(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106061982 A
(43)申请公布日 2016.10.26

(21)申请号 201480074587.9

(22)申请日 2014.12.05

(30)优先权数据
61/912,407 2013.12.05 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2016.07.29

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2014/068932 2014.12.05

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2015/085256 EN 2015.06.11

(71)申请人 奇默里克斯公司
地址 美国北卡罗来纳州

(72)发明人 罗伊·韦尔 亚伦·唐尼
欧内斯特·拉尼尔
菲罗泽·塞斯纳 迪恩·塞列斯泽

(74)专利代理机构 北京聿宏知识产权代理有限公司 11372
代理人 吴大建

(51)Int.Cl.
C07F 9/32(2006.01)

权利要求书8页 说明书57页

(54)发明名称

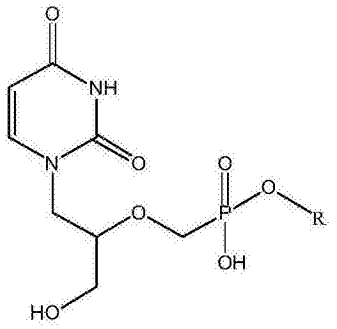
支链无环核苷膦酸酯及其合成方法与应用

(57)摘要

本发明涉及支链核苷膦酸酯化合物及其合成方法。本发明还涉及包含支链核苷膦酸酯化合物的药物组合物和治疗和/或预防双链DNA病毒感染和/或与病毒感染有关的疾病或病症的方法。

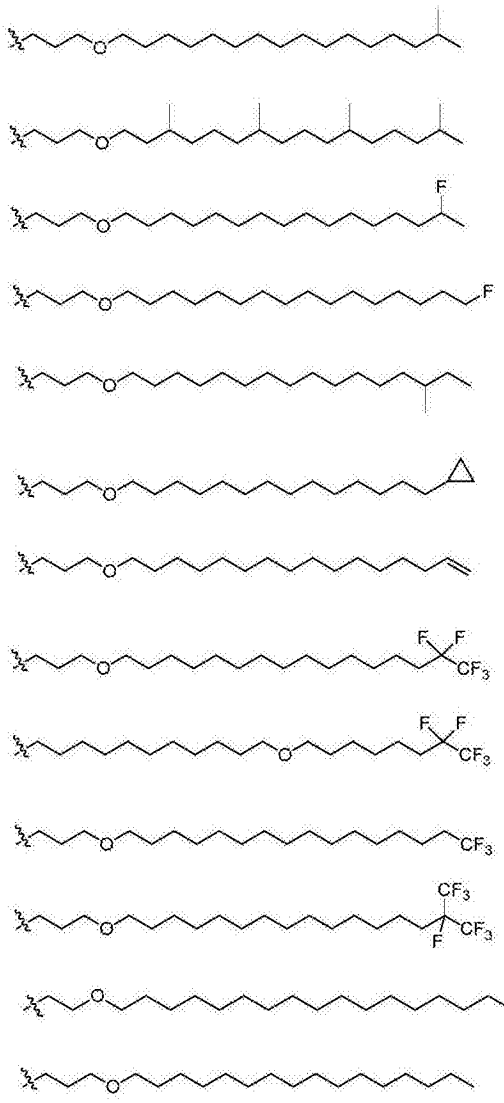
CN 106061982 A

1.一种由如下式(I)所示的化合物：

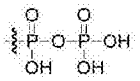


式(I)

其中,R为

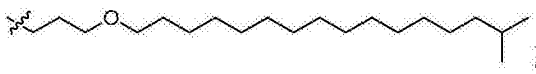


或

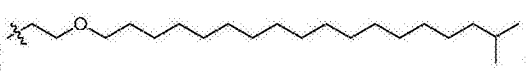


。

2.根据权利要求1所述的化合物,其特征在于,R为：

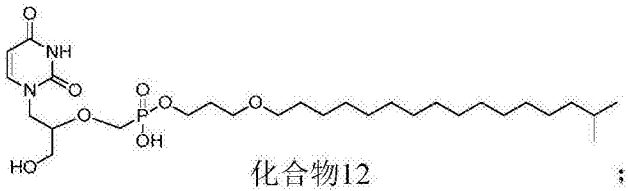


或

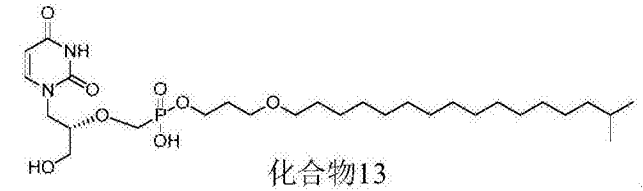


。

3.一种化合物或其药学上可接受的盐,所述化合物选自由

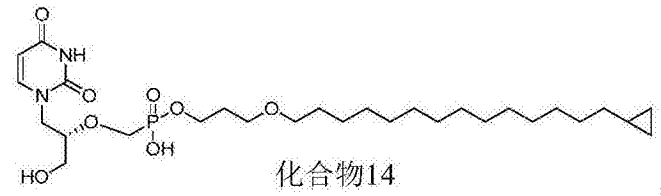


化合物12 ;



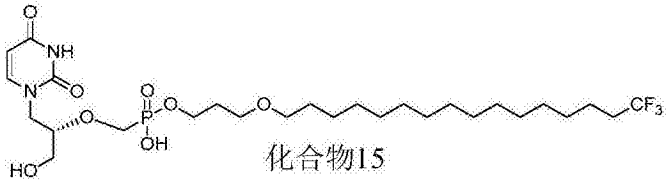
化合物13

;



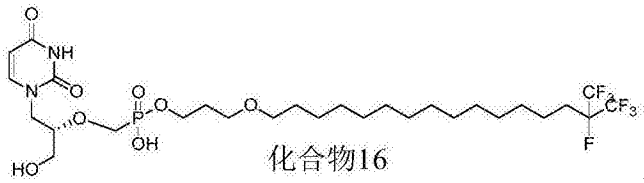
化合物14

;



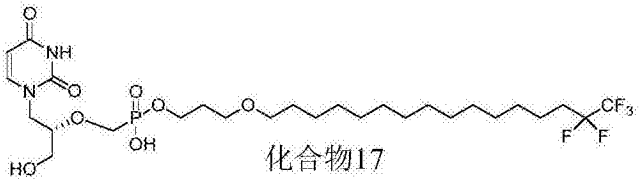
化合物15

;



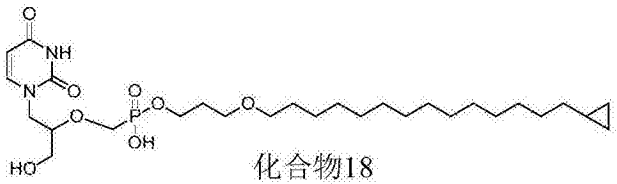
化合物16

;



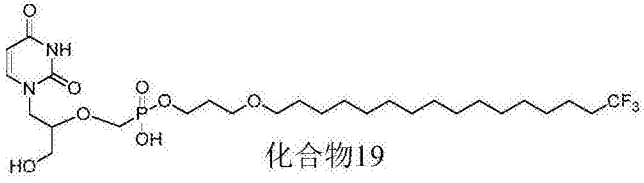
化合物17

;



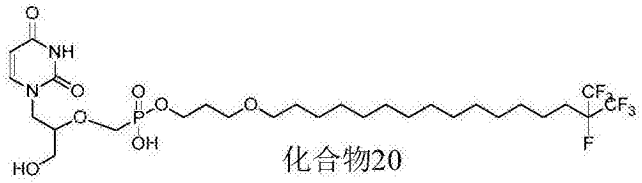
化合物18

;

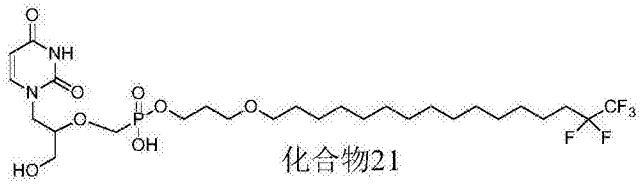


化合物19

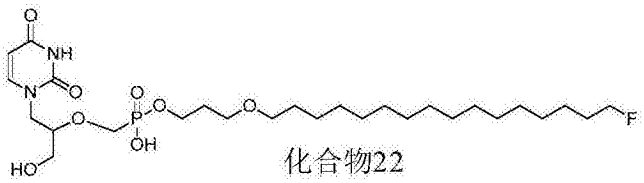
;



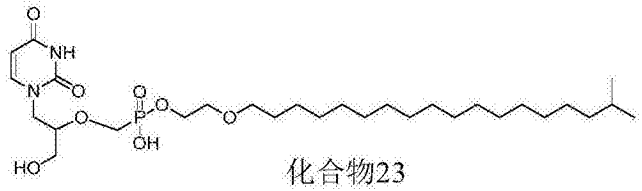
化合物20 ;



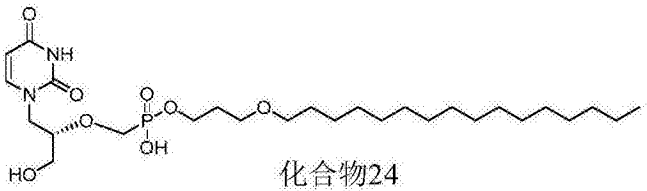
化合物21 ;



化合物22 ;



化合物23 ;



化合物24 ;

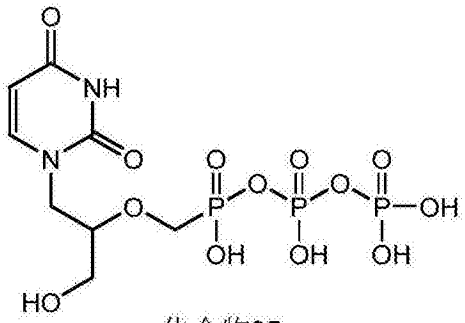


化合物25 ;



化合物26

；



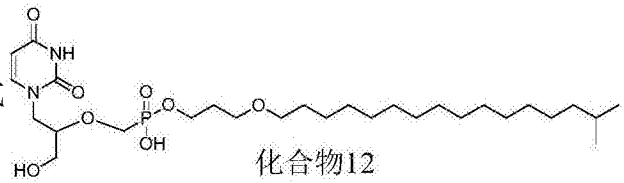
化合物27

；或



化合物28

组成的组。

4.一种合成式的化合物的方法，其中，所

化合物12

述方法包括如下步骤：

(i)向1-溴-3甲基丁烷的2-甲基四氢呋喃(Me-THF)溶液中加入镁，随后加热，然后冷却该混合物；

(ii)向步骤(i)的反应混合物中加入12-溴-1-十二烷醇的Me-THF溶液，此后立即加入四氯合铜酸二锂的四氢呋喃(THF)溶液；

(iii)用乙酸乙酯反萃取反应混合物中的水相；

(iv)用盐水洗涤有机溶液并经$MgSO_4$干燥、过滤，然后在真空中浓缩以产生化合物3；

(v)向化合物3和N,N-二异丙基乙胺(DIPEA)的二氯甲烷的冷溶液中加入甲磺酰氯，同时保持温度在约5℃以下；

(vi)使反应温热至室温并搅拌几小时；

(vii)向反应混合物中加入甲磺酰氯和DIPEA并搅拌几小时；

(viii)冷却反应混合物的同时加入水，然后从水层中分离二氯甲烷(DCM)层，经干燥剂干燥，并过滤DCM层以除去干燥剂；

(ix)在真空下浓缩DCM溶液以得到黄色油状物；向黄色油状物的浓缩物中加入甲醇；

(x)将沉淀的固体过滤并干燥，以产生化合物4；

(xi)向1,3-丙二醇的N-甲基-2-吡咯烷酮(NMP)的冷溶液中加入氢化钠(NaH)，温热该混合物；

(xii)将化合物4加入到步骤(xi)的溶液中，搅拌几小时；

(xiii)向该溶液中加入水和乙酸乙酯，分离有机层；

(xiv)在真空中浓缩有机层，加入甲醇，然后干燥；

(xv)加入乙腈，重复步骤(xiv)，在过滤和干燥后，形成化合物5；

(xvi)向化合物6的乙腈溶液中加入三甲基溴硅烷(TMS-Br)；

(xvii)除去乙腈和TMS-Br后加入二氯甲烷，然后浓缩；

(xviii)加入草酰氯和二甲基甲酰胺(DMF)，在真空中浓缩形成化合物7；

(xix)在二氯甲烷中混合化合物5和化合物7，并向化合物7和化合物5的溶液中加入吡啶；

(xx)向步骤(xix)中的混合物中加入水后分离有机层；

(xxi)向步骤(xx)中的有机层中加入水和甲醇后再次分离有机层；

(xxii)在真空中干燥步骤(xxi)的有机层，并加入丙酮；

(xxiii)干燥和在进一步干燥前加入丙酮，调节pH至约9.0；

(xxiv)过滤步骤(xxiii)中形成的固体后加入丙酮；

(xxv)过滤并干燥步骤(xxiv)的固体产物，以产生化合物8；

(xxvi)在DMF中混合化合物8、化合物9、二-叔丁醇镁；

(xxvii)向混合物中加入异丙醇和盐酸(HCl)，然后分离有机层；

(xxviii)浓缩有机层，并向混合物中加入甲醇；

(xxix)浓缩步骤(xxviii)的混合物，以产生化合物10；

(xxx)向化合物10中加入甲醇，并过滤取代基产物；

(xxxi)用水稀释步骤(xxx)中的滤液，调节pH至约2-3，并过滤以产生化合物11；

(xxxii)向化合物11中加入水，并用HCl调节pH至约1-2；

(xxxiii)用乙酸乙酯萃取步骤(xxxii)的水溶液；

(xxxiv)干燥步骤(xxxiv)的乙酸乙酯萃取物，过滤并浓缩以产生稠油；和

(xxxv)用丙酮磨碎所述稠油，将该溶液冷却，过滤并干燥，以得到作为白色固体的化合物12。

5.一种权利要求1所述的化合物或其药学上可接受的盐的药物制剂，其包含载体。

6.根据权利要求5所述的药物制剂，其特征在于，包含约40-1000mg的式(I)的化合物。

7.根据权利要求6所述的药物制剂，其特征在于，包含约40-400mg的式(I)的化合物。

8.根据权利要求7所述的药物制剂，其特征在于，包含约100mg的式(I)的化合物。

9.一种治疗病毒感染和/或与病毒感染有关的疾病或病症的方法，其包括向有需要的

受试者施用治疗有效量的权利要求1的化合物或其药物上可接受的盐。

10.一种治疗病毒感染和/或与病毒感染有关的疾病或病症的方法，其包括向有需要的受试者施用治疗有效量的权利要求5的药物制剂。

11.根据权利要求9所述的方法，其特征在于，权利要求1的化合物的施用量在约40-1000mg的范围内。

12.根据权利要求10所述的方法，其特征在于，所述药物制剂包括约40-1000mg的量的权利要求1的化合物。

13.根据权利要求9所述的方法，其特征在于，权利要求1的化合物以约40-400mg的量施用。

14.根据权利要求9所述的方法，其特征在于，权利要求1的化合物以约100mg的量施用。

15.一种在感染了BK病毒的受试者中延缓发病、降低风险、或治疗终末器官损害或损伤的方法，所述方法包括向受试者口服施用药物组合物，所述药物组合物包括治疗有效剂量的选自权利要求1的化合物中的任意一种化合物或其药学上可接受的盐。

16.根据权利要求15所述的方法，其特征在于，所述受试者为造血干细胞移植(HSCT)后的受试者。

17.根据权利要求15所述的方法，其特征在于，所述终末器官选自肾、输尿管、膀胱、前列腺和尿道。

18.根据权利要求9所述的方法，其特征在于，用约40-1000mg的所述化合物每天、每周一次(QW)或每周两次(BIW)治疗所述受试者被。

19.一种在有BK病毒感染再激活危险的受试者中降低血尿或肾损害发生率的方法，该方法包括向受试者口服施用包含治疗有效剂量的选自权利要求1的化合物中的任意一种化合物或其药学上可接受的盐的药物组合物。

20.根据权利要求19所述的方法，其特征在于，所述受试者是HSCT后受试者。

21.根据权利要求19所述的方法，其特征在于，所述药物组合物进一步减少所述受试者中的BK病毒感染再激活。

22.根据权利要求21所述的方法，其特征在于，所述药物组合物降低所述受试者中的BK病毒载量。

23.根据权利要求22所述的方法，其特征在于，所述药物组合物延缓终末器官损害或损伤的发病或减少终末器官损害或损伤的危险，其中，所述终末器官选自肾、输尿管、膀胱、前列腺和尿道。

24.根据权利要求22所述的方法，其特征在于，所述受试者每天、一周一次(QW)或两周一次(BIW)被施用约40-1000mg的所述化合物。

25.根据权利要求22所述的方法，其特征在于，在HSCT后之后的第1天、第2天或第4天向所述受试者施用1.25mg/kg、2.5mg/kg、5.0mg/kg、10.0mg/kg或20.0mg/kg。

26.一种治疗、预防或延缓丙型肝炎病毒(HCV)感染或与HCV感染有关的疾病或病症发病的方法，所述方法包括向受试者口服施用包含治疗有效剂量的选自权利要求1的化合物中的任意一种化合物或其药学上可接受的盐的药物组合物。

27.根据权利要求26所述的方法，其特征在于，每天、一周一次(QW)或两周一次(BIW)用约40-1000mg的所述化合物治疗所述受试者。

28.根据权利要求27所述的方法，其特征在于，每天或一周两次(BIW)用约40-1000mg的所述化合物治疗所述受试者。

29.一种预防性治疗、预防或延缓丙型肝炎病毒(HCV)感染或与HCV感染有关的疾病或病症发病的方法，所述方法包括向受试者口服施用包含治疗有效剂量的选自权利要求1的化合物中的任意一种化合物或其药学上可接受的盐的药物组合物。

30.根据权利要求29所述的方法，其特征在于，每天、一周一次(QW)或两周一次(BIW)用约40-1000mg的所述化合物治疗所述受试者。

31.根据权利要求30所述的方法，其特征在于，每天或一周一次(BIW)用约40-1000mg的所述化合物治疗所述受试者。

32.一种治疗、预防或延缓丙型肝炎病毒(HCV)感染或与HCV感染有关的疾病或病症发病的方法，所述方法包括向受试者口服施用包含治疗有效剂量的选自权利要求1的化合物中的任意一种化合物或其药学上可接受的盐的药物组合物，以及选自免疫抑制剂和抗病毒剂的一种或多种化合物或组合物。

33.根据权利要求32所述的方法，其特征在于，所述药物组合物与选自于由咪达唑仑、环孢霉素A、他克莫司、唑类、更昔洛韦、缬更昔洛韦、膦甲酸钠、西多福韦、二线抗HCV药物、膦甲酸、静脉(IV)注射用西多福韦、非格司亭、聚乙二醇非格司亭、皮质类固醇如布地奈德、倍氯米松和广谱CYP抑制剂氨基苯并三唑构成的组中的一种或多种化合物或组合物结合施用。

34.根据权利要求9、10、15、26、30和32中任意一项所述的方法，其特征在于，所述受试者为免疫功能低下的受试者。

35.根据权利要求34所述的方法，其特征在于，所述免疫功能低下的受试者是免疫抑制药物的移植病人。

36.根据权利要求34所述的方法，其特征在于，所述免疫功能低下的受试者感染了HIV。

37.根据权利要求34所述的方法，其特征在于，所述的化合物与至少一种其它的免疫抑制剂结合施用。

38.根据权利要求37所述的方法，其特征在于，所述免疫抑制剂同时或顺序被施用。

39.根据权利要求37所述的方法，其特征在于，所述免疫抑制剂选自于由达利珠单抗、巴利昔单抗、他克莫司、西罗莫司、霉酚酸酯、环孢霉素A、糖皮质激素、抗CD3单克隆抗体、抗胸腺细胞球蛋白、抗CD52单克隆抗体、硫唑嘌呤、依维莫司、更生霉素、环磷酰胺、铂、亚硝基脲、甲氨蝶呤、巯嘌呤、莫罗单抗、干扰素γ、英夫利昔单抗、依那西普、阿达木单抗、那他珠单抗、芬戈莫德及其组合构成的组。

40.根据权利要求5所述的药物制剂，其特征在于，所述制剂适用于口服施用。

41.一种治疗病毒感染和/或与病毒感染有关的疾病或病症的方法，其包括向有需要的受试者施用治疗有效量的权利要求40的药物制剂。

支链无环核苷膦酸酯及其合成方法与应用

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求享有2013年12月5日提交的第61/912,407号美国临时专利申请的优先权和利益,其全部内容通过整体引用并入本文中。

技术领域

[0003] 本申请涉及支链无环核苷膦酸酯化合物、其类似物、其药物组合物及其合成方法。本发明还涉及用所述支链无环核甘膦酸酯化合物、其衍生物及其药物组合物治疗病毒感染的方法。

背景技术

[0004] 病毒感染能对个人和整个社会产生不良影响。除了致命病毒感染如埃博拉,甚至非致命感染也可能产生严重的经济后果。例如,1999年,在美国仅仅流感感染的直接医疗费用就占了10-30亿美元,更不用说100-150亿美元的间接费用。见Szucs,J.Antimicrob.Chemother.(1999年),Topic B,11-15。另外的病毒如人类巨细胞病毒(HCMV)、BK病毒(BKV)、爱泼斯坦-巴尔病毒(EBV)、腺病毒、JC病毒(JCV)、SV40、MC病毒(MCV)、KI病毒(KIV)、WU病毒(WUV)、牛痘、单纯疱疹病毒1型(HSV-1)、单纯疱疹病毒2型(HSV-2)、人类疱疹病毒6型(HHV-6)、人类疱疹病毒8(HHV-8)、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、水痘带状疱疹病毒(VZV)、典型天花、类天花、天花、牛痘、骆驼痘、猴痘、脊髓灰质炎病毒、埃博拉病毒、马尔堡病毒、肠道病毒、乳头状瘤病毒以及人类免疫缺陷病毒(HIV)可以各自产生显著的社会和经济的影响。

[0005] 因此,有效对抗这些病毒的有效抗病毒治疗的发展对提高感染个体如移植患者的健康状况是重要的,并且作为一种公共卫生措施来预防其它致病性病毒的发作。

[0006] 核苷膦酸酯(例如,核糖核苷酸衍生物)代表依赖于使用核糖核苷酸为底物病毒编码的霉来抑制病毒的一种优异的靶标类抗病毒药物,如对许多RNA病毒的某些病毒聚合酶和/或对RNA或DNA病毒的病毒解旋酶。但是,这类抗病毒药物疗效的一个障碍是需要在靶细胞内口服制剂的生物改性,以形成活性抗病毒药物。如果一个核苷被输送,需要三个磷酸化步骤来形成三磷酸盐。核苷膦酸酯的输送有效地绕过第一个磷酸化,但是加剧了穿过脂质双分子层周围的细胞输送临床上有用量的带电药物的问题。

[0007] 脂质结合可以用来伪装口服药物(包括核苷膦酸酯)作为一种容易被人体吸收的天然化合物。具体地,核苷膦酸酯能够被改性成类似部分代谢(单酰基)的磷脂质。与正常的二酰基磷脂相反,单酰基脂质改性的核苷可以容易地穿透肠衬肠道的内腔,进入循环血液和/或淋巴,不像标准药物,保持完整。因此,脂质部分确实不仅仅向血浆提供核苷;它促进高效吸收到靶细胞。脂质是在靶细胞的细胞质隔室并在核苷类似物偶合物的情况下裂解,得到相应的单磷酸盐。总体而言,这种策略可导致在病毒复制的部位的活性抗病毒药物水平的大大增加。

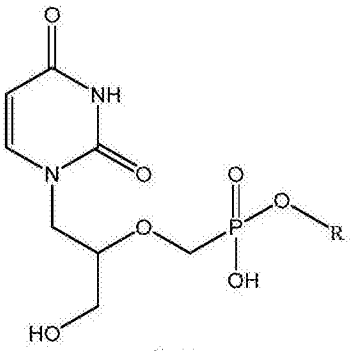
[0008] 本发明满足了对通过使用新的抗病毒药物和输送载体可用于治疗和/或预防引起

疾病的病毒的新疗法的需求。

[0009] 本发明部分提供了用作抗病毒药物的支链核苷膦酸酯及其合成方法。本发明公开还提供了使用一种或多种实施例的化合物来治疗和/或预防病毒感染和或与病毒感染有关的疾病或病症的方法。

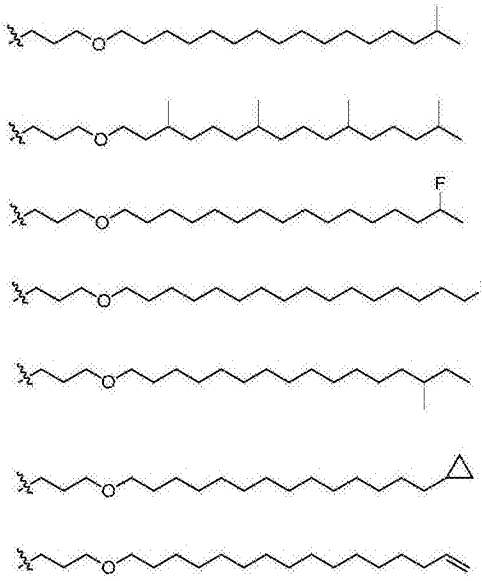
发明内容

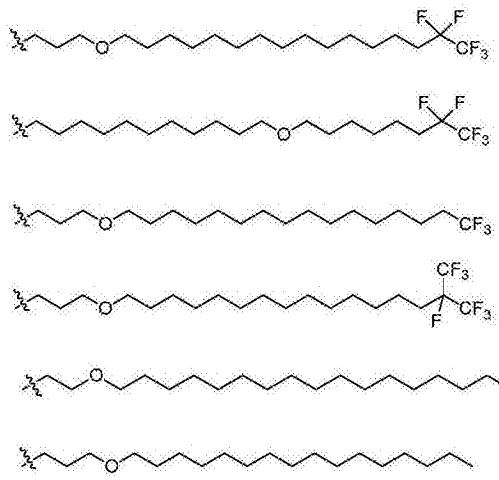
[0010] 本发明涉及式(I)的化合物

[0011] 

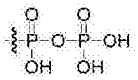
式(I)

[0012] 和其药学上可接受的对映体、非对映体、外消旋体、混合物或盐，其中R为：



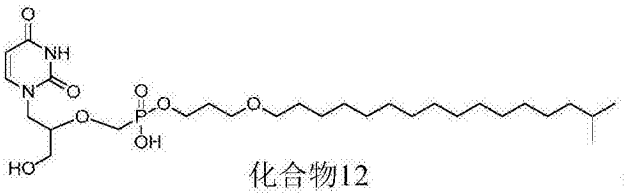
[0013] 

或

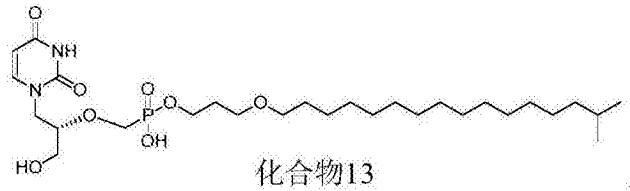


。

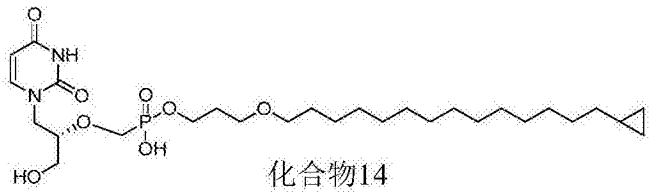
[0014] 本发明还涉及下列化合物：

[0015] 

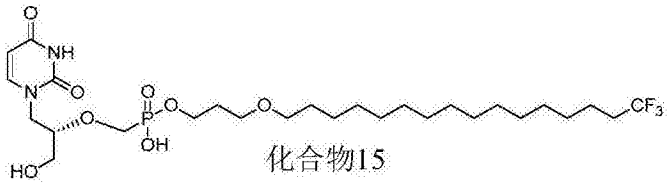
化合物12 ；



化合物13 ;

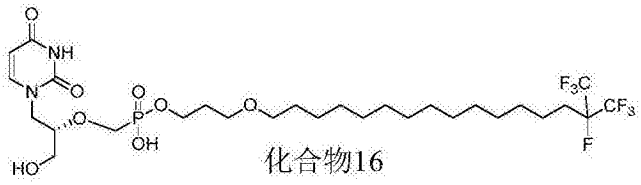


化合物14 ;

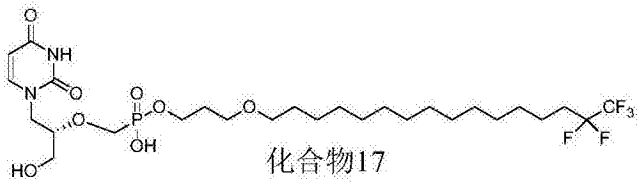


化合物15 ;

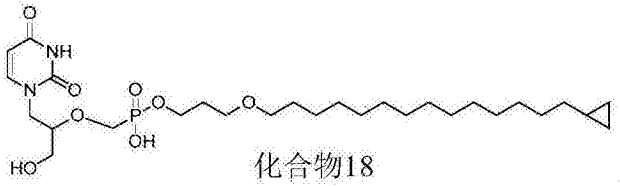
[0016]



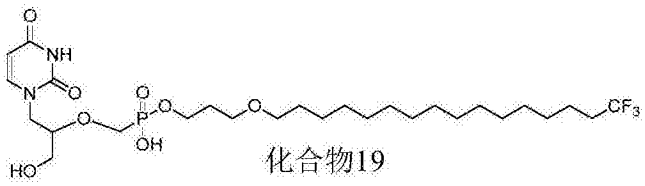
化合物16 ;



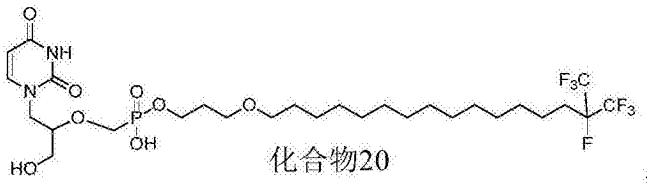
化合物17 ;



化合物18 ;

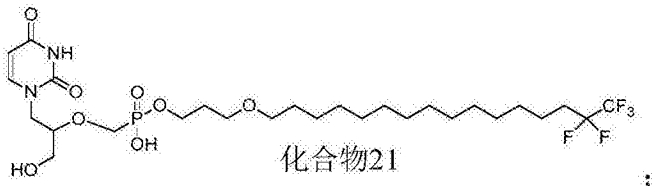


化合物19 ;



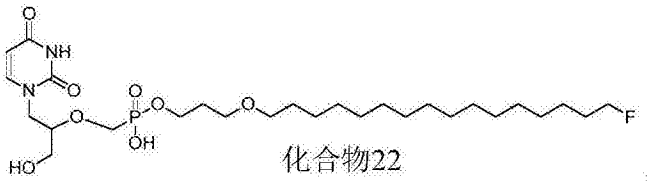
化合物20

;



化合物21

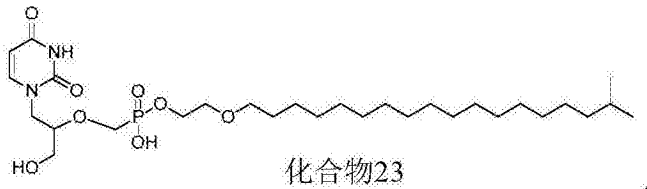
;



化合物22

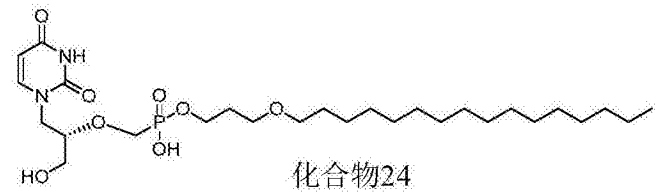
;

[0017]

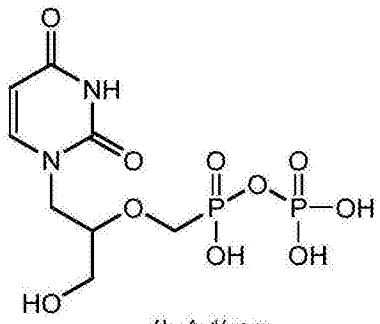


化合物23

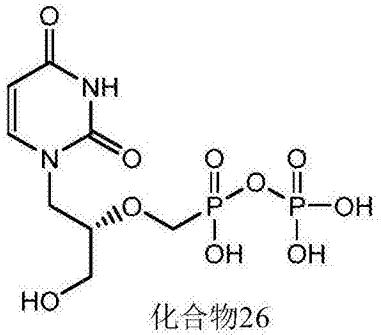
;



化合物24

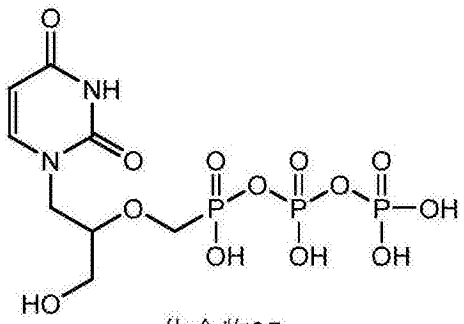


化合物25

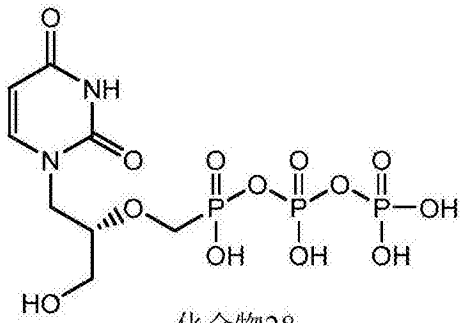


化合物26

[0018]



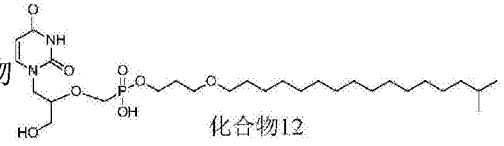
化合物27



化合物28

[0019] 和其药学上可接受的盐。

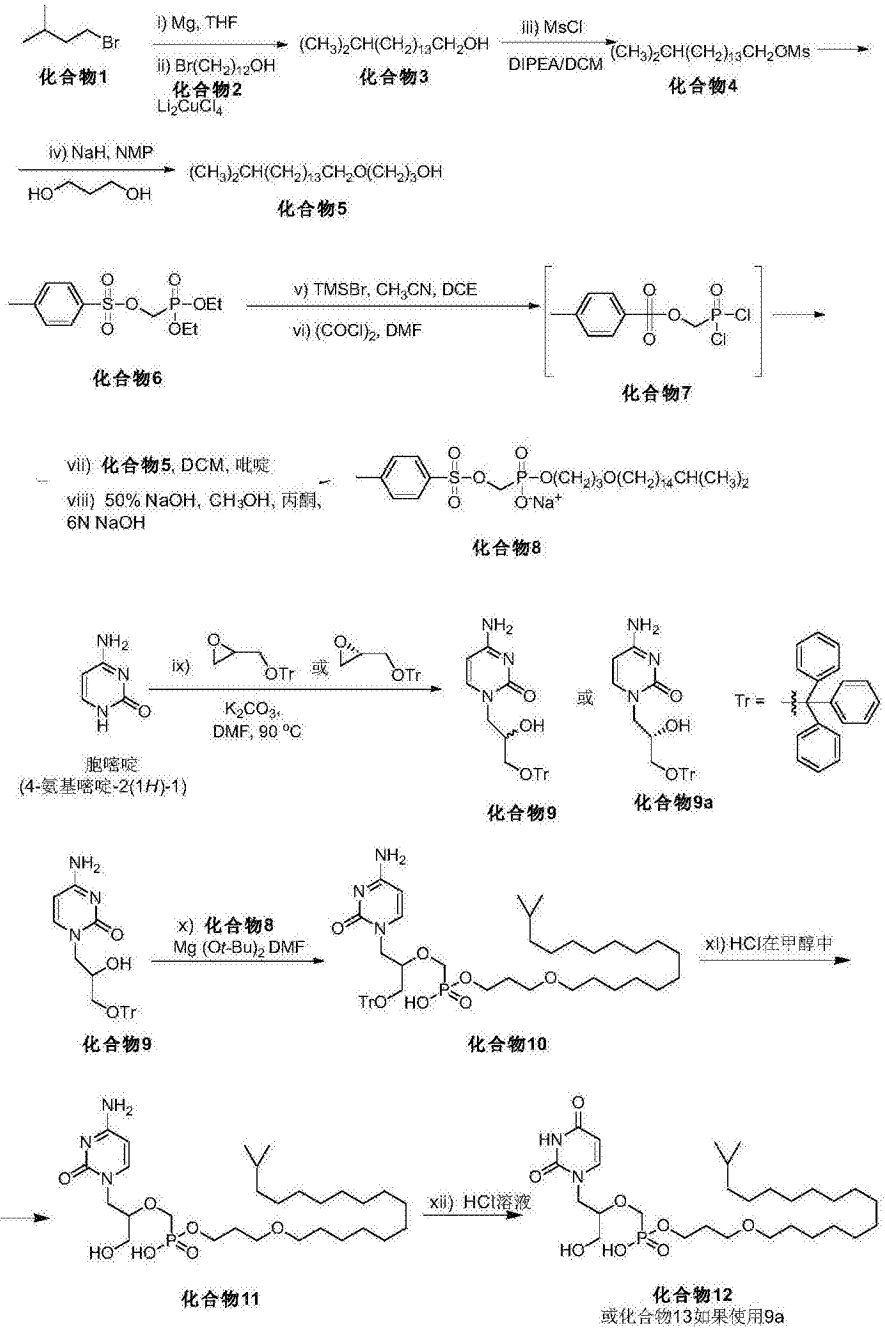
[0020] 本发明的一个实施例涉及式(I)的典型化合物



化合物12

的合成方法,如下方案A所示。

[0021] 方案A:



[0022]

[0023] 例如,所述方法包括如下步骤:

[0024] (i)向1-溴-3-甲基丁烷的2-甲基四氢呋喃(Me-THF)溶液中加入镁屑;

[0025] (ii)向反应混合物中加入12-溴-1-十二烷醇的Me-THF溶液,随后加入四氯合铜酸二锂的四氢呋喃(THF)溶液,以合成化合物3;

[0026] (iii)向化合物3和N,N-二异丙基乙胺(DIPEA)的二氯甲烷的冷溶液中加入甲磺酰氯,同时保持温度低于约5℃,以提供化合物4;

[0027] (iv)向1,3-丙二醇的N-甲基-2-吡咯烷酮(NMP)的冷溶液中加入氢化钠(NaH),随后加入化合物4,以合成化合物5;

[0028] (v)向化合物6(购自Lacamas实验室)的乙腈溶液中加入三甲基溴硅烷(TMS-Br);

[0029] (vi)除去乙腈和TMS-Br后,加入乙二酰氯和二甲基甲酰胺(DMF),以形成化合物7;

[0030] (vii)向化合物7和化合物5的二氯甲烷溶液中加入吡啶;

[0031] (viii)调节分离的中间体的pH至约9.0,以产生化合物8;

[0032] (ix)向在无水N,N-二甲基甲酰胺中的胞嘧啶和(S-)三苯甲基缩水甘油醚的混合物中加入碳酸钾,并加热到约90℃,以提供化合物9(以外消旋或对映体纯形式);

[0033] (x)向DMF中的化合物8和化合物9的混合物中加入叔丁醇镁,以产生化合物10;

[0034] (xi)用HCl(甲醇或有机溶剂的替代品)处理化合物10,以产生化合物11;

[0035] (xii)向化合物11中加入水,并加热到约90-120℃,以提供化合物12。

[0036] 本发明还涉及一种用在治疗或预防病毒感染或与病毒感染有关的疾病或病症,例如,双链DNA(dsDNA)病毒感染的方法中的本发明的化合物的药物制剂。

[0037] 本发明还涉及本发明的药物制剂在用于治疗或预防病毒感染和/或与病毒感染有关的疾病或病症(例如,dsDNA病毒感染)的药物的制备中的应用。

[0038] 本发明还涉及用于治疗或预防病毒感染和/或与病毒感染有关的疾病或病症(例如,dsDNA病毒感染)的方法。

[0039] 除非另有说明,本文所用的所有的科技术语与本发明所属领域的普通技术人员的常规理解的含义相同。在冲突的情况下,依照本发明的说明书,包括定义。在说明书中,单数形式也包括复数,除非上下文另有明确说明。尽管本文中描述的那些类似或相当于本发明的方法或材料可以在本发明的实践或测试中使用,但是适合的方法和材料在下文中被描述。本文所提及的所有出版物、专利申请、专利和其它参考文献通过引用并入本文。此处引用的参考文献不允许为请求保护的发明的现有技术。此外,材料、方法和实施例仅起说明性作用,并非旨在限制。

[0040] 下面的详细说明和权利要求书将会清晰地显示本发明其它的特征和优点。

具体实施方式

[0041] 本发明提供了化合物、药物组合物以及合成方法以及使用化合物来治疗或预防病毒感染或与病毒感染有关的疾病或病症(例如,dsDNA病毒感染)的方法。

[0042] 与本领域中类似使用的化合物相比,本发明的化合物具有改进的疗效/毒性比。

[0043] 定义

[0044] 为了本发明的目的,下列定义将被使用(除非另有说明):

[0045] 术语“本发明的化合物(单数)”或“本发明的化合物(复数)”是指本文公开的化合物,例如,本发明的化合物包括本文中公开的式(I)所示的化合物中的任意化合物。每当该术语在本发明的上下文中使用时,应当理解可以参照游离碱和其药学上可接受的盐,如果在这些情况下,这样是可能的和/或适当的。应该理解本文描述的化合物12-24是式(I)的化合物的子集。

[0046] 本文所使用的术语“烷基”指饱和的、直链或支链的烃基,在某些实施例中,分别包括一个到六个或一个到八个之间的碳原子。支链指连接到直链烷基链上的一个或多个低级C_1-C_6烷基,例如甲基、乙基或丙基。典型的烷基包括甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、叔丁基、正戊基和3-戊基。C_1-C_6的烷基的例子包括但不限于甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、叔丁基、新戊基、正己基;C_1-C_8的烷基的例子包括但不限于甲基、乙基、丙基、异丙基、正丁基、叔丁基、新戊基、正己基、庚基、辛基。

[0047] 本文所使用的术语“烯基”表示从含烃部分衍生的具有至少一个碳碳双键的一价

基团，在某些实施例中，含有从两个到六个或两个到八个碳原子。双键可能是或不是另一个基团的连接点。C_2-C_8烯基的例子包括但不限于，例如，乙烯基、丙烯基、丁烯基、1-甲基-2-丁烯-1-基，庚烯基、辛烯基等。

[0048] 术语“烷氧基”指-O-烷基。

[0049] 本文所使用的术语“芳基”指具有一个或多个芳环的、稠合或非稠合的单环或多环的碳环系统，包括但不限于，苯基、萘基、四氢萘基、茚满基、茚基等。术语芳基包括二氢吲哚。

[0050] 本文所使用的术语“环烷基”表示由单环或多环的饱和或部分不饱和的碳环化合物衍生的一价基团。C_3-C_8的环烷基(3至8元环烷基)的例子包括但不限于，环丙基、环丁基、环戊基、环己基、环戊基和环辛基；C_3-C_{12}的环烷基的例子包括但不限于，环丙基、环丁基、环戊基、环己基、二环[2.2.1]庚基和双环[2.2.2]辛基。所涉及的也可以是从具有至少一个碳碳双键的单环或多环的碳环化合物通过去除一个氢原子的衍生的一价基团。这些基团的例子包括但不限于，环丙烯基、环丁烯基、环戊烯基、环己烯基、环庚烯基、环辛烯基等。

[0051] 本文所使用的术语“杂芳基”指具有至少一个芳环的、单环或多环的(例如，双环或三环或多环的)稠合或非稠合的基团或环系统，所述芳环具有5-10个环原子，且其中一个环原子选自S、O和N，零个、一个或两个环原子是独立选自S、O和N的其他杂原子。

[0052] 术语“5或6元杂芳基”指具有五个或六个环原子且其中一个环原子选自S，O和N的环。杂芳基包括但不限于，吡啶基、吡嗪基、嘧啶基、吡咯基、吡唑基、咪唑基、噻唑基、恶唑基、异恶唑基、噻二唑基、恶二唑基、噻吩基、呋喃基、喹啉基、异喹啉基、苯并咪唑基、二苯并恶唑基、喹喔啉基等。

[0053] 本文所使用的术语“3-8元杂环”指非芳族的3、4、、5、、6、7或8元环或稠合的双环或三环的非稠合系统，其中(i)各环包含独立地选自O、S和N的一个至三个杂原子；(ii)每个5元环都有0-1个双键和每个6元环有0-2个双键；(iii)所述N和S杂原子可任选地被氧化；(iv)所述N原子可任选被季铵化，以及(iv)任何上述环可与苯环稠合。典型的杂环基团包括但不限于，[1,3]二氧戊环、吡咯烷基、吡唑啉基、吡唑烷基、咪唑啉基、咪唑烷基、哌啶基、哌嗪基、恶唑烷基、异恶唑烷基、吗啉基、噻唑啉基、异噻唑啉基和四氢呋喃基。

[0054] 根据本发明，本文中描述的任意芳基、取代的芳基、杂芳基和取代的杂芳基可以是任意芳族基团。芳族基团可以是取代的或未取代的。

[0055] 本文中使用的术语“卤”和“卤素”指选自氟、氯、溴和碘的原子。

[0056] 取代或未取代的：如本文所述，本发明的化合物可任选地被一个或多个取代基取代，例如通常由上文说明的，或由本发明特定的类别、亚类和的种类例证的。应当理解的是，短语“任选取代的”可交换地使用短语“取代的或未取代的”。一般而言，术语“取代的”，无论前面有无术语“任选地”，都表示在带有特定取代基的基团的给定结构中的氢基取代。除非另有说明，任选取代的基团可以在该基团的每个可取代的位置具有取代基，并且当任意给定结构中一个以上位置可以被选自特定基团中的一个以上的取代基所取代，每个位置的取代基可以是相同的或不同的。

[0057] 当本文术语“药物的”或“药学上可接受的”作为形容词使用时指对于接受者是基本无毒和基本无害的。本文中所使用的短语“药学上可接受的”指在合理的医学判断范围内适用于与人类和动物的组织接触而没有过度的毒性、刺激、过敏反应或其他问题或并发症，

与合理的利益/风险比相当的那些化合物、材料、组合物、载体和/或剂型。

[0058] “药物制剂”还指载体、溶剂、赋形剂和盐必须与制剂的活性组分(例如本发明的化合物)相容。本领域普通技术人员可以理解术语“药物制剂”和“药物组合物”通常是可互换的,它们因此用于本申请的目的,并且包括适用于施用给哺乳动物,例如人类的制剂。

[0059] 本文所使用的“药物组合物”涉及包含以适用于施用给受试者的形式的本发明的化合物的制剂。在一个实施例中,药物组合物是散装的或单位剂型的。所述单位剂型是任何各种形式,包括,例如胶囊、IV包、片剂、气溶胶吸入器或小瓶的单个泵。在单位剂量的化合物中的活性成分(例如,制剂公开的化合物或盐、水合物、溶剂化物或其异构体)的量是有效量并且根据所涉及的特定治疗而变化。本领域的一个技术人员将理解,有时需要根据患者的年龄和状况对剂量做常规的改变。剂量也取决于施用途径。有多种途径可以考虑,包括口服、肺部、直肠、肠胃外、透皮、皮下、静脉内、肌肉、腹膜内、吸入、口腔、舌下、胸膜内、鞘内、鼻内等。对于本发明的化合物的局部或经皮施用剂型包括粉剂、喷雾剂、软膏、糊剂、霜剂、洗剂、凝胶、溶液、贴剂和吸入剂。在一个实施例中,活性化合物与药学上可接受的载体在无菌条件下混合,并用所需的任何防腐剂、缓冲剂或推进剂混合。

[0060] 本文中所使用的“药学上可接受的载体”可以包括任何的和所有的溶剂、稀释剂或其它液体媒介物、分散或悬浮助剂、表面活性剂、等渗剂、增稠剂或乳化剂、防腐剂、固体粘合剂、润滑剂等,作为适用于所需的特定剂型。Remington's Pharmaceutical Sciences, Sixteenth Edition,E.W.Martin(Mack Publishing Co.,Easton,Pa.,1980)公开了用于配制药物组合物的各种载体和其已知的制备技术。除非在任何常规载体介质与化合物不相容的情况下,例如通过产生任何不期望的生物学效应或另外以有害方式与药物组合物的任何其它组分相互作用,它的使用涵盖在本发明的范围之内。可作为药学上可接受的载体的材料的例子包括但不限于,糖,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;粉状黄蓍胶;麦芽;明胶;滑石;赋形剂,例如可可脂和栓剂蜡;油,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,如丙二醇;酯,如油酸乙酯和月桂酸乙酯;琼脂;缓冲剂,如氢氧化镁和氢氧化铝;藻酸;无热原水;等渗盐水;林格氏溶液;乙醇和磷酸盐缓冲溶液,以及其他非毒性相容的润滑剂,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,调味剂和芳香剂,防腐剂和抗氧化剂也可以存在于组合物中,根据配方设计师的判断。“药学上可接受的赋形剂或载体”还涉及一种用于制备普遍安全的、无毒的并且没有生物学上或其它方面不期望的药物组合物的药学上可接受的赋形剂或载体,并包括可被兽医用途以及人类药物用途接受的赋形剂。如在说明书和权利要求书中使用的“药学上可接受的赋形剂”包括一种和一种以上这样的赋形剂。

[0061] 本发明的一些化合物可以以非溶剂化和溶剂化的形式存在,例如,水合物。

[0062] “溶剂化物”指一种包含化学计量的或非化学计量的量的溶剂的溶剂加成形式。一些化合物在结晶固体状态有一种形成固定摩尔比的溶剂分子的趋势,从而形成溶剂化物。如果溶剂是水,则形成的溶剂化物是水合物,当溶剂是醇时,形成的溶剂化物是醇化物。水合物通过将一个或多个在其中的水仍然保持其分子状态如H_2O的物质结合形成,这种结合能够形成一种或多种水合物。在水合物中,水分子通过分子间作用力的次价相接触,特别是氢键。固体水合物包含化学计量比的作为所谓的结晶水的水,其中水分子相对于它们的结

合状态不必是等效的。水合物的例子是倍半水合物、一水合物、二水合物或三水合物。本发明的化合物的盐的水合物是同样适合的。

[0063] 本发明还包括本文所述的化合物的代谢物。不管是固有的或药学的，来自化学化合物的代谢物作为降解和消除化合物的天然生化过程的一部分形成。化合物的降解速率是其作用的持续时间和强度的重要决定因素。分析药物组合物的代谢物、药物代谢是药物开发的重要组成部分，使得对任何不良副作用的理解。

[0064] 生理学上/药学上可接受的/相容的盐：生理学上可接受的，即药学上相容的，盐可以是本发明的具有无机酸或有机酸的化合物的盐。优选的是无机酸，如，例如，盐酸、氢溴酸、磷酸或硫酸的盐，或有机羧酸或磺酸，如，例如，乙酸、三氟乙酸、丙酸盐酸、马来酸、富马酸、苹果酸、柠檬酸、酒石酸、乳酸、苯甲酸、或甲磺酸、乙磺酸、苯磺酸、甲苯磺酸或萘二磺酸的盐。

[0065] 可提及的其它药学上相容的盐是常规的碱的盐，如，例如，碱金属盐(例如钠盐或钾盐)、碱土金属盐(例如钙盐或镁盐)或从盐氨或有机胺衍生，如，例如，二乙胺、三乙胺、乙基二异丙胺、普鲁卡因、二苄胺、N-甲基吗啉、二氢松香或甲基哌啶的铵盐。

[0066] 本文所使用的“药学上可接受的盐”指本发明的化合物的衍生物，其中，母体化合物通过制备其酸或碱盐来改性。药学上可接受的盐的例子包括但不限于，碱性残基如胺的矿物或有机酸盐，酸性残基如羧酸的碱金属盐或有机盐等。药学上可接受的盐包括常规的非毒性盐或母体化合物形成的季铵盐，例如，来自无毒无机酸或有机酸。例如，这些常规无毒盐包括但不限于那些从选自2-乙酰氧基苯甲酸、2-羟基乙磺酸、乙酸、抗坏血酸、苯磺酸、苯甲酸、重碳酸、碳酸、柠檬酸、乙二胺四乙酸、乙烷二磺酸、1,2-乙烷磺酸、富马酸、葡庚糖酸，葡糖酸、谷氨酸、乙醇酸、对氨基苯基乙醇酸、己基间苯二酸、异羟肟酸、氢溴酸、盐酸、氢碘酸、羟基马来酸、羟基萘、羟乙磺酸、乳酸、乳糖酸、月桂基磺酸、马来酸、苹果酸、扁桃酸、甲烷磺酸、辛酸、硝酸、草酸、扑酸、泛酸、苯乙酸、磷酸、聚半乳糖醛酸、丙酸、水杨酸、硬脂酸、亚乙酸、琥珀酸、氨基磺酸、对氨基苯磺酸、硫酸、鞣酸、酒石酸、甲苯磺酸和通常出现的胺酸，例如，甘氨酸、丙氨酸、苯丙氨酸、精氨酸等中衍生的无机酸和有机酸。

[0067] 药学上可接受的盐的其它例子包括己酸、环戊烷丙酸、丙酮酸、丙二酸、3-(4-羟基苯甲酰)苯甲酸、肉桂酸、4-氯苯磺酸、2-萘磺酸、4-甲苯磺酸、樟脑磺酸，4-甲基二环[2.2.2]-辛-2-烯-1-羧酸、3-苯基丙酸、三甲基乙酸、叔丁基乙酸、粘康酸等。本发明还包括当存在于母体化合物中的酸性质子或者被金属离子，例如碱金属离子或碱土金属离子，例如，铝离子，取代形成的盐；或与有机碱如乙醇胺、二乙醇胺、三乙醇胺、氨丁三醇、N-甲基葡糖胺、二乙胺、二乙基氨基乙醇、乙二胺、咪唑、赖氨酸、精氨酸、吗啉、2-羟乙基吗啉、二苄基乙二胺、三甲胺、哌啶、吡咯烷、苄胺、四甲基氢氧化胺等配合形成的盐。

[0068] 本文所使用的术语“治疗”是指在当前有这种情况的患者中以任何合适的程度减少症状、标志物，和/或任何副作用的情况。在一些实施例中，治疗可以被施用给那些仅仅展现出这种情况的早期征兆的受试者，目的是降低疾病、病症和/或状况发展的风险。

[0069] 本文所使用的术语“预防”指任何部分地或完全地预防或延缓疾病、病症和/或病情的一个或多个症状或特征的发作的方法。预防治疗可以被施用给那些没有显示出疾病、病症和/或病情的征兆的受试者。

[0070] 本文所使用的术语“治疗有效量”指治疗、改善、或预防所识别的疾病或病情，或显

示出可检测的治疗或抑制效果的药剂的量。这种效果可以通过本领域中公知的任何检测方法来检测。对受试者的精确有效量取决于受试者的体重、身高和健康状况；病情的实质和病情的程度；以及选择施用的治疗药物或治疗药物的组合。对于给定的情况，治疗有效量可通过常规实验确定，这种实验在临床医师的技能和判断范围内。

[0071] 本文所使用的“受试者”指人类或动物(在动物的情况下，更通常是哺乳动物)。在一个方面，受试者是人类。在一个方面，受试者是男人。在一个方面，受试者是女人。

[0072] 应当理解的是，所有对药学上可接受的盐的引用包括如本文所定义的相同的盐的溶剂加成形式(溶质)或晶体形式(多晶型物)。

[0073] 本发明的化合物也可以被制备成酯，例如，药学上可接受的酯。例如，化合物中的羧酸官能团可以转化成其相应的酯，例如，甲酯、乙酯或其它酯。此外，化合物中的羟基可以转化为其相应的酯，例如，乙酸酯、丙酸酯或其它酯。

[0074] 美国专利7749983，其全部内容通过整体引用并入本文中，涉及膦酸酯、核苷膦酸酯或核苷膦酸酯化合物，包括末端或倒数第二支链的、不饱和的和卤素取代的烷氧烷基膦酸酯化合物。在一些其他实施例中，式(I)的化合物可以包含在美国专利7749983中作为R基团公开的侧链。

[0075] 本发明包括通常由式(I)所示的新化合物，或其药学上可接受的盐，和其制备方法与应用。

[0076] 本发明的化合物也可以制备药物前体。在某些实施例中，本发明的一种或多种化合物被配制成药物前体。在某些实施例中，当在体内施用时，药物前体被化学转化为生物学上、药学上或治疗上更活跃的形式。在某些实施例中，药物前体是有用的，因为与其相应的活性形式相比，它们更容易施用。例如，在某些例子中，药物前体与其相应的活性形式相比可能生物利用度更高(例如，通过口服施用)。在某些实施例中，药物前体与其相应的活性形式相比可能具有改进的溶解性。在某些实施例中，药物前体比其相应的活性形式的水溶性更小。在某些实施例中，这些药物前体具有优异的跨细胞膜传送，在这些细胞膜中水溶性不利于流动。在某些实施例中，药物前体是酯。在某些这样的实施例中，酯在施用时代谢水解为羧酸。在某些实施例中，含羧酸的化合物是相应的活性形式。在某些实施例中，药物前体包括连接至酸基的短肽(聚氨基酸)。在某些这样的实施例中，肽在施用时裂解形成相应的活性形式。

[0077] 在某些实施例中，药物前体通过改性药学上的活性化合物产生，使得当在体内施用时会产生活性化合物。药物前体可以被设计为改变药物代谢稳定性或输运特性，掩盖副作用或毒性，改进药物的味道或改变药物的其他特性。凭借本领域技术人员公知的体内药效过程和药物代谢，一旦药学活性化合物是已知的，就可以设计出该化合物的药物前体(例如，参见Nogrady(1985)Medicinal Chemistry A Biochemical Approach,Oxford University Press,New York,pages 388-392)。

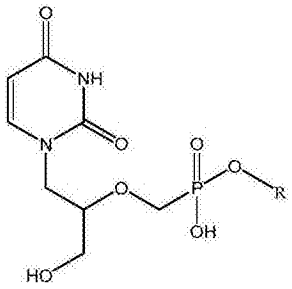
[0078] 化合物或其药学上可接受的盐、酯或衍生物通过口服、经鼻、经皮、肺、吸入、颊、舌下、腹腔内、皮下、肌内、静脉内、直肠、胸膜内、鞘内和肠胃外施用。在一个实施例中，该化合物口服施用。本领域技术人员将认识到某些施用途径的优势。

[0079] 利用化合物的给药方案在根据患者的多种因素包括类型、物种、年龄、体重、性别和医疗状况、要治疗的病情的严重程度、施用途径、患者的肾和肝功能以及其施用的特定的

化合物或其盐中选择。一个普通技术的医师或兽医可以很容易的确定并开出有效量的所需药物来预防、对抗或阻止病情的发展。

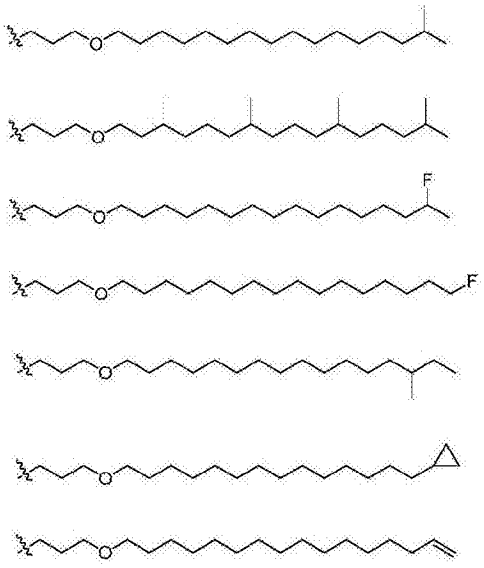
[0080] 本发明的化合物

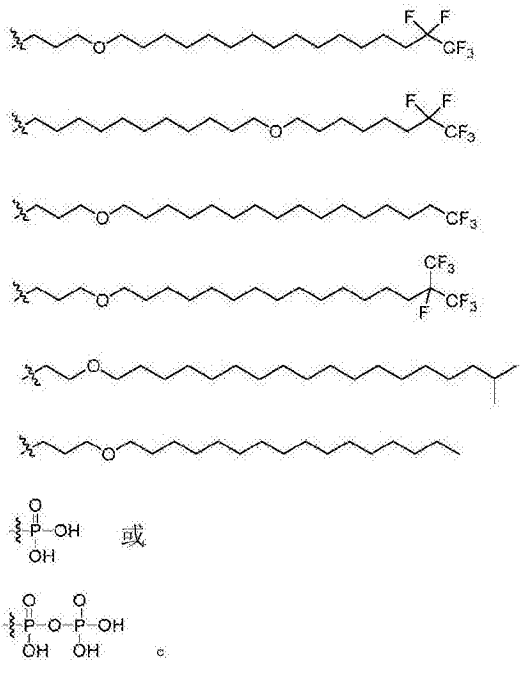
[0081] 通常，本发明的核苷磷酸酯也可以通过如下式(I)表示：

[0082] 

式（I）

[0083] 其中，R为：



[0084] 

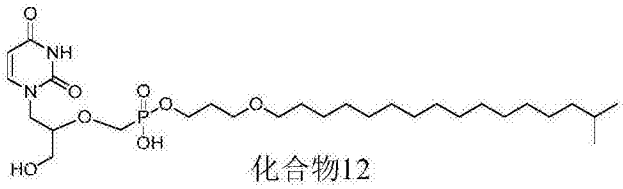
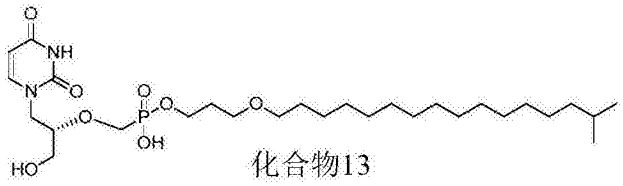
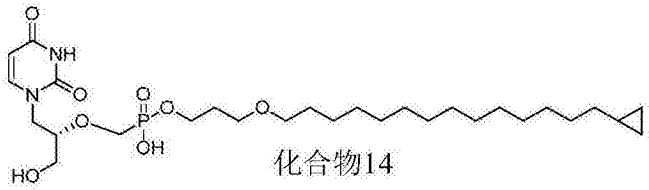
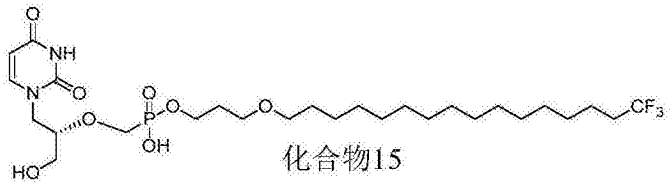
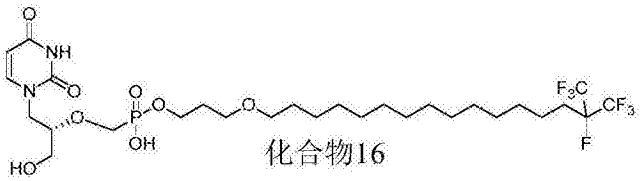
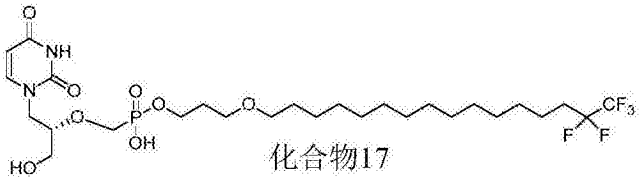
或

。

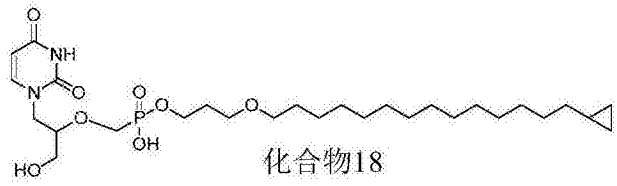
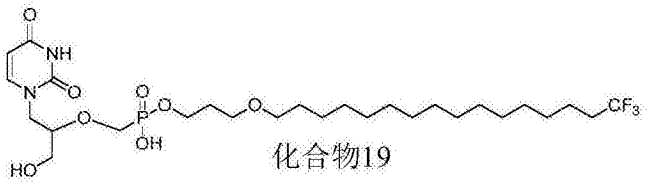
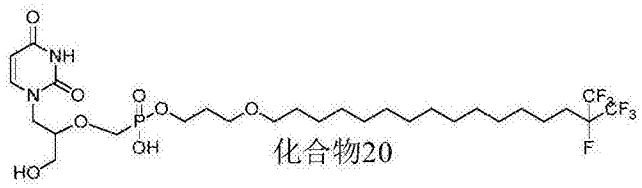
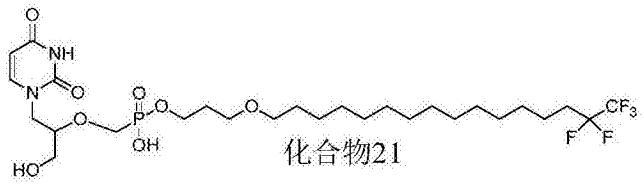
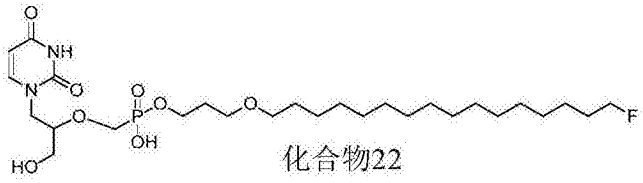
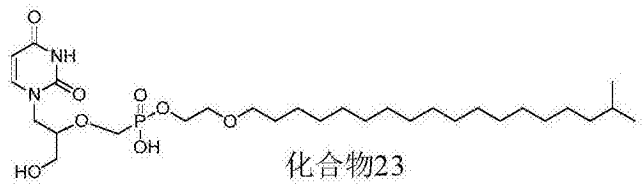
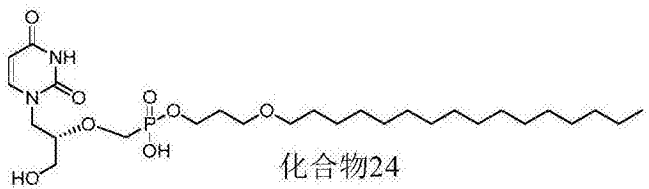
[0085] 本发明的典型的核苷磷酸酯列于表1。

[0086] 表1

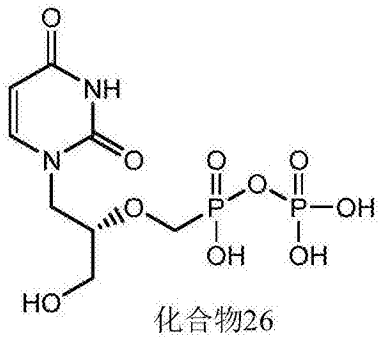
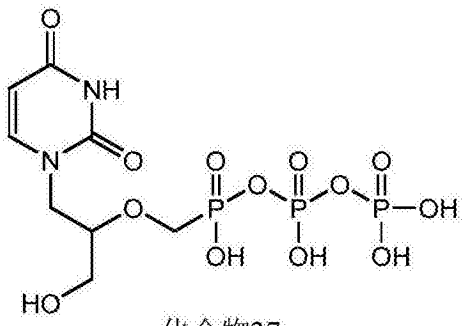
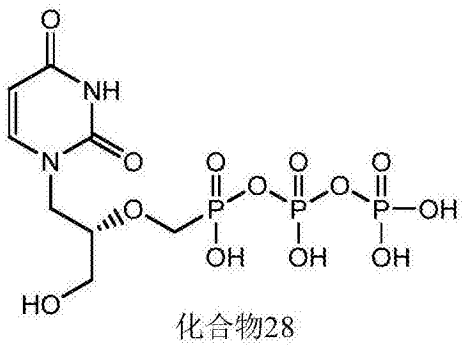
[0087]

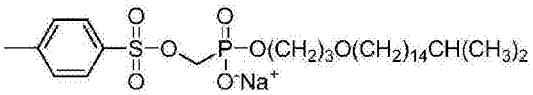
化合物号码	本发明公开的典型的非限制性的化合物的实例
12	 化合物12
13	 化合物13
14	 化合物14
15	 化合物15
16	 化合物16
17	 化合物17

[0088]

化合物号码	本发明公开的典型的非限制性的化合物的实例
18	 化合物18
19	 化合物19
20	 化合物20
21	 化合物21
22	 化合物22
23	 化合物23
24	 化合物24

[0089]

化合物号码	本发明公开的典型的非限制性的化合物的实例
25	 化合物25
26	 化合物26
27	 化合物27
28	 化合物28

[0090] 在另外的实施例中，本发明提供了具有式的化合物8和合成化合物8的方法，其中，所述方法包括如下步骤：

[0091] (i)向1-溴-3甲基丁烷的2-甲基四氢呋喃(Me-THF)溶液中加入镁屑,随后加热,然后冷却该混合物;

[0092] (ii)向步骤(i)的反应混合物中加入12-溴-1-十二烷醇的Me-THF溶液,然后立即加入四氯合铜酸二锂的四氢呋喃(THF)溶液;

[0093] (iii)用乙酸乙酯反萃取反应混合物中的水相;

[0094] (iv)用盐水洗涤有机溶液并经$MgSO_4$干燥,过滤,然后在真空中浓缩,以产生化合物3;

[0095] (v)向化合物3和N,N-二异丙基乙胺(DIPEA)的二氯甲烷的冷溶液中加入甲磺酰氯,同时保持温度在约5℃以下;

[0096] (vi)将反应温热至室温,并搅拌几小时;

[0097] (vii)向反应混合物中加入甲磺酰氯和DIPEA,并搅拌几小时;

[0098] (viii)冷却反应混合物的同时加入水,然后从水层中分离二氯甲烷(DCM)层,经干燥剂干燥,并过滤DCM层以除去干燥剂;

[0099] (ix)在真空下浓缩DCM溶液,以给出黄色油状物;并向黄色油状物的浓缩物中加入甲醇;

[0100] (x)过滤沉淀出白色固体的甲醇浓缩物,过滤固体并干燥,制得化合物4;

[0101] (xi)向1,3-丙二醇的N-甲基-2-吡咯烷酮(NMP)的冷溶液中加入氢化钠(NaH),并温热该混合物;

[0102] (xii)向步骤(xi)的溶液中加入化合物4,并搅拌几小时;

[0103] (xiii)向溶液中加入水和乙酸乙酯,并分离有机层;

[0104] (xiv)在真空中浓缩有机层,加入甲醇,然后干燥;

[0105] (xv)加入乙腈,重复步骤(xiv),在过滤和干燥后,形成化合物5;

[0106] (xvi)向化合物6(购自Lacamas实验室)的乙腈溶液中加入三甲基烷硅溴(TMS-Br);

[0107] (xvii)除去乙腈和TMS-Br后加入二氯甲烷,然后浓缩;

[0108] (xviii)加入草酰氯和二甲基甲酰胺(DMF),并在真空中浓缩,以形成化合物7;

[0109] (xix)在二氯甲烷中混合化合物5和化合物7,并向化合物7和化合物5的溶液中加入吡啶;

[0110] (xx)在向步骤(xix)的混合物中加入水后分离有机层;

[0111] (xxi)在向步骤(xx)的有机层中加入水和甲醇后再次分离有机层;

[0112] (xxii)在真空中干燥来自步骤(xxi)的有机层,并加入丙酮;

[0113] (xxiii)干燥和在进一步干燥前加入丙酮并调节pH至约9.0;

[0114] (xxiv)过滤在步骤(xxiii)中形成的固体后加入丙酮;和

[0115] (xxv)过滤并干燥步骤(xxiv)的固体产物,以产生化合物8。

[0116] 在另一个实施例中,所述方法包括如下步骤:

[0117] (i)向1-溴-3甲基丁烷(或合适的取代烃)的2-甲基四氢呋喃(Me-THF)溶液中加入镁屑;

[0118] (ii)向反应混合物中加入12-溴-1-十二烷醇(或合适的取代烃)的Me-THF溶液,随后加入四氯合铜酸二锂的四氢呋喃(THF)溶液,以合成化合物3;

[0119] (iii)向化合物3和N,N-二异丙基乙胺(DIPEA)的二氯甲烷冷溶液中加入甲磺酰氯,同时保持温度在约5℃以下,以提供化合物4;

[0120] (iv)向1,3-丙二醇的N-甲基-2-吡咯烷酮(NMP)的冷溶液中加入氢化钠(NaH),随后加入化合物4,以产生化合物5;

[0121] (v)向化合物6(购自Lacamas实验室)的乙腈溶液中加入三甲基溴硅烷(TMS-Br);

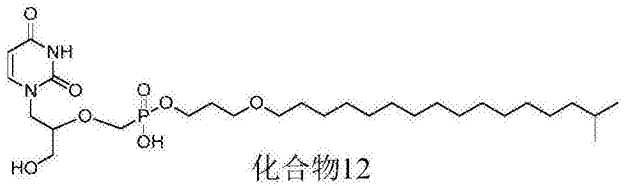
[0122] (vi)除去乙腈和TMS-Br后加入草酰氯和二甲基甲酰胺(DMF),以形成化合物7;

[0123] (vii)向化合物7和化合物5的二氯甲烷溶液中加入吡啶;

[0124] (viii)调节分离的中间体的pH至约9.0,以产生化合物8。

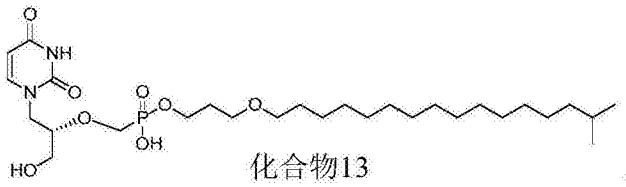
[0125] 依照本发明的方法合成的化合物12-24基本上没有杂质。依照本发明实施例合成的化合物12-24具有大于或等于约99%w/w的纯度。应当理解,本发明公开的方法可以适用于所需化合物的大规模和小规模制备。在本文所描述的方法的优选的实施例中,膦酸酯可以被大规模生产,例如,以工业规模而不是试验性/实验室规模。例如,根据本发明的方法的一个间歇式过程允许制备至少1g,或至少5g,或至少10g,或至少100g,或至少1kg,或至少100kg的膦酸酯产品的批量。本发明的化合物可被制成对映体、非对映体和外消旋体。此外,该方法允许具有通过HPLC测得的至少98%或至少98.5%的纯度的膦酸酯产品的制备。在本发明优选的实施例中,这些产品在不涉及通过任何形式的色谱法(例如,气相色谱,HPLC,制备液相色谱,体积排阻色谱等)纯化的反应顺序中获得。

[0126] 在一个实施例中,本发明涉及化合物12:

[0127] 

化合物12

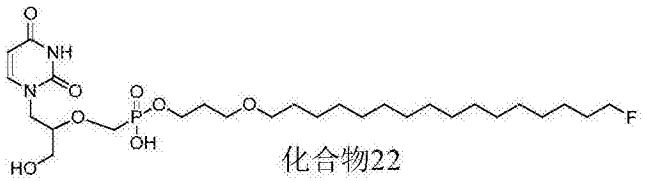
[0128] 在一个实施例中,本发明涉及化合物13:

[0129] 

化合物13

[0130] 在另一个实施例中,在化合物12和/或化合物13的侧链上的一个或多个-CH_2基团中的一个或两个氢可任选地被烷基、卤素或如US 7749983公开的任何其它基团取代。

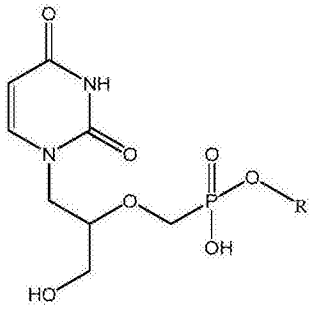
[0131] 在一些实施例中,端基-CH_3被卤素或烷基或如US 7749983公开的任何其它基团取代。例如,本发明的一个实施例涉及化合物22,其中,端基-CH_3基团被氟基取代:

[0132] 

化合物22

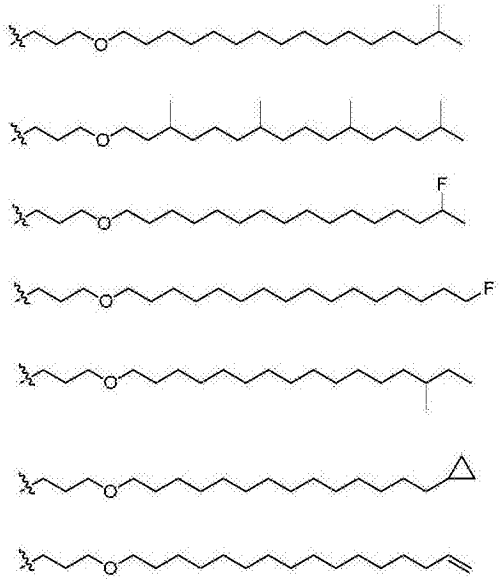
[0133] 合成方法

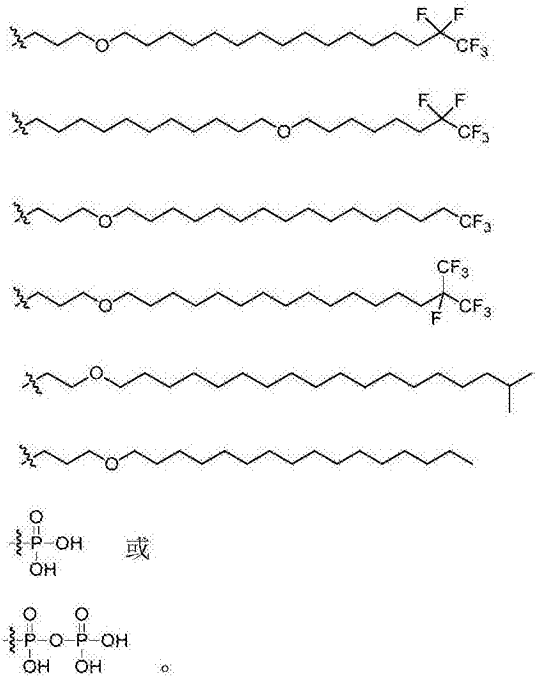
[0134] 本发明提供了支链核苷膦酸酯的合成方法。在某些方面,本发明提供了通常由式(I)所示的化合物的制备方法:

[0135] 

式（I）

[0136] 其中，R为：



[0137] 

或

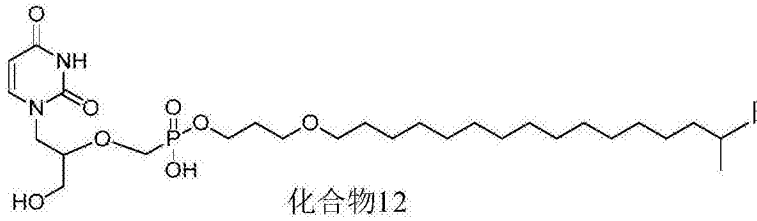
。

[0138] 在一个实施例中，本发明提供了列于表1的典型的化合物的制备方法。

[0139] 本发明的实施例提供了式(I)的化合物或其药学上可接受的盐或溶剂化物的合成方法。在一个实施例中，本发明提供了一种化合物12和/或化合物13的合成方法。本发明还

提供了一种化合物8的合成方法。

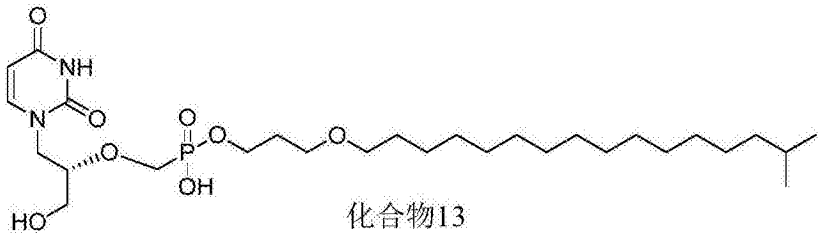
[0140] 本发明提供了取代的膦酸酯的合成方法。在某些方面，本发明提供了具有结构：

[0141] 

化合物12

的化合物12的制备方法。

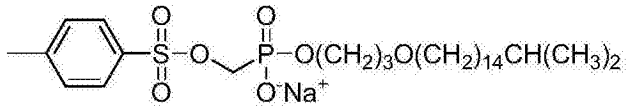
[0142] 在一个实施例中，本发明提供了具有结构：

[0143] 

化合物13

的化合物13，或其对映体、非对映体、外消旋体或其混合物，或药学上可接受的盐的制备方法。

[0144] 本发明提供了中间体化合物8和其合成方法。

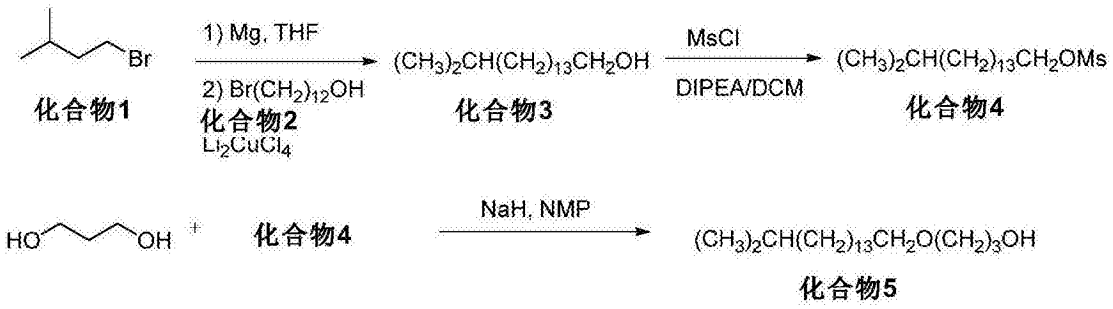
[0145] 

化合物8。

[0146] 下面的方案和说明描述了本发明的化合物的一些制备方法。

[0147] 本发明的合成方法可以容许各种各样的官能团；因此可以使用各种取代的起始材料。所述方法通常在或接近整个过程结束时提供所需的最终化合物，尽管在某些情况下希望将最终化合物进一步转化成其药学上可接受的盐、酯或衍生物。

[0148] 方案1

[0149] 

化合物1 化合物2 化合物3 化合物4 化合物5

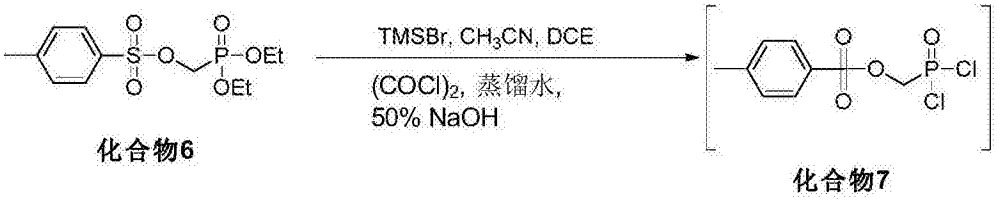
[0150] 化合物3的合成：通过向1-溴-3-甲基丁烷的溶剂(例如，2-甲基四氢呋喃(Me-THF))的溶液中加入碱土金属(例如屑形式的镁)合成本发明的化合物3。为了防止温度升高，使用干冰和酮(例如，丙酮)浴。在约30-60℃，例如40℃左右，加入卤素(例如，一小块碘)。然后将溶液加热到约60-80℃(例如，约61℃)，并搅拌约1-3小时(例如，约1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8，、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9或3.0小时)。将混合物冷却至约30-60℃(例如，等于或小于约40℃)。将反应混合物进一步冷却至约0至-70℃(例如，约-59℃)。向混合物中加入醇(例如，脂肪醇如12-溴-1-十二烷醇)的有机溶剂(例如，Me-THF)。加入醇(例如，脂肪醇如12溴-1-十二烷醇)后，立即加入催化剂溶液(例如，四氯合铜(II)酸二锂溶液)。将反应温热至约室温并搅拌几小时(例如，约16小时)。在反应完成后，将反应冷却至约0℃，并将无机溶剂(例如氯化铵)缓慢加入直至饱和并且直

到温度升高至约15-30℃(例如,高于约22℃)。水相用有机添加剂(例如,乙酸乙酯)反萃取。用盐溶液(例如,盐水)洗涤合并的有机物,经无机盐(例如,$MgSO_4$)干燥,然后过滤。在约40℃的真空中浓缩该溶液。

[0151] 化合物4的合成:向化合物3和为强碱但是弱亲核试剂的有机试剂(例如,N,N-二异丙基乙胺(DIPEA))的溶剂(例如,二氯甲烷)的冷溶液中缓慢加入甲磺酰氯,以确保温度不会升到约5℃以上。向含有化合物3的反应混合物中加入甲磺酰化剂(例如,甲磺酰氯(甲基磺酰氯)和DIPEA。在冷却该混合物后加入水并搅拌。二氯甲烷(DCM)层被分离,经Na_2SO_4干燥,并过滤。在约40-50℃真空中浓缩该溶液。向黄色残余物中加入甲醇。将该溶液在约4℃下静置约30min以沉淀出白色固体。过滤沉淀固体的溶液,并将固体在过滤器上风干几小时。将滤液浓缩至一半体积并过滤。将固体合并,并在甲醇中磨碎。过滤并干燥白色固体。

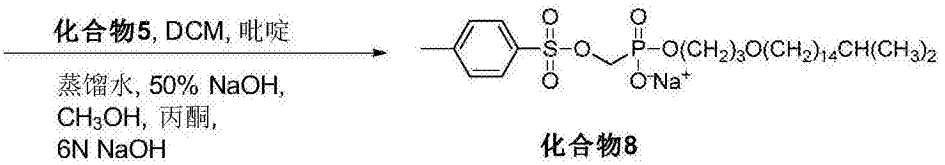
[0152] 化合物5的合成:向低于0℃(例如,约-5℃)的1,3-丙二醇的冷溶液中加入合适的有机试剂(例如,N-甲基-2-吡咯烷酮(NMP))和强碱(例如NaH)。将混合物温热到室温,并搅拌约30min。将溶解在合适的有机试剂(例如NMP)中的化合物4加入到该溶液中。向反应混合物中加入水和有机溶剂(例如乙酸乙酯)。将有机层和水层分离。用水洗涤有机层。在40℃真空中浓缩该溶液。通过加入甲醇进一步干燥该混合物并在约40℃真空中浓缩。用极性非质子溶剂(例如乙腈)重复在甲醇中干燥和浓缩的步骤。向黄色油状物中加入极性非质子溶剂(例如乙腈),并搅拌该混合物。形成蜡状的白色固体,将其过滤。在旋转蒸发器中干燥得到化合物5。

[0153] 方案2



化合物6 化合物7

[0154]



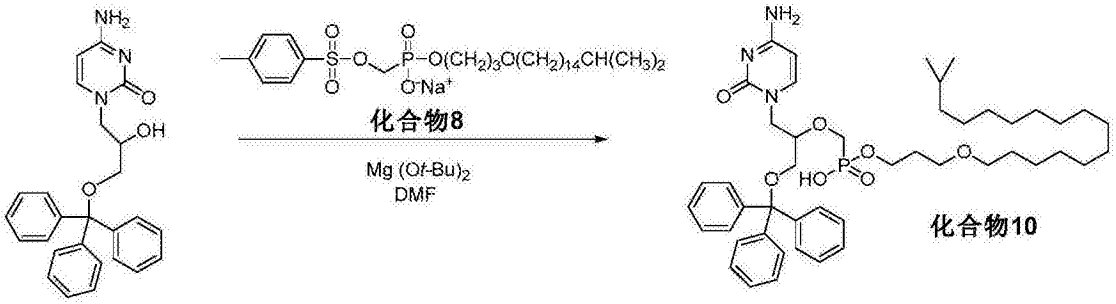
化合物8

[0155] 化合物8的合成:向化合物6的极性非质子溶剂(例如乙腈)的溶液中加入三甲基溴硅烷(TMS-Br)。加入完成后,将内部温度调节至约55℃。将混合物搅拌2小时后,通过在约40℃下的真空蒸馏将极性非质子溶剂(例如乙腈)和TMS-Br除去,形成浓缩物。向浓缩物中加入有机溶剂(例如二氯甲烷),以形成溶液,随后加入合适的有机试剂(例如草酰氯)。在有机试剂(例如草酰氯)的加入完成后,加入有机溶剂(例如极性(亲水的)非质子溶剂(例如,二甲基甲酰胺(DMF))。搅拌反应混合物,然后在约35℃的外部温度下的真空中浓缩,以提供化合物7。中间产物化合物7无需纯化可用于下一个步骤。

[0156] 在0℃以下(例如约-8℃)冷却化合物5和化合物7(0.1462mol,44.33g)的二氯甲烷(423ml)溶液。向该冷却的溶液中加入吡啶(0.381mol,30.18g)。将反应混合物搅拌3小时。以己烷与乙酸乙酯的体积比为2:1进行薄层色谱(TLC),其显示化合物5已被消耗掉。向反应混合物(冷却至10℃)中加入200ml水。将该混合物搅拌0.5小时。然后分离有机层。向有机层

中加入100ml水和75ml甲醇。再次分离有机层，并在35℃的真空中浓缩。向残留物中加入200ml丙酮，并使用6N NaOH(约使用15ml)将pH调节至约9.04。将该混合物在约4℃下静置16小时。在潜伏期后，10g白色固体沉淀。将含有白色固体沉淀的混合物过滤。向该混合物中加入另外的300ml丙酮。将混合物再次在4℃下静置16小时。在另外的潜伏期后，棕褐色固体沉淀。过滤并干燥该混合物，以产生化合物8。

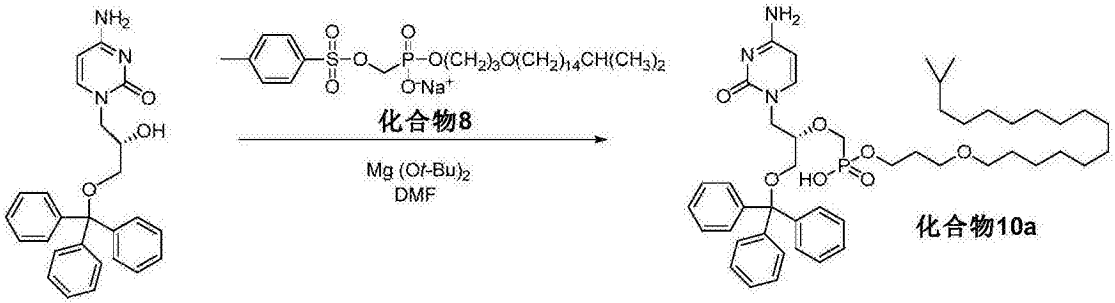
[0157] 方案3

[0158] 

化合物9

[0159] 化合物10的合成：将化合物9、化合物8、温和的碱土金属醇盐(碱)，(例如叔丁醇镁)和DMF(25ml)一起加热至约60℃或更高温度(例如80℃)，持续1小时以上(例如约3小时)。将该反应在有机溶剂(例如乙酸异丙酯)中冷却到室温，并加入酸(例如HCl)。将有机层分离，用盐溶液(例如盐水)洗涤有机层，经盐(例如Na_2SO_4)干燥，并在约40℃真空中浓缩。向该混合物中加入甲醇，浓缩以产生化合物10。

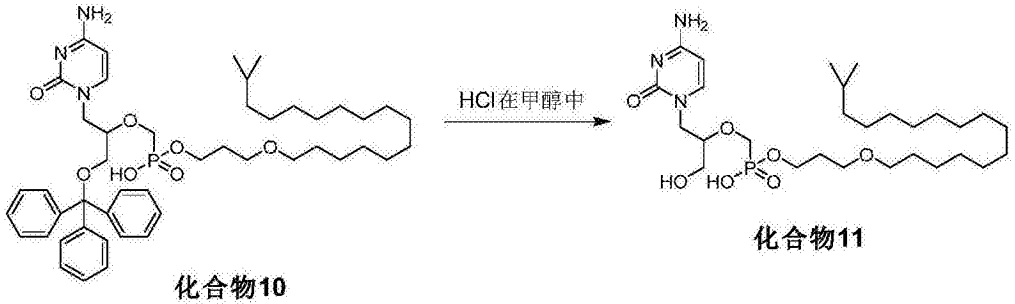
[0160] 方案3a

[0161] 

化合物9a

[0162] 化合物10a的合成：将化合物9a、化合物8、温和的碱土金属醇盐(碱)，(例如叔丁醇镁)和DMF(25ml)一起加热至约60℃或更高温度(例如80℃)，持续1小时以上，例如约3小时。将该反应在有机溶剂，例如乙酸异丙酯中冷却到室温，并加入酸(例如HCl)。将有机层分离，用盐溶液(例如盐水)洗涤有机层，经盐(例如Na_2SO_4)干燥，并在约40℃真空中浓缩。向混合物中加入甲醇，浓缩以产生化合物10a。

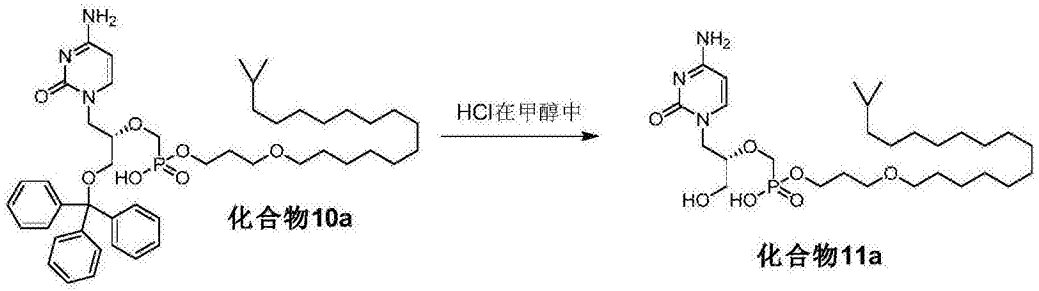
[0163] 方案4

[0164] 

化合物10 化合物11

[0165] 化合物11的合成:在室温下向化合物10中加入醇(例如甲醇)和酸(例如HCl)。形成并滤出白色固体三苯甲基副产物。用水稀释滤液,并使用碱金属氢氧化物(例如NaOH)调节pH至约2.5,形成化合物11。将产物在有机溶剂,例如丙酮中制成浆,并过滤。将产物在室温下的真空烘箱中干燥。

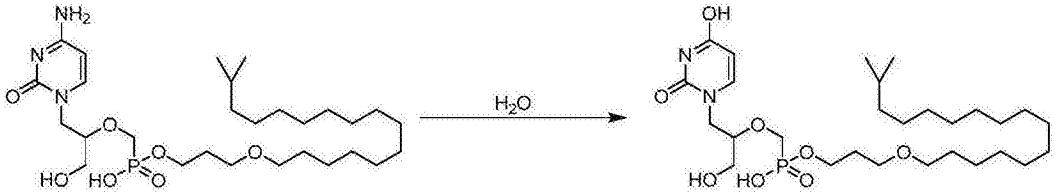
[0166] 方案4a

[0167] 

化合物10a 化合物11a

[0168] 化合物11a的合成:在室温下向化合物10a中加入醇(例如甲醇)和酸(例如HCl)。形成并滤出白色固体三苯甲基副产物。用水稀释滤液,并使用碱金属氢氧化物(例如NaOH)调节pH至约2.5,形成化合物11a。将产物在有机溶剂,例如丙酮中制成浆,并过滤。将产物在室温下的真空烘箱中干燥。

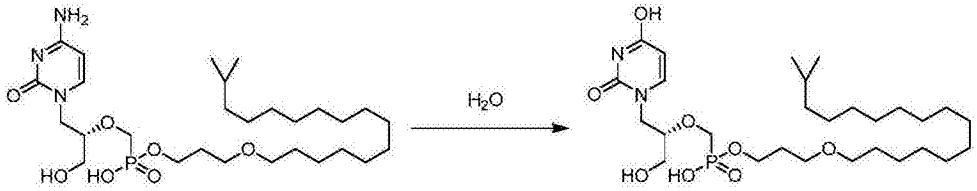
[0169] 方案5

[0170] 

化合物11 化合物12

[0171] 化合物12的合成:在将混合物加热至约90℃之前向化合物11中加入水,并搅拌。在反应完成95%或95%以上后,将混合物冷却至室温。使用酸(例如HCl)将pH调节至约1-2。用乙酸乙酯萃取水溶液。将合并的乙酸乙酯萃取物经Na_2SO_4干燥,过滤,并在约40℃的真空中浓缩,以产生稠的油状物。用丙酮将该稠的油状物磨碎,冷却,以产生白色固体。过滤并干燥白色固体,以产生化合物12。

[0172] 方案5a

[0173] 

化合物11a 化合物13

[0174] 化合物13的合成：在将混合物加热至约90℃之前向化合物11a中加入水，并搅拌。在反应完成95％或95％以上后，将混合物冷却至室温。使用酸(例如HCl)将pH调节至约1-2。用乙酸乙酯萃取水溶液。将合并的乙酸乙酯萃取物经Na_2SO_4干燥，过滤，并在约40℃的真空中浓缩，以合成稠的油状物。用丙酮将该粗稠的油状物磨碎，并冷却以产生白色固体。过滤并干燥白色固体，以产生化合物13。

[0175] 类似的方法被用于制备式(I)的其他化合物。起始原料，例如化合物1和/或化合物3可以根据本发明的化合物的合成需要而改变。

[0176] 在整个说明书中，其中，方法或处理被描述为具有、包括或包含特定的处理步骤，所述处理也基本上包含或由所述的处理步骤组成。此外，应该理解，步骤的顺序或执行某些动作的顺序是不重要的，只要本发明保持可操作性。此外，两个或多个步骤或动作可以同时进行。

[0177] 化合物的纯度

[0178] 本发明提供了式(I)的化合物，例如，具有大于或等于约91％w/w，大于或等于约95％w/w，或大于或等于约99％w/w的纯度的化合物12-24(或其药学上可接受的盐)中任意一种。

[0179] 在一些实施例中，本发明的式(I)所示的化合物，例如，化合物12-24基本上没有杂质。在一些实施例中，化合物12-24或其药学上可接受的盐的纯度等于或大于92％(例如，≥92％，≥93％，≥94％，≥95％，≥96％，≥97％，≥98％，≥99％，或≥99.5％)。在其他实施例中，化合物12-24或其药学上可接受的盐的纯度等于或大于91％(例如，≥91％，≥92％，≥93％，≥94％，≥95％，≥96％，≥97％，≥98％，≥99％，或≥99.5％)。在又一个实施例中，化合物12-24或其药学上可接受的盐是溶剂化物，例如，甲醇溶剂化物，乙醇溶剂化物，或异丙醇溶剂化物。

[0180] 在一些实施例中，式(I)所示的化合物(例如化合物12-24)或其药学上可接受的盐的纯度等于或大于92％(例如，≥92％，≥93％，≥94％，≥95％，≥96％，≥97％，≥98％，≥99％，或≥99.5％)。在其它实施例中，化合物12-24(或其药学上可接受的盐)中的任意一种具有等于或大于91％(例如，≥91％，≥92％，≥93％，≥94％，≥95％，≥96％，≥97％，≥98％，≥99％，或≥99.5％)的纯度。在一个实施例中，化合物12-24(或其药学上可接受的盐)中的任意一种的纯度为约99％。

[0181] 本发明还提供了具有等于或大于91％w/w的纯度，例如，具有小于或等于9％w/w的杂质的式(I)的化合物(或其药学上可接受的盐)(例如，化合物12-24)中的任意一种或其药学上可接受的盐在用于受试者(例如，免疫缺陷受试者)中病毒感染的治疗性和/或预防性治疗的药物的制备中的应用。

[0182] 本发明提供大于约99％w/w纯度的式(I)所示的化合物(例如化合物12-24)或其药

学上可接受的盐。在一些实施例中，式(I)所示的化合物(例如化合物12-24)中的任意一种或其药学上可接受的盐的纯度等于或大于约99％w/w，98％w/w，97％w/w，96％w/w，95％w/w，94％w/w，93％w/w，92％w/w或91％w/w。

[0183] 药物组合物

[0184] 在整个说明书中，其中，组合物被描述为具有、包括或包含特定组分，可以预期的是所述组合物也基本上由或由所述的组分组成。

[0185] 在另一方面，本发明提供了包含式(I)的化合物或其药学上可接受的盐的药物组合物。在一些实施例中，本发明提供了包含式(I)的化合物或其药学上可接受的盐的药物组合物和药学上可接受的载体和/或稀释剂。本发明的药物组合物包含化合物12-24中的任意一种或其药学上可接受的盐。本发明还提供了包含化合物12-24中的任意一种或其药学上可接受的盐和一种药学上可接受的载体和/或稀释剂的药物组合物。

[0186] 本发明化合物的制备工艺和施用方法见Remington:the Science and Practice of Pharmacy,19th edition,Mack Publishing Co.,Easton,PA(1995)。

[0187] 在一个实施例中，本发明所述的化合物及其药学上可接受的盐，与药学上可接受的载体或稀释剂结合被用于药物制剂中。合适的药学上可接受的载体包括惰性固体填充剂或稀释剂和无菌水或有机溶剂。所述化合物将存在于这样的药物组合物中，其量足以提供本发明所述的范围内的所需剂量。

[0188] 在另一个实施例中，本发明提供了一种在受试者(例如免疫缺陷受试者)中的病毒感染的治疗性和/或预防性治疗的方法，所述方法包括向受试者施用纯度等于或大于91％w/w(例如，具有小于或等于9％w/w的杂质)的化合物12-24中的任意一种或其药学上可接受的盐。

[0189] 本发明提供了具有等于或大于91％的纯度的式(I)的化合物(或其药学上可接受的盐)(例如，化合物12-24中的任意一种或其药学上可接受的盐)在治疗受试者的病毒感染(例如dsDNA病毒感染)中的应用。所述病毒感染包括但不限于人类巨细胞病毒(HCMV)、BK病毒(BKV)、爱泼斯坦-巴尔病毒(EBV)、腺病毒、JC病毒(JCV)、SV40、MC病毒(MCV)、KI病毒(KIV)、WU病毒(WUV)、牛痘病毒、单纯疱疹病毒1型(HSV-1)、单纯疱疹病毒2(HSV-2)、人类疱疹病毒6型(HHV-6)、人类疱疹病毒8型(HHV-8)、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、水痘带状疱疹病毒(VZV)、典型天花、类天花、天花、牛痘、骆驼痘、猴痘、脊髓灰质炎病毒、埃博拉病毒、马尔堡病毒、肠道病毒、乳头状瘤病毒以及人类免疫缺陷病毒(HIV)感染。例如，所述感染对缬更昔洛韦盐酸盐(或更昔洛韦)具有抗药性或在所述受试者中显示出对缬更昔洛韦盐酸盐(或更昔洛韦)的副作用。或者或另外，具有等于或大于91％w/w的纯度的式(I)的化合物(或其药学上可接受的盐)，例如，化合物12-24中的任意一种或其药学上可接受的盐，被用来治疗CMV。例如，人类巨细胞病毒(HCMV)。例如，用更昔洛韦治疗后发生感染，例如，在这种情况下，CMV感染是急性的。所述患者可以是干细胞移植的患者，例如，骨髓干细胞移植的患者，特别是存在来自于患者中的更昔洛韦的骨髓毒性风险(真实的或感观的)的患者。

[0190] 在另一个实施例中，具有等于或大于约91％的纯度的式(I)的化合物中的一种或其药学上可接受的盐被口服施用于受试者，例如，约0.01mg/kg至约10mg/kg或更多，例如，高达100mg/kg的剂量。在另一个实施例中，具有等于或大于约91％的纯度的式(I)的化合物或其药学上可接受的盐以约0.01mg/kg、0.05mg/kg、0.1mg/kg、0.5mg/kg、1mg/kg、1.5mg/

kg、2mg/kg、2.5mg/kg、3mg/kg、3.5mg/kg、4mg/kg、4.5mg/kg、5mg/kg、5.5mg/kg、6mg/kg、6.5mg/kg、7mg/kg、7.5mg/kg、8mg/kg、8.5mg/kg、9mg/kg、9.5mg/kg或10mg/kg或更多的剂量或其中任何范围的剂量被口服施用于受试者。

[0191] 在一些实施例中，式(I)的化合物(或其药学上可接受的盐)，例如，本发明的化合物12-24中的任意一种，以约1-20mg/kg(例如，约1-1.1mg/kg，约1.1-1.2mg/kg，约1.2-1.3mg/kg，约1.3-1.4mg/kg，约1.4-1.5mg/kg，约1.5-1.6mg/kg，约1.6-1.7mg/kg，约1.7-1.8mg/kg，约1.8-1.9mg/kg，约1.9-2.0mg/kg，约2.0-2.1mg/kg，约2.1-2.2mg/kg，约2.2-2.3mg/kg，约2.3-2.4mg/kg，约2.4-2.5mg/kg，约2.5-2.6mg/kg，约2.6-2.7mg/kg，约2.7-2.8mg/kg，约2.8-2.9mg/kg，约2.9-3.0mg/kg，约3.0-3.1mg/kg，约3.1-3.2mg/kg，约3.2-3.3mg/kg，约3.3-3.4mg/kg，约3.4-3.5mg/kg，约3.5-3.6mg/kg，约3.6-3.7mg/kg，约3.7-3.8mg/kg，约3.8-3.9mg/kg，3.9-4.0mg/kg，约4.0-5.0mg/kg，约5.0-6.0mg/kg，约6.0-7.0mg/kg，约7.0-8.0mg/kg，约8.0-9.0mg/kg，约9.0-10.0mg/kg，或约10-20mg/kg)的剂量被施用于受试者。

[0192] 在一些实施例中，式(I)的化合物(或其药学上可接受的盐)，例如，本发明的化合物12-24中的任意一种，以约1-20mg/kg(例如，约1-1.1mg/kg，约1.1-1.2mg/kg，约1.2-1.3mg/kg，约1.3-1.4mg/kg，约1.4-1.5mg/kg，约1.5-1.6mg/kg，约1.6-1.7mg/kg，约1.7-1.8mg/kg，约1.8-1.9mg/kg，约1.9-2.0mg/kg，约2.0-2.1mg/kg，约2.1-2.2mg/kg，约2.2-2.3mg/kg，约2.3-2.4mg/kg，约2.4-2.5mg/kg，约2.5-2.6mg/kg，约2.6-2.7mg/kg，约2.7-2.8mg/kg，约2.8-2.9mg/kg，约2.9-3.0mg/kg，约3.0-3.1mg/kg，约3.1-3.2mg/kg，约3.2-3.3mg/kg，约3.3-3.4mg/kg，约3.4-3.5mg/kg，约3.5-3.6mg/kg，约3.6-3.7mg/kg，约3.7-3.8mg/kg，约3.8-3.9mg/kg，3.9-4.0mg/kg，约4.0-5.0mg/kg，约5.0-6.0mg/kg，约6.0-7.0mg/kg，约7.0-8.0mg/kg，约8.0-9.0mg/kg，约9.0-10.0mg/kg，或约10-20mg/kg)的剂量被用在施用于受试者的药物的制备中。

[0193] 在另一个实施例中，本发明还提供了一种用于受试者的病毒感染的治疗性和/或预防性治疗的口服剂型，其包含具有等于或大于91％w/w的纯度(例如，小于或等于9％的杂质)的式(I)的化合物(或其药学上可接受的盐)，例如，化合物12-24中的任意一种或其药学上可接受的盐，其中，当将所述化合物以约2mg/kg的剂量施用于人类的时候，所述口服剂型提供所述化合物的约2000至约4000h·ng/mL，例如，约2500至约3000h·ng/mL的AUC。

[0194] 在另一个实施例中，本发明还提供了一种用于受试者的病毒感染的治疗性和/或预防性治疗的口服剂型，其包含具有等于或大于约91％w/w的纯度(例如小于或等于9％的杂质)的式(I)的化合物(或其药学上可接受的盐)，例如，化合物12-24中的任意一种或其药学上可接受的盐，其中，当将所述化合物以约1-2mg/kg、约2-3mg/kg、约3-4mg/kg的剂量施用给人类的时候，所述口服剂型提供所述化合物的约100-500h·ng/mL，例如，约200-400h·ng/mL的C_{max}。

[0195] 在另一个实施例中，本发明还提供了一种用于受试者的病毒感染的治疗性和/或预防性治疗的口服剂型，其包含具有等于或大于约91％w/w的纯度(例如小于或等于9％的杂质)的式(I)的化合物(或其药学上可接受的盐)，例如，化合物12-24中的任意一种或其药学上可接受的盐，其中，当将所述化合物以约1-2mg/kg、约2-3mg/kg、约3-4mg/kg的剂量和所述化合物对西多福韦的代谢物施用给人类的时候，所述口服剂型提供所述西多福韦的

C_{max}少于所述化合物的C_{max}的约30％，例如，少于所述化合物的C_{max}的约20％。

[0196] 在一些实施例中，施用持续十个总剂量。例如，式(I)的化合物以约100mg的剂量每周两次持续五周(即，十个总剂量)被施用。或者，式(I)的化合物可以以约200mg的负荷剂量接着约100mg剂量连续每周两次被施用。在一些实施例中，施用持续十个总剂量。例如，式(I)的化合物可以以约200mg的负荷剂量接着约9个另外的100mg剂量每周两次共十个总剂量被施用。在本发明的一个实施例中，式(I)的化合物可以每天按约20-200mg/天的范围的剂量或每周按约200mg-2000mg的范围的剂量给药。

[0197] 当本发明的化合物作为药物被施用给哺乳动物(例如，人类)时，它们可以给予本身或作为一种包含，例如，约0.1％-0.99％，、约0.2％-0.98％、约0.3％-97％、约0.4％-96％或约0.5％-95％的活性成分的药物组合物与一种药学上可接受的载体结合。在一个实施例中，包含约0.5％-95％的活性成分的药物组合物与一种药学上可接受的载体结合适用于施用给哺乳动物(例如，人类)。本发明的一些实施例提供了用于治疗、防止或预防病毒感染或与病毒感染有关的病症的药物组合物的制备，所述药物组合物包含约0.1％-99.9％、约0.2％-98％、约0.3％-97％、约0.4％-96％或约0.5％-95％的式(I)的化合物或其药学上可接受的盐，例如，化合物12-24中任意一种或其药学上可接受的盐。本发明提供了约0.1％-99.9％、约0.2％-98％、约0.3％-97％、约0.4％至96％或约0.5％-95％的式(I)的化合物或其药学上可接受的盐(例如化合物12-24中任意一种或其药学上可接受的盐)在包含有效量的化合物的用于治疗、防止或预防病毒感染或与病毒感染有关的疾病的药物的制造中的应用。

[0198] 根据常规的药物混合技术，本发明所述的式(I)的化合物或其药学上可接受的盐，例如，化合物12-24中的任意一种或其药学上可接受的盐，可以与药学上可接受的载体相结合。此外，所述载体可以采取多种形式，这取决于施用所需的剂型的形式，例如，口服、经鼻、直肠、阴道、肠胃外(包括静脉内注射或输注)。在制备用于口服剂型的组合物中任何常用的药物介质都可以被使用。常用的药物介质包括，例如，水、二醇、油、醇、调味剂、防腐剂、着色剂等在口服液体制剂(例如，悬浮液、溶液、乳液和酏剂)的情况下；气溶胶；或载体如淀粉、糖、微晶纤维素，稀释剂，成粒剂、润滑剂、粘合剂、崩解剂等在口服固体制剂的情况下(例如，粉剂、胶囊和片剂)。

[0199] 包含本发明的化合物(例如，式(I)的化合物)的药物组合物可以被配制成具有任何所需的浓度。在一些实施例中，所述组合物被配制成使得其包含至少治疗有效量。本发明所述“治疗有效量”指使患者在临床观察上改善所必需的量。在一些实施例中，所述组合物被配制成使得其包含不引起一个或多个不期望的副作用的量。

[0200] 药物组合物包括适于口服、舌下、鼻、直肠、阴道、局部、口腔和胃肠外(包括皮下，肌内和静脉内)施用的那些，虽然最合适的途径将取决于治疗的病情的性质和严重程度。所述组合物可以以单位剂量形式方便地存在和通过任何药学领域熟知的方法制备。在某些实施例中，为了口服施用，所述药物组合物被配制成丸剂、胶囊、锭剂或片剂的形式。在其他实施例中，所述药物组合物是混悬液的形式。

[0201] 给药方案可影响什么构成药学有效量。式(I)的化合物或其药学上可接受的盐，例如，化合物12-24中的任意一种或其药学上可接受的盐，可以在疾病发作之前或之后施用给受试者。另外，数个分剂量，以及交错剂量可以每天或相继施用，或剂量可以连续注入，或者

可以是弹丸注射。此外，所述剂量可以根据治疗或预防的情况的紧迫性成比例地增加或减少。而且，所述剂量可以与其它抗病毒药物，例如，与本领域技术人员公知的化学治疗剂相结合共同施用。所述试剂包括但不限于，布林西多福韦(BCV)、更昔洛韦(GCV)、缬更昔洛韦(vGCV)、乐泰莫韦(letermovir)和膦甲酸及其组合。例如，式(I)的化合物可以与BCV、GCV、vGCV、乐泰莫韦或膦甲酸或它们的组合相结合使用来治疗CMV感染和/或与CMV有关的疾病或病症。在另一个实施例中，式(I)的化合物可以与BCV结合使用来治疗BKV(BK病毒)感染和/或与BKV有关的疾病或病症。

[0202] 本发明的药物组合物被配制成与其预期的施用途径相配。施用途径的例子包括肠胃外，例如静脉内、皮内、皮下、口服(例如，吸入)、经皮(局部)和经粘膜施用。用于肠胃外、皮内或皮下应用的溶液或悬浮液可包括以下组分：无菌稀释剂如注射用水、盐水溶液、固定油、聚乙二醇、甘油、丙二醇或其它合成溶剂；抗菌剂如苄醇或对羟基苯甲酸甲酯；抗氧化剂如抗坏血酸或亚硫酸氢钠；螯合剂如乙二胺四乙酸；缓冲剂如乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐，和张力调节剂例如氯化钠或右旋糖。pH可以用酸或碱，如盐酸或氢氧化钠调节。肠胃外制剂可封装在安瓿、一次性注射器或玻璃或塑料制成的多剂量小瓶中。

[0203] 在一个优选的方面，待治疗的疾病或状况是病毒感染。

[0204] 对于任何化合物，治疗有效量可以首先在细胞培养检测，例如，肿瘤细胞，或在动物模型，通常是大鼠、小鼠、兔、狗或猪，中估计。动物模型还可以用来确定适当的浓度范围和施用途径。这样的信息然后可以被用于确定在人类中施用的有效剂量和途径。治疗/预防疗效和毒性可以通过在细胞培养或实验动物，例如，ED_{50}(在群体的50％中的治疗有效的剂量)和LD_{50}(在群体的50％中的致死的剂量)的标准药学方法中确定。毒性和治疗效果之间的剂量比是治疗指数，并且它可以表示为比例，LD_{50}/ED_{50}。显示大的治疗指数的药物组合物是优选的。该剂量可以根据所采用的剂型、患者的敏感性和施用途径在此范围内变化。

[0205] 调节剂量和施用以提供活性剂的足够水平或维持期望的效果。可考虑的因素包括疾病状态的严重性、受试者的一般健康状况、年龄、体重、以及受试者的性别、饮食、施用时间和施用频率、药物组合(或多个药物组合)、反应敏感性和对治疗的耐性/反应。长效药物组合物根据半衰期和特定制剂的清除率可以每3-4天、每周、两周一次、或每月被施用。

[0206] 在一些实施例中，所述施用持续十个总剂量。例如，式(I)的化合物可以以约100mg的剂量每周两次持续五周(即，十个总剂量)被施用。或者，式(I)的化合物可以以约200mg的负荷剂量接着约100mg剂量每周连续两次施用。在一些实施例中，施用持续十个总剂量。例如，式(I)的化合物可以以约200mg的负荷剂量接着9个另外的约100mg剂量每周两次共十个总剂量被施用。在本发明的一个实施例中，式(I)的化合物可以每天按约20-200mg/天的范围的剂量或每周按约200mg-2000mg的范围的剂量给药。

[0207] 包含本发明的式(I)的化合物的药物组合物可以以通常已知的方式，例如，通过常规的混合、溶解、制粒、制锭、研磨，乳化、包封、包埋、或冻干方法来制备。药物组合物可以以常规方式使用一种或多种包括赋形剂和/或促进活性化合物加工成药用制剂的助剂的药学上可接受的载体进行配制。适当的制剂取决于选择的施用途径。

[0208] 适于注射使用的药物组合物包括无菌水溶液(在水溶性的情况)或分散液和用于无菌可注射溶液或分散体的临时制备的无菌粉剂。对于静脉内施用，合适的载体包括生理盐水、抑菌水、聚氧乙烯蓖麻油EL™(BASF，帕西帕尼，N.J.)或磷酸盐缓冲盐水(PBS)。在所有

情况下，组合物必须是无菌的并且应当流体到容易以注射性存在的程度。它在生产和储存条件下必须是稳定的，并且必须防止微生物如细菌和真菌的污染作用来保存。所述载体可以是溶剂或含有，例如水，乙醇、多元醇(例如，甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)，及其合适的混合物的分散介质。适当的流动性可以被保持，例如，通过使用包衣如卵磷脂，通过维持在分散体的情况下所需的颗粒大小和通过使用表面活性剂。微生物作用的预防可通过各种抗菌剂和抗真菌剂，例如对羟基苯甲酸酯类、氯丁醇、苯酚、抗坏血酸、硫柳汞等来实现。在许多情况下，在组合物中优选包括等渗剂，例如糖、多元醇如甘露醇、山梨醇，氯化钠。注射组合物的延迟吸收可以通过包含在组合物中可延迟吸收的试剂，例如，单硬脂酸铝和明胶来实现。

[0209] 无菌可注射溶液可以通过将所需量的在合适的溶剂中的活性化合物与上述列举的成分中的一种或其组合混合来制备，如果需要，随后过滤灭菌。一般地，分散剂通过将活性化合物掺入到含有基本分散介质的无菌载体和来自上述列举的所需其它成分来制备。在用无菌粉末制备无菌注射溶液的情况下，制备方法是真空干燥和冷冻干燥，其产生活性成分的粉末，加上来自其先前无菌过滤的溶液中的任何另外所需的成分。

[0210] 口服组合物通常包括惰性稀释剂或可食用的药学上可接受的载体。它们可以被封装在明胶胶囊中或压制成片剂。为了口服治疗施用，活性化合物可以与赋形剂混合并以片剂、锭剂或胶囊的形式使用。口服组合物也可以使用用作漱口水的液体载体制备，其中，在液体载体中的化合物口服施用，并唰洗、吐出或咽下。药学上相容的粘合剂和/或助剂材料可以被包含作为组合物的一部分。所述片剂、丸剂、胶囊、锭剂等可含有任何以下成分或类似性质的化合物：粘合剂如微晶纤维素、黄蓍树胶或明胶；赋形剂如淀粉或乳糖，崩解剂如藻酸、淀粉或玉米淀粉；润滑剂如硬脂酸镁或Sterotes；助流剂如胶体二氧化硅；甜味剂如蔗糖或糖精；或调味剂，如，例如薄荷、水杨酸甲酯或橙调味剂。

[0211] 对于通过吸入施用，所述化合物以从来自加压容器或分配器或喷雾器的气溶胶喷雾的形式传送，其包含合适的推进剂，例如，气体，如二氧化碳。

[0212] 全身施用也可以通过经粘膜或经皮方式。对于经粘膜或经皮施用，适合作为渗透阻挡层的渗透剂被用于制剂中。这样的渗透剂在本领域中通常是公知的，并且包括，例如，对于经粘膜施用，洗涤剂、胆汁盐和夫西地酸衍生物。经粘膜施用可以通过使用鼻喷雾剂或栓剂来实现。对于经皮施用，将活性化合物配制成如本领域中公知的软膏剂、油膏剂、凝胶剂或乳膏。

[0213] 所述化合物可以用保护化合物免于从身体快速流失的药学上可接受的载体，例如控释制剂，包括植入物和微囊化传送系统来制备。可以使用可生物降解的、生物相容的聚合物，如乙烯乙酸乙烯酯、聚酐、聚乙醇酸、胶原、聚原酸酯和聚乳酸。用于制备此类制剂的方法对本领域技术人员是显而易见的。该材料也可以从Alza公司和Nova制药公司购得。脂质体悬浮液(包括针对病毒抗原的靶向感染的细胞单克隆抗体脂质体)也可以用作药学上可接受的载体。

[0214] 配制成易于施用和剂量均匀的剂量单位形式的口服或肠胃外组合物是特别有利的。所述剂量单位形式指适合作为单一剂量用于治疗受试者的物理上的离散单元；每个单元含有经计算以产生与所需的药物载体联合产生期望的治疗效果的活性化合物的预定的量。对于本发明的剂量单位形式的规格由决定和直接取决于活性化合物的独特特征和要实

现的特定的治疗效果。

[0215] 在治疗应用中，在影响所选剂量的其他因素中，按照本发明使用的药物组合物的剂量取决于药剂、年龄、体重和受者患者的临床状况，以及临床医师或医师施用治疗的经验和判断力。剂量可以是从约0.01mg/kg至约100mg/kg。在优选的方面，剂量可以是从约0.01mg/kg至约10mg/kg。在一个方面，所述剂量可以是从约1mg至约1g；约10mg至约500mg；约20mg至约400mg；约40mg至约400mg；或约50mg至约400mg，单一的、分开的或连续的剂量(其剂量可以根据患者以kg的体重、以m^2的体表面积和以年为单位的年龄调节)。在某些实施例中，每剂型的量可以为约0.1mg至约1000mg，例如，约0.1mg、约0.5mg、约1mg、约2mg，、约3mg、约4mg、约5mg、约6mg、约7mg、约8mg、约9mg、约10mg、约15mg、约20mg、约25mg、约30mg、约35mg、约40mg、约45mg、约50mg、约55mg、约60mg、约65mg、约70mg、约75mg、约80mg、约85mg、约90mg、约95mg、约100mg、约200mg、约300mg、约400mg、约500mg、约600mg、约700mg、约800mg、约900mg或约1000mg。在一个实施例中，所述量可以为约20mg。在一个实施例中，所述量可以为约50mg。在另一个实施例中，所述剂量可以是100mg。

[0216] 式(I)的化合物或其药学上可接受的盐，例如，本发明的化合物12-24中的任意一种或其药学上可接受的盐，被配制成药物组合物或被用于制备治疗病毒感染和/或与病毒感染有关的疾病和/或病症的药物。式(I)的化合物或其药学上可接受的盐(例如化合物12-24中的任意一种或其药学上可接受的盐)的组合物和/或药物被配制成片剂或悬浮液。式(I)的化合物或其药学上可接受的盐(例如，化合物12-24中的任意一种或其药学上可接受的盐)的片剂被配制成包含药理学上可接受的缓冲剂、赋形剂、载体，包括乳化剂、增强剂(如吸收促进剂)、崩解剂(例如，聚乙烯聚吡咯烷酮(polyvinyl polypyrrolidone、PVPP、交聚维酮、交聚烯吡酮或E1202)，其为高度交联改性的聚乙烯吡咯烷酮(PVP))，和/或在本发明中公开的和众所周知的聚合物。

[0217] 在一个实施例中，本发明提供了式(I)的化合物或其药学上可接受的盐(例如，化合物12-24中任意一种或其药学上可接受的盐)的片剂制剂在预防性治疗或预防病毒感染和/或与病毒感染有关的疾病或病症中的应用。本发明提供了式(I)的化合物或其药学上可接受的盐(例如，化合物12-24中任意一种或其药学上可接受的盐)的片剂制剂在治疗需要这种治疗的受试者(包括但不限于免疫受试者，或器官和/或组织移植前或后的受试者)中的应用。本发明提供了式(I)的化合物或其药学上可接受的盐(例如，化合物12-24中的任意一种或其药学上可接受的盐)在用于治疗需要这种治疗的受试者(包括但不限于，免疫受试者，或器官和/或组织移植前或后的受试者)的药物的制备中的应用。

[0218] 在一个实施例中，化合物12或化合物13，或其药学上可接受的盐，被配制成用于预防性治疗或预防病毒感染和/或与病毒感染有关的疾病或病症的片剂。在一些实施例中，化合物12或化合物13，或其药学上可接受的盐，被配制成用于治疗免疫受试者，或器官和/或组织移植前或后的受试者的片剂。在一些实施例中，化合物12或化合物13，或其药学上可接受的盐，被配制成用于制备用于治疗需要这种治疗的受试者(包括但不限于免疫受试者，或器官和/或组织移植前或后的受试者)的药物的片剂。

[0219] 在一个实施例中，式(I)的化合物或其药学上可接受的盐(例如，化合物12-24中任意一种或其药学上可接受的盐)的100mg片剂制剂包括硅化微晶纤维素(Prosolv 90)(约27.8%wt/片)、交联聚乙烯吡咯烷酮(Polyplasdone XL-10)(约22%wt/片)、微晶纤维素和

甘露糖醇(Avicel HFE102)(约3.7%wt/片)、微晶纤维素(AVICEL®PHE102)(约11.4%wt/片)、甘露糖醇(Pearlitol 100 SD)(约33.9%wt/片)、胶体二氧化硅(CAB-O-SIL®)(0.5%wt/片)和硬脂酸镁(0.5%wt/片)。

[0220] 在一个实施例中,本发明提供了式(I)的化合物或其药学上可接受的盐(例如,化合物12-24中的任意一种或其药学上可接受的盐)的悬浮液制剂在预防性治疗或预防病毒感染和/或与病毒感染有关的疾病和/或病症中的应用。本发明提供了式(I)的化合物或其药学上可接受的盐(例如,化合物12-24中任意一种或其药学上可接受的盐)的悬浮液制剂在治疗需要这种治疗的受试者(包括但不限于免疫受试者,或器官和/或组织移植前或后的受试者)中的应用。

[0221] 在本发明另一个实施例中,另外的赋形剂包括但不限于磷酸钠、二元碱、柠檬酸(一水合物)(约0.06%wt)、柠檬酸钠(约0.10%wt)、黄原胶(约0.04%wt)、对羟基苯甲酸甲酯(钠盐)(约0.17%wt)、对羟基苯甲酸丙酯(钠盐)(约0.02%wt)、三氯蔗糖(约0.05%wt)、微晶纤维素和羧甲基纤维素钠(VivaPur MCG591)(约1.56%wt)、高果糖玉米糖浆(约55%wt)、酸柠檬香料(WONF220J15)(约0.40%wt)、氢氧化钠小丸、氢氧化钠/盐酸和纯净水(约68.93%wt)。

[0222] 本发明的制剂用于治疗与病毒感染有关的终末器官损伤,例如,治疗、预防和/或改善受试者中与终末器官损伤有关的BKV感染。

[0223] 本发明的制剂用于制备预防性治疗和/或预防病毒感染和/或与病毒有关的疾病和/或病症的药物。

[0224] 在一个实施例中,式(I)的化合物或其药学上可接受的盐(例如,化合物12-24中任意一种或其药学上可接受的盐)以约100mg(片剂或悬浮液制剂)的剂量每周两次被施用。在一些实施例中,施用持续十个总剂量。例如,式(I)的化合物可以以约100mg的剂量一周两次持续五周(即,十个总剂量)被施用。或者,式(I)的化合物可以以约200mg的负荷剂量接着约100mg剂量每周连续两次施用。在一些实施例中,施用持续十个总剂量。例如,式(I)的化合物可以以约200mg的负荷剂量接着9个另外的约100mg剂量每周两次共十个总剂量被施用。在本发明的一个实施例中,式(I)的化合物可以每天按约20-200mg/天的范围的剂量或每周按约200mg-2000mg的范围的剂量给药。

[0225] 在另一个实施例中,式(I)的化合物或其药学上可接受的盐(例如,化合物12-24中任意一种或其药学上可接受的盐)的片剂或悬浮液,以约40-1000mg的剂量每天、一周一次(QW)或一周两次(BIW)被施用。在另一个实施例中,式(I)的化合物或其药学上可接受的盐(例如,化合物12-24中任意一种或其药学上可接受的盐)的片剂或悬浮液,以约40-400mg的剂量每天、一周一次(QW)或一周两次(BIW)被施用。

[0226] 在另一个实施例中,本发明提供了具有令人满意的药物动力学特性的组合物(例如,药物组合物)。例如,本发明的组合物可提供血液水平的式(I)的化合物或其药学上可接受的盐(例如,化合物12-24中任意一种或其药学上可接受的盐),其代谢成治疗活性形式(例如,三磷酸盐等同物)后,产生的代谢物的血液水平不会诱导毒性(例如,肾毒性)。

[0227] 药剂的有效量是提供能够被临床医生或其他合格的观察者注意到的客观识别的改善的量。本发明所用术语“剂量有效方式”指在受试者或细胞中产生所需生物效果的活性化合物的量。

[0228] 在另一个实施例中，式(I)的化合物或其药学上可接受的盐，例如，化合物12-24中任意一种或其药学上可接受的盐，以单剂量被施用给受试者。在另一个实施例中，式(I)的化合物或其药学上可接受的盐，例如，化合物12-24中的任意一种或其药学上可接受的盐，以多剂量被施用给受试者。多剂量可以定期施用，例如，每12小时一次，每天一次，每2天，每3天，每4天，每5天，每6天，每7天，每8天，每9天，每10天，每11天，每12天，每13天，每14天或每15天。例如，剂量可每周两次被施用。此外，每个单独的剂量可以以相同的或不同的剂量被施用。

[0229] 例如，受试者可以被施用式(I)的化合物中的任意一种或其药学上可接受的盐(例如，化合物12-24中任意一种或其药学上可接受的盐)，首先施用约1-20mg/kg(例如，约1-1.1mg/kg，约1.1-1.2mg/kg，约1.2-1.3mg/kg，约1.3-1.4mg/kg，约1.4-1.5mg/kg，约1.5-1.6mg/kg，约1.6-1.7mg/kg，约1.7-1.8mg/kg，约1.8-1.9mg/kg，约1.9-2.0mg/kg，约2.0-2.1mg/kg，约2.1-2.2mg/kg，约2.2-2.3mg/kg，约2.3-2.4mg/kg，约2.4-2.5mg/kg，约2.5-2.6mg/kg，约2.6-2.7mg/kg，约2.7-2.8mg/kg，约2.8-2.9mg/kg，约2.9-3.0mg/kg，约3.0-3.1mg/kg，约3.1-3.2mg/kg，约3.2-3.3mg/kg，约3.3-3.4mg/kg，约3.4-3.5mg/kg，约3.5-3.6mg/kg，约3.6-3.7mg/kg，约3.7-3.8mg/kg，约3.8-3.9mg/kg，约3.9-4.0mg/kg的第一剂量的化合物12-24中的任意一种(或其药学上可接受的盐)，随后在这周或下周施用1-4mg/kg(例如，约1-1.1mg/kg，约1.1-1.2mg/kg，约1.2-1.3mg/kg，约1.3-1.4mg/kg，约1.4-1.5mg/kg，约1.5-1.6mg/kg，约1.6-1.7mg/kg，约1.7-1.8mg/kg，约1.8-1.9mg/kg，约1.9-2.0mg/kg，约2.0-2.1mg/kg，约2.1-2.2mg/kg，约2.2-2.3mg/kg，约2.3-2.4mg/kg，约2.4-2.5mg/kg，约2.5-2.6mg/kg，约2.6-2.7mg/kg，约2.7-2.8mg/kg，约2.8-2.9mg/kg，约2.9-3.0mg/kg，约3.0-3.1mg/kg，约3.1-3.2mg/kg，约3.3-3.4mg/kg，约3.4-3.5mg/kg，约3.5-3.6mg/kg，约3.6-3.7mg/kg，约3.7-3.8mg/kg，约3.8-3.9mg/kg，约3.9-4.0mg/kg，约4.0-5.0mg/kg，约5.0-6.0mg/kg，约6.0-7.0mg/kg，约7.0-8.0mg/kg，约8.0-9.0mg/kg，约9.0-10.0mg/kg，或约10-20mg/kg的一个或多个另外剂量的化合物12-24中的任意一种(或其药学上可接受的盐)。例如，受试者可以被施用约3mg/kg的第一剂量，随后施用约1mg/kg的一个或多个另外剂量。例如，受试者可以被施用约2mg/kg的第一剂量，随后施用约3mg/kg的一个或多个另外剂量。例如，受试者可以被施用约4mg/kg的第一剂量，随后施用的约4mg/kg的一个或多个另外剂量。

[0230] 多剂量也可以在可变的时间间隔施用。例如，第2、3、4、5、6、7或8或更多个剂量可以以6天间隔被施用，随后以7天间隔被施用另外的剂量。例如，第2、3、4、5，、6、7或8或更多个剂量可以以7天间隔被施用，随后以3天间隔被施用另外的剂量。

[0231] 在一个实施例中，式(I)的化合物或其药学上可接受的盐，例如，化合物12-24中任意一种或其药学上可接受的盐，以约40-1000mg的剂量每周一次，或以约40-1000mg的剂量每周两次被施用给受试者。

[0232] 在另外的实施例中，本发明提供了一种延缓发病、降低风险或在感染BKV的受试者中治疗终末器官损害或损伤的方法，所述方法包括向受试者口服施用包含治疗有效量的选自化合物12-24中的任意一种化合物或其药学上可接受的盐。

[0233] 在一些实施例中，用本发明的一种或多种化合物治疗的受试者是HSCT后受试者。在其他实施例中，用本发明的一种或多种化合物治疗的受试者具有终末器官损伤，其中，受

影响的器官包括但不限于肾、输尿管、膀胱、前列腺或尿道。

[0234] 在一些实施例中，用本发明的一种或多种化合物治疗的受试者是HCV受试者。在其他实施例中，用本发明的一种或多种化合物治疗的受试者具有终末器官损伤，其中，受影响的器官包括但不限于肾、输尿管、膀胱、前列腺或尿道。

[0235] 在一些实施例中，本发明提供了一种通过向受试者口服施用包括治疗有效量的选自化合物12-24中的任意一种化合物或其药学上可接受的盐来减少HCV的发病率的方法。

[0236] 在一些实施例中，本发明提供了一种通过向存在BKV感染再激活风险的受试者口服施用包括治疗有效量的选自化合物12-24中的任意一种化合物或其药学上可接受的盐的药物组合物来减少血尿或肾功能损害的发病率的方法。

[0237] 在一些实施例中，本发明的化合物降低了在存在BKV感染再激活风险的受试者中的血尿或肾功能损害的发病率，其中所述受试者是HSCT后受试者。在另外的实施例中，本发明提供了用于降低所述受试者中的BKV感染再激活的式(I)的化合物或其药学上可接受的盐的药物组合物。本发明的药物组合物降低了受试者中的BK病毒载量，并延缓发病或降低终末器官损伤或损害的风险。终末器官包括但不限于肾、输尿管、膀胱、前列腺和尿道。

[0238] 在一些实施例中，本发明的药物组合物每天、每周一次(QW)或每周两次(BIW)以约40-1000mg的式(I)的化合物(例如，化合物12-24或其药学上可接受的盐)被施用。本发明的药物组合物每天、每周一次(QW)或每周两次(BIW)以约40mg、50mg，75mg、100mg、150mg、175mg、200mg、250mg、275mg、300mg、325mg、350mg、375mg、400mg、450mg、500mg、500-600mg、600-700mg、700-800mg、800-900mg或900-1000mg，或每周两次以约40mg、50mg、75mg、100mg、150mg、175mg、200mg、250mg、275mg、300mg、325mg、350mg、375mg或400mg、450mg、500mg、500-600mg、600-700mg、700-800mg、800-900mg或900-1000mg的化合物12-24或其药学上可接受的盐，被施用。

[0239] 本发明的化合物在HSCT后之后第1、2、3、4、5、6、7或至10天以1-20mg/kg，例如，1.25mg/kg，2.5mg/kg，5.0mg/kg，10.0mg/kg，或20.0mg/kg的剂量被施用。1-20mg/kg的本发明的化合物可以每周一次或每周两次被施用。在一个实施例中，所述治疗以1-20mg/kg的每周一次施用开始，然后1-20mg/kg的两周施用直至满足需要。

[0240] 本发明提供了以约1-20mg/kg的剂量(例如，约1-1.1mg/kg，约1.1-1.2mg/kg，约1.2-1.3mg/kg，约1.3-1.4mg/kg，约1.4-1.5mg/kg，约1.5-1.6mg/kg，约1.6-1.7mg/kg，约1.7-1.8mg/kg，约1.8-1.9mg/kg，约1.9-2.0mg/kg，约2.0-2.1mg/kg，约2.1-2.2mg/kg，约2.2-2.3mg/kg，约2.3-2.4mg/kg，约2.4-2.5mg/kg，约2.5-2.6mg/kg，约2.6-2.7mg/kg，约2.7-2.8mg/kg，约2.8-2.9mg/kg，约2.9-3.0mg/kg，约3.0-3.1mg/kg，约3.1-3.2mg/kg，约3.2-3.3mg/kg，约3.3-3.4mg/kg，约3.4-3.5mg/kg，约3.5-3.6mg/kg，约3.6-3.7mg/kg，约3.7-3.8mg/kg，约3.8-3.9mg/kg，约3.9-4.0mg/kg，约4.0-5.0mg/kg，约5.0-6.0mg/kg，约6.0-7.0mg/kg，约7.0-8.0mg/kg，约8.0-9.0mg/kg，约9.0-10.0mg/kg，约10-15mg/kg，或约15-20mg/kg)施用的式(I)的化合物，例如，化合物12-24中任意一种(或其药学上可接受的盐)。

[0241] 在一些实施例中，本发明提供了被配制成药物组合物的式(I)的化合物，例如，化合物12-24中任意一种(或药学上可接受的盐)。在一个实施例中，式(I)的化合物，例如，化合物12-24中任意一种(或药学上可接受的盐)被配制成片剂。在另一个实施例中，式(I)的

化合物，例如，化合物12-24中任意一种(或药学上可接受的盐)被配制成悬浮液。

[0242] 本发明提供了采用本发明的化合物的病毒感染的治疗和/或预防。式(I)所示的化合物被用于治疗、预防至少一种病毒和/或制备用于治疗和/或预防至少一种病毒的药物，所述至少一种病毒选自腺病毒、CMV、JCV、BKV、SV40、MCV、KIV、WUV、EBV、牛痘病毒、单纯疱疹病毒1型(HSV-1)、单纯疱疹病毒2型(HSV-2)、人类疱疹病毒6型(HHV-6)、人类疱疹病毒8(HHV-8)、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、水痘带状疱疹病毒(VZV)、典型天花、类天花、天花、牛痘、骆驼痘、猴痘、脊髓灰质炎病毒、埃博拉病毒、马尔堡病毒、肠道病毒(例如，EV68和EV71)、乳头状瘤病毒、人类免疫缺陷病毒(HIV)、流感及其组合。

[0243] 在一些实施例中，本发明提供了一种通过向有需要的受试者口服施用治疗有效量的选自化合物12-24的化合物或其药学上可接受的盐的药物组合物来治疗、预防或延缓CMV感染或与CMV感染有关的疾病或病症的方法。

[0244] 在一些实施例中，本发明提供了一种通过向有需要的受试者口服施用治疗有效量的选自化合物12-24的化合物或其药学上可接受的盐的药物组合物来治疗、预防或延缓HCV感染或与HCV感染有关的疾病或病症的方法。

[0245] 在一些实施例中，本发明提供了一种通过向有需要的受试者口服施用治疗有效量的选自化合物12-24的化合物或其药学上可接受的盐的药物组合物来治疗、预防或延缓马尔堡病毒感染或与马尔堡病毒感染有关的疾病或病症的方法。

[0246] 在一些实施例中，本发明提供了一种通过向有需要的受试者口服施用治疗有效量的选自化合物12-24的化合物或其药学上可接受的盐的药物组合物来治疗、预防或延缓埃博拉病毒感染或与埃博拉病毒感染有关的疾病或病症的方法。

[0247] 在一些实施例中，本发明提供了一种通过向有需要的受试者口服施用治疗有效量的选自化合物12-24的化合物或其药学上可接受的盐的药物组合物来治疗、预防或延缓肠道病毒感染或与肠道病毒感染有关的疾病或病症的方法。

[0248] 治疗病毒感染(例如，CMV感染或与CMV感染有关的疾病或病症或HCV感染或与HCV感染有关的疾病或病症)的受试者每周一次或每周两次施用约40mg、50mg、75mg、100mg、150mg、175mg、200mg或250mg的选自化合物12-24的化合物或其药学上可接受的盐。本发明提供了对CMV感染或与CMV感染有关的疾病或病症或HCV感染或与HCV感染有关的疾病或病症的受试者的治疗，通过向受试者施用每周一次(QW)约200mg或每周两次(BIW)约100mg的选自化合物12-24的化合物或其药学上可接受的盐。在一个实施例中，每周两次(BIW)用约100mg的化合物治疗受试者。在另一个实施例中，每周一次(QW)用约200mg或每周两次(BIW)用约100mg的化合物治疗受试者。CMV感染或与CMV感染有关的疾病或病症或HCV感染或与HCV感染有关的疾病或病症的治疗的受试者是HSCT受试者并且接受异基因干细胞移植。

[0249] 本发明还提供了一种通过向受试者施用包括治疗有效量的选自化合物12-24的化合物或其药学上可接受的盐的药物组合物来预防性治疗、预防或延缓CMV感染或与CMV感染有关的疾病或病症的方法。

[0250] 本发明还提供了一种通过向受试者施用包括治疗有效量的选自化合物12-24的化合物或其药学上可接受的盐的药物组合物来预防性治疗、预防或延缓HCV感染或与HCV感染有关的疾病或病症的方法。

[0251] 本发明进一步提供了一种预防性治疗、预防或延缓马尔堡病毒感染或与马尔堡病

毒感染有关的疾病或病症的方法，通过向受试者施用包括治疗有效量的选自化合物12-24的化合物或其药学上可接受的盐的药物组合物，并结合施用选自免疫抑制剂和抗病毒剂的一种或多种化合物或组合物。

[0252] 本发明进一步提供了一种预防性治疗，预防，或延缓埃博拉病毒感染或与埃博拉病毒感染有关的疾病或病症的方法，通过向受试者施用包括治疗有效量的选自化合物12-24中的一种化合物或其药学上可接受的盐的药物组合物，并结合施用选自免疫抑制剂和抗病毒剂中的一种或多种化合物或组合物。

[0253] 本发明进一步提供了一种预防性治疗、预防或延缓肠道病毒感染或与肠道病毒感染有关的疾病或病症的方法，通过向受试者施用包括治疗有效量的选自化合物12-24中的一种化合物或其药学上可接受的盐的药物组合物，并结合施用选自免疫抑制剂和抗病毒剂的一种或多种化合物或组合物。

[0254] 本发明进一步提供了一种预防性治疗、预防或延缓病毒感染或与病毒感染有关的疾病或病症(例如，人类巨细胞病毒(HCMV)、BK病毒(BKV)、爱泼斯坦-巴尔病毒(EBV)、腺病毒、JC病毒(JCV)、SV40、MC病毒(MCV)、KI病毒(KIV)、WU病毒(WUV)，牛痘病毒、单纯疱疹病毒1型(HSV-1)、单纯疱疹病毒2型(HSV-2)、人类疱疹病毒6型(HHV-6)、人类疱疹病毒8型(HHV-8)、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、水痘带状疱疹病毒(VZV)、典型天花、类天花、天花、牛痘、骆驼痘、猴痘、脊髓灰质炎病毒、埃博拉病毒、马尔堡病毒、肠道病毒、乳头状瘤病毒以及人类免疫缺陷病毒(HIV))的方法，通过向受试者口服施用包括治疗有效量的选自化合物12-24的化合物或其药学上可接受的盐的药物组合物，并结合施用选自免疫抑制剂和抗病毒剂的一种或多种化合物或组合物。

[0255] 在一些实施例中，本发明的药物组合物与选自咪达唑仑、环孢霉素A、他克莫司、更昔洛韦、缬更昔洛韦、膦甲酸钠、西多福韦、二线抗CMV药、二线抗HCV药物、膦甲酸、非格司亭、培非司亭、糖皮质激素如布地奈德、倍氯米松、广谱CYP抑制剂氨基苯并三唑或其组合的一种或多种化合物或组合物结合施用。

[0256] 在一些实施例中，本发明还涉及使用一种本发明的化合物(例如，化合物12-24)或其药学上可接受的盐的PV相关的例如JCV相关的、多灶性脑白质病(PVML)或与PV相关的肾病的治疗。

[0257] 本发明提供了使用式(I)的化合物或其药学上可接受的盐治疗受试者，其中，受试者是免疫受损的。在一个实施例中，所述免疫受损的受试者是免疫抑制药物的移植患者。在一些实施例中，免疫受损的受试者感染HIV。

[0258] 在另外的实施例中，化合物与至少一种其它的免疫抑制剂结合施用。在一个实施例中，免疫抑制剂同时或顺序施用。免疫抑制剂包括但不限于达利珠单抗、巴利昔单抗、他克莫司，西罗莫司、霉酚酸酯、环孢菌素A、糖皮质激素、抗CD3单克隆抗体、抗胸腺细胞球蛋白、抗CD52单克隆抗体、硫唑嘌呤、依维莫司、更生霉素、环磷酰胺、铂磷酰胺、亚硝基脲、甲氨蝶呤、巯嘌呤、莫罗单抗、干扰素γ、英夫利昔单抗、依那西普、阿达木单抗、他珠单抗、芬戈莫德及其组合。

[0259] 在另一个实施例中，本发明提供了一种用于受试者中病毒感染的治疗性和/或预防性治疗的口服剂型，其包含纯度等于或大于约91％的式(I)的化合物或其药学上可接受的盐，例如，化合物12-24中任意一种或其药学上可接受的盐，其中，所述口服剂型，以约1-

20mg/kg(例如,约1-1.1mg/kg,约1.1-1.2mg/kg,约1.2-1.3mg/kg,约1.3-1.4mg/kg,约1.4-1.5mg/kg,约1.5-1.6mg/kg,约1.6-1.7mg/kg,约1.7-1.8mg/kg,约1.8-1.9mg/kg,约1.9-2.0mg/kg,约2.0-2.1mg/kg,约2.1-2.2mg/kg,约2.2-2.3mg/kg,约2.3-2.4mg/kg,约2.4-2.5mg/kg,约2.5-2.6mg/kg,约2.6-2.7mg/kg,约2.7-2.8mg/kg,约2.8-2.9mg/kg,约2.9-3.0mg/kg,约3.0-3.1mg/kg,约3.1-3.2mg/kg,约3.2-3.3mg/kg,约3.3-3.4mg/kg,约3.4-3.5mg/kg,约3.5-3.6mg/kg,约3.6-3.7mg/kg,约3.7-3.8mg/kg,约3.8-3.9mg/kg,约3.9-4.0mg/kg,约4.0-5.0mg/kg,约5.0-6.0mg/kg,约6.0-7.0mg/kg,约7.0-8.0mg/kg,约8.0-9.0mg/kg,约9.0-10.0mg/kg,或约10-20mg/kg))的剂量的所述化合物施用给人类后,提供针对HCMV UL54的抗性突变体AD169的约0.06-0.04的EC_{50}(μM),例如,约0.059、0.058、0.057,、0.056、0.055、0.054、0.053、0.052、0.051、0.050、0.049、0.048、0.047、0.046、0.045、0.044、0.043、0.042,0.041或0.040。在一个实施例中,针对HCMV UL54的抗性突变体AD169的化合物12和/或化合物13的EC_{50}(μM)为约0.052。EC_{50}通过任何本领域中公知的方法确定,并且如本文实施例中所述。

[0260] 在另一个实施例中,本发明提供了一种用于受试者中病毒感染的治疗性和/或预防性治疗的口服剂型,其包含纯度等于或大于约91%的式(I)的化合物或其药学上可接受的盐,例如,化合物12-24中任意一种或其药学上可接受的盐,其中,所述口服剂型,以约1-20mg/kg(例如,约1-1.1mg/kg,约1.1-1.2mg/kg,约1.2-1.3mg/kg,约1.3-1.4mg/kg,约1.4-1.5mg/kg,约1.5-1.6mg/kg,约1.6-1.7mg/kg,约1.7-1.8mg/kg,约1.8-1.9mg/kg,约1.9-2.0mg/kg,约2.0-2.1mg/kg,约2.1-2.2mg/kg,约2.2-2.3mg/kg,约2.3-2.4mg/kg,约2.4-2.5mg/kg,约2.5-2.6mg/kg,约2.6-2.7mg/kg,约2.7-2.8mg/kg,约2.8-2.9mg/kg,约2.9-3.0mg/kg,约3.0-3.1mg/kg,约3.1-3.2mg/kg,约3.2-3.3mg/kg,约3.3-3.4mg/kg,约3.4-3.5mg/kg,约3.5-3.6mg/kg,约3.6-3.7mg/kg,约3.7-3.8mg/kg,约3.8-3.9mg/kg,约3.9-4.0mg/kg,约4.0-5.0mg/kg,约5.0-6.0mg/kg,约6.0-7.0mg/kg,约7.0-8.0mg/kg,约8.0-9.0mg/kg,约9.0-10.0mg/kg,或约10-20mg/kg))的剂量的所述化合物施用给人类后,提供针对HCMV UL54的抗性突变体D542E的约6.0-4.0的EC_{50}μM,例如,约6.0-5.9、5.9-5.8、5.8-5.7、5.7-5.6、5.6-5.5、5.5-5.4、5.4-5.3、5.3-5.2、5.2-5.1、5.1-5.0、5.0-4.9、4.9-4.8、4.8-4.7、4.7-4.6、4.6-4.5、4.5-4.4、4.4-4.3、4.3-4.2、4.2-4.1或4.1-4.0。在一个实施例中,针对HCMV UL54的抗性突变体D542E的化合物12和/或化合物13的EC_{50}(μM)为约5.41。

[0261] 在另一个实施例中,本发明提供了一种口用于受试者中病毒感染的治疗性和/或预防性治疗的服剂型,其包含纯度等于或大于约91%的式(I)的化合物或其药学上可接受的盐,例如,化合物12-24中任意一种或其药学上可接受的盐,其中,所述口服剂型,以约1-20mg/kg(例如,约1-1.1mg/kg,约1.1-1.2mg/kg,约1.2-1.3mg/kg,约1.3-1.4mg/kg,约1.4-1.5mg/kg,约1.5-1.6mg/kg,约1.6-1.7mg/kg,约1.7-1.8mg/kg,约1.8-1.9mg/kg,约1.9-2.0mg/kg,约2.0-2.1mg/kg,约2.1-2.2mg/kg,约2.2-2.3mg/kg,约2.3-2.4mg/kg,约2.4-2.5mg/kg,约2.5-2.6mg/kg,约2.6-2.7mg/kg,约2.7-2.8mg/kg,约2.8-2.9mg/kg,约2.9-3.0mg/kg,约3.0-3.1mg/kg,约3.1-3.2mg/kg,约3.2-3.3mg/kg,约3.3-3.4mg/kg,约3.4-3.5mg/kg,约3.5-3.6mg/kg,约3.6-3.7mg/kg,约3.7-3.8mg/kg,约3.8-3.9mg/kg,约3.9-4.0mg/kg,约4.0-5.0mg/kg,约5.0-6.0mg/kg,约6.0-7.0mg/kg,约7.0-8.0mg/kg,约8.0-9.0mg/kg,约9.0-10.0mg/kg,或约10-20mg/kg))的剂量的所述化合物施用给人类后,提供

针对HCMV UL54的抗性突变体GDF^{R}P53的约0.2-0.15的EC_{50}μM，例如，约0.2-0.19、0.19-0.18、0.18-0.17，、0.17-0.16或0.16-0.15。在一个实施例中，针对HCMV UL54的抗性突变体GDF^{R}P53的化合物12和/或化合物13的EC_{50}(μM)为约0.171。

[0262] 在另一个实施例中，本发明提供了一种用于受试者中病毒感染的治疗性和/或预防性治疗的口服剂型，其包含纯度等于或大于约91％的式(I)的化合物或其药学上可接受的盐，例如，化合物12-24中任意一种或其药学上可接受的盐，其中，所述口服剂型，以约1-20mg/kg(例如，约1-1.1mg/kg，约1.1-1.2mg/kg，约1.2-1.3mg/kg，约1.3-1.4mg/kg，约1.4-1.5mg/kg，约1.5-1.6mg/kg，约1.6-1.7mg/kg，约1.7-1.8mg/kg，约1.8-1.9mg/kg，约1.9-2.0mg/kg，约2.0-2.1mg/kg，约2.1-2.2mg/kg，约2.2-2.3mg/kg，约2.3-2.4mg/kg，约2.4-2.5mg/kg，约2.5-2.6mg/kg，约2.6-2.7mg/kg，约2.7-2.8mg/kg，约2.8-2.9mg/kg，约2.9-3.0mg/kg，约3.0-3.1mg/kg，约3.1-3.2mg/kg，约3.2-3.3mg/kg，约3.3-3.4mg/kg，约3.4-3.5mg/kg，约3.5-3.6mg/kg，约3.6-3.7mg/kg，约3.7-3.8mg/kg，约3.8-3.9mg/kg，约3.9-4.0mg/kg，约4.0-5.0mg/kg，约5.0-6.0mg/kg，约6.0-7.0mg/kg，约7.0-8.0mg/kg，约8.0-9.0mg/kg，约9.0-10.0mg/kg，或约10-20mg/kg))的剂量的所述化合物施用给人类后，提供针对HCMV UL54的抗性突变体4955^{R}的约0.2-0.11的EC_{50}μM，例如，约0.2-0.19，0.19-0.18，0.18-0.17，0.17-0.16，0.16-0.15，0.15-0.14，0.14-0.13，0.13-0.12，或0.12-0.11。在一个实施例中，针对HCMV UL54的抗性突变体4955^{R}的化合物12和/或化合物13的EC_{50}(μM)为约0.143。

[0263] 在一些实施例中，本发明的化合物具有抗各种病毒(例如，单纯疱疹病毒和HCMV)的活性。生物学活性检测方法可以在许多系统中进行，例如，人包皮成纤维细胞或狗肾传代(MDCK)细胞。本发明的化合物的生物活性的一些实例在下面给出。

[0264] 表2在人包皮成纤维细胞中化合物12抗单纯疱疹病毒1(E-377株)和HCMV(AD169株)的活性

[0265]

化合物	HSV-1 EC_{50}, μM	HSV-1 CC_{50}, μM	HSV-1 SI_{50}	HCMV EC_{50}, μM	HCMV CC_{50}, μM	HCMV SI_{50}
化合物 12	>50	>50	1	0.052	>50	>961
阿昔洛韦	2.2	>100	>45			
更昔洛韦				1.5	>100	>67

[0266] 表3在人包皮成纤维细胞中化合物12和六癸氧基丙基-西多福韦(HDP-CDV)抗HCMV UL54的抗病性突变体的活性

[0267]

病毒	化合物 12	化合物 12	HDP-CDV	HDP-CDV

[0268]

	EC_{50} μM	EC_{90} μM	EC_{50} μM	EC_{90} μM
AD169	0.052	0.15	0.001	
D542E (HDP-CDV^R)	5.41	>10	0.0295	0.1529
GDG^RP53	0.171	1.552	0.0053	0.0316
4955^R	0.143	0.372	0.0013	0.006

[0269] 表4在人包皮成纤维细胞中化合物12抗牛痘病毒(哥本哈根株)和牛痘病毒(布莱顿株)的活性

[0270]

化合物	VACV EC_{50}, μM	VACV CC_{50}, μM	VACV SI_{50}	CPXV EC_{50}, μM	CPXV CC_{50}, μM	CPXV SI_{50}
化合物 12-001	>10	>10	1	>10	>10	1
西多福韦	22.42	>300	>13	30.52	>300	>10

[0271] 表5在狗肾传代(MDCK)细胞中化合物12抗流感病毒株的活性

[0272]

化合物	A/CA/10/2009 (EC_{50}, μM)	B/FL/4/2006 (EC_{50}, μM)	细胞毒性 (CC_{50},μM)
化合物 12	>4	>4	17.18
奥司他韦	0.17	16.25	>20

[0273] 表6在阿卡塔细胞(Akata cells)中化合物12抗爱泼斯坦-巴尔病毒的活性

[0274]

化合物	DNA 杂交法的疗效 (EC_{50}, μM)	滴度-球蛋白试剂盒的细胞毒性 (CC_{50},μM)
化合物 12	>10	18
阿昔洛韦	7.0	>100

[0275] 表7在MRC-5细胞中抗HCMV和在非洲绿猴肾细胞中抗BKV的化合物12和HDP-CDV的活性

[0276]

化合物	CMV EC_{50}	BKV EC_{50}	MT4 CC_{50}	CMV - SI	BKV - SI

[0277]

	(μM)	(μM)	(μM)	(MT4 CC_{50} /EC_{50})	(MT4 CC_{50} /EC_{50})
化合物 12	0.027 (n=4)	1.55 (n=2)	25.6 (n=7)	948	16.5
HDP-CDV	0.0004 (n=8)	0.018 (n=11)	0.060 (n=6)	150	3.3

[0278] 表8化合物12的体外抗病毒活性

[0279]

病毒	EC_{50} (μM)	CC_{50} (μM)	SI	细胞系
HCMV	0.017, n=12	50, n=4	2941	MRC5
MCMV	1.6, n=2	60, n=1	37.5	MEF
HHV-8	<0.08, n=1	>10, n=1	>125	BCBL-1
HCV	0.57, n=1	>20, n=1	>35	Huh
BKV	2.1, n=4	93, n=1	44	Vero
HBV	3, n=1	34,n=1	11	2.2.15
骨髓灰质炎病毒 3	3.3,n=1	29, n=1	9	Vero 76
HHV-6B	4.7, n=1	8.4, n=1	~2	MOLT-3
埃博拉病毒	1.0, n=1	36.9, n=1	37	Huh

[0280] 表9体外抗病毒活性比较(平均值XC50)

[0281]

化合物	布林西多福韦(BCV)	化合物12	化合物24
HCMV EC_{50} (uM)	0.0003 N = 9	0.017 N = 10	0.008 N = 4
MT4 细胞毒性 CC_{50} (uM)	0.06 N = 10	24.7 N = 8	13.5 N = 6

[0282] 本发明提供了式(I)的化合物或其药学上可接受的盐(例如,化合物12-24中的任意一种的化合物或其药学上可接受的盐),其与HDP-CDV相比具有改进的疗效/毒性比。在一些实施例中,本发明的化合物对CMV的选择性指数(SI)值在900-100之间和/或对BKV的SI值在15-20之间。在一个实施例中,化合物12和/或化合物13对CMV的SI(选择性指数)值为约948和/或对BKV为约16.5,而HDP-CDV对CMV的SI值为约150和对BKV为约3.3。

[0283] 在另一个实施例中,本发明提供了一种用于受试者中病毒感染的治疗性和/或预防性治疗的口服剂型,其包含纯度等于或大于约91%的化合物12-24中任意一种或其药学上可接受的盐,其中,所述口服剂型,以约1-20mg/kg(例如,约1-1.1mg/kg,约1.1-1.2mg/kg,约1.2-1.3mg/kg,约1.3-1.4mg/kg,约1.4-1.5mg/kg,约1.5-1.6mg/kg,约1.6-1.7mg/kg,约1.7-1.8mg/kg,约1.8-1.9mg/kg,约1.9-2.0mg/kg,约2.0-2.1mg/kg,约2.1-2.2mg/

kg，约2.2-2.3mg/kg，约2.3-2.4mg/kg，约2.4-2.5mg/kg，约2.5-2.6mg/kg，约2.6-2.7mg/kg，约2.7-2.8mg/kg，约2.8-2.9mg/kg，约2.9-3.0mg/kg，约3.0-3.1mg/kg，约3.1-3.2mg/kg，约3.2-3.3mg/kg，约3.3-3.4mg/kg，约3.4-3.5mg/kg，约3.5-3.6mg/kg，约3.6-3.7mg/kg，约3.7-3.8mg/kg，约3.8-3.9mg/kg，约3.9-4.0mg/kg，约4.0-5.0mg/kg，约5.0-6.0mg/kg，约6.0-7.0mg/kg，约7.0-8.0mg/kg，约8.0-9.0mg/kg，约9.0-10.0mg/kg，或约10-20mg/kg))的剂量的化合物12-24中任意一种(或其药学上可接受的盐)和所述化合物12-24中任意一种(或其药学上可接受的盐)代谢为三磷酸盐等同物的代谢物施用给人类后，提供了少于化合物12-24(或其药学上可接受的盐)中任意一种的所述化合物的C_{max}的约30％的所述三磷酸盐等同物的C_{max}，例如，少于所述化合物的C_{max}约20％。在一些实施例中，所述代谢物(即，三磷酸盐等同物)的C_{max}少于化合物12-24中的任意一种的C_{max}约50％，45％，40％，35％，30％，25％，20％，15％或10％。

[0284] 组合物的药物代谢动力学在人群中会从受试者到受试者有些变化。上述用于本发明的组合物中所述的数字是基于在人群中的平均行为。本发明旨在包括平均值落在本发明范围内的组合物，尽管可以理解，某些主体可能落在范围之外。

[0285] 所述药物组合物可以与使用说明书一起纳入容器、包装或分配器中。本发明提供了一种包括除了所公开的化合物中的任意一种的药物组合物的与使用说明书一起的容器、包装或分配器的试剂盒。

[0286] 本发明的化合物能够进一步形成盐。所有这些形式也被考虑在要求保护的发明的范围之内。

[0287] 预防由于病毒再激活的疾病或病症的方法

[0288] 本发明还提供了一种在有病毒感染再激活危险的受试者中预防疾病或病症的方法，通过向所述受试者口服施用治疗有效剂量的式(I)的化合物或其药学上可接受的盐(例如化合物12-24中任意一种或其药学上可接受的盐)的药物组合物。在一些实施例中，有再激活危险的病毒可以是BKV。在一些优选的实施例中，有再激活危险的病毒可以是CMV。

[0289] 在一个实施例中，有病毒感染再激活危险的受试者可以是干细胞移植或肾细胞移植接受者。在一个实施例中，受试者可以是HSCT后受试者。在其他实施例中，受试者可以是胰岛细胞移植接受者、骨髓移植接受者、内皮细胞移植接受者、表皮细胞移植接受者、成肌细胞移植接受者、肌肉衍生的干细胞接受者和/或神经干细胞移植接受者。

[0290] 在其他实施例中，受试者可以是胰岛细胞移植接受者、骨髓移植接受者、内皮细胞移植接受者、表皮细胞移植接受者、成肌细胞移植接受者和/或神经干细胞移植接受者。

[0291] 在另一个实施例中，本发明方法防止在HSCT受后试者中的血尿或肾功能损害。在HSCT后患者中血尿和肾功能损害的预防与受试者中的病毒感染的预防有关。在一个实施例中，病毒感染再激活的预防防止所述受试者中血尿和肾功能损害。

[0292] 减少与血尿和/或肾功能损害有关的BKV的发病率的方法

[0293] 本申请还涉及减少与血尿和/或肾功能损害有关的BKV的发病率的方法。本发明的方法防止了均与来自BKV感染的终末器官损伤有关的血尿和肾功能损害的出现。本发明还涉及用式(I)的化合物或其药学上可接受的盐(例如，化合物12或化合物13，或其药学上可接受的盐)减少HSCT后患者中BK病毒负荷增加的危险和/或延缓HSCT后患者中BK病毒负荷增加，从而在这些患者中减少终末器官疾病的危险和/或延缓终末器官疾病的方法。本发明

的药物组合物可以预防终末器官损害或损伤，例如，肾、输尿管、膀胱、前列腺和尿道损害或损伤。

[0294] 在一些实施例中，减少与血尿和/或肾功能损害有关的BKV的发病率的方法提供了将约40-100mg的本发明的化合物每周一次(QW)或每周两次(BIW)施用于受试者来预防或治疗终末器官损害或损伤。在一个实施例中，用约40-1000mg QW或BIW或约100-200mg每周一次或两次治疗受试者。感染了dsDNA病毒(例如，BKV)的受试者每天、每周一次(QW)用约40-100mg或每周两次(BIW)用约40-1000mg的本发明的化合物(例如，化合物12或化合物13，或其药学上可接受的盐)治疗，。在另外的实施例中，每天、一周一次(QW)用约150mg或约200mg，或每周两次(BIW)用约75mg或约100mg的本发明的化合物(例如，化合物12或化合物13，或其药学上可接受的盐)治疗所述受试者。

[0295] 在其他实施例中，用于减少与血尿和/或肾功能损害有关的BKV的发病率的方法提供了用约50-99mg，101-149mg，151-199mg，201-250mg，或＞251mg的剂量治疗受试者，没有带来显著的不利影响(AEs)。在一些实施例中，所述剂量在一周、两周之内或在整个治疗周期中改变。

[0296] 基于治疗突发血尿的发病率评估了式(I)的化合物或其药学上可接受的盐对出血性膀胱炎的出现的影响。本发明提供了用化合物12或化合物13(或其药学上可接受的盐)在基线(BKU+)BKV阳性的HSCT患者中预防血尿(Hem+)。在一个实施例中，与安慰剂组相比，在基线BKV阴性(BKU-)的患者中的Hem+没有显著差异。

[0297] 测量了式(I)的化合物或其药学上可接受的盐对先前存在BKV感染的受试者中的肾功能损害的影响。例如，本发明提供在基线(HSCT移植后)BKV病毒尿症(BKU+)的患者中预防肌酸酐水平的增加和肾功能的恶化，和与安慰剂组相比，所述患者用化合物12或13(或其药学上可接受的盐)治疗。在一个实施例中，化合物12或化合物13(或其药学上可接受的盐)不影响基线BKV病毒尿症阴性(BKU-)的患者中的终末器官损害。在这些患者中，与安慰剂组相比，所述肌酸酐水平不增加。

[0298] 本发明提供了使用式(I)的化合物或其药学上可接受的盐来减少在其尿液中脱落的BKV病毒尿症受试者中的镜下血尿。例如，在治疗期间，即接受化合物12或13或其药学上可接受的盐的药物组合物，患有BKV病毒尿症的受试者，相比接受安慰剂的受试者，血液阳性尿检下降2-10倍。在一些实施例中，在治疗组和安慰剂组之间，血液阳性尿检的差异可能是2-8倍、2-7倍、2-6倍、2-5倍或2-4倍。在没有BK病毒尿症的受试者中，在治疗的患者或未治疗的患者(例如接受安慰剂的患者)之间，血液阳性尿检的比率可能是低的或是相当的。

[0299] 用式(I)的化合物或其药学上可接受的盐治疗的方法对与膀胱活动有关的BK具有有益的效果。例如，高BK病毒尿症测量(例如，$\geq 1\times 10^{10}$拷贝/mL)与临床上重要的活动(例如，AEs为膀胱炎或尿中带血)有关。相比安慰剂治疗的受试者，确认的血液阳性尿液分析的比率可发生在化合物12或化合物13(或其药学上可接受的盐)的治疗的受试者的比率的1/10、1/9、1/8、1/7、1/6、1/5、1/4。在一些实施例中，对于用化合物12或化合物13(或其药学上可接受的盐)治疗的在治疗期间发展BK病毒尿症的受试者，持续的BK病毒尿症的发病率可被减小。

[0300] 本发明实施例的方法涉及作为肾功能标志物的血清肌酸酐的浓度的测量。本发明方法通过计算通过肾脏从体内肌酸酐清除率衡量肾功能。这被称为肌酸酐清除率，并且它

估计通过肾脏(肾小球过滤,或GFR)过滤的速率。肌酐清除率以两种方式测量。它通过使用血清(血液)肌酸酐值、患者的体重和年龄的公式计算。肌酸酐清除率还通过收集24小时的尿液样本进行测量。血液中肌酸酐的正常水平对于男性为0.7-1.3mg/dL和对于女性为0.6-1.1mg/dL。见Creatinine -Blood,Medline Plus,U.S.National Library of Medicine,NIH。如果肾功能不正常,血液中的肌酸酐水平将增加(因为几乎没有肌酸酐通过你的尿液释放)。

[0301] 尿液中的肌酸酐水平超过约1.36mg/mL被视为升高。在本发明的方法中,在治疗期间肌酸酐水平从基线约15%或约25%的增加被认为是临床上重要的变化。

[0302] 本发明的方法提供了使用血红素+1尿检作为替代镜下血尿的评价。在血清肌酸酐测量中治疗结束(最后一个值)提高(例如,>120μM(1.36mg/dl))被认为具有临床意义。通过测量肌酸酐的最后值,其高于正常值,例如,大于>120μM和从基线至少15%或25%的增加,来区分预先存在的肾功能障碍。

[0303] 本发明的方法提供了通过口服施用化合物12或化合物13(或其药学上可接受的盐)来减少BKV阳性患者中的终末器官损害的危险或延缓在BKV阳性患者中的终末器官损害的发病。在治疗期间是BV病毒尿症的受试者由于用化合物12或化合物13(或其药学上可接受的盐)的治疗可表现出有益效果,降低了1.5-4.5倍的肾功能障碍(肌酸酐升高)的发病率。肾功能障碍的发病率可以被减少约1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4.0、4.1、4.2、4.3、4.4或4.5倍。在本发明的BK阳性受试者中,可能存在肌酸酐升高或新发血红素+尿检的1.2-4.4倍的降低。在治疗期间保持BK阴性的受试者中,对于肌酸酐升高或肌酸酐或血红素尿+的综合分析的比率可能会在数值上相似。

[0304] BKV对肾功能和膀胱有影响(血尿、膀胱炎、排尿困难等)。常规化验值的分析(血清肌酸酐升高和新发的存在,证实的血尿)在HSCT后受试者中提供了BK影响的潜在标志。本发明的方法提供了在用化合物12或化合物13(其药学上可接受的盐)治疗的受试者中在治疗期间测定肌酸酐的最终值,肌酸酐水平超过基线的增加%和血红素+1尿检。

[0305] 联合治疗

[0306] 本发明所提供的化合物或组合物也可以与增强剂,与其它活性成分,或与免疫抑制剂组合使用。在某些实施例中,化合物可以与另外的治疗剂或增强剂组合,或相继施用。此类另外的治疗剂包括用于治疗、预防或改善与病毒感染有关的一种或多种病症的公知的那些。应当理解的是,本发明所提供的化合物与一种或多种上述提到的化合物和任选的一种或多种其他药理学活性物质的任意合适的组合也被认为在本发明的保护范围内。在另一个实施例中,本发明所提供的化合物在一种或多种另外的活性成分之前或之后施用。在一个实施例中,两种或多种本发明公开的抗病毒剂连续或组合施用。

[0307] 一些增强剂的量可以使用本领域中公知的的方法来选择以增强抗病毒剂的生物利用度。可以使用通过一些增强剂能提供所期望的反应的任何量。在非限制性的例子中,剂量可以为从0.001mg至约2000mg的化合物每千克体重每天,例如,0.01-500mg/kg,或例如0.1-20mg/kg。

[0308] 本发明提供的与另一种药剂共施用的化合物或组合物在治疗BKV感染、BKV的再激活或预防在感染了BKV的受试者中的终末器官损害或损伤中具有协同效应。这样的组合的

具体实例包括但不限于:化合物12或化合物13(或其药学上可接受的盐)与至少一种免疫抑制剂结合。示例性的免疫抑制剂包括但不限于,达珠单抗、巴利昔单抗、他克莫司、西罗莫司、霉酚酸酯(如麦考酚钠或霉酚酸酯)、环孢霉素A,糖皮质激素、抗CD3单克隆抗体(OKT3)、抗胸腺细胞球蛋白(ATG)、抗CD52单克隆抗体(阿仑单抗1-H)、硫唑嘌呤、依维莫司、更生霉素、环磷酰胺、铂、亚硝基脲、甲氨蝶呤、硫唑嘌呤、巯基嘌呤、莫罗单抗、干扰素γ、英夫利昔单抗、依那西普、阿达木单抗、那他珠单抗(Tysabri或Natalizumab)、芬戈莫德及其组合。在一些实施例中,所述药物组合物包括,例如,化合物12、那他珠单抗(Tysabri或Natalizumab)和药学上可接受的载体。

[0309] 在一个实施例中,本发明所述的药物组合物包括,例如,化合物12或化合物13(或其药学上可接受的盐)和一种或多种用于治疗病毒感染,例如,引起进行性多灶性白质脑病("PML")的多瘤病毒JC病毒("JCV")的药物,在至少一种药学上可接受的载体中。在一个实施例中,所述一种或多种药物选自包含RAPTIVA®(依法利珠单抗)、TYSABRI®(那他珠单抗)、MYFORTIC®(霉酚酸)、AVONEX®(干扰素β-1a)、REMICADE®(英夫利昔单抗)、ENBREL®(依那西普)、HUMIRA®(阿达木单抗)、CELLCEPT®(霉酚酸酯)和它们的组合,在至少一种药学上可接受的载体中。

[0310] 食物的影响

[0311] 在一些实施例中,当受试者在进食或禁食条件下时,本发明的实施例中的药物组合物,例如,片剂或悬浮液,可以提供给受试者。在一个实施例中,包含化合物12或化合物13(或其药学上可接受的盐)的组合物可以提供给空腹受试者,例如,在进食少于24小时但超过12小时、超过11小时、超过10小时、超过8小时或超过5小时后。

[0312] 在其他实施例中,包含化合物12或化合物13(或其药学上可接受的盐)的组合物可以与食物一起或在进食之后提供给受试者。在一个实施例中,化合物12或化合物13(或其药学上可接受的盐)可以被空腹的受试者服用。

[0313] 患者人群

[0314] 在某些实施例中,式(I)的化合物,例如,化合物12或化合物13(或其药学上可接受的盐)(仅在此部分被称为"化合物")、包含化合物的组合物或组合疗法被施用于约1-6个月、6-12个月、1-5岁,、5-10岁、10-15岁、15-20岁、25-30岁、30-35岁、35-40岁、40-45岁、45-50岁、50-55岁、55-60岁,、60-65岁、65-70岁、70-75岁、75-80岁、80-85岁、85-90岁、90-95岁或95-100岁的哺乳动物。

[0315] 在某些实施例中,化合物、包含化合物的组合物或组合疗法被施用给有病毒感染危险的人。在某些实施例中,化合物、包含化合物的组合物或组合疗法被施用于给有病毒感染危险的人。在某些实施例中,所述患者是约1-6个月、6-12个月、1-5岁、5-10岁、10-15岁、15-20岁、25-30岁、30-35岁、35-40岁、40-45岁、45-50岁、50-55岁,、55-60岁、60-65岁、65-70岁、70-75岁、75-80岁、80-85岁、85-90岁、90-95岁或95-100岁的人。

[0316] 在一些实施例中,化合物、包含化合物的组合物或组合疗法被施用于人类婴儿。在其他实施例中,化合物或组合疗法被施用于人类儿童。在其他实施例中,化合物、包含化合物的组合物或组合疗法被施用于成人。在另外其他实施例中,化合物包含化合物的组合物或组合疗法被施用于老年人。

[0317] 本文所用的所有的百分数和比率,除非另有说明,均以重量计。本发明其它的特征

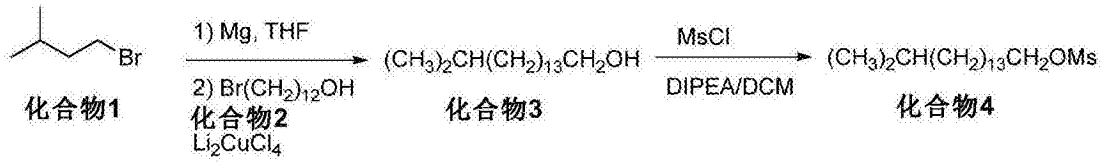
和优点从不同的实施例中显而易见。所提供的实施例说明了用于实施本发明的不同的组分和方法论。所述实施例不限制要求保护的发明。基于本发明公开的内容，本领域技术人员可以识别并使用用于实施本发明的其他组分和方法论。

[0318] 本文提及的所有的专利、专利申请和出版物在此通过整体引用并入本文。然而，在通过引用并入的包含明确定义的一个专利、专利申请或出版物，那些明确定义应当理解为适用于所并入的专利、专利申请或出版物，其中，发现它们不是本申请的文本的其余部分，特别是本申请的权利要求书。

[0319] 实施例

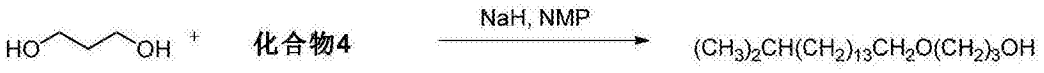
[0320] 实施例1

[0321] 方案1



化合物1 化合物2 化合物3 化合物4

[0322]



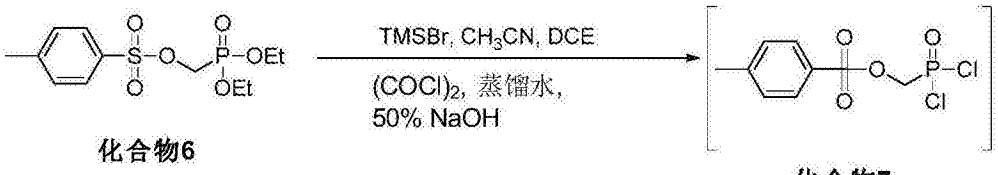
化合物4 化合物5

[0323] 化合物3的合成：向1-溴-3-甲基丁烷(156.6g，1.037mol)的Me-THF(1.252ml)溶液中加入镁屑(30.70g，1.263mol)。在4-5分钟后，温度开始从21.7℃升高至50℃。使用干冰/丙酮浴来控制温度。最终，温度升高至60℃，然后冷却下来。在40℃时，加入一小块碘。然后将溶液加热至61℃并搅拌2小时。然后将加热除去，并将混合物冷却至40℃。将反应混合物进一步冷却至-59℃，并向混合物中加入12-溴-1-十二烷醇(50g，0.189mol)的Me-THF溶液(312.5ml)，以使温度从来不会高于-55℃。在加入12-溴-1-十二烷醇后，紧接着立即加入四氯合铜(II)酸二锂溶液(在THF中0.1M，103.68ml)。将反应物温热至室温并搅拌16小时。薄层色谱法(TCL)(己烷：乙酸乙酯为2:1)表明反应完成(起始原料的R_f为0.48，产物的R_f为0.58)。将反应物冷却至0℃并向反应物中缓慢加入饱和NH_4Cl(750ml)。在加入的过程中温度升高到22℃。用乙酸乙酯(1500ml)反萃取水相。将合并的有机物用盐水(750ml)洗涤，$MgSO_4$干燥，并过滤。将该溶液在40℃的真空中浓缩，得到49g(99％)所需的材料。该材料直接用于下一步骤。

[0324] 化合物4的合成：向化合物3(49g，0.191mol)和N，N-二异丙基乙胺(DIPEA)(27.41g，0.212mol)的二氯甲烷(490ml)的冷溶液(0-5℃)中缓慢地加入甲磺酰氯(24.29g，0.212mol)，以确保温度从来不会升到5℃以上。将反应物温热至室温，并搅拌16小时。向反应混合物中加入甲磺酰氯(0.065mol，7.4g)和DIPEA(0.52mol，6.27g)。将反应物再搅拌24小时。将反应物冷却至6.5℃，缓慢加入水(500ml)。将冷却的反应混合物搅拌2.5小时。将DCM层分离，经Na_2SO_4干燥，并过滤。将该溶液在40℃真空中浓缩。向黄色残留物中加入100ml甲醇。将该溶液在4℃下静置30分钟，沉淀出白色固体。将该有沉淀的固体的溶液过滤，并在空气过滤器中干燥16小时。将滤液浓缩至一半体积，其中，沉淀出另外的固体，然后将其过滤。将从前面两个步骤中合并的固体合并，在甲醇(200ml)中磨碎0.5小时。过滤，干燥白色固体16小时，得到48g(75％)的所需产物。将该材料用于下一步骤。

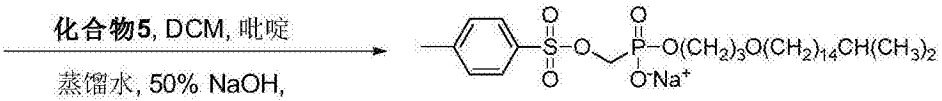
[0325] 化合物5的合成:在30分钟内,向1,3-丙二醇(0.551mol,41.96g)的NMP(225ml)的冷(-5℃)溶液中以小份(约0.5g的小份)加入NaH(0.276mol,11.02g)。将该混合物温热至室温,搅拌30分钟。向该溶液中加入溶解在N-甲基-2-吡咯烷酮(NMP)(225ml)中的化合物4(0.135mol,45g)。将反应物搅拌16小时。TLC(己烷:乙酸乙酯为2:1)指示反应完全。起始原料的R_f为0.62,而产物的R_f为0.53。向反应混合物中加入水(400ml)和乙酸乙酯(800ml)。将有机层和水层分离。用水(2×500ml)洗涤有机层。将该溶液在40℃真空中浓缩。通过加入甲醇(2×200ml)并在40℃真空中浓缩进一步干燥混合物。在甲醇中干燥和浓缩的步骤也用乙腈(2×200ml)重复以得到黄色油状物。向59g黄色油状物中加入120ml乙腈,并将该混合物在0-5℃下搅拌1小时。将从乙腈研磨中形成的蜡状白色固体过滤。将该固体立即转移至一个500ml的圆底烧瓶中,并在旋转蒸发仪中干燥16小时,得到44g材料。该干燥的材料,化合物5,在方案2中使用。

[0326] 方案2



化合物6 化合物7

[0327]

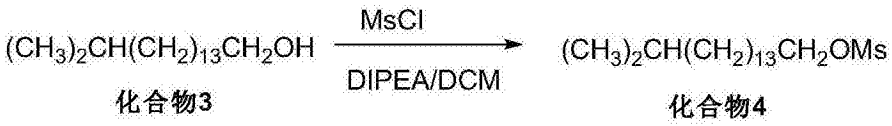


化合物8

[0328] 化合物8的合成:向化合物6(0.146mol,47g)的乙腈(423ml)溶液中加入TMS-Br(0.327mol,50.01g),同时保持约21.7-23.5℃的内部温度。在加入完成后,将内部温度调节到55℃,并搅拌2小时。2小时后,通过在40℃的真空蒸馏除去乙腈和TMS-Br,以形成浓缩物。向浓缩物中加入二氯甲烷(423ml)以形成溶液,随后加入草酰氯(0.327mol,41.46g),同时保持25-40℃的内部温度。在草酰氯加入完成后,加入2滴DMF。将反应混合物搅拌18小时。将该溶液在35℃的外部温度下真空浓缩。将该材料(化合物7)用于下一步骤。

[0329] 向化合物5(0.1272mol,40g)和化合物7(0.1462mol,44.33g)的二氯甲烷(423ml)的冷(-8℃)溶液中加入吡啶(0.381mol,30.18g)。将该反应混合物搅拌3小时。TLC(己烷:乙酸乙酯为2:1)表明化合物5已经被消耗。向反应混合物(冷却至10℃)中加入200ml水。将该混合物搅拌0.5小时。然后分离有机层。向有机层中加入100ml水和75ml甲醇。再次分离有机层,并在35℃真空中浓缩。向残留物中加入200ml丙酮,并浓缩直至留物干燥。向残留物中加入200ml丙酮,并用6N NaOH(约使用15ml)将pH调节至约9.04。将该混合物在4℃下静置16小时。在潜伏期后得到10g白色固体沉淀。过滤有白色固体沉淀的混合物。向混合物中加入另外的300ml丙酮。将混合物再次在4℃下静置16小时。在潜伏期后得到显著量的褐色固体沉淀。过滤该混合物并干燥,得到约18g的产物(化合物8)。进行核磁共振,证明产物为化合物8。该材料在方案3中使用。可替代地将化合物8用下列步骤制备(化合物8的步骤以20g规模,HPLC-ELSD纯度)。

[0330] 化合物4:

[0331] 

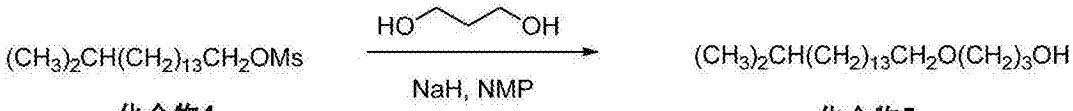
化合物3

(15-甲基十六烷醇)

化合物4

[0332] 向反应器中装入15-甲基-十六烷醇(1.0当量,13.4kg,52.25mol)、二氯甲烷(172.2kg)和N,N-二异丙基乙基胺(1.3当量,8.8kg,67.92mol)。将该混合物冷却至-2.5℃,并在20分钟内向其中加入甲磺酰氯(1.3当量,7.8kg,67.92mol),同时保持≤2℃的温度。在加入完成后,将温度调节至0-5℃并搅拌30分钟。然后将温度调节至20℃,再搅拌30分钟。进程内HPLC-ELSD分析确定15-甲基-十六烷醇已经被消耗。向反应混合物中加入水(40kg)。将其搅拌2小时,然后静置0.5小时。分离各层,并在21.5℃下用水(20kg)洗涤有机层10分钟。然后将各层静置1小时。分离各层,并在≤35℃的温度下浓缩二氯甲烷直至保持在18L的量。向反应器中加入乙醇(23.7kg),该混合物在20℃下搅拌10分钟。将混合物在≤55℃的温度下浓缩直至保持18L的量。该乙醇共沸物进行另外的时间。向该反应器中加入乙醇(15.8kg)。将溶液温热至28.7℃,并搅拌1小时。然后在37分钟内将溶液冷却至0℃。然后将其在0℃下搅拌至少17小时。然后将所得的固体过滤。用乙醇(4.8kg)洗涤反应器,并且其也被转移到过滤器中。将固体转移至盘式干燥器,并在≤35℃的温度下干燥,直到干燥失重(LOD)为≤1%。得到16.1kg(92%)。HPLC-ELSD(AUC)纯度-99.3%。

[0333] 化合物5:

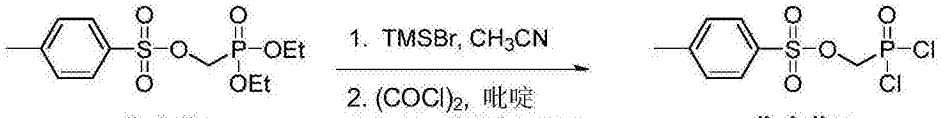
[0334] 

化合物4

化合物5

[0335] 将反应器中装入1,3-丙二醇(4.2当量,15.4kg,201.6mol)和NMP(65.4kg)。将该混合物搅拌并冷却至-3.3℃。在2小时内向该溶液中分批加入氢化钠(60%分散在矿物油中,2当量,3.8kg,96.0mol),以确保温度保持在≤10℃。将温度调节至20℃,并且将该溶液搅拌1小时。以使得温度保持在≤35℃的速度向该反应器中加入化合物4(1当量,16.0kg,48.1mol)的NMP(65.4kg)溶液。用NMP(20kg)洗涤化合物4被混合的反应器,其也被以使得温度保持在≤35℃的速度转移到反应器中。将反应温度调节至35℃并搅拌1小时。然后将反应温度调节至25℃并搅拌15小时。进程内HPLC-ELSD分析确定化合物4被消耗。向反应混合物中加入庚烷(35kg)。然后将溶液冷却至3.6℃,在30分钟内向其中加入水(40kg)同时保持≤20℃的温度。将温度调节至20℃并搅拌10分钟。向该反应器中加入水(380kg)和庚烷(70kg)。将其搅拌10分钟,然后静置30分钟。分离各层,并用庚烷(35kg)的水溶液再萃取。将合并的有机物用盐水(11.6kg)搅拌10分钟,然后静置30分钟。分离各层,并经硫酸钠(3.3kg)干燥有机层。将其搅拌1小时,然后过滤。用庚烷(20kg)洗涤含有硫酸钠的有机层的反应器,其也通过过滤器送出。然后在≤50℃的温度下浓缩溶剂,直到没有观察到进一步的馏出物。向含有产物的反应器中加入乙腈(28.7kg),将其加热至45℃。将其搅拌10分钟,然后冷却至0℃。然后将溶液在0℃下搅拌1小时。然后将所得的固体过滤。用乙腈(4kg)洗涤反应器,并且其也被转移到过滤器中。将该乙腈再次重结晶。将产物在过滤器中干燥1小时。然后将其转移至盘式干燥器,并在22℃下干燥约72小时,此时LOD测定为≤1.0%。得到15.6kg(103.3%)。HPLC-ELSD(AUC)纯度为98.3%。

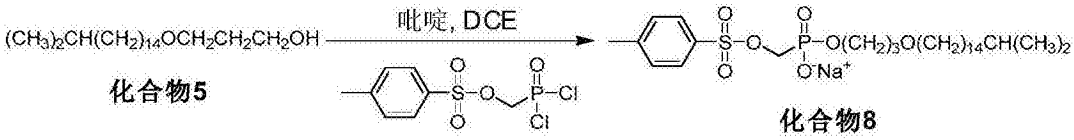
[0336] 化合物7：

[0337] 

化合物6 化合物7

[0338] 向反应器中加入化合物6(1当量,18.8kg,58.3mol)和乙腈(70.7kg)。向该混合物中一次性加入三甲基溴硅烷(2.24当量,20.0kg,130.6mol)。将混合物温热至55℃并搅拌3小时。LC/MS确定化合物6被消耗。将该反应的内容物在≤50℃的温度下浓缩,直到没有观察到进一步的馏出物。向该反应器中加入1,2-二氯乙烷(25kg),并将其在≤50℃的温度下浓缩,直到没有观察到进一步的馏出物。重复另外一次。向该反应器中加入1,2-二氯乙烷(138.2kg)。将温度调节至20℃,并在30分钟内向该溶液中分批加入草酰氯(2.24当量,16.6kg,130.6mol),同时保持温度在≤30℃。将反应温度调节至55℃,并将混合物搅拌3小时。31P NMR分析表明化合物7的转化率仅为57%。在30分钟内向反应混合物中加入二甲基甲酰胺(85g)的1,2-二氯乙烷(4kg)溶液,同时将温度保持在≤30℃。然后将反应混合物在25℃下搅拌1小时。31P NMR分析表明化合物7的转化率为98%。将该反应的内容物在≤50℃的温度下浓缩,直到体积在大约40L以下。向该反应器中加入1,2-二氯乙烷(25kg),并将其在≤50℃的温度下浓缩,直到体积在接近40L以下。将1,2-二氯乙烷共沸物再重复2次,得到40L的终体积。HPLC确定纯度为90.4%。将该材料(化合物7)保持在20℃氮气下,直到下一个步骤(化合物8)。

[0339] 化合物8：

[0340] 

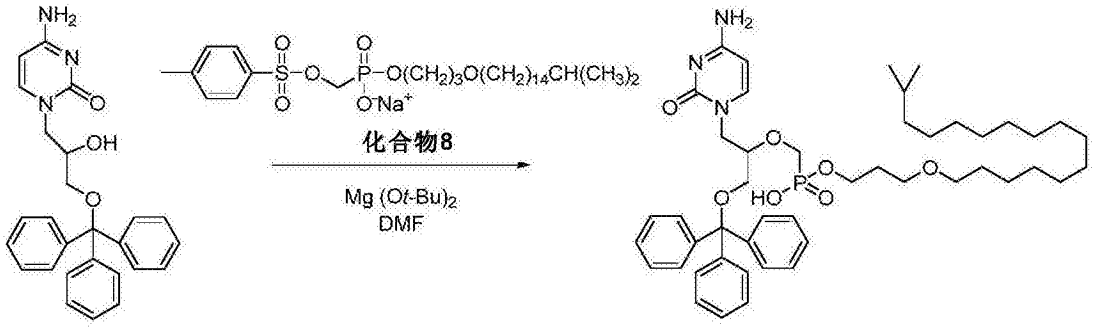
化合物5 化合物8

化合物7

[0341] 向含有来自上述步骤的化合物7(1.25当量,17.7kg,58.3mol)的溶液的反应器中加入化合物5(1当量,14.7kg,46.7mol)和1,2-二氯乙烷(160.0kg)。然后将该混合物冷却至9℃,并在30分钟内向其中分批加入吡啶(3当量,11.1kg,140.1mol)的1,2-二氯乙烷(10kg)溶液,同时保持≤15℃的内部温度。温度从来不会高于10.8℃。将温度调节至10℃并搅拌2小时。进程内HPLC-ELSD分析确定化合物5已经被消耗。将反应物冷却至3℃,并在30分钟内向其中缓慢地加入水(3kg),同时保持≤30℃的温度。温度从来不高于19℃。在接下来的40分钟内加入另外的67kg的水。将温度调节至30℃,将混合物搅拌16小时。停止搅拌,将各层静置23小时。分离各层。向有机层中加入水(50kg)和甲醇(40kg)的混合物。将其在30℃下搅拌30分钟,然后静置30分钟。分离各层,用甲醇/水重复洗涤两次。然后向有机层中加入水(50kg)/甲醇(40kg)/6N HCl(0.6kg)的混合物,将其在30℃下搅拌30分钟。将各层静置沉降30分钟,然后分离。水/甲醇/6N HCl洗涤重复2次。将有机层在≤50℃浓缩,直到没有观察到进一步的馏出物。向含有产物的反应器中加入丙酮(25kg)。将丙酮在≤50℃浓缩,直到没有观察到进一步的馏出物。该共沸物又重复一次。向含有产物的反应器中加入丙酮(100.5kg)。向其中加入7.3kg的6N NaOH溶液。加入NaOH溶液的这个量使得pH值在9.75以上,1N HCl溶液制成,并将0.4kg的该HCl溶液加入到该混合物中,以得到9.68的最终pH。然

后将丙酮溶液冷却至0℃，并向其中加入20g化合物8种子。将其在0℃下搅拌14.5小时，然后过滤。在0℃下用丙酮(20kg)洗涤反应器，其也被引导到过滤器中。然后将固体产物转移到反应器中，并向其中加入丙酮(100kg)。将其在20℃下搅拌1小时，然后冷却至0℃。将混合物在0℃下搅拌2小时，然后过滤。将反应器再次在0℃用丙酮(20kg)洗涤，其也被引导到过滤器中。将产物放置在过滤器中在真空下干燥13小时。将产物转移至盘式干燥器，并在≤30℃干燥，直至LOD为≤1％。HPLC确定纯度为95.1％。得到19.3kg(70.7％)。

[0342] 方案3

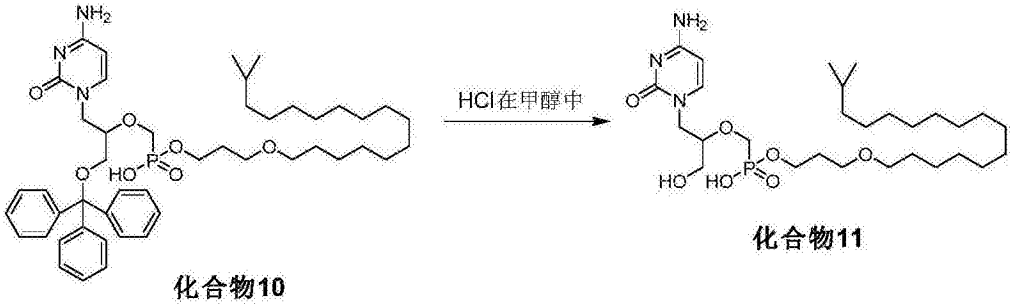
[0343] 

化合物9 化合物10

[0344] 化合物10的合成：(方法A)：向反应器中装入无水二甲基甲酰胺(18kg)、化合物9(6kg，1当量，14.04mol)、叔丁醇镁(2.5kg，1.05当量，14.74mol)和化合物8(9.0kg，1.1当量，15.44mol)。将反应加热至80℃并搅拌3小时。用HPLC监测反应。当化合物9为≤20％时，将反应物冷却至15℃，并向其中加入乙酸异丙酯(56kg)。向其中加入HCl溶液(3kg HCl在36kg水中)。将温度调节至20℃，将混合物搅拌1小时。停止搅拌，将各层静置1小时。分离各层，并用盐水洗涤有机层(10kg NaCl在40kg水中)两次。最终分离后，在40℃真空中除去乙酸异丙酯，直到没有观察到更多的馏出物。向反应器中加入甲醇(36.7kg)。将其在40℃真空中除去，直到没有观察到更多的馏出物。向反应器中加入甲醇(36.7kg)。该溶液直接用于下一步骤。

[0345] (方法B)：可替代地，将化合物9(0.014mol 6g)、化合物8(0.029mol，17.17g)、二叔丁醇镁(0.035mol，5.98g)和DMF(25ml)一起加入烧瓶中，并加热至80℃持续3小时。此时，HPLC显示反应完成。将反应物冷却至室温，向其中加入乙酸异丙酯(45ml)和1N HCl(40ml)。将其搅拌0.5小时。将有机层分离，用盐水(2×41ml)洗涤，经Na_2SO_4干燥，并在40℃真空中浓缩。向混合物中加入甲醇(2×100ml)，该混合物在40℃下进一步浓缩以产生化合物10，其然后用于下一步骤。

[0346] 方案4

[0347] 

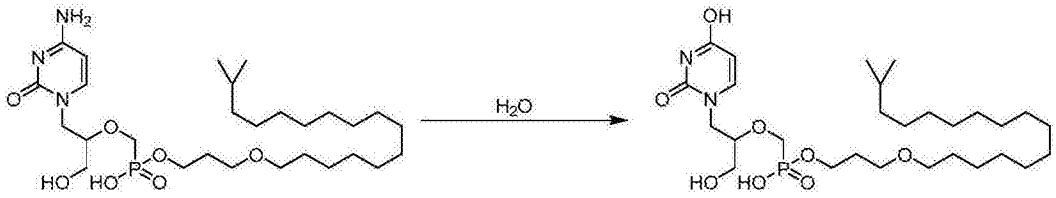
化合物10 化合物11

[0348] 化合物11的合成：(方法A)：将来自前一步骤(方法A)的甲醇溶液冷却至0℃，向其

中通入氯化氢气体(1.6kg)。将该溶液温热至15℃并搅拌2小时。用HPLC监测反应。当将化合物10为≤5%时，过滤已沉淀的固体。这不是产物。产物在滤液中。用甲醇洗涤(2.9kg)反应器，其通过过滤器送出。将甲醇滤液转移回反应器，并冷却至5℃。在30分钟内向该溶液中加入水(54.3kg)，同时保持≤30℃的温度。使用pH计，向反应滤液中加入1N NaOH溶液，直到达到2.5的pH。过滤所得固体。将反应器用水(17.6kg)洗涤，其被转移到过滤器中。将固体转移回反应器，并向其中加入丙酮(47.2kg)。将其搅拌1小时，然后在压力下过滤。然后将滤饼用丙酮(2×11.8kg)洗涤。将固体转移至托盘干燥器并在≤40℃下真空干燥12小时。丙酮除去完成后，将固体转移回反应器，并向其中加入甲醇(41kg)。将该混合物加热至回流(65℃)并搅拌直至获得澄清的溶液。在6小时内，将溶液冷却至0℃并搅拌2小时。过滤固体。在0℃下用甲醇(11.7kg)洗涤反应器，并转移到过滤器中。不再产生滤液后，将固体转移回反应器中，并向其中加入甲醇(51kg)。将其加热至回流(65℃)并搅拌直至获得澄清的溶液。在6小时内，将溶液冷却至0℃并搅拌2小时。通过过滤将固体收集。在0℃下再次用甲醇(11.7kg)洗涤反应器，其也被转移到过滤器中。然后将固体转移到干燥器托盘并在≤40℃的真空烘箱中干燥24小时。得到5.6kg(69%)的纯度≥92%的化合物11。

[0349] (方法B)：可替代地，在室温下向化合物10(12g，0.0147mol)中加入甲醇(70ml)和1.25N HCl的甲醇溶液(0.0441mol，35.29ml)。将反应物搅拌18小时。HPLC表明反应完全。过滤白色固体(三苯甲基副产物)。将滤液用水(50ml)稀释，并用6N NaOH将pH调节至2.5。将该混合物在室温下搅拌1小时并过滤。将产物(化合物11)在丙酮中浆化(2×100ml)，并过滤。将产物在室温下的真空烘箱中干燥24小时。核磁共振证实了产物。

[0350] 方案5

[0351] 

化合物11 化合物12

[0352] 化合物12的合成：(方法A)：向反应器中装入化合物11(5.6kg，1当量，9.73mol)和水(84kg)。将其加热至90℃并搅拌20小时。得到澄清的溶液。将反应物加热至99℃并搅拌96小时。HPLC确定化合物11为≤1%。将反应物冷却至20℃，并向其中加入碳酸钠(1.5kg，1.5当量，14.6mol)。将其搅拌10分钟。向该溶液中加入乙酸乙酯(65kg)/2-丙醇(6.3kg)混合物。将其搅拌5分钟，并使其分离20分钟。将各层分离。将水溶液(含有产物)转移回反应器，并向其中加入乙酸乙酯(65kg)/2-丙醇(6.3kg)混合物。将其再次搅拌5分钟，并使其分离20分钟。将各层分离。将水溶液(含有产物)转移到反应器，并冷却至10℃。向其中小心地加入HCl溶液(5.8kg HCl在4.8kg水中)保持温度≤25℃。将温度调节到20℃，并向该水溶液中加入乙酸乙酯(50.5kg)/甲醇(11.1kg)溶液。将其搅拌10分钟，并允许分离20分钟。将各层分离。将水相转移回反应器中并用乙酸乙酯(50.5kg)/甲醇(11.1kg)溶液再提取一次。将有机层转移回反应器，并用0.5M的HCl溶液(1kg HCl在19kg水中)洗涤。将其搅拌5分钟，并使其分离20分钟。除去下层水层。向反应器中加入0.5M的HCl溶液(1kg HCl在19kg水中)和甲醇(1.6kg)。将其搅拌5分钟，并使其分离20分钟。除去下层水层。向反应器中加入0.5M的HCl溶

液(1kg HCl在19kg水中)和甲醇(1.6kg)。将其搅拌5分钟,并使其分离20分钟。除去下层水层。将有机物在≤40℃的温度下进行真空蒸馏直到没有观察到进一步的馏出物。向反应器中加入甲醇(40kg),将其在≤40℃的温度下进行真空蒸馏直到没有观察到进一步的馏出物。向反应器中加入甲醇(60kg)和炭(7kg)。将混合物加热至62℃并搅拌20分钟。然后将其冷却至20℃并取样进行HPLC分析。HPLC显示纯度为97.8%。将甲醇溶液通过一层已用甲醇(2×12kg)洗涤过的硅藻土(6kg)过滤。硅藻土滤饼用甲醇(2×50kg)洗涤,以确保所有的产物都被除去。将含产物的甲醇转移到反应器中,并在≤40℃的温度下在真空中蒸馏,直到没有观察到进一步的馏出物。向反应器中加入丙酮(20kg),并在≤40℃的温度下蒸馏,直到没有观察到进一步的馏出物。向反应器中加入丙酮(20kg),并在≤40℃的温度下蒸馏,直到没有观察到进一步的馏出物。向反应器中加入丙酮(20kg)。将该溶液转移到一个50L的rbf中。将反应器用另外的丙酮(8kg)洗涤,并转移到50L的rbf中。将丙酮溶液冷却至-45℃,并搅拌20分钟。然后将产物过滤并干燥。得到2.13kg(38%)。纯度≥97%。

[0353] (方法B):可替代地,向化合物11(0.01563mol,9g)中加入水(90ml)。将混合物加热至90℃并用机械搅拌器搅拌。1周后,HPLC表明反应已完成大于95%。将混合物冷却至室温。用1N HCl调节pH至1-2。用乙酸乙酯(3×500ml)萃取水溶液。合并的乙酸乙酯萃取物经Na_2SO_4干燥,过滤,并在40℃真空浓缩,得到9g的厚油状物。将其用丙酮(100ml)磨碎,并冷却至4℃。将白色固体过滤干燥后,得到5g产物。NMR证实该产物为化合物12。

[0354] 实施例2

[0355] 抗病毒和细胞毒性实验

[0356] 在MRC-5细胞中的人类巨细胞病毒(HCMV)的EC_{50}:将Costar 96孔组织培养板在EMEM中接种20000MRC-5细胞/孔,所述EMEM含有2%胎牛血清标准胎牛血清和1%胎牛血清青霉素和链霉素。外孔不用于最小化由延长温育产生的边缘效应。细胞用0.01的MOI的HCMV接种。将测试化合物的连续稀释液加入到细胞中,板在5%的CO_2中在37℃温育7天。在7天温育后,阳性对照孔显示在90-100%MRC-5细胞中的HCMV感染的细胞形态指示。7天温育后,将培养基轻轻地从感染的细胞中去除。将细胞用冰冷的PBS漂洗两次,然后冷冻/解冻一次。各孔在55℃下用200μL裂解缓冲液温育2小时。裂解缓冲液包括0.5mg/mL的蛋白酶K、50mM的KCl、pH为8.0的10mM Tris-Cl、2.5mM $MgCl_2$、0.45%的IGEPAL和溶解在DEPC处理水中的0.45%吐温-20。细胞内的CMV DNA通过使用正向和反向的HCMV PCR引物(qPCR)和FAM标记探针的定量聚合酶链反应进行测量。使用采用含有与扩增片段同源的序列的HCMV DNA扩增子的稀释液的标准曲线进行病毒复制数的绝对定量。下面的qPCR扩增条件被使用:1个循环在95℃进行10分钟,随后为95℃的45个循环进行15秒和60℃进行60秒。qPCR反应用美国应用生物系统公司的7500实时PCR系统进行。第5代软件(美国伯腾仪器有限公司)用来计算抑制HCMV感染的MRC-5细胞的病毒DNA水平到50%(EC_{50})的浓度。

[0357] 在VERO细胞中的BKV的EC_{50}:将Costar 96孔组织培养板在DMEM中接种10000Vero细胞/孔,所述DMEM含有2%胎牛血清标准胎牛血清(FBS,Cat SH30088.03)和1%胎牛血清青霉素和链霉素。外孔不用于最小化由延长温育产生的边缘效应。细胞用115BKV DNA拷贝/细胞(ATCC,加德纳株)接种。将测试化合物的连续稀释液加入到细胞中,板在5%的CO_2中在37℃温育10天。在10天温育后,将50μL的上清液与提供终浓度0.5mg/mL的蛋白酶K的50μL 2X裂解缓冲液、50mM的KCl、pH为8.0的10mM Tris-Cl、2.5mM $MgCl_2$、0.45%的IGEPAL和溶解在

DEPC处理水中的0.45%吐温-20混合。将各板在55℃下温育2小时。上清液的BKV DNA通过使用正向和反向的BKV PCR引物和FAM标记探针的定量聚合酶链反应(qPCR)进行测量。使用采用含有与扩增片段同源的序列的BKV DNA扩增子的稀释液的标准曲线进行病毒复制数的绝对定量。下面的qPCR扩增条件被使用:1个循环在95℃进行10分钟,随后为95℃的45个循环进行15秒和60℃进行60秒。qPCR反应用美国应用生物系统公司的7500实时PCR系统进行。第5代软件(美国伯腾仪器有限公司)用来计算抑制BKV感染的Vero细胞的病毒DNA水平到50%(EC_{50})的浓度。

[0358] 在Vero细胞中的细胞毒性(CC_{50}):将Costar 96孔组织培养板在DMEM(ACTT,Cat 30-2002)中接种10000Vero细胞(ATCC)/孔,所述DMEM含有2%胎牛血清标准胎牛血清(FBS,Cat SH30088.03)和1%胎牛血清青霉素和链霉素(Cat SV30010)。外孔不用于最小化由延长温育产生的边缘效应。将测试化合物的连续稀释液加入到细胞中,板在5%的CO_2中在37℃温育7天。在7天的温育后,按制造商指示向每个孔中的200μL的培养基中加入40μL细胞滴度96®水溶液的MTS试剂(Promega公司,G111),并在37℃培养,直到未处理的细胞对照形成在490nm处的1.1和1.8之间的吸光度。最终吸光度读数使用美国伯腾仪器有限公司的Synergy2,和使用第5代软件(美国伯腾仪器有限公司)来计算抑制Vero细胞到50%(CC_{50})的浓度。

[0359] 在MRC-5细胞中的细胞毒性(CC_{50}):将Costar 96孔组织培养板在EMEM(ACTT,Cat 30-2003)中接种20000MRC-5细胞(ATCC)/孔,所述EMEM含有2%胎牛血清标准胎牛血清(FBS,Cat SH30088.03)和1%胎牛血清青霉素和链霉素(Cat SV30010)。外孔不用于最小化由延长温育产生的边缘效应。将测试化合物的连续稀释液加入到细胞中,板在5%的CO_2中在37℃温育7天。在7天的温育后,按制造商指示向每个孔中的200μL的培养基中加入40μL细胞滴度96®水溶液的MTS试剂(Promega公司,G111),并在37℃培养,直到未处理的细胞对照形成在490nm处的在1.1和1.8之间的吸光度。最终吸光度读数使用美国伯腾仪器有限公司的Synergy2,和使用第5代软件(美国伯腾仪器有限公司)来计算抑制MRC-5细胞到50%(CC_{50})的浓度。

[0360] 在MT4细胞中的细胞毒性(CC_{50}):将Costar 96孔组织培养板在RPMI(Lonza,Cat 12-11F)中接种5000MT4细胞(NIH艾滋病试剂项目)/孔,所述RPMI含有10%胎牛血清标准胎牛血清(FBS,Cat SH30088.03)、1%胎牛血清青霉素和链霉素(Cat SV30010)和2mM的Lonza L-谷氨酰胺(Cat 17-605E)。外孔不用于最小化由延长温育产生的边缘效应。将测试化合物的连续稀释液加入到细胞中,板在5%的CO_2中在37℃温育6天。在6天的温育后,按制造商指示向每个孔中的200μL的培养基中加入40μL细胞滴度96®水溶液的MTS试剂(Promega公司,G111),并在37℃培养,直到未处理的细胞对照形成在490nm处在1.1和1.8之间的吸光度。最终吸光度读数使用美国伯腾仪器有限公司的Synergy2,和使用第5代软件(美国伯腾仪器有限公司)来计算抑制MT4细胞到50%(CC_{50})的浓度。

[0361] 细胞培养和病毒株:从伯明翰组织在其IRB批准下采购设备的阿拉巴马大学获得的人包皮组织制备人包皮成纤维(HFF)细胞。将该组织在4℃下在细胞培养培养基中温育4小时,所述细胞培养培养基由补充有10%胎牛血清(FBS)(Hyclone公司,洛根UT)的厄尔平衡盐和标准浓度的谷氨酰胺、两性霉素B和万古霉素的最小必需培养基(MEM)组成。然后将组织置于磷酸盐缓冲盐水(PBS)中,切碎,清洗除去红血细胞,并重新悬浮于胰蛋白酶/EDTA

溶液中。将组织悬浮液于37℃温育，并轻轻搅拌以分散细胞，然后通过离心收集。将细胞重悬浮在4mL培养基中，并放置在25cm^{2}组织培养烧瓶中，在湿润的CO_2培养箱中，在37℃温育24小时。然后将培养基用新鲜培养基替代，每日监测细胞生长直至形成融合的细胞单层。然后将HFF细胞通过在补充有10％FBS的厄尔氏盐、L-谷氨酰胺、青霉素和庆大霉素的MEM的标准生长培养基中连续传代扩大。将细胞常规传代，并将等于或低于10代细胞用于测定。

[0362] Vero细胞从美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection)(ATCC，马纳萨斯，VA)获得，并维持在补充有10％FBS的厄尔氏盐、L-谷氨酰胺、青霉素和链霉素的MEM的标准生长培养基中。

[0363] 潜在感染EBV的阿卡塔细胞从John Sixbey获得。通过NIH艾滋病研究和参考试剂计划获得HHV-6A的GS株。

[0364] 抗病毒实验：评价化合物的抗病毒活性的每个实验都包括阳性和阴性对照化合物，以确保每个测定的性能。对公开化合物的同等水平的每项研究也进行细胞毒性的并行评估。当有足够的材料可用时，分别针对每种化合物进行多种分析评估获得统计数据。

[0365] HSV-1、VZV和HCMV的空斑减数实验：在6孔板中制备HFF细胞单层，并在37℃温育2天，以使细胞达到融合。然后将培养基从孔中吸出，并向三个孔中加入0.2mL的病毒，以在每个孔中得到20-30个斑块。病毒被允许吸附到细胞1小时，并且每15分钟轻轻摇晃板以重新分配培养基。化合物被稀释在包含补充有2％FBS的厄尔氏盐、L-谷氨酰胺、青霉素和庆大霉素的MEM的维持细胞培养基中。根据所用的病毒，向复制孔中加入从300μM至0.1μM范围的溶液，并且多次温育所述板。HSV-1菌株F的空斑减数实验以相似的方式进行，但是用涂板(plating)后一天感染的Vero细胞。在该实验中最终的FBS浓度为5％。对于HSV-1和-2，单层用在20％甲醇中的1％结晶紫染色，未结合的染料通过dH_2O洗涤除去。对于HCMV和VZV实验，细胞单层用1％中性红溶液染色4小时，然后将染色液抽吸，将细胞用PBS洗涤。对于所有的实验，使用立体显微镜计算噬菌斑和从实验数据评价减少50％(EC_{50})的斑块形成的化合物浓度。

[0366] EBV、HHV-6A和HHV-6B的DNA杂交实验。EBV实验在通过标准方法被诱导经历50μg/ml的山羊抗人免疫球蛋白抗体的裂解性感染的阿卡塔细胞中进行。在圆底96孔板中稀释实验化合物以产生从20到0.016μM范围的浓度。向所述板中以每孔4×10^4个细胞的浓度加入阿卡塔细胞并培养72小时。对HHV-6实验，在96孔板中连续稀释化合物，然后向各孔中加入1×10^4未感染的HSB-2或Molt-3细胞。通过分别以将近1个感染的细胞对每10个未感染的HSB-2细胞或Molt-3细胞的比例，加入感染了HSB-2的HHV-6A细胞或感染了Molt-3的HHV-6B细胞开始感染，并在37℃培养7天。

[0367] 对于所有的实验，向每个孔中加入100μL变性缓冲液(1.2M NaOH，4.5M 80 NaCl)，以变性DNA，使用温敏器装置(Bio-Rad公司，赫拉克勒斯(Hercules)，CA)通过Immobilon尼龙膜(密理博(Millipore)，贝德福德(Bedford)，马萨诸塞州)抽吸50μL等份。然后该膜被允许在地高辛简便杂交液(DIG Easy Hyb)(罗氏诊断(Roche Diagnostics)，印第安纳波利斯，印第安纳州)平衡之前在56℃下干燥30分钟。根据制造商的实验方法(罗氏诊断)制备了每个病毒的特异性地高辛(DIG)标记的探针。对于EBV，引物5'-CCC AGG AGT CCC AGT AGT CA-3'和5'-CAG TTC CTC GCC TTA GGT TG-3扩增对应于在EBV基因组中(AJ507799)坐标96802-97234的片段。特异性的HHV-6地高辛标记的探针用引物5'-CCT TGA TCA TTC GAC

CGT TT-3'和5'-TGG GAT TGG GAT TAG AGC TG-3'扩增ORF2的片段(在X83413中坐标37820-38418)来制备。将含EBV DNA的膜在56℃下杂交过夜,随后在相同的温度下,用含0.1%SDS的0.2×SSC和用含0.1%SDS的0.1×SSC依次洗涤。对HHV-6A和HHV-6B印迹,允许探针在42℃杂交过夜,在相同温度下用含0.1%SDS的0.2×SSC和用含0.1%SDS的0.1×SSC漂洗印迹。使用制造商的实验方法(罗氏诊断)用抗DIG抗体进行特异性结合的DIG探针的检测。捕获胶片的图像并用QuantityOne软件(Bio-Rad公司)量化,通过实验数据评价足够将病毒DNA的累积减少至50%(EC_{50})的化合物的浓度。

[0368] (v)流感病毒

[0369] 基于细胞的实验。对于剂量反应曲线,对每个所使用的浓度,使用三个孔向在96孔微孔板(8×10^4细胞/孔)中的MDCK细胞中加入单独的药物。在下列浓度下添加化合物:奥司他韦羧酸盐在0、0.000032、0.0001、0.00032、0.001、0.0032、0.01、0.032、0.1、1.0、10.0和100μg/ml;金刚烷胺和利巴韦林在0、0.001、0.0032、0.01、0.032、0.1、0.32、1、3.2、10、32和100μg/ml。每个试验板中包括感染的细胞(病毒对照)和未感染的细胞(细胞对照)的未处理的孔。在三天感染后,病毒对照孔表现出100%的细胞病理学。各孔中病毒细胞病理学的程度是通过用显微镜观察和用中性红(NR)染色确定。简要地说,将细胞用稀释在MEM中的0.011%NR染色以确定细胞活力。两小时后,将板进行处理,摄取量化的NR导入活细胞。由细胞摄取NR的量用分光光度法测定。

[0370] 细胞毒性实验:每个抗病毒实验都包括采用对于每个病毒相同的细胞、相同的细胞数量、相同的药物浓度和相同的培育时间的平行细胞毒性实验来提供相同的药物接触。为了确保所有的化合物的细胞毒性可以直接比较,我们还对在7天的培养期的融合HFF细胞中的所有化合物进行了标准中性红摄取细胞毒性实验。

[0371] (i)中性红摄取细胞毒性实验。通过标准方法在标准细胞毒性实验下评价各化合物。简言之,将HFF细胞在标准组织培养基中以2.5×10^4个细胞/孔接种在96孔组织培养板中。培养24小时后,培养基用维持细胞培养基替代,将化合物加入到第一行,然后5倍连续稀释液然后用于产生一系列具有最多300μM的化合物的浓度。将实验板培养7天,向各孔中加入100μl的10.66mg/ml的中性红的PBS溶液,并将该板培养1小时。然后将着色剂除去,用PBS漂洗所述板,将由活细胞内化的染料溶解在补充有50%乙醇和1%冰醋酸的PBS中。然后在550nm测定光密度,并从实验数据评价CC_{50}值。

[0372] 对于在HFF细胞中的所有空斑减数实验,在包含接收用于抗病毒实验相同的化合物的浓度的未感染的HFF细胞的平行组6孔板中进行中性红细胞毒性实验。如每个抗病毒实验,同一天从培养箱中取出细胞毒性板,细胞单层用2ml在PBS中浓度为0.165mg/ml的中性红溶液染色6小时。然后将该染料除去,将细胞中残留染料用PBS漂洗,目测检查细胞单层的任何迹象的毒性。用从1μM至1mM范围的药物浓度进行Vero细胞毒性实验。根据制造商的说明使用细胞滴度96®水性单溶液细胞增殖实验(Promega公司)测定细胞活力。

[0373] (ii)淋巴细胞中的细胞毒性实验。使用细胞滴度球蛋白发光细胞活性实验(Promega公司)评估淋巴细胞在所有实验中的细胞活力。简言之,将实验板在室温下培养30分钟,然后向每个孔中加入50μl的细胞滴度球蛋白试剂,并将板在定轨摇床中混合2分钟以裂解细胞。然后将板在室温下培养另外10分钟,并在光度计中定量发光。用标准方法计算抑制阿卡塔(Akata)、HSB-2、BCLB-1或Molt-3细胞增殖至50%(CC_{50})的药物浓度。

[0374] (iii)细胞增殖实验。HFF细胞增殖的抑制被用来改善对一些化合物的细胞毒性的估计，并根据在实验室中使用的标准程序进行。用2.5×10^4个细胞/孔和标准培养基将细胞以低密度接种于6孔板中。24小时后，将培养基吸出，并从300μM开始制备在生长培养基中的化合物溶液范围，并加入到复制孔中。将平板在37℃培养72小时，然后用胰蛋白酶将细胞脱落，并在贝克曼库尔特计数器中计数。从实验数据评价细胞增殖降低至50％的化合物浓度。

[0375] 表2在人包皮成纤维细胞中化合物12抗单纯疱疹病毒1(E-377株)和HCMV(AD169株)的活性

[0376]

化合物	HSV-1 EC_{50}, μM	HSV-1 CC_{50}, μM	HSV-1 SI_{50}	HCMV EC_{50}, μM	HCMV CC_{50}, μM	HCMV SI_{50}
化合物 12	>50	>50	1	0.052	>50	>961
阿昔洛韦	2.2	>100	>45			
更昔洛韦				1.5	>100	>67

[0377] 表3在人包皮成纤维细胞中化合物12和十六烷丙基西多福韦(HDP-CDV)抗HCMV UL54抗药突变体的活性

[0378]

病毒	化合物 12 EC_{50}, μM	化合物 12 EC_{90}, μM	HDP-CDV EC_{50} μM	HDP-CDV EC_{90} μM
AD169	0.052	0.15	0.001	
D542E (HDP-CDV^R)	5.41	>10	0.0295	0.1529
GDG^RP53	0.171	1.552	0.0053	0.0316
4955^R	0.143	0.372	0.0013	0.006

[0379] 表4在人包皮成纤维细胞中化合物12抗牛痘病毒(哥本哈根株)和牛痘病毒(布莱顿株)的活性

[0380]

化合物	VACV	VACV	VACV	CPXV	CPXV	CPXV

[0381]

	EC_{50}, μM	CC_{50}, μM	SI_{50}	EC_{50}, μM	CC_{50}, μM	SI_{50}
化合物 12-001	>10	>10	1	>10	>10	1
西多福韦	22.42	>300	>13	30.52	>300	>10

[0382] 表5在Madin-Darby狗肾(MDCK)细胞中化合物12抗流感病毒株的活性

[0383]

化合物	A/CA/10/2009 (EC_{50}, μM)	B/FL/4/2006 (EC_{50}, μM)	细胞毒性 (CC_{50},μM)
化合物 12	>4	>4	17.18
奥司他韦	0.17	16.25	>20

[0384] 表6在阿卡塔细胞中化合物12抗爱泼斯坦-巴尔病毒的活性

[0385]

化合物	疗效 DNA 杂化实验 (EC_{50}, μM)	细胞毒性 细胞滴度-球蛋白实验 (CC_{50},μM)
化合物 12	>10	18
阿昔洛韦	7.0	>100

[0386] 表7化合物12和HDP-CDV在MRC-5细胞中抗HCMV和在Vero细胞中抗BKV的活性

[0387]

化合物	CMV EC_{50} (μM)	BKV EC_{50} (μM)	MT4 CC_{50} (μM)	CMV - SI (MT4 CC_{50} /EC_{50})	BKV - SI (MT4 CC_{50} /EC_{50})
化合物 12	0.027 (n=4)	1.55 (n=2)	25.6 (n=7)	948	16.5
HDP-CDV	0.0004 (n=8)	0.018 (n=11)	0.060 (n=6)	150	3.3

[0388] 表8化合物12在体外的抗病毒活性

[0389]

病毒	EC_{50} (μM)	CC_{50} (μM)	SI	细胞系
HCMV	0.017, n=12	50, n=4	2941	MRC5
MCMV	1.6, n=2	60, n=1	37.5	MEF

[0390]

HHV-8	<0.08, n=1	>10, n=1	>125	BCBL-1
HCV	0.57, n=1	>20, n=1	>35	Huh
BKV	2.1, n=4	93, n=1	44	Vero
HBV	3, n=1	34,n=1	11	2.2.15
骨髓灰质炎病毒 3	3.3,n=1	29, n=1	9	Vero 76
HHV-6B	4.7, n=1	8.4, n=1	~2	MOLT-3
埃博拉病毒	1.0, n=1	36.9, n=1	37	Huh

[0391] 表9体外活性对比(平均值XC_{50})

[0392]

化合物	布林西多福韦(BCV)	化合物12	化合物24
HCMV EC_{50} (uM)	0.0003 N = 9	0.017 N = 10	0.008 N = 4
MT4 细胞毒性 CC_{50} (uM)	0.06 N = 10	24.7 N = 8	13.5 N = 6

[0393] 总之，这些数据表明化合物12具有改进的疗效/毒性比。UL54 HCMV抗性变异体数据表明该基因的突变降低了化合物12的疗效，其也降低了HDP-CDV的疗效，这表明化合物12被破坏为三磷酸等同物，并且对CMV聚合酶UL54而言作为一种替代的底物抑制剂。

[0394] 实施例3:CMV临床研究

[0395] 进行了化合物12和化合物13的临床研究。在HSCT CMV(R+)接受者中进行了安慰剂对照的、减时增量的实验，评价化合物12或化合物13预防或控制CMV感染的能力。建立几个队列，其中参与者或受试者口服接受安慰剂或化合物13，剂量范围从40-1000mg每天或每周(QW)到40-1000mg每周两次(BIW)，例如，每周一次接受200mg或每周两次100mg。HSCT后的受试者在植入的时候被登记，被随机分配化合物13或安慰剂(3:1的比例)，并接受盲性治疗直到移植后约100天。化合物12或化合物13的剂量在40-1000mg每天或每周和40-1000mg每周两次，例如，40mg每天或每周，100mg每天或每周，200mg每天或每周，200mg每周两次和100mg每周两次。患CMV疾病或CMV感染需要用当地的医护标准的先发治疗的受试者都从盲性疗法停止，并随访4周。完成盲性疗法治疗后的受试者在治疗后随访8周。

[0396] 患者接受研究药物9-11周，这取决于移植后随机选择的那天，以使得该研究药物在完成研究药物的患者中移植后的第13周停止。在患者正在接受研究药物的同时，由中心实验室进行通过PCR实验的血浆CMV DNA水平的每周测量。如果CMV疾病发展或者如果因为在血浆中检测到CMV DNA或因其他原因患者需要用抗CMV感染的药物治疗，停止研究药物，并且根据研究现场的实际情况治疗病人。

[0397] 主要疗效终点是无法阻止进展型CMV感染，其定义为CMV疾病或血浆CMV DNA水平大于200拷贝每毫升，在研究药物的最后剂量后1周内在中心实验室进行检测。如果患者在研究结束具有200拷贝每毫升或更少的血浆CMV DNA水平和不具有确认的CMV疾病，则研究治疗(用化合物12或化合物13或安慰剂)被认为是成功的，即使在研究药物施用期间特定的每周测量是大于200份每毫升，然后再次下降。如果患者中断研究药物，以开始为了CMV感染或其他原因的治疗，但血浆CMV DNA水平是200拷贝每毫升或以下，并且CMV疾病没有被确认，那么用化合物12或化合物13的治疗被认为是成功的。预先指定的次要终点包括CMV感染的发生或对CMV DNA在基线(无论是在筛查或研究药物施用的第一天)是阴性或阳性的患者的血浆CMV DNA水平增加、研究药物停止率和停止原因、治疗CMV反应的抗病毒剂的使用和化合物12或化合物13和西多福韦的波谷水平。安全性终点包括所有不良反应、实验值和心电图评估的变化以及任何原因引起的死亡。

[0398] 实施例4:BKV临床研究

[0399] 进行了化合物12或化合物13预防后HCT的BKV感染的一个9-11周的随机、安慰剂对照、双盲、剂量递增的临床研究(40-1000mg每周一次和40-1000mg每周两次，例如，40mg每周一次，100mg每周一次，200mg每周一次，200mg每周两次和100mg每周两次)。治疗在移植时开

始并一直持续到后HCT第13周。

[0400] 与BKV有关的终末器官损害的研究

[0401] 分析了队列中的受试者BKV感染的发病率和终末器官并发症的影响。如果病毒尿症存在，每次测量BK病毒尿症并评估病毒血症。分析研究数据以评估化合物12或化合物13是否对BKV感染终末器官疾病有影响。镜下血尿被定义为证实血红素阳性尿分析；肾功能损伤被定义为在治疗期间最后一次测量具有升高的肌酸酐(≥120μmol/L)，这也是从基线增加≥25％。

[0402] 在临床研究中，在参与研究的受试者中，一些受试者以不同的剂量接受安慰剂和其他受试者以不同的剂量接受化合物12或化合物13。

[0403] 定义和方法

[0404] 临床意义的终末器官影响定义如下：

[0405] 镜下血尿—在尿分析(试纸浸渍)中至少1+血红素标记

[0406] 新发血尿—至少1+血红素(通过≥痕量的连续测量确认)，仅在治疗期间出现

[0407] 治疗结束时的肾功能障碍—治疗结束时的血清肌酐≥120μM(≥1.36mg/dl)

[0408] 新发肾功能障碍—治疗结束时的血清肌酐≥120μM(≥1.36mg/dl)以及至少比基线血清肌酐大25％

[0409] 根据治疗组(与安慰剂比较，联合化合物13)和BKV状态(在治疗期间的任何时间的病毒尿症阳性或阴性)将受试者列成表。使用Fisher精确检验进行两两比较。由于有限的样品大小，与安慰剂组比较，将化合物12的数据集中起来。

[0410] 为了探究BKV感染的紧急症状的影响，加药之前(即，BKV的PCR阳性在基线)，首先分析在BKV感染的受试者中包含术语BKV尿的AEs的发病率。

[0411] 为了进一步探讨化合物12对急性出血膀胱炎的影响，探究了急性出血治疗的发病率。

[0412] 等价物

[0413] 本发明可以以其它不背离其精神或基本特征的具体形式体现。因此，前述实施例都被认为在所有方面是说明性而非限制本文所描述的发明。本发明的范围因此由所附的权利要求书而不是由前面的说明书表示，并且含义和权利要求书的等价范围内的所有改变旨在被包括在其中。