

(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102137676 A

(43) 申请公布日 2011. 07. 27

(21) 申请号 200880127594. 5

(22) 申请日 2008. 12. 23

(30) 优先权数据

61/017116 2007. 12. 27 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010. 08. 27

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2008/014015 2008. 12. 23

(87) PCT申请的公布数据

W02009/085267 EN 2009. 07. 09

(71) 申请人 伊皮芬尼生物科学公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 S·董 M·C·施勒德

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

司 72001

代理人 周齐宏 艾尼瓦尔

(51) Int. Cl.

A61K 31/70(2006. 01)

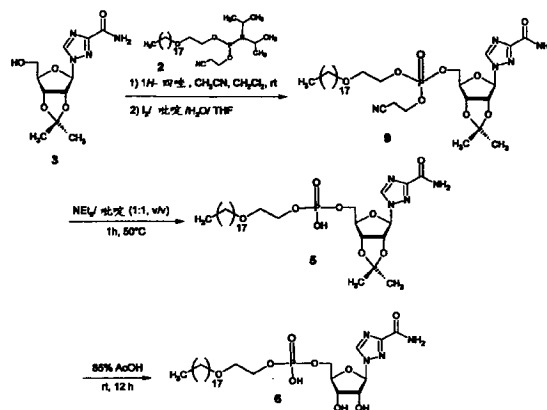
权利要求书 2 页 说明书 26 页 附图 1 页

(54) 发明名称

抗病毒化合物

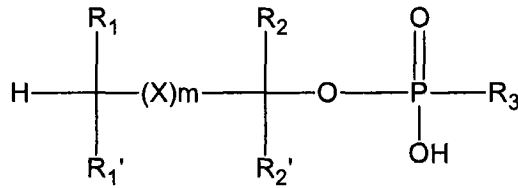
(57) 摘要

本文描述了脂质修饰的磷酸二酯核苷前药。该前药可用于治疗病毒感染和癌症。



1. 包含共价连接到脂质上的磷酸化核苷类似物的脂质修饰的磷酸二酯核苷前药化合物。

2. 权利要求 1 的化合物,具有下式的结构:



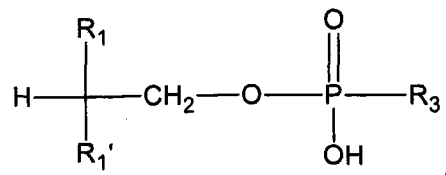
其中 R_1 和 R_1' 独立地为氢、取代和未取代的 $-\text{O}(\text{C}_1-\text{C}_{24})$ 烷基、 $-\text{O}(\text{C}_1-\text{C}_{24})$ 链烯基、 $-\text{O}(\text{C}_1-\text{C}_{24})$ 酰基、 $-\text{S}(\text{C}_1-\text{C}_{24})$ 烷基、 $-\text{S}(\text{C}_1-\text{C}_{24})$ 链烯基或 $-\text{S}(\text{C}_1-\text{C}_{24})$ 酰基,其中 R_1 和 R_1' 中的至少一个不是氢,且其中所述链烯基或酰基部分具有 1 至 6 个双键;

其中 R_2 和 R_2' 独立地为氢、取代和未取代的 $-\text{O}(\text{C}_1-\text{C}_7)$ 烷基、 $-\text{O}(\text{C}_1-\text{C}_7)$ 链烯基、 $-\text{S}(\text{C}_1-\text{C}_7)$ 烷基、 $-\text{S}(\text{C}_1-\text{C}_7)$ 链烯基、 $-\text{O}(\text{C}_1-\text{C}_7)$ 酰基、 $-\text{S}(\text{C}_1-\text{C}_7)$ 酰基、 $-\text{N}(\text{C}_1-\text{C}_7)$ 酰基、 $-\text{NH}(\text{C}_1-\text{C}_7)$ 烷基、 $-\text{N}((\text{C}_1-\text{C}_7) \text{ 烷基})_2$ 、氧代、卤素、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{OH}$ 或 $-\text{SH}$;

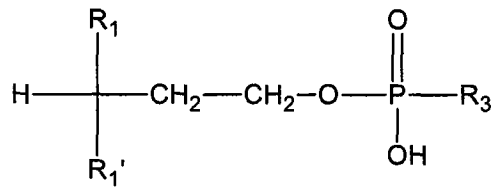
其中 R_3 是包含经由磷酸酯键连接到磷上的核糖或修饰环或非环结构的核苷;且其中 X 是碳且 m 为 0 至 6 的整数。

3. 权利要求 2 的化合物,其中 $m = 0, 1$ 或 2 且 R_2 和 R_2' 包含 H。

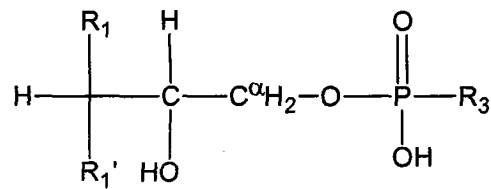
4. 权利要求 3 的化合物,其具有结构:



5. 权利要求 3 的化合物,其具有结构:



6. 权利要求 3 的化合物,其中该磷酸甘油酯物质具有结构:



7. 权利要求 2 的化合物,其中 R_1 是 $-\text{O}(\text{C}_1-\text{C}_{24})$ 烷基。

8. 权利要求 2 的化合物,其中 R_1 是 $-\text{O}(\text{C}_{12}-\text{C}_{19})$ 烷基。

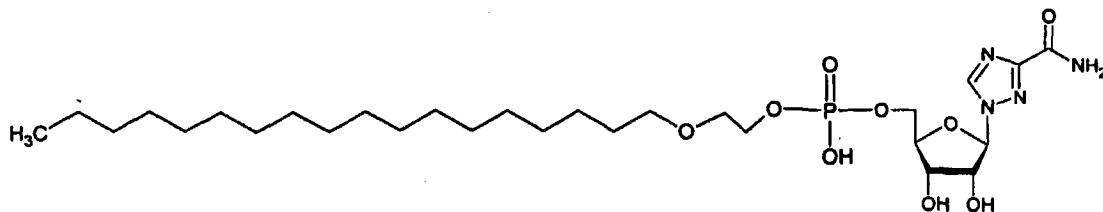
9. 权利要求 2 的化合物,其中 R_1 是 $-\text{O}(\text{C}_{16}-\text{C}_{17})$ 烷基。

10. 治疗病毒感染的方法,所述方法包括给予需要治疗的患者治疗有效量的权利要求 1 的脂质修饰的磷酸二酯核苷前药。

11. 权利要求 10 的治疗方法,其中给药量为 0.01 至 1,000mg/kg/天。

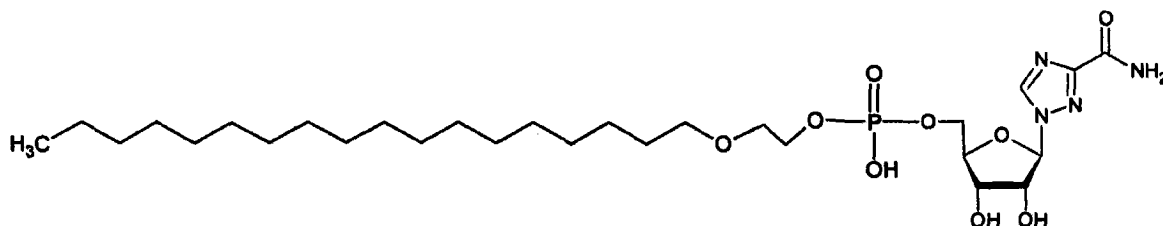
12. 权利要求 10 的治疗方法,其中给药量为 0.10 至 100mg/kg/天。

13. 权利要求 10 的方法,其中该病毒感染是丙型肝炎感染且所述前药具有结构:



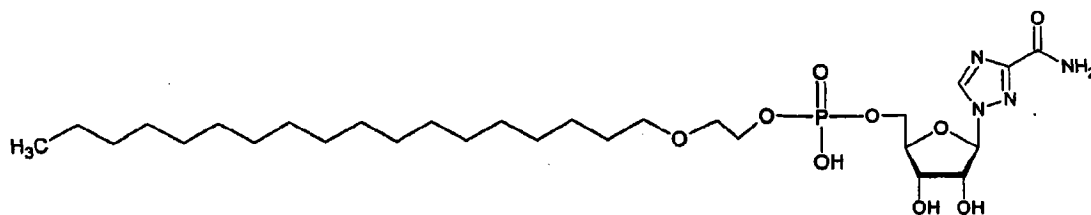
14. 权利要求 13 的方法,其中该治疗有效量为服用量 100 至 4000mg/天。

15. 权利要求 10 的方法,其中该病毒感染是呼吸道合胞病毒感染且所述前药具有结构:



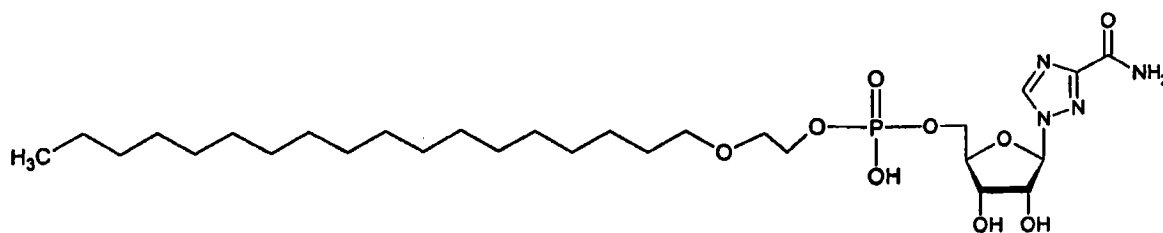
16. 权利要求 15 的方法,其中该治疗有效量为服用量 100 至 4000 毫克/6 小时,持续 4 天,接着服用量 100 至 4000 毫克/8 小时,持续 3 天。

17. 权利要求 10 的方法,其中该病毒感染是流行性感冒病毒感染且所述前药具有结构:



18. 权利要求 17 的方法,其中该治疗有效量为服用量 100 至 4000 毫克/6 小时,持续 4 天,接着服用量 100 至 4000 毫克/8 小时,持续 3 天。

19. 权利要求 10 的方法,其中该病毒感染是呼吸综合征病毒感染且所述前药具有结构:



20. 权利要求 19 的方法,其中该治疗有效量为服用量 100 至 4000 毫克/6 小时,持续 4 天,接着服用量 100 至 4000 毫克/8 小时,持续 3 天。

抗病毒化合物

[0001] 对相关申请的交叉引用

[0002] 本申请依据 35 U. S. C. § 119(e) (1) 要求 2007 年 12 月 27 日提交的美国临时申请系列号 no. 61/017, 116 的优先权, 其全文经此引用并入本文。

[0003] 发明背景

发明领域

[0004] 本发明涉及新型抗病毒化合物、所述化合物的制造方法和使用所述化合物治疗各种医学疾病, 包括例如病毒感染和癌症的方法。

[0005] 发明背景

[0006] 核苷由连接到核糖或脱氧核糖环上的核碱基构成。已经描述了核苷类似物, 其中核糖被修饰环状核 (“环状”) 或被无环核 (“无环”) 替代。这些环状和无环核苷类似物的子集已表现出抗病毒活性, 且一些在临床上用于治疗许多病毒感染。环核苷类似物的实例包括溴夫定、齐多夫定 (AZT, Retrovir)、去羟肌苷 (ddI, Videx)、扎西他滨 (ddC, Hivid)、司他夫定 (d4T, Zerit) 和阿巴卡韦 (Ziagen)。无环核苷类似物的实例包括阿昔洛韦 (Zovirax)、喷昔洛韦 (Denavir)、奥昔洛韦 (H2G) 和更昔洛韦 (Cytovene)。一些抗病毒核苷类似物在细胞内被激酶磷酸化最多三次以产生核苷类似物三磷酸盐。这些磷酸化核苷类似物通过各种作用机制, 包括抑制病毒酶, 如 DNA 聚合酶和逆转录酶来发挥它们的抗病毒活性。

[0007] 利巴韦林是对 RNA 和 DNA 病毒, 如丙型肝炎病毒 (HCV) 表现出一定抗病毒活性的环核苷类似物的实例。不同于其它核苷类似物, 尚未确定利巴韦林的抗病毒, 如 HCV 的作用的主要机制。[Dixit, NM; Perelson, AS Cell Mol Life Sci 2006, 63, 832; 经此引用并入本文]。但是, 利巴韦林的活性形式由其三种 5' - 磷酸化状态构成 [Wu, JZ; Larson, G; Walker, H; Shim, JH; Hong, Z Antimicro Agent Chemother 2005, 49, 2164; 经此引用并入本文]。例如, 利巴韦林 5' - 单磷酸盐可以抑制肌苷酸脱氢酶 (IMPDH) —— 在支持病毒复制方面发挥作用的酶 [Gish, RG J Antimicrob Chemother 2005, 57, 8; 经此引用并入本文]。

[0008] 直接给予磷酸化化合物, 如磷酸化核苷类似物的主要限制在于, 它们从胃肠道中的吸收差。另外, 许多必须肠道外给药。此外, 带负电的磷酸根部分会干扰细胞渗透, 造成降低的抗病毒或抗增殖活性。

[0009] 在一些情况下, 磷酸化核苷类似物也与毒性效应相关联。例如, 利巴韦林的主要限制之一是溶血性贫血副作用 [Russmann, S; Grattagliano, I; Portincasa, P; Palmieri, VO; Palasciano, G Curr Med Chem 2006, 13, 3351; 经此引用并入本文]。贫血归因于利巴韦林 -5' - 三磷酸盐 (RTP) 在红细胞中的过度积聚, 这会竞争性抑制腺苷三磷酸盐 (ATP) 依赖性利用。红细胞由于它们缺乏可将 RTP 降解回利巴韦林的脱磷酸酶而积聚 RTP。

[0010] 因此, 始终需要更无毒、更有效的磷酸化核苷类似物以治疗各种失调症, 如病毒感染造成的那些、癌症和与不适当的细胞增殖相关的其它疾病, 例如自身免疫病。

[0011] 发明概述

[0012] 本发明提供了通过提供脂质修饰的磷酸二酯 (phosphodiester) 核苷前药作为抗

病毒剂来将磷酸化核苷类似物输递至病毒感染细胞或癌细胞的方式。这些脂质修饰的磷酸二酯核苷前药在给予需要其的对象时使母体核苷类似物上的有害副作用最小化。

[0013] 第一方面,本发明提供脂质修饰的磷酸二酯核苷前药化合物及其药物组合物。这一组合物在一些实施方案中是共价连接(直接或间接通过连接分子)到取代脂质,如未取代的烷基甘油、烷基丙二醇或烷基乙二醇上的磷酸化核苷类似物,其充当抗病毒剂的前药。这种组合物在另一些实施方案中可用于预防和/或治疗病毒感染,尤其是具有可检出的HCV和代偿性肝病(compensated liver disease)的成年人的丙型肝炎(HCV);如呼吸道合胞病毒(RSV)、流行性感音和SARS之类的疾病;如生殖器疱疹(HSV-1/2)、带状疱疹(VZV)、单核细胞增多症(EBV)、CMV视网膜炎和/或源自HHV-6A、HHV-6B和HHV-8的其它疱疹病毒感染之类的疾病;和获益于抗病毒药物疗法的其它疾病和病状。

[0014] 第二方面,本发明提供制备脂质修饰的磷酸二酯核苷前药化合物的方法。该方法在一些实施方案中利用亚磷酰胺(phosphoramidite)化学成本发明的化合物。

[0015] 第三方面,本发明提供用于治疗病毒感染的治疗方法和用在这些方法中的组合物,其中给予患者治疗有效量的(a)本发明的脂质修饰的磷酸二酯核苷前药;和任选地,(b)药物相容载体或稀释剂。在一些实施方案中,本发明提供用于治疗病毒感染的治疗方法和用在这些方法中的组合物,其中联合给予患者(a)本发明的脂质修饰的磷酸二酯核苷前药;(b)一种或多种附加抗病毒治疗剂;和任选地,(c)药物相容载体或稀释剂。在一些实施方案中,本发明的脂质修饰的磷酸二酯核苷前药和附加抗病毒治疗剂分开给药。在另一些实施方案中,一种、两种或三种药剂任选与载体混合。

[0016] 此类联合给药的附加抗病毒治疗剂的非限制性实例包括:(a)干扰素,如聚乙二醇干扰素 α -2a、聚乙二醇干扰素 α -2b、干扰素 α -2b、干扰素 α -2a和组合干扰素;(b)HCV蛋白酶抑制剂,如telaprevir和boceprevir;(c)HCV聚合酶抑制剂,如valopicitabine和R-1626;(d)神经氨酸酶抑制剂,如扎那米韦和奥司他韦;和(e)M2通道阻滞剂,如金刚烷胺和金刚乙胺。

[0017] 附图简述

[0018] 图1显示利用核苷类似物利巴韦林制备脂质修饰的磷酸二酯核苷前药的代表性方法。

[0019] 图2显示在雄性小鼠中(N=3)静脉内给药5mg/kg和口服给药30mg/kg后小鼠血浆中(ODE)磷酸二酯利巴韦林前药的药物动力学。

[0020] 发明详述

[0021] 如下组织本发明的不同方面和实施方案的详述:第I节提供有用的定义;第II节描述本发明的化合物和制备方法;第III节提供治疗、给药、配制方法并描述本发明的单位剂型;第IV节提供用于合成和验证本发明的化合物的活性的示例性方法。仅为便于读者,将该详述分节,任何一节中的公开内容适用于本文其它地方的公开。

[0022] 第I节:定义

[0023] 本文所用的术语“烷基”是指1至24个(C₁-C₂₄)碳原子的单价直链或支链或环状基团,包括甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、叔丁基、正己基等。

[0024] 本文所用的“取代烷基”包括进一步带有一个或多个选自羟基、烷氧基、巯基、环烷基、取代环烷基、杂环、取代杂环、芳基、取代芳基、杂芳基、取代杂芳基、芳氧基、取代芳氧

基、卤素、三氟甲基、氰基、硝基、硝酮、氨基、酰氨基、甲酰基、酰基、氧酰基、羧基、氨基甲酸根 (carbamate)、磺酰基 (sulfonyl)、磺酰胺、硫酰基 (sulfuryl) 等的取代基的烷基。

[0025] 本文所用的“链烯基”是指具有一个或多个碳-碳双键并具有大约 2 至 24 个 (C_1-C_{24}) 碳原子的直链或支链烃基,“取代链烯基”是指进一步带有一个或多个如对取代烷基定义的取代基的链烯基。

[0026] 本文所用的“芳基”是指具有 6 至 14 个碳原子的芳基,“取代芳基”是指进一步带有一个或多个如对取代烷基定义的取代基的芳基。

[0027] 本文所用的“杂芳基”是指含有一个或多个杂原子 (例如 N、O、S 等) 作为环结构的一部分并具有 3 至 14 个碳原子的芳基,“取代杂芳基”是指进一步带有一个或多个如对取代烷基定义的取代基的杂芳基。

[0028] 本文所用的术语“键”或“价键”是指由电子对构成的原子之间的连接。

[0029] 本文所用的术语“可药用盐”是指可用在药用制剂中的酸和碱加成盐。

[0030] 本文所用的术语“前药”是指药物活性化合物的类似物、衍生物或变体,其与相应的药物活性化合物的差别在于具有可化学或代谢裂解的基团或缺乏可添加的基团,其通过在体内生理学条件下的溶剂分解或其它酶作用变成该药物活性化合物。前药可能在这种体内生理学条件中的活性远低于“母体”化合物。

[0031] 本文所用的术语“脂质”是指独自或与如上定义的烷基、取代烷基、链烯基、取代链烯基、芳基、杂芳基等结合构成的链。对于本发明,脂质包括脂肪酸、中性脂肪、蜡、类固醇和其它示例性脂质。

[0032] 本文所用的术语“磷酸二酯”是指在磷酸酯基团中含有经由两个酯键键合到两个其它烷基上的磷原子的基团,或独自构成或与如上定义的烷基、取代烷基、链烯基、芳基、杂芳基、脂质、核苷基等结合构成的此类基团的组合。

[0033] 本文所用的术语“无环”是指在核苷类似物的核内不存在环状结构。本文所用的术语“环状”是指在核苷类似物的核内存在环状结构。本文所用的术语“修饰环”是指在核苷类似物的核内存在结构修饰的核糖。

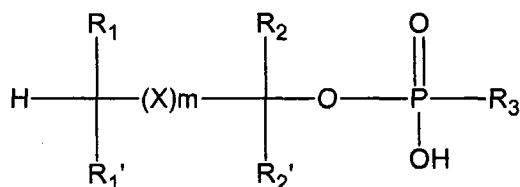
[0034] 本文所用的术语“联合给药”和“联合给予”是指在另一物质的给药之前、同时或之后给予一物质,以使这些物质的生物效应叠加并至少部分同时作用于其给药对象。在一些实施方案中,在各剂治疗剂临给药之前、同时或刚给药之后给予包括本发明的脂质修饰的磷酸二酯核苷前药和其它治疗剂的联合试剂。在另一些实施方案中,这些药剂在给予患者之前混合在一起。在另一些实施方案中,这些药剂通过不同给药方法联合给药。在另一些实施方案中,在一剂本发明的脂质修饰的磷酸二酯核苷前药的临给药之前、同时或刚给药之后给予该治疗剂,脂质修饰的磷酸二酯核苷前药的其余每日剂量在没有该治疗剂,即不存在该治疗剂的情况下独自给药。

[0035] 本文所用的术语“肠道外”是指皮下、静脉内、动脉内、肌肉内或玻璃体内注射或输液技术。

[0036] 第 II 节

[0037] 本发明的脂质修饰的磷酸二酯核苷前药化合物具有结构:

[0038]



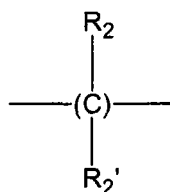
[0039] R_1 和 $\text{R}_{1'}$ 独立地为 -H、取代和未取代的 $-\text{O}(\text{C}_1-\text{C}_{24})$ 烷基、 $-\text{O}(\text{C}_1-\text{C}_{24})$ 链烯基、 $-\text{O}(\text{C}_1-\text{C}_{24})$ 酰基、 $-\text{S}(\text{C}_1-\text{C}_{24})$ 烷基、 $-\text{S}(\text{C}_1-\text{C}_{24})$ 链烯基或 $-\text{S}(\text{C}_1-\text{C}_{24})$ 酰基, 其中 R_1 和 $\text{R}_{1'}$ 的至少一个不是 -H 且其中所述链烯基或酰基部分任选具有 1 至 6 个双键;

[0040] R_2 和 $\text{R}_{2'}$ 独立地为 -H、取代和未取代的 $-\text{O}(\text{C}_1-\text{C}_7)$ 烷基、 $-\text{O}(\text{C}_1-\text{C}_7)$ 链烯基、 $-\text{S}(\text{C}_1-\text{C}_7)$ 烷基、 $-\text{S}(\text{C}_1-\text{C}_7)$ 链烯基、 $-\text{O}(\text{C}_1-\text{C}_7)$ 酰基、 $-\text{S}(\text{C}_1-\text{C}_7)$ 酰基、 $-\text{N}(\text{C}_1-\text{C}_7)$ 酰基、 $-\text{NH}(\text{C}_1-\text{C}_7)$ 烷基、 $-\text{N}((\text{C}_1-\text{C}_7) \text{ 烷基})_2$ 、氧代、卤素、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{OH}$ 或 $-\text{SH}$;

[0041] R_3 是药物活性核苷, 包括具有核糖或修饰环或无环结构的无环或环状类似物, 在每种情况下具有含有至少一个可修饰羟基的修饰结构, 其中核糖核苷被修饰环 (“环状”) 或被无环结构 (“无环”) 替代。环核苷类似物的实例包括利巴韦林 (Copegus、Rebetol、Ribasphere)、viramidine (Taribavirin)、valopicitabine (NM283)、NM 107、MK608、R1479、溴夫定、齐多夫定 (AZT、Retrovir)、去羟肌苷 (ddI、Videx)、扎西他滨 (ddC、Hivid)、司他夫定 (d4T、Zerit) 和阿巴卡韦 (Ziagen)、碘苷、洛布卡韦、cyclopropavir、拉米夫定、环己烯基 G 和 maribavir。无环核苷类似物的实例包括阿昔洛韦 (Zovirax)、喷昔洛韦 (Denavir)、奥昔洛韦 (H2G)、S2242、A-5021 和更昔洛韦 (Cytovene)。

[0042] 当 m 大于 0 时, X 为:

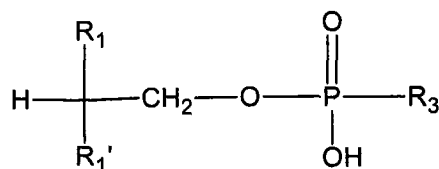
[0043]



[0044] 且 m 为 0 至 6 的整数。

[0045] 在一些实施方案中, $m = 0, 1$ 或 2 且 R_2 和 $\text{R}_{2'}$ 是 H。相应类似物可随之被描述为本发明的脂质修饰的磷酸二酯核苷前药化合物的乙二醇、丙二醇或丁二醇衍生物。在一个实施方案中, 该衍生物具有结构:

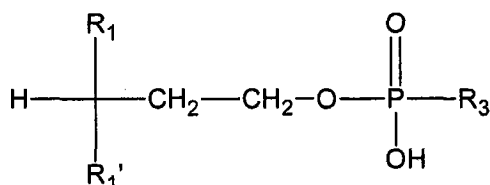
[0046]



[0047] 其中 R_1 和 $\text{R}_{1'}$ 和 R_3 如上定义。

[0048] 在一些实施方案中, 该衍生物具有结构:

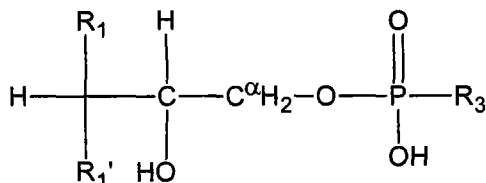
[0049]



[0050] 其中 $m = 1$ 和 R_1, R_1' 和 R_3 如上定义。

[0051] 类似地, 在另一些实施方案中, 本发明提供具有下列结构的甘油衍生物:

[0052]



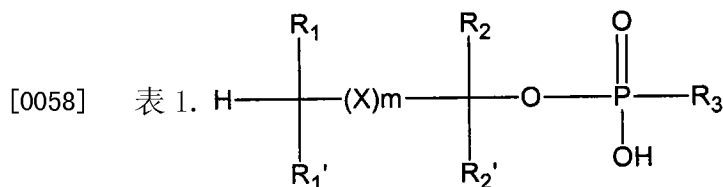
[0053] 其中 $m = 1, \text{R}_2 = \text{H}, \text{R}_2' = \text{OH}$ 且 C^α 上的 R_2 和 R_2' 都是 $-\text{H}$ 。在具有甘油残基的本发明的化合物中, 该 $-\text{P}(\text{O})\text{OH}-\text{R}_3$ 部分可以连接在甘油的 sn-3 或 sn-1 位置。

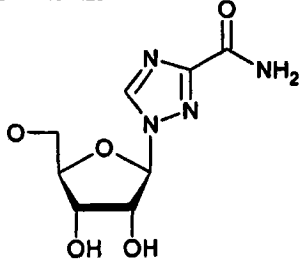
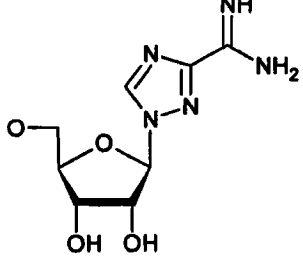
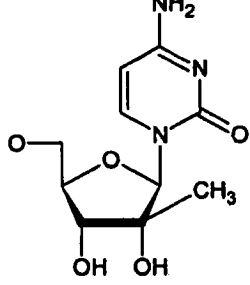
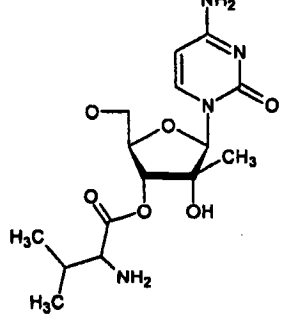
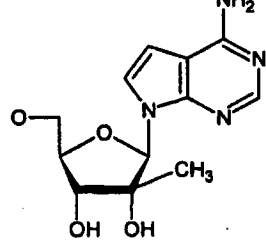
[0054] 在本发明的脂质修饰的磷酸二酯核苷前药化合物的一些实施方案中, R_1 是具有式 $-\text{O}-(\text{CH}_2)_t-\text{CH}_3$ 的烷氧基, 其中 t 为 0-24。在另一实施方案中, t 为 11-19。在另一实施方案中, t 为 15 或 17。

[0055] 本发明的某些化合物具有一个或多个手性中心, 例如在糖部分中, 因此可以以旋光活性形式存在。同样地, 当该化合物含有链烯基或不饱和烷基或酰基部分时, 存在该化合物的顺式-和反式-异构形式的可能性。在取代基, 如烷基中可存在其它不对称碳原子。本发明提供 R- 和 S- 异构体及其混合物, 包括外消旋混合物以及顺式-和反式-异构体的混合物。在本发明中提供所有这样的异构体及其混合物。如果需要特定立体异构体, 其可以通过本领域公知用于其它化合物的方法使用与含有不对称中心并已经拆分的原材料的立体定向反应制备, 或通过产生立体异构体混合物随后用已知方法拆分的方法制备。

[0056] 脂质修饰的磷酸二酯核苷前药的制备方法

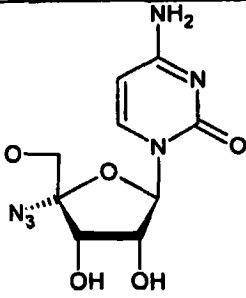
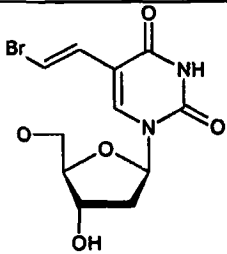
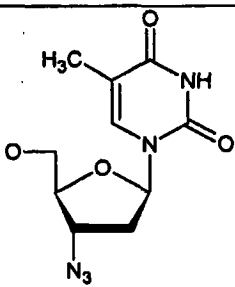
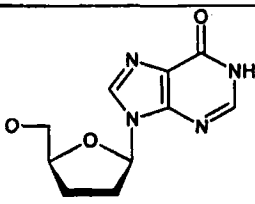
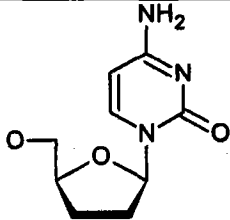
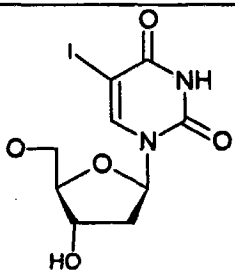
[0057] 一方面, 本发明提供脂质修饰的磷酸二酯核苷前药, 其中核苷羟基共价连接 (直接或间接通过连接分子) 到取代或未取代的烷基甘油、烷基丙二醇、烷基乙二醇或相关部分上以产生磷酸二酯。在一个实施方案中, 该脂质修饰基团是十八烷基-乙二醇 (“ODE”)。表 1 例举本发明提供的此类脂质修饰的磷酸二酯核苷前药的非限制性实例。



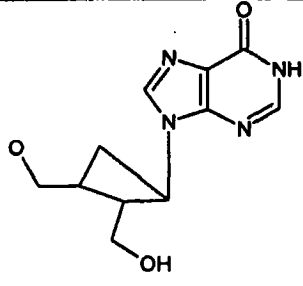
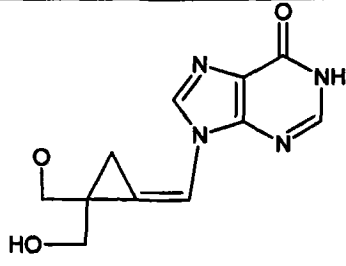
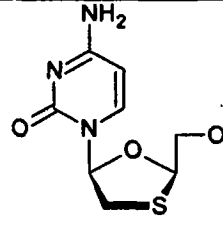
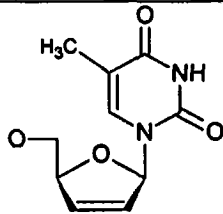
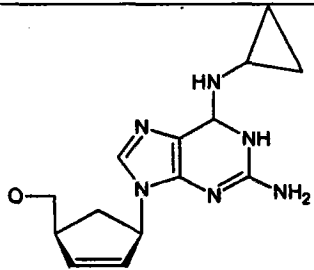
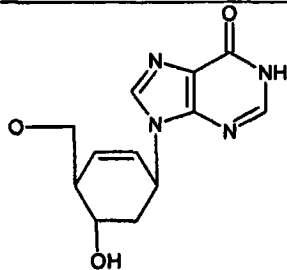
化合物	R ₁	R _{1'}	X	m	R ₂	R _{2'}	R ₃
ODE-磷酸化-利巴韦林	CH ₃ (CH ₂) ₁₇ O	H	CH ₂	0	H	H	
ODE-磷酸化-viramidine	CH ₃ (CH ₂) ₁₇ O	H	CH ₂	0	H	H	
ODE-磷酸化-NM107	CH ₃ (CH ₂) ₁₇ O	H	CH ₂	0	H	H	
ODE-磷酸化-valopicitabine	CH ₃ (CH ₂) ₁₇ O	H	CH ₂	0	H	H	
ODE-磷酸化-MK608	CH ₃ (CH ₂) ₁₇ O	H	CH ₂	0	H	H	

[0059]

[0060]

ODE-磷酸化- R1479	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{17}\text{O}$	H	CH_2	0	H	H	
ODE-磷酸化- 溴夫定	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{17}\text{O}$	H	CH_2	0	H	H	
ODE-磷酸化- 齐多夫定 (azt)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{17}\text{O}$	H	CH_2	0	H	H	
ODE-磷酸化- 去羟肌苷 (ddl)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{17}\text{O}$	H	CH_2	0	H	H	
ODE-磷酸化- 扎西他滨 (ddC)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{17}\text{O}$	H	CH_2	0	H	H	
ODE-磷酸化- 碘苷	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{17}\text{O}$	H	CH_2	0	H	H	

[0061]

ODE-磷酸化- 洛布卡韦	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{17}\text{O}$	H	CH_2	0	H	H	
ODE-磷酸化- cyclopropavir	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{17}\text{O}$	H	CH_2	0	H	H	
ODE-磷酸化- 拉米夫定	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{17}\text{O}$	H	CH_2	0	H	H	
ODE-磷酸化- 司他夫定	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{17}\text{O}$	H	CH_2	0	H	H	
ODE-磷酸化- 阿巴卡韦	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{17}\text{O}$	H	CH_2	0	H	H	
ODE-磷酸化- 环己烯基G	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{17}\text{O}$	H	CH_2	0	H	H	

ODE-磷酸化- maribavir	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{17}\text{O}$	H	CH_2	0	H	H	
ODE-磷酸化- 阿昔洛韦	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{17}\text{O}$	H	CH_2	0	H	H	
ODE-磷酸化- 喷昔洛韦	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{17}\text{O}$	H	CH_2	0	H	H	
ODE-磷酸化- 奥昔洛韦	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{17}\text{O}$	H	CH_2	0	H	H	
ODE-磷酸化- S2242	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{17}\text{O}$	H	CH_2	0	H	H	
ODE-磷酸化- A-5021	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{17}\text{O}$	H	CH_2	0	H	H	
ODE-磷酸化- 更昔洛韦	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{17}\text{O}$	H	CH_2	0	H	H	

[0062]

[0063] 在一些实施方案中,本发明提供利用亚磷酰胺(phosphoramidite)化学制备脂质修饰的磷酸二酯核苷前药的一般方法。利用核苷类似物利巴韦林的代表性实例显示在图1中。一方面,使适当被保护的环状和无环核苷,如2',3'-丙酮化合物保护的利巴韦林3与

脂质修饰的亚磷酸胺 (phosphoramidite), 如 1-O-十八烷基-乙二醇-2-(2-氰基乙基-N, N-二异丙基)-亚磷酸胺 (phosphoramidite) 2 偶联。随后用氧化剂, 如 I₂ 氧化以提供脂质修饰的磷酸三酯核苷类似物, 如 9。碱介导的从磷酸三酯中除去氰基乙氧基提供了磷酸二酯, 如 5。如果需要, 核苷的适当脱保护, 如从 5 中除去丙酮化合物保护基提供了本发明中所述的最终脂质修饰的磷酸二酯核苷前药, 如十八烷基-乙二醇-修饰的 (ODE) 磷酸二酯利巴韦林前药 6。

[0064] 第三节

[0065] 治疗疾病的方法

[0066] 本发明提供治疗或预防与疾病、病毒感染和癌症等相关的失调的方法。该方法包括给予需要其的人或其它哺乳动物治疗有效量的本发明的脂质修饰的磷酸二酯核苷前药。

[0067] 对于与病毒感染或不适当的细胞增殖相关的失调, 例如癌症, 参照抗病毒或抗癌母体化合物的推荐剂量确定“治疗有效量”。所选剂量随所选化合物的活性、给药途径、要治疗的病状的严重性和所治疗的患者的状况和之前病史而变。但是, 在技术人员范围内的是, 该化合物的剂量以比实现所需治疗效果所需的水平低的水平开始, 并逐渐提高剂量直至实现所需效果。如果需要, 该有效日剂量可分成多剂给药, 例如每天 2 至 4 剂。但是, 要理解的是, 任何特定患者的具体剂量水平取决于各种因素, 包括体重、一般健康、饮食、给药时间和途径、以及与其它药物的联合、和所治疗的疾病的严重性。

[0068] 通常, 本发明的化合物以包含 1% 至 100% 活性成分的单位剂型分配。当作为药物给予患者, 例如人时, 治疗剂量范围为大约 0.01 至大约 1,000mg/kg (患者体重)/天, 例如大约 0.10mg/kg/天至 100mg/kg/天是优选的。可以改变本发明的药物组合中活性成分的实际剂量水平以给予有效实现特定患者的所需治疗响应的量的活性化合物。

[0069] 在一些实施方案中, 本发明提供病毒感染, 包括 RNA 和 DNA 病毒造成的感染的治疗方法, 所述方法包括给予需要其的人或其它哺乳动物治疗有效量的本发明的脂质修饰的磷酸二酯核苷前药。脂质修饰的磷酸二酯核苷前药的使用和单位剂型、给药方法和给药安排的示例性实例列在表 2 中。

[0070] 表 2. 脂质修饰的磷酸二酯核苷前药作为单一药剂的给药方法和给药剂量

[0071]

Comb o	指征	API	剂量 & 给药方法 & 安排
		RNA 病毒	
1	丙型肝炎	ODE-磷酸二酯利巴韦林前药	1200 mg po, 48 周
2	RSV	ODE-磷酸二酯利巴韦林前药	1g q6h, 4d, 随后 500 mg q8h 达 3d po
3	流行性感胃	ODE-磷酸二酯利巴韦林前药	1g q6h, 4d, 随后 500 mg q8h 达 3d po
4	SARS	ODE-磷酸二酯利巴韦林前药	1g q6h, 4d, 随后 500 mg q8h 达 3d po
5	拉沙热	ODE-磷酸二酯利巴韦林前药	1g q6h, 4d, 随后 500 mg q8h 达 3d po
		DNA 病毒	
6	生殖器疱疹 HSV-1/2	ODE-磷酸二酯阿昔洛韦前药	1000 mg BID po 达 10 d
7	带状疱疹 VZV, HHV-3	ODE-磷酸二酯奥昔洛韦前药	1000 mg QD po 达 7 d
8	单核细胞增多症 EBV, HHV-4	ODE-磷酸二酯奥昔洛韦前药	2000 mg BID po 达 3 周
9	CMV 视网膜炎 HHV-5	ODE-磷酸二酯更昔洛韦前药	900 mg BID po 达 3 周
10	HHV-6A	ODE-磷酸二酯 A-5021 前药	1000 mg QD po 达 6 mo
11	HHV-6B	ODE-磷酸二酯 A-5021 前药	1000 mg QD po 达 6 mo
12	HHV-8	ODE-磷酸二酯更昔洛韦前药	900 mg BID po 达 3 周

[0072] 在一些实施方案中,本发明提供使用十八烷基-乙二醇-修饰的(ODE)磷酸二酯利巴韦林前药治疗丙型肝炎(HCV)的方法,所述方法包括给予需要其的人或其它哺乳动物治疗有效量的本发明的十八烷基-乙二醇-修饰的(ODE)磷酸二酯利巴韦林前药。在另一些实施方案中,十八烷基-乙二醇-修饰的(ODE)磷酸二酯利巴韦林前药以大约100毫克至4000毫克/天的剂量单位口服给药(po)于具有可检出的丙型肝炎病毒和代偿性肝病的成年人,每天一次(qd),持续48周。给药实际剂量随包括患者体重在内的许多患者因素而变。

[0073] 在一些实施方案中,本发明提供使用十八烷基-乙二醇-修饰的(ODE)磷酸二酯利巴韦林前药治疗呼吸道合胞病毒(RSV)的方法,所述方法包括给予需要其的人或其它哺乳动物治疗有效量的本发明的十八烷基-乙二醇-修饰的(ODE)磷酸二酯利巴韦林前药。在另一些实施方案中,对具有可检出的RSV感染和严重细支气管炎和/或肺炎的儿童,十八烷基-乙二醇-修饰的(ODE)磷酸二酯利巴韦林前药经口(po)以大约100毫克至4000毫克/6小时(q6h)的剂量单位给药4天,随后以大约100毫克至4000毫克/8小时(q8h)的剂量单位给药3天。给药实际剂量随包括患者体重在内的许多患者因素而变。

[0074] 在一些实施方案中,本发明提供使用十八烷基-乙二醇-修饰的(ODE)磷酸二酯利巴韦林前药治疗流行性感胃的方法,所述方法包括给予需要其的人或其它哺乳动物治疗有效量的本发明的十八烷基-乙二醇-修饰的(ODE)磷酸二酯利巴韦林前药。在另一些实施方案中,对要治疗由流行性感胃感染引起的简单急性病的成年人,十八烷基-乙二醇-修饰的(ODE)磷酸二酯利巴韦林前药经口(po)以大约100毫克至4000毫克/6小时(q6h)的剂量单位给药4天,随后以大约100毫克至4000毫克/8小时(q8h)的剂量单位给药3天。流行性感胃的症状可以包括发烧 $> 100^{\circ}\text{F}$;呼吸症状,如咳嗽、鼻部症状或喉咙痛;和全身症状,如肌痛、发冷/发汗(swats)、不适、疲乏或头痛。给药实际剂量随包括患者体重在内的许多患者因素而变。

[0075] 在一些实施方案中,本发明提供使用十八烷基-乙二醇-修饰的(ODE)磷酸二酯利巴韦林前药治疗严重急性呼吸综合征(SARS)的方法,所述方法包括给予需要其的人或其它哺乳动物治疗有效量的本发明的十八烷基-乙二醇-修饰的(ODE)磷酸二酯利巴韦林前药。在另一些实施方案中,对具有可检出的SARS感染和/或SARS症状,如发烧 $\geq 100.4^{\circ}\text{F}$;非典型肺炎或呼吸窘迫综合征的阳性胸部x-射线结果;在最近10天内与SARS确诊者接触(性接触或日常接触);和/或旅行到被WHO确定为近期SARS局部感染区的任何区域的成年人,十八烷基-乙二醇-修饰的(ODE)磷酸二酯利巴韦林前药经口(po)以大约100毫克至4000毫克/6小时(q6h)的剂量单位给药4天,随后以大约100毫克至4000毫克/8小时(q8h)的剂量单位给药3天。给药实际剂量随包括患者体重在内的许多患者因素而变。

[0076] 在一些实施方案中,本发明提供可用于治疗由其它病毒感染造成的失调症的脂质修饰的磷酸二酯核苷前药。适于此类治疗的指征包括易感病毒,如乙型肝炎病毒、人类免疫缺陷病毒(HIV)、单纯疱疹病毒-1(HSV-1)、单纯疱疹病毒-2(HSV-2)、水痘带状疱疹病毒(VZV、HHV-3)、Epstein-Barr病毒(EBV、HHV-4)、巨细胞病毒(CMV、HHV-5)、人疱疹病毒6A(HHV-6A)、人疱疹病毒6B(HHV-6B)、卡波西肉瘤相关病毒(KSHV、HHV-8)和天花病毒(orthopox virus)造成的疾病(例如,重型和轻型天花、牛痘(vaccinia)、天花(smallpox)、牛痘(cowpox)、骆驼痘、猴痘等)、埃博拉病毒、乳头状瘤病毒等。

[0077] 在一些实施方案中,提供治疗由不适当细胞增殖造成的失调,例如癌症,如黑色素瘤;肺癌;胰腺癌;胃癌、结肠癌和直肠癌;前列腺癌症;乳癌;白血病和淋巴瘤等的方法,所述方法包括给予需要其的人或其它哺乳动物治疗有效量的本发明的脂质修饰的磷酸二酯核苷前药。本发明提供抗癌的脂质修饰的磷酸二酯核苷前药作为本发明的化合物,其包括但不限于,阿糖胞苷(ara-C)、氟尿苷、氟脱氧尿苷(fluorodeoxyuridine/floxuridine)、吉西他滨、克拉屈滨、氟达拉滨、喷司他丁(2'-脱氧助间型霉素)、6-巯基嘌呤和6-硫鸟嘌呤和取代或未取代的ara-腺苷(ara-A)、ara-鸟苷(ara-G)和ara-尿核苷(ara-U)。本发明的抗癌化合物可以单独或与其它antimetabobtes或与其它种类的抗癌药,如生物碱、拓扑异构酶抑制剂、烷基化剂、antifumor 抗生素等联合使用。

[0078] 另一方面,本发明提供使用与另一治疗药物结合的脂质修饰的磷酸二酯核苷前药治疗疾病的方法,所述方法包括给予需要其的人或其它哺乳动物治疗有效量的与另一治疗药物结合的本发明的脂质修饰的磷酸二酯核苷前药。适用在本发明的方法和组合物中的脂质修饰的磷酸二酯核苷前药与其它治疗剂的组合、单位剂型和量的示例性实例列在表3

中。

[0079] 表 3. 脂质修饰的磷酸二酯核苷前药与其它治疗剂的组合和给药剂量

Comb o	指征	API's	剂量; 给药方法	给药安排
		<i>加干扰素</i>		
1.	丙型肝炎	ODE-磷酸二酯利巴韦林前药; PEGASYS (聚乙二醇干扰素 α -2a)	1200 mg po; 180 μ g sc	QD 48 周; QW 48 周
2.	丙型肝炎	ODE-磷酸二酯利巴韦林前药; Peg-Intron (聚乙二醇干扰素 α -2b)	800 mg po; 1.5 μ g/kg sc	QD 48 周; QW 48 周
3.	丙型肝炎	ODE-磷酸二酯利巴韦林前药; Intron A (干扰素 A-2b)	1200 mg po; 3 MIU sc	QD 48 周; TIW 48 周
4.	丙型肝炎	ODE-磷酸二酯利巴韦林前药; Roferon A (干扰素 A-2a)	1200 mg po; 3 MIU sc	QD 48 周; TIW 48 周
5.	丙型肝炎	ODE-磷酸二酯利巴韦林前药; Infergen (组合干扰素)	1200 mg po; 15 μ g sc	QD 48 周; TIW 48 周
		<i>加 HCV 蛋白酶抑制剂</i>		
6.	丙型肝炎	ODE-磷酸二酯利巴韦林前药; Telaprevir (HCV 蛋白酶抑制剂)	1200 mg po; 750 mg po	QD 48 周; TID 48 周
[0080] 7.	丙型肝炎	ODE-磷酸二酯利巴韦林前药; Boceprevir (HCV 蛋白酶抑制剂)	1200 mg po; 800 mg po	QD 48 周; TID 48 周
		<i>加 HCV 聚合酶抑制剂</i>		
8.	丙型肝炎	ODE-磷酸二酯利巴韦林前药; Valopicitabine (HCV 聚合酶抑制剂)	1200 mg po; 400mg po	QD 48 周; QD 48 周
9.	丙型肝炎	ODE-磷酸二酯利巴韦林前药; R-1626 (HCV 聚合酶抑制剂)	1200 mg po; 3000 mg po	QD 48 周; BID 48 周
		<i>加干扰素, 加蛋白酶抑制剂</i>		
10.	丙型肝炎	ODE-磷酸二酯利巴韦林前药; PEGASYS (聚乙二醇干扰素 α -2a); Telaprevir (HCV 蛋白酶抑制剂);	1200 mg po; 180 μ g sc; 750 mg po	QD 48 周; QW 48 周; TID 48 周
11.	丙型肝炎	ODE-磷酸二酯利巴韦林前药; PEGASYS (聚乙二醇干扰素 α -2a); Boceprevir (HCV 蛋白酶抑制剂)	1200 mg po; 180 μ g sc; 800 mg po	QD 48 周; QW 48 周; TID 48 周
		<i>加干扰素, 加聚合酶抑制剂</i>		

[0081]

12.	丙型肝炎	ODE-磷酸二酯利巴韦林前药; PEGASYS (聚乙二醇干扰素 α -2a); Valopicitabine (HCV 聚合酶抑制剂)	1200 mg po; 180 μ g sc; 400 mg po	QD 48 周; QW 48 周; QD 48 周
13.	丙型肝炎	ODE-磷酸二酯利巴韦林前药; PEGASYS (聚乙二醇干扰素 α -2a); R-1626 (HCV 聚合酶抑制剂)	1200 mg po; 180 μ g sc; 3000 mg po	QD 48 周; QW 48 周; BID 48 周
		<i>加神经氨酸酶抑制剂</i>		
14.	流行性感 冒	ODE-磷酸二酯利巴韦林前药; 扎那米韦 (神经氨酸酶抑制剂)	1200 mg po; 10 mg 吸入	QD 1 周; BID 5 天
15.	流行性感 冒	ODE-磷酸二酯利巴韦林前药; 奥司他韦 (神经氨酸酶抑制剂)	1200 mg po; 75 mg po	QD 1 周; BID 5 天
		<i>加 M2 离子通道阻滞剂</i>		
16.	流行性感 冒	ODE-磷酸二酯利巴韦林前药; 金刚烷胺 (M2 离子通道阻滞剂)	1200 mg po; 200 mg po	QD 1 周; QD 5 天
17.	流行性感 冒	ODE-磷酸二酯利巴韦林前药; 金刚乙胺 (M2 离子通道阻滞剂)	1200 mg po; 200 mg po	QD 1 周; QD 5 天

[0082] 在一些实施方案中,本发明提供通过与 PEGASYS(聚乙二醇干扰素 α -2a) 联合给予患者十八烷基-乙二醇-修饰的 (ODE) 磷酸二酯利巴韦林前药来治疗丙型肝炎 (HCV) 的方法。在另一些实施方案中,对具有可检出的丙型肝炎病毒和代偿性肝病的成年人,十八烷基-乙二醇-修饰的 (ODE) 磷酸二酯利巴韦林前药以大约 100 毫克至 4000 毫克/天的剂量单位口服给药 (po) 每天一次 (qd),同时聚乙二醇干扰素 α -2a 以大约 180 μ g 的剂量单位皮下给药 (sc) 每周一次,持续 48 周。给药实际剂量随包括患者体重在内的许多患者因素而变。本发明的十八烷基-乙二醇-修饰的 (ODE) 磷酸二酯利巴韦林前药通过溶血性贫血的毒副作用的降低以及经由选择性分布到肝中、利巴韦林的活性磷酸化形式的释放和在治疗的组织中降低的细胞内分解代谢而改进的效力,提供与母药利巴韦林相比改善的治疗指数。

[0083] 在一些实施方案中,本发明提供使用与 Peg-Intron(聚乙二醇干扰素 α -2b) 联合给药的十八烷基-乙二醇-修饰的 (ODE) 磷酸二酯利巴韦林前药治疗丙型肝炎 (HCV) 的方法。在另一些实施方案中,对具有可检出的丙型肝炎病毒和代偿性肝病的成年人,十八烷基-乙二醇-修饰的 (ODE) 磷酸二酯利巴韦林前药以大约 100 毫克至 4000 毫克/天的剂量单位口服给药 (po) 每天一次 (qd),同时聚乙二醇干扰素 α -2b 以大约 15 μ g/kg 的剂量单位皮下给药 (sc) 每周一次,持续 48 周。给药实际剂量随包括患者体重在内的许多患者因素而变。

[0084] 在一些实施方案中,本发明提供使用与干扰素 α -2b(Intron-A ;REBETRON) 联合给药的十八烷基-乙二醇-修饰的 (ODE) 磷酸二酯利巴韦林前药治疗丙型肝炎 (HCV) 的方法。在另一些实施方案中,对具有可检出的丙型肝炎病毒和代偿性肝病的成年人,十八烷基-乙二醇-修饰的 (ODE) 磷酸二酯利巴韦林前药以大约 100 毫克至 4000 毫克/天的剂量单位口服给药 (po) 每天一次 (qd),同时干扰素 α -2b 以大约 3 百万国际单位 (MIU) 的剂量单位皮下给药 (SC) 每周三次 (TIW),持续 48 周。给药实际剂量随包括患者体重在内的许多患者因素而变。

[0085] 在一些实施方案中,本发明提供使用与干扰素 α -2a(Roferon) 联合给药的十八烷基-乙二醇-修饰的 (ODE) 磷酸二酯利巴韦林前药治疗丙型肝炎 (HCV) 的方法。在另一些实施方案中,对具有可检出的丙型肝炎病毒和代偿性肝病的成年人,十八烷基-乙二醇-修饰的 (ODE) 磷酸二酯利巴韦林前药以大约 100 毫克至 4000 毫克/天的剂量单位口服给药 (po) 每天一次 (qd),同时干扰素 α -2a 以大约 3 百万国际单位 (MIU) 的剂量单位皮下给药 (SC) 每周三次 (TIW),持续 48 周。给药实际剂量随包括患者体重在内的许多患者因素而变。

[0086] 在一些实施方案中,本发明提供使用与 telaprevir (HCV 蛋白酶抑制剂, VX-950) 联合给药的十八烷基-乙二醇-修饰的 (ODE) 磷酸二酯利巴韦林前药治疗丙型肝炎 (HCV) 的方法。在另一些实施方案中,对具有可检出的丙型肝炎病毒和代偿性肝病的成年人,十八烷基-乙二醇-修饰的 (ODE) 磷酸二酯利巴韦林前药以大约 100 毫克至 4000 毫克/天的剂量单位口服给药 (po) 每天一次 (qd),同时 telaprevir 以大约 100 毫克至 4000 毫克/天的剂量单位 po 给药每天三次 (tid),持续 48 周。给药实际剂量随包括患者体重在内的许多患者因素而变。

[0087] 在一些实施方案中,本发明提供使用与 R-1626 (HCV 聚合酶抑制剂) 联合给药的十八烷基-乙二醇-修饰的 (ODE) 磷酸二酯利巴韦林前药治疗丙型肝炎 (HCV) 的方法。在另一些实施方案中,对具有可检出的丙型肝炎病毒和代偿性肝病的成年人,十八烷基-乙二醇-修饰的 (ODE) 磷酸二酯利巴韦林前药以大约 100 毫克至 4000 毫克/天的剂量单位口服给药 (po) 每天一次 (qd),同时 R-1626 以大约 100 毫克至 4000 毫克/天的剂量单位 po 给药每天两次 (bid),持续 48 周。给药实际剂量随包括患者体重在内的许多患者因素而变。

[0088] 在一些实施方案中,本发明提供使用与 PEGASYS(聚乙二醇干扰素 α -2a) 和 telaprevir (HCV 蛋白酶抑制剂) 联合给药的十八烷基-乙二醇-修饰的 (ODE) 磷酸二酯利巴韦林前药治疗丙型肝炎 (HCV) 的方法。在另一些实施方案中,对具有可检出的丙型肝炎病毒和代偿性肝病的成年人,十八烷基-乙二醇-修饰的 (ODE) 磷酸二酯利巴韦林前药以大约 100 毫克至 4000 毫克/天的剂量单位口服给药 (po) 每天一次 (qd),同时聚乙二醇干扰素 α -2a 以大约 180 μ g 的剂量单位皮下给药 (SC) 每周一次且 telaprevir 以大约 100 毫克至 4000 毫克/天的剂量单位 po 给药每天三次 (tid),持续 48 周。给药实际剂量随包括患者体重在内的许多患者因素而变。

[0089] 在一些实施方案中,本发明提供使用与 PEGASYS(聚乙二醇干扰素 α -2a) 和 R-1626 (HCV 聚合酶抑制剂) 联合给药的十八烷基-乙二醇-修饰的 (ODE) 磷酸二酯利巴韦林前药治疗丙型肝炎 (HCV) 的方法。在另一些实施方案中,对具有可检出的丙型肝炎病

毒和代偿性肝病的成年人,十八烷基-乙二醇-修饰的(ODE)磷酸二酯利巴韦林前药以大约 100 毫克至 4000 毫克/天的剂量单位口服给药(po)每天一次(qd),同时聚乙二醇干扰素 α -2a 以大约 180 μ g 的剂量单位皮下给药(SC)每周一次且 R-1626 以大约 100 毫克至 4000 毫克/天的剂量单位 po 给药每天两次(bid),持续 48 周。给药实际剂量随包括患者体重在内的许多患者因素而变。

[0090] 另一方面,本发明提供使用与奥司他韦(TAMIFLU,神经氨酸酶抑制剂)联合给药的十八烷基-乙二醇-修饰的(ODE)磷酸二酯利巴韦林前药治疗流行性感胃的方法。在一些实施方案中,对要治疗由流行性感胃感染引起的简单急性病的成年人,十八烷基-乙二醇-修饰的(ODE)磷酸二酯利巴韦林前药以大约 100 毫克至 4000 毫克/天的剂量单位口服给药(po)每天一次(qd),同时奥司他韦以大约 10 毫克至 2000 毫克/天的剂量单位 po 给药每天两次(bid),持续大约 7 天。给药实际剂量随包括患者体重在内的许多患者因素而变。

[0091] 另一方面,本发明提供使用与金刚乙烷(M2 通道阻滞剂)联合给药的十八烷基-乙二醇-修饰的(ODE)磷酸二酯利巴韦林前药治疗流行性感胃的方法。在一些实施方案中,对要治疗由流行性感胃感染引起的简单急性病的成年人,十八烷基-乙二醇-修饰的(ODE)磷酸二酯利巴韦林前药以大约 100 毫克至 4000 毫克/天的剂量单位口服给药(po)每天一次(qd),同时奥司他韦以大约 10 毫克至 2000 毫克/天的剂量单位 po 给药每天一次(qd),持续大约 7 天。给药实际剂量随包括患者体重在内的许多患者因素而变。

[0092] 将本发明的组合物和治疗组合以治疗有效量给予需要抗病毒治疗的对象以治疗或预防病毒感染。上述各种组合物和治疗组合的日剂量可以按需要以单剂或多个分剂量给予对象。分剂量可以例如每天给药 2 至 6 次。也可以使用给药频率较低的缓释剂。在脂质修饰的磷酸二酯核苷前药和其它抗病毒治疗剂在分开剂型中给药的一些实施方案中,每天给予的各组分的剂数不一定相同,例如一组分可能具有较大的活性持续期,因此给药频率较低。

[0093] 本发明的组合物和药剂可进一步包含一种或多种可药用载体、一种或多种赋形剂和/或一种或多种添加剂。该药物组合物可包含大约 1 至大约 99 重量%活性成分,例如大约 5 至大约 95%活性成分。

[0094] 可用的可药用载体可以是固体、液体或气体。可药用载体的非限制性实例包括固体和/或液体,如碳酸镁、硬脂酸镁、滑石、糖、乳糖、乙醇、甘油、水等。单位剂型或制剂中的载体量可以为该治疗组合物或治疗组合总重量的大约 5 至大约 99 重量%。合适的可药用赋形剂和添加剂的非限制性实例包括无毒相容填料、粘合剂,如淀粉、聚乙烯基吡咯烷酮或纤维素醚,崩解剂,如淀粉羟乙酸钠、交联聚乙烯基吡咯烷酮或交联羧甲纤维素钠,缓冲剂、防腐剂、抗氧化剂、润滑剂、香料、增稠剂、着色剂、润湿剂,如十二烷基硫酸钠,乳化剂等。赋形剂或添加剂的量可以为该单位剂型或制剂总重量的大约 0.1 至大约 95 重量%。本领域技术人员会理解,载体、赋形剂和添加剂(如果存在)的量可变。可药用载体和各种组合物制造方法的进一步实例可见于 A. Gennaro(ed.), Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 第 21 版, (2005), Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, Md.

[0095] 对本发明而言,可用的固体形式制剂包括粉末、片剂、可分散颗粒剂、胶囊、扁囊剂和栓剂。下面提供优选的固体形式制剂的制备例。

[0096] 对本发明而言,可用的液体形式制剂包括溶液、悬浮液和乳状液。实例包括用于肠道外注射的水或水-丙二醇溶液。口服溶液、悬浮液和乳状液可含有甜味剂和乳浊剂。本发明的液体形式制剂还包括鼻内给药溶液。

[0097] 适合吸入的本发明的气雾剂制剂包括溶液和粉末形式的固体,它们可以与可药用载体,如惰性压缩气体,例如氮气结合。

[0098] 本发明包括要在临使用前转化成口服或肠道外给药用液体形式制剂的固体形式制剂。此类液体形式包括溶液、悬浮液和乳状液。

[0099] 本发明的方法和组合物中所用的活性药物成分(“APIs”或“治疗剂”)也可以经皮给药。该经皮组合物可以呈霜、洗液、气雾剂和/或乳状液形式,并可以包括在如本领域中常规用于其它用途的基质型或储库型经皮贴膏中。

[0100] 在一些实施方案中,本发明的组合物和方法中的APIs口服给药。在另一些实施方案中,本发明的组合物和方法中的APIs在合适的口服剂型中。例如,本发明的组合物可以通过普通方法压成单层或多层片剂。此外,它们可以以包衣片形式制造或以硬壳胶囊形式提供。它们也可以以口服悬浮液或用于重构成口服悬浮液的粉末形式提供。一般而言,可以根据本文的公开内容通过传统程序和技术制备本组合物的各种口服剂型。根据本公开,本领域技术人员容易看出此类方法和技术对本发明的组合物的配制的适用性。

[0101] 除上文提到的治疗活性成分外,本发明的组合物可以含有常用于制造药物制品的任何各种稀释剂作为任选成分。因此,例如,在将本组合物配制成所需口服剂型时,可以使用任何普通填料、崩解剂或润滑剂,例如乳糖、阿拉伯树胶、淀粉、滑石、硬脂酸镁或硬脂酸钙、明胶等作为任选成分。但是,应该充分理解的是,本文提到的任选成分仅作为实例给出,本发明不限于使用其。相反,可以使用其它辅助剂,如防腐剂、稳定剂、悬浮剂或缓冲剂(它们的性质和应用是本领域中公知的)实施本发明。

[0102] 在实施上述方法时,可以使用包含脂质修饰的磷酸二酯核苷前药和另一抗病毒剂,如 telaprevir、boceprevir、valopicitabine、R-1626、奥斯他韦、amantidien 或金刚乙烷的代表性制剂在分开的片剂或胶囊中的联合给药。

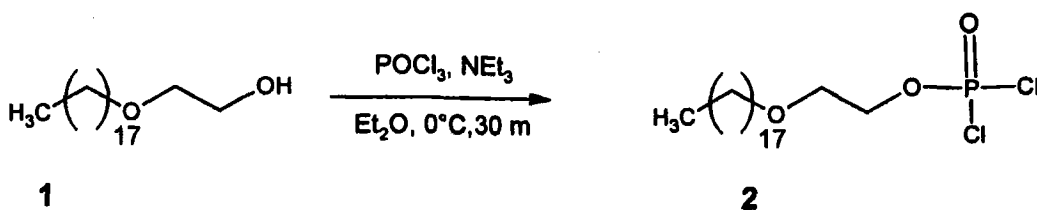
[0103] 本发明还提供含活性成分的组别的抗病毒治疗药盒,其中活性成分可以分开给药或以混合物形式给药,本发明还提供任选与使用说明书一起包装在药盒中的药物组合物。该药盒含有包含至少一种抗病毒剂的药物组合物和分立的包含另一抗病毒剂或抗病毒剂组合的药物组合物,或如上所述两者的混合物的单一组合物,以及任选地,该药盒中所含的组别的给药指导。例如当不同的组分必须以不同剂型(例如口服和肠道外)给药或以不同剂量间隔给药时,药盒是有利的。

[0104] IV. 实施例

[0105] 现在参照下列非限制性实施例更详细描述本发明。下列实施例描述利巴韦林5'-磷酸二酯脂质前药的制备。本发明提供的在合成制备法中制备本发明的化合物的示例性方法的概况显示在图1中。参照图1,实施例1-7描述该合成的各种步骤。本领域技术人员会认可,本文所述的实施例中所用的方法容易适用于制备如第II节中所述的其它相关核苷磷酸二酯脂质前药。

[0106] 实施例 1.1-0-十八烷基-乙二醇-2-二氯代磷酸酯(2)的合成

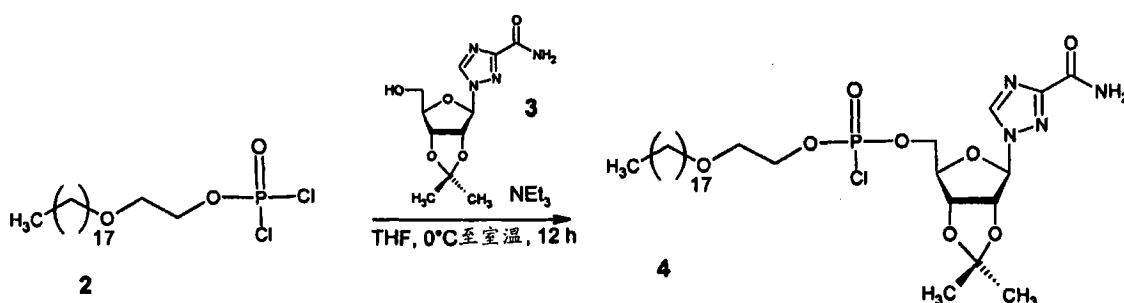
[0107]



[0108] 将 2-(十八烷氧基)乙烷 (1, 1.0 克, 3.18 毫摩尔, 1 当量) 溶解在无水乙醚 (20 毫升) 中并在 N_2 下冷却至 $0^\circ C$ 。缓慢加入三乙胺 (0.45 毫升, 3.18 毫摩尔, 1 当量) 和 $POCl_3$ (0.29 毫升, 3.18 毫摩尔, 1 当量)。在 N_2 下在 $0^\circ C$ 下搅拌 30 分钟后, 过滤该反应以除去三乙胺盐酸盐, 产生粗产物 2。

[0109] 实施例 2. 1-O-十八烷基-乙二醇-2-氯代磷酸化-利巴韦林-2',3'-丙酮化合物 (4) 的合成

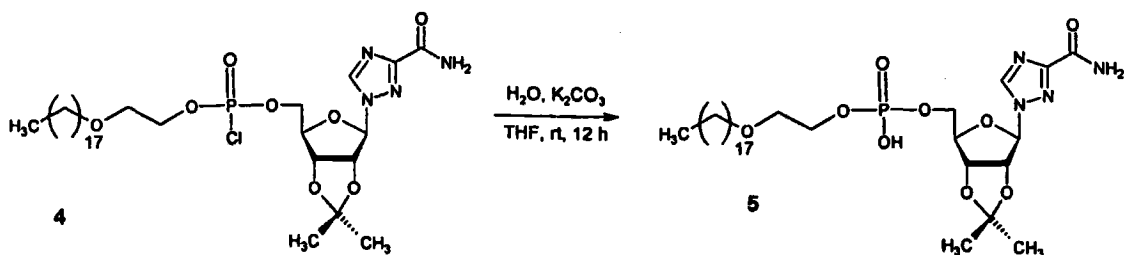
[0110]



[0111] 将二氯代磷酸酯 2 (1.0 克, 2.32 毫摩尔, 1 当量) 溶解在无水 THF (15 毫升) 中并在 N_2 下将该溶液冷却至 $0^\circ C$ 。缓慢加入三乙胺 (0.32 毫升, 2.32 毫摩尔, 1 当量) 和利巴韦林-2',3'-丙酮化合物 (3, 0.66 克, 2.32 毫摩尔, 1 当量)。在 N_2 下在 $0^\circ C$ 下搅拌 30 分钟后, 使该反应经 12 小时升温至室温。过滤该反应以除去三乙胺盐酸盐, 产生粗产物 4。

[0112] 实施例 3. 1-O-十八烷基-乙二醇-2-磷酸化-利巴韦林-2',3'-丙酮化合物 (5) 的合成

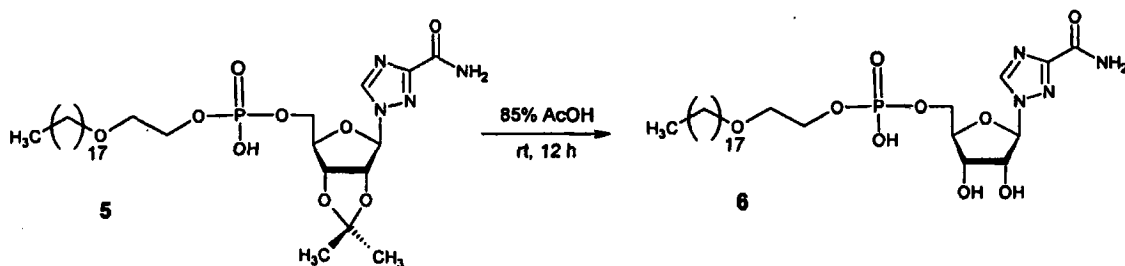
[0113]



[0114] 将氯代磷酸酯 4 (1.0 克, 1.47 毫摩尔, 1 当量) 溶解在 THF (15 毫升) 中。加入饱和 K_2CO_3 水溶液 (0.1 毫升) 并将该反应在室温下搅拌 1 小时。将该反应真空浓缩。该粗材料通过快速色谱法 (二氧化硅, 梯度 70 : 30 : 3 : 3/ $CHCl_3$: MeOH : NH_4OH : H_2O) 提纯以提供 5。

[0115] 实施例 4. 1-O-十八烷基-乙二醇-2-磷酸化-利巴韦林 (5) 的合成

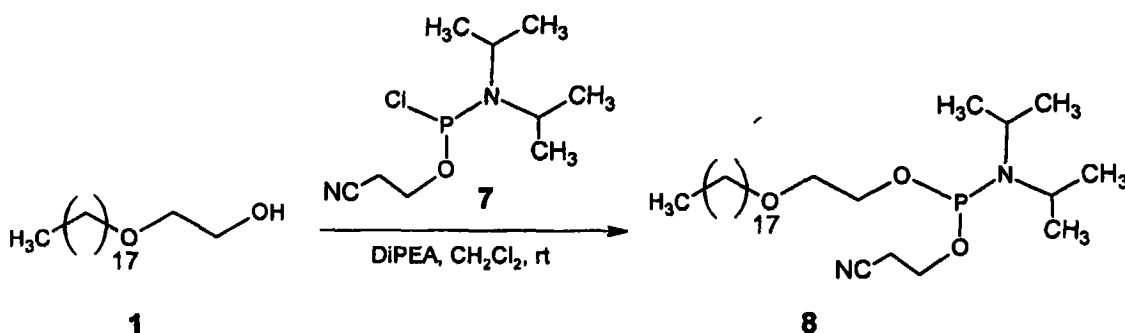
[0116]



[0117] 丙酮化合物 5(1.0 克, 1.51 毫摩尔, 1 当量) 用 85% AcOH(5 毫升) 处理和室温下搅拌 12 小时。将该反应真空浓缩。该粗材料通过快速色谱法(二氧化硅, 梯度 70 : 30 : 3 : 3/CHCl₃ : MeOH : NH₄OH : H₂O) 提纯以提供 6。

[0118] 实施例 5. 1-O-十八烷基-乙二醇-2-(2-氰基乙基-N,N-二异丙基)-亚磷酰胺(phosphoramidite) (8) 的合成

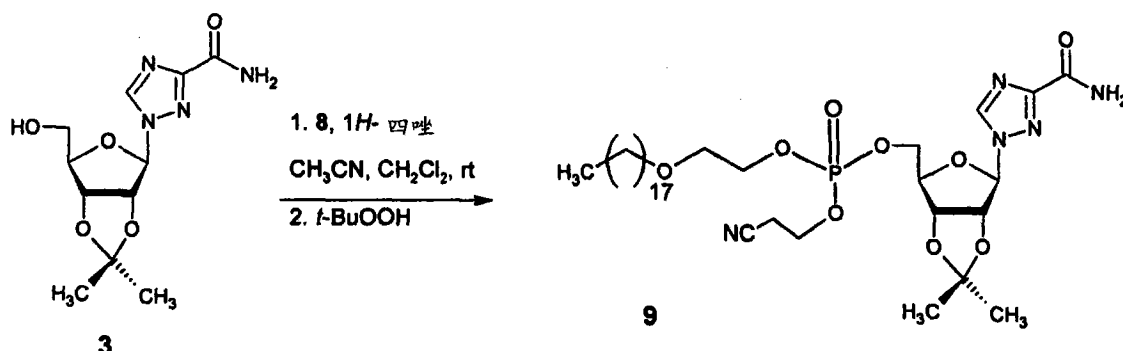
[0119]



[0120] 将 2-(十八烷氧基) 乙烷 (1, 1.0 克, 3.18 毫摩尔, 1 当量) 溶解在无水 CH₂Cl₂ (20 毫升) 中。在 N₂ 下逐滴加入二异丙基乙胺 (1.66 毫升, 9.54 毫摩尔, 3 当量) 和 2-氰基乙基-N,N-二异丙基氯化磷酰胺酯 (phosphoramidochlorite) (0.99 毫升, 4.45 毫摩尔, 1.4 当量)。在 N₂ 下在室温下搅拌 1 小时后, 该反应用乙酸乙酯 (250 毫升) 稀释, 用盐水洗涤, 经 Na₂SO₄ 干燥和真空浓缩。该粗材料通过快速色谱法(二氧化硅, 1 : 1/己烷 : Et₂O+1% NEt₃) 提纯以提供 8。

[0121] 实施例 6. 1-O-十八烷基-乙二醇-2-(2-氰基乙基)-5'-利巴韦林-磷酸三酯 (9) 的合成

[0122]

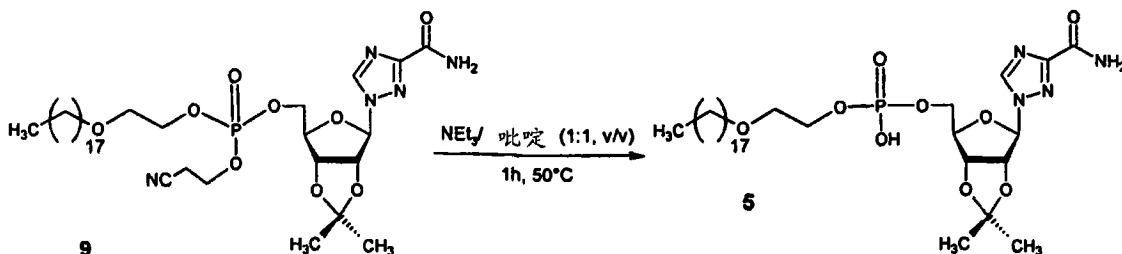


[0123] 将利巴韦林-2',3'-丙酮化合物 (3, 1.0 克, 3.52 毫摩尔, 1 当量) 溶解在无水 CH₃CN : CH₂Cl₂/1 : 1 (20 毫升) 中。在 N₂ 下加入亚磷酰胺 (phosphoramidite) 8 (1.81 克, 3.52 毫摩尔, 1 当量) 和 1-H-四唑 (0.74 克, 10.56 毫摩尔, 3 当量) 并将该反应在 N₂ 下在室温下搅拌 24 小时。

[0124] 添加 $t\text{-BuOOH}$ (5.5M 在癸烷中, 2.56 毫升, 14.08 毫摩尔, 4 当量) 并将该反应在室温下搅拌 1 小时。使该反应在 CHCl_3 和饱和 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 之间分相, 用 CHCl_3 萃取, 用盐水洗涤, 经 Na_2SO_4 干燥, 并真空浓缩。该粗材料通过快速色谱法 (二氧化硅, 25% EtOAc : 己烷) 提纯以提供 9。

[0125] 实施例 7.1-0-十八烷基-乙二醇-2-磷酸化-利巴韦林-2',3'-丙酮化合物 (5) 的合成

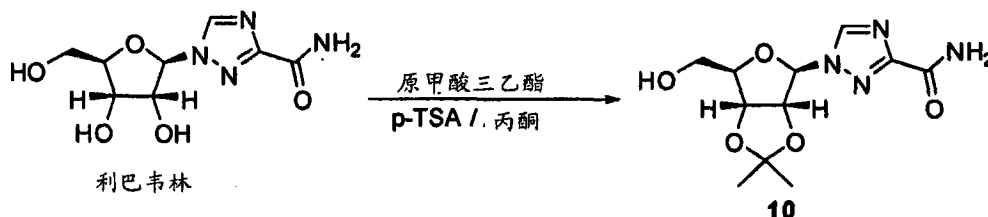
[0126]



[0127] 用 NEt_3 /吡啶 (1 : 1, 10 毫升) 处理三酯 9 (1.0 克, 1.4 毫摩尔, 1 当量) 并在室温下搅拌 12 小时。将该反应真空浓缩。该粗材料通过快速色谱法 (二氧化硅, 梯度 70 : 30 : 3 : 3/ CHCl_3 : MeOH : NH_4OH : H_2O) 提纯以提供 5。

[0128] 实施例 8.1-(2,3-0-亚异丙基- β -D-呋喃核糖基 (ribofuranosyl))-1H-1,2,4-三唑-3-羧酰胺 (10)

[0129]

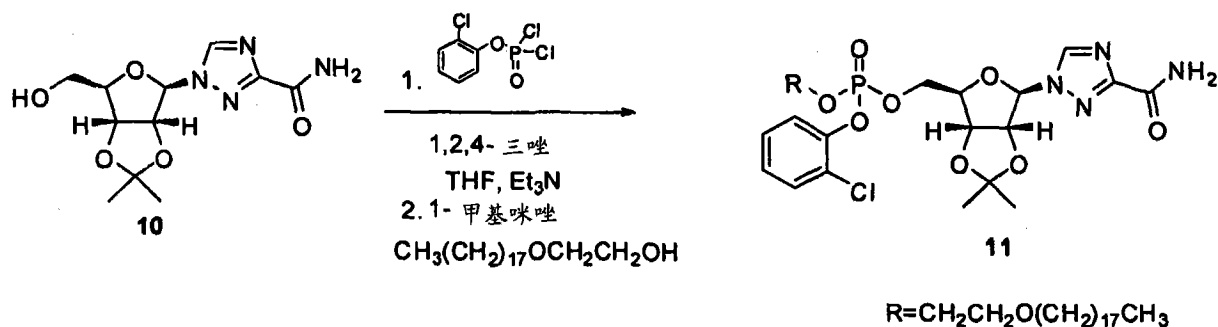


[0130] 将原甲酸三乙酯 (5.99 毫升 / 36.0 毫摩尔) 和对甲苯磺酸 (0.068 克 / 0.360 毫摩尔) 添加到丙酮 (40 毫升) 中并使该反应在室温下搅拌过夜。将所得红色溶液添加到利巴韦林 (4.00g/16.4 毫摩尔) 在无水的 DMF (10 毫升) 中的悬浮液中。红色大部分消失。将该悬浮液在 50°C 下搅拌 12 小时, 然后在室温下搅拌过夜。将该反应真空浓缩以产生粘性黄色残留物。将该残留物再溶解在 THF 中。向该 THF 溶液中加入硅胶并将该悬浮液真空浓缩。将该残留物置于 90 克硅胶筒上, 相继用二氯甲烷 (400 毫升), 随后在二氯甲烷中的 5% 甲醇 (1 升)、最后在二氯甲烷中的 10% 甲醇 (10 升) 洗脱该柱。合并纯产物的类似馏分并真空浓缩。将该残留物悬浮在氯仿中并真空浓缩以产生白色固体状的标题化合物 10 (4.02 克 / 86%)。

[0131] ^1H NMR (400MHz, DMSO-d_6) δ ppm 1.33 (s, 3H) 1.51 (s, 3H) 3.36-3.53 (m, 2H) 4.23 (dt, $J = 6.06, 1.76\text{Hz}$, 1H) 4.91 (dd, $J = 6.01, 1.87\text{Hz}$, 1H) 4.94-5.01 (m, 1H) 5.19 (dd, $J = 6.01, 1.45\text{Hz}$, 1H) 6.21 (d, $J = 1.45\text{Hz}$, 1H) 7.66 (s, 1H) 7.86 (s, 1H) 8.81 (s, 1H). MS ES^+m/z 307.2 ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$, 285.3 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$. MS ES^-m/z 283.3 ($\text{M}-\text{H}$) $^-$.

[0132] 实施例 9.1-{5-0-[(2-氯苯氧基)(十八烷氧基)磷酰基]-2,3-0-亚异丙基- β -D-呋喃核糖基}-1H-1,2,4-三唑-3-羧酰胺 (11)

[0133]

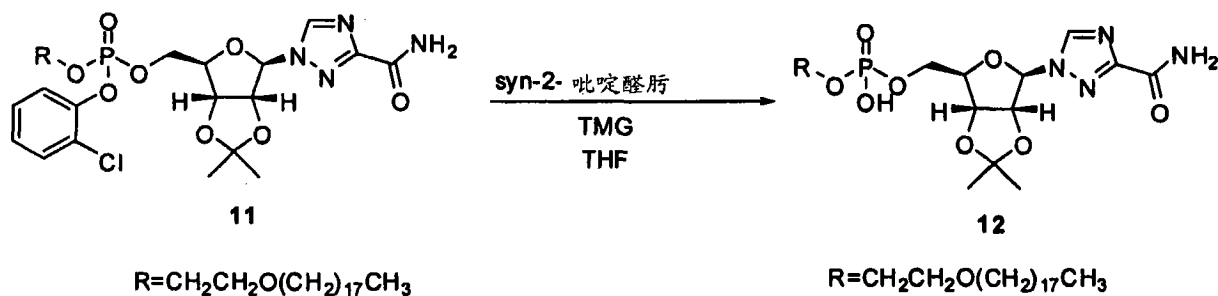


[0134] 向三唑 (0.146 克 / 2.12 毫摩尔)、三乙胺 (0.215 克 / 2.12 毫摩尔) 和无水 THF (2.1 毫升) 的溶液中加入溶解在无水 THF (1.3 毫升) 中的 2-氯苯基二氯代磷酸酯 (phosphorodichloridate) (0.259 克 / 1.06 毫摩尔) 溶液。形成白色固体。将该反应在室温下搅拌 1 小时, 然后过滤。用无水 THF (2.1 毫升) 洗涤过滤垫。向滤液中加入追加 THF (1.2 毫升)、1-(2,3-O-亚异丙基-β-D-呋喃核糖基)-1H-1,2,4-三唑-3-羧酰胺 (0.226 克 / 0.795 毫摩尔) 10 和 1-甲基咪唑 (0.084 毫升 / 1.06 毫摩尔)。将该反应在室温下搅拌 1 小时, 随后加入 2-(十八烷氧基) 乙烷 (0.250 克 / 0.795 毫摩尔) 并将该反应在室温下搅拌过夜。将该反应真空浓缩, 将残留物溶解在二氯甲烷中并装载到已用二氯甲烷预平衡的 40 克硅胶筒上。相继用二氯甲烷 (100 毫升), 随后在二氯甲烷中的 2.5% 甲醇 (250 毫升)、最后在二氯甲烷中的 5% 甲醇洗脱该柱。获得差的分离, 合并含有产物的所有馏分并真空浓缩。将残留物再溶解在二氯甲烷中, 并装载在已用二氯甲烷预平衡的 40 克硅胶筒上。相继用二氯甲烷 (250 毫升), 随后在二氯甲烷中的 1% 甲醇 (250 毫升)、随后在二氯甲烷中的 2% 甲醇 (250 毫升), 最后在二氯甲烷中的 4% 甲醇洗脱该柱。合并纯产物的类似馏分并真空浓缩。将残留物溶解在二氯甲烷中并真空浓缩以产生无色粘稠油状的标题化合物 11 (0.439 克 / 71%)。

[0135] ¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ ppm 0.80-0.90 (m, 3H) 1.15-1.30 (m, 30H) 1.33 (s, 3H) 1.39-1.48 (m, 2H) 1.51 (s, 3H) 3.29-3.39 (m, 2H) 3.50-3.59 (m, 2H) 4.13-4.30 (m, 3H) 4.31-4.41 (m, 1H) 4.43-4.51 (m, 1H) 5.02 (dd, J = 5.81, 2.28Hz, 1H) 5.12-5.18 (m, 1H) 6.38 (d, J = 5.60Hz, 1H) 7.20-7.27 (m, 1H) 7.27-7.39 (m, 2H) 7.51-7.58 (m, 1H) 7.67 (s, 1H) 7.86 (br. s., 1H) 8.81 (s, 1H). MS ES⁺m/z 793.9 (M+Na)⁺.

[0136] 实施例 10. 1-(5-O-{羟基 [2-(十八烷氧基) 乙氧基] 磷酰基}-2,3-O-亚异丙基-β-D-呋喃核糖基)-1H-1,2,4-三唑-3-羧酰胺 (12)

[0137]



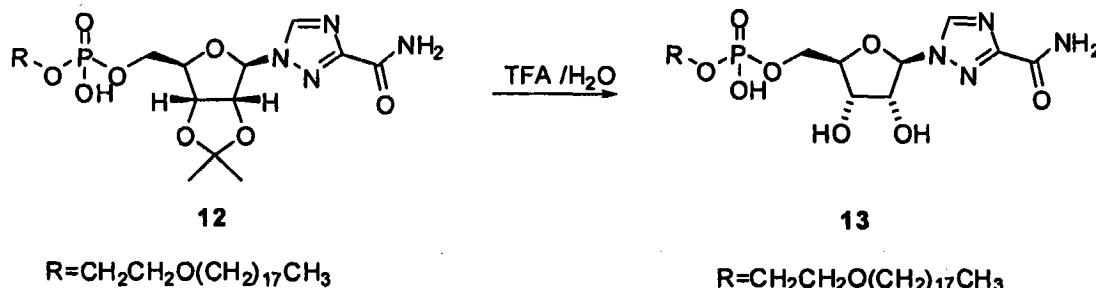
[0138] 向 1-{5-O-[(2-氯苯氧基) (十八烷氧基) 磷酰基]-2,3-O-亚异丙基-β-D-呋喃核糖基}-1H-1,2,4-三唑-3-羧酰胺 11 (0.448 克 / 0.581 毫摩尔) 和无水 THF (8.0 毫升) 的溶液中加入溶解在无水 THF (4.2 毫升) 中的 1,1,3,3-四甲基胍 (0.378 克 / 3.28 毫摩

尔) 和 *syn*-2-吡啶醛肟 (0.401 克 / 3.28 毫摩尔) 的溶液。该反应用追加的无水 THF (4.2 毫升) 稀释并在室温下搅拌过夜。随后将该反应真空浓缩, 将残留物溶解在二氯甲烷中并装载到已用二氯甲烷预平衡的 40 克硅胶筒上。相继用二氯甲烷 (40 毫升)、在二氯甲烷中的 10% 甲醇 (250 毫升)、在二氯甲烷中的 20% 甲醇 (250 毫升)、最后在二氯甲烷中的 30% 甲醇洗脱该柱。合并纯产物的类似馏分并真空浓缩以产生 (0.368 克 / 96%) 含有痕量 1, 1, 3, 3, - 四甲胍的标题化合物。将这种受污染材料 (0.345 克) 溶解在 THF 和乙酸乙酯的 1 : 1 溶液 (15 毫升) 中并向该溶液中加入水 (5 毫升)。将所得双相混合物在冰 / 水浴中冷却, 并将水相用冷 1M HCl 酸化至 pH = 1-2。摇振该酸化混合物, 然后在分层的同时保持冷却。分离有机层, 水层用水 (5 毫升) 稀释。水层用 THF 和乙酸乙酯的 1 : 1 溶液再洗涤两次。合并有机层, 用硫酸钠干燥并真空浓缩。将残留物溶解在甲醇中并真空浓缩以助于除去残留水。该方法再重复三次。将残留物溶解在二氯甲烷中和真空浓缩以产生 (0.312 克 / 81%) 白色固体状的标题化合物 12。

[0139] $^1\text{H NMR}$ (400MHz, DMSO-d_6) δ ppm 0.85 (t, $J = 6.70\text{Hz}$, 3H) 1.17-1.29 (m, 30H) 1.33 (s, 3H) 1.46 (t, $J = 6.43\text{Hz}$, 2H) 1.51 (s, 3H) 3.35 (t, $J = 6.63\text{Hz}$, 2H) 3.47 (t, $J = 4.46\text{Hz}$, 2H) 3.84-3.98 (m, 3H) 3.98-4.08 (m, 1H) 4.40 (dt, $J = 6.43, 2.07\text{Hz}$, 1H) 5.00 (dd, $J = 5.91, 2.18\text{Hz}$, 1H) 5.13-5.19 (m, 1H) 6.30-6.37 (m, 1H) 7.67 (s, 1H) 7.91 (s, 1H) 8.81 (s, 1H). MS $\text{ES}^+_{\text{m/z}}$ 661.5 (M+H) $^+$. MS $\text{ES}^-_{\text{m/z}}$ 659.6 (M-H) $^+$. HPLC = 100% .

[0140] 实施例 11. 1-(5-O-{羟基 [2-(十八烷氧基) 乙氧基] 磷酰基} - β -D-呋喃核糖基) -1H-1, 2, 4-三唑-3-羧酰胺 (13)

[0141]



[0142] 将丙酮化合物, 1-(5-O-{羟基 [2-(十八烷氧基) 乙氧基] 磷酰基} - 2, 3-O-亚异丙基 - β -D-呋喃核糖基) -1H-1, 2, 4-三唑-3-羧酰胺, 12 (0.304 克 / 0.460 毫摩尔) 溶解在三氟乙酸和水的 9 : 1 混合物 (4 毫升) 中并在室温下搅拌。在搅拌 45 分钟后, 将该反应真空浓缩。向残留物中加入甲苯, 并将该混合物真空浓缩。该方法重复数次以从残留物中共沸残留水。向残留物中加入甲醇并浓缩悬浮液。该方法重复数次直至真空浓缩产生白色固体。将该白色固体溶解在二氯甲烷中并真空浓缩以产生 (0.264 克 / 93%) 白色固体状的标题化合物:

[0143] $^1\text{H NMR}$ (400MHz, DMSO-d_6) \square ppm 0.81-0.91 (m, 3H) 1.16-1.33 (m, 30H) 1.46 (t, $J = 6.22\text{Hz}$, 2H) 3.34 (t, $J = 6.63\text{Hz}$, 2H) 3.47 (t, $J = 4.46\text{Hz}$, 2H) 3.86-4.03 (m, 3H) 4.05-4.16 (m, 2H) 4.19-4.26 (m, 1H) 4.31-4.38 (m, 1H) 5.88 (d, $J = 3.52\text{Hz}$, 1H) 7.64 (s, 1H) 7.87 (s, 1H) 8.82 (s, 1H). MS $\text{ES}^+_{\text{m/z}}$ 659.4 (M+K) $^+$, 643.4 (M+Na) $^+$, 621.4 (M+H) $^+$. MS $\text{ES}^-_{\text{m/z}}$ 619.5 (M-H) $^+$. HPLC = 100% .

[0144] 实施例 12. 体外红血球 ATP 水平的检测法

[0145] 使用红血球 ATP 水平作为证实化合物造成溶血性贫血（一种不合意的副作用）的潜力的替代指标。为了测定十八烷基 - 乙二醇 - 修饰的 (ODE) 磷酸二酯利巴韦林前药对红血球 ATP 水平的作用, 特别在含有 120 毫摩尔 / 升 NaCl、5 毫摩尔 / 升 KCl、1.2 毫摩尔 / 升 MgSO₄、1.2 毫摩尔 / 升 KH₂PO₄、24 毫摩尔 / 升 NaHCO₃, pH 7.4、补充了 50% 血浆和 10 毫摩尔 / 升葡萄糖, 含和不含利巴韦林磷脂前药或利巴韦林 (1 毫摩尔 / 升) 的缓冲剂中以 10% 血细胞比容培养洗过的红细胞。在 37°C 下培养 12 小时后, 将该红细胞在磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 中洗 4 次, 并立即用于不同的测量。通过标准分光光度法进行中和的高氯酸提取物中的红细胞 ATP 水平的分析。ATP 水平的差异与溶血作用相关联。

[0146] 实施例 13. 对 HCV 复制子的体外效力的检测法

[0147] HCV RNA 复制子检测法采用细胞株 Huh7 ET(luc-ubi-neo/ET), 其含有含稳定的荧光素酶 (LUC) 报告基因的 HCV RNA 复制子 (Murray, M; Korba, B “Hepatitis C Virus Assays”, <http://niaid-aacf.org/protocols/HCV.htm>)。该 LUC 报告基因用作 HCV 复制的间接衡量标准。LUC 报告基因的活性与 HCV RNA 水平成正比, 且使用 LUC 或 RNA 端点时阳性对照的抗病毒化合物表现相当。该 HCV RNA 复制子检测法用于检查十八烷基 - 乙二醇 - 修饰的 (ODE) 磷酸二酯利巴韦林前药在 5 个自然对数对半 (half-log) 浓度下的作用。在每次操作中包括人干扰素 α -2b 作为阳性对照的化合物。将 ET 株的亚汇合培养物接种到专用于分析细胞数 (细胞毒性) 或抗病毒活性的 96 孔板中, 第二天将药物加入适当的孔中。当细胞仍亚汇合时, 72 小时后处理细胞。由使用 TaqMan RT-PCR 作为 HCV RNA 复制子衍生的 LUC 活性或作为 HCV RNA 评估的 HCV RNA 水平推导出 ODE- 磷酸二酯利巴韦林前药 EC₅₀ 和 EC₉₀ 值 (抗病毒活性)。使用 CytoTox-1 (Promega) (在使用 LUC 检测系统时, 用作细胞数和细胞毒性指示剂的比色测定法) 计算 ODE- 磷酸二酯利巴韦林前药 IC₅₀ 和 IC₉₀ 值 (细胞毒性), 同时使用经由 TaqMan RT-PCR 测得的核糖体 (rRNA) 水平作为 RNA- 基检测法中细胞数的指征。

[0148] 实施例 14. 评测十八烷基 - 乙二醇 - 修饰的 (ODE) 磷酸二酯利巴韦林前药抑制细胞培养物中的 HCV 复制

[0149] 在稳定 HCV 复制株 AVA5 (基因型 1b, 亚基因组, 复制子, Blight 等人, 2000, *Sci.* 290 :1972) 和 APC 103 (基因型 1a, 基因组复制子) 中评估受试化合物的抗病毒活性 (Okuse 等人, 2005, *Antivir. Res.* 65 :23)。每天将 (ODE) 磷酸二酯利巴韦林前药添加到分出的培养物中, 持续三天。培养物通常在 30-50% 汇合时开始检测, 并在处理的最后一天达到汇合。使用细胞内 HCV RNA 水平和细胞毒性 (在 96 孔板上)。总共 12 个未处理的对照培养物和用 α -干扰素和 2' CmeC 处理的一式三份培养物充当检测对照物。

[0150] 使用传统印迹杂交法测量 HCV RNA 水平的一式三份培养物, 其中在各个培养物中将 HCV RNA 水平正规化至 β -肌动蛋白 RNA 水平 (Okuse 等人, 2005, *Antivir. Res.* 65 :23)。使用既定的中性红色染料吸收检测法测量细胞毒性 (Korba 等人, 1992, *Antivir. Res.* 19 :55, Okuse 等人, *Antivir. Res.* 65 :23)。受试化合物在干冰上以粉末形式取得并以 10mM 溶解在 100% 组织培养级 DMSO (Sigma, Inc.) 中。将足够一次每日处理的受试化合物等分试样逐一置于独立管中, 所有材料储存在 -20°C 下。在处理的每天, 将每日等分试样在室温下悬浮到培养基中并立即添加到细胞培养物中。

[0151] (ODE) 磷酸二酯利巴韦林前药诱发 AVA5 和 APC 103 培养物在受试浓度下产生的细胞内 HCV RNA 水平的选择性降低。对于在用于抗病毒分析的浓度下的利巴韦林,观察到显著毒性(在未处理细胞中观察到的染料吸收水平的大于 50%降低)。对于 (ODE) 磷酸二酯利巴韦林前药,没有观察到显著毒性。

[0152] 实施例 15 在雄性 CD-1 小鼠中,在单次口服和静脉内给药后 (ODE) 磷酸二酯利巴韦林前药的药动力学研究

[0153] 此研究的目的是评测在雄性 CD-1 小鼠中在单次口服 (P. O.) 和静脉内 (I. V.) 给药后 (ODE) 磷酸二酯利巴韦林前药的药动力学 (PK) 状况。

[0154] 将为此研究选择的 48 只雄性 CD-1 小鼠分成三个研究组,第 1 组 6 只小鼠,无处理并用作给药前的 PK 采样,第二组 21 只小鼠,以 30mg/kg 口服 (ODE) 磷酸二酯利巴韦林前药,第三组 21 只小鼠,以 5mg/kg 静脉内给予 (ODE) 磷酸二酯利巴韦林前药。对于 P. O. 处理组,在给药前、给药后 1、3、6、12、24、48 和 72 小时,对于 I. V. 处理组,在给药前、给药后 0.25、2、6、12、24、48 和 72 小时收集血浆样品。所有样品在目标时间的 ± 2 分钟内收集。

[0155] 开发出小鼠血浆中 (ODE) 磷酸二酯利巴韦林前药的 LC-MS/MS 定量测定法。使用酚酞作为内标。该方法专用于小鼠血浆中的 (ODE) 磷酸二酯利巴韦林前药,且浓度 - 响应关系在 5.0 至 500ng/mL 的校准范围内是线性的,回归系数等于或大于 0.9981。样品处理包括将 50 微升 1 : 1 乙腈 : 水 (或用作校准标样和 QC 样品的 (ODE) 磷酸二酯利巴韦林前药操作溶液)、50 微升 500ng/mL 内标和 150 μ L 乙腈添加到 50 微升小鼠血浆 (或用作校准标样和 QC 样品的空白汇集小鼠血浆) 中。将样品通过涡旋混合 5 分钟,并在 4°C 下在 15,000rpm 下离心 10 分钟。将上清液的 150 微升等分试样转移到 96 孔板中并将 10 微升上清液样品注入分析用的 LC-MS/MS 系统。在各分析批中,PK 样品与校准标样 (空白、0、5、10、25、50、100、150、300 和 500ng/mL) 和低、中、高和 10 倍稀释的 QC 样品 (15、250、400 和 2000ng/mL) 同时操作。

[0156] 使用整合 (non-compartmental) 模型 (WinNonlin Professional, version 5.0.1) 获得小鼠血浆中 (ODE) 磷酸二酯利巴韦林前药的药动力学参数。使 $1/Y^2$ 加权因数。

[0157] 在 (ODE) 磷酸二酯利巴韦林前药以 5mg/kg 静脉内给药后,分别观察到在 0.25 小时和 1960ng/mL 的 T_{max} 和 C_{max} 。(ODE) 磷酸二酯利巴韦林前药具有 1.13 小时的血浆半衰期。 $AUC_{0-\infty}$ 值计算为 2659hr \cdot ng/mL。分别获得 1881mL/hr/kg 和 913mL/kg 的总清除率 (Cl) 和在稳态下的分布容积 (V_{ss})。

[0158] 在 (ODE) 磷酸二酯利巴韦林前药以 30mg/kg 口服给药后,分别观察到在 3.0 小时和 407ng/mL 的 T_{max} 和 C_{max} 。 $AUC_{0-\infty}$ 值计算为 1705hr \cdot ng/mL。(ODE) 磷酸二酯利巴韦林前药的口服生物利用率计算为 10.7%。

[0159] 从口服后 24 小时至 72 小时和在静脉内给药后 12 小时至 72 小时,(ODE) 磷酸二酯利巴韦林前药血浆水平低于 LLOQ (5ng/mL)。

[0160] 在存活期间,每天进行笼边 (cageside) 观察两次并在给药之前进行详细的临床观察。

[0161] 表 4. 静脉内和口服给药后小鼠血浆中 (ODE) 磷酸二酯利巴韦林前药的整合药动力学参数

[0162]

参数	IV	PO
剂量 (mg/kg)	5	30
T _{max} (hr)	0.25	3.0
C _{max} (ng/mL)	1960	407
t _{1/2} (hr)	1.13	不适用
Cl (mL/hr/kg)	1881	不适用
V _{ss} (mL/kg)	913	不适用
AUC _{0→tlast} (hr·ng/mL)	2645	1661
AUC _{0→∞} (hr·ng/mL)	2659	1705
F (%)	-	10.7

[0163] 图 2. 在雄性小鼠 (N = 3) 中静脉内给药 5mg/kg 和口服给药 30mg/kg 后小鼠血浆中 (ODE) 磷酸二酯利巴韦林前药的药动力学

[0164] 实施例 15. 评测十八烷基 - 乙二醇 - 修饰的 (ODE) 磷酸二酯利巴韦林前药对 HepG2、CEM 和 PBMC 细胞的细胞毒性

[0165] 在细胞毒性研究中使用 CytoTox-ONE™ 均质膜完整性检测试剂盒 (Promega)。该检测法以荧光均匀模式测量从具有受损膜的细胞中的乳酸脱氢酶 (LDH) 释放。用偶联酶检测法测量释放到培养基中的 LDH, 其导致刃天青转化成荧光试卤灵产物。生成的荧光量与溶解的细胞数成比例。在 96 孔板中使用为培养基、药物、细胞和病毒的分配设计的板模式进行细胞毒性评估检测法。将 6 个连续稀释浓度的十八烷基 - 乙二醇 - 修饰的 (ODE) 磷酸二酯利巴韦林前药施加到细胞上以推导 TC₅₀ (将细胞存活率降低 50% 的药物中毒浓度)、TC₉₀ (将细胞存活率降低 90% 的药物中毒浓度) 和 TC₉₅ (将细胞存活率降低 95% 的药物中毒浓度)。对 HepG2 细胞, 十八烷基 - 乙二醇 - 修饰的 (ODE) 磷酸二酯利巴韦林前药分别具有 13.15 μM、28.32 μM 和 41.69 μM 的 TC₅₀、TC₉₀ 和 TC₉₅ 值。对 CEM 细胞, 十八烷基 - 乙二醇 - 修饰的 (ODE) 磷酸二酯利巴韦林前药分别具有 14.06 μM、63.41 μM 和 84.55 μM 的 TC₅₀、TC₉₀ 和 TC₉₅ 值。对 PBMC 细胞, 十八烷基 - 乙二醇 - 修饰的 (ODE) 磷酸二酯利巴韦林前药分别具有 111 μM、245 μM 和 272 μM 的 TC₅₀、TC₉₀ 和 TC₉₅ 值。

[0166] 实施例 16. 评测十八烷基 - 乙二醇 - 修饰的 (ODE) 磷酸二酯利巴韦林前药对流行性感 A 的活性

[0167] 在 Madin-Darby 犬肾 (MDCK) 细胞中使用 CPE (病毒诱发的致细胞病变效应) 抑制检测程序评测十八烷基 - 乙二醇 - 修饰的 (ODE) 磷酸二酯利巴韦林前药对流行性感 A 的抗病毒活性。设计抗病毒检测法以便一式三份地测试六种浓度的十八烷基 - 乙二醇 - 修饰的 (ODE) 磷酸二酯利巴韦林前药的抗流行性感 A 性。细胞对照物仅含培养基, 病毒感染的细胞对照物含有培养基和病毒, 药物细胞毒性对照物含有培养基和各药物浓度, 试剂对照物仅含培养基 (无细胞), 药物量热对照物含有药物和培养基 (无细胞), 它们用试样同时运行。使用利巴韦林作为阳性对照化合物。这些板在含有 5% CO₂ 的湿润气氛中在 37°C 下

培养,直至在未处理的病毒对照培养物中观察到最大 CPE。使用 Cell Titer[®] AQU_{eous} 单溶液细胞增殖检测试剂盒 (Promega) (其是用于测定活细胞数的比色法) 测定 (ODE) 磷酸二酯利巴韦林前药对 CPE 的抑制。该试剂含有新型四唑鎓化合物 MTS 和电子偶联剂 PES,它们在合并时形成稳定溶液。该 MTS 四唑鎓化合物被脱氢酶在代谢活性细胞中生成的 NADPH 或 NADH 生物还原。因此,甲臜 (formazan) 产物测量量与培养物中的活细胞数成正比。使用电脑程序计算病毒感染细胞的 CPE 减少百分比和未感染的药物对照孔的存活率百分比。计算将 CPE 减少 50% 的最小抑制药物浓度 (IC₅₀) 和造成活细胞减少 50% 的最小有毒药物浓度 (TC₅₀)。通过将 TC₅₀ 除以 IC₅₀,测定治疗指数 (TI₅₀)。十八烷基 - 乙二醇 - 修饰的 (ODE) 磷酸二酯利巴韦林前药的测得 IC₅₀ 小于 0.316 μM,而 TC₅₀ 为 66.4 μM,且 TI 大于 210。

[0168] 尽管已为了清楚和理解起见通过实例详细描述本发明,但本领域普通技术人员根据本发明的教导容易看出,可以在不背离权利要求的精神或范围的情况下对其作出某些变动和修改。

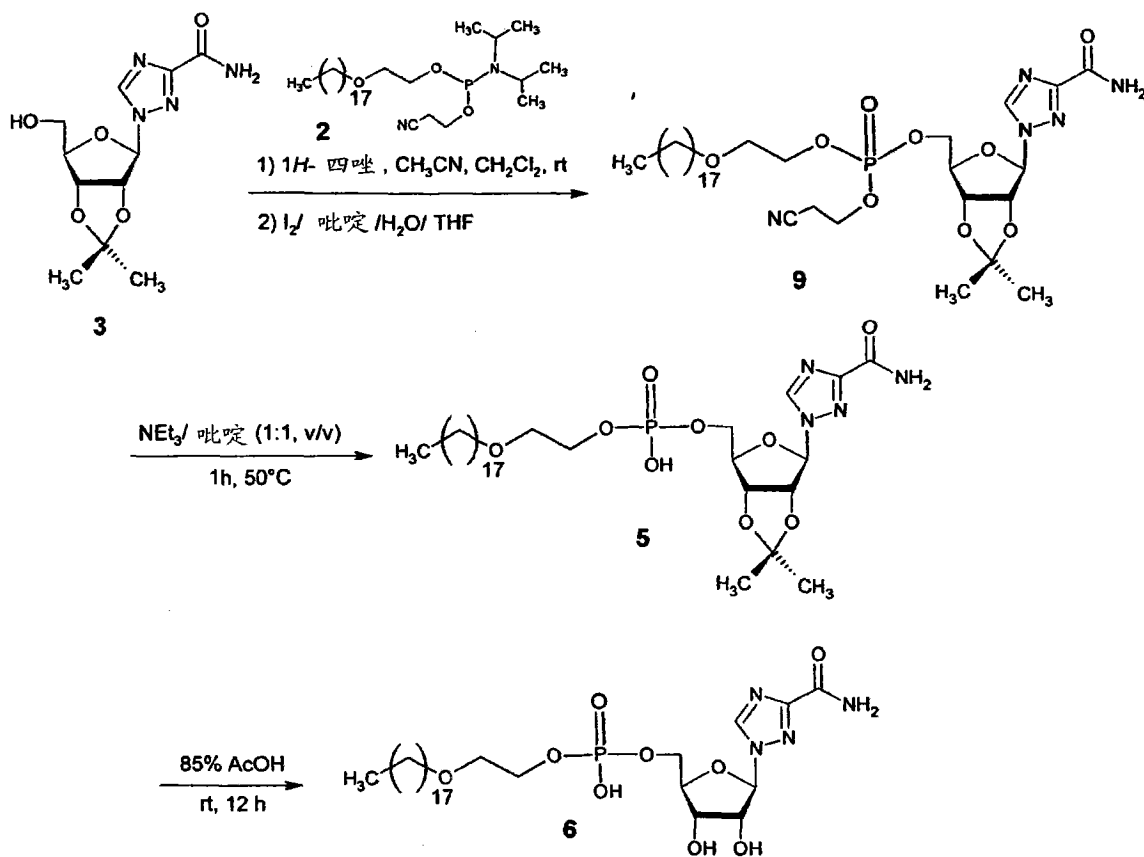


图 1

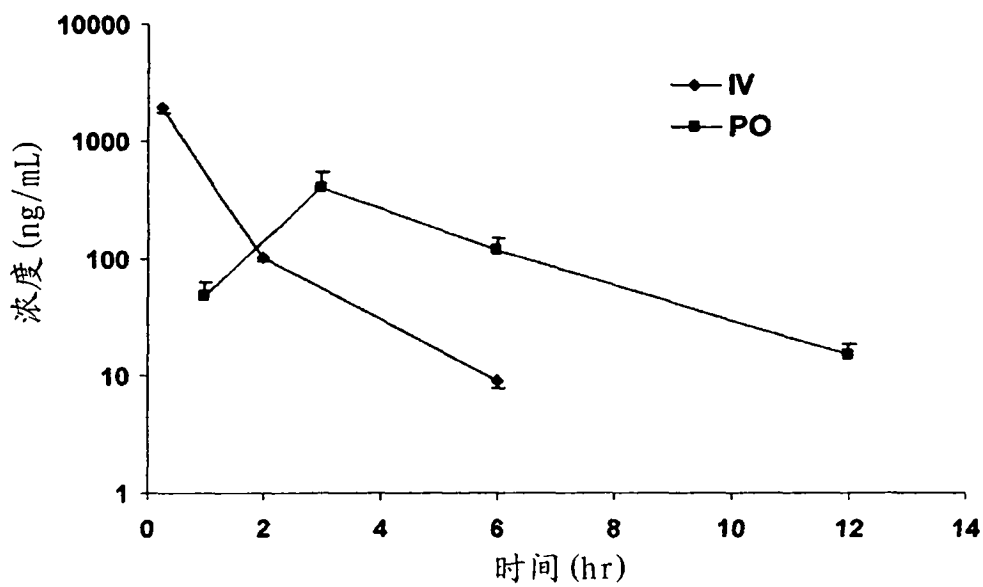


图 2