



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111194217 B

(45) 授权公告日 2024.01.12

(21) 申请号 201880061322.3
 (22) 申请日 2018.09.21
 (65) 同一申请的已公布的文献号
 申请公布号 CN 111194217 A
 (43) 申请公布日 2020.05.22
 (30) 优先权数据
 62/561,237 2017.09.21 US
 (85) PCT国际申请进入国家阶段日
 2020.03.20
 (86) PCT国际申请的申请数据
 PCT/US2018/052239 2018.09.21
 (87) PCT国际申请的公布数据
 W02019/060740 EN 2019.03.28
 (73) 专利权人 里伯赛恩斯有限责任公司
 地址 美国加利福尼亚州
 (72) 发明人 M·史密斯 K·G·克伦普
 (74) 专利代理机构 上海一平知识产权代理有限公司 31266
 专利代理师 徐迅 马莉华
 (51) Int.Cl.
 A61K 31/7072 (2006.01)
 A61K 31/7076 (2006.01)
 C07H 19/04 (2006.01)
 (56) 对比文件
 US 2007027104 A1,2007.02.01
 CN 104011061 A,2014.08.27
 WO 2013092481 A1,2013.06.27

US 2014341848 A1,2014.11.20
 CN 105307661 A,2016.02.03
 CN 1777432 A,2006.05.24
 US 2011150836 A1,2011.06.23
 CN 105307662 A,2016.02.03
 CN 101287472 A,2008.10.15
 CN 104244945 A,2014.12.24
 CN 105073766 A,2015.11.18
 TW 201642872 A,2016.12.16
 CN 107011350 A,2017.08.04
 CN 101172992 A,2008.05.07
 CN 101384609 A,2009.03.11
 CN 109414508 A,2019.03.01
 WO 2014100505 A1,2014.06.26
 WO 2014186637 A1,2014.11.20
 US 2010016251 A1,2010.01.21
 US 2016115186 A1,2016.04.28
 WO 2016035006 A1,2016.03.10
 郭宗儒.基于代谢活化设计的索非布韦.药
 学学报.2014,第49卷(第10期),第1479-1482页.
 Pinho P,等.Discovery of β -d-2'-
 deoxy-2'-dichlorouridine nucleotide
 prodrugs as potent inhibitors of
 hepatitis C virus replication.Bioorg Med
 Chem Lett.2017,第27卷(第15期),第3468-3471
 页.
 岗上武,等.干扰素/利巴韦林联用疗法治疗
 慢性丙型肝炎.日本医学介绍.2003,第2003卷
 (第05期),第195-196页.

审查员 苟静

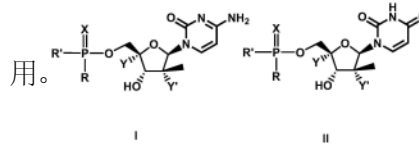
权利要求书3页 说明书49页

(54) 发明名称

作为HCV RNA复制抑制剂的4'-氟-2'-甲基
取代的核苷衍生物

(57) 摘要

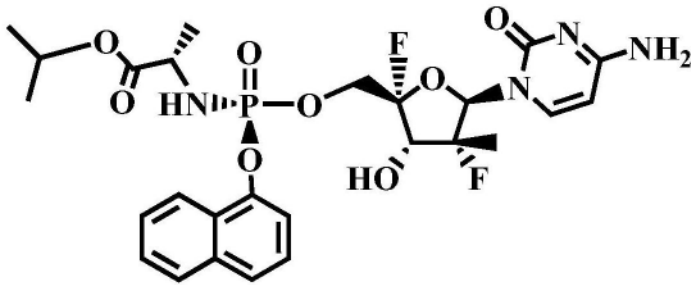
式I的胞苷核苷类似物(其可变因素如本文
所述),与式II的尿苷核苷类似物(其可变因素如
本文所述)组合下,产生抑制HCV聚合酶的协同作



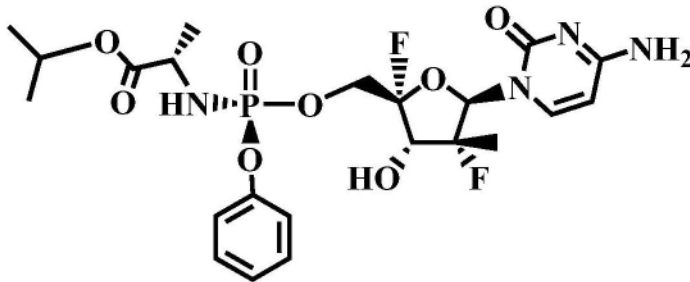
CN 111194217 B

1. 一种式I化合物和式II化合物的组合的用途,其特征在於,用于制备一制剂或药物,所述的制剂或药物用于治疗HCV:

其中,式I化合物选自下组:



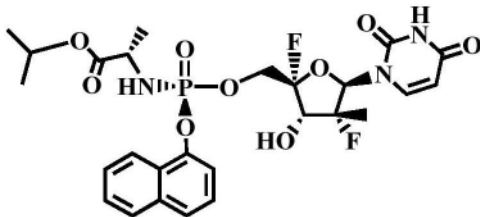
I-1, 或



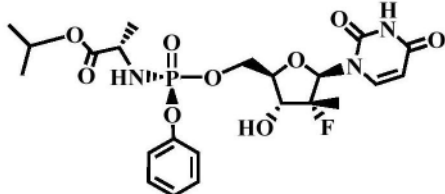
I-3,

或它们药理学上可接受的盐;

以及,其中所述的式II化合物选自下组:



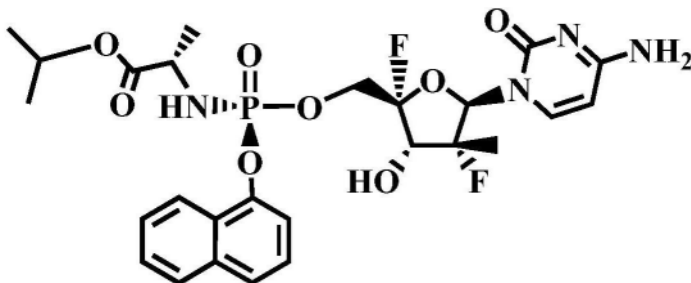
II-1, 或



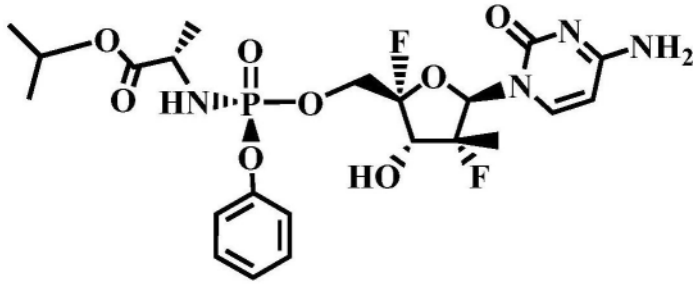
II-3,

或它们药理学上可接受的盐。

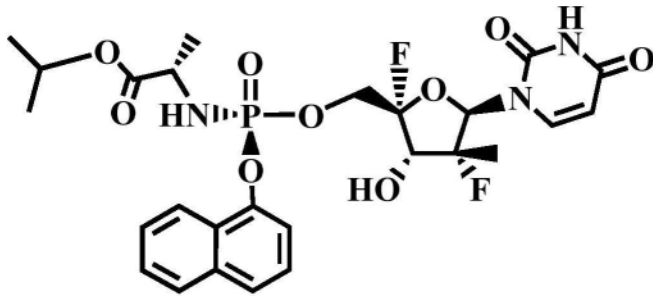
2. 如权利要求1所述的用途,其特征在於,式I化合物为:



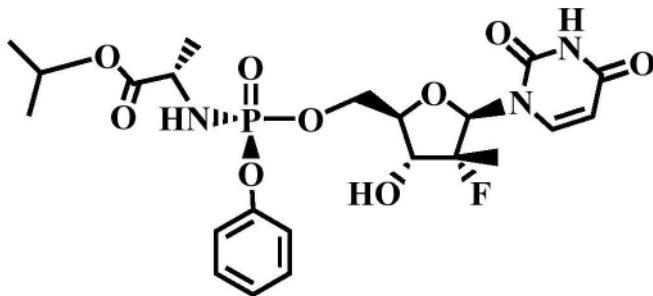
3. 如权利要求1所述的用途,其特征在於,式I化合物为:



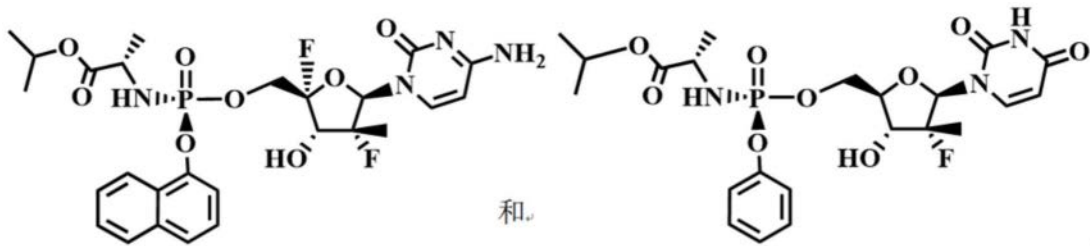
4. 如权利要求1所述的用途,其特征在于,式II化合物为:



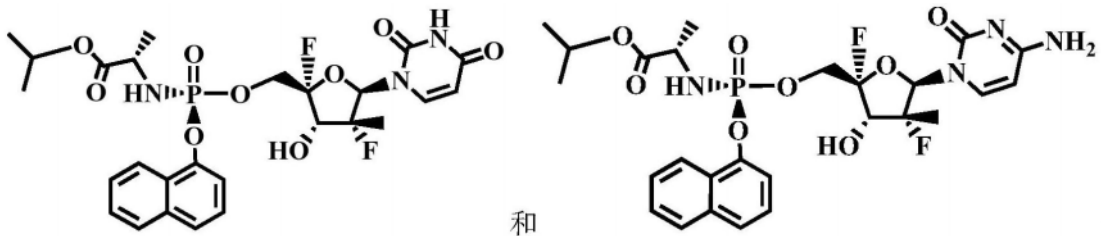
5. 如权利要求1所述的用途,其特征在于,式II化合物为:



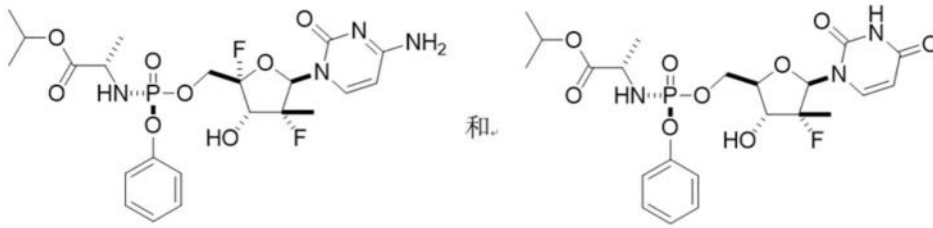
6. 如权利要求1所述的用途,其特征在于,式I化合物和式II化合物分别为:



7. 如权利要求1所述的用途,其特征在于,式I化合物和式II化合物分别为:



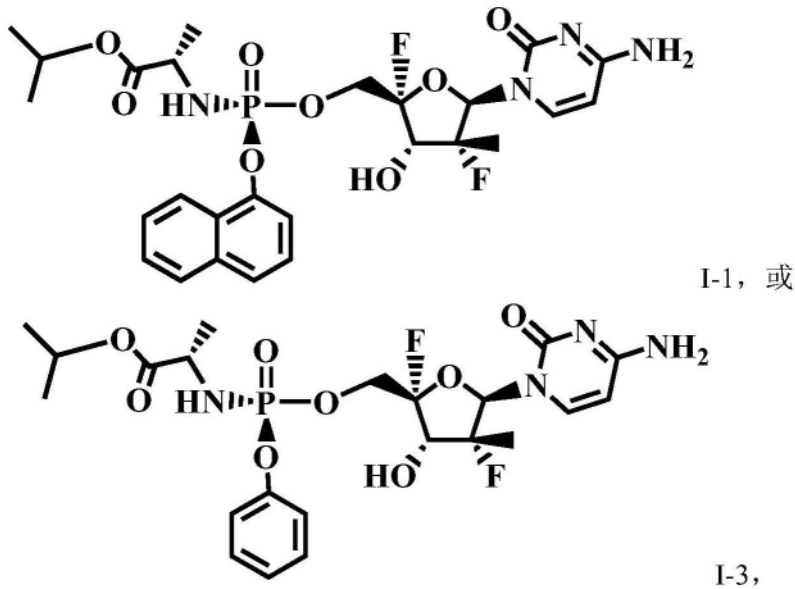
8. 如权利要求1所述的用途,其特征在于,式I的化合物和式II的化合物分别为:



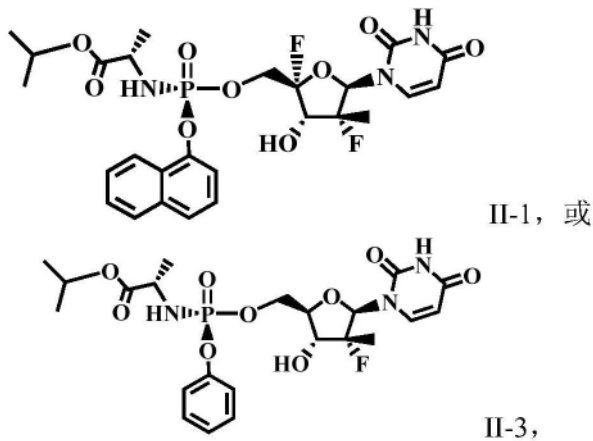
9. 如权利要求1所述的用途,其特征在于,式I化合物和式II化合物的组合还包含利巴韦林、聚乙二醇干扰素- α 、西咪匹韦、雷迪帕韦、达卡他韦和维帕他韦中的一种或多种。

10. 一种组合物,其包含与至少一种载体、稀释剂或赋形剂混合的式I化合物和式II化合物,

其中,式I化合物选自下组:



或其药学上可接受的盐;以及,其中,所述的式II化合物选自下组:



或其药学上可接受的盐。

作为HCV RNA复制抑制剂的4'-氟-2'-甲基取代的核苷衍生物

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请根据35U.S.C.§119(e)要求2017年9月21日提交的美国申请序列号62/561,237的优先权,其公开内容通过引用整体并入本文。

发明领域

[0003] 本发明涉及作为HCV复制子RNA复制抑制剂的核苷衍生物的组合。特别地,本发明涉及胞苷和尿苷嘧啶核苷衍生物的组合作为亚基因组丙型肝炎病毒(HCV)RNA复制的抑制剂的用途和包含这些化合物的药物组合物。特别地,式I的胞苷核苷类似物,与式II的尿苷核苷类似物组合下,产生抑制HCV聚合酶的协同作用。

[0004] 发明背景

[0005] 丙型肝炎病毒是全世界慢性肝病的主要原因。HCV感染的患者有发展为肝硬化和随后发生肝细胞癌的风险,因此HCV是肝移植的主要适应症。当前仅两种批准的疗法可用于治疗HCV感染(R.G.Gish,肝病论文集(Sem.Liver.Dis.),1999,19,35)。这些是干扰素- α 单一疗法,最近是核苷类似物利巴韦林(ribavirin)(病毒唑(Virazole))与干扰素- α 的联合疗法。

[0006] 被批准用于治疗病毒感染的许多药物是核苷或核苷类似物,并且大多数这些核苷类似物药物转化为相应的三磷酸酯之后通过抑制病毒聚合酶来抑制病毒复制。这种向三磷酸酯的转化通常是由细胞激酶介导的,因此,仅使用基于细胞的检测方法就可以方便地对作为HCV复制抑制剂的核苷进行直接评估。对于HCV,真正的基于细胞的病毒复制测定或感染的动物模型缺乏有效性。

[0007] 丙型肝炎病毒属于黄病毒科(flaviridae)家族。它是一种RNA病毒,RNA基因组编码大型多蛋白,加工后会产生必要的复制机制,以确保后代RNA的合成。据信,HCV RNA基因组编码的大多数非结构蛋白都参与RNA复制。Lohmann等人.[V.Lohmann等人.,科学(Science),1999,285,110-113]描述了人类肝癌(Huh7)细胞系的构建,其中引入亚基因组HCV RNA分子,并显示出高效率复制。据信,在这些细胞系中RNA复制的机制与在感染的肝细胞中全长HCV RNA基因组的复制相同。用于分离这些细胞系的亚基因组HCV cDNA克隆已为用于确定HCV复制的核苷类似物抑制剂的细胞水平的测试的开发奠定了基础。

发明内容

[0008] 在第一方面,提供了通过向有需要的患者施用式I化合物和式II化合物的组合来治疗HCV的方法:

- 基四氢呋喃-2-基)甲氧基)((氨基)磷酰基)-L-丙氨酸二环己基酯;
- [0032] ((S)-(((2S,3S,4R,5R)-5-(4-氨基-2-氧代嘧啶-1(2H)-基)-2-氟-3,4-二羟基-4-甲基四氢呋喃-2-基)甲氧基)(苯氧基)磷酰基)-L-丙氨酸戊-3-酯;
- [0033] ((2S,3S,4R,5R)-5-(4-氨基-2-氧代嘧啶-1(2H)-基)-2-氟-3,4-二羟基-4-甲基四氢呋喃-2-基)甲基二苯基磷酸酯;
- [0034] ((S)-(((2S,3S,4R,5R)-5-(4-氨基-2-氧代嘧啶-1(2H)-基)-2-氟-3,4-二羟基-4-甲基四氢呋喃-2-基)甲氧基)(苯氧基)磷酰基)-L-丙氨酸异丙酯;
- [0035] ((S)-(((2S,3S,4R,5R)-5-(4-氨基-2-氧代嘧啶-1(2H)-基)-2-氟-3,4-二羟基-4-甲基四氢呋喃-2-基)甲氧基)(萘-1-基氧基)磷酰基)-L-丙氨酸异丙酯;
- [0036] ((S)-(((2R,3R,4R,5R)-5-(4-氨基-2-氧代嘧啶-1(2H)-基)-4-氟-3-羟基-4-甲基四氢呋喃-2-基)甲氧基)(苯氧基)磷酰基)-L-丙氨酸异丙酯;
- [0037] ((R)-(((2S,3S,4R,5R)-5-(4-氨基-2-氧代嘧啶-1(2H)-基)-2,4-二氟-3-羟基-4-甲基四氢呋喃-2-基)甲氧基)(萘-1-基氧基)磷酰基)-L-丙氨酸异丙酯;
- [0038] ((S)-(((2S,3S,4R,5R)-5-(4-氨基-2-氧代嘧啶-1(2H)-基)-2,4-二氟-3-羟基-4-甲基四氢呋喃-2-基)甲氧基)(萘-1-基氧基)磷酰基)-L-丙氨酸异丙酯;
- [0039] ((R)-(((2S,3S,4R,5R)-5-(4-氨基-2-氧代嘧啶-1(2H)-基)-2,4-二氟-3-羟基-4-甲基四氢呋喃-2-基)甲氧基)(苯氧基)磷酰基)-L-丙氨酸异丙酯;
- [0040] ((R)-(((2S,3S,4R,5R)-5-(4-氨基-2-氧代嘧啶-1(2H)-基)-2,4-二氟-3-羟基-4-甲基四氢呋喃-2-基)甲氧基)(苯氧基)磷酰基)-L-丙氨酸环己基酯;
- [0041] ((R)-(((2S,3S,4R,5R)-5-(4-氨基-2-氧代嘧啶-1(2H)-基)-2,4-二氟-3-羟基-4-甲基四氢呋喃-2-基)甲氧基)(苯氧基)磷酰基)-L-丙氨酸戊-3-酯;
- [0042] (((((2S,3S,4R,5R)-5-(4-氨基-2-氧代嘧啶-1(2H)-基)-2,4-二氟-3-羟基-4-甲基四氢呋喃-2-基)甲氧基)((氨基)磷酰基)-L-丙氨酸二异丙酯;
- [0043] (((((2S,3S,4R,5R)-5-(4-氨基-2-氧代嘧啶-1(2H)-基)-2,4-二氟-3-羟基-4-甲基四氢呋喃-2-基)甲氧基)((氨基)磷酰基)-L-丙氨酸酯;
- [0044] ((2S,3S,4R,5R)-5-(4-氨基-2-氧代嘧啶-1(2H)-基)-2,4-二氟-3-羟基-4-甲基四氢呋喃-2-基)甲基二苯基磷酸酯;
- [0045] (((((2S,3S,4R,5R)-5-(4-氨基-2-氧代嘧啶-1(2H)-基)-2-氟-3,4-二羟基-4-甲基四氢呋喃-2-基)甲氧基)((氨基)磷酰基)-L-丙氨酸二异丙酯;
- [0046] ((R)-(((2S,3S,4R,5R)-5-(4-氨基-2-氧代嘧啶-1(2H)-基)-2-氟-3,4-二羟基-4-甲基四氢呋喃-2-基)甲氧基)(苯氧基)磷酰基)-L-丙氨酸环己基酯;
- [0047] (((((2S,3S,4R,5R)-5-(4-氨基-2-氧代嘧啶-1(2H)-基)-2-氟-3,4-二羟基-4-甲基四氢呋喃-2-基)甲氧基)((氨基)磷酰基)-L-丙氨酸二环己基酯;
- [0048] ((R)-(((2S,3S,4R,5R)-5-(4-氨基-2-氧代嘧啶-1(2H)-基)-2-氟-3,4-二羟基-4-甲基四氢呋喃-2-基)甲氧基)(苯氧基)磷酰基)-L-丙氨酸戊-3-酯;
- [0049] ((2S,3S,4R,5R)-5-(4-氨基-2-氧代嘧啶-1(2H)-基)-2-氟-3,4-二羟基-4-甲基四氢呋喃-2-基)甲基二苯基磷酸酯;
- [0050] ((R)-(((2S,3S,4R,5R)-5-(4-氨基-2-氧代嘧啶-1(2H)-基)-2-氟-3,4-二羟基-4-甲基四氢呋喃-2-基)甲氧基)(苯氧基)磷酰基)-L-丙氨酸异丙酯;

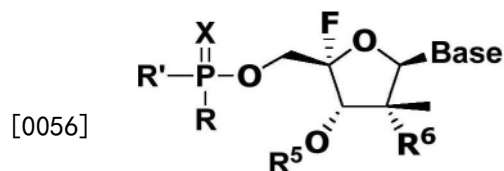
[0051] ((R) - (((2S, 3S, 4R, 5R) - 5 - (4 - 氨基 - 2 - 氧代嘧啶 - 1 (2H) - 基) - 2 - 氟 - 3, 4 - 二羟基 - 4 - 甲基四氢呋喃 - 2 - 基) 甲氧基) (萘 - 1 - 基氧基) 磷酰基) - L - 丙氨酸异丙酯; 和

[0052] ((R) - (((2R, 3R, 4R, 5R) - 5 - (4 - 氨基 - 2 - 氧代嘧啶 - 1 (2H) - 基) - 4 - 氟 - 3 - 羟基 - 4 - 甲基四氢呋喃 - 2 - 基) 甲氧基) (苯氧基) 磷酰基) - L - 丙氨酸异丙酯; 和

[0053] 其 S_p 和 R_p 差向异构体的混合物; 或

[0054] 上述各化合物的药学上可接受的盐。

[0055] 在第三方面, 提供了化合物, 提供了式III化合物:



III

[0057] 其中:

[0058] R为O-R¹或NHR^{1'};

[0059] 或R和R⁵共同形成键;

[0060] R' 为N(R⁴)C(R^{2a})(R^{2b})C(=O)OR³或-OR³;

[0061] R¹为H、低级卤代烷基或芳基, 其中, 芳基为苯基或萘基, 任选地被一个或多个低级烷基、低级烯基、低级炔基、低级烷氧基、卤素、低级卤代烷基、-N(R^{1a})₂、酰氨基、-SO₂N(R^{1a})₂、-COR^{1b}、-SO₂(R^{1c})、-NHSO₂(R^{1c})、硝基或氰基取代;

[0062] 各个R^{1a}独立地为H或低级烷基;

[0063] 各个R^{1b}独立地为-OR^{1a}或-N(R^{1a})₂;

[0064] 各个R^{1c}为低级烷基;

[0065] R^{1'} 为-C(R^{2a})(R^{2b})C(=O)OR³;

[0066] 各个R^{2a}和R^{2b}独立地为H、低级烷基、-(CH₂)_rN(R^{1a})₂、低级羟烷基、-CH₂SH、-(CH₂)_pS(O)_pMe、-(CH₂)₃NHC(=NH)NH₂、(1H-吡啶-3-基)甲基、(1H-吡啶-4-基)甲基、-(CH₂)_mC(=O)R^{1b}、芳基和芳基低级烷基, 其中, 芳基可任选地被一个或多个羟基、低级烷基、低级烷氧基、卤素、硝基或氰基取代;

[0067] 或R^{2a}为H, 且R^{2b}和R⁴共同形成(CH₂)_n;

[0068] 各个R³为H、低级烷基、低级卤代烷基、苯基或苯基低级烷基;

[0069] 各个R⁴为H、低级烷基, 或R^{2b}和R⁴共同形成(CH₂)₃;

[0070] R⁵为H、C(=O)R^{1c}、C(=O)R^{1b}、P(=O)(OR¹)(OR^{1a})或P(=O)(OR¹)(NR⁴R⁷);

[0071] R⁶为OH或F;

[0072] R⁷为C(R^{2a}R^{2b})C(=O)OR³

[0073] m为0至3;

[0074] n为3、4或5;

[0075] p为0至2;

[0076] r为1至6;

[0077] X为O或S; 和

[0078] 碱为尿嘧啶、胞嘧啶、鸟嘌呤、腺嘌呤、胸腺嘧啶或杂环烷基, 它们各自可以任选地

被一个或多个羟基、低级烷基、低级烷氧基、卤素、硝基或氰基取代；

[0079] 或其药理学上可接受的盐。

[0080] 式I、II和III的化合物可用于治疗由丙型肝炎病毒(HCV)介导的疾病。

[0081] 本申请还提供了一种用于治疗丙型肝炎病毒(HCV)感染的方法,该方法包括向有需要的患者施用治疗有效量的式III化合物。

[0082] 本申请进一步提供了包含式I、II和III的化合物和药学上可接受的赋形剂的组合物。

具体实施方式

[0083] 式I和II的化合物已被证明是肝癌细胞系中亚基因组丙型肝炎病毒复制的抑制剂。这些化合物作为用于治疗人HCV感染的抗病毒药应是有效的。

[0084] 定义:

[0085] 除非另有说明,否则权利要求书和说明书中使用的下列术语具有以下含义。

[0086] 如本文所用,术语“烷基”表示含有1至12个碳原子的直链或支链烃残基。优选地,术语“烷基”表示含有1至7个碳原子的直链或支链烃残基,并且在本文中可以称为低级烷基。最优选的为甲基、乙基、丙基、异丙基、正丁基、异丁基、叔丁基或戊基。烷基可以是未取代的或取代的。取代基选自环烷基、硝基、氨基、烷基氨基、二烷基氨基、烷基羰基和环烷基羰基中的一个或多个。在一个实施方案中,烷基是未取代的。

[0087] 如本文所用,术语“环烷基”表示含有3至7个碳原子的任选取代的环烷基基团,如环丙基、环丁基、环戊基、环己基或环庚基。取代基选自环烷基、硝基、氨基、烷基氨基、二烷基氨基、烷基羰基和环烷基羰基中的一个或多个。在一个实施方案中,环烷基是未取代的。

[0088] 如本文所用,术语“环烷基羰基”表示式-C(=O)R基团,其中,R为如上定义的环烷基。

[0089] 如本文所用,术语“烷氧基”表示任选取代的直链或支链烷基-氧基基团,其中,“烷基”(包括低级烷基)部分如上所定义。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、叔-丁氧基、戊氧基、己氧基、庚氧基,包括它们的异构体。

[0090] 如本文所用,术语“烷基氨基”表示直链或支链烷基-NH-基团,其中,“烷基”(包括低级烷基)部分如上所定义。

[0091] 如本文所用,术语“二烷基氨基”表示直链或支链(烷基)₂-N-基团,其中,“烷基”(包括低级烷基)部分如上所定义。

[0092] 如本文所用,术语“烷氧基烷基”表示与如上所定义的包括如上所定义的烷氧基与如上所定义的烷基(包括低级烷基)键合。实例是甲氧基甲基、甲氧基乙基、甲氧基丙基、乙氧基甲基、乙氧基乙基、乙氧基丙基、丙氧基丙基、甲氧基丁基、乙氧基丁基、丙氧基丁基、丁氧基丁基、叔-丁氧基丁基、甲氧基戊基、乙氧基戊基、丙氧基戊基,包括他们的异构体。

[0093] 如本文所用,术语“烯基”表示具有2至7个碳原子(优选2至4个碳原子)并且具有一个或两个烯族双键(优选一个烯双键)的未取代或取代的烃链基团。包含2-4个碳原子的烯基在本文中可以被称为低级烯基。取代基选自环烷基、硝基、氨基、烷基氨基、二烷基氨基、烷基羰基和环烷基羰基中的一个或多个。在一个实施方案中,烯基是未取代的。实例有乙烯基、1-丙烯基、2-丙烯基(烯丙基)或2-丁烯基(巴豆基)。

[0094] 如本文所用,术语“炔基”是指具有2至7个碳原子(优选2至4个碳原子)并且具有一个或如果可能两个三键(优选一个三键)的未取代或取代的烃链基团。含有2-4个碳原子的炔基在本文中可以被称为低级炔基。取代基选自环烷基、硝基、氨基、烷基氨基、二烷基氨基、烷基羰基和环烷基羰基中的一个或多个。在一个实施方案中,烷基是未取代的。实例有乙炔基、1-丙炔基、2-丙炔基、1-丁炔基、2-丁炔基或3-丁炔基。

[0095] 如本文所用,术语“羟烷基”表示直链或支链烷基(包括低级烷基),烷基如上定义,其中,1、2、3或更多个氢原子被羟基取代。实例是羟甲基、1-羟乙基、2-羟乙基、1-羟丙基、2-羟丙基、3-羟丙基、羟异丙基、羟丁基等。

[0096] 如本文所用,术语“卤代烷基”表示直链或支链烷基(包括低级烷基),烷基如上所定义,其中1、2、3或更多个氢原子被卤素取代。实例有1-氟甲基、1-氯甲基、1-溴甲基、1-碘甲基、三氟甲基、三氯甲基、三溴甲基、三碘甲基、1-氟乙基、1-氯乙基、1-溴乙基、1-碘乙基、2-氟乙基、2-氯乙基、2-溴乙基、2-碘乙基、2,2-二氯乙基、3-溴丙基或2,2,2-三氟乙基等。

[0097] 除非另有说明,否则本文所用的术语“芳基”表示任选取代的苯基和萘基(例如1-萘基,2-萘基或3-萘基)。芳基的合适取代基可以选自为烷基提名的那些,但是此外,卤素、羟基、烷氧基和任选取代的烷基(即如上定义的未被取代或取代的烷基)、卤代烷基、烯基、炔基和芳氧基是可被添加到选择中的取代基。在一个实施方案中,取代基包括除烷氧基以外的其他取代基。

[0098] 如本文所用,术语“芳基烷基”表示连接至烷基的芳基,各术语具有如上所述定义。当芳基为苯基时,其在本文中也可以称为苯基烷基。


[0099] 如本文所用,术语“杂环基”或“杂环烷基”表示任选取代的饱和、部分不饱和或芳族单环、双环或三环杂环体系,其包含一个或多个选自氮、氧和硫的杂原子,其也可以与任选取代的饱和、部分不饱和或芳族单环碳环或杂环稠合。杂环基的合适的取代基可以选自为烷基提名的那些,但是此外,任选取代的烷基、烯基、炔基、氧代基团(=O)或氨基磺酰基(-SO₂NH₂)是可被添加到选择中的取代基。合适的杂环的实例有恶唑基、异恶唑基、咪唑基、四氢咪唑基、1,3-二氧代戊环基、二氢吡喃基、2-噻吩基、3-噻吩基、吡嗪基、异噻唑基、二氢恶唑基、嘧啶基、四唑基、1-吡咯烷基、2-吡咯烷基、3-吡咯烷基、吡咯烷酮基、(N-氧化物)-吡啶基、1-吡咯基、2-吡咯基、三唑基(例如1,2,3-三唑基或1,2,4-三唑基)、1-吡唑基、2-吡唑基、4-吡唑基、哌啶基、吗啉基(例如4-吗啉基)、硫代吗啉基(例如4-硫代吗啉基)、噻唑基、吡啶基、二氢噻唑基、咪唑烷基、吡唑啉基、哌嗪基、1-咪唑基、2-咪唑基、4-咪唑基、噻二唑基(例如1,2,3-噻二唑基)、4-甲基哌嗪基、4-羟基哌啶-1-基。

[0100] 本文所用的术语“酰基”(“烷基羰基”)表示式C(=O)R基团,其中,R为氢、含有1至7个碳原子的未取代或取代的直链或支链烃基或苯基。最优选的酰基是其中R为氢、含1-4个碳原子的未取代的直链或支链烃基或苯基的那些。

[0101] 如本文所用,术语“酰基氨基”表示式-NHC(=O)R基团,其中,R为氢、含有1至7个碳原子的未取代或取代的直链或支链烃基或苯基。最优选的酰基是其中R为氢、含1-4个碳原子的未取代的直链或支链烃基或苯基的那些。

[0102] 术语卤素或卤代代表氟、氯、溴或碘,优选氟、氯或溴。

[0103] 如本文所用,术语“苯基烷基”表示苯基连接至如上所定义的烷基。实例包括但不限于苄基、苄乙基等。

[0104] 在本申请中给出的化合物的立体图示表示中,加厚楔形线(thickened tapered line)()表示位于不对称碳所属的环的平面上方的取代基,以及虚线("''''")表示位于不对称碳所属的环的平面下方的取代基。

[0105] 本发明的化合物具有立体异构性。这些化合物可以是式I、II或III的化合物的任何异构体或这些异构体的混合物,包括差向异构体。如本文所用, R_p 和 S_p 是指在磷原子上的立体化学。具有一个或多个不对称碳原子的本发明的化合物和中间体可以作为可拆分的立体异构体的外消旋混合物获得。

[0106] 式I、II或III的化合物具有互变异构现象,这意味着本发明的化合物可以以两种或更多种能够容易地相互转化的化合物形式存在。在许多情况下,它仅表示氢原子在另两个原子之间的交换,氢原子与两个原子中的一个形成共价键。互变异构化合物彼此之间处于动态平衡,因此尝试制备单独的物质通常会导致形成混合物,这表明根据这些组分的结构,可以预期所有物化性质。

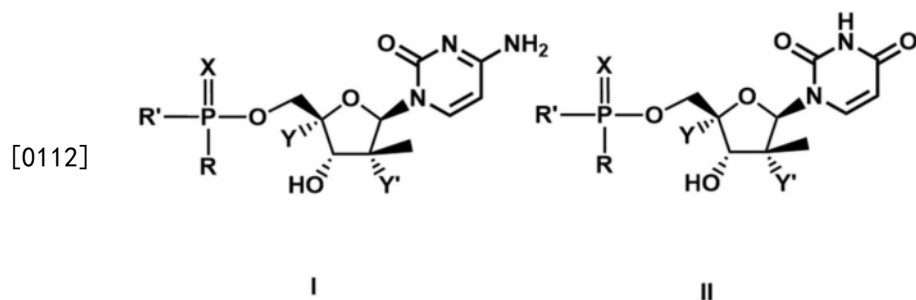
[0107] 最常见的互变异构类型是涉及羰基或酮基化合物和不饱和羟基化合物或烯醇的互变异构。结构变化是氢原子在碳原子和氧原子之间的转移,伴随着键的重排。例如,在许多脂族醛和酮(如乙醛)中,酮形式是优势构象。在苯酚中,烯醇形式是主要构象。

[0108] 碱性的式I、II或III的化合物可以与无机酸例如氢卤酸(例如盐酸和氢溴酸)、硫酸、硝酸和磷酸等,和与有机酸(例如与乙酸、酒石酸、琥珀酸、富马酸、马来酸、苹果酸、水杨酸、柠檬酸、甲磺酸和对甲苯磺酸等)形成药学上可接受的盐。这些盐的形成和分离可以根据本领域已知的方法进行。

[0109] 实施方案:

[0110] HCV的治疗方法

[0111] 本申请提供了一种治疗HCV的方法,该方法包括向有需要的患者施用式I化合物和式II化合物的组合:



[0113] 其中:

[0114] 各个R独立地为 $O-R^1$ 或 $NHC(R^{2a})(R^{2b})C(=O)OR^3$;

[0115] 各个R'独立地为 $O-R^1$ 或 $NHC(R^{2a})(R^{2b})C(=O)OR^3$;

[0116] 各个 R^1 独立地为苯基或萘基,任选地被一个或多个低级烷基、低级烷氧基、卤素、低级卤代烷基或氰基取代;

[0117] R^{2a} 和 R^{2b} 各自独立地为H或低级烷基;

[0118] 各个 R^3 独立地为H、低级烷基、低级卤代烷基、苯基或苯基低级烷基;

[0119] 各个X独立地为O或S;

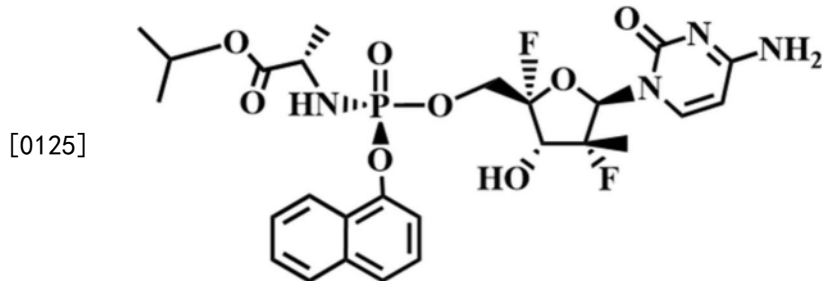
[0120] 各个Y独立地为H或F;和

[0121] 各个Y' 独立为F或OH;

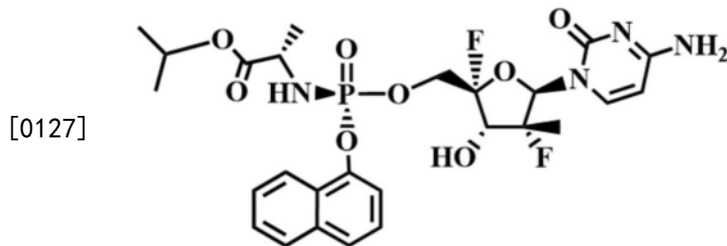
[0122] 或其药理学上可接受的盐。

[0123] 在一个实施方案中,式(I)的化合物中,各个R³独立地为H、低级烷基、低级卤代烷基、苯基或苯基低级烷基。

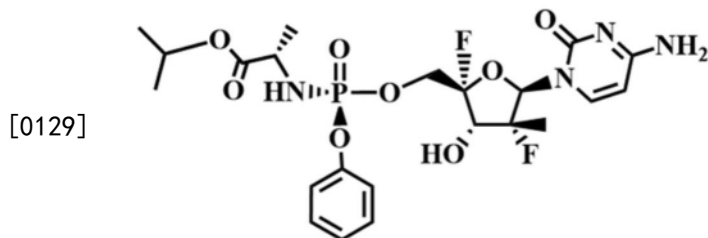
[0124] 本申请提供了一种治疗HCV的方法,其包括向有需要的患者施用式I化合物和式II化合物的组合,其中,式I化合物为:



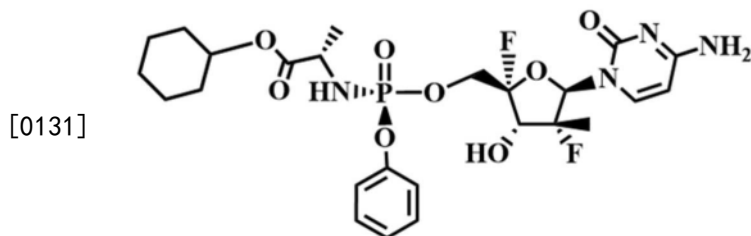
[0126] 本申请提供了一种治疗HCV的方法,该方法包括向有需要的患者施用式I化合物和式II化合物的组合,其中,式I化合物为:



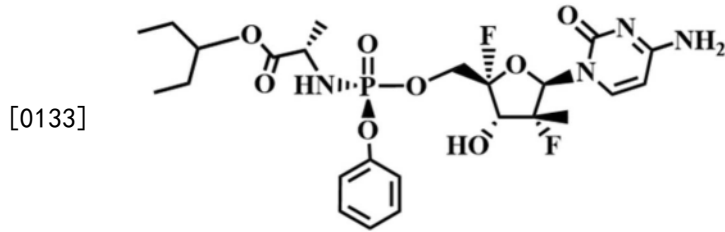
[0128] 本申请提供了一种治疗HCV的方法,该方法包括向有需要的患者施用式I化合物和式II化合物的组合,其中,式I化合物为:



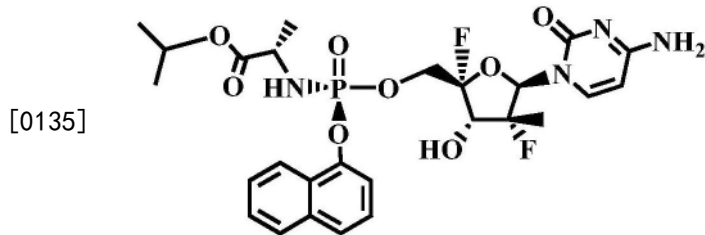
[0130] 本申请提供了一种治疗HCV的方法,该方法包括向有需要的患者施用式I化合物和式II化合物的组合,其中,式I化合物为:



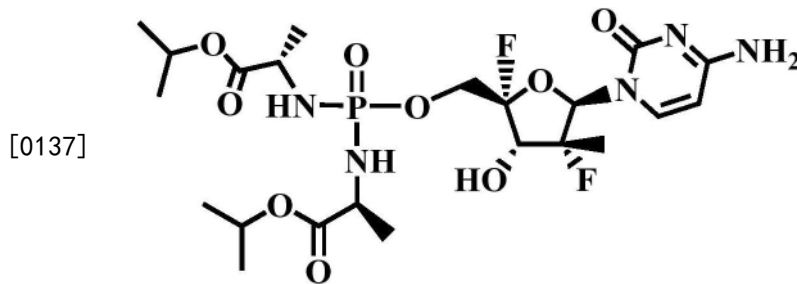
[0132] 本申请提供了一种治疗HCV的方法,该方法包括向有需要的患者施用式I化合物和式II化合物的组合,其中,式I化合物为:



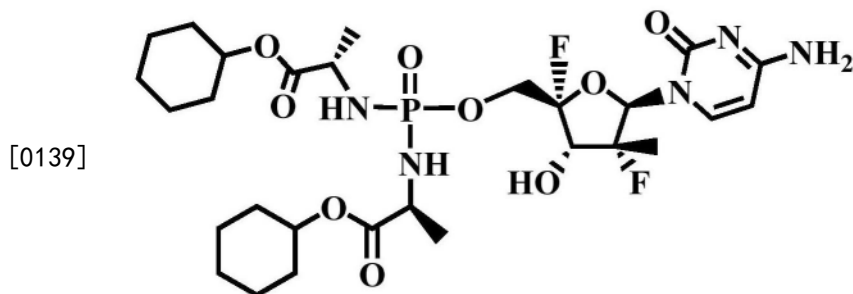
[0134] 本申请提供了一种治疗HCV的方法,该方法包括向有需要的患者施用式I化合物和式II化合物的组合,其中,式I化合物为:



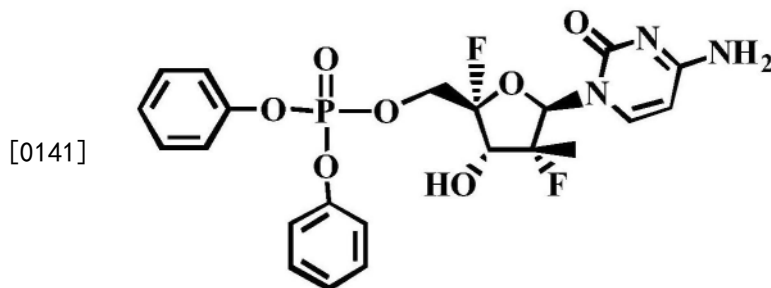
[0136] 本申请提供了一种治疗HCV的方法,该方法包括向有需要的患者施用式I化合物和式II化合物的组合,其中,式I化合物为:



[0138] 本申请提供了一种治疗HCV的方法,该方法包括向有需要的患者施用式I化合物和式II化合物的组合,其中,式I化合物为:

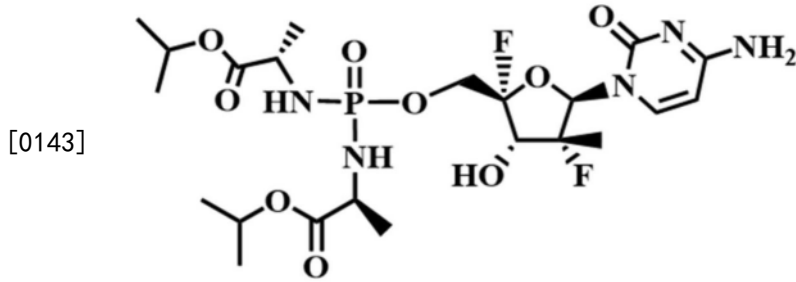


[0140] 本申请提供了一种治疗HCV的方法,该方法包括向有需要的患者施用式I化合物和式II化合物的组合,其中,式I化合物为:

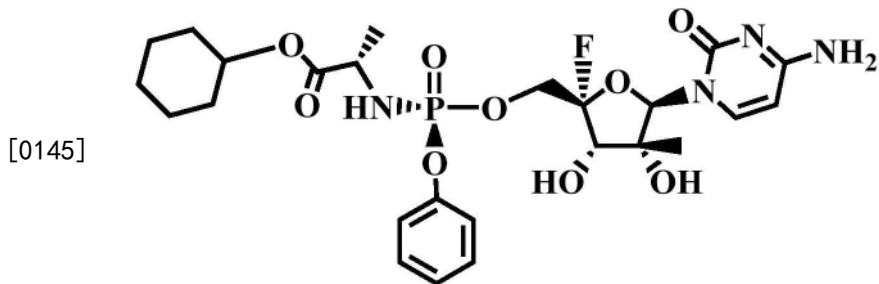


[0142] 本申请提供了一种治疗HCV的方法,该方法包括向有需要的患者施用式I化合物和

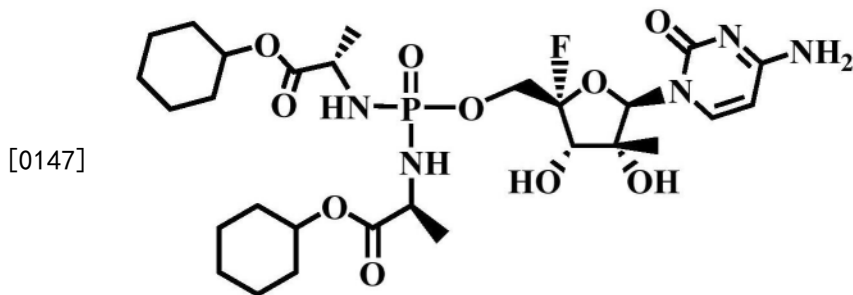
式II化合物的组合,其中,式I化合物为:



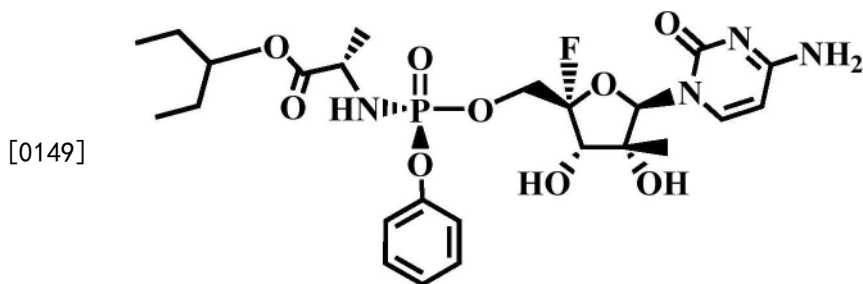
[0144] 本申请提供了一种治疗HCV的方法,该方法包括向有需要的患者施用式I化合物和式II化合物的组合,其中,式I化合物为:



[0146] 本申请提供了一种治疗HCV的方法,该方法包括向有需要的患者施用式I化合物和式II化合物的组合,其中,式I化合物为:

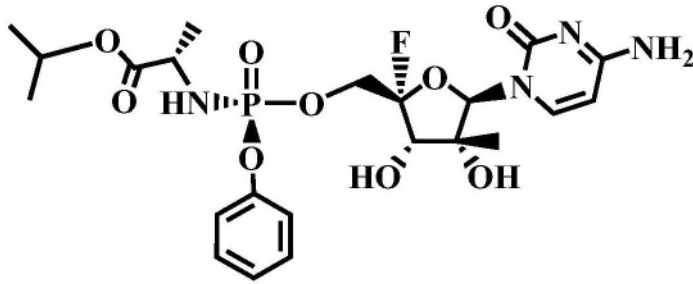


[0148] 本申请提供了一种治疗HCV的方法,该方法包括向有需要的患者施用式I化合物和式II化合物的组合,其中,式I化合物为:



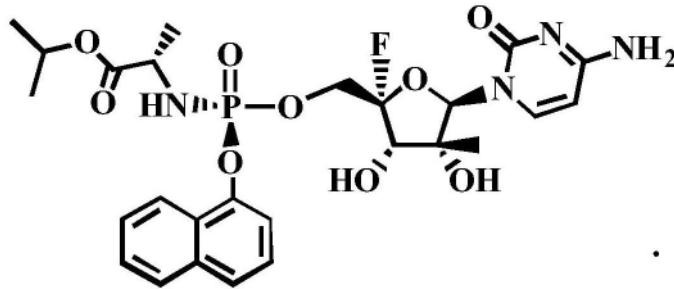
[0150] 本申请提供了一种治疗HCV的方法,该方法包括向有需要的患者施用式I化合物和式II化合物的组合,其中,式I化合物为:

[0151]



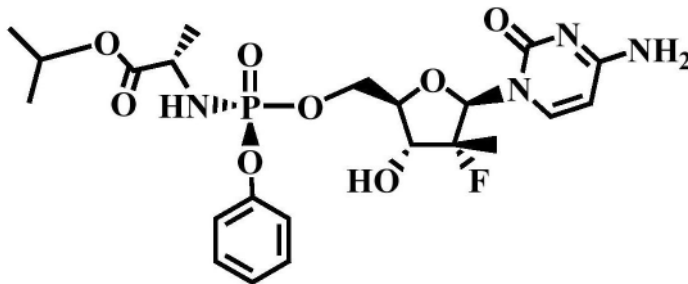
[0152] 本申请提供了一种治疗HCV的方法,该方法包括向有需要的患者施用式I化合物和式II化合物的组合,其中,式I化合物为:

[0153]



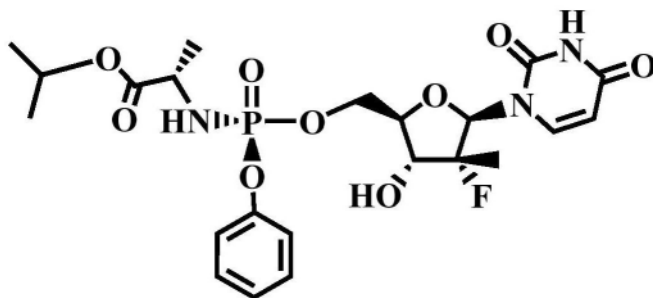
[0154] 本申请提供了一种治疗HCV的方法,该方法包括向有需要的患者施用式I化合物和式II化合物的组合,其中,式I化合物为:

[0155]

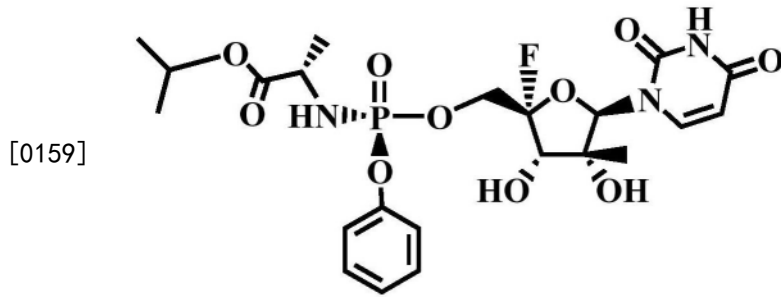


[0156] 本申请提供了一种治疗HCV的方法,该方法包括向有需要的患者施用式I化合物和式II化合物的组合,其中,式II化合物为索非布韦 (Sofosbuvir):

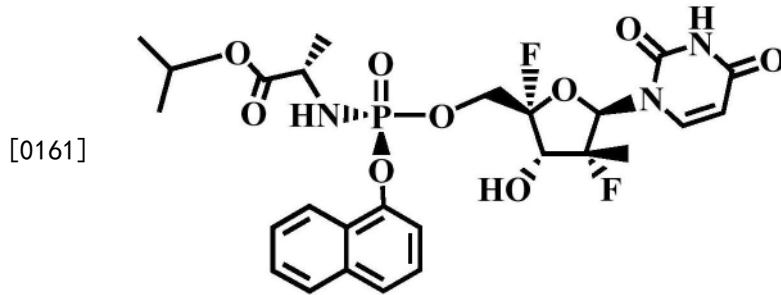
[0157]



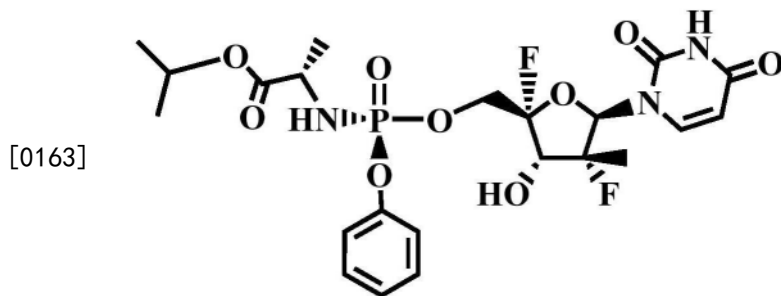
[0158] 本申请提供了一种治疗HCV的方法,该方法包括向有需要的患者施用式I化合物和式II化合物的组合,其中,式II化合物为:



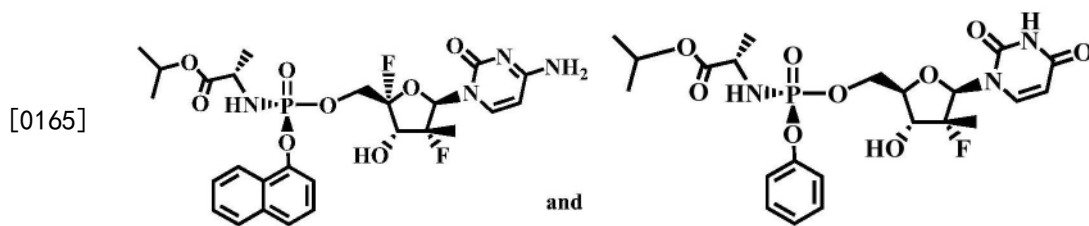
[0160] 本申请提供了一种治疗HCV的方法,该方法包括向有需要的患者施用式I化合物和式II化合物的组合,其中,式II化合物为:



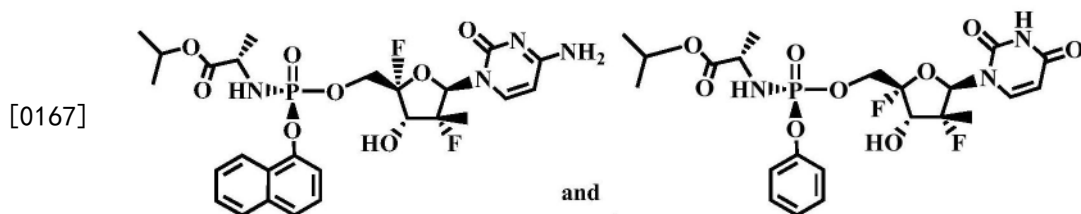
[0162] 本申请提供了一种治疗HCV的方法,该方法包括向有需要的患者施用式I化合物和式II化合物的组合,其中,式II化合物为:



[0164] 本申请提供了一种治疗HCV的方法,该方法包括向有需要的患者施用式I化合物和式II化合物的组合,其中,式I化合物和式II化合物分别为:

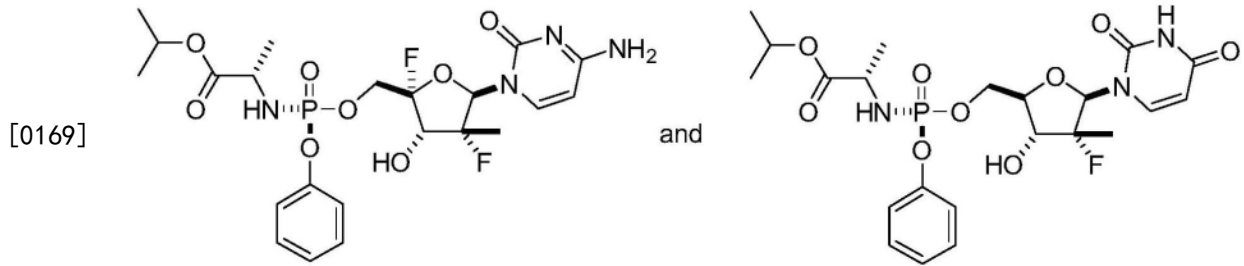


[0166] 本申请提供了一种治疗HCV的方法,该方法包括向有需要的患者施用式I的化合物和式II的化合物的组合,其中,式I的化合物和式II的化合物分别为,

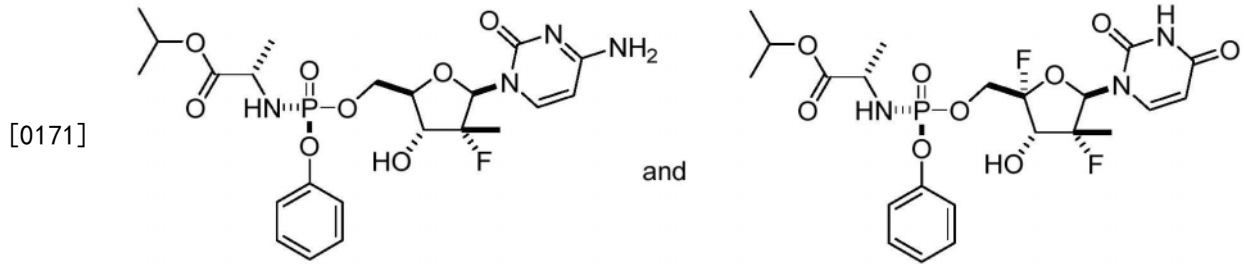


[0168] 本申请提供了一种治疗HCV的方法,该方法包括向有需要的患者施用式I的化合物

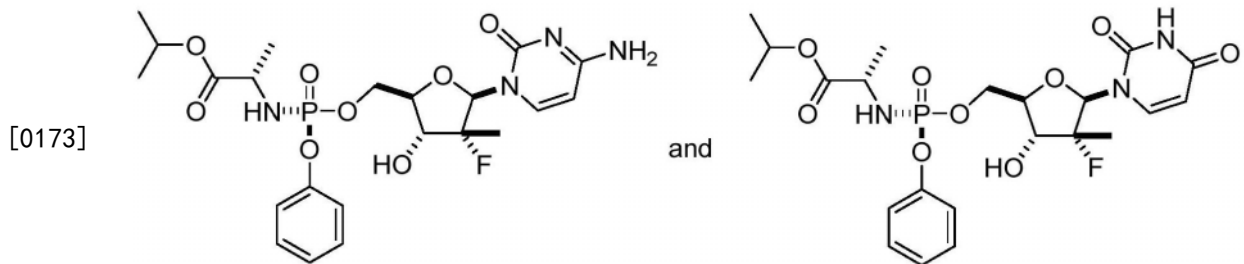
和式II的化合物的组合,其中,式I的化合物和式II的化合物分别为,



[0170] 本申请提供了一种治疗HCV的方法,该方法包括向有需要的患者施用式I的化合物和式II的化合物的组合,其中,式I的化合物和式II的化合物分别为:



[0172] 本申请提供了一种治疗HCV的方法,该方法包括向有需要的患者施用式I的化合物和式II的化合物的组合,其中,式I的化合物和式II的化合物为:



[0174] 本申请还提供了一种治疗HCV的方法,该方法包括向有需要的患者施用式I化合物和式II化合物的组合,其中,式I化合物选自下组:

[0175] ((S)-(((2S,3S,4R,5R)-5-(4-氨基-2-氧代嘧啶-1(2H)-基)-2,4-二氟-3-羟基-4-甲基四氢吡喃-2-基)甲氧基)(萘-1-基氧基)磷酰基)-L-丙氨酸异丙酯;

[0176] ((R)-(((2S,3S,4R,5R)-5-(4-氨基-2-氧代嘧啶-1(2H)-基)-2,4-二氟-3-羟基-4-甲基四氢吡喃-2-基)甲氧基)(萘-1-基氧基)磷酰基)-L-丙氨酸异丙酯;

[0177] ((S)-(((2S,3S,4R,5R)-5-(4-氨基-2-氧代嘧啶-1(2H)-基)-2,4-二氟-3-羟基-4-甲基四氢吡喃-2-基)甲氧基)(苯氧基)磷酰基)-L-丙氨酸异丙酯;

[0178] ((S)-(((2S,3S,4R,5R)-5-(4-氨基-2-氧代嘧啶-1(2H)-基)-2,4-二氟-3-羟基-4-甲基四氢吡喃-2-基)甲氧基)(苯氧基)磷酰基)-L-丙氨酸环己酯;

[0179] ((S)-(((2S,3S,4R,5R)-5-(4-氨基-2-氧代嘧啶-1(2H)-基)-2,4-二氟-3-羟基-4-甲基四氢吡喃-2-基)甲氧基)(苯氧基)磷酰基)-L-丙氨酸戊-3-酯;

[0180] (((((2S,3S,4R,5R)-5-(4-氨基-2-氧代嘧啶-1(2H)-基)-2,4-二氟-3-羟基-4-甲基四氢吡喃-2-基)甲氧基)((氨基)磷酰基)-L-丙氨酸二异丙酯;

[0181] (((((2S,3S,4R,5R)-5-(4-氨基-2-氧代嘧啶-1(2H)-基)-2,4-二氟-3-羟基-4-甲基四氢吡喃-2-基)甲氧基)((氨基)磷酰基)-L-丙氨酸二环己基酯;

- [0182] ((2S,3S,4R,5R)-5-(4-氨基-2-氧代嘧啶-1(2H)-基)-2,4-二氟-3-羟基-4-甲基四氢呋喃-2-基)甲基二苯基磷酸酯;
- [0183] (((2S,3S,4R,5R)-5-(4-氨基-2-氧代嘧啶-1(2H)-基)-2-氟-3,4-二羟基-4-甲基四氢呋喃-2-基)甲氧基)((氨基)磷酰基)-L-丙氨酸二异丙酯;
- [0184] ((S)-((2S,3S,4R,5R)-5-(4-氨基-2-氧代嘧啶-1(2H)-基)-2-氟-3,4-二羟基-4-甲基四氢呋喃-2-基)甲氧基)(苯氧基)磷酰基)-L-丙氨酸环己基酯;
- [0185] (((2S,3S,4R,5R)-5-(4-氨基-2-氧代嘧啶-1(2H)-基)-2-氟-3,4-二羟基-4-甲基四氢呋喃-2-基)甲氧基)((氨基)磷酰基)-L-丙氨酸二环己基酯;
- [0186] ((S)-((2S,3S,4R,5R)-5-(4-氨基-2-氧代嘧啶-1(2H)-基)-2-氟-3,4-二羟基-4-甲基四氢呋喃-2-基)甲氧基)(苯氧基)磷酰基)-L-丙氨酸戊-3-酯;
- [0187] ((2S,3S,4R,5R)-5-(4-氨基-2-氧代嘧啶-1(2H)-基)-2-氟-3,4-二羟基-4-甲基四氢呋喃-2-基)甲基二苯基磷酸酯;
- [0188] ((S)-((2S,3S,4R,5R)-5-(4-氨基-2-氧代嘧啶-1(2H)-基)-2-氟-3,4-二羟基-4-甲基四氢呋喃-2-基)甲氧基)(苯氧基)磷酰基)-L-丙氨酸异丙酯;
- [0189] ((S)-((2S,3S,4R,5R)-5-(4-氨基-2-氧代嘧啶-1(2H)-基)-2-氟-3,4-二羟基-4-甲基四氢呋喃-2-基)甲氧基)(萘-1-基氧基)磷酰基)-L-丙氨酸异丙酯;和
- [0190] ((S)-((2R,3R,4R,5R)-5-(4-氨基-2-氧代嘧啶-1(2H)-基)-4-氟-3-羟基-4-甲基四氢呋喃-2-基)甲氧基)(苯氧基)磷酰基)-L-丙氨酸异丙酯;
- [0191] ((R)-((2S,3S,4R,5R)-5-(4-氨基-2-氧代嘧啶-1(2H)-基)-2,4-二氟-3-羟基-4-甲基四氢呋喃-2-基)甲氧基)(萘-1-基氧基)磷酰基)-L-丙氨酸异丙酯;
- [0192] ((S)-((2S,3S,4R,5R)-5-(4-氨基-2-氧代嘧啶-1(2H)-基)-2,4-二氟-3-羟基-4-甲基四氢呋喃-2-基)甲氧基)(萘-1-基氧基)磷酰基)-L-丙氨酸异丙酯;
- [0193] ((R)-((2S,3S,4R,5R)-5-(4-氨基-2-氧代嘧啶-1(2H)-基)-2,4-二氟-3-羟基-4-甲基四氢呋喃-2-基)甲氧基)(苯氧基)磷酰基)-L-丙氨酸异丙酯;
- [0194] ((R)-(((2S,3S,4R,5R)-5-(4-氨基-2-氧代嘧啶-1(2H)-基)-2,4-二氟-3-羟基-4-甲基四氢呋喃-2-基)甲氧基)(苯氧基)磷酰基)-L-丙氨酸环己酯;
- [0195] ((R)-(((2S,3S,4R,5R)-5-(4-氨基-2-氧代嘧啶-1(2H)-基)-2,4-二氟-3-羟基-4-甲基四氢呋喃-2-基)甲氧基)(苯氧基)磷酰基)-L-丙氨酸戊-3-酯;
- [0196] (((2S,3S,4R,5R)-5-(4-氨基-2-氧代嘧啶-1(2H)-基)-2,4-二氟-3-羟基-4-甲基四氢呋喃-2-基)甲氧基)((氨基)磷酰基)-L-丙氨酸二异丙酯;
- [0197] (((2S,3S,4R,5R)-5-(4-氨基-2-氧代嘧啶-1(2H)-基)-2,4-二氟-3-羟基-4-甲基四氢呋喃-2-基)甲氧基)((氨基)磷酰基)-L-丙氨酸二环己基酯;
- [0198] ((2S,3S,4R,5R)-5-(4-氨基-2-氧代嘧啶-1(2H)-基)-2,4-二氟-3-羟基-4-甲基四氢呋喃-2-基)甲基二苯基磷酸酯;
- [0199] (((2S,3S,4R,5R)-5-(4-氨基-2-氧代嘧啶-1(2H)-基)-2-氟-3,4-二羟基-4-甲基四氢呋喃-2-基)甲氧基)((氨基)磷酰基)-L-丙氨酸二异丙酯;
- [0200] ((R)-(((2S,3S,4R,5R)-5-(4-氨基-2-氧代嘧啶-1(2H)-基)-2-氟-3,4-二羟基-4-甲基四氢呋喃-2-基)甲氧基)(苯氧基)磷酰基)-L-丙氨酸环己基酯;
- [0201] (((2S,3S,4R,5R)-5-(4-氨基-2-氧代嘧啶-1(2H)-基)-2-氟-3,4-二羟基-4-甲

基四氢呋喃-2-基)甲氧基)((氨基)磷酰基)-L-丙氨酸二环己基酯;

[0202] ((R)-(((2S,3S,4R,5R)-5-(4-氨基-2-氧代嘧啶-1(2H)-基)-2-氟-3,4-二羟基-4-甲基四氢呋喃-2-基)甲氧基)(苯氧基)磷酰基)-L-丙氨酸戊-3-酯;

[0203] ((2S,3S,4R,5R)-5-(4-氨基-2-氧代嘧啶-1(2H)-基)-2-氟-3,4-二羟基-4-甲基四氢呋喃-2-基)甲基二苯基磷酸酯;

[0204] ((R)-(((2S,3S,4R,5R)-5-(4-氨基-2-氧代嘧啶-1(2H)-基)-2-氟-3,4-二羟基-4-甲基四氢呋喃-2-基)甲氧基)(苯氧基)磷酰基)-L-丙氨酸异丙酯;

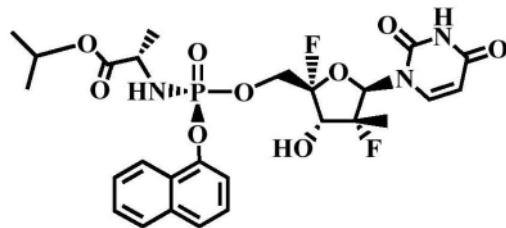
[0205] ((R)-(((2S,3S,4R,5R)-5-(4-氨基-2-氧代嘧啶-1(2H)-基)-2-氟-3,4-二羟基-4-甲基四氢呋喃-2-基)甲氧基)(萘-1-基氧基)磷酰基)-L-丙氨酸异丙酯;和

[0206] ((R)-(((2R,3R,4R,5R)-5-(4-氨基-2-氧代嘧啶-1(2H)-基)-4-氟-3-羟基-4-甲基四氢呋喃-2-基)甲氧基)(苯氧基)磷酰基)-L-丙氨酸异丙酯;和

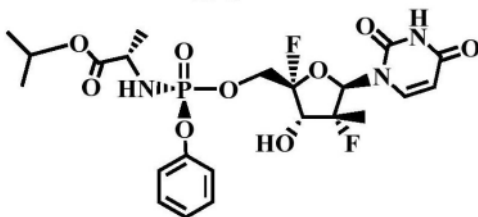
[0207] 其 S_p 和 R_p 差向异构体的混合物;或

[0208] 上述各化合物的药学上可接受的盐。

[0209] 在前述段落的另一个实施方案中,式(II)的化合物独立地选自:

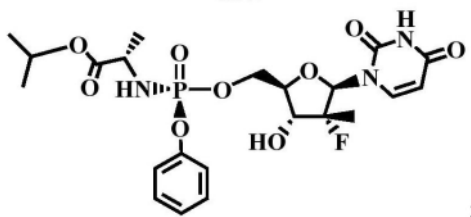


II-1



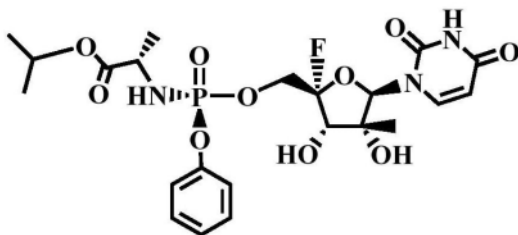
II-2

[0210]



II-3

和



II-4

[0211] 或其S_p和R_p差向异构混合物。

[0212] 本申请还提供了一种通过向有需要的患者施用式I化合物和式II化合物的组合来治疗HCV的方法,其中,式I化合物选自下组:

[0213] 2'-脱氧-2',4'-二氟-2'-甲基胞苷-5'-(0-苯基-N-(S)-1-(异丙氧基羰基)乙基硫代氨基磷酸酯(thiosphoramidate);

[0214] 2'-脱氧-2',4'-二氟-2'-甲基胞苷-5'-(0-1-萘基-N-(S)-1-(异丙氧基羰基)乙基硫代氨基磷酸酯;

[0215] 2'-脱氧-2',4'-二氟-2'-甲基胞苷-5'-(0-2-萘基-N-(S)-1-(异丙氧基羰基)乙基硫代氨基磷酸酯;

[0216] 2'-脱氧-2',4'-二氟-2'-甲基胞苷-3',5'-环磷酸异丙酯;

[0217] 2'-脱氧-2',4'-二氟-2'-甲基胞苷-3',5'-环硫代磷酸异丙酯;

[0218] 4'-氟-2'-甲基胞苷-5'-(0-苯基-N-(S)-1-(异丙氧基羰基)乙基氨基磷酸酯;

[0219] 4'-氟-2'-胞苷-5'-(0-1-萘基-N-(S)-1-(异丙氧基羰基)乙基氨基磷酸酯;

[0220] 4'-氟-2'-甲基胞苷-5'-(0-1-萘基-N-(S)-2-(异丙氧基羰基)乙基氨基磷酸酯;

[0221] 4'-氟-2'-甲基胞苷-5'-(0-苯基-N-(S)-1-(异丙氧基羰基)乙基硫代氨基磷酸酯;

[0222] 4'-氟-2'-甲基胞苷-5'-(0-1-萘基-N-(S)-1-(异丙氧基羰基)乙基硫代氨基磷酸酯;

[0223] 4'-氟-2'-甲基胞苷-5'-(0-1-萘基-N-(S)-2-(异丙氧基羰基)乙基硫代氨基磷酸酯;

[0224] 4'-氟-2'-甲基胞苷-3',5'-环磷酸异丙酯;

[0225] 4'-氟-2'-甲基胞苷-3',5'-环硫代磷酸异丙酯;

[0226] 2'-脱氧-2',4'-二氟-2'-甲基胞苷-5'-{N,N'-双[(S)-1-(异丙氧基羰基)乙基]-二氨基磷酸酯};

[0227] 2'-脱氧-2',4'-二氟-2'-甲基胞苷-5'-{N,N'-双[(S)-1-(异丙氧基羰基)乙基]-硫代二氨基磷酸酯};

[0228] 4'-氟-2'-甲基胞苷-5'-{N,N'-双[(S)-1-(异丙氧基羰基)乙基]-二氨基磷酸酯};
和

[0229] 4'-氟-2'-甲基胞苷-5'-{N,N'-双[(S)-1-(异丙氧基羰基)乙基]硫代二氨基磷酸酯}。

[0230] 本申请还提供了一种通过向有需要的患者给药式I化合物和式II化合物的组合来治疗HCV的方法,其中,式II化合物选自下组:

[0231] 2'-脱氧-2',4'-二氟-2'-甲基尿苷-5'-(0-苯基-N-(S)-1-(异丙氧基羰基)乙基硫代氨基磷酸酯;

[0232] 2'-脱氧-2',4'-二氟-2'-甲基尿苷-5'-(0-2-萘基-N-(S)-1-(异丙氧基羰基)乙基硫代氨基磷酸酯;

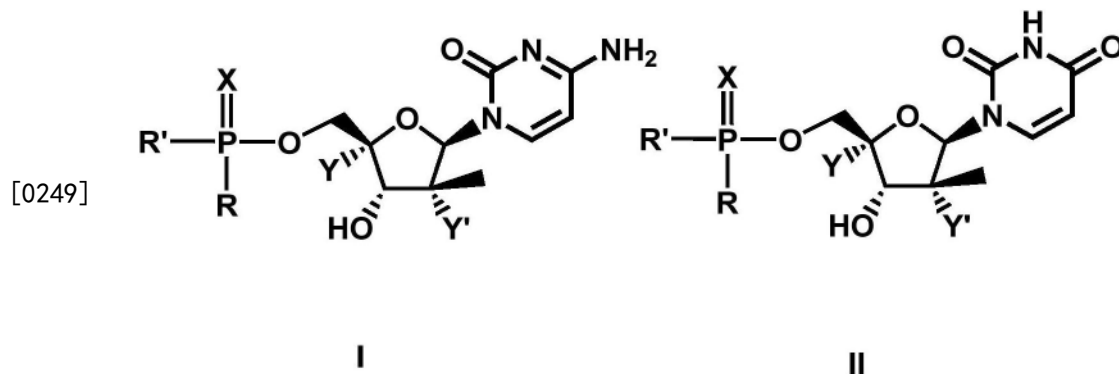
[0233] 2'-脱氧-2',4'-二氟-2'-甲基尿苷-5'-(0-1-萘基-N-(S)-1-(异丙氧基羰基)乙基硫代氨基磷酸酯;

[0234] 2'-脱氧-2',4'-二氟-2'-甲基尿苷-3',5'-环磷酸异丙酯;

- [0235] 4'-氟-2'-甲基尿苷-5'-(0-苯基-N-(S)-1-(异丙氧基羰基)乙基氨基磷酸酯);
- [0236] 4'-氟-2'-甲基尿苷-5'-(0-1-萘基-N-(S)-1-(异丙氧基羰基)乙基氨基磷酸酯);
- [0237] 4'-氟-2'-甲基尿苷-5'-(0-1-萘基-N-(S)-2-(异丙氧基羰基)乙基氨基磷酸酯);
- [0238] 4'-氟-2'-甲基尿苷-5'-(0-苯基-N-(S)-1-(异丙氧基羰基)乙基硫代氨基磷酸酯);
- [0239] 4'-氟-2'-甲基尿苷-5'-(0-1-萘基-N-(S)-1-(异丙氧基羰基)乙基硫代氨基磷酸酯);
- [0240] 4'-氟-2'-甲基尿苷-5'-(0-1-萘基-N-(S)-2-(异丙氧基羰基)乙基硫代氨基磷酸酯);
- [0241] 4'-氟-2'-甲基尿苷-3',5'-环磷酸异丙酯);
- [0242] 4'-氟-2'-甲基尿苷-3',5'-环硫代磷酸异丙酯);
- [0243] 2'-脱氧-2',4'-二氟-2'-甲基尿苷-5'-{N,N'-双[(S)-1-(异丙氧基羰基)乙基]-二氨基磷酸酯};
- [0244] 2'-脱氧-2',4'-二氟-2'-甲基尿苷-5'-{N,N'-双[(S)-1-(异丙氧基羰基)乙基]-硫代二氨基磷酸酯};
- [0245] 4'-氟-2'-甲基尿苷-5'-{N,N'-双[(S)-1-(异丙氧基羰基)乙基]二氨基磷酸酯};
- 和
- [0246] 4'-氟-2'-甲基尿苷-5'-{N,N'-双[(S)-1-(异丙氧基羰基)乙基]-硫代二氨基磷酸酯}。

[0247] 还提供了治疗HCV的方法,其包括向有需要的患者施用式I的化合物和式II的化合物的组合(或本文中的任何实施方案),该方法进一步包括施用一种或多种利巴韦林、聚乙二醇化干扰素- α (peginterferon- α)、西咪匹韦(simeprevir)、雷迪帕韦(ledipasvir)、达卡他韦(daclatasvir)和维帕他韦(velpatasvir)。

[0248] 本申请还提供了一种治疗HCV的方法,该方法包括向有需要的患者施用包含式I化合物和/或式II化合物的组合物



[0250] 其中:

- [0251] 各个R独立地为O-R¹或NHC(R^{2a})(R^{2b})C(=O)OR³;
- [0252] 各个R'独立地为O-R¹或NHC(R^{2a})(R^{2b})C(=O)OR³;
- [0253] 各个R¹独立地为苯基或萘基,任选地被一个或多个低级烷基、低级烷氧基、卤素、低级卤代烷基或氰基取代;
- [0254] R^{2a}和R^{2b}各自独立地为H或低级烷基;

- [0277] 各个R独立地为O-R¹或NHC(R^{2a})(R^{2b})C(=O)OR³;
- [0278] 各个R'独立地为O-R¹或NHC(R^{2a})(R^{2b})C(=O)OR³;
- [0279] 各个R¹独立地为苯基或萘基,任选地被一个或多个低级烷基、低级烷氧基、卤素、低级卤代烷基或氰基取代;
- [0280] R^{2a}和R^{2b}各自独立地为H或低级烷基;
- [0281] 各个R³独立地为H、低级烷基、低级卤代烷基、环烷基、苯基或苯基低级烷基;
- [0282] 各个X独立地为O或S;
- [0283] 各个Y独立地为H或F;和
- [0284] 各个Y'独立为F或OH;
- [0285] 或其药理学上可接受的盐;
- [0286] (或本申请中任何实施方案),进一步与另外的NS5B HCV聚合酶抑制剂组合。
- [0287] 本申请提供了用于抑制细胞中HCV复制的方法,其包括施用式I的化合物和/或式II的化合物的组合。
- [0288] 本申请提供了式I化合物和式II化合物的组合在制备用于治疗HCV的药物中的用途。
- [0289] 本申请提供了本文所述的化合物、组合物或方法。
- [0290] 本发明涵盖并且在本发明范围内的式(I)的代表性化合物的实例如下表1所示。
- [0291] 通常,本申请中使用的命名法基于本领域普通技术人员所常用的标准核酸命名法。如果所示结构与给定结构的名称之间存在差异,则以所示结构为准。另外,如果未用例如粗线或虚线指示结构或结构的一部分的立体化学,则该结构或结构的一部分应解释为涵盖其所有立体异构体。

表 1		
化合物编号	结构	名称
I-1		((S)-(((2S,3S,4R,5R)-5-(4-氨基-2-氧代嘧啶-1(2H)-基)-2,4-二氟-3-羟基-4-甲基四氢呋喃-2-基)甲氧基)(萘-1-基氧基)磷酰基)-L-丙氨酸异丙酯
[0292] I-2		((R)-(((2S,3S,4R,5R)-5-(4-氨基-2-氧代嘧啶-1(2H)-基)-2,4-二氟-3-羟基-4-甲基四氢呋喃-2-基)甲氧基)(萘-1-基氧基)磷酰基)-L-丙氨酸异丙酯
I-3		((S)-(((2S,3S,4R,5R)-5-(4-氨基-2-氧代嘧啶-1(2H)-基)-2,4-二氟-3-羟基-4-甲基四氢呋喃-2-基)甲氧基)(苯氧基)磷酰基)-L-丙氨酸异丙酯

表 1		
表 1		
化合物编号	结构	名称
I-4		((S)-(((2S,3S,4R,5R)-5-(4-氨基-2-氧代嘧啶-1(2H)-基)-2,4-二氟-3-羟基-4-甲基四氢咪喃-2-基)甲氧基)(苯氧基)磷酰基)-L-丙氨酸环己基酯
I-5		(((2S,3S,4R,5R)-5-(4-氨基-2-氧代嘧啶-1(2H)-基)-2,4-二氟-3-羟基-4-甲基四氢咪喃-2-基)甲氧基)(苯氧基)磷酰基)-L-丙氨酸戊-3-酯
I-6		(((2S,3S,4R,5R)-5-(4-氨基-2-氧代嘧啶-1(2H)-基)-2,4-二氟-3-羟基-4-甲基四氢咪喃-2-基)甲氧基)((氨基)磷酰基)-L-丙氨酸二异丙酯
I-7		(((2S,3S,4R,5R)-5-(4-氨基-2-氧代嘧啶-1(2H)-基)-2,4-二氟-3-羟基-4-甲基四氢咪喃-2-基)甲氧基)((氨基)磷酰基)-L-丙氨酸二环己基酯
I-8		((2S,3S,4R,5R)-5-(4-氨基-2-氧代嘧啶-1(2H)-基)-2,4-二氟-3-羟基-4-甲基四氢咪喃-2-基)甲基二苯基磷酸酯

[0293]

表 1		
I-9		((S)-(((2R,3R,4R,5R)-5-(4-氨基-2-氧代嘧啶-1(2H)-基)-4-氟-3-羟基-4-甲基四氢呋喃-2-基)甲氧基)(苯氧基)磷酸基)-L-丙氨酸异丙酯
表 1		
化合物编号	结构	名称
I-10		((2S,3S,4R,5R)-5-(4-氨基-2-氧代嘧啶-1(2H)-基)-2,4-二氟-3-羟基-4-甲基四氢呋喃-2-基)双(4-甲氧基苄基)二氨基磷酸酯

[0294]

[0295] 可用于本文公开的方法的其他式I化合物如下表2所示：

表 2		
化合物编号	结构	名称
I-11		(((2S,3S,4R,5R)-5-(4-氨基-2-氧代嘧啶-1(2H)-基)-2-氟-3,4-二羟基-4-甲基四氢呋喃-2-基)甲氧基)((氨基)磷酸基)-L-丙氨酸二异丙酯
I-12		((S)-(((2S,3S,4R,5R)-5-(4-氨基-2-氧代嘧啶-1(2H)-基)-2-氟-3,4-二羟基-4-甲基四氢呋喃-2-基)甲氧基)(苯氧基)磷酸基)-L-丙氨酸环己基酯

[0296]

表 2		
化合物编号	结构	名称
I-13		(((2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>R</i>))-5-(4-氨基-2-氧代嘧啶-1(2 <i>H</i>)-基)-2-氟-3,4-二羟基-4-甲基四氢呋喃-2-基)甲氧基)((氨基)磷酰基)- <i>L</i> -丙氨酸二环己基酯
I-14		((<i>S</i>)-(((2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>R</i>))-5-(4-氨基-2-氧代嘧啶-1(2 <i>H</i>)-基)-2-氟-3,4-二羟基-4-甲基四氢呋喃-2-基)甲氧基)(苯氧基)磷酰基)- <i>L</i> -丙氨酸戊-3-酯
[0297] I-15		((2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>R</i>))-5-(4-氨基-2-氧代嘧啶-1(2 <i>H</i>)-基)-2-氟-3,4-二羟基-4-甲基四氢呋喃-2-基)甲基二苯基磷酸酯
I-16		((<i>S</i>)-(((2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>R</i>))-5-(4-氨基-2-氧代嘧啶-1(2 <i>H</i>)-基)-2-氟-3,4-二羟基-4-甲基四氢呋喃-2-基)甲氧基)(苯氧基)磷酰基)- <i>L</i> -丙氨酸异丙酯
I-17		((<i>S</i>)-(((2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>R</i>))-5-(4-氨基-2-氧代嘧啶-1(2 <i>H</i>)-基)-2-氟-3,4-二羟基-4-甲基四氢呋喃-2-基)甲氧基)(萘-1-基氧基)磷酰基)- <i>L</i> -丙氨酸异丙酯

[0298] 组合疗法

[0299] 本发明的化合物及它们的异构体形式及其药学上可接受的盐单独地或与靶向HCV生命周期中涉及的病毒或细胞成分或功能的其他化合物组合使用时,可用于治疗和预防HCV感染。可用于本发明的化合物的种类包括但不限于所有类型的HCV抗病毒物质。

[0300] 对于组合疗法,当与本发明的化合物组合时,可用的机理类试剂包括,例如HCV聚合酶的核苷和非核苷抑制剂、蛋白酶抑制剂、解旋酶抑制剂、NS4B抑制剂,和在功能上抑制内部核糖体进入位点(IRES)的药剂,和其他抑制HCV细胞附着或病毒进入、HCV RNA翻译、HCV RNA转录、复制或HCV成熟、组装或病毒释放的药剂。在这些类别中并可用于本发明的特定化合物包括但不限于大环、杂环和线性HCV蛋白酶抑制剂,例如例如特拉匹韦(telaprevir) (VX-950)、博赛匹韦(boceprevir) (SCH-503034)、那拉匹韦(narlaprevir)

(SCH-9005 18)、ITMN-191 (R-7227)、TMC-435350 (a.k.a. TMC-435)、MK-7009、BI-201335、BI-2061 (西鲁瑞韦 (ciluprevir))、BMS-650032、ACH-1625、ACH-1095 (HCV NS4A蛋白酶辅因子抑制剂)、VX-500、VX-8 13、PHX-1766、PHX2054、IDX-136、IDX-3 16、ABT-450EP-0 13420 (及同系物) 和VBY-376; 本发明中使用的核苷HCV聚合酶(复制酶)抑制剂包括但不限于: R7128、PSI-785 1、IDX-184、IDX-102、R1479、UNX-08 189、PSI-6130、PSI-938和PSI-879以及各种其它核苷和核苷酸类似物, 和HCV抑制剂包括(但不限于) 那些衍生为2'-C-甲基修饰的核苷、4'-氮杂修饰核苷和7'-去氮杂修饰的核苷。可用于本发明的非核苷HCV聚合酶(复制酶)抑制剂包括但不限于HCV-796、HCV-371、VCH-759、VCH-916、VCH-222、ANA-598、MK-3281、ABT-333、ABT-072、PF-00868554、BI-207127、GS-9190、A-837093、JKT-109、GL-59728和GL-60667。

[0301] 另外, 本发明的化合物可以与亲环蛋白(cyclophyllin)和亲免疫蛋白(immunophyllin)拮抗剂(例如但不限于DEBIO化合物、NM-811以及环孢菌素及其衍生物)、激酶抑制剂、热休克蛋白抑制剂(例如HSP90和HSP70)、其它免疫调节剂, 所述调节剂可包括但不限于干扰素(- α 、- β 、- ω 、- γ 、- λ 或合成的), 例如内含子A (Intron A)、罗扰素-A (Roferon-A)、卡恩扰素-A300 (Canferon-A300)、爱得瓦扰素 (Advaferon)、干复津 (Infergen)、胡莫扰素 (Humoferon)、苏米扰素MP (Sumiferon MP)、埃尔法扰素 (Alfaferone)、IFN- β 、酶蛋白 (Feron) 等; 聚乙二醇衍生化的(聚乙二醇化)干扰素化合物, 例如PEG干扰素- α -2a (派罗欣 (Pegasys))、PEG干扰素- α -2b (PEG内含子 (Intron))、聚乙二醇化IFN- α -con1等; 干扰素化合物的长效制剂和衍生物, 例如白蛋白融合干扰素、白蛋白干扰素 (Albuferon)、洛克特伦 (Locteron) 等; 带有各种类型的控释系统的干扰素(例如ITCA-638, 通过Duros皮下传递系统传递的 ω -干扰素); 刺激细胞中干扰素合成的化合物, 例如瑞奎莫得 (resiquimod) 等; 白介素类; 增强I型辅助T细胞响应的化合物, 例如SCV-07等; TOLL-样受体激动剂, 例如CpG-10101 (actilon)、伊索托拉滨 (Isotorabine)、ANA773等; 胸腺素 α -1; ANA-245和ANA-246; 组胺二盐酸盐; 丙帕锗 (propagermanium); 十氧化四氯 (tetrachlorodecaoxide); 安普利近 (ampligen); IMP-321; KRN-7000; 抗体, 例如西瓦塞 (civacir)、XTL-6865等, 以及预防性和治疗性疫苗, 例如InnoVac C、HCV E1E2/MF59等。另外, 可以通过施用有效量的TNF- α 拮抗剂来增强涉及施用NS5A抑制剂、I型干扰素受体激动剂(例如, IFN- α)和II型干扰素受体激动剂(例如, IFN- γ)的任何上述方法。适用于此类组合疗法的示例非限制性TNF- α 拮抗剂包括依那西普 (ENBREL)、英利昔单抗 (REMICADE) 和阿达木单抗 (HUMIRA)。

[0302] 另外, 本发明的化合物可以与抗原虫和其他被认为对HCV感染有效的抗病毒药(例如但不限于前药硝唑尼特 (nitazoxanide)) 联合使用。硝唑尼特可以用作与本发明中公开的化合物组合以及与其他可用于治疗HCV感染的药物(例如聚乙二醇干扰素 α -2a和利巴韦林)组合中的药剂。

[0303] 本发明的化合物还可以与替代形式的干扰素和聚乙二醇化干扰素、利巴韦林或其类似物(例如他立韦林 (tarabavirin)、他立韦林 (levoviron))、微核糖核酸、小干扰RNA化合物(例如SIRPLEX-140-N等)、核苷酸或核苷类似物、免疫球蛋白、保肝剂 (hepatoprotectants)、抗炎药和其他NS5A抑制剂一起使用。HCV生命周期中其他靶标抑制剂包括NS3解旋酶抑制剂; NS4A辅助因子抑制剂; 反义寡核苷酸抑制剂, 例如ISIS-14803、

AVI-4065等;载体编码的短发夹RNA(shRNA);HCV特异的核酶,例如庚酶(heptazyme)、RPI-13919等;进入抑制剂,例如HepeX-C、HuMax-HepC等; α 葡萄糖苷酶抑制剂,例如西戈斯韦(celgosivir)、UT-231B等;KPE-02003002和BIVN 401和IMPDH抑制剂。其他示例性HCV抑制剂化合物包括在以下出版物中公开的那些化合物:美国专利号:5,807,876;6,498,178;6,344,465;和6,054,472;PCT专利申请公开号:W097/40028;W098/40381;W000/56331,;W002/04425;W003/007945;W003/010141;W003/000254;W001/32153;W000/06529;W000/18231;W000/10573;W000/13708;W001/85172;W003/037893;W003/037894;W003/037895;W002/100851;W002/100846;W099/01582;W000/09543;W002/18369;W098/17679,W000/056331;W098/22496;W099/07734;W005/073216,W005/073195和W008/021927。

[0304] 另外,例如利巴韦林和干扰素的组合可以与至少一种本发明的化合物作为多重组合疗法施用。本发明不限于上述种类或化合物,并且涵盖已知的和新的化合物以及生物活性剂的组合。本发明的联合疗法意在包括本发明组的化合物与本发明组的其他化合物组或本发明化合物组以外的其他化合物的任何化学相容的组合,只要该组合不消除本发明组化合物的抗病毒活性或其药物组合物本身的抗病毒活性即可。

[0305] 组合疗法可以是顺序的,即先用一种药剂然后用第二种药剂治疗(例如,其中每种疗法包含本发明的不同化合物,或者其中一种疗法包含本发明的化合物,而另一种疗法包含一种或更多的生物活性剂),也可以在相同的时间(同时)用两种试剂进行治疗。顺序治疗可以包括在完成第一项治疗后的合理时间后,再开始第二种治疗。两种药剂同时治疗可以在相同的日剂量中或分开的剂量中。组合疗法不必限于两种药物,并且可以包括三种或更多种药物。同时和顺序联合疗法的剂量将取决于联合疗法中组分的吸收、分布、代谢和排泄速率以及本领域技术人员已知的其他因素。剂量值也将随着要减轻的病情的严重程度而变化。还应理解,对于任何特定的对象,可以根据个体的需要和管理或监督联合疗法给药的本领域技术人员的判断,随时间调整具体的剂量方案和时间表。

[0306] 本申请提供了一种治疗丙型肝炎病毒(HCV)感染的方法,其包括向有需要的患者施用治疗有效量的本发明化合物中的任一种的化合物。

[0307] 本申请提供了上述方法,其进一步包括施用免疫系统调节剂或抑制HCV复制的抗病毒剂,或其组合。

[0308] 本申请提供了上述方法,其中,所述免疫系统调节剂为干扰素或化学衍生的干扰素。

[0309] 本申请提供了上述方法,其中,所述抗病毒剂选自下组:HCV蛋白酶抑制剂、HCV聚合酶抑制剂、HCV解旋酶抑制剂、HCV引发酶抑制剂、HCV融合抑制剂,及其组合。

[0310] 应当理解本文对治疗的提及扩展到预防以及对现有病症的治疗,并且对动物的治疗包括对人类以及其他哺乳动物的治疗。此外,如本文所用,丙型肝炎病毒(HCV)感染的治疗还包括与丙型肝炎病毒(HCV)感染相关或由其介导的疾病或病症或其临床症状的治疗或预防。

[0311] 剂量和给药:

[0312] 如生物实施例所示(下表A),式I化合物具有作为抗病毒药有效治疗人类HCV感染的潜力,或被代谢成具有这种活性的化合物。

[0313] 所述活性化合物或其前药衍生物或盐可与另一种抗病毒剂,例如抗肝炎剂(包括

式I的那些)组合施用。当所述活性化合物或其衍生物或盐与另一种抗病毒剂组合施用,其活性可能增加超过母体化合物。根据本文所述的方法,可以通过制备衍生物并测试其抗HCV活性来容易地评估。

[0314] 活性化合物的可以在连续(静脉滴注)至每天几次口服施用(例如,Q. I. D)的范围内施用,并且可以包括口服、局部肠胃外、肌肉内、静脉内、皮下、经皮(其可以包括渗透增强剂)、口腔和栓剂给药以及其他给药途径。

[0315] 本文公开的化合物及其药学上可用的盐可以用作任何药物制剂形式的药物。药物制剂可以肠内给药,口服给药,如以片剂、包衣片剂、糖衣丸、硬和软明胶胶囊剂、溶液剂、乳剂、糖浆剂或混悬剂的形式,或直肠给药,如以栓剂的形式。它们也可以肠胃外给药(肌内、静脉内、皮下或胸骨内注射或输注技术)(例如注射溶液的形式),以鼻腔给药(例如以鼻喷雾剂或吸入喷雾剂的形式),局部使用等。

[0316] 为了制备药物制剂,可以将本文公开的化合物及它们的药学上可用的盐与治疗惰性的无机或有机赋形剂一起配制,以生产片剂、包衣片剂、糖衣丸、硬和软明胶胶囊剂、溶液剂、乳剂或悬浮剂。

[0317] 本文公开的化合物可以与药学上可接受的载体混合配制。例如,本发明的化合物可以作为药理学上可接受的盐口服给药。因为本发明的化合物大多数是水溶性的,所以它们可以在生理盐水溶液(例如,缓冲到约7.2至7.5的pH)中静脉内给药。常规的缓冲剂例如磷酸盐、碳酸氢盐或柠檬酸盐可用于此目的。当然,本领域普通技术人员可以在说明书的教导范围内修改制剂,以提供用于特定给药途径的多种制剂,而不会使本发明的组合物不稳定或损害其治疗活性。特别地,本发明化合物的修饰使它们更易溶于水或其他媒介物中,例如,可以在本领域的普通技术范畴内通过较小修饰(盐型、酯化等)容易地实现。改变特定化合物的给药途径和剂量方案以控制本发明化合物的药代动力学以在患者中获得最大的有益效果,这也在本领域普通技术的范畴内。

[0318] 对于肠胃外制剂,载体通常将包含无菌水或氯化钠水溶液,但是可以包括其他成分(包括那些有助于分散的成分)。当然,在要使用无菌水并将其保持无菌状态的情况下,也必须对组合物和载体进行灭菌。也可以制备可注射的悬浮液,在这种情况下,可以使用适当的液体载体,悬浮剂等。

[0319] 片剂、包衣片剂、糖衣丸和硬明胶胶囊剂的合适赋形剂为例如乳糖、玉米淀粉及其衍生物、滑石粉和硬脂酸或其盐。如果需要,可以通过标准技术将片剂或胶囊剂包肠溶衣或缓释。软明胶胶囊的合适的赋形剂有,例如植物油、蜡、脂肪、半固体和液体多元醇。注射溶液的合适的赋形剂有,例如水、盐水、醇、多元醇、甘油或植物油。栓剂的合适赋形剂有,例如天然和硬化油、蜡、脂肪、半液体或液体多元醇。用于肠溶使用的溶液剂和糖浆剂的合适赋形剂有,例如水、多元醇、蔗糖、转化糖和葡萄糖。

[0320] 本发明的药物制剂也可以以缓释制剂或其他合适的制剂形式提供。

[0321] 药物制剂还可以包含防腐剂、增溶剂、稳定剂、湿润剂、乳化剂、甜味剂、着色剂、调味剂、用于调节渗透压的盐、缓冲剂、掩蔽剂或抗氧化剂。药物制剂还可包含本领域已知的其他治疗活性剂。

[0322] 剂量可以在很宽的范围内变化,并且当然将在每种特定情况下调整个人需要。对于口服给药,在单一疗法和/或联合疗法中,每天约0.01至约100mg/kg体重之间的日剂量应

该是合适的。优选的日剂量为每天约0.1至约500mg/kg体重,更优选0.1至约100mg/kg体重,最优选1.0至约100mg/kg体重之间。典型的制剂包含约5%至约95%的活性化合物(w/w)。日剂量可以单剂量或分剂量给药,通常每天1-5剂。

[0323] 在某些药物剂型中,化合物的前药形式,特别是包括本发明化合物的酰化(乙酰化或其他)衍生物、吡啶酯和各种盐形式是优选的。本领域普通技术人员将认识到如何容易地将本发明的化合物修饰成前药形式以促进将活性化合物递送至宿主生物或患者内的靶位点。在适用的情况下,本领域普通技术人员还将利用前药形式的有利的药代动力学参数将本发明的化合物递送至宿主生物或患者体内的靶位点以使化合物的预期效果最大化。

[0324] 通用合成

[0325] 本发明的化合物可以通过以下实施例部分描述的示例性合成反应中的多种方法制备。

[0326] 用于制备这些化合物的起始原料和试剂通常可以从商业供应商(例如奥尔德里奇化学有限公司(Aldrich Chemical Co.))获得,或者通过本领域技术人员已知的按照参考文献(例如Fieser和Fieser的有机合成试剂(Reagents for Organic Synthesis);威利父子公司(Wiley&Sons):纽约,1991年,第1-15卷;Rodd的《碳化合物化学(Chemistry of Carbon Compounds)》,爱思唯尔科学出版社(Elsevier Science Publishers),1989年,第1-5卷和增刊;和有机反应(Organic Reactions),威利父子公司:纽约,1991年,第1-40卷)提出的方法制备。应当理解,在实施例部分中所示的合成反应方案仅仅是可以合成本发明的化合物的一些方法的说明,并且可以对这些合成反应方案进行各种修改并且已经参考了本申请中包含的公开内容的本领域技术人员可以从中得到启示。

[0327] 如果需要,可以使用常规技术来分离和纯化合成反应方案的起始原料和中间体,所述常规技术包括但不限于过滤、蒸馏、结晶、色谱法等。可以使用常规手段来表征此类材料,包括物理常数和光谱数据。

[0328] 除非有相反的说明,否则本文所述的反应通常在惰性气氛中,在大气压下,在约-78°C至约150°C、通常约0°C至约125°C的反应温度范围内,并且更经常和方便地在大约室温(或环境温度)如大约20°C下进行。

[0329] 本发明化合物上的各种取代基可以存在于起始化合物中,添加到任何一种中间体中,或者通过已知的取代或转化反应方法在形成最终产物之后添加。如果取代基本身是反应性的,则可以根据本领域已知的技术来保护取代基本身。本领域已知的多种保护基并可被使用。许多可能的基团的例子可以在Green等人的“有机合成中的保护基团(Protective Groups in Organic Synthesis)”约翰·威利父子出版公司(John Wiley and Sons),1999中找到。例如,可以通过硝化引入硝基,并且可以将硝基转化为其他基团,例如通过还原转化为氨基,通过将氨基的重氮化并用卤素取代重氮基而转化为卤素。可以通过弗-克(Friedel-Crafts)酰基化来引入酰基。然后可以通过各种方法将酰基转化为相应的烷基,所述方法包括基斯内尔-沃尔夫(Wolff-Kishner)还原和克莱门森(Clemmenson)还原。可以将氨基烷基化以形成单和二烷基氨基;巯基和羟基可被烷基化以形成相应的醚。伯醇可以被本领域已知的氧化剂氧化以形成羧酸或醛,而仲醇可以被氧化以形成酮。因此,贯穿原料、中间体或最终产物(包括分离产物)的分子中,可以采用取代或改变(alteration)反应以提供各种取代基。

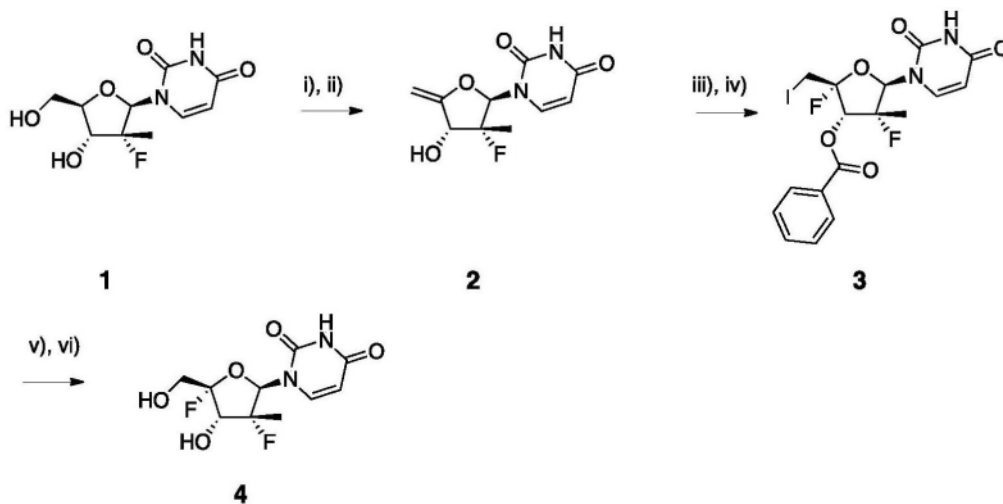
[0330] 式II化合物的合成:

[0331] 式II化合物可如下述方案1-4中所示和所述制备。

[0332] 方案1

[0333] 方案1

[0334] 1-((2R,3R,4S,5S)-3,5-二氟-4-羟基-5-(羟甲基)-3-甲基四氢咪喃-2-基)嘧啶-2,4(1H,3H)-二酮的合成



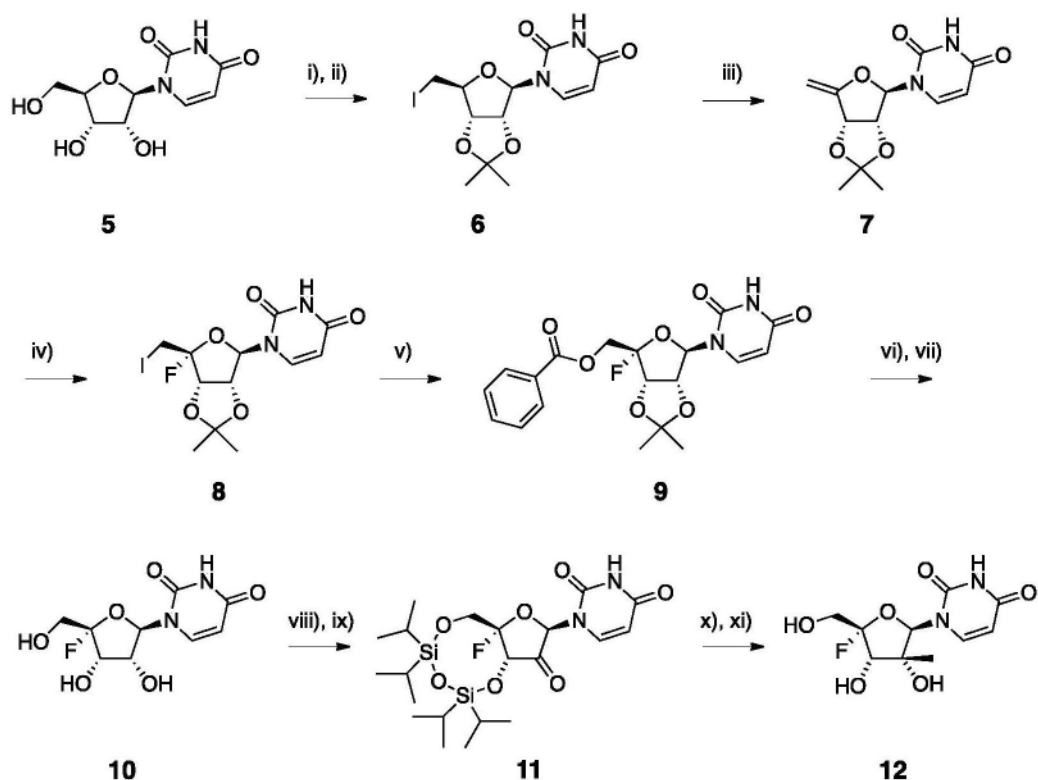
[0335]

i) I_2 , PPh_3 , THF; ii) NaOMe, MeOH; iii) BzCl, DMAP, THF; iv) I_2 , AgF, CH_2Cl_2 ; v) $PhCO_2Na$, DMSO; vi) NH_3 , MeOH

[0336] 起始材料1可以根据由Sofia, M.J. 等人, 药物化学杂志 (J. Med. Chem.) (2010), 53 (19), 7202-7218和Clark, J.L. 等人, 药物化学杂志 (J. Med. Chem.) (2005), 48 (17), 5504-5508中描述的步骤制备。1的碘化, 然后在碱性条件下消除碘化物可得中间体2。用苯甲酰基保护2中的3'-羟基, 然后进行关键的立体特异性氟化反应, 可制得中间体3。先前Ajmera, S. 等人, 药物化学杂志 (J. Med. Chem.) (1988), 31 (6), 1094-1098和Moffatt, J.G. 等, 药物化学杂志 (J. Med. Chem.) (1971), 93 (17), 4323-4324中已描述了类似的转变以在4' α 位引入氟。用苯甲酸钠置换3中的5'碘, 然后通过3', 5'苯甲酰基脱保护得到核苷中间体4。

[0337] 方案2

[0338] 1-((2R,3R,4S,5S)-5-氟-3,4-二羟基-5-(羟甲基)-3-甲基四氢咪喃-2-基)嘧啶-2,4(1H,3H)-二酮的合成



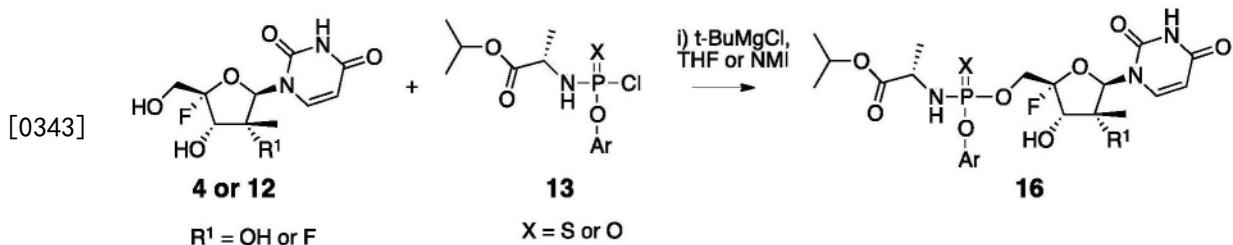
[0339]

i) Acetone, PTSA; ii) I_2 , PPh_3 , THF; iii) NaOMe, MeOH; iv) I_2 , AgF, CH_2Cl_2 ; v) $PhCO_2Na$, DMSO; vi) NH_3 , MeOH; vii) Formic acid; viii) DIPSCl, Pyridine; ix) Dess-Martin, CH_2Cl_2 ; x) $AlCl_3$, CH_2Cl_2 ; xi) TBAF, THF.

[0340] 保护、碘化,以及随后碱性条件下的碘的消除提供了中间体7。7在4'-位的氟化可按照Ajmera, S.等人,药物化学杂志(J. Med. Chem.) (1988), 31(6), 1094-1098和Moffatt, J. G.等,药物化学杂志(J. Med. Chem.) (1971), 93(17), 4323-4324中所描述的进行。用苯甲酸钠置换8的5'碘将得到中间体9。脱保护,然后用1,3-二氯-1,1,3,3-四异丙基二硅氧烷(DIPSCl)选择性保护3'和5'-羟基,然后在戴斯-马丁(Dess-Martin)条件下氧化,可以得到酮11,接着用Hayakawa, H等人,化学与药学通报(Chem. Pharm. Bull.), (1987), 35(6), 2605-2608.中描述的类似方法。在标准条件下脱保护基以除去甲硅烷基保护基将得到所需产物12。

[0341] 方案3

[0342] 式II化合物(其中碱为尿嘧啶, X为O或S, R为-OAr, 其中, Ar为苯基或萘基, 和R'为 $NHCH(CH_3)C(=O)O$ -异丙基, Y为F和Y'为OH或F)的合成。

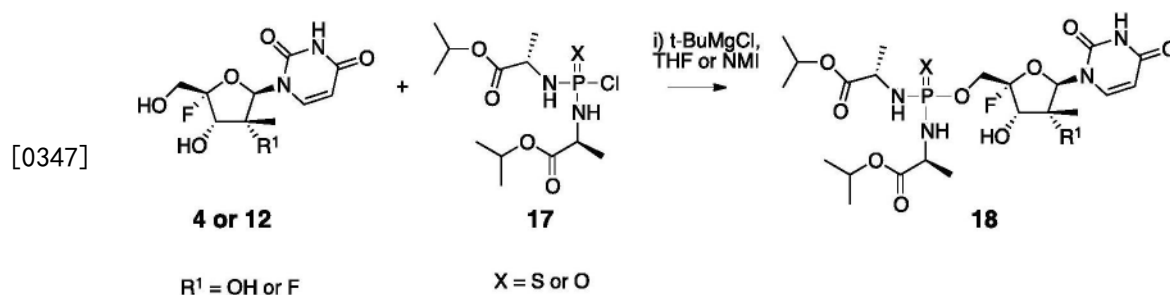


[0344] 式II氨基磷酸酯化合物可以通过在强碱存在下,使核苷4或12与适当取代的类型13的磷酰氯(phosphochloridate)或其硫类似物缩合来制备。在偶联反应下,获得的式II的偶联产物16最初为两种非对映异构体的混合物,并且可以通过手性柱、手性HPLC或手性SFC

色谱将混合物分离成它们相应的手性对映体。

[0345] 方案4

[0346] 式II化合物(其中碱为尿嘧啶,X为O或S,R和R'为NHCH(CH₃)C(=O)O-异丙基,Y为F,和Y'为OH或F)的合成。



[0348] 本发明中,式II二氨基磷酸酯化合物可以通过在强碱存在下,使核苷4或12与适当取代的类型17的二氨基氯酸磷(phosphorodiamidic chloride)或硫代二氨基氯酸磷(phosphorodiamidothioic chloride)缩合来制备。

[0349] 式(I)化合物可以通过以上方案1-4中公开的方法,使用本领域已知和以下实施例的方法来制备。

[0350] 实施例

[0351] 提供以下这些实施例和制备方法,以使本领域技术人员能够更清楚地理解和实施本发明。它们不应被认为是对本发明范围的限制,而仅仅是作为说明性的和代表性的。

[0352] 在本申请中使用的缩写包括:乙酰基(Ac)、乙酸(HOAc)、偶氮-双-异丁酰胺(AIBN)、1-N-羟基苯并三唑(HOBT)、大气压(Atm)、高压液相色谱法(HPLC)、9-硼双环[3.3.1]壬烷(9-BBN或BBN)、甲基(Me)、叔丁氧羰基(Boc)、乙腈(MeCN)、焦碳酸二叔丁酯或boc酸酐(BOC₂O)、1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDCI)、苯甲酰基(Bz)、苄基(Bn)、间氯过氧苯甲酸(MCPBA)、丁基(Bu)、甲醇(MeOH)、苄氧羰基(cbz或Z)、熔点(mp)、羰基二咪唑(CDI)、MeSO₂- (甲硅烷基或Ms)、1,4-二氮杂双环[2.2.2]辛烷(DABCO)、质谱(ms)、二乙氨基三氟化硫(DAST)、甲基叔丁基醚(MTBE)、二亚苄基丙酮(Dba)、N-羧基内酰胺酐(NCA)、1,5-二氮杂双环[4.3.0]壬-5-烯(DBN)、N-溴丁二酰亚胺(NBS)、1,8-二氮杂双环[5.4.0]十一碳-7-烯(DBU)、N-甲基吗啉(NMM)、N-甲基吡咯烷酮(NMP)、1,2-二氯乙烷(DCE)、氯铬酸吡啶盐(PCC)、N,N'-二环己基碳二亚胺(DCC)、重铬酸吡啶盐(PDC)、二氯甲烷(DCM)、丙基(Pr)、偶氮二羧酸二乙酯(DEAD)、苯基(Ph)、偶氮二羧酸二异丙酯(DIAD)、磅每平方英寸(psi)、二异丙基乙胺(DIPEA)、吡啶(pyr)、二异丁基氢化铝(DIBAL-H)、室温,rt或RT、N,N-二甲基乙酰胺(DMA)、叔丁基二甲基甲硅烷基或t-BuMe₂Si(TBDMS)、4-N,N-二甲基氨基吡啶(DMAP)、三乙胺(Et₃N或TEA)、N,N-二甲基甲酰胺(DMF)、三氟甲磺酸盐或CF₃SO₂-(Tf)、二甲基亚砷(DMSO)、三氟乙酸(TFA)、1,1'-双-(二苯基膦)乙烷(dppe)、2,2,6,6-四甲基庚烷-2,6-二酮(TMHD)、1,1'-双-(二苯基膦)二茂铁(dppf)、薄层色谱(TLC)、乙酸乙酯(EtOAc)、四氢呋喃(THF)、乙醚(Et₂O)、三甲基硅烷基或Me₃Si(TMS)、乙基(Et)、对甲苯磺酸一水合物(TsOH或pTsOH)、六甲基二硅氮烷锂(LiHMDS)、4-Me-C₆H₄SO₂-或甲苯磺酰基(Ts)、异丙基(i-Pr)、N-尿烷-N-羧基酸酐(UNCA)、乙醇(EtOH)。传统命名包括当与烷基部分一起使用时,前缀正(n)、异(i-),仲(sec-),叔(tert-)和新(neo)具有其惯常含义。(J.Rigaudy和D.P.Klesney,有机化学命名法(Nomenclature in Organic Chemistry),

IUPAC 1979年,佩加蒙出版社,牛津)。

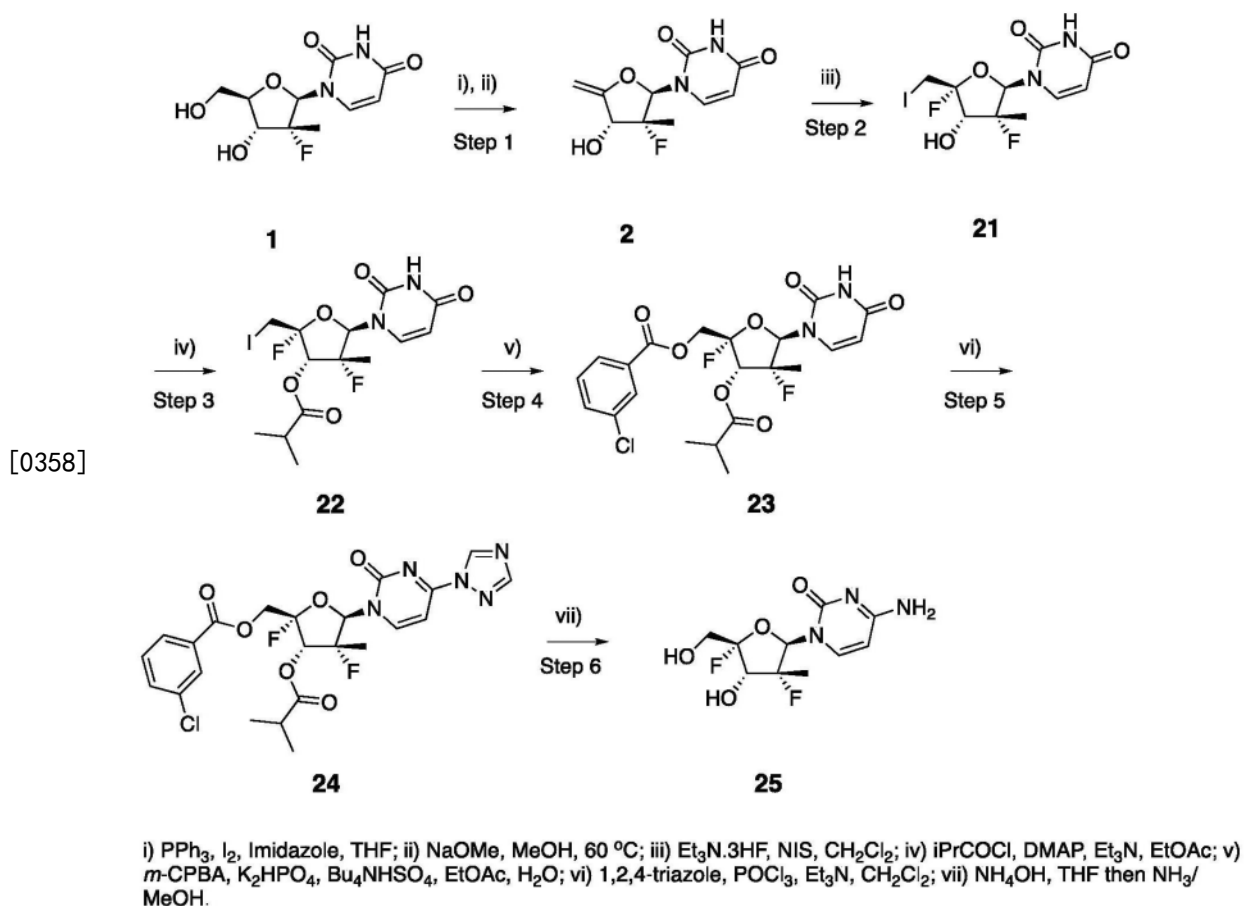
[0353] 合成实施例

[0354] 给出以下式I化合物和中间体的制备(参考)以使本领域技术人员能够更清楚地理解和实施本申请。它们不应被认为是对本申请范围的限制,而仅仅是作为说明性的和代表性的。

[0355] 除非另有说明,所有反应均使用市售材料和试剂进行,无需进一步纯化。通过硅胶板上的薄层色谱法(TLC)(Keisegel 60F254,默克公司(Merck))和/或超高效液相色谱法(UPLC)监测所有反应。通过紫外光和用高锰酸钾对TLC板染色并用热枪炭化,来实现TLC板上斑点的可视化。在带有Acquity PDA检测器、QDA质量检测器和二元溶剂体系的沃特世(Waters)Acquity UPLC仪器上记录UPLC 1。在带有Acquity PDA检测器、QDA质量检测器和四元溶剂体系的沃特世Acquity UPLC H级仪器上记录UPLC 2。采用在CSH C18色谱柱(2.1x50mm 1.7 μ m)上,以0.8mL/min的速度,以0.1%甲酸的乙腈溶液和0.1%甲酸的水溶液的变化梯度来运行UPLC 1酸性方法。采用CSH C18色谱柱(2.1x50mm 1.7 μ m)上,以0.8mL/min的速度,乙腈、水和2%甲酸水溶液的变化梯度来运行UPLC 2酸性方法。在XB C18色谱柱(2.1x50mm 2.5 μ m)或XB C8色谱柱(2.1x50mm 2.5 μ m)上,以0.8mL/min的速度,使用乙腈和10mM NH_4HCO_3 (用氨水调节至pH 10)的变化梯度来运行基本方法。所有产物均通过 ^1H NMR和在适当的情况下通过 ^{13}C , ^{31}P 和 ^{19}F NMR表征。NMR光谱数据记录在JEOL ECX300 MHz或JEOL ECX400 MHz光谱仪上。化学位移以百万分率值(ppm)表示,并用s(单峰);br s(宽峰);d(双峰);t(三峰);q(四重峰);quint(五重峰)或m(多重峰)表示。快速色谱在硅胶上进行,并使用氟化学公司(Fluorochem)硅胶LC60A 40-63微米和试剂级的庚烷、乙酸乙酯、二氯甲烷和甲醇作为洗脱剂。使用带有PDA检测器和3100质量检测器(配有X-Bridge C18色谱柱(19x150mm)或XSelect C18色谱柱(19x150mm))的沃特世自动纯化系统,以20mL/min的速度进行的质量定向制备型HPLC。

[0356] 参考例1

[0357] 4-氨基-1-((2R,3R,4S,5S)-3,5-二氟-4-羟基-5-(羟甲基)-3-甲基四氢呋喃-2-基)嘧啶-2(1H)-酮25的合成



[0359] 步骤1: 1-[(2R,3R,4R)-3-氟-4-羟基-3-甲基-5-亚甲基(methylidene)氧杂环戊烷(oxolan)-2-基]-1,2,3,4-四氢嘧啶-2,4-二酮2的制备

[0360] 步骤(i): 在1-[(2R,3R,4R,5S)-3-氟-4-羟基-3-甲基氧杂环戊烷-2-基]-1,2,3,4-四氢嘧啶-2,4-二酮1 (2602g, 10.00mol, 1eq)、 PPh_3 (3410g, 13.00mol, 1.30eq) 和咪唑 (885.0g, 13.00mol, 1.30eq) 于THF (25L) 的搅拌溶液中, 在1h的时间内, 分批加入碘 (2665g, 10.50mol, 1.05eq), 同时保持内部温度在10°C-20°C之间。搅拌的反应混合物温热至环境温度20h。过滤悬浮液, 浓缩滤液, 得到浅黄色油状粗产物。将残余物悬浮在甲醇 (8.0L) 中, 收集固体并用石油醚 (8L) 洗涤, 干燥, 得到3430g白色固体状的1-[(2R,3R,4R,5S)-3-氟-4-羟基-5-(碘甲基)-3-甲基氧杂环戊烷-2-基]-1,2,3,4-四氢嘧啶-2,4-二酮 (92.67%)。 ^1H NMR (DMSO- d_6 , 400MHz) δ_{H} 11.52 (s, 1H), 7.61-7.63 (d, 1H), 5.91-6.05 (m, 2H), 5.675-6.9 (d, $J=20\text{Hz}$, 1H), 4.06-4.10 (m, 1H), 3.77-3.80 (m, 1H), 3.49-3.65 (m, 3H), 1.21-1.27 (d, 3H)。

[0361] 步骤(ii): 向1-[(2R,3R,4R,5S)-3-氟-4-羟基-5-(碘甲基)-3-甲基氧杂环戊烷-2-基]-1,2,3,4-四氢嘧啶-2,4-二酮 (5000g, 13.509mol, 1.0eq) 于甲醇 (25.0L) 中的溶液中加入甲醇钠 (在甲醇中30%, 6080g, 33.77mol, 2.5eq)。将反应混合物在60°C搅拌5h, 然后冷却至10°C。过滤悬浮液, 浓缩滤液, 得到棕黄色固体状粗产物, 其无需进一步纯化直接用于下一步。

[0362] 将粗残余物溶于乙腈 (25.0L) 中, 并加入乙酸酐 (2758g, 27.018mol, 2.00eq)。将反应混合物在65°C下搅拌15小时。根据LC-MS, 加入额外量的乙酸酐 (276.0g, 2.70mol, 0.2eq)。12小时后, 将反应混合物在减压下浓缩以除去乙腈 (15.0L)。将残余物冷却至10°C并过滤。滤饼用最少量的乙腈和 H_2O 洗涤, 直到滤液的pH为7, 然后将其真空干燥, 得到2461g

(64.1%) 白色固体状的 (3R,4R,5R) -5- (2,4-二氧化-1,2,3,4-四氢嘧啶-1-基) -4-氟-4-甲基-2-亚甲基氧杂环戊烷-3-基乙酸酯。

[0363] 向 (3R,4R,5R) -5- (2,4-二氧化-1,2,3,4-四氢嘧啶-1-基) -4-氟-4-甲基-2-亚甲基氧杂环戊烷-3-基乙酸酯 (2461g, 8.662mol, 1.0eq) 于甲醇 (12.30L) 溶液中, 加入甲醇钠 (在甲醇中30%, 77.97g, 0.433mol, 0.05eq)。将反应混合物在50℃下搅拌15h。根据HPLC, 添加额外量的甲醇钠 (在甲醇中的30%, 77.97g, 0.433mol, 0.05eq)。8小时后, 反应完成, 然后冷却至5℃。在5℃下搅拌12h后, 通过过滤收集沉淀的产物, 滤饼用最少量的甲醇洗涤, 真空干燥, 得到1856g (88.4%) 灰白色固体状的1-[(2R,3R,4R) -3-氟-4-羟基-3-甲基-5-亚甲基氧杂环戊烷-2-基]-1,2,3,4-四氢嘧啶-2,4-二酮2。¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 11.56 (s, 1H), 7.39 (s, 1H), 6.16-6.12 (d, 1H), 5.98 (s, 1H), 5.68-5.66 (s, 1H), 4.63-4.53 (m, 2H), 4.28 (s, 1H), 1.37-1.31 (d, 3H)。

[0364] 步骤2: 1-((2R,3R,4S,5R) -3,5-二氟-4-羟基-5-(碘甲基) -3-甲基-四氢呋喃-2-基) 嘧啶-2,4(1H,3H) -二酮21的制备

[0365] 向1-[(2R,3R,4R) -3-氟-4-羟基-3-甲基-5-亚甲基氧杂环戊烷-2-基]-1,2,3,4-四氢嘧啶-2,4-二甲酮2 (1855g, 7.66mol, 1.0eq) 和TEA·3HF (1976g, 12.254mol, 1.6eq) 于DCM (37L) 的溶液中加入N-碘代琥珀酰亚胺 (3274g, 14.552mol, 1.9eq)。将反应混合物在25℃下搅拌24h。然后加入10% NaHSO₃水溶液 (13L), 并将混合物搅拌2小时。过滤收集沉淀的产物。将滤饼与另一批 (从1555g的0001289-015-01开始) 合并。合并的固体用最少量的DCM、5% NaHCO₃水溶液直到滤液的pH为7-8和H₂O洗涤, 在真空中干燥, 得到5060g (92.6%) 浅黄色固体状的粗产物。将粗产物 (2500g) 在甲醇 (37.5L) 中的混合物加热至回流2h, 然后冷却至5℃。在5℃下搅拌2小时后, 通过过滤收集沉淀的产物, 滤饼用最少量的甲醇洗涤, 干燥, 得到1970g (78.8%) 浅黄色固体状的1-((2R,3R,4S,5R) -3,5-二氟-4-羟基-5-(碘甲基) -3-甲基四氢呋喃-2-基) 嘧啶-2,4(1H,3H) -二酮21。

[0366] ¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ_H 11.63 (s, 1H), 7.81-7.51 (m, 1H), 6.31-5.95 (m, 2H), 5.73-5.71 (d, 1H), 4.56-3.78 (m, 3H), 1.30-1.25 (m, 3H)。

[0367] 步骤3: (2R,3S,4R,5R) -5- (2,4-二氧化-3,4-二氢嘧啶-1(2H) -基) -2,4-二氟-2-(碘甲基) -4-甲基四氢呋喃-3-基异丁酸酯, 22的制备

[0368] 在环境温度下, 向1-((2R,3R,4S,5R) -3,5-二氟-4-羟基-5-(碘甲基) -3-甲基四氢呋喃-2-基) 嘧啶-2,4(1H,3H) -二酮21 (400g, 1.03mol, 1eq.) 于EtOAc (2L) 的搅拌悬浮液中, 加入4-二甲基氨基吡啶 (6.30mg, 51.5mmol, 5mol%) 和三乙胺 (172mL, 1.24mol)。将所得悬浮液冷却至0℃, 并经40分钟逐滴加入异丁酰氯 (130mL, 1.24mol, 1.2eq.), 保持温度<10℃。将反应混合物在环境温度搅拌3小时。将水 (1L) 和EtOAc (300mL) 添加至反应混合物, 并分离各相。随后将水层用EtOAc (2L) 萃取。合并有机层, 用MgSO₄和SiO₂干燥, 并过滤。滤饼用EtOAc (300mL) 洗涤, 滤液40℃真空浓缩, 得到白色固体状的 (2R,3S,4R,5R) -5- (2,4-二氧化-3,4-二氢嘧啶-1(2H) -基) -2,4-二氟-2-(碘甲基) -4-甲基四氢呋喃-3-基异丁酸酯, 22, (461g, 产率98%)。¹H NMR (CDCl₃, 300MHz) δ_H 8.59 (br s, 1H), 7.30 (br d, 1H), 5.83 (dd, 1H), 3.71-3.38 (m, 2H), 2.77 (sept, 1H), 1.45 (d, 3H), 1.26 (d, 3H)。ES⁺m/z 459MH⁺

[0369] 步骤4: 3-氯苯甲酸 ((2S,3S,4R,5R) -5- (2,4-二氧化-3,4-二氢嘧啶-1(2H) -基) -2,4-二氟-3-(异丁酰氧基) -4-甲基四氢呋喃-2-基) 甲基酯23的制备

[0370] 在0℃下,向(2R,3S,4R,5R)-5-(2,4-二氧化-3,4-二氢嘧啶-1(2H)-基)-2,4-二氟-2-(碘甲基)-4-甲基四氢呋喃-3-基异丁酸酯22(461g,1.01mol,1eq.)和3-氯苯甲酸(173g,1.11mol,1.1eq.)、磷酸氢二钾(364g,2.09mol,2.08eq.)和硫酸四-正丁基铵(345g,1.02mol,1.07eq.)于EtOAc(3.5L)和水(900mL)的搅拌混合物中,经20分钟分批添加3-氯过氧苯甲酸(966g,3.92mol,3.9eq.,70%w/w)。将混合物温热至18℃并搅拌16h。将混合物冷却至0℃,然后经30分钟逐滴加入Na₂SO₃(2.4L,10%水溶液),以使内部温度保持<5℃。分离各相,并将有机相用Na₂SO₃(2×2L,10%水溶液)、NaHCO₃(4×2L,饱和水溶液)、盐水(2L)洗涤,并用MgSO₄和SiO₂干燥并过滤。将滤液40℃真空浓缩,得到胶状物。将该物质溶解在EtOAc(1.2L)中。将NaHCO₃(800mL,饱和水溶液)加入反应混合物中并搅拌24小时。然后分离有机相,并用NaHCO₃(饱和水溶液)、盐水洗涤,用MgSO₄干燥,并在40℃下真空浓缩,得到橙色胶状物。将该物质重新溶解在EtOAc中,并加入SiO₂。将混合物搅拌15分钟,然后通过SiO₂垫过滤。滤饼用EtOAc洗涤,并在真空中于40℃下浓缩,得到3-氯苯甲酸((2S,3S,4R,5R)-5-(2,4-二氧化-3,4-二氢嘧啶-1(2H)-基)-2,4-二氟-3-(异丁氧基)-4-甲基-四氢呋喃-2-基)甲基酯23,为橙色胶状物。

[0371] ¹H NMR(CDCl₃,300MHz) δ_H 8.96(s,1H),8.00(s,1H),7.92(d,1H),7.58(d,1H),7.43(t,1H),7.20(d,1H),5.67(m,1H),4.61(dq,2H),2.74(sept,1H),1.44(d,3H),1.25(d,3H)。

[0372] ES⁻m/z 485M-H

[0373] 步骤5:3-氯苯甲酸((2S,3S,4R,5R)-2,4-二氟-3-(异丁酰氧基)-4-甲基-5-(2-氧代-4-(1H-1,2,4-三唑-1-基)嘧啶-1(2H)-基)四氢呋喃-2-基)甲基酯,24的制备

[0374] 在环境温度下,向3-氯苯甲酸((2S,3S,4R,5R)-5-(2,4-二氧化-3,4-二氢嘧啶-1(2H)-基)-2,4-二氟-3-(异丁酰氧基)-4-甲基四氢呋喃-2-基)甲基酯23(1.02g,210mmol,1eq.)和三唑(144g,2.10mol,101eq.)在CH₂Cl₂(1L)中的搅拌混合物中,加入Et₃N(291mL,2.10mol,10eq.)。将所得混合物冷却至0℃,滴加三氯氧磷(V)(49.0mL,524mmol,2.5eq.),并保持温度<10℃。将混合物在0℃下搅拌3小时。将混合物加入水中并萃取到CH₂Cl₂中。合并有机相,用MgSO₄干燥,过滤并在40℃下真空浓缩溶剂,得到橙色油状的3-氯苯甲酸((2S,3S,4R,5R)-2,4-二氟-3-(异丁酰氧基)-4-甲基-5-(2-氧代-4-(1H-1,2,4-三唑-1-基)嘧啶-1(2H)-基)四氢呋喃-2-基)甲基酯,24(118g,定量)。¹H NMR(CDCl₃,300MHz) δ_H 9.25(s,1H),8.14(s,1H),8.01-7.80(m,3H),7.62(d,1H),7.64(t,1H),4.68(m,1H),2.76(m,1H),1.45(br d,3H),1.30-1.15(m,6H)。ES⁺m/z 538MH⁺

[0375] 步骤6:4-氨基-1-((2R,3R,4S,5S)-3,5-二氟-4-羟基-5-(羟甲基)-3-甲基四氢呋喃-2-基)嘧啶-2(1H)-酮,25的制备

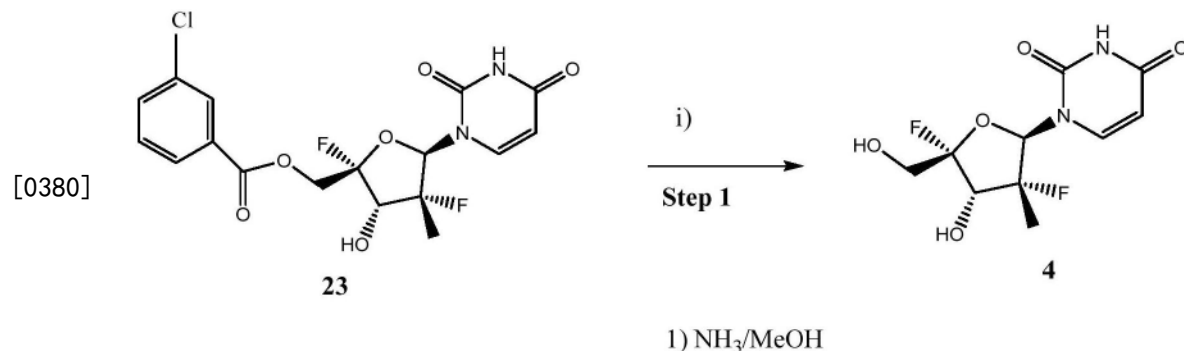
[0376] 在环境温度下,向3-氯苯甲酸((2S,3S,4R,5R)-2,4-二氟-3-(异丁酰氧基)-4-甲基-5-(2-氧代-4-(1H-1,2,4-三唑-1-基)嘧啶-1(2H)-基)四氢呋喃-2-基)甲基酯24于THF(1L)的搅拌混合物中,加入NH₃(200mL,浓水溶液)。将混合物在环境温度下搅拌16小时。将混合物在40℃下真空浓缩。向所得的浆液中加入MeOH(250mL)和NH₃(250mL,7N的MeOH溶液),并将混合物在环境温度下搅拌2小时。将混合物在40℃下真空浓缩,得到橙色胶状物。加入EtOAc,并将混合物在环境温度下搅拌16小时。过滤收集所得固体,并用EtOAc(500mL)和Et₂O(500mL)洗涤,得到灰白色固体状的4-氨基-1-((2R,3R,4S,5S)-3,5-二氟-4-羟基-

5-(羟甲基)-3-甲基四氢呋喃-2-基)嘧啶-2(1H)-酮, 25, (57.0g, 产率65%)。

[0377] ^1H NMR (MeOD, 300MHz) δ_{H} 7.82 (br s, 1H), 6.52 (br d, 1H), 5.89 (d, 1H), 4.07 (br t, 1H), 1.30 (d, 1H)。

[0378] 参考例2

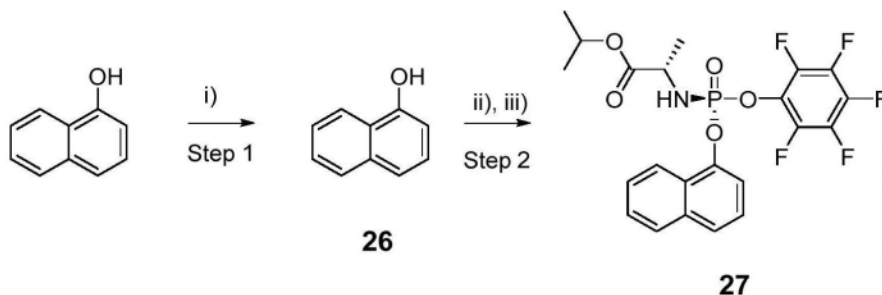
[0379] 1-((2R,3R,4S,5S)-3,5-二氟-4-羟基-5-(羟甲基)-3-甲基-四氢呋喃-2-基)嘧啶-2,4(1H,3H)-二酮4的合成



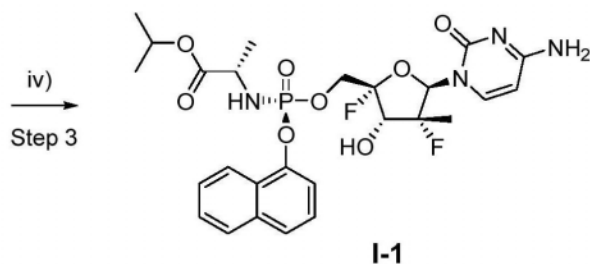
[0381] 向3-氯苯甲酸(((2S,3S,4R,5R)-5-(2,4-二氧化-3,4-二氢嘧啶-1(2H)-基)-2-二氟-3-(异丁氧基)-4-甲基四氢呋喃-2-基)甲基酯23 (238g, 489mmol) 的MeOH (100mL) 溶液中, 加入 NH_3 (1L, 7N的MeOH溶液)。将混合物在环境温度搅拌16小时。将混合物真空浓缩。将所得油状物在 CH_2Cl_2 (200mL) 中搅拌1h, 并通过过滤收集所得固体, 用 Et_2O 洗涤, 并在 50°C 下真空干燥48h。得到灰白色固体状的1-((2R,3R,4S,5S)-3,5-二氟-4-羟基-5-(羟甲基)-3-甲基四氢呋喃-2-基)嘧啶-2,4(1H,3H)-二酮, 4 (102g, 产率75%)。 ^1H NMR (MeOD, 300MHz) δ_{H} 7.80 (d, 1H), 6.45 (br d, 1H), 5.71 (d, 1H), 4.15 (br m, 1H), 3.77 (m, 2H), 1.37 (d, 1H)。 ^{19}F NMR (MeOD, 283MHz) δ_{F} -135 (m, 1F), -159 (m, 1F)。 $\text{ES}^+_{\text{m/z}}$ 279 MH^+

[0382] 实施例1

[0383] ((S)-(((2S,3S,4R,5R)-5-(4-氨基-2-氧代嘧啶-1(2H)-基)-2,4-二氟-3-羟基-4-甲基四氢呋喃-2-基)甲氧基)(萘-1-基氧基)磷酸基)-L-丙氨酸异丙酯I-1



[0384]



i) Et_3N , POCl_3 , Et_2O ; ii) isopropyl L-alanine, Et_3N , CH_2Cl_2 ; iii) $\text{C}_6\text{F}_5\text{OH}$, Et_3N , CH_2Cl_2 ; iv) **25**, tBuMgCl , DMF

[0385] 步骤1: 二氯磷酸萘-1-酯26的制备

[0386] 在-78℃下,氩气氛围中,向三氯氧磷(V) (30.1mL, 327mmol, 1eq.) 于乙醚(500mL)的搅拌溶液中,加入1-萘醇(47.1g, 327mmol, 1eq.)。经2小时滴加三乙胺(45.0mL, 327mmol, 1eq.), 保持温度<-60℃。经2小时使反应混合物升温至环境温度,然后搅拌16小时。将混合物通过硅藻土过滤,并将滤饼用二乙醚洗涤,得到无色溶液。在减压下(蒸馏温度25℃)浓缩滤液,得到黄色油状的二氯磷酸萘-1-酯26(78.2g, 产率92%)。³¹P NMR (CDCl₃, 161MHz) δ_p 4.44(s)。

[0387] 步骤2: ((R) - (萘-1-基氧基) (全氟苯氧基) 磷酰基) -L-丙氨酸异丙酯27的制备

[0388] 在-78℃下,氩气氛围中,将二氯磷酸萘-1-酯26(78.2g, 299mmol, 1eq.) 和异丙基-L-丙氨酸(41.9g, 299mmol, 1eq.) 于二氯甲烷的搅拌溶液中,逐滴添加三乙胺(43mL, 589mmol, 2eq.), 保持温度<-70℃。将反应混合物在-78℃下搅拌30分钟,然后在0℃下搅拌30分钟。

[0389] 将五氟苯酚(66.0g, 359mmol, 1.2eq.) 和三乙胺(43mL, 589mmol, 2eq.) 在二氯甲烷(100mL)中搅拌,并将该混合物滴加到大部分的反应混合物中。1小时后,将反应混合物减压浓缩,得到白色固体。将固体悬浮在乙酸乙酯/庚烷(1:1, 300mL)中,并加入二氧化硅。将混合物搅拌5分钟,然后过滤。滤饼用乙酸乙酯/庚烷(1:1, 200mL)洗涤。将滤液在减压下浓缩。将得到的残余物悬浮在1:4乙酸乙酯:庚烷(500mL)中,并在环境温度下搅拌16小时。通过过滤收集沉淀物,得到白色固体状的((R) - (萘-1-基氧基) - (全氟苯氧基) 磷酰基) -L-丙氨酸异丙酯26(49.2g, 32%, >99:1d.r.)。¹H NMR (CDCl₃, 300MHz): 8.10-8.13(m, 1H), 7.87(dd, 1H), 7.71(d, 1H), 7.51-7.61(m, 3H), 7.42(t, 1H), 4.95-5.03(m, 1H), 4.14-4.27(m, 1H), 3.98-4.06(m, 1H), 1.42(q, 3H), 1.18-1.25(m, 6H)。³¹P NMR (CDCl₃, 122MHz): -0.05(s)。¹⁹F NMR (CDCl₃, 238MHz): -152.54--153.40(d, 1F), -158.86--159.61(t, 1F), -161.62--162.30(t, 1F)

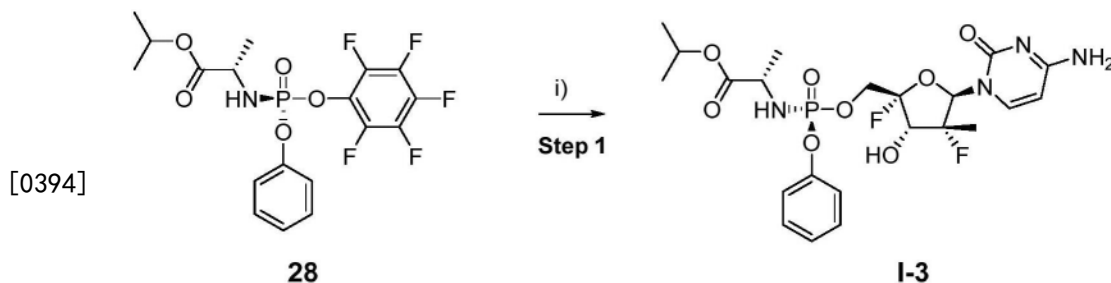
[0390] 步骤3: ((S) - (((2S, 3S, 4R, 5R) - 5- (4-氨基-2-氧代嘧啶-1(2H) -基) - 2,4-二氟-3-羟基-4-甲基四氢呋喃-2-基) 甲氧基) (萘-1-基氧基) 磷酰基) -L-丙氨酸酯I-1

[0391] 在-10℃下,氩气氛围中,向4-氨基-1-((2R, 3R, 4S, 5S) - 3,5-二氟-4-羟基-5-(羟甲基) - 3-甲基四氢呋喃-2-基) 嘧啶-2(1H) -酮(13.9g, 50.1mmol, 1eq.) 于二甲基甲酰胺(70mL)的搅拌溶液中,在30分钟内逐滴滴入叔丁基氯化镁(1M的THF溶液, 100mL, 100mmol, 2eq.), 保持内部温度<10℃。将反应混合物在-5℃下搅拌20分钟,然后加入((R) - (全氟-苯氧基) (萘氧基) 磷酰基) -L-丙氨酸异丙酯(37.8g, 75.1mmol, 1.5eq.)。将反应混合物在-5℃下搅拌3h,并加入至氯化铵(饱和水溶液, 200mL)和2-MeTHF(200mL)中。分离各相,并将水相用2-甲基四氢呋喃萃取。合并有机相,并用硫酸镁干燥,过滤并在减压下除去溶剂。所得油状物通过干快速色谱法(二氧化硅, 2.5-10%甲醇/二氯甲烷)纯化,得到橙色油状物。然后通过Isolera(120g ZIP SPHERE, 二氧化硅, 5-7.5%甲醇/二氯甲烷洗脱)纯化含有产物的级分(Fractions)。将干净的级分溶解于水/乙腈中,冷冻干燥,得到灰白色固体状的((S) - (((2S, 3S, 4R, 5R) - 5- (4-氨基-2-氧代嘧啶-1(2H) -基) - 2,4-二氟-3-羟基-4-甲基四氢呋喃-2-基) 甲氧基) (萘-1-基氧基) 磷酰基) -L-丙氨酸异丙酯I-1(3.16g)。¹H NMR (含D₂O的DMSO-d₆, 400MHz): 8.03(m, 1H), 7.90(m, 1H), 7.71(m, 1H), 7.55-7.52(m, 2H), 7.43-7.37(m, 2H), 7.11(m, 1H), 6.41(br d, 1H), 5.58-5.50(m, 1H), 4.77(sept, 1H), 4.28(m, 2H), 3.99(t,

1H), 1.22-1.02 (m, 12H); ^{19}F NMR (DMSO- d_6 , 376MHz): -123 (m, 1F) -154 (m, 1F); ^{31}P NMR (DMSO- d_6 , 161MHz): 4.74 (s)。ES $^+$ m/z 597MH $^+$

[0392] 实施例2

[0393] ((S)-(((2S,3S,4R,5R)-5-(4-氨基-2-氧代嘧啶-1(2H)-基)-2,4-二氟-3-羟基-4-甲基四氢呋喃-2-基)甲氧基)(苯氧基)磷酰基)-L-丙氨酸异丙酯I-3的合成



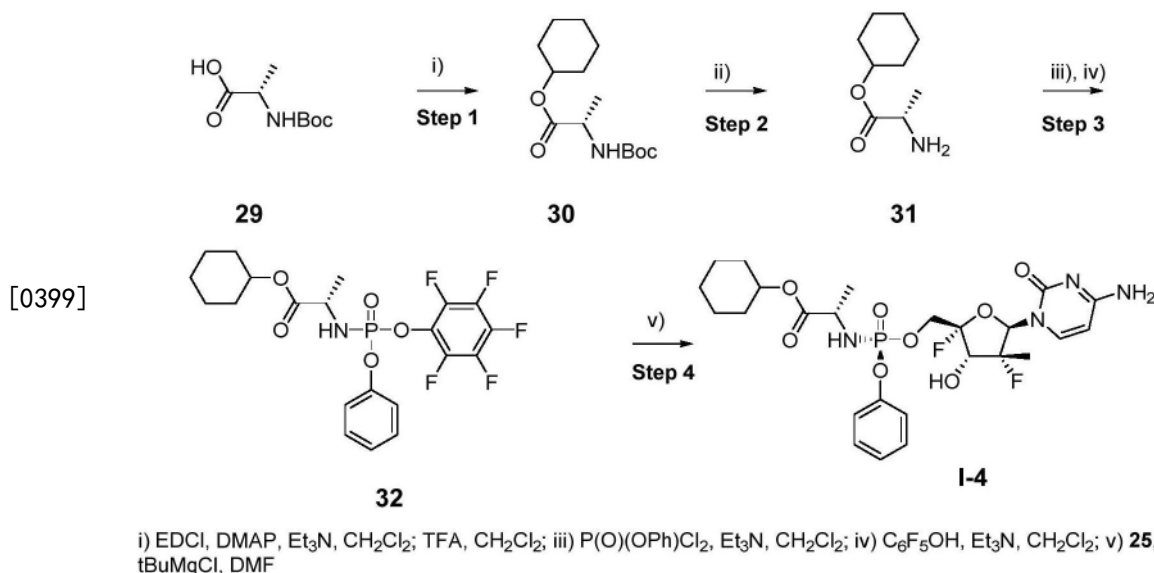
i) 25, tBuMgCl, DMF

[0395] 0℃, 氩气氛围中,向4-氨基-1-((2R,3R,4S,5S)-3,5-二氟-4-羟基-5-(羟甲基)-3-甲基四氢呋喃-2-基)嘧啶-2(1H)-酮25(41g, 134mmol, 1.0eq.)于无水二甲基甲酰胺(410mL)的搅拌溶液中,在30分钟内加入 $^t\text{BuMgCl}$ (296mL的1.0M的四氢呋喃溶液, 300mmol, 2.0eq.),保持内部温度低于10℃。将所得混合物在0℃以下搅拌10分钟,然后加入作为固体的((S)-((全氟苯氧基)(苯氧基)磷酰基)-L-丙氨酸异丙酯28(134g, 300mmol, 2.0eq.)。将所得混合物在0℃下搅拌10分钟,然后在1小时内升温至环境温度。将所得混合物在环境温度搅拌30分钟,然后重新冷却至0℃。将反应混合物用2-甲基四氢呋喃(400mL)稀释,然后通过加入氯化铵淬灭,然后进一步用水和乙酸乙酯稀释。加入硅藻土(~75g),将混合物过滤并用水和乙酸乙酯冲洗滤饼。分离各层,水层用乙酸乙酯萃取。合并的乙酸乙酯萃取物用碳酸氢钠(饱和水溶液)洗涤,碳酸氢钠水溶液用乙酸乙酯反萃取。合并的乙酸乙酯萃取物经硫酸镁干燥,过滤并减压浓缩,得到棕色油状物。将该油状物重新溶解在乙酸乙酯中,并用碳酸氢钠洗涤(饱和水溶液用水稀释至1.0L)。碳酸氢钠水溶液用乙酸乙酯反萃取,合并的乙酸乙酯萃取液用硫酸镁干燥,过滤并减压浓缩,得到棕色油状粗产物(113g)。通过在二氧化硅上用乙酸乙酯-甲醇(0-15%)然后用二氯甲烷-甲醇(0-10%)的混合物重复进行干式快速柱色谱法纯化粗产物,得到灰白色泡沫,将其从水-乙腈(35%)中冷冻干燥,得到((S)-(((2S,3S,4R,5R)-5-(4-氨基-2-氧代嘧啶-1(2H)-基)-2,4-二氟-3-羟基-4-甲基-四氢呋喃-2-基)甲氧基)(苯氧基)磷酰基)-L-丙氨酸异丙酯I-3(27.3g),作为灰白色无定形固体并作为95:5非对映异构体混合物。 ^1H NMR (DMSO- d_6 , 400MHz): 7.38-7.27 (br m, 5H), 7.21-7.16 (m, 3H), 6.45 (d, 1H), 6.12 (br s, 2H), 5.70 (d, 1H), 4.83 (septet, 1H), 4.24 (br s, 2H), 4.04 (br td, 1H), 3.79 (br s, 1H), 1.20 (d, 3H), 1.17 (d, 3H), 1.11 (d, 6H)。 ^{19}F NMR (DMSO- d_6 , 376MHz): -120.3和-122.9 (br s 1F), -148.5和-154.7 (br s 1F)。

[0396] ^{31}P NMR (DMSO- d_6 , 161MHz): 4.22 (s)。ES $^+$ 546.97。

[0397] 实施例3

[0398] ((S)-(((2S,3S,4R,5R)-5-(4-氨基-2-氧代嘧啶-1(2H)-基)-2,4-二氟-3-羟基-4-甲基四氢呋喃-2-基)甲氧基)(苯氧基)磷酰基)-L-丙氨酸环己基酯的合成I-4



[0400] 步骤1: (叔丁氧基羰基)-L-丙氨酸环己基酯30的制备

[0401] 向(叔丁氧基羰基)-L-丙氨酸(5g, 26.4mmol, 1eq.)、4-(二甲基氨基)吡啶29(323mg, 2.64mmol, 10mol%) 和Et₃N(14.7mL, 106mmol, 4eq.) 于CH₂Cl₂(50mL) 的搅拌溶液中, 加入N-(3-二甲基氨基丙基)-N'-乙基碳二亚胺盐酸盐(10.1g, 52.9mmol, 2eq.)。将反应混合物在0℃下搅拌1h。加入环己醇(3.35mL, 31.7mmol, 1.2eq.) , 并将反应混合物在环境温度下搅拌48h。将反应混合物真空浓缩, 得到油状固体, 将其用Et₂O和水分配。分离各相, 并将有机相用水(50mL)、盐水(50mL) 洗涤, 用MgSO₄干燥, 过滤并真空浓缩, 得到无色油状物。通过快速色谱法纯化(SiO₂, 11-14% EtOAc/庚烷洗脱), 得到(叔丁氧基羰基)-L-丙氨酸环己基酯30(1.76g, 产率25%)。¹H NMR(CDCl₃, 300MHz) δ_H 5.04(br s, 1H), 4.83-4.76(m, 1H), 4.27(br quint, 1H), 1.84(br s, 2H), 1.72(br s, 2H), 155-1.23(m, 6H), 1.37(d, 3H)。

[0402] 步骤2: L-丙氨酸环己基酯, 31的制备

[0403] 在0℃下, 向搅拌的(叔丁氧基羰基)-L-丙氨酸环己基酯30(1.76g, 6.49mmol, 1eq.) 在CH₂Cl₂(18mL) 的搅拌溶液中加入三氟乙酸(2mL)。将反应混合物在环境温度下搅拌2小时, 然后静置16小时。将反应混合物加入到NaHCO₃(70mL, 饱和水溶液) 中。分离各相, 并用CH₂Cl₂萃取水相。合并有机相, 并用MgSO₄干燥, 过滤并真空浓缩, 得到L-丙氨酸环己基酯31, 为黄色油状物(1.179g, 收率100%)。¹H NMR(CDCl₃, 300MHz) δ_H 4.77(m, 1H), 3.51(m, 1H), 1.83-0.85(m, 13H)。

[0404] 步骤3: ((全氟苯氧基)(苯氧基)磷酸基)-L-丙氨酸环己基酯, 32的制备

[0405] 在-78℃下, Ar氛围中, 向二氯磷酸苯酯(phenyl phosphorodichloridate)(1.23g, 5.84mmol, 1eq.) 于CH₂Cl₂(10mL) 溶液中, 加入L-丙氨酸环己基酯31(1g, 5.84mmol) 和Et₃N(0.81mL, 5.84mmol, 1eq.) 于CH₂Cl₂(5mL) 的溶液。将反应混合物在-78℃下搅拌30分钟, 然后温热至环境温度。将混合物冷却至0℃, 并加入五氟苯酚(1.07g, 5.84mmol, 1eq.) 的CH₂Cl₂(5mL) 溶液, 接着加入Et₃N(0.81mL, 5.84mmol, 1eq.)。将反应混合物在0℃下搅拌2h, 然后在环境温度下搅拌16h。将该混合物真空浓缩, 得到白色固体。将固体悬浮在EtOAc/庚烷(1:1, 100mL) 中, 并加入SiO₂(5g)。将混合物在环境温度下搅拌5分钟, 并过滤。滤饼用EtOAc/庚烷(1:1, 200mL) 洗涤。将滤液真空浓缩, 得到白色固体。通过快速色谱法(SiO₂, 用20% EtOAc/庚烷洗脱) 纯化, 得到((全氟苯氧基)(苯氧基)磷酸基)-L-丙氨酸环己基酯32

(1.62g, 产率56%)。

[0406] 步骤4: ((S) - (((2S,3S,4R,5R) -5- (4-氨基-2-氧代嘧啶-1(2H) -基) -2,4-二氟-3-羟基-4-甲基四氢呋喃-2-基) 甲氧基) (苯氧基) 磷酰基) -L-丙氨酸环己基酯, I-4的制备

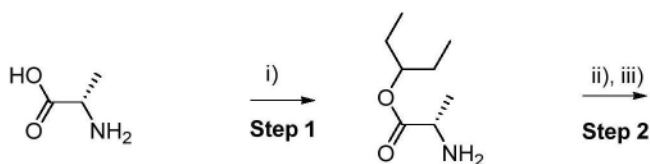
[0407] 0°C下,在氩气氛围中,向4-氨基-1-((2R,3R,4S,5S) -3,5-二氟-4-羟基-5-(羟甲基) -3-甲基四氢呋喃-2-基) 嘧啶-2(1H) -酮25(284mg, 1.02mmol, 1eq.)于无水THF(6mL)中的搅拌溶液中,加入^tBuMgCl(1.28mL, 1.28mmol, 2eq., 1M的THF溶液)。向反应混合物中加入(((R)) -1-(环己氧基) -1-氧代丙烷-2-基) 氨基) (全氟苯氧基) 磷酰基) -丙氨酸环己基酯(632mg, 1.28mmol)并将反应混合物在0°C下搅拌2h。将反应混合物加入到NH₄Cl(10mL, 饱和水溶液)中,并萃取到2-MeTHF中。合并的有机相用MgSO₄干燥,过滤并真空浓缩,得到棕色油状物。通过快速色谱纯化(SiO₂, 10-15%MeOH/CH₂Cl₂洗脱),得到黄色泡沫,用MDAP(XSelect C18, 30%MeCN/水洗脱)纯化。将含有产物的级分冷冻干燥,得到((R) - (((2S,3S,4R,5R) -5-(4-氨基-2-氧代嘧啶-1(2H) -基) -2,4-二氟-3-羟基-4-甲基四氢呋喃-2-基) 甲氧基) (苯氧基) 磷酰基) -L-丙氨酸环己基酯, (R_p), (14mg, 2%) 和((S) - (((2S,3S,4R,5R) -5-(4-氨基-2-氧代嘧啶-1(2H) -基) -2,4-二氟-3-羟基-4-甲基四氢呋喃-2-基) 甲氧基) (苯氧基) 磷酰基) -L-丙氨酸环己基酯, 目标产物I-4(S_p), (49mg, 8%), 作为白色固体。

[0408] R_p非对映异构体: ¹H NMR (DMSO-d₆, 400MHz) δ_H 7.40-7.20 (br m, 3H), 7.19-7.10 (br m, 3H), 6.45 (d, 1H), 6.21-6.10 (br m, 2H), 5.70 (d, 1H), 4.60 (br s, 1H), 4.30-4.20 (br m, 2H), 3.96 (br td, 1H), 3.78 (br q, 1H), 1.68 (s, 2H), 1.60 (br s, 2H), 1.43 (br s, 1H), 1.35-br m, 5H), m 1.19 (d, 3H), 1.18/1.12 (s, 3H, 旋转异构体); ¹⁹F NMR (DMSO-d₆, 376MHz) δ_F (旋转异构体) -120.1--120.3/-122.4--122.7 (br m, 1F), -148.3--148.6/-154.7--155.0 (br m, 1F); ³¹P NMR (DMSO-d₆, 161MHz) δ_p 4.18 (s)。UPLC (酸性, 2-95%, CSH C18) RT=2.101min, 98.94%ESIpos m/z 587MH⁺

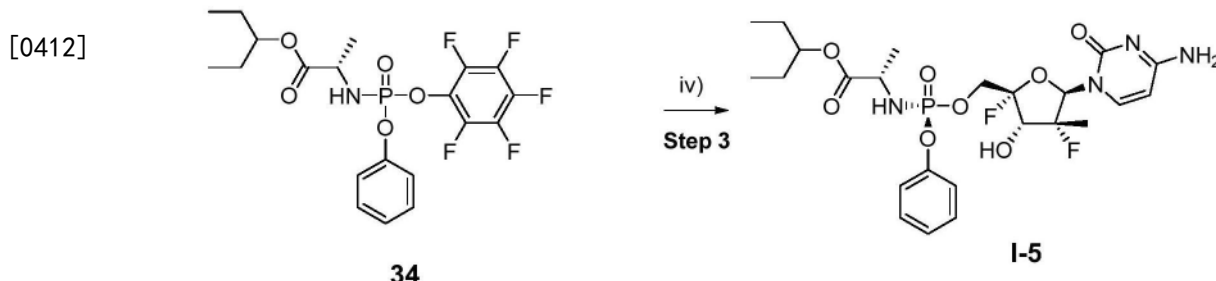
[0409] S_p非对映异构体 (I-4): ¹H NMR (DMSO-d₆, 400MHz) δ_H 7.40-7.27 (br m, 5H), 7.22-7.10 (br m, 3H), 6.47 (d, 1H), 6.19-6.12 (br m, 2H), 5.71 (d, 1H), 4.61 (br s, 1H), 4.25 (br s, 2H), 4.04 (br td, 1H), 3.87-3.75 (br m, 1H), 1.67 (br s, 2H), 1.61 (br s, 2H), 1.43 (br s, 1H), 1.38-1.25 (br m, 5H), 1.23/1.15 (s, 3H, 旋转异构体) 2.21 (d, 3H)。 ¹⁹F NMR (DMSO-d₆, 376MHz) δ_F (旋转异构体) -120.3/-123.0 (s m, 1F), 148.5/-154.5--154.8 (br m, 1F)。 ³¹P NMR (DMSO-d₆, 161MHz) δ_p 4.21 (s)。UPLC (酸性, 2-95%, CSH C18) RT=2.12min, 99.49%ESIpos m/z 587MH⁺

[0410] 实施例4

[0411] ((S/R_p) - (((2S,3S,4R,5R) -5- (4-氨基-2-氧代嘧啶-1(2H) -yl) -2) 4-二氟-3-羟基-4-甲基四氢呋喃-2-基) 甲氧基) (苯氧基) 磷酰基) -L-丙氨酸-3-戊酯, I-5的合成



33



34

I-5

iii) 3-pentanol, SOCl_2 ; ii) $\text{P}(\text{O})(\text{OPh})\text{Cl}_2$, Et_3N , CH_2Cl_2 ; iii) $\text{C}_6\text{F}_5\text{OH}$, Et_3N , CH_2Cl_2 iv) **25**, tBuMgCl , DMF

[0413] 步骤1: L-丙氨酸-3-戊酯, 33的制备

[0414] 在环境温度下,向3-戊醇 (15.2mL, 140mmol, 2.5eq.) 和L-丙氨酸 (5g, 56.1mmol, 1eq.) 的搅拌溶液中加入亚硫酸氯 (6.1mL, 84.2mmol, 1.5eq.)。将反应混合物加热至回流24小时,然后冷却至环境温度。将混合物加入到剧烈搅拌下的 CH_2Cl_2 和 NaHCO_3 (饱和水溶液) 的混合物中。将该混合物搅拌15分钟,然后分离各相。将水相用 CH_2Cl_2 洗涤,并将有机相合并,用 MgSO_4 干燥,过滤并真空浓缩。将得到的油状物与甲苯和EtOAc共沸,得到浅褐色油状的L-丙氨酸戊-3-酯33 (905mg, 10%)。 ^1H NMR (CDCl_3 , 300MHz) δ_{H} 4.77 (五重峰, 1H), 3.53 (q, 1H), 1.62-1.52 (m, 4H), 1.34 (d, 1H), 0.87 (t, 6H)。

[0415] 步骤2: ((全氟苯氧基)(苯氧基)磷酰基)-L-丙氨酸戊-3-酯, 34的制备

[0416] 在 -78°C 下, Ar氛围中,向二氯磷酸苯酯 (1.2g, 5.68mmol, 1eq.) 的 CH_2Cl_2 (4mL) 溶液中加入L-丙氨酸戊-3-酯 (905mg, 5.84mmol) 的 CH_2Cl_2 (12mL) 溶液。加入 Et_3N (0.79mL, 5.68mmol, 1eq.)。将反应混合物在 -78°C 下搅拌1h,然后温热至环境温度。将该混合物冷却至 0°C ,并加入五氟苯酚 (1.05g, 5.68mmol, 1eq.) 的 CH_2Cl_2 (4mL) 溶液,然后加入 Et_3N (1.58mL, 11.4mmol, 2eq.)。将反应混合物在 0°C 下搅拌15分钟,然后在环境温度下搅拌2小时。将该混合物真空浓缩,得到白色固体。将固体悬浮在EtOAc/庚烷 (1:1, 100mL) 中,并加入 SiO_2 (5g)。将混合物在环境温度搅拌5分钟,并过滤。滤饼用EtOAc/庚烷 (1:1, 200mL) 洗涤。滤液在真空浓缩,得到白色固体状的((全氟苯氧基)-(苯氧基)磷酰基)-L-丙氨酸戊-3-酯, 34 (1.9g, 产率69%) (1:1非对映异构体的混合物)。 ^1H NMR (CDCl_3 , 300MHz) δ_{H} 7.36 (t, 2H), 7.29-7.19 (m, 3H), 4.81 (六重峰, 1H), 4.24-4.15 (m, 1H), 4.07-3.94 (m, 1H), 1.62-1.55 (m, 4H), 1.48 (d, 1.5H), 1.47 (d, 1.5H), 0.90-0.84 (m, 6H)。 ^{31}P NMR (CDCl_3 , 122MHz) δ_{P} -0.99 (s)。

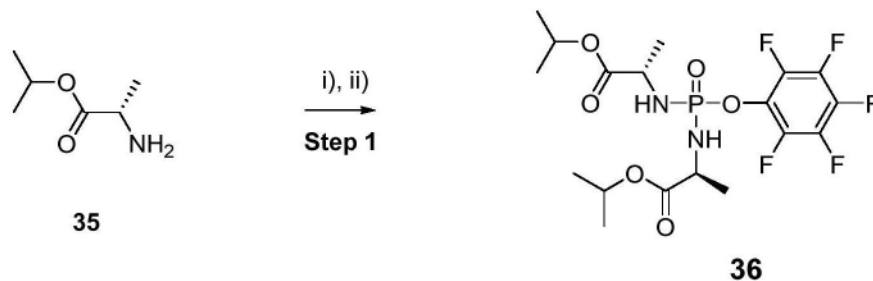
[0417] 步骤3: (((2S,3S,4R,5R)-5-(4-氨基-2-氧代嘧啶-1(2H)-基)-2,4-二氟-3-羟基-4-甲基四氢呋喃-2-基)甲氧基)(苯氧基)磷酰基)-L-丙氨酸戊-3-酯, I-5的制备

[0418] 0°C 下,在氩气氛围中,向4-氨基-1-(((2R,3R,4S,5S)-3,5-二氟-4-羟基-5-(羟甲基)-3-甲基四氢呋喃-2-基)嘧啶-2(1H)-酮)25 (265mg, 0.955mmol, 1eq.) 在无水THF (6mL) 中的搅拌溶液中加入 tBuMgCl (1.43mL, 1.28mmol, 1.5eq., 1M的THF溶液)。向混合物中加入((全氟苯氧基)(苯氧基)磷酰基)-L-丙氨酸戊-3-酯34 (690mg, 1.43mmol), 并将反应混合物

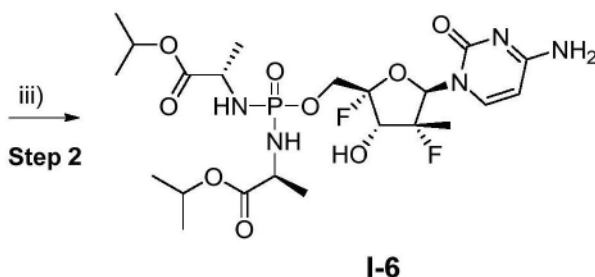
在0℃搅拌1.5h。将反应混合物加入到NH₄Cl (10mL, 饱和水溶液) 中, 并萃取到EtOAc中。有机相用NaHCO₃ (饱和水溶液)、盐水洗涤, 经MgSO₄干燥, 过滤并真空浓缩, 得到棕色油状物。通过MDAP (XSelect C18, MeCN/水) 纯化。将含有产物的级分冷冻干燥, 得到白色固体状的(((2S, 3S, 4R, 5R) -5-(4-氨基-2-氧代嘧啶-1(2H)-基)-2,4-二氟-3-羟基-4-甲基四氢呋喃-2-基)甲氧基)-(苯氧基)磷酰基)-L-丙氨酸异丙酯, I-5 (156mg, 产率28%, 差向异构体的混合物)。¹H NMR (DMSO-d₆, 400MHz) δ_H 7.43-7.08 (m, 7H), 6.49 (d, 1H), 6.23-6.09 (m, 2H), 5.70 (d, 1H), 4.61 (m, 1H), 4.24 (m, 2H), 4.03 (t, 1H), 3.80 (m, 1H), 1.54 (m, 3H), 1.30-1.00 (m, 5H), 0.82-0.70 (m, 6H)。¹⁹F NMR (DMSO-d₆, 376MHz) δ_F -120 (m), -122 (m), -123.0 (m), -148 (m), -154 (m)。³¹P NMR (DMSO-d₆, 161MHz) δ_P 4.25 (s)。UPLC (酸性, 2-95%, CSH C18) RT=2.489min, 19.65%ESIpos m/z 587MH⁺R_p, RT=2.610min, 69.11%ESIpos m/z 587MH⁺

[0419] 实施例5

[0420] (2S) -2-[[[(2S, 3S, 4R, 5R) -5-(4-氨基-2-氧代-嘧啶-1-基)-2,4-二氟-3-羟基-4-甲基-四氢呋喃-2-基]甲氧基-[[(1S) -2-异丙氧基-1-甲基-2-氧代-乙基]氨基]磷酰基]氨基]丙酸异丙酯, I-6的合成



[0421]



i) POCl₃, Et₃N, CH₂Cl₂; ii) C₆F₅OH, Et₃N, CH₂Cl₂ iii) 25, tBuMgCl, DMF

[0422] 步骤1: (((R) -1-(异丙氧基)-1-氧代丙烷-2-基)氨基)(全氟-苯氧基)-磷酰基)-L-丙氨酸异丙酯, 35的制备

[0423] 向冷却至-78℃、Ar氛围中的POCl₃ (0.360mL, 3.81mmol, 1eq.) 在CH₂Cl₂ (2.5mL) 中的搅拌下的溶液中, 逐滴添加L-丙氨酸异丙酯35 (1.00g, 7.62mmol, 2eq.) 的CH₂Cl₂ (2.5mL) 溶液, 保持温度<-60℃。滴加Et₃N (1.06mL, 7.62mmol, 2eq.), 保持温度<-60℃。将混合物在-78℃下搅拌1h, 然后温热至0℃并搅拌45min。将五氟苯酚 (700mg, 3.81mmol, 1eq.) 和Et₃N (1.06mL, 7.62mmol, 2eq.) 在CH₂Cl₂ (4mL) 中的预搅拌的混合物加入至主反应混合物中, 并在0℃下搅拌2h, 然后在环境温度下搅拌2h。向混合物中加入SiO₂ (约 (ca.) 5g) 和EtOAc (50mL)。将反应混合物搅拌5分钟, 然后过滤。滤饼用EtOAc (100mL) 洗涤。将滤液真空浓缩, 得到油状固体。通过快速色谱法纯化 (SiO₂, 33-50% EtOAc/庚烷洗脱), 得到白色固体状的(((R) -1-(异丙氧基)-1-氧代丙烷-2-基)氨基)-(全氟苯氧基)磷酰基)-L-丙氨酸异丙酯,

36, (619mg, 产率33%)。

[0424] ^1H NMR (CDCl_3 , 300MHz) δ_{H} 5.06 (septet, 2H), 4.07 (sept, 2H), 3.74 (q, 2H), 1.46 (d, 3H), 1.43 (d, 3H), 1.28 (d, 6H), 1.27 (d, 6H). ^{31}P NMR (CDCl_3 , 162MHz) δ_{P} 10.70 (s)。

[0425] 步骤2: (2S)-2-[[[(2S,3S,4R,5R)-5-(4-氨基-2-氧代-嘧啶-1-基)-2,4-二氟-3-羟基-4-甲基-四氢呋喃-2-基]甲氧基-[[[(1S)-2-异丙氧基-1-甲基-2-氧代-乙基]氨基]磷酰基]氨基]丙酸异丙酯I-6的制备

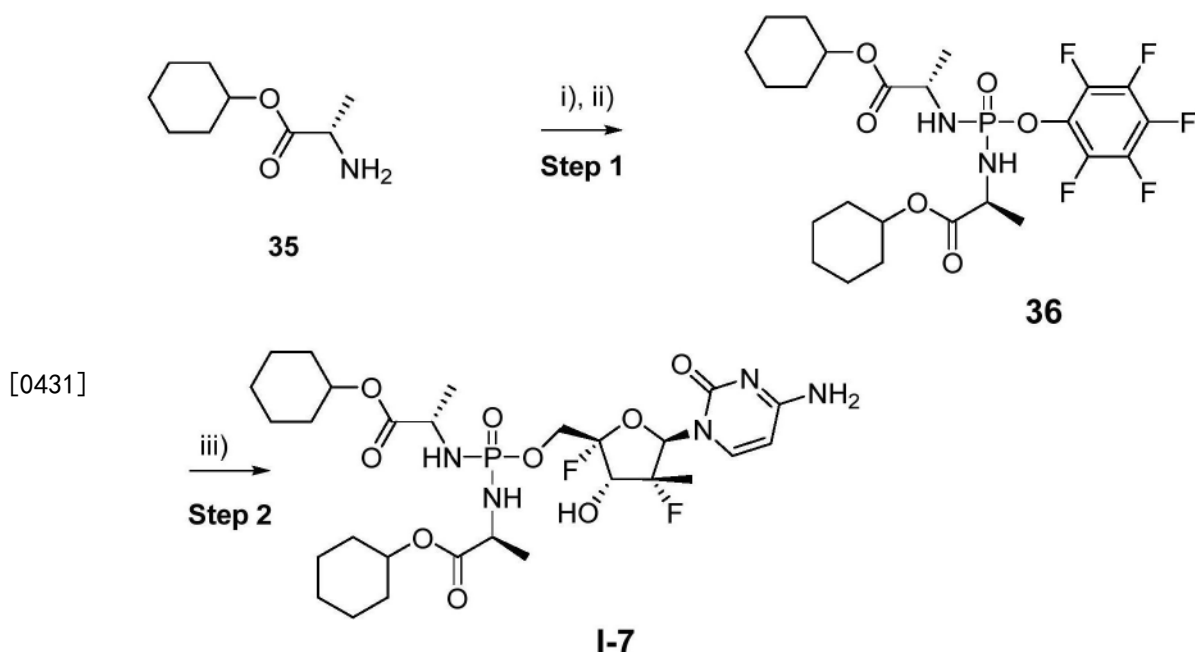
[0426] 0°C下,在氩气氛围中,向4-氨基-1-((2R,3R,4S,5S)-3,5-二氟-4-羟基-5-(羟甲基)-3-甲基四氢呋喃-2-基)嘧啶2(1H)-酮25(100mg, 0.360mmol, 1eq.)的无水DMF(3mL)中的搅拌下的悬浮液中,加入 $^t\text{BuMgCl}$ (0.72mL, 0.72mmol, 2eq., 1M的THF溶液)。向混合物中加入((全氟苯氧基)(苯氧基)磷酰基)-L-丙氨酸戊-3-酯36(690mg, 0.72mmol, 2eq.),并将反应混合物在0°C搅拌1.5h。将反应混合物用2-MeTHF稀释,并加入到 NH_4Cl (饱和水溶液)和水中。将水相萃取到2-MeTHF中。合并的有机相用 MgSO_4 干燥,过滤并真空浓缩,得到棕色油状物。通过快速色谱纯化(SiO_2 , 10-15%MeOH/ CH_2Cl_2 洗脱),得到灰白色泡沫,将其通过MDAP纯化(XSelect C18, 20-40%MeCN/水洗脱)。将含有产物的级分冷冻干燥,得到白色固体状的(2S)-2-[[[(2S,3S,4R,5R)-5-(4-氨基-2-氧代-嘧啶-1-基)-2,4-二氟-3-羟基-4-甲基-四氢呋喃-2-基]甲氧基-[[[(1S)-2-异丙氧基-1-甲基-2-氧代-乙基]氨基]磷酰基]氨基]丙酸异丙酯, I-6, (24mg, 产率11%)。

[0427] ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 400MHz) δ_{H} 7.33 (br s, 1H), 7.39 (d, 1H), 6.46 (d, 1H), 6.06 (d, 1H), 5.78 (d, 1H), 4.98 (q, 2H), 4.90-4.80 (m, 2H), 4.04 (br s, 3H), 3.77-3.65 (m, 2H), 1.22 (d, 6H), 1.17-1.13 (m, 5H). ^{19}F NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 376MHz) δ_{F} -22.3 (t, 1F), -154.9 (sept, 1F)

[0428] ^{31}P NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 161MHz) δ_{P} 13.6 (s)。UPLC (酸性, 2-95%, CSH C18) RT = 1.687min, 98.54ESI neg m/z 582 [M-H]⁻

[0429] 实施例6

[0430] (2S)-2-[[[(2S,3S,4R,5R)-5-(4-氨基-2-氧代-嘧啶-1-基)-2,4-二氟-3-羟基-4-甲基-四氢呋喃-2-基]甲氧基-[[[(1S)-2-(环己氧基)-1-甲基-2-氧代-乙基]氨基]磷酰基]氨基]丙酸环己基酯, I-7



i) POCl_3 , Et_3N , CH_2Cl_2 ; ; ii) $\text{C}_6\text{F}_5\text{OH}$, Et_3N , CH_2Cl_2 iv) **25**, tBuMgCl , DMF

[0432] 步骤1: (((R)-1-(环己氧基)-1-氧代丙烷-2-基)氨基)(全氟苯氧基)磷酰基)-L-丙氨酸环己基酯, 37的制备

[0433] 向冷却至 -78°C 、氩气氛围中的 POCl_3 ($303\mu\text{L}$, 3.25mmol , 1eq.) 在 CH_2Cl_2 (2mL) 中的搅拌下的溶液中, 滴加L-丙氨酸环己基酯 (1.11g , 6.49mmol , 2eq.) 的 CH_2Cl_2 (2mL) 溶液。滴加 Et_3N (0.902mL , 6.49mmol , 2eq.)。将混合物在 -78°C 下搅拌1h, 然后温热至 0°C 并搅拌30min。将五氟苯酚 (657mg , 3.57mmol , 1.1eq.) 和 Et_3N (0.902mL , 6.49mmol , 2eq.) 在 CH_2Cl_2 (2mL) 中的预搅拌的混合物加入至主反应混合物中, 并在 0°C 下搅拌2h。将该混合物真空浓缩, 得到白色固体。将固体悬浮在 EtOAc /庚烷 (2:3) 中, 并与 SiO_2 一起搅拌。将混合物过滤, 并将滤饼用 EtOAc /庚烷 (2:3) 洗涤。将滤液真空浓缩, 得到无色油状物。通过Isolera (SiO_2 , 80g ZIP SPHERE柱, 12-100% EtOAc /庚烷洗脱) 纯化, 得到白色固体状的(((R)-1-(环己氧基)-1-氧代丙烷-2-基)氨基)(全氟苯氧基)磷酰基)-L-丙氨酸环己基酯, **37**, (250mg , 25%)。 ^1H NMR (CDCl_3 , 400MHz) δ_{H} 4.86-4.78 (m, 2H), 4.14-4.01 (m, 2H), 3.79-3.69 (m, 2H), 1.85-1.72 (m, 8H), 1.62-1.25 (m, 18H)。

[0434] ^{19}F NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 376MHz) δ_{F} -154 (d, 2F), -160 (t, 1F), -162 (d, 2F)。 ^{31}P NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 161MHz) δ_{P} 10.7 (s)。

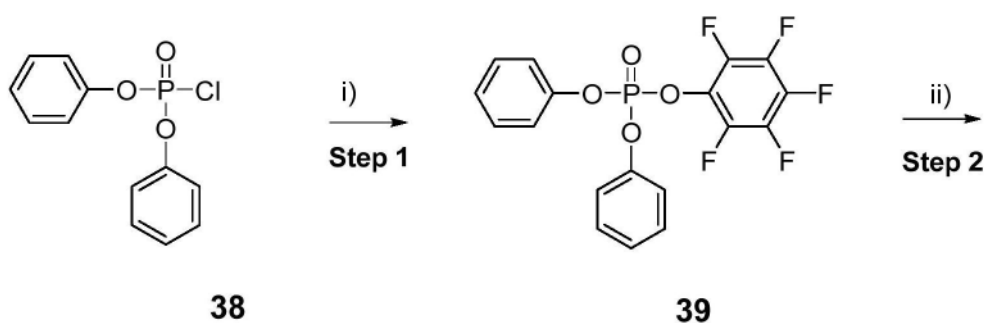
[0435] 步骤2: (2S)-2-[[[(2S,3S,4R,5R)-5-(4-氨基-2-氧代-嘧啶-1-基)-2,4-二氟-3-羟基-4-甲基-四氢咪喃-2-基]甲氧基-[[[(1S)-2-(环己氧基)-1-甲基-2-氧代-乙基]氨基]磷酰基]氨基]丙酸环己基酯, 1-7的制备

[0436] 在氩气氛围中, 0°C 下, 向4-氨基-1-((2R,3R,4S,5S)-3,5-二氟-4-羟基-5-(羟甲基)-3-甲基四氢咪喃-2-基)嘧啶-2(1H)酮**25** (168mg , 0.607mmol , 1eq.) 于 DMF (5mL) 中的搅拌溶液中, 加入 tBuMgCl (1.28mL , 0.911mmol , 2eq. , 1M 的 THF 溶液)。将反应混合物在 0°C 下搅拌15分钟, 得到悬浮液。向该混合物中加入(((R)-1-(环己氧基)-1-氧代丙烷-2-基)氨基)(全氟-苯氧基)磷酰基)-L-丙氨酸环己基酯 (502mg , 0.911mmol , 1.5eq.), 并在 0°C 下搅拌2

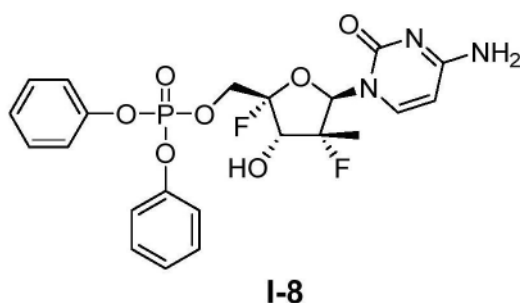
小时。将混合物加入到 NH_4Cl (30mL, 饱和水溶液) 中, 并萃取到2-MeTHF中。合并有机相, 并用 MgSO_4 干燥, 过滤并真空浓缩。通过MDAP (XSelect C 18, 30-60% MeCN/水洗脱) 纯化, 得到白色固体状的(2S)-2-[[[(2S,3S,4R,5R)-5-(4-氨基-2-氧代-嘧啶-1-基)-2,4-二氟-3-羟基-4-甲基-四氢呋喃-2-基]甲氧基-[[[(1S)-2-(环己氧基)-1-甲基-2-氧代-乙基]氨基]磷酰基]氨基]丙酸环己基酯I-7 (58.5mg, 产率15%)。 ^1H NMR (含 D_2O 的 DMSO-d_6 , 400MHz) δ_{H} 7.32(d, 1H), 6.44(d, 1H), 5.78(d, 1H), 4.98(d, 1H), 4.62(d, 1H), 4.03(m, 3H), 3.72(m, 2H), 1.86-1.00(m, 29H)。 ^{19}F NMR (DMSO-d_6 , 376MHz) δ_{F} -122(m, 1F) -155(m, 1F)。 ^{31}P NMR (DMSO-d_6 , 161MHz) δ_{P} 13.6(s)。UPLC (中性, 2-95%, CSH C18) RT=2.377min, 99.5% ESIpos m/z 664MH⁺

[0437] 实施例7

[0438] ((2S,3S,4R,5R)-5-(4-氨基-2-氧代嘧啶-1(2H)-基)-2,4-二氟-3-羟基-4-甲基四氢呋喃-2-基) 甲基二苯基磷酸酯, I-8的合成



[0439]



i) $\text{C}_6\text{F}_5\text{OH}$, Et_3N , CH_2Cl_2 ii) **25**, tBuMgCl , DMF

[0440] 步骤1: 全氟苯基二苯基磷酸酯, 39的制备

[0441] 在 0°C 下, Ar氛围中, 向五氟苯酚 (2g, 10.9mmol, 1eq.) 和 Et_3N (3.79mL, 27.2mmol) 于 CH_2Cl_2 中的搅拌溶液中, 加入氯磷酸二苯酯38 (2.70mL, 13.0mmol, 1.2eq.)。将混合物在 0°C 下搅拌1h, 然后在环境温度下搅拌16h。将反应混合物真空浓缩。将得到的油状物悬浮在 EtOAc 中, 用水和盐水洗涤, 用 MgSO_4 干燥, 过滤并真空浓缩, 得到浅褐色油状的全氟苯基二苯基磷酸酯39 (4.23g, 收率94%)。 ^1H NMR (CDCl_3 , 300MHz) δ_{H} 7.42-7.35(m, 5H), 7.32-7.24(m, 5H)。 ^{31}P NMR (CDCl_3 , 161MHz) δ_{P} -16.4(s)。UPLC (酸性, 2-95%, CSH C18) RT=2.377min ESIpos m/z 417MH⁺

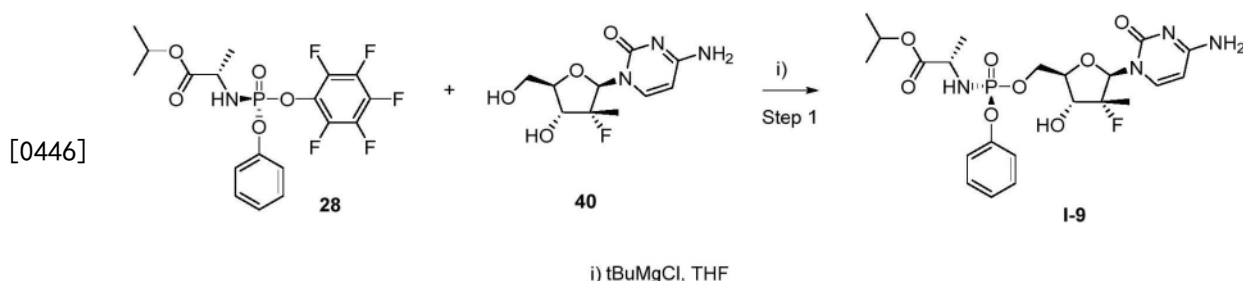
[0442] 步骤2: ((2S,3S,4R,5R)-5-(4-氨基-2-氧代嘧啶-1(2H)-基)-2,4-二氟-3-羟基-4-甲基四氢呋喃-2-基) 甲基二苯基磷酸酯, I-8的制备

[0443] 在环境温度下, 向4-氨基-1-((2R,3R,4S,5S)-3,5-二氟-4-羟基-5-(羟甲基)-3-

甲基四氢呋喃-2-基)嘧啶2-(1H)-酮25(150mg, 0.54mmol, 1eq.) 和全氟苯基二苯基磷酸酯(270mg, 0.65mmol) 于干燥的MeCN的搅拌悬浮液中, 加入1-甲基咪唑(0.22mL, 2.71mmol, 5eq.), 并搅拌3小时。将反应混合物加入到EtOAc和盐水中。分离各相, 水相用EtOAc萃取。合并的有机层经MgSO₄干燥, 过滤并真空浓缩, 得到棕色油状物。通过快速色谱(SiO₂, 10-15% MeOH/CH₂Cl₂洗脱), 然后通过MDAP(XSelect C18, 30-60% MeCN/水洗脱) 纯化, 得到白色固体状的((2S, 3S, 4R, 5R)-5-(4-氨基-2-氧代嘧啶-1(2H)-基)-2,4-二氟-3-羟基-4-甲基四氢呋喃-2-基)甲基二苯基磷酸酯, I-8(9.5mg, 3.5% 产率)。¹H NMR (DMSO-d₆, 300MHz) δ_H 7.38/7.23-7.20 (br m, 13H), 6.48/6.27/5.90-5.64 (3H, m), 4.59 (br s, 1H), 4.47/4.06 (br t, 1H), 1.03/1.17 (br d, 3H) (旋转异构体)。¹⁹F NMR (DMSO-d₆, 283MHz) δ_F -120.0/-12.8 (m, 1F), -148.9/-154.1 (m, 1F)。³¹P NMR (DMSO-d₆, 161MHz) δ_P -11.5。UPLC (酸性, 2-95%, CSH C18) RT=1.43min, 97.21% ESI_{neg} m/z 508 [M-H]⁻

[0444] 实施例8

[0445] ((S)-(((2R, 3R, 4R, 5R)-5-(4-氨基-2-氧代嘧啶-1(2H)-基)-4-氟-3-羟基-4-四氢呋喃-2-基)甲氧基)(苯氧基)磷酰基)-L-丙氨酸异丙酯, I-9的合成

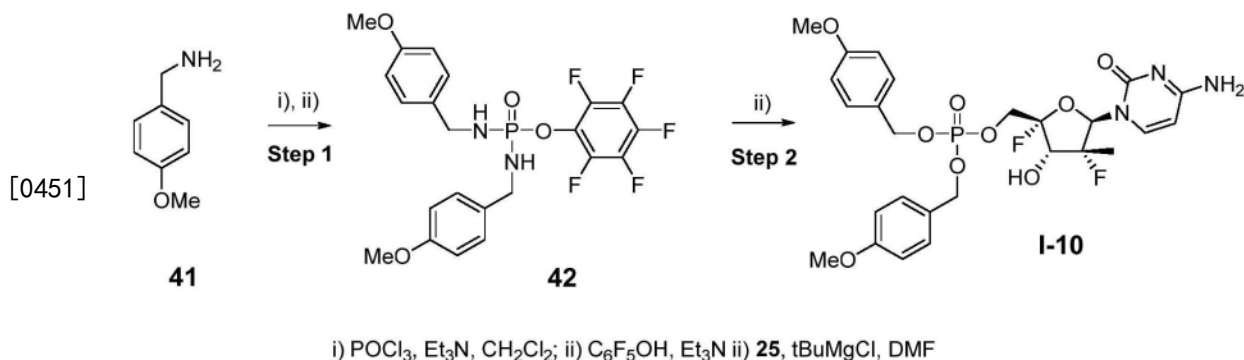


[0447] 步骤1: ((S)-(((2R, 3R, 4R, 5R)-5-(4-氨基-2-氧代嘧啶-1(2H)-基)-4-氟-3-羟基-4-四氢呋喃-2-基)甲氧基)(苯氧基)磷酰基)-L-丙氨酸异丙酯, I-9的制备

[0448] 在氩气氛围中, 0℃下, 向4-氨基-1-((2R, 3R, 4R, 5R)-3-氟-4-羟基-5-(羟甲基)-3-甲基四氢呋喃-2-基)嘧啶-2(1H)-酮-甲烷40(301mg, 1.77mmol, 1eq.) 于干燥的THF(10mL)中的搅拌下的混合物中, 加入^tBuMgCl(1.75mL, 1.75mmol, 1.5eq., 1M的THF溶液)。将混合物在0℃下搅拌15分钟, 并加入((S)-((全氟苯氧基)-(苯基)磷酰基)-L-丙氨酸异丙酯(793mg, 1.75mmol, 1.5eq.)。将混合物在0℃下搅拌1h。将混合物加入到NH₄Cl(饱和水溶液)中, 并萃取到EtOAc中。有机相用Na₂HCO₃(饱和水溶液)、盐水()洗涤, 经MgSO₄干燥, 过滤并在40℃下真空浓缩。粗产物通过HPLC(XSelect C18, 25-30% MeCN/水洗脱) 纯化。合并含有产物的级分并冷冻干燥, 得到白色固体状的((S)-(((2R, 3R, 4R, 5R)-5-(4-氨基-2-氧代嘧啶-1(2H)-基)-4-氟-3-羟基-4-甲基-4-甲基四氢呋喃-2-基)甲氧基)(苯氧基)磷酰基)-L-丙氨酸异丙酯, I-9(137mg, 产率30%)。¹H NMR (含D₂O的DMSO-d₆, 400MHz) δ_H 7.51-7.03 (m, 6H), 6.08 (br m, 1H), 5.68 (d, 1H), 4.79 (m, 1H), 4.18 (m, 1H), 3.94 (m, 1H), 3.81-3.62 (m, 2H), 1.24-1.02 (m, 12H)。¹⁹F NMR (DMSO-d₆, 376MHz) δ_F -159 (m, 1F)。³¹P NMR (DMSO-d₆, 161MHz) δ_P 4.42 (s)。UPLC (中性, 2-95%, CSH C18) RT=1.763min, 100% ESI_{pos} m/z 279MH⁺

[0449] 实施例9

[0450] ((2S, 3S, 4R, 5R)-5-(4-氨基-2-氧代嘧啶-1(2H)-基)-2,4-二氟-3-羟基-4-甲基四氢呋喃-2-基)甲基(4-甲氧基苄基)二氨基磷酸酯(phosphordiamidate), I-10的合成



[0452] 步骤1: 4-甲氧基苄基(全氟苯基)二氨基磷酸酯, 41的制备

[0453] 在氩气氛围中, 将三氯化磷(V) (609 μ L, 6.52mmol, 1eq.) 的CH₂Cl₂溶液冷却至-78 $^{\circ}$ C。向混合物中滴加4-甲氧基苄胺 (1.70mL, 13.0mmol, 2eq.), 然后滴加三乙胺 (2.73mL, 19.6mmol)。将混合物在-78 $^{\circ}$ C下搅拌1h, 然后温热至0 $^{\circ}$ C。加入五氟苯酚 (1.80g, 9.78mmol, 1.5eq.)。1小时内, 将混合物加热至环境温度。将该混合物真空浓缩, 得到黄色固体。通过Isolera (SiO₂, 80g ZIP SPHERE柱, 0-50%EtOAc/庚烷洗脱) 进行纯化, 得到白色固体状的4-甲氧基苄基(全氟苯基)二氨基磷酸酯41 (2.00g, 收率61%)。¹H NMR (CDCl₃, 400MHz) δ _H 7.23(m, 4H), 6.85(m, 4H), 4.18(m, 4H), 3.78(s, 6H)。³¹P NMR (DMSO-d₆, 161MHz) δ _p 13.4(s)。

[0454] 步骤2: ((2S, 3S, 4R, 5R) - 5- (4-氨基-2-氧代嘧啶-1(2H)-基) - 2, 4-二氟-3-羟基-4-甲基四氢呋喃-2-基) 甲基 (4-甲氧基苄基) 二氨基磷酸酯, I-10的制备

[0455] 0 $^{\circ}$ C下, Ar氛围中, 向4-氨基-1-((2R, 3R, 4S, 5S) - 3, 5-二氟-4-羟基-5-(羟甲基)-3-甲基四氢呋喃-2-基)嘧啶-2(1H)-酮**25** (200mg, 0.721mmol, 1eq.) 于无水THF (10mL) 中的搅拌混合物中, 加入^tBuMgCl (1.08mL, 1.44mmol, 1.5eq., 1M的THF溶液)。将混合物在0 $^{\circ}$ C下搅拌15分钟, 并加入4-甲氧基苄基(全氟苯基)二氨基磷酸酯 (495mg, 1.08mmol, 1.5eq.)。将混合物在0 $^{\circ}$ C下搅拌1h。将混合物加入到NH₄Cl (饱和水溶液) 中, 并萃取到EtOAc中。将有机相用Na₂HCO₃ (饱和水溶液), 盐水() 洗涤, 用MgSO₄干燥, 过滤并在40 $^{\circ}$ C下真空浓缩。以相等的规模重复该过程, 并将粗物质合并并通过MDAP (XSelect C18, MeCN/水洗脱) 纯化。合并含有产物的级分, 冷冻干燥, 得到白色固体状的((2S, 3S, 4R, 5R) - 5- (4-氨基-2-氧代嘧啶-1(2H)-基) - 2, 4-二氟-3-羟基- (4-甲基四氢呋喃-2-基) 甲基 (4-甲氧基苄基) 磷二酰胺, I-10, (113mg, 收率13%)。¹H NMR (含D₂O的DMSO-d₆, 300MHz) δ _H 7.27(d, 1H), 7.19(m, 4H), 6.81(m, 4H), 6.43(d, 1H), 5.70(d, 1H), 5.10(m, 1H), 4.10-3.77(m, 6H), 3.60(s, 6H), 1.14(d, 3H)。¹⁹F NMR (DMSO-d₆, 376MHz) δ _F -122(m, 1F) -155(m, 1F)

[0456] ³¹P NMR (DMSO-d₆, 161MHz) δ _p 17.1(s)。UPLC (中性, 2-95%, CSH C18) RT = 1.795min, 99.6%ESIpos m/z 595MH⁺

[0457] 生物实施例

[0458] HCV复制子测定

[0459] 该测定法测量式I化合物抑制HCV RNA复制的能力, 并因此测量其在治疗HCV感染中的潜在效用。该测定利用报告基因作为细胞内HCV复制子RNA水平的简单示值读数 (simple readout)。将海肾荧光素酶 (Renilla luciferase) 基因导入至基因型1b复制子构建体NK5.1的第一开放阅读框 (open reading frame) (N.Krieger等人, J.Virol., 2001 75 (10):4614), 紧接内部核糖体进入位点 (IRES) 序列后, 并通过口蹄疫病毒的自切割肽2A与

新霉素磷酸转移酶 (NPTII) 基因融合 (MD Ryan&J.Drew, EMBO 1994 13(4):928-933)。体外转录后,将RNA电穿孔到人肝癌Huh7细胞中,并分离和扩增G418耐药菌落。稳定选择的细胞系2209-23包含复制性HCV亚基因组RNA,复制子表达的海肾荧光素酶的活性反映了其在细胞中的RNA水平。为了平行测定化学化合物的抗病毒活性和细胞毒性,一式两份地在板(一块板为不透明白色,一块板为透明)上进行该测定,以确保所观察到的活性不是由于细胞增殖减少或由于细胞死亡引起的。

[0460] 将表达海肾荧光素酶报告基因的HCV复制子细胞(2209-23)在含有5%胎牛血清(FBS, Invitrogen目录号.10082-147)的Dulbecco's MEM(英杰公司(Invitrogen)目录号.10569-010)中温育,以每孔5000个细胞铺在96-孔板上,温育过夜。二十四小时后,将生长培养基中不同稀释度的化合物加入到细胞中,然后在37°C下进一步孵育三天。在温育时间结束时,收获白板中的细胞,并使用R. 荧光素酶测定系统(普洛麦格(Promega)目录号E2820)测量荧光素酶活性。以下段落中描述的所有试剂均包含在制造商的试剂盒中,并遵循制造商的说明进行试剂的制备。将细胞用100 μ L磷酸盐(pH 7.0)(PBS)缓冲盐水(每孔)洗涤一次,采用20 μ L的1 \times 海肾荧光素酶测试裂解缓冲液裂解,然后于室温下温育20min。然后将板插入Centro LB 960微孔板光度计(伯托科技(Berthold Technologies))中,向每个孔中注入100 μ L海肾荧光素酶试验缓冲液,采用2-秒延迟、2-秒测量程序测量信号。 IC_{50} (相对于未处理的细胞对照值而言,使复制子水平降低50%所需的药物浓度)可以根据荧光素酶活性降低百分比与上述药物浓度的关系图来计算。

[0461] 将罗氏诊断(目录号1644807)的WST-1试剂用于细胞毒性测定。将十微升WST-1试剂添加到透明板的每个孔(包括仅包含培养基作为空白的孔)中。然后将细胞在37°C下孵育2小时,并使用MRX启示(Revelation)微量滴定板读数仪(实验室系统(Lab System))于450nm(参比滤波器于650nm)测定OD值。同样, CC_{50} (相对于未处理的细胞对照值而言,使细胞增殖降低50%所需的药物浓度)可以根据WST-1值的降低百分比与上述药物浓度的关系图进行计算。

[0462] 组合疗法测试方案和结果

[0463] 方法:

[0464] 1. 细胞培养基

[0465] DMEM生长培养基包含添加有10%热灭活的胎牛血清(FBS)、1x MEM非必需氨基酸、2mM L-谷氨酰胺、100IU/ml青霉素和100 μ g/ml链霉素的杜氏改良伊格尔培养基(DMEM)。

[0466] HCV复制子测试培养基包含添加有5%热灭活FBS、1x MEM非必需氨基酸、2mM L-谷氨酰胺、100IU/ml青霉素和100 μ g/ml链霉素的无酚红DMEM。

[0467] 2. 细胞培养

[0468] 5%CO₂、37°C下、在添加250 μ g/ml G418的DMEM生长培养基中,培养在Huh7-Lunet细胞中表达双顺反子基因型1b复制子的HCV 1b复制子细胞。

[0469] 3. 抗病毒组合测试

[0470] 在HCV 1b复制子细胞中进行了HCV抑制剂组合测试。在化合物处理之前24小时,将HCV 1b复制子细胞以4000细胞/孔/100 μ L的密度接种在96孔平底白板中。对于药物组合研究,将化合物贮存液(stock solution)(1.75mM的((S)-(((2S,3S,4R,5R)-5-(2,4-二氧代-3,4-二氢嘧啶-1(2H)-基)-2,4-二氟-3-羟基-4-甲基四氢咪喃-2-基)甲氧基)(萘-1-基氧

基) 磷酸基) -L-丙氨酸异丙基酯化合物II-1和1mM的((S)-(((2S,3S,4R,5R)-5-(4-氨基-2-氧代嘧啶-1(2H)-基)-2,4-二氟-3-羟基-4-甲基四氢呋喃-2-基)甲氧基)(萘-1-基氧基)磷酸基) -L-丙氨酸异丙酯,化合物I-1于100%DMSO中)在复制子测试培养基中稀释100倍,分别得到17.5 μ MII-1和10 μ M I-1于1%DMSO中。然后将两种化合物在含1%DMSO的复制子测试培养基中连续稀释1.5倍,分别获得10次浓缩浓度范围1.75-0.068 μ M的II-1和1-0.088 μ M的I-1。将12.5 μ lII-1(横向药物(Horizontal drug))和12.5 μ l的I-1(纵向药物(vertical drug))的这些10次浓缩连续稀释液添加到复制子细胞中。对于所有测试点,细胞培养基中DMSO的终浓度为0.2%。处理后三天,通过加入70 μ l/孔的One-Glo®试剂(普洛麦格(Promega))测量复制子荧光素酶活性来确定抗病毒活性。使用珀金埃尔默(Perkin Elmer)EnSpire酶标仪测量相对光单位(RLU),设定以0.5秒/孔读取。使用表A中显示的模板生成化合物II-1和化合物I-1组合的药物治疗方案

[0471] 4. 数据分析

[0472] 使用由Prichard和Shipman开发的MacSynergy™II程序分析数据。通过以95%置信度,经行Bonferroni调整的表面偏差(surface deviations)体积(体积以 μ M浓度乘以 μ M浓度乘以百分比或 μ M²%表示)来计算每对抑制剂的组合效果。

[0473] 表A用于组合研究的化合物处理模板

纵向药物 I-1		横向药物 II-1 浓度范围[μ M]											
		0	0.068	0.102	0.154	0.230	0.346	0.519	0.778	1.167	1.75		
[0474]	1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	VC	CC
	0.667	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	VC	CC
	0.444	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	VC	CC
	0.296	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	VC	CC
	0.198	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	VC	CC
	0.132	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	VC	CC
	0.088	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	VC	CC
	0	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	VC	CC

[0475] VC:空白对照(0.2% DMSO)

[0476] CC:细胞对照(无细胞,仅复制子测试培养基)

[0477] 结果

[0478]

药物 1	药物 2	协同作用	拮抗作用		核苷组合 (Nuc Combo)	最大%I	最小%I	最大%SD	最小%SD
索非布韦 (II-3)	索非布韦 (II-3)	11	-6.5	相加	U: U	100	42.85	4.57	0
II-1	索非布韦 (II-3)	8.7	-9.2	相加	U: U	100	31.56	6.23	0
II-1	索非布韦 (II-3)	59	-11	适度协同	U: U	99.9	24.62	9.66	0
II-1	I-1	115	-10	强协同	U: C	99.8	5.43	6.14	0
II-1	I-1	66	-12	适度协同	U: C	99.7	3.78	13.37	0.01
索非布韦 (II-3)	I-1	59	-15	适度协同	U: C	99.9	9.2	11.08	0.01
索非布韦 (II-3)	I-1	815	-1.6	强协同	U: C	99.5	-2.12	9.49	0
索非布韦 (II-3)	I-1	238	-32	强协同	U: C	99.8	-4.15	11.93	0.03
II-1	I-1	309	-5.2	强协同	U: C	99.3	-9.15	15.72	0.01
II-1	I-1	143	-25	强协同	U: C	99.7	10.79	8.02	0
II-1	I-3	148	-8.3	强协同	U: C	99.5	-2.07	12.35	0.03

[0479] 如上所示,式I胞苷核苷类似物与式II尿苷核苷类似物组合产生了抑制HCV聚合酶的协同作用。

[0480] 在上述描述所公开的,以其具体形式或以用于执行所公开功能的手段,或获得所公开的效果的方法或工艺的方面所表示的特征可以,视情况而定地,单独地或以这些特征的任意组合的方式,以其各种形式被用于实现本发明。

[0481] 为了清楚和理解的目的,已经通过图示和实施例的方式详细地描述了前述发明。对于本领域的技术人员显而易见的是,可以在所附权利要求的范围内进行改变和修改。因此,应当理解,以上描述意在说明而非限制。因此,本发明的范围不应参考以上描述来确定,而应参考所附的权利要求书以及该权利要求书所享有的等同形式的全部范围来确定。

[0482] 出于所有目的,将本申请中引述的全部专利、专利申请和出版物通过参考整体引入本文,以就好像与每篇单独专利、专利申请或出版物各自表示的相同程度。