据下述的通用方法2a、2b或2c制备。

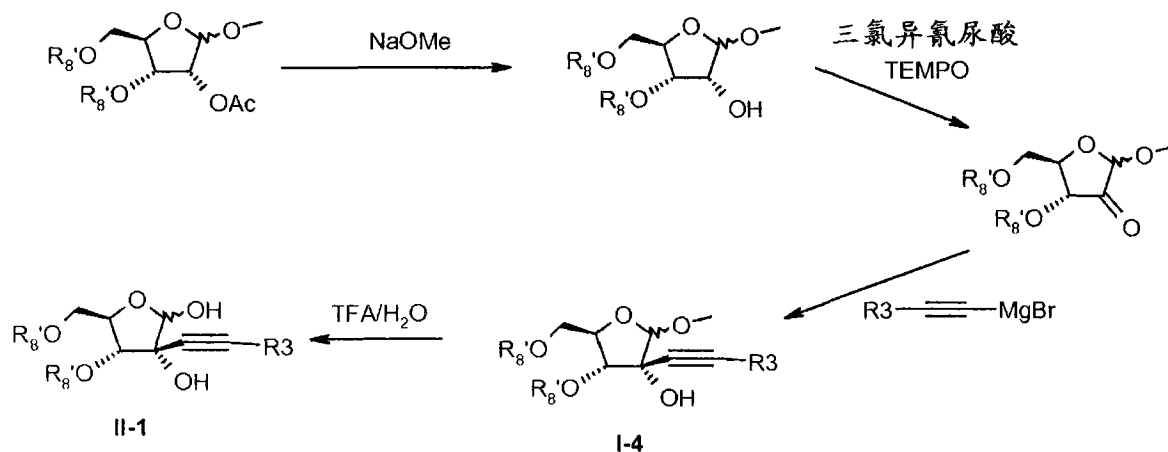
[0271] 通用方法2a应用二保护的(在4-羟基和5-羟基甲基取代基)4-羟基-5-羟基甲基-2-甲氧基-四氢呋喃-3-乙酸酯,例如(3R,4R,5R)-4-(2,4-二氯苄基氧基)-5-(2,4-二氯苄基氧基甲基)-2-甲氧基-四氢-呋喃-3-乙酸酯作为原料。乙酸酯基团是在碱性条件下除去的,例如应用NaOMe或另一种适合的碱,例如醇钠或碳酸钾等。氧化步骤可以应用任何适合的氧化剂/条件(例如Swern氧化、TEMPO或Dess-Martin过碘烷)来进行,以获得呋喃-3-酮。转化为亚炔基可以应用适合的格氏试剂(例如炔基卤化镁,例如炔基溴化镁,例如乙炔基溴化镁)或用有机锂试剂(例如炔基锂试剂,例如乙炔基锂)来完成。

[0272] 通用方法2b应用三保护的(在2-羟基、4-羟基和5-羟基甲基取代基)四氢呋喃-3-醇,例如1,3,5-三-O-苯甲酰基-α-D-呋喃核糖作为原料。氧化步骤可以应用任何适合的氧化剂/条件(例如TEMPO、Dess-Martin过碘烷或Swern氧化)来进行,以获得呋喃-3-酮。转化为亚炔基可以如通用方法2a描述的来完成,应用适合的格氏试剂(例如炔基卤化镁,例如炔基溴化镁,例如乙炔基溴化镁)或用有机锂试剂(例如炔基锂试剂,例如乙炔基锂)。2-保护基的选择性除去可以在碱性条件下应用K₂CO₃/MeOH进行。

[0273] 依照通用方法2c,可以将可商购获得的二丙酮-D-葡萄糖用作原料。氧化步骤可以应用任何适合的氧化剂/条件(例如TEMPO、Dess-Martin过碘烷或Swern氧化)来进行,以获得呋喃-4-酮。转化为亚炔基可以如通用方法2a和2b描述的来完成,应用适合的格氏试剂(例如炔基卤化镁,例如炔基溴化镁,例如乙炔基溴化镁)或用有机锂试剂(例如炔基锂试剂,例如乙炔基锂)。3-羟基可以应用任何适合的试剂来保护,例如2,5-二氯苄基溴、2,4-二氯苄基溴、烯丙基卤化物或甲硅烷基卤化物。类似地,4-羟基和5-羟基甲基取代基上的羟基可以应用任何适合的试剂来保护,例如苯甲酰基卤化物、甲苯酰基卤化物等。

[0274] 通用方法2a

[0275]



[0276] $R_8' = 2,4\text{-二氯苄基}$

[0277] R3 如本文定义的

[0278] 通用方法 2a 步骤 1 : (3R, 4S, 5R)-5-(2,4-二氯苄基氧基甲基)-4-(2,4-二氯苄基氧基)-2-甲氧基-四氢呋喃-3-醇

[0279] 在在 MeOH(150mL) 中的 (3R, 4R, 5R)-5-(2,4-二氯苄基氧基甲基)-4-(2,4-二氯苄基氧基)-2-甲氧基-四氢呋喃-3-乙酸酯 (10g, 19.1mmol) 中加入 30% NaOMe 的 MeOH 溶液 (5.37mL, 28.6mmol), 并且将反应在 20℃ 下搅拌 30 分钟。将反应混合物浓缩并且溶于 IPAC(100mL) 中, 用 1N HCl 溶液 (50mL) 和水 (50mL) 洗涤并且浓缩, 获得 (3R, 4S, 5R)-5-(2,4-二氯苄基氧基甲基)-4-(2,4-二氯苄基氧基)-2-甲氧基-四氢呋喃-3-醇, 为淡黄色油状物。将获得的粗化合物用于下一步而无需进一步纯化。

[0280] $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400MHz) : δ 7.43(d, $J = 8.1\text{Hz}$, 1H), 7.35-7.31(m, 3H), 7.23(dd, $J = 2.1, 4.0\text{Hz}$, 1H), 7.21-7.10(dd, $J = 2.1, 4.0\text{Hz}$, 1H), 4.92(d, $J = 4.6\text{Hz}$, 1H), 4.77(d, $J = 13.4\text{Hz}$, 1H), 4.68(d, $J = 13.4\text{Hz}$, 1H); 4.60(d, $J = 13.0\text{Hz}$, 1H), 4.56(d, $J = 13.0\text{Hz}$, 1H), 4.25(q, $J = 4.0\text{Hz}$, 1H), 4.19(dd, $J = 6.8, 4.8\text{Hz}$, 1H), 3.86(dd, $J = 6.9, 7.0\text{Hz}$, 1H), 3.60(d, $J = 10.5\text{Hz}$, 2H), 3.48(s, 3H); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100MHz) : δ 134.2, 134.1, 133.9, 133.5, 133.4, 129.9, 129.8, 129.1, 129.08, 127.11, 127.08, 102.8, 81.6, 77.4, 72.0, 70.8, 70.0, 69.5, 55.6(一个碳重叠); ESI-MS : 计算值 $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{Cl}_4\text{O}_5(\text{M}+\text{NH}_4^+)$, 480.0; 实测值 : 498.0。

[0281] 通用方法 2a 步骤 2 : (4R, 5R)-5-(2,4-二氯苄基氧基甲基)-4-(2,4-二氯苄基氧基)-2-甲氧基-二氢呋喃-3-酮

[0282] 在在冰浴中的 (3R, 4S, 5R)-5-(2,4-二氯苄基氧基甲基)-4-(2,4-二氯苄基氧基)-2-甲氧基-四氢呋喃-3-醇 (9.20g, 19.08mmol) 的无水 CH_2Cl_2 (70mL) 和三氯异氰尿酸 (4.88g, 21mmol) 的溶液中加入 TEMPO (160mg, 0.95mmol)。反应混合物变成黄色悬浮液并且在 20℃ 下搅拌 1 小时。将反应通过 HPLC 确定完成, 并且过滤。将溶剂蒸发并且加入甲苯 (100mL)。将有机相用饱和的 NaHCO_3 溶液 (50mL) 和 HCl 水溶液 (1N, 50mL) 洗涤。将有机层干燥 (MgSO_4), 过滤并且浓缩, 获得 (4R, 5R)-5-(2,4-二氯苄基氧基甲基)-4-(2,4-二氯苄基氧基)-2-甲氧基-二氢呋喃-3-酮, 为淡绿色油状物, 将其直接用于下一步。

[0283] 通用方法 2a 步骤 3 : (3R, 4R, 5R)-5-(2,4-二氯苄基氧基甲基)-4-(2,4-二氯苄基氧基)-3-乙炔基-2-甲氧基-四氢呋喃-3-醇 (I-4)

[0284] 在冷的 (-20℃) (4R, 5R)-5-(2,4-二氯苄基氧基甲基)-4-(2,4-二氯苄基氧基)-2-甲氧基-二氢呋喃-3-酮 (9.16g, 19.07mmol) 的干燥 THF (20mL) 溶液中滴加入 0.5M 炔基溴化镁 (例如, 其中 R3 = H, 炔基溴化镁是乙炔基溴化镁) 的 THF 溶液 (57.2mL, 28.6mmol)。将黄色反应混合物在相同温度下搅拌 1 小时, 并且用饱和的 NH_4Cl (50mL) 猝灭, 并且用 IPAC (2×70mL) 萃取。将有机层用水 (50mL) 洗涤, 浓缩, 获得 (3R, 4R, 5R)-5-(2,4-二氯苄基氧基甲基)-4-(2,4-二氯苄基氧基)-3-乙炔基-2-甲氧基-四氢呋喃-3-醇 (I-4) (R3 = H), 为深红色油状物, 将其直接用于下一步。

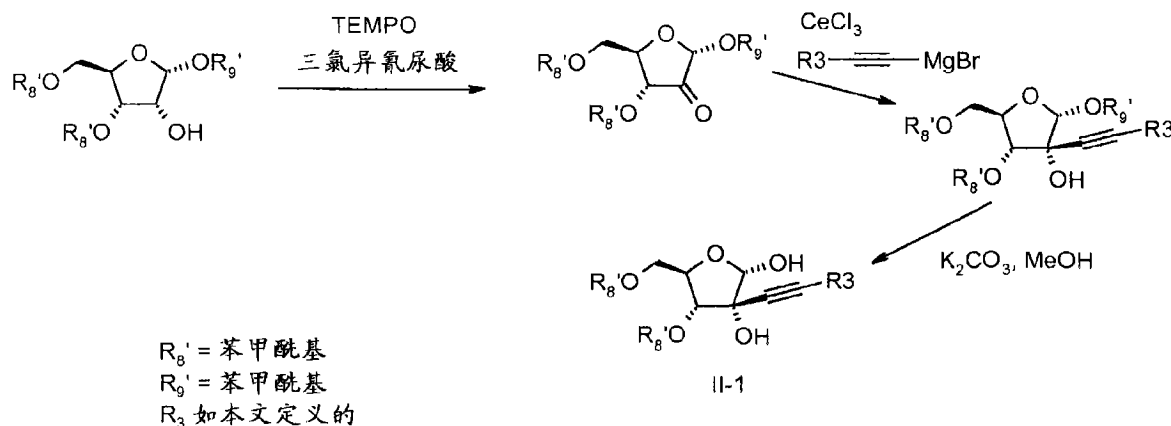
[0285] 通用方法 2a 步骤 4 : (3R, 4R, 5R)-5-(2,4-二氯苄基氧基甲基)-4-(2,4-二氯苄基氧基)-3-乙炔基-四氢呋喃-2,3-二醇

[0286] 将 (3R, 4R, 5R)-5-(2,4-二氯苄基氧基甲基)-4-(2,4-二氯苄基氧基)-3-乙炔基-2-甲氧基-四氢呋喃-3-醇 (I-4) (9.65g, 19.08mmol) 的 TFA 和水 (30mL : 1.5mL) 溶

液加热至 55℃。红色溶液变成黑色溶液,并且在相同温度下搅拌 24 小时。将溶剂蒸发,并且用 DCM(70mL) 稀释。将有机层用饱和的 Na_2CO_3 (50mL)、水 (50mL) 洗涤并且浓缩,获得黑色油状物。将粗产物通过柱色谱 (庚烷: EA 2 : 1) 纯化,获得 (3R,4R,5R)-5-(2,4-二氯苄基氧基甲基)-4-(2,4-二氯-苄基氧基)-3-乙炔基-四氢呋喃-2,3-二醇,为红色油状物 (两种端基异构体的混合物)。(约 1.4 : 1,基于 NMR 分析和 HPLC 分析)。ESI-MS: 计算值 $\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{Cl}_4\text{O}_5$ ($\text{M}+\text{NH}_4^+$, 490.0); 实测值: 508.0。

[0287] 通用方法 2b

[0288]



[0289] 通用方法 2b 步骤 1: (2R,3R,4R,5R)-2,4-二苯甲酰基氧基-5-苯甲酰基氧基甲基-二氢呋喃-3-酮

[0290] 将 1,3,5-三-O-苯甲酰基- α -D-呋喃核糖 (10.0g, 21.62mmol, 1.0 当量) 溶于二氯甲烷 (60mL) 中,并且在冰下冷却。加入三氯异氰尿酸 (5.52g, 23.80mmol, 1.1 当量),然后加入催化量的 TEMPO。将冰浴除去,并且将混合物在室温下搅拌 1 小时,然后在 **Celite®** 上过滤。将有机相用饱和的 Na_2CO_3 水溶液洗涤,然后用 1N HCl 和盐水洗涤。将有机层干燥 (MgSO_4) 并且将溶剂蒸发,获得 (2R,4R,5R)-2,4-二苯甲酰基氧基-5-苯甲酰基氧基甲基-二氢呋喃-3-酮,为白色泡沫状物。 $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3): δ 8.13-8.01 (m, 6H), 7.65-7.37 (m, 9H), 6.20 (d, 1H, $J = 1.2\text{Hz}$), 5.88 (dd, 1H, $J = 1.2\text{Hz}$, 8.8Hz), 5.05 (m, 1H, $J = 1.2\text{Hz}$, 4Hz, 8.8Hz), 4.84 (dd, 1H, $J = 4\text{Hz}$, 12.4Hz), 4.65 (dd, 1H, $J = 4\text{Hz}$, 12.4Hz)。

[0291] 通用方法 2b 步骤 2: (2R,3R,4R,5R)-2,4-二苯甲酰基氧基-5-苯甲酰基氧基甲基-3-乙炔基-四氢呋喃-3-醇

[0292] 在 N_2 下,在干燥的三颈烧瓶中装入 CeCl_3 (23.6g, 95.48mmol, 4.4 当量) 和 THF (100mL),将其冷却至 -50°C 。历经 20 分钟,加入 1M 乙炔基溴化镁 (186.8mL, 93.4mmol, 4.3 当量)。将悬浮液在 -50°C 下搅拌 1.5 小时。历经 10 分钟,加入 (2R,4R,5R)-2,4-二苯甲酰基氧基-5-苯甲酰基氧基甲基-二氢呋喃-3-酮 (10.0g, 21.7mmol, 1.0 当量) 的 THF (80mL) 溶液。加入后,将悬浮液在 -50°C 下搅拌 4 小时。将反应用饱和的 NH_4Cl (200mL) 猝灭。温至环境温度后,将反应混合物过滤并且用 CH_2Cl_2 (200mL $\times$ 3) 萃取。将有机相经无水 Na_2SO_4 干燥并且浓缩,获得泡沫状 (2R,3R,4R,5R)-2,4-二苯甲酰基氧基-5-苯甲酰基氧基甲基-3-乙炔基-四氢呋喃-3-醇。 $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3): δ 8.05-8.01 (m, 6H), 7.65-7.37 (m, 9H), 6.59 (s, 1H), 5.53 (d, 1H, $J = 2.8\text{Hz}$), 4.80-4.77 (m, 1H), 4.70 (dd, 1H, J

= 5.2Hz, 12Hz), 4.65 (dd, 1H, J = 6Hz, 12Hz), 3.02 (bs, 1H), 2.65 (s, 1H)。

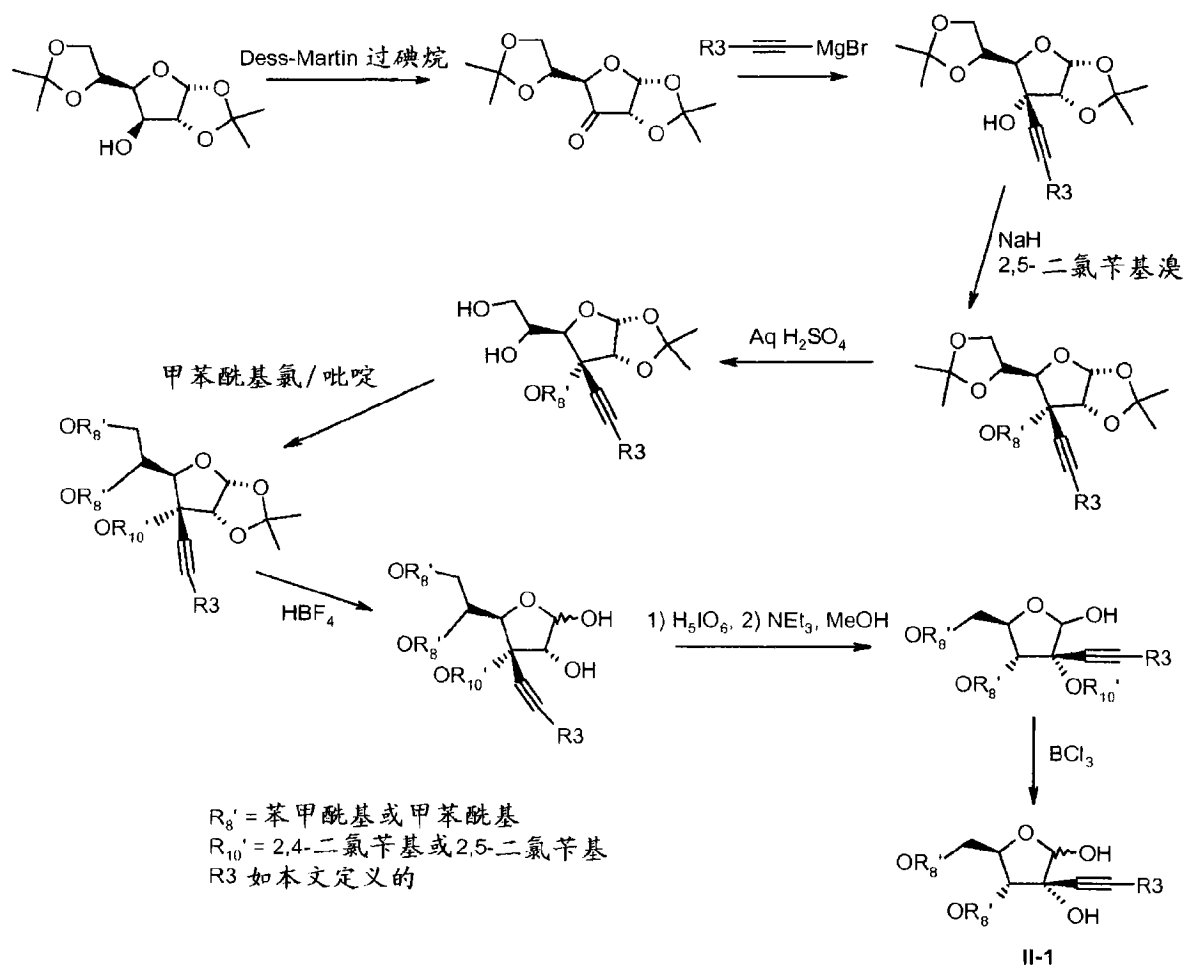
[0293] 可选择的是, 可以应用步骤 2 中描述的相同方法, 除了反应温度是 -30℃ 并且反应时间是 3 小时, 应用 (2R, 4R, 5R)-2, 4- 二苯甲酰基氧基 -5- 苯甲酰基氧基甲基 - 二氢呋喃 -3- 酮 (1.0g, 2.17mmol, 1.0 当量)、1M 乙炔基溴化 镁 (13mL, 6.51mmol, 3 当量)、 CeCl_3 (1.77g, 7.16mmol, 3.3 当量) 和 THF (18mL), 获得 (2R, 3R, 4R, 5R)-2, 4- 二苯甲酰基氧基 -5- 苯甲酰基氧基甲基 -3- 乙炔基 - 四氢呋喃 -3- 酮。

[0294] 通用方法 2b 步骤 3: (2R, 3R, 4R, 5R)-4- 苯甲酰基氧基 -5- 苯甲酰基氧基甲基 -3- 乙炔基 - 四氢呋喃 -2, 3- 二醇

[0295] 将中间体 (2R, 3R, 4R, 5R)-2, 4- 二苯甲酰基氧基 -5- 苯甲酰基氧基甲基 -3- 乙炔基 - 四氢 - 呋喃 -3- 醇 (2.048g, 4.21mmol, 1.0 当量) 溶于甲醇 (10mL) 和 THF (10mL) 中。加入 K_2CO_3 (176mg, 1.26mmol, 0.3 当量), 将反应在环境温度下搅拌 2 小时, 在硅胶上过滤, 浓缩并且通过快速色谱纯化, 获得 (2R, 3R, 4R, 5R)-4- 苯甲酰基氧基 -5- 苯甲酰基氧基甲基 -3- 乙炔基 - 四氢呋喃 -2, 3- 二醇, 为泡沫状物。1H-NMR (400MHz, CDCl_3): δ 8.06-7.96 (m, 4H), 7.54-7.26 (m, 6H), 5.88 (d, 0.26H, J = 6.4Hz), 5.54 (s, 0.72H), 5.53 (d, 0.72H, J = 5.2Hz), 5.41 (s, 0.28H), 5.28 (bs, 1H), 4.67-4.49 (m, 3H), 4.22 (bs, 1H), 2.67 (s, 0.26H), 2.59 (s, 0.71H); ^{13}C -NMR (100MHz, CDCl_3): δ 166.74, 166.61, 165.74, 165.66, 133.79, 133.71, 133.52, 133.33, 133.24, 130.11, 130.05, 130.02, 129.89, 129.81, 129.44, 129.41, 128.86, 128.75, 128.57, 128.41, 128.36, 81.87, 80.07, 79.23, 77.89, 77.21, 76.61, 76.39, 75.77, 75.58, 72.83, 65.29, 64.26。

[0296] 通用方法 2c

[0297]



[0298] 通用方法 2c 步骤 1: 1,2:5,6-二-O-异亚丙基- α -D-核己呋喃-3-酮糖

[0299] 将二丙酮-D-葡萄糖 (2.0g, 6.9mmol) 溶于 CH_2Cl_2 (40mL) 中。加入 Dess-Martin 过碘烷 (7.5g, 13.8mmol, 2.0 当量) 并且将反应在室温下搅拌过夜。然后加入 10% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 溶液 (20mL) 和饱和的 NaHCO_3 溶液 (20mL) 并且将反应搅拌 15 分钟直至有机层变成澄清溶液。加入另外 40mL CH_2Cl_2 , 并且将 CH_2Cl_2 层分离, 用 NaHCO_3 溶液 (20mL)、盐水 (20mL) 洗涤, 干燥 (Na_2SO_4), 过滤并且浓缩, 获得粗中间体 1,2:5,6-二-O-异亚丙基- α -D-核己呋喃-3-酮糖。将粗中间体 1,2:5,6-二-O-异亚丙基- α -D-核己呋喃-3-酮糖用甲苯 ($2 \times 25\text{mL}$) 共沸蒸馏, 溶于甲苯 (20mL) 并且用于下一步。

[0300] 通用方法 2c 步骤 2: 1,2:5,6-二-O-异亚丙基-3-C-乙炔基- α -D-异呋喃糖 (allofuranose)

[0301] 将在甲苯 (20mL) 中的中间体 1,2:5,6-二-O-异亚丙基- α -D-核己呋喃-3-酮糖 (1.82g, 6.9mmol, 1 当量) 冷却至 0°C , 然后加入 0.5M 乙炔基溴化镁的 THF 溶液 (55.2mL, 27.6mmol, 4 当量), 并且将混合物在室温下搅拌 1 小时。将反应用 10% NH_4Cl 溶液 (40mL) 猝灭, 并且将粗产物在乙酸乙酯 (100mL) 和水相之间分配。将水相进一步用乙酸乙酯 ($3 \times 20\text{mL}$) 萃取, 并且将合并的乙酸乙酯用盐水 (40mL) 洗涤, 干燥 (Na_2SO_4), 过滤并且浓缩至干燥, 获得粗中间体 1,2:5,6-二-O-异亚丙基-3-C-乙炔基- α -D-异呋喃糖, 为淡黄色泡沫状物。

[0302] 通用方法 2c 步骤 3: 3-C-乙炔基-1,2:5,6-双-O-(1-甲基亚乙基)-3-O-(2,5-二

氯苄基)- α -D-异呋喃糖

[0303] 将中间体 1,2:5,6-二-O-异亚丙基-3-C-乙炔基- α -D-异呋喃糖 (2.84g, 10mmol) 溶于 DMF (15mL) 中并且在冰下冷却。加入 NaH (600mg, 60% 的油分散液, 15mmol, 1.5 当量) 并且将反应搅拌 2 分钟, 然后加入 2,5-二氯苄基溴 (3.6g, 15mmol, 1.5 当量) 并且将混合物在室温下搅拌 3 小时。加入乙酸乙酯 (120mL), 并且用 1N HCl (3 $\times$ 25mL)、盐水 (2 $\times$ 25mL) 洗涤, 干燥 (Na₂SO₄), 过滤并且浓缩至干燥, 获得粗中间体 3-C-乙炔基-1,2:5,6-双-O-(1-甲基亚乙基)-3-O-(2,5-二氯苄基)- α -D-异呋喃糖, 为淡黄色油状物。

[0304] 通用方法 2c 步骤 4: 3-C-乙炔基-1,2-O-(1-甲基亚乙基)-3-O-(2,5-二氯苄基)- α -D-异呋喃糖

[0305] 将粗中间体 3-C-乙炔基-1,2:5,6-双-O-(1-甲基亚乙基)-3-O-(2,5-氯苄基)- α -D-异呋喃糖 (5.91g, 10mmol) 溶于乙腈 (50mL) 中。加入 5 体积% H₂SO₄ 溶液 (12mL) 并且将混合物在室温下搅拌过夜。加入 NaOAc 溶液 (0.1M, 20mL) 并且将混合物真空蒸发。在溶液残留物中加入乙酸乙酯 (120mL)。将乙酸乙酯层用饱和的 NaHCO₃ 溶液 (2 $\times$ 25mL)、盐水 (2 $\times$ 25mL) 洗涤, 干燥 (Na₂SO₄), 过滤并且浓缩, 获得粗中间体 3-C-乙炔基-1,2-O-(1-甲基亚乙基)-3-O-(2,5-二氯苄基)- α -D-异呋喃糖。

[0306] 通用方法 2c 步骤 5: 3-C-乙炔基-1,2-O-(1-甲基亚乙基)-3-O-(2,5-二氯苄基)-5,6-双(4-甲基苯甲酸酯)- α -D-异呋喃糖-二苯甲酸酯

[0307] 将粗中间体 3-C-乙炔基-1,2-O-(1-甲基亚乙基)-3-O-(2,5-二氯苄基)- α -D-异呋喃糖 (5.6g, 10mmol) 溶于乙腈 (30mL) 中。加入吡啶 (7.9mL, 100mmol, 10 当量), 然后加入对甲苯酰氯 (3.11mL, 30mmol, 3 当量)。将反应在 55 $^{\circ}$ C 下搅拌 3 小时并且真空浓缩。加入乙酸乙酯 (120mL) 并且用 1N HCl 溶液 (3 $\times$ 25mL)、盐水 (2 $\times$ 25mL) 洗涤, 干燥 (Na₂SO₄), 过滤并且浓缩至干燥, 获得粗中间体 3-C-乙炔基-1,2-O-(1-甲基亚乙基)-3-O-(2,5-二氯苄基)-5,6-双(4-甲基苯甲酸酯)- α -D-异呋喃糖, 为油状物。

[0308] 通用方法 2c 步骤 6: 3-C-乙炔基-3-O-(2,5-二氯苄基)-5,6-双(4-甲基苯甲酸酯)-D-阿洛糖

[0309] 将粗中间体 3-C-乙炔基-1,2-O-(1-甲基亚乙基)-3-O-(2,5-二氯苄基)-双(4-甲基苯甲酸酯)- α -D-异呋喃糖 (7.4g, 10mmol) 溶于乙腈 (35mL) 中, 加入用 7mL 水稀释的 50% HBF₄ 的水溶液 (6.3mL, 50mmol, 5 当量)。将反应混合物在 60 $^{\circ}$ C 下搅拌 3 小时。将乙酸乙酯 (200mL) 加入至反应混合物中并且用饱和的 NaHCO₃ 溶液 (2 $\times$ 30mL)、1N HCl 溶液 (2 $\times$ 30mL)、盐水 (2 $\times$ 30mL) 洗涤, 干燥 (Na₂SO₄), 过滤, 浓缩并且通过快速色谱 (己烷: 乙酸乙酯 = 70 : 30) 纯化, 获得 3-C-乙炔基-3-O-(2,5-二氯苄基)-5,6-双(4-甲基苯甲酸酯)-D-阿洛糖, 为白色泡沫状物 (4.41g, 7.36mmol, 历经四步产率 73.6%)。1H-NMR(CDCl₃): δ 7.92-7.80(m, 4H), 7.38(d, 0.79H, J = 2.4Hz), 7.34(d, 0.23H, J = 2.1Hz), 7.30-7.09(m, 6H), 5.84-5.60(m, 1H), 5.51(d, 0.76H, J = 3.9Hz), 5.40(d, 0.22H, J = 1.5Hz), 4.94-4.50(m, 5H), 4.29(d, 1H, J = 4.2Hz), 2.87(s, 0.23H), 2.80(s, 0.76H), 2.34(s, 6H)。13C-NMR(CDCl₃): δ 166.71, 166.59, 165.66, 165.63, 144.08, 143.88, 136.59, 136.41, 133.01, 132.98, 131.59, 131.25, 130.61, 130.48, 129.97, 129.91, 129.75, 129.45, 129.30, 129.26, 129.22, 127.16, 127.06, 102.76, 96.78, 81.53, 81.25, 80.91, 80.83, 80.67, 80.55, 80.21, 77.83, 77.74, 76.81, 76.70, 72.10, 71.24, 65.67, 65.61, 64.07,

63.84, 21.80, 21.78。

[0310] 通用方法 2c 步骤 7: 2-C-乙炔基-2-O-(2,5-二氯苄基)-3,5-双(4-甲基苯甲酸酯)-D-核糖

[0311] 将中间体 3-C-乙炔基-3-O-(2,5-二氯苄基)-5,6-双(4-甲基苯甲酸酯)-D-阿洛糖 (2.20g, 3.67mmol) 溶于乙腈 (20mL) 中并且冷却至 0℃。加入高碘酸 (1.25g, 5.50mmol, 1.5 当量) 的 H₂O (5.0mL) 溶液, 并且将反应搅拌 30 分钟。加入乙酸异丙酯 (50mL), 并且用饱和的 NaHCO₃ 溶液 (50mL)、5% 硫代硫酸钠水溶液 (30mL)、盐水 (30mL) 洗涤, 干燥 (Na₂SO₄), 过滤并且浓缩至干燥。将 MeOH (20mL) 加入至油状残留物中并且冷却至 0℃。加入三乙胺 (1.09mL, 7.84mmol, 2.1 当量), 并且将反应在 4℃ 下搅拌 60 小时。加入乙酸乙酯 (200mL), 并且将有机相用 1N HCl 溶液 (2×40mL)、盐水 (2×30mL) 洗涤, 干燥 (Na₂SO₄), 过滤, 浓缩并且通过快速色谱 (己烷: 乙酸乙酯 = 75 : 25) 纯化, 获得标题化合物, 为淡黄色糊状物。1H-NMR (CDCl₃): δ 7.99-7.84 (m, 4H), 7.51 (d, 0.53H, J = 2.4Hz), 7.33 (d, 0.43H, J = 2.4Hz), 7.28-7.10 (m, 6H), 5.94 (d, 0.53H, J = 5.7Hz), 5.73 (d, 0.43H, J = 4.2Hz), 5.57 (s, 0.45H), 5.46 (s, 0.53H), 4.98-4.85 (m, 2H), 4.80-4.54 (m, 3H), 2.81 (s, 0.48H), 2.80 (s, 0.40H), 2.44-2.34 (m, 6H)。13C-NMR (CDCl₃): δ 166.65, 166.47, 165.62, 165.44, 144.89, 144.73, 144.07, 144.05, 137.64, 136.75, 133.04, 130.82, 130.46, 130.24, 130.21, 130.10, 130.06, 129.60, 129.51, 129.29, 129.26, 129.06, 128.94, 128.60, 128.39, 127.14, 127.12, 126.31, 126.13, 100.36, 100.34, 81.54, 80.24, 80.07, 79.51, 78.64, 78.48, 76.89, 76.60, 76.45, 66.34, 65.38, 64.76, 64.25, 21.95, 21.88。

[0312] 通用方法 2c 步骤 8: (3R, 4R, 5R)-4-(4-甲基苯甲酰基氧基)-5-(4-甲基苯甲酰基氧基甲基)-3-乙炔基-四氢-呋喃-2,3-二醇

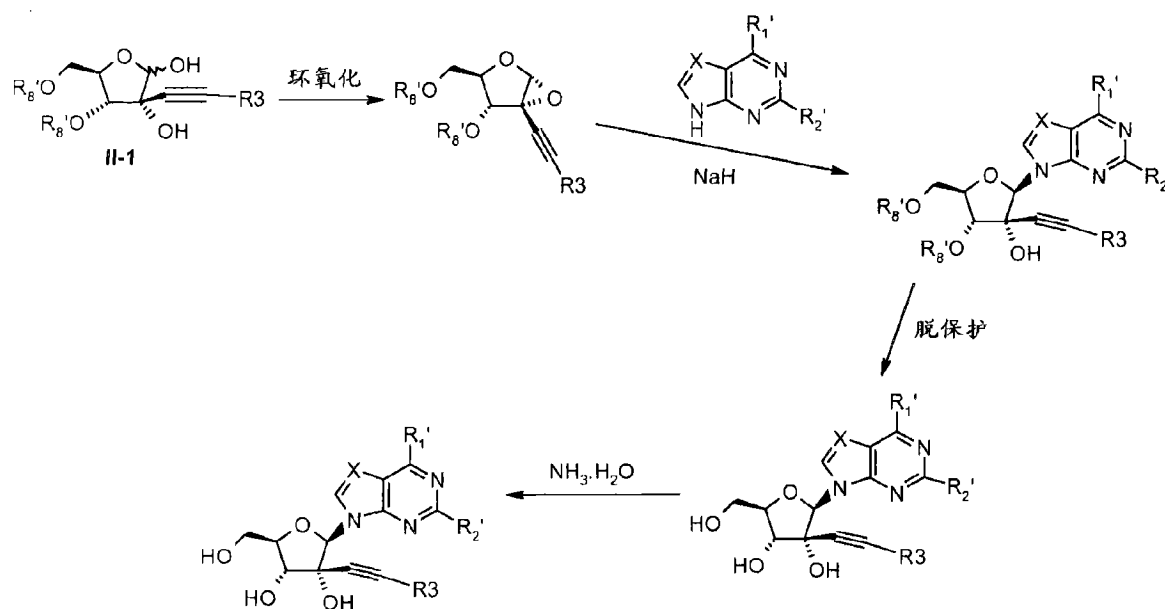
[0313] 将中间体 2-C-乙炔基-2-O-(2,5-二氯苄基)-3,5-双(4-甲基苯甲酸酯)-D-核糖 (1.113g, 1.95mmol) 溶于 CH₂Cl₂ (30mL) 中并且冷却至 -35℃ (邻二甲苯和干冰, 加入乙腈)。加入 1M BCl₃ 的 CH₂Cl₂ 溶液 (15.6mL, 15.6mmol, 8 当量), 并且将混合物在 -35℃ 下搅拌 3 小时。将冷的甲醇 (10mL) 加入至反应中, 然后加入 KHCO₃ 粉末 (3.9g, 39.0mmol, 20 当量)。搅拌 10 分钟后, 将混合物过滤。加入 CH₂Cl₂ (30mL) 和 1N HCl 溶液 (20mL), 并且将两层分离。将水层进一步用 CH₂Cl₂ (20mL) 萃取。将合并的 CH₂Cl₂ 溶液用盐水 (15mL) 洗涤, 干燥 (Na₂SO₄), 过滤, 浓缩并且通过快速色谱 (己烷: 乙酸乙酯 = 70 : 30) 纯化, 获得 (3R, 4R, 5R)-4-(4-甲基苯甲酰基氧基)-5-(4-甲基苯甲酰基氧基甲基)-3-乙炔基-四氢呋喃-2,3-二醇, 为白色泡沫状物。原料可以回收。1H-NMR (CDCl₃): δ 7.96-7.84 (m, 4H), 7.28-7.10 (m, 4H), 5.80-5.30 (m, 2H), 4.70-4.45 (m, 3H), 2.67 (s, 0.16H), 2.59 (s, 0.63H), 2.44-2.34 (m, 6H)。13C-NMR (CDCl₃): δ 166.80, 166.61, 165.79, 165.67, 144.93, 144.78, 144.10, 144.07, 130.20, 130.08, 130.02, 129.50, 129.47, 129.26, 129.22, 127.02, 126.27, 101.73, 100.18, 81.85, 80.07, 79.57, 78.47, 76.75, 76.50, 76.13, 75.63, 73.07, 65.10, 64.16, 21.91, 21.84。

[0314] 通用方法 3: 由中间体二保护的 (在 4-羟基和 5-羟基甲基取代基): (3R, 4R, 5R)-3-炔基-5-羟基甲基-四氢呋喃-2,3,4-三醇 (II-1) 制备本发明化合物

[0315] 应用任何适合的磺酰氯 (例如 Ms-Cl 或 Ts-Cl) 或磺酸酐 (例如 Ms-O-Ms 或 Ts-O-Ts) 可以将化合物 II-1 转化为环氧化物。将该环氧化物与适合的碱或碱类似物偶联,

获得核苷类似物。尽管通用方法 3 描述了碱类似物 4-氯-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶,应当理解的是,可以应用任何适合的碱基团,例如腺嘌呤或鸟嘌呤类似物,其中 $X = N, CH$ 或 CR_4 , $R_1' =$ 卤素、 NR_5R_6 或 OR_7 , $R_2' = H$ 、卤素或 NR_5R_6 并且 R_3, R_4, R_5, R_6 和 R_7 如本文定义的。在某些实例中, X 可以是 CH 。在其它实例中, X 可以是 CR_4 。在某些实例中 R_4 可以是卤素,例如 F 或 I 。在其它实例中 R_4 可以是炔基,例如乙炔基。在某些实例中 R_1' 可以是卤素,例如 Cl 。在其它实例中, R_1' 可以是氨基或烷氧基,例如甲氧基。在某些实例中 R_2' 可以是 H 。碱/碱类似物的其它实例包括例如 4-氯-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶、4-氯-5-氟-吡咯并[2,3-d]嘧啶、4-氯-5-碘-吡咯并[2,3-d]嘧啶、7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基-异吲哚-1,3-酮和 4-氯-5-乙炔-吡咯并[2,3-d]嘧啶。偶联步骤可以应用任何适合的试剂(例如适合的碱,例如 NaH) 进行。保护基 R_8' 可以是任何适合的保护基,例如 2,4-氯苄基或 2,5-二氯苄基、甲苯酰基、苯甲酰基或苄基。这些可以通过适合的试剂(例如应用 BCl_3 或适合的碱,例如甲醇钠)除去。

[0316]



[0317] $R_8' =$ 2,4-二氯苄基、甲苯酰基、苯甲酰基或苄基

[0318] $X = N, CH$ 或 CR_4

[0319] $R_1' =$ 卤素, NR_5R_6 或 OR_7

[0320] $R_2' = H$, 卤素或 NR_5R_6

[0321] R_3, R_4, R_5, R_6 和 R_7 如本文定义的

[0322] 通用方法 3 步骤 1: 1,2-脱水-2-C-乙炔基-3,5-双(4-甲基苯甲酰基)- α -D-呋喃核糖

[0323] 将中间体 (3R,4R,5R)-4-(4-甲基苯甲酰基氧基)-5-(4-甲基苯甲酰基氧基甲基)-3-乙炔基-四氢-呋喃-2,3-二醇 (II-1) (304mg, 0.74mmol) 溶于 CH_2Cl_2 (4mL) 中。加入三乙胺 (308.4 μ L, 2.22mmol, 3 当量) 并且将混合物加热至 30 $^{\circ}C$ 。历经 10 分钟, 滴加入甲磺酸酐 (167.6mg, 0.96mmol, 1.3 当量) 的 CH_2Cl_2 (1mL) 溶液。将反应在 40 $^{\circ}C$ 下搅拌 2.5 小时并且加入 CH_2Cl_2 (50mL)。将 CH_2Cl_2 溶液用 H_2O (2 $\times$ 5mL)、盐水 (10mL) 洗涤, 干燥 (Na_2SO_4), 过滤并且浓缩至干燥, 获得粗中间体 1,2-脱水-2-C-乙炔基-3,5-双(4-甲基苯

甲酰基)- α -D-呋喃核糖。

[0324] 通用方法3步骤2:(2R,3R,4R,5R)-2-(4-氯-吡咯并[2,3-d]嘧啶-7-基)-4-(4-甲基苯甲酰基氧基)-5-(4-甲基苯甲酰基氧基甲基)-3-乙炔基-四氢呋喃-3-醇

[0325] 在装有4-氯-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶(227.3mg,1.48mmol,2当量)的干燥烧瓶中加入NaH(59.2mg,60%的油分散液,1.48mmol,2当量)和乙腈(4mL),搅拌10分钟。加入溶于乙腈(2mL)中的粗中间体1,2-脱水-2-C-乙炔基-3,5-双(4-甲基苯甲酰基)- α -D-呋喃核糖(383mg,0.74mmol,1当量)并且将反应在50℃下加热15小时。通过加入1N HCl溶液将混合物中和至pH 7.0,并且真空蒸发。将乙酸乙酯(50mL)加入至残留溶液中并且将其用1N HCl溶液(8mL)、H₂O(8mL)、盐水(10mL)洗涤,干燥(Na₂SO₄),过滤并且浓缩至干燥,获得粗中间体(2R,3R,4R,5R)-2-(4-氯-吡咯并[2,3-d]嘧啶-7-基)-4-(4-甲基苯甲酰基氧基)-5-(4-甲基苯甲酰基氧基甲基)-3-乙炔基-四氢呋喃-3-醇(434mg)。

[0326] 通用方法3步骤3:(2R,3R,4R,5R)-2-(4-氯-吡咯并[2,3-d]嘧啶-7-基)-3-乙炔基-5-羟基甲基-四氢呋喃-3,4-二醇

[0327] 将粗中间体(2R,3R,4R,5R)-2-(4-氯-吡咯并[2,3-d]嘧啶-7-基)-4-(4-甲基苯甲酰基氧基)-5-(4-甲基苯甲酰基氧基甲基)-3-乙炔基-四氢呋喃-3-醇(434mg,0.74mmol)溶于MeOH(5mL)和CH₂Cl₂(5mL)中。加入30%甲醇钠的甲醇溶液(1.38mL,7.4mmol,10当量),并且将混合物在室温下搅拌15分钟。通过加入1N HCl溶液将混合物中和至pH 7.0,并且真空蒸发至干燥,通过快速色谱(CH₂Cl₂:MeOH=92:8)纯化,获得(2R,3R,4R,5R)-2-(4-氯-吡咯并[2,3-d]嘧啶-7-基)-3-乙炔基-5-羟基甲基-四氢呋喃-3,4-二醇。¹H-NMR(CDCl₃): δ 8.58(s,1H),8.00(d,1H,J=3.9Hz),6.68(d,1H,J=3.9Hz),6.49(s,1H),4.51(d,1H,J=9.0Hz),4.20-3.75(m,3H),2.51(s,1H)。ESI-MS:计算值C₁₃H₁₂ClN₃O₄(309.05);实测值:310.3。

[0328] 通用方法3步骤4:(2R,3R,4R,5R)-2-(4-氨基-吡咯并[2,3-d]嘧啶-7-基)-3-乙炔基-5-羟基甲基-四氢呋喃-3,4-二醇

[0329] 将(2R,3R,4R,5R)-2-(4-氯-吡咯并[2,3-d]嘧啶-7-基)-3-乙炔基-5-羟基甲基-四氢呋喃-3,4-二醇(198.0mg,0.64mmol)和NH₃·H₂O(30mL)的混合物在玻璃压力管中在100℃下加热5小时。将反应混合物浓缩至干燥并且通过快速色谱(CH₂Cl₂:MeOH=80:20)纯化,获得(2R,3R,4R,5R)-2-(4-氨基-吡咯并[2,3-d]嘧啶-7-基)-3-乙炔基-5-羟基甲基-四氢呋喃-3,4-二醇,为淡黄色固体。¹H NMR(300MHz,MeOD): δ 8.07(1H,s),7.48(1H,d,J=3.9Hz),6.58(1H,d,J=3.6Hz),6.29(1H,s),4.49(1H,d,J=8.4Hz),4.08-3.96(2H,m),3.90-3.75(1H,m),2.52(1H,s)。¹H NMR(300MHz,DMSO-d₆): δ 8.05(1H,s),7.41(1H,d,J=3.6Hz),6.97(2H,s),6.55(1H,d,J=3.6Hz),6.23(1H,s),6.16(1H,s),5.61(1H,d,J=7.5Hz),5.13(1H,t,J=4.9Hz),4.33(1H,t,J=7.8Hz),3.90-3.70(2H,m),3.78-3.68(1H,m),3.01(1H,s)。¹³CNMR(75MHz,DMSO-d₆): δ 157.4,151.6,150.1,121.6,102.4,99.6,89.6,82.1,81.8,76.5,75.8,74.0,59.7。ESI-MS:计算值C₁₃H₁₄N₄O₄(290.1);实测值:291.2。

[0330] 实施例

[0331] 本发明参考以下实施例进行描述。应该理解的是,本发明并不限制于这些实施例。

[0332] 缩略语

[0333] DMSO 二甲亚砜

[0334] THF 四氢呋喃

[0335] DMAP 4-二甲基氨基吡啶

[0336] NMR 核磁共振

[0337] TEA 三乙胺

[0338] MS 质谱

[0339] DMF 二甲基甲酰胺

[0340] DCM 二氯甲烷

[0341] PBS 磷酸缓冲盐溶液

[0342] FBS 胎牛血清

[0343] HRP 辣根过氧化物酶

[0344] TMB 3,3',5,5'-四甲基联苯胺

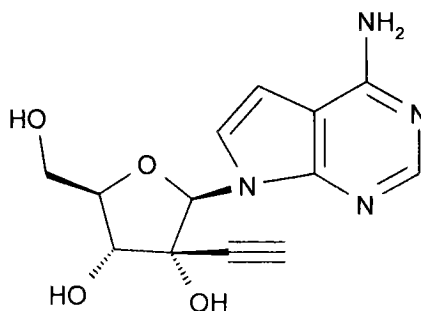
[0345] DMEM Dulbecco 改良的 Eagle 培养基

[0346] I. 制备本发明化合物

[0347] 实施例 1

[0348] (2R,3R,4R,5R)-2-(4-氨基-吡咯并[2,3-d]嘧啶-7-基)-3-乙炔基-5-羟基甲基-四氢呋喃-3,4-二醇

[0349]



[0350] 标题化合物根据通用方法 1 由可商购获得的 (3R,4R,5R)-5-(2,4-二氯苄基氧基甲基)-4-(2,4-二氯苄基氧基)-2-甲氧基-四氢呋喃-3-乙酸酯 I-1 和 4-氯吡咯并[2,3-d]嘧啶制备。

[0351] 可选择的是,该化合物根据通用方法 2a、2b 或 2c 和通用方法 3 制备。

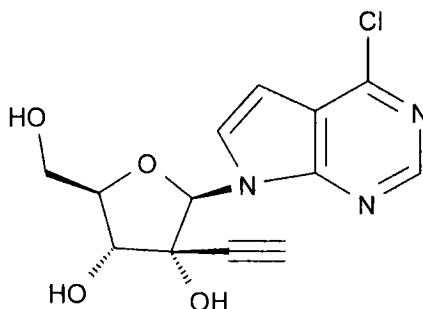
[0352] 黄色固体。¹H NMR(300MHz, MeOD) : δ 8.07(1H, s), 7.48(1H, d, J = 3.9Hz), 6.58(1H, d, J = 3.6Hz), 6.29(1H, s), 4.49(1H, d, J = 8.4Hz), 4.08-3.96(2H, m), 3.90-3.75(1H, m), 2.52(1H, s)。¹H NMR(300MHz, DMSO-d₆) : δ 8.05(1H, s), 7.41(1H, d, J = 3.6Hz), 6.97(2H, s), 6.55(1H, d, J = 3.6Hz), 6.23(1H, s), 6.16(1H, s), 5.61(1H, d, J = 7.5Hz), 5.13(1H, t, J = 4.9Hz), 4.33(1H, t, J = 7.8Hz), 3.90-3.70(2H, m), 3.78-3.68(1H, m), 3.01(1H, s)。¹³C NMR(75MHz, DMSO-d₆) : δ 157.4, 151.6, 150.1, 121.6, 102.4, 99.6, 89.6, 82.1, 81.8, 76.5, 75.8, 74.0, 59.7。ESI-MS : 计算值 C₁₃H₁₄N₄O₄(290.1) ; 实测值 : 291.2(M+1)。

[0353] $[\alpha]_D^{25} : +160.0^\circ$ (ATAGO AP-100 旋光计 ; 甲醇溶剂 ; 100mm 观察管 ; 23.4℃ ; 波长 589nm)。

[0354] 实施例 2

[0355] (2R,3R,4R,5R)-2-(4-氯-吡咯并[2,3-d]嘧啶-7-基)-3-乙炔基-5-羟基甲基-四氢呋喃-3,4-二醇

[0356]



[0357] 标题化合物根据通用方法 1 由可商购获得的 (3R,4R,5R)-5-(2,4-二氯苄基氧基甲基)-4-(2,4-二氯苄基氧基)-2-甲氧基-四氢呋喃-3-乙酸酯 I-1 和 4-氯吡咯并[2,3-d]嘧啶制备。

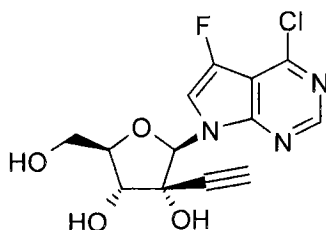
[0358] 可选择的是,该化合物根据通用方法 2a、2b 或 2c 和通用方法 3 制备。

[0359] 白色固体。¹H-NMR(300MHz, MeOH-d₄) : δ 8.59(1H, s), 8.01(1H, d, J = 4.2Hz), 6.69(1H, d, J = 3.9Hz), 6.49(1H, s), 4.50(1H, d, J = 9.3Hz), 4.06-3.99(2H, m), 3.87-3.82(1H, m), 2.52(1H, s)。ESI-MS : 计算值 C₁₃H₁₂ClN₃O₄(309.2) ; 实测值 : 310.6(M+1)。

[0360] 实施例 3

[0361] (2R,3R,4R,5R)-2-(4-氯-5-氟-吡咯并[2,3-d]嘧啶-7-基)-3-乙炔基-5-羟基甲基-四氢呋喃-3,4-二醇

[0362]



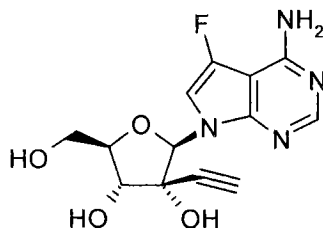
[0363] 标题化合物根据通用方法 2a 或 2b 和通用方法 3 由可商购获得的 (3R,4R,5R)-5-(2,4-二氯苄基氧基甲基)-4-(2,4-二氯苄基氧基)-2-甲氧基-四氢呋喃-3-乙酸酯 I-1 和 4-氯-5-氟-吡咯并[2,3-d]嘧啶制备。

[0364] ¹H NMR(300MHz, MeOD) : δ 8.60(1H, s), 7.92(1H, d, J = 2.1Hz), 6.54(1H, d, J = 2.1Hz), 4.46(1H, d, J = 8.7Hz), 4.05-3.95(2H, m), 3.90-3.80(1H, m), 2.56(1H, s)。ESI-MS : 计算值 C₁₃H₁₁ClF₁N₃O₄(327.0) ; 实测值 : 328.2。

[0365] 实施例 4

[0366] (2R,3R,4R,5R)-2-(4-氨基-5-氟-吡咯并[2,3-d]嘧啶-7-基)-3-乙炔基-5-羟基甲基-四氢呋喃-3,4-二醇

[0367]



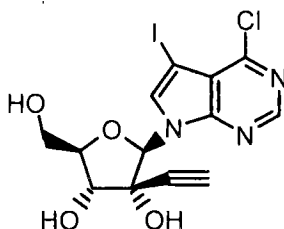
[0368] 标题化合物根据通用方法 2a 或 2c 和通用方法 3 由可商购获得的 (3R,4R,5R)-5-(2,4-二氯苄基氧基甲基)-4-(2,4-二氯苄基氧基)-2-甲氧基-四氢呋喃-3-乙酸酯 I-1 和 4-氯-5-氟-吡咯并 [2,3-d] 嘧啶制备。

[0369] ^1H NMR (300MHz, MeOD) : δ 8.08 (1H, s), 7.39 (1H, d, $J = 2.1\text{Hz}$), 6.34 (1H, d, $J = 2.1\text{Hz}$), 4.44 (1H, d, $J = 9.0\text{Hz}$), 4.05-3.95 (2H, m), 3.85-3.75 (1H, m), 2.58 (1H, s)。ESI-MS : 计算值 $\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{FN}_4\text{O}_4$ (308.1) ; 实测值 : 309.2。

[0370] 实施例 5

[0371] (2R,3R,4R,5R)-2-(4-氯-5-碘-吡咯并 [2,3-d] 嘧啶-7-基)-3-乙炔基-5-羟基甲基-四氢呋喃-3,4-二醇

[0372]



[0373] 标题化合物根据通用方法 1 由可商购获得的 (3R,4R,5R)-5-(2,4-二氯苄基氧基甲基)-4-(2,4-二氯苄基氧基)-2-甲氧基-四氢呋喃-3-乙酸酯 I-1 和 4-氯-5-碘-吡咯并 [2,3-d] 嘧啶制备。

[0374] 可选择的是,该化合物根据通用方法 2a 和通用方法 3 制备。

[0375] 白色固体。 ^1H -NMR (300MHz, DMSO- d_6) : δ 8.69 (1H, s), 8.36 (1H, s), 6.39 (1H, s), 6.33 (1H, s), 5.70 (1H, d, $J = 7.60\text{Hz}$), 5.33 (1H, t, $J = 4.85\text{Hz}$), 4.34 (dd, $J = 8.94, 7.47\text{Hz}$, 1H), 3.92-3.81 (2H, m), 3.71-3.64 (1H, m), 3.04 (1H, s)。

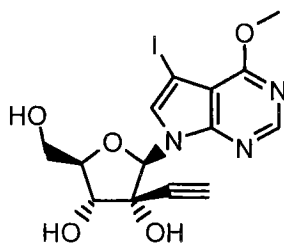
[0376] ESI-MS : 计算值 $\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{ClIN}_3\text{O}_4$ (435.6) ; 实测值 : 436.1.2 (M+1)。

[0377] ^{13}C NMR (75MHz, DMSO- d_6) : δ 151.67, 151.32, 144.28, 133.96, 117.00, 90.85, 83.06, 82.08, 77.46, 76.61, 73.85, 59.54, 53.76。

[0378] 实施例 6

[0379] (2R,3R,4R,5R)-3-乙炔基-5-羟基甲基-2-(5-碘-4-甲氧基-吡咯并 [2,3-d] 嘧啶-7-基)-四氢呋喃-3,4-二醇

[0380]



[0381] 标题化合物根据通用方法 1 由可商购获得的 (3R,4R,5R)-5-(2,4-二氯苄基氧基甲基)-4-(2,4-二氯苄基氧基)-2-甲氧基-四氢呋喃-3-乙酸酯 I-1 和 4-氯-5-碘-吡咯并 [2,3-d] 嘧啶制备,然后通过用甲醇处理将氯代化合物转化为甲氧基化合物。

[0382] 可选择的是,该化合物根据通用方法 2a 和通用方法 3 制备。

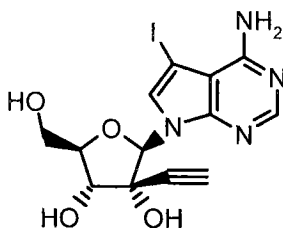
[0383] 白色固体。¹H-NMR(300MHz, DMSO-d₆): δ 8.44(1H, s), 7.97(1H, s), 6.28(2H, s), 5.66(1H, d, J = 7.34Hz), 5.24(1H, t, J = 4.73Hz), 4.33(t, J = 7.76, Hz, 1H), 4.05(3H, s), 3.88-3.79(2H, m), 3.67-3.62(1H, m), 3.03(1H, s)。ESI-MS:计算值 C₁₄H₁₄IN₃O₅(431.2); 实测值:432.1.2(M+1)。

[0384] ¹³C NMR(75MHz, DMSO-d₆): δ 162.82, 152.19, 144.62, 144.54, 144.41, 129.81, 107.02, 82.79, 82.26, 76.58, 73.98, 59.68, 54.37, 51.69。

[0385] 实施例 7

[0386] (2R,3R,4R,5R)-2-(4-氨基-5-碘-吡咯并 [2,3-d] 嘧啶-7-基)-3-乙炔基-5-羟基甲基-四氢呋喃-3,4-二醇

[0387]



[0388] 标题化合物根据通用方法 1 由可商购获得的 (3R,4R,5R)-5-(2,4-二氯苄基氧基甲基)-4-(2,4-二氯-苄基氧基)-2-甲氧基-四氢呋喃-3-乙酸酯 I-1 和 4-氯-5-碘-吡咯并 [2,3-d] 嘧啶制备。

[0389] 可选择的是,该化合物根据通用方法 2a 和通用方法 3 制备。

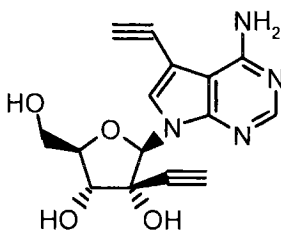
[0390] 白色固体。¹H-NMR(300MHz, DMSO-d₆): δ 8.10(1H, s), 7.75(1H, s), 6.62(2H, bs), 6.20(2H, d, J = 2.38Hz), 5.60(1H, d, J = 7.38Hz), 5.18(1H, t, J = 5.18Hz), 4.31(dd, J = 8.64, 7.47Hz, 1H), 3.84-3.76(2H, m), 3.65-3.64(1H, m), 3.07(1H, s)。ESI-MS:计算值 C₁₃H₁₃IN₄O₄(416.2); 实测值:417.2(M+1)。

[0391] ¹³C NMR(75MHz, DMSO-d₆): δ 157.80, 150.71, 144.96, 127.45, 103.48, 90.16, 82.63, 82.49, 77.31, 76.50, 74.18, 59.85, 52.29。

[0392] 实施例 8

[0393] (2R,3R,4R,5R)-2-(4-氨基-5-乙炔基-吡咯并 [2,3-d] 嘧啶-7-基)-3-乙炔基-5-羟基甲基-四氢-呋喃-3,4-二醇

[0394]



[0395] 标题化合物根据通用方法 2a 和通用方法 3 由可商购获得的 (3R,4R,5R)-5-(2,4-二氯苄基氧基甲基)-4-(2,4-二氯-苄基氧基)-2-甲氧基-四氢呋喃-3-乙酸酯 I-1 和 4-氯-5-乙炔-吡咯并 [2,3-d] 嘧啶或 4-氯-5-三甲基甲硅烷基乙炔基-7H-吡咯并 [2,3-d] 嘧啶制备。

[0396] 可选择的是,标题化合物和实施例 9 和 10 化合物是由 (2R,3R,4R,5R)-2-(4-氨基-5-碘-吡咯并 [2,3-d] 嘧啶-7-基)-3-乙炔基-5-羟基甲基-四氢呋喃-3,4-二醇 (实施例 7) 制备的。在干燥并且预冷的 25mL 圆底烧瓶中加入溶于无水 THF (1.0mL) 和无水 DMF (0.5mL)、三乙胺 (0.04mL, 0.288mmol)、三甲基甲硅烷基乙炔 (0.024mL, 0.173mmol) 中的 (2R,3R,4R,5R)-2-(4-氨基-5-碘-吡咯并 [2,3-d] 嘧啶-7-基)-3-乙炔基-5-羟基甲基-四氢呋喃-3,4-二醇 (0.060g, 0.144mmol)、碘化铜 (I) (0.006g, 0.028mmol)、四(三苯膦)钯 (0) (0.016g, 0.014mmol)。将反应混合物在 0℃ 至室温下、在氩气下搅拌 30 分钟。将溶剂真空除去,并且将获得的残留物溶于甲醇 (0.60mL) 和 30% 氨溶液 (0.60mL) 中。将产生的反应混合物在室温下搅拌 1 小时。将溶剂真空除去。将获得的粗残留物通过反相制备 HPLC 在 Atlantis C¹⁸ 柱 (250×20mm) 上纯化,梯度为 5 至 95% 在水中的乙腈。将包含所需产物的级分分离,蒸发并且从水中冻干,获得 (2R,3R,4R,5R)-2-(4-氨基-5-乙炔基-吡咯并 [2,3-d] 嘧啶-7-基)-3-乙炔基-5-羟基甲基-四氢-呋喃-3,4-二醇 (实施例 8)、(2R,3R,4R,5R)-2-(4-氨基-5-乙炔基-吡咯并 [2,3-d] 嘧啶-7-基)-3-丁-1,3-二炔基-5-羟基甲基-四氢-呋喃-3,4-二醇 (实施例 9) 和 (2R,3R,4R,5R)-2-(4-氨基-5-碘-吡咯并 [2,3-d] 嘧啶-7-基)-3-丁-1,3-二炔基-5-羟基甲基-四氢-呋喃-3,4-二醇 (实施例 10), 为白色固体。

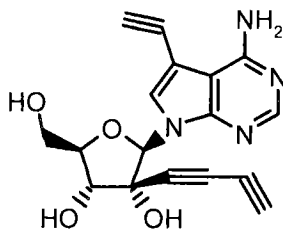
[0397] 白色固体。¹H-NMR (300MHz, DMSO-d₆) : δ 8.14 (1H, s), 7.88 (1H, s), 6.62 (1H, bs), 6.26-6.20 (2H, m), 5.70 (1H, bs), 5.25 (1H, bs), 4.33 (d, J = 8.79 Hz, 1H), 4.26 (1H, s), 3.85-3.62 (4H, m), 3.06 (1H, s)。

[0398] ESI-MS : 计算值 C₁₅H₁₄IN₄O₄ (314.3) ; 实测值 : 315.3 (M+1)。

[0399] 实施例 9

[0400] (2R,3R,4R,5R)-2-(4-氨基-5-乙炔基-吡咯并 [2,3-d] 嘧啶-7-基)-3-丁-1,3-二炔基-5-羟基甲基-四氢-呋喃-3,4-二醇

[0401]



[0402] 标题化合物如以上实施例 8 描述的制备。

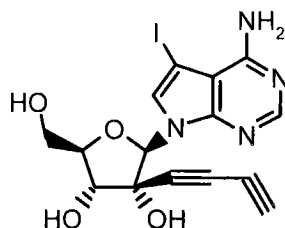
[0403] 白色固体。 $^1\text{H-NMR}$ (300MHz, DMSO-d_6) : δ 8.15(1H, s), 7.92(1H, s), 6.60(2H, bs), 6.21(1H, s), 5.80(1H, bs), 5.25(1H, bs), 4.36(d, $J = 9.08\text{Hz}$, 1H), 4.28(1H, s), 3.88-3.78(2H, m), 3.67-3.62(2H, m), 3.54(1H, s)。

[0404] ESI-MS : 计算值 $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_4$ (338.3) ; 实测值 : 339.3 (M+1)。

[0405] 实施例 10

[0406] (2R, 3R, 4R, 5R)-2-(4-氨基-5-碘-吡咯并[2,3-d]嘧啶-7-基)-3-丁-1,3-二炔基-5-羟基甲基-四氢-呋喃-3,4-二醇

[0407]



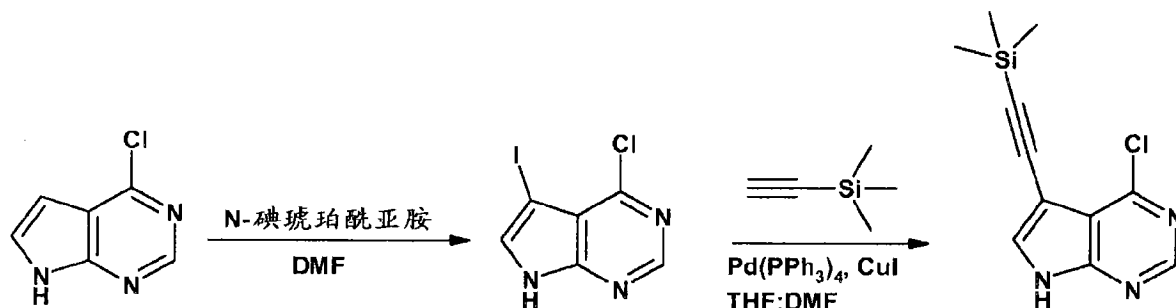
[0408] 标题化合物如以上实施例 8 描述的制备。

[0409] 白色固体。ESI-MS : 计算值 $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{IN}_4\text{O}_4$ (440.2) ; 实测值 : 441.2 (M+1)。

[0410] 实施例 11 : 合成碱基团

[0411] 4-氯-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶是可商购获得的。4-氯-5-氟-吡咯并[2,3-d]嘧啶可以如 X Wang, P P Seth, R Ranken, E E Swayze 和 M T Migawa, Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids, 23:1, 161-170 中描述的合成。7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基-异吲哚-1,3-二酮可以如 M M Bio, F Xu, M Waters, J M Willimas, K A Savery, C J Cowden, C Yang, E Buck, Z J Song, D M Tschäen, R P Volante, R A Reamer, E J J Grabowski, J. Org. Chem. 2004, 69, 6257-6266 中描述的合成。4-氯-5-碘-吡咯并[2,3-d]嘧啶和 4-氯-5-乙炔-吡咯并[2,3-d]嘧啶可以由以下描述的 4-氯-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶合成。其中如通用方法 3 描述的, 将碱 7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基-异吲哚-1,3-二酮与糖基团偶联, 保护基可以在偶联步骤之后在碱性条件下(例如 1-丁基胺, 在甲醇中)除去(例如在 65°C 下加热 12 小时)。从而可以获得相应的 4-氨基-吡咯并[2,3-d]嘧啶-7-基核苷。

[0412]



[0413] 实施例 11.1 : 在用铝箔避光的 250mL 圆底烧瓶中, 加入溶于无水 DMF 中的 4-氯-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶 1 (2.15g, 14.0mmol) 和 N-碘琥珀酰亚胺 (3.37g, 14.98mmol)。将反应混合物在室温下、在氮气下搅拌 16 小时。将溶剂真空除去, 并且将残留物溶于二氯甲烷 (250mL) 中。将反应混合物用盐水 (50mL) 洗涤, 并且将有机层分离, 经

Na₂SO₄ 干燥并且真空浓缩。将粗残留物通过快速色谱在硅胶上纯化,并且用 60% 在环己烷中的 EtOAc 洗脱。将包含所需产物的级分 (TLC) 合并并且蒸发,获得 4- 氯 -5- 碘 - 吡咯并 [2,3-d] 嘧啶,为淡黄色固体。

[0414] ESI-MS :计算值 C₆H₃ClIN₃(279.4) ;实测值 :280.07 (M+1)。

[0415] 实施例 11.2 :在用铝箔避光的 250mL 圆底烧瓶中,加入溶于无水 THF (60mL)、无水 DMF (20mL) 和三乙胺 (0.64mL, 4.65mmol) 的 4- 氯 -5- 碘 -7H- 吡咯并 [2,3-d] 嘧啶 (1.3g, 4.6mmol)、碘化铜 (I) (0.17g, 0.93mmol)、三甲基甲硅烷基乙炔 (0.96mL, 6.97mmol) 和四 (三苯膦) 钯 (0) (0.26g, 0.23mmol)。将反应混合物在室温下、在氮气下搅拌 16 小时。将溶剂真空除去,并且将残留物溶于二氯甲烷 (250mL) 中。将反应混合物用水 (3×50mL) 洗涤,并且将合并的有机层经 Na₂SO₄ 干燥并且真空浓缩。将粗残留物通过快速色谱在硅胶上纯化,并且用 70% 在环己烷中的 EtOAc 洗脱。将包含 所需产物的级分 (TLC) 合并并且蒸发,获得 4- 氯 -5- 三甲基甲硅烷基乙炔基 -7H- 吡咯并 [2,3-d] 嘧啶,为黄褐色白色固体。

[0416] ¹H-NMR (300MHz, DMSO-d₆) : δ 12.92 (1H, s), 8.62 (1H, s), 8.06 (1H, s), 0.23 (9H, s)。

[0417] ESI-MS :计算值 C₁₁H₁₂ClN₃Si (249.7) ;实测值 :250.2 (M+1)。

[0418] 或者将 4- 氯 -5- 三甲基甲硅烷基乙炔基 -7H- 吡咯并 [2,3-d] 嘧啶直接用于偶联步骤,如通用方法 3 中所示,在该情况中,三甲基甲硅烷基是在偶联反应条件下裂解的,或者应用例如氨、NaOH 或 KOH 通过脱甲硅烷基反应可以将其转化为 4- 氯 -5- 乙炔 - 吡咯并 [2,3-d] 嘧啶。

[0419] II. 本发明化合物的抗病毒活性

[0420] 本发明化合物具有对抗黄病毒科的多种成员的活性。本发明化合物的活性可以在标准体外和体内试验中显示。

[0421] 50% 有效浓度 (EC₅₀) 是降低 50% 的病毒所产生的信号的试验化合物的浓度。其是应用非线性回归分析计算的,应用变量斜率 S 形的剂量响应曲线和商购的软件,例如 Prism 或 Activity Base。

[0422] 实施例 12

[0423] 基于细胞的黄病毒属 (Flavivirus) 免疫检测 (CFI) 试验

[0424] 将 BHK21 或 A549 细胞用胰蛋白酶消化、计数并且在 Hams F-12 培养基 (对于 A549 细胞) 或添加 2% 胎牛血清和 1% 青霉素 / 链霉素的 RPMI-1640 培养基 (对于 BHK21 细胞) 中稀释至 2×10⁵ 个细胞 / mL。将 2×10⁴ 个细胞 / 孔分布在透明的 96- 孔组织培养板中,并且在 37℃、5% CO₂ 下放置过夜。第二天,将细胞在多种浓度的试验化合物的存在下、在 37℃ 和 5% CO₂ 下、在相同培养基中以 0.3 复合感染 (MOI) 用病毒感染 1 小时。将包含病毒和化合物的培养基除去,用仅包含试验化合物的新鲜培养基替代并且在 37℃、5% CO₂ 下再培养 48 小时。将细胞用 PBS 洗涤一次并且用冷的甲醇固定 10 分钟。用 PBS 洗涤两次后,将固定的细胞用包含 1% FBS 和 0.05 吐温 -20 的 PBS 在室温下封闭 1 小时。然后加入浓度为 1 : 20 至 1 : 100 (在包含 1% FBS 和 0.05 吐温 -20 的 PBS 中) 的一抗溶液 (4G2) 达 3 小时。然后将细胞用 PBS 洗涤 3 次,然后与辣根过氧化物酶 (HRP) 结合的抗鼠 IgG (Sigma, 1 : 2000 稀释) 培养 1 小时。用 PBS 洗涤 3 次后,将 50 μL 3,3',5,5' - 四甲基联苯胺 (TMB) 底物溶液 (Sigma) 加入至每孔中达 2 分钟。将反应通过加入 0.5M 硫酸来终止。将板在 450nm

处读取吸光度,用于病毒载量定量。测量后,将细胞用 PBS 洗涤 3 次,然后用碘化丙啶培养 5 分钟。将板在 Tecan Safire 读板仪(激发 537nm,发射 617nm)中读数,用于细胞数量定量。剂量响应曲线是用平均吸光度对试验化合物浓度的对数来绘制的。 EC_{50} 是通过非线性回归分析来计算的。可以应用阳性对照,例如 N-壬基-脱氧野尻霉素。

[0425] 实施例 13

[0426] 基于细胞的黄病毒属致细胞病变作用(CPE)试验

[0427] 为了试验对抗西尼罗河病毒或日本脑炎病毒,将 BHK21 细胞用胰蛋白酶消化并且在添加 2%胎牛血清和 1%青霉素/链霉素的 RPMI-1640 培养基中稀释至浓度为 4×10^5 个细胞/mL。为了试验对抗登革病毒,将 Huh7 细胞用胰蛋白酶消化并且在添加 5%胎牛血清和 1%青霉素/链霉素的 DMEM 培养基中稀释至浓度为 4×10^5 个细胞/mL。将 50 μ L 细胞悬浮液(2×10^4 个细胞)/孔分布在 96-孔底部透光的 PIT 聚合基质板(Nunc)中。将细胞在培养基中、在 37°C、5% CO_2 下培养过夜,然后以 MOI = 0.3 用西尼罗河病毒(例如 B956 菌株)或日本脑炎病毒(例如 Nakayama 菌株)或者以 MOI = 1 用登革病毒(例如 DEN-2 NGC 菌株),在不同浓度的试验化合物的存在下感染。将包含病毒和化合物的板进一步在 37°C、5% CO_2 下培养 72 小时。培养结束后,将 100 μ L CellTiter- **Glo**®试剂加入至每孔中。将内容物在定轨振荡器上混合 2 分钟,以诱导细胞裂解。将板在室温下培养 10 分钟,以稳定发光信号。发光读数是应用读板仪记录的。可以应用阳性对照,例如 N-壬基-脱氧野尻霉素。

[0428] 实施例 14

[0429] 基于细胞的丙型肝炎病毒(HCV)复制子试验

[0430] 将包含 HCV 复制子的细胞(Huh-luc/neo-ET)保持在包含 2mM L-谷氨酸盐、0.1 mM 非必需氨基酸溶液、10%热灭活的胎牛血清和 250mg/mL **Geneticin**®、G418 硫酸盐溶液的 DMEM 培养基中。将细胞保持在 20 至 80%的融合并且用胰蛋白酶(0.05%)/EDTA 溶液进行胰蛋白酶消化。胰蛋白酶消化后,将细胞重新悬浮于添加的 DMEM 无酚红的培养基(添加 2mM L-谷氨酰胺、0.1mM 非必需氨基酸溶液、10%热灭活的胎牛血清和 1mM 丙酮酸钠的 DMEM 无酚红的培养基)中,并且以 420g 离心沉淀 5 分钟。计算细胞密度并且用无酚红的培养基稀释至 1×10^5 个细胞/mL。

[0431] 制备两套板,白色不透光 96-孔板用于荧光素酶读数,96-孔透明板用于细胞毒性测量。将每个孔接种 10,000 个细胞/孔,并且在 37°C、5% CO_2 下培养过夜。培养后,将培养基吸出并且加入添加多种浓度化合物的无酚红的培养基,并且将板进一步在 37°C、5% CO_2 下再培养 48 小时。作为阳性对照,可以应用例如 NM107(2'-C-甲基胞苷)。

[0432] 为了测量荧光素酶活性,将板从培养箱中取出,使得它们平衡至室温达 30 分钟,并且荧光素酶活性是在加入 100 μ L 根据厂商说明书制备的 **Britelite**®(PerKin Elmer)后测量的。

[0433] III. 本发明化合物在登革热感染的小鼠模型中的抗病毒活性

[0434] 实施例 15

[0435] 本发明化合物在登革热感染的小鼠模型体内也显示出活性(Schul 等人, Journal of Infectious Diseases 2007;195:665-74)。简而言之,将 AG129 小鼠(B&K Universal Ltd,Hull,UK)饲养在单独通风的笼里(TechniPlast,Italy)并且应用 6 至 10 周龄。将小

鼠腹膜内注射 0.4mL TSV01 登革病毒 2 悬浮液。血样是在异氟烷麻醉下通过后眼眶穿刺获取的。将血样收集在包含终浓度为 0.4% 的柠檬酸钠的试管中,并且立刻以 6000g 离心 3 分钟,获得血浆。将 20 μ L 血浆稀释在 780 μ L RPMI 1640 培养基中并且迅速冻存在液氮中,用于噬菌斑试验分析。剩余的血浆用于细胞因子和 NS1 蛋白质水平测定。小鼠发展成登革病毒血症在数天内上升,在感染后第 3 天达到峰值。

[0436] 为了试验抗病毒活性,将本发明化合物溶于介质液中,例如 10% 乙醇、30% PEG300 和 60% D5W(5% 葡萄糖水溶液);或 6N HCl(1.5 当量):1N NaOH(pH 调节至 3.5):100mM 柠檬酸盐缓冲液 pH 3.5(0.9% v/v:2.5% v/v:96.6% v/v)。将 36 只 6-10 周龄的 AG129 小鼠分成 6 组,每组 6 只小鼠。如以上描述的,将所有的小鼠用登革病毒感染(0 天)。组 1 通过口服管饲法施用 200mL/只小鼠 0.2mg/kg 的本发明化合物,一天两次(早晨一次、傍晚一次),从 0 天开始连续 3 天(首剂量恰好在登革热感染前给药)。组 2、3 和 4 以相同方法分别施用 1mg/kg、5mg/kg 和 25mg/kg 本发明化合物。可以应用阳性对照,例如抗病毒化合物或 (2R,3R,4R,5R)-2-(2-氨基-6-羟基-嘌呤-9-基)-5-羟基甲基-3-甲基-四氢-呋喃-3,4-二醇,采用先前组的相同方法通过口服管饲法施用 200 μ L/只小鼠。另外一组仅用介质液体处理。

[0437] 感染后第 3 天,约 100 μ L 血样(用柠檬酸钠抗凝)是在异氟烷麻醉下通过后眼眶穿刺从小鼠中获取的。血浆是通过离心从每个血样中获得的,并且迅速冻存于液氮中,用于噬菌斑试验分析。将收集的血浆样品通过噬菌斑试验分析,如 Schul 等人,Journal of Infectious Diseases 2007;195:665-74 中描述的。细胞因子也如 Schul 等人,Journal of Infectious Diseases 2007;195:665-74 中描述的进行分析。NS1 蛋白质水平应用 **Platelia®** 试剂盒(BioRad Laboratories)分析。抗病毒作用是通过细胞因子水平和/或 NS1 蛋白质水平的减少来指示的。

[0438] 本发明化合物以剂量为 5-50mg/kg(一天两次)显示出剂量响应抑制,与对照组相比,获得病毒血症降低约 5-100 倍、例如约 10-60 倍、例如约 20-30 倍。例如,实施例 1 的化合物以剂量为 25mg/kg(一天两次)显示出剂量响应抑制,获得病毒血症降低约 20 倍。

[0439] IV. 用于登革热临床试验的临床试验方案

[0440] 临床试验例如以以下方法进行。I 期研究是在 64 位健康成年志愿者中进行随机的,安慰剂可控的剂量增加试验,以评价单个和多个口服剂量后的安全性、耐受性和药物代谢动力学。基于登革病毒血症典型地持续 5-7 天,进行 7 天给药。食物对血浆药物水平的影响是在一个同期组志愿者中评价的。

[0441] IIa 期研究是随机的、安慰剂可控的剂量增加试验,以评价本发明化合物在急性登革热成年患者中的抗病毒活性。有 3 个同期组,总共约 60 个个体。将适合的住院患者在发病的 48 小时内随机分入药物或安慰剂组,以提供观察抗病毒或临床作用的最好机会。每天给药或根据药物的药物代谢动力学性质所示的给药,至多 3 天。临床、血液学、生物化学和病毒学的指标每天测量 4 次,直至退热后 72 小时。主要的试验室终点是病毒血症消退的时间。主要的临床终点是发烧消退的时间。病毒血症消退的及时显著的降低是成功的说明。次要的测量可以包括 NS1 抗原血症消退的时间、血小板减少症恢复的时间以及任何静脉内补液的需求。

[0442] 应当理解的是,本文描述的实施例和实施方案仅用于说明目的并且关于它的多种

修饰或变化将提供给本领域技术人员以建议,并且包括在本申请书的精神和范围内以及附属权利要求的范围内。