



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111615391 B

(45) 授权公告日 2023. 05. 30

(21) 申请号 201980009140.6
 (22) 申请日 2019.01.18
 (65) 同一申请的已公布的文献号
 申请公布号 CN 111615391 A
 (43) 申请公布日 2020.09.01
 (30) 优先权数据
 62/619,478 2018.01.19 US
 (85) PCT国际申请进入国家阶段日
 2020.07.17
 (86) PCT国际申请的申请数据
 PCT/US2019/014311 2019.01.18
 (87) PCT国际申请的公布数据
 W02019/144015 EN 2019.07.25
 (73) 专利权人 吉利德科学公司
 地址 美国加利福尼亚州
 (72) 发明人 金浩崙 边衡正 B·J·史密斯
 R·萨布拉玛尼安 王建红
 (74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所
 11256
 专利代理师 陈文平 侯宝光

(51) Int. Cl.
 A61K 31/553 (2006.01)
 A61P 31/18 (2006.01)
 (56) 对比文件
 CN 106074411 A, 2016.11.09
 WO 2017156262 A1, 2017.09.14
 郭涛主编. 代谢. 《新编药物动力学》. 中国科学技术出版社, 2005, 第266-271页.
 Joel E. Gallant et al.. Antiviral Activity, Safety, and Pharmacokinetics of Bictegravir as 10-Day Monotherapy in HIV-1-Infected Adults. 《J Acquir Immune Defic Syndr.》. 2017, 第75卷(第1期), 第61-67页.
 Melinda J. Reese et al.. In Vitro Investigations into the Roles of Drug Transporters and Metabolizing Enzymes in the Disposition and Drug Interactions of Dolutegravir, a HIV Integrase Inhibitor. 《Drug Metab Dispos.》. 2013, 第41卷(第2期), 第353-361页.

审查员 甘露

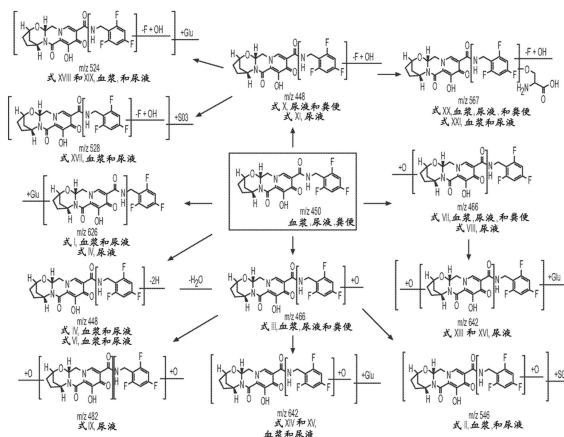
权利要求书8页 说明书30页 附图14页

(54) 发明名称

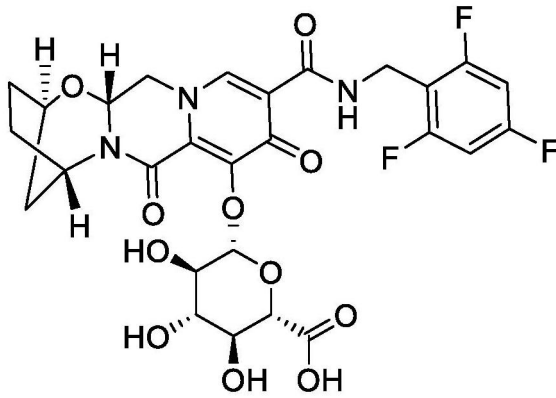
比卡格韦的代谢物

(57) 摘要

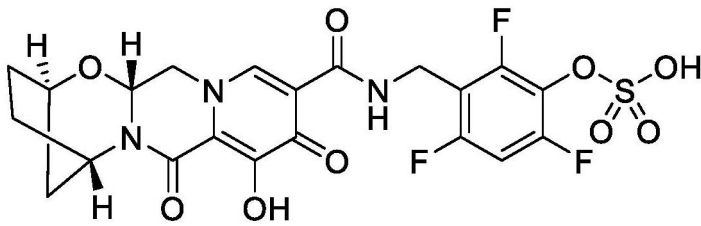
本发明提供了抗病毒药物比卡格韦(bictegravir)的代谢物, 包括其组合物和盐, 可用于预防和/或治疗HIV以及与比卡格韦的施用有关的分析方法。



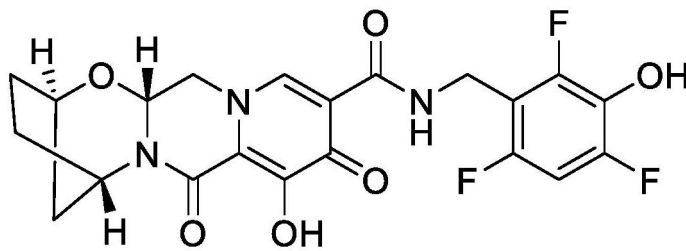
1. 一种选自M15、M20和M23的化合物：



M15,



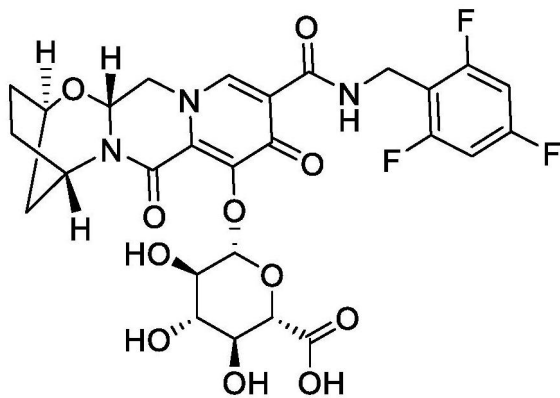
M20,



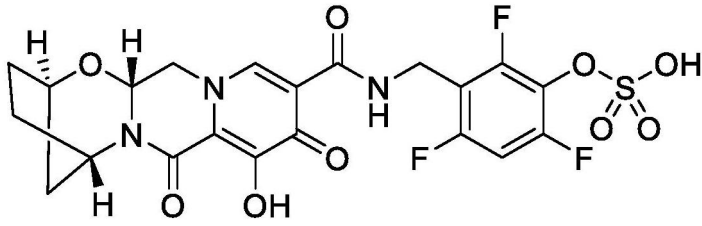
M23,

或其药学上可接受的盐,其是实质上分离的。

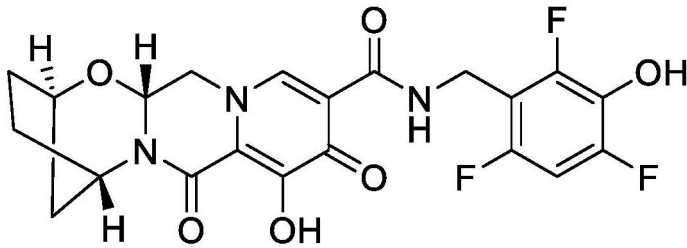
2. 一种包含选自M15、M20和M23的化合物：



M15,



M20,



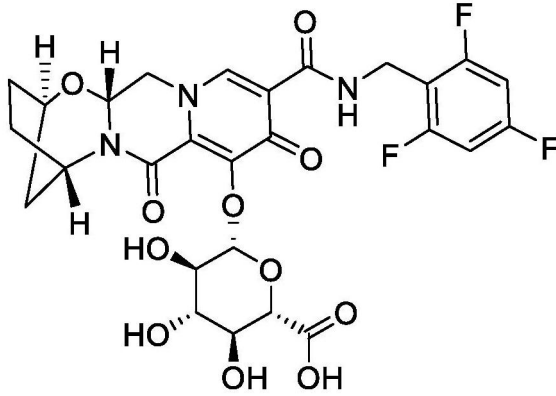
M23,

或其药学上可接受的盐的组合物,其中所述化合物或其药学上可接受的盐以大于约25重量%的量存在于所述组合物中。

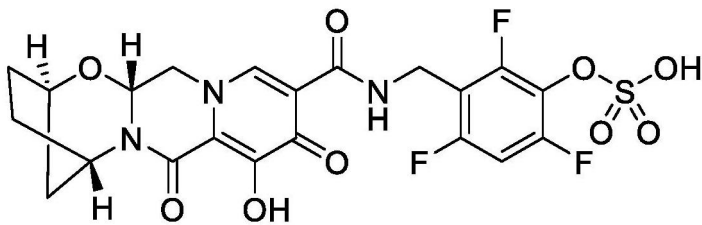
3. 根据权利要求2所述的组合物,其中所述化合物或其药学上可接受的盐以大于约50重量%的量存在于所述组合物中。

4. 根据权利要求2所述的组合物,其中所述化合物或其药学上可接受的盐以大于约75重量%的量存在于所述组合物中。

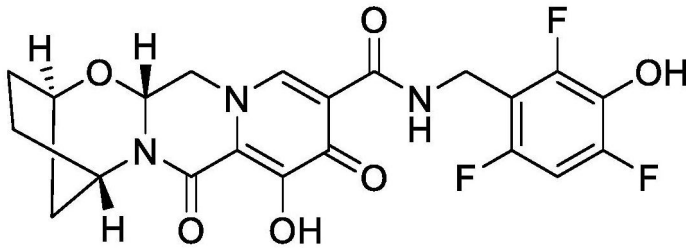
5. 一种选自M15、M20和M23的化合物:



M15,



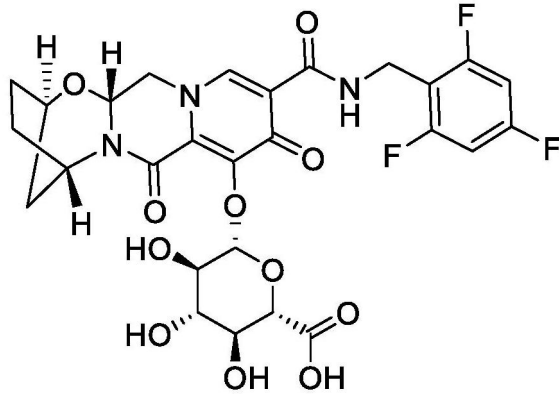
M20,



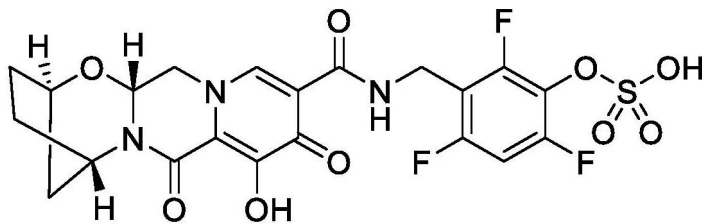
M23,

或其药学上可接受的盐的制品,所述制品的纯度大于约95%。

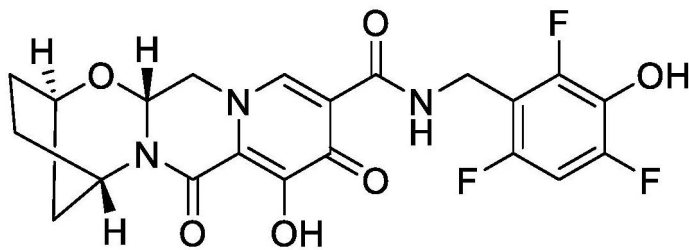
6. 一种药物组合物,其包含选自M15、M20和M23的化合物:



M15,



M20,



M23,

或其药学上可接受的盐以及至少一种药学上可接受的载体。

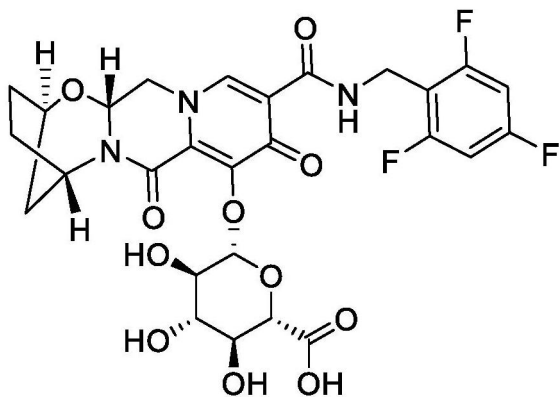
7. 根据权利要求6所述的药物组合物,其还包含一种至三种另外的治疗剂。

8. 根据权利要求7所述的药物组合物,其中所述一种至三种另外的治疗剂是抗HIV剂。

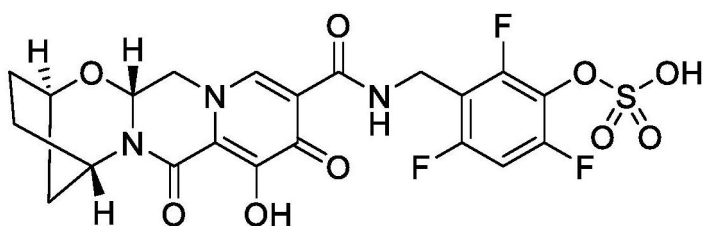
9. 根据权利要求8所述的药物组合物,其中所述一种至三种另外的治疗剂中的每一种选自:HIV蛋白酶抑制剂,HIV逆转录酶非核苷抑制剂,HIV逆转录酶核苷抑制剂,HIV逆转录酶核苷酸抑制剂,及它们的组合。

10. 治疗有效量的选自M15、M20和M23的化合物或其药学上可接受的盐在制备预防或治

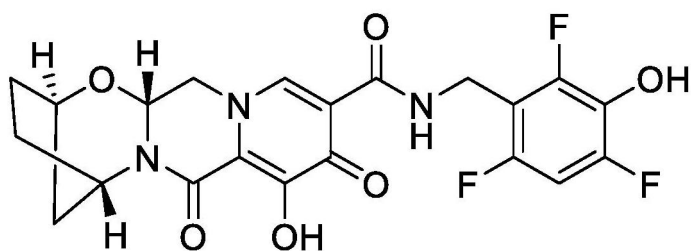
疗人的HIV感染的药物中的用途



M15,



M20,



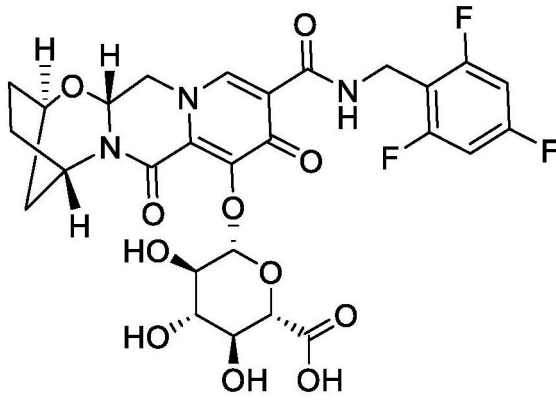
M23.

11. 根据权利要求10所述的用途,其中所述药物还包括治疗有效量的一种至三种另外的治疗剂。

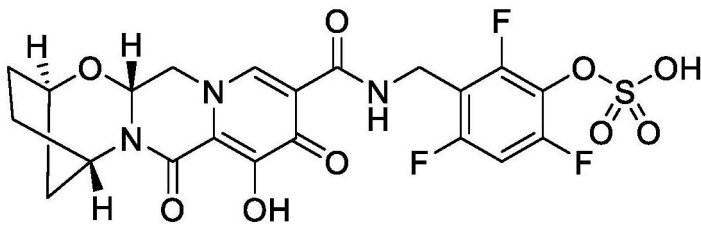
12. 根据权利要求11所述的用途,其中所述一种至三种另外的治疗剂是抗HIV剂。

13. 根据权利要求12所述的用途,其中所述一种至三种另外的治疗剂选自:HIV蛋白酶抑制剂,HIV逆转录酶非核苷抑制剂,HIV逆转录酶核苷抑制剂,HIV逆转录酶核苷酸抑制剂,和其他用于治疗HIV的药物,及它们的组合。

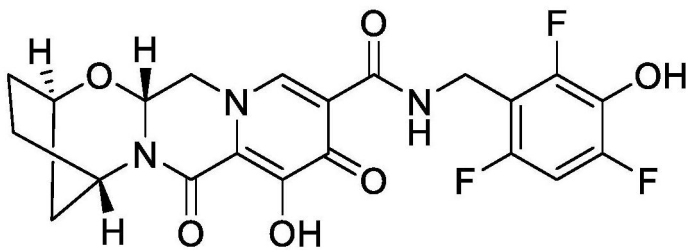
14. 一种检测或确认向患者施用比卡格韦的方法,包括在从所述患者获得的生物样品中鉴定选自M15、M20和M23的化合物:



M15,



M20,

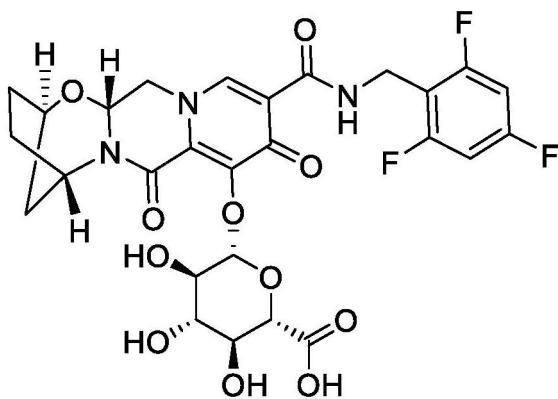


M23,

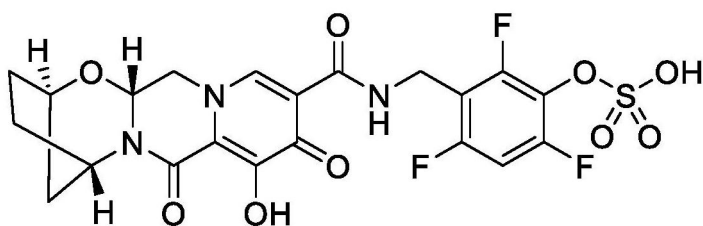
或其盐。

15. 根据权利要求14所述的方法, 其中所述生物样品源自血浆、尿液或粪便。

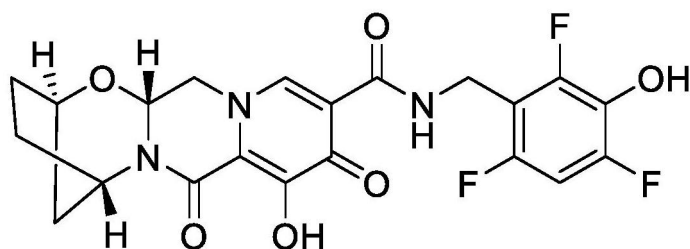
16. 一种测量患者中比卡格韦的代谢速率的方法, 包括在施用比卡格韦之后的一个或多个时间点测量所述患者中选自M15、M20和M23的化合物:



M15,



M20,



M23,

或其盐的量。

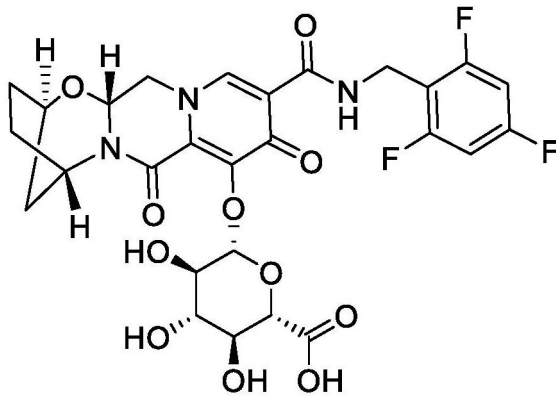
17. 根据权利要求16所述的方法, 其中所述化合物的量从血液样品中测量。

18. 根据权利要求16所述的方法, 其中所述化合物的量从血浆中测量。

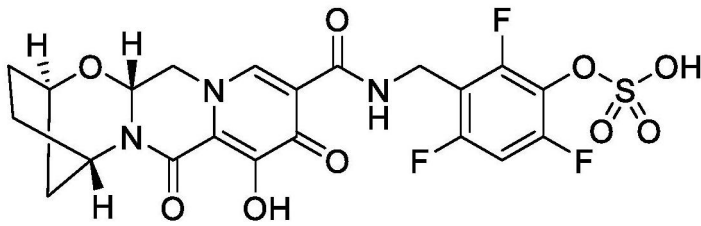
19. 根据权利要求16所述的方法, 其中所述化合物的量从尿液样品中测量。

20. 根据权利要求16所述的方法, 其中所述化合物的量从粪便样品中测量。

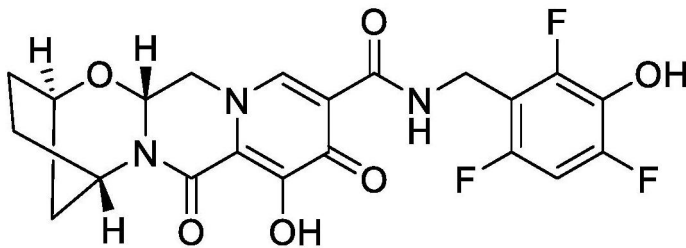
21. 选自M15、M20和M23的化合物或其药学上可接受的盐在制备在治疗HIV感染中确定患者对比卡格韦的预防性或治疗性反应的检测剂中的用途



M15,

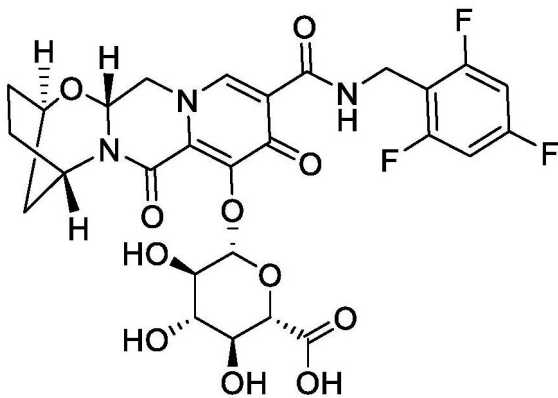


M20,

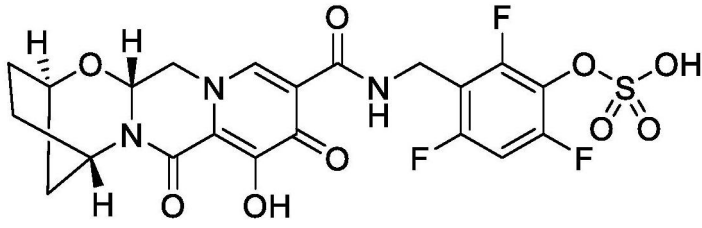


M23。

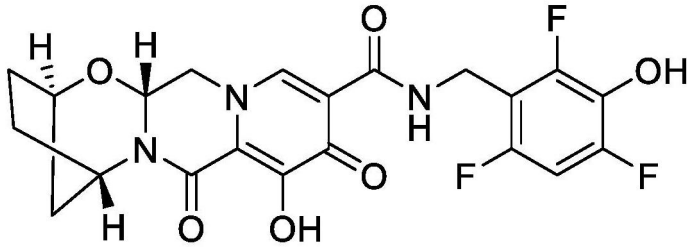
22. 选自M15、M20和M23的化合物或其药学上可接受的盐在制备为需要用比卡格韦治疗的患者优化比卡格韦剂量的检测剂中的用途



M15,



M20,



M23.

比卡格韦的代谢物

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本专利申请要求于2018年1月19日提交的美国临时专利申请序列号62/619,478的优先权的权益。该申请的内容通过引用合并于此。

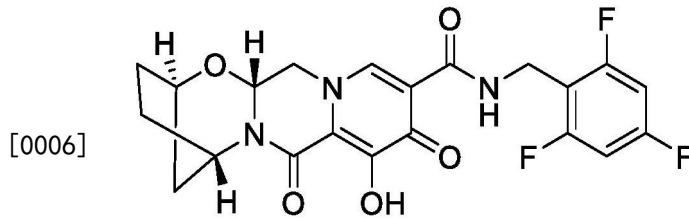
技术领域

[0003] 本发明提供抗病毒药物比卡格韦 (bictegravir) 的代谢物以及与施用比卡格韦有关的分析方法,所述代谢物包括其组合物和盐,可用于预防和/或治疗HIV。

背景技术

[0004] HIV/AIDS流行病夺走了数百万人的生命,目前还有数百万人受到感染。抗逆转录病毒疗法已使HIV感染变成了一种慢性、可控制的疾病;然而,还没有治愈HIV的方法。患者必须终生坚持治疗,这使耐药性成为持续的问题。此外,随着患者年龄的增长,对其他疾病和病症的伴随治疗变得更加普遍,从而增加了与HIV抗病毒治疗的药物-药物相互作用的可能性。因此,继续开发新的抗病毒药物和联合疗法是HIV治疗学领域中的优先事项。

[0005] 整合酶链转移抑制剂 (INSTI) 是一类抗逆转录病毒药物,其通过抑制必需的HIV蛋白整合酶使病毒DNA基因组插入宿主细胞的染色质中来起作用。INSTI的一个实例是比卡格韦 (BIC),目前正在与恩曲他滨 (FTC) 和替诺福韦艾拉酚胺 (TAF) 联合在人类临床试验中进行测试。比卡格韦具有以下所示的分子结构,并在WO 2014/100212中进行了描述。

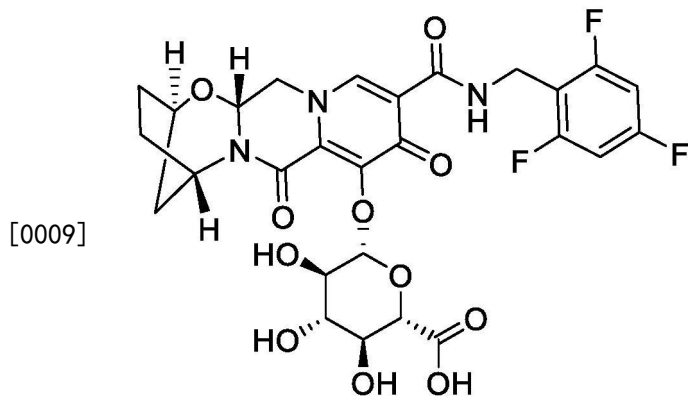


比卡格韦 (化合物 I)

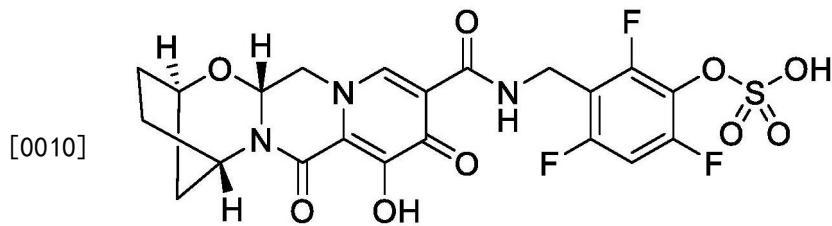
[0007] 鉴于广泛的HIV感染以及克服耐药性和药物-药物相互作用的挑战,持续需要新的和改进的抗病毒剂。本文描述的比卡格韦的代谢物及其组合物和使用方法旨在满足这一需求。

发明内容

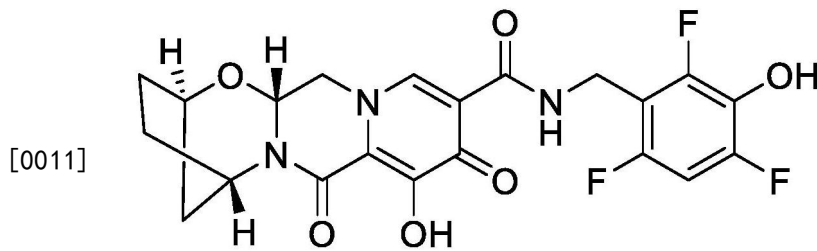
[0008] 本发明提供选自以下的化合物:



M15,



M20,



M23。

[0012] 或其药学上可接受的盐,其是实质上分离的。

[0013] 本发明还提供了包含本发明化合物或其药学上可接受的盐和至少一种药学上可接受的载体的组合物。

[0014] 本发明还提供包含本发明化合物或其药学上可接受的盐的制品。

[0015] 本发明还提供通过向人施用治疗有效量的本发明化合物或其药学上可接受的盐来预防或治疗人的HIV感染的方法。

[0016] 本发明还提供检测或确认向患者施用比卡格韦的方法,包括在获自所述患者的生物样品中鉴定本发明化合物或其盐。

[0017] 本发明还提供测量患者中比卡格韦的代谢速率的方法,包括在施用比卡格韦后的一个或多个时间点测量所述患者中本发明化合物或其盐的量。

[0018] 本发明还提供确定在治疗HIV感染中患者对比卡格韦的预防性或治疗性反应的方法,包括在施用比卡格韦后的一个或多个时间点测量所述患者中本发明化合物或其盐的量。

[0019] 本发明还提供为需要用比卡格韦治疗的患者优化比卡格韦的剂量的方法,包括在施用比卡格韦后的一个或多个时间点测量所述患者中本发明化合物或其盐的量。

附图说明

[0020] 图1显示了人类健康成年男性受试者单次口服100 μ Ci/100mg剂量的 14 C]比卡格韦后,在人血浆、尿液和粪便中拟议的比卡格韦的代谢物结构和生物转化途径。

[0021] 图2显示了通过分析M15标准溶液得到的M15的提取离子色谱图。

[0022] 图3显示了通过分析在人类男性受试者单次口服一定剂量(100mg,100 μ Ci)的 14 C]比卡格韦后获得的8小时合并血浆样品得到的代谢物M15的放射色谱图和提取离子色谱图比卡格韦。

[0023] 图4显示了通过单独注射和共注射M15的标准溶液与在人类男性受试者单次口服一定剂量(100mg,100 μ Ci)的 14 C]比卡格韦后获得的8小时合并血浆样品得到的提取离子色谱图比卡格韦。

[0024] 图5A显示了通过分析M15的标准溶液得出的MS前体和MS/MS产物离子质谱(m/z 626)。

[0025] 图5B显示了M15的拟议结构和拟议碎片化模式。

[0026] 图6显示了通过分析在人类男性受试者单次口服一定剂量(100mg,100 μ Ci)的 14 C]比卡格韦后获得的8小时合并血浆样品得到的代谢物M15的MS前体和MS/MS产物离子质谱(m/z 626)比卡格韦。

[0027] 图7显示了通过分析M20的标准溶液得到的提取离子色谱图。

[0028] 图8显示了通过分析在人类男性受试者单次口服一定剂量(100mg,100 μ Ci)的 14 C]比卡格韦后获得的8小时合并血浆样品得到的提取离子色谱图和放射色谱图比卡格韦。

[0029] 图9显示了通过单独注射和共同注射M20的标准溶液与在人类男性受试者单次口服一定剂量(100mg,100 μ Ci)的 14 C]比卡格韦后获得的8小时合并血浆样品得到的提取离子色谱图比卡格韦。

[0030] 图10A显示了通过分析M20的标准溶液得到的M20的产物离子(m/z 546)质谱。

[0031] 图10B显示了M20的拟议结构和拟议碎片化模式。

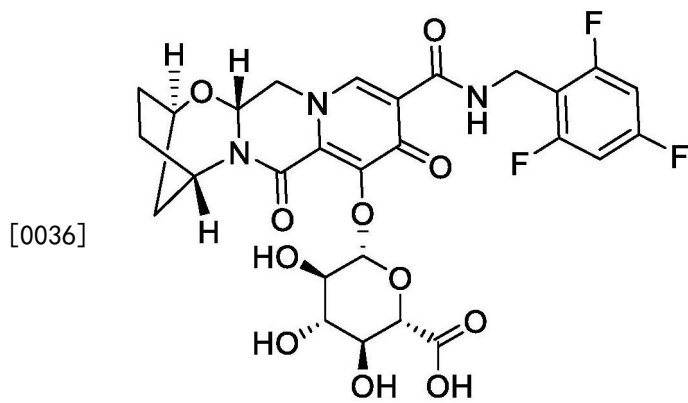
[0032] 图11显示了通过分析人类男性受试者单次口服一定剂量的(100mg,100 μ Ci)的 14 C]比卡格韦后获得的8小时合并血浆样品得到的M20的产物离子(m/z 546)质谱比卡格韦。

[0033] 图12显示了在体外鉴定的BIC代谢物M465a、M465b、M465c、M305、M625、M641和M611的拟议结构。

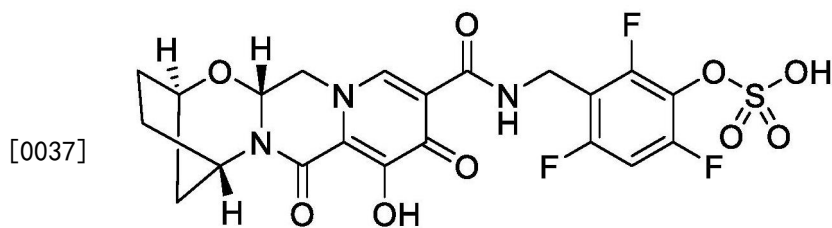
具体实施方式

[0034] 本发明涉及比卡格韦的代谢物及其用途。在一些实施方案中,代谢物是比卡格韦,其已经经历(1)葡糖苷酸化,(2)脱氢,(3)羟基化,(4)失去氟的羟基化,(5)羟基-比卡格韦的硫酸化或葡糖醛酸缀合,(6)脱氟-羟基-比卡格韦的硫酸化或葡糖醛酸或半胱氨酸缀合,或(7)它们的组合。在一些实施方案中,代谢物选自M15、M58、M51、M52、M21、M23、M54、M55、M22、M53、M20、M35、M12、M59、M45、M56、M16、M57、M9和M37(参见图1)。在一些实施方案中,代谢物选自M465a、M465b、M465c、M305、M625、M641和M611(参见图12)。

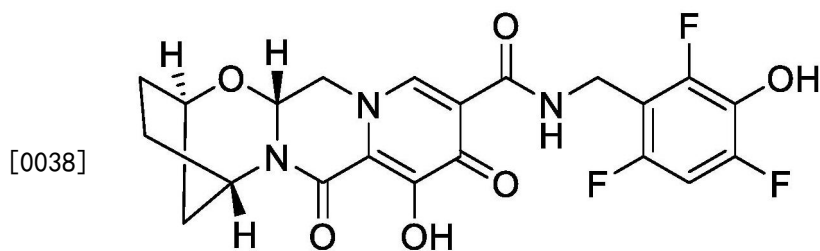
[0035] 在一些实施方案中,代谢物是选自M15、M20和M23的化合物:



M15,



M20,



M23.

[0039] 在一些实施方案中,代谢物是选自M15和M20的化合物。在一些实施方案中,代谢物是M15。在一些实施方案中,代谢物是M20。在一些实施方案中,代谢物是M23。

[0040] 本发明还包括本发明的代谢物的盐,诸如药学上可接受的盐。盐通常是指所公开化合物的衍生物,其中母体化合物通过将现有的酸或碱部分转化成其盐形式而被修饰。药学上可接受的盐是在合理的医学判断范围内适用于与人类和动物组织接触而无过度毒性、刺激性、过敏反应或其他问题或并发症的盐,具有合理的益处/风险比。药学上可接受的盐的实例包括但不限于碱性残基诸如胺的无机酸或有机酸盐;酸性残基诸如羧酸的碱金属或有机盐;等。本发明的药学上可接受的盐包括例如由无毒的无机或有机酸形成的母体化合物的常规无毒盐。本发明的药学上可接受的盐可以通过常规化学方法由含有碱性或酸性部分的母体化合物合成。通常,可以通过使这些化合物的游离酸或碱形式与化学计量的合适的碱或酸反应来制备这些盐。合适的盐的清单可见于Remington's Pharmaceutical Sciences (《雷明顿药物科学》),第17版,Mack Publishing Company,宾夕法尼亚州伊斯顿,1985年,第1418页和Journal of Pharmaceutical Science (药物科学杂志),66,2 (1977),通过引用将其全部内容并入本文。在一个特定的实施方案中,药学上可接受的盐是钠盐。

[0041] 在一些实施方案中,代谢物化合物或其盐实质上是分离的。“实质上分离的”是指代谢物化合物或其盐与其形成或被检测到的环境至少部分或实质上分离。部分分离可以包

括例如富含本发明化合物的组合物。实质上分离可包括含有按重量计至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%、至少约95%、至少约97%或至少约99重量%的代谢物或其盐的组合物。在一些实施例中，M15、M20和M23是实质上分离的。

[0042] 本发明的代谢物或其盐可以存在于组合物中，其中该组合物包含除代谢物以外的至少一种化合物。在一些实施方案中，该组合物包含多于一种的本发明的代谢物。在一些实施方案中，该组合物包含一种或多种本发明的代谢物或其盐，和比卡格韦或其盐。组合物可以是含有本发明的代谢物或其盐，和一种或多种溶剂、底物、载体等的混合物。在一些实施方案中，该组合物包含按重量计大于约25%的量的本发明的代谢物或其盐。在一些实施方案中，该组合物包含按重量计大于约50%的量的本发明的代谢物或其盐。在一些实施方案中，该组合物包含按重量计大于约75%的量的本发明的代谢物或其盐。在一些实施方案中，该组合物包含按重量计大于约80%的量的本发明的代谢物或其盐。在一些实施方案中，该组合物包含按重量计大于约85%的量的本发明的代谢物或其盐。在一些实施方案中，该组合物包含按重量计大于约90%的量的本发明的代谢物或其盐。在一些实施方案中，该组合物包含按重量计大于约95%的量的本发明的代谢物或其盐。

[0043] 本发明的代谢物或其盐的制品可以通过化学合成或通过从生物样品中分离代谢物来制备。制品的纯度可以为大于约50%，大于约60%，大于约70%，大于约80%，大于约90%或大于约95%。纯度可以通过任何常规方法进行测定，诸如通过色谱法或光谱法如NMR、MS、LC-MS等。

[0044] 本发明的代谢物是不对称的（例如，具有一个或多个立体中心）。除非另有说明，否则意指所有立体异构体，诸如对映异构体和非对映异构体。如何从光学活性起始原料制备光学活性形式的方法是本领域已知的，诸如通过拆分外消旋混合物或通过立体选择性合成。

[0045] 本发明的代谢物还包括在代谢物中出现的原子的所有同位素。同位素包括具有相同原子序数但质量数不同的那些原子。例如，氢的同位素包括氘和氚。在一些实施方案中，代谢物包括至少一个氘。

[0046] 如本文所用，术语“化合物”或“代谢物”是指包括所描述结构的所有立体异构体、几何异构体、互变异构体和同位素。

[0047] 如本文所用，术语“代谢物”是指包括比卡格韦的任何和所有代谢衍生物，包括已经经历选自以下的一个或多个转化过程的衍生物：(1) 葡糖苷酸化，(2) 脱氢，(3) 羟基化，(4) 失去氟的羟基化，(5) 羟基-比卡格韦的硫酸化或葡糖醛酸缀合；(6) 脱氟-羟基-比卡格韦的硫酸化或葡糖醛酸或半胱氨酸缀合。在一些实施方案中，本发明的代谢物经历了多于一个转化过程，包括已经经历了一次或多次代谢转化的比卡格韦衍生物的代谢转化。

[0048] 化合物比卡格韦也可被视为本发明代谢产物的前药（例如，代谢物M15、M20、M23等的前药），因为比卡格韦在施用后会代谢转化，从而提供本发明的代谢物。因此，比卡格韦可以作为向人提供本发明的代谢物的手段而施用给人，例如，用于预防或治疗人的HIV感染。

[0049] 本发明还包括药物组合物，其包含本发明的代谢物或其药学上可接受的盐，和至少一种药学上可接受的载体。如本文所用，“药学上可接受的载体”是指已被美国食品药品监督管理局批准可用于人或家畜的任何佐剂、载体、赋形剂、助流剂、甜味剂、稀释剂、防腐剂、染料/着色剂、增味剂、表面活性剂、润湿剂、分散剂、悬浮剂、稳定剂、等渗剂、溶剂或乳

化剂。

[0050] 方法

[0051] 本发明还涉及通过向人施用治疗有效量的本发明的代谢物或其药学上可接受的盐来预防或治疗人的HIV感染(例如,HIV-1和/或HIV-2)的方法。所述人可能患有感染或处于患有感染的风险之中。

[0052] 如本文所用,术语“治疗”或“处理”意指施用根据本发明的代谢物、其组合物或其制品,以减轻或消除患者的HIV感染的症状和/或减少患者的病毒载量。

[0053] 术语“预防”或“阻止”是指在人暴露于病毒后但在疾病症状出现之前和/或在血液中检测到病毒之前施用根据本发明的代谢物、其组合物或其制品。该术语还指预防疾病症状的出现和/或防止病毒在血液中达到可检测的水平。该术语包括暴露前预防和暴露后预防两者。该术语还指通过在分娩前对母亲施用和在生命的最初几天向婴儿施用来预防HIV从母亲到婴儿的围产期传播。

[0054] 术语“有效量”或“治疗有效量”是指一定量的根据本发明的代谢物,当施用于有需要的患者时,该量足以实现对该化合物对其具有效用的疾病状态、病症或失调进行治疗。这样的量将足以引起研究者或临床医生所寻求的组织系统或患者的生物学或医学反应。构成治疗有效量的根据本发明的代谢物的量将根据诸如以下的因素而变化:化合物及其生物活性,用于施用的组合物,施用时间,施用途径,化合物的排泄速率,治疗的持续时间,所治疗的疾病状态或病症的类型及其严重性,与本发明化合物组合或同时使用的药物,和患者的年龄、体重、总体健康状况、性别和饮食。这种治疗有效量可以由本领域的普通技术人员在考虑到他们自己的知识、现有技术和本公开内容的情况下常规确定。

[0055] 本发明的代谢物或其药学上可接受的盐的施用可以通过用于相似效用的试剂的任何可接受的施用模式进行。本发明的药物组合物可以通过将本发明的代谢物或其药学上可接受的盐与适当的药学上可接受的载体混合来制备,并且在特定的实施方案中,被配制成为以固体、半固体、液体或气体形式的制剂,诸如片剂、胶囊剂、散剂、颗粒剂、软膏剂、溶液剂、栓剂、注射剂、吸入剂、凝胶剂、微球剂和气雾剂。施用这种药物组合物的示例性途径包括但不限于口服、局部、透皮、吸入、肠胃外、舌下、颊、直肠、阴道和鼻内。在一个特定的实施方案中,本发明的药物组合物是片剂。在另一个实施方案中,本发明的药物组合物是注射剂(肌内(IM)或腹膜内(IP))。配制本发明的药物组合物以使其中所含的活性成分在将组合物施用于患者时是生物可利用的。将被施用于受试者或患者的组合物采取一个或多个剂量单位的形式,其中例如片剂可以是单个剂量单位,并且气雾剂形式的本发明化合物的容器可以容纳多个剂量单位。制备这种剂型的实际方法对于本领域技术人员而言是已知的或将是显而易见的;例如,参见Remington's Pharmaceutical Sciences(《雷明顿药物科学》),第20版(Philadelphia College of Pharmacy and Science,2000)。在任何情况下,根据本文所述的教导,待施用的组合物将包含治疗有效量的本发明的化合物或其药学上可接受的盐,用于治疗所关注的疾病或病症。

[0056] 本发明还涉及一种检测或确认向患者施用比卡格韦的方法,该方法包括在由该患者获得的生物样品中鉴定本发明的代谢物或其盐。在一些实施方案中,生物样品源自血浆、尿液或粪便。

[0057] 本发明还涉及一种测量患者中比卡格韦的代谢速率的方法,该方法包括在施用比

卡格韦后的一个或多个时间点测量患者体内比卡格韦的代谢物或其盐的量。

[0058] 本发明还涉及一种确定在治疗HIV感染中患者对比卡格韦的预防性或治疗性反应的方法,该方法包括在施用比卡格韦后的一个或多个时间点测量患者体内本发明的代谢物或其盐的量。

[0059] 本发明还涉及一种为需要用比卡格韦治疗的患者优化比卡格韦剂量的方法,该方法包括在施用比卡格韦后的一个或多个时间点测量患者体内本发明的代谢物或其盐的量。代谢物的量可以指示患者代谢比卡格韦的速率。与较慢速代谢比卡格韦的患者相比,比其他患者更快速或更有效地代谢比卡格韦的患者可能形成更高数量的代谢物,并可能需要更高剂量的比卡格韦或额外的剂量。与更快地代谢比卡格韦的患者相比,比其他患者没那么快速或没那么有效地代谢比卡格韦的患者可能会形成较少量的代谢物,并可能需要更低剂量的比卡格韦或更少的剂量。因此,优化比卡格韦的剂量的方法还可以包括确定所测量的代谢物的量是否高于或低于平均值,并相应地调整比卡格韦的剂量。

[0060] 可通过从患者获得生物样品并测量样品中的代谢物或其盐的量来进行患者中代谢物或其盐的量的测量。在一些实施方案中,样品是血液。在其他实施方案中,样品是血浆。在其他实施方案中,样品是尿。在其他实施方案中,样品是粪便。

[0061] 术语“患者”是指需要治疗性或预防性治疗病毒感染诸如HIV感染的人或其他哺乳动物,诸如实验动物和家庭宠物(例如猫、狗、猪、牛、绵羊、山羊、马、兔),以及非家养动物诸如非人灵长类动物、野生哺乳动物等。

[0062] 联合疗法

[0063] 一种或多种其他药物试剂可以与本发明的化合物、盐和组合物组合使用,以预防或治疗HIV感染(例如在人类患者中)。在一些实施方案中,本发明的组合物还包含一种或多种其他治疗剂。在一些实施方案中,本发明的组合物还包含1至3种另外的治疗剂(例如1至3种抗HIV剂)。在一些实施方案中,一种或多种另外的治疗剂是抗HIV剂。

[0064] 在以上实施方案中,另外的治疗剂可以是抗HIV剂。例如,在一些实施方案中,另外的治疗剂选自:HIV蛋白酶抑制剂,HIV逆转录酶非核苷抑制剂,HIV逆转录酶核苷抑制剂,HIV逆转录酶核苷酸抑制剂,HIV整合酶抑制剂,HIV非催化位点(或变构)整合酶抑制剂,进入抑制剂(例如CCR5抑制剂,gp41抑制剂(即融合抑制剂)和CD4附着抑制剂),CXCR4抑制剂,gp120抑制剂,G6PD和NADH氧化酶抑制剂,靶向HIV衣壳的化合物(“衣壳抑制剂”;例如,衣壳聚合抑制剂或破坏衣壳的化合物诸如W0 2013/006738(Gilead Sciences),US 2013/0165489(University of Pennsylvania)和W0 2013/006792(Pharma Resources)中公开的化合物),药代动力学增强剂和其他用于治疗HIV的药物,及它们的组合。在一些实施方案中,抗HIV剂是HIV蛋白酶抑制剂、HIV逆转录酶非核苷抑制剂、HIV逆转录酶核苷抑制剂、HIV逆转录酶核苷酸抑制剂、药代动力学增强剂或它们的组合。在一些实施方案中,抗HIV剂是HIV逆转录酶核苷抑制剂、HIV逆转录酶核苷酸抑制剂或它们的组合。

[0065] 在其他实施方案中,另外的治疗剂选自以下的一种或多种:

[0066] (1) HIV蛋白酶抑制剂,选自:安普那韦(amprenavir),阿扎那韦(atazanavir),夫沙那韦(fosamprenavir),茚地那韦(indinavir),洛匹那韦(lopinavir),利托那韦(ritonavir),奈非那韦(nelfinavir),沙奎那韦(saquinavir),替拉那韦(tipranavir),brecanavir,地瑞那韦(darunavir),TMC-126,TMC-114,mozenavir(DMP-450),JE-2147

(AG1776), L-756423, R00334649, KNI-272, DPC-681, DPC-684, GW640385X, DG17, PPL-100, DG35和AG 1859;

[0067] (2) HIV逆转录酶非核苷或非核苷酸抑制剂,选自:卡普韦林(capravirine),乙米韦林(emivirine),德拉维拉丁(delaviridine),依法韦仑(efavirenz),奈韦拉平(nevirapine), (+) calanolide A,依曲韦林(etravirine), GW5634, DPC-083, DPC-961, DPC-963, MIV-150, TMC-120, rilpivirene, BILR 355BS, VRX 840773, lersivirine (UK-453061), RDEA806, KM023和MK-1439;

[0068] (3) HIV逆转录酶核苷抑制剂,选自:齐多夫定(zidovudine),恩曲他滨(emtricitabine),去羟肌苷(didanosine),司他夫定(stavudine),扎西他滨(zalcitabine),拉米夫定(lamivudine),阿巴卡韦(abacavir),氨多索韦(amdoxovir),艾夫他滨(elvucitabine),阿洛夫定(alovudine), MIV-210, \pm -FTC, D-d4FC, 恩曲他滨(emtricitabine), phosphazide, 福齐夫定替酯(fozivudine tidoxil), 阿立他滨(apricitabine, AVX754), KP-1461, GS-9131 (Gilead Sciences) 和福沙夫定替酯(fosalvudine tidoxil, 以前为HDP 99.0003);

[0069] (4) HIV逆转录酶核苷酸抑制剂,选自:

[0070] 替诺福韦(tenofovir),富马酸替诺福韦酯(tenofovir disoproxil fumarate),替诺福韦艾拉酚胺(tenofovir alafenamide, Gilead Sciences), GS-7340 (Gilead Sciences), GS-9148 (Gilead Sciences), 阿德福韦(adefovir), 阿德福韦酯(adefovir dipivoxil), CMX-001 (Chimerix) 或CMX-157 (Chimerix);

[0071] (5) HIV整合酶抑制剂,选自:雷特格韦(raltegravir),埃替格韦(elvitegravir),度鲁特韦(dolutegravir), cabotegravir, 姜黄素, 姜黄素衍生物, 菊苣酸, 菊苣酸衍生物, 3,5-二咖啡酰奎宁酸, 3,5-二咖啡酰奎宁酸衍生物, 金精三羧酸, 金精三羧酸衍生物, 咖啡酸苯乙酯, 咖啡酸苯乙酯衍生物, 酪磷锡(tyrphostin), 酪磷锡衍生物, 槲皮素, 槲皮素衍生物, S-1360, AR-177, L-870812和L-870810, BMS-538158, GSK364735C, BMS-707035, MK-2048, BA 011和GSK-744;

[0072] (6) HIV非催化部位或变构整合酶抑制剂(NCINI),包括但不限于:BI-224436, CX0516, CX05045, CX14442, WO 2009/062285 (Boehringer Ingelheim)、WO 2010/130034 (Boehringer Ingelheim)、WO 2013/159064 (Gilead Sciences)、WO 2012/145728 (Gilead Sciences)、WO 2012/003497 (Gilead Sciences)、WO 2012/003498 (Gilead Sciences) 中公开的化合物,这些专利中的每个通过引用以其整体合并于此;

[0073] (7) gp41抑制剂,选自:恩夫韦肽(enfuvirtide),西夫韦肽(sifuvirtide),艾博韦泰(albuvirtide), FB006M和TRI-1144;

[0074] (8) CXCR4抑制剂AMD-070;

[0075] (9) 进入抑制剂SP01A;

[0076] (10) gp120抑制剂BMS-488043;

[0077] (11) G6PD和NADH-氧化酶抑制剂免疫素(immunitin);

[0078] (12) CCR5抑制剂,选自:aplaviroc, vicriviroc, maraviroc, cenicriviroc, PRO-140, INCB15050, PF-232798 (Pfizer) 和CCR5mAb004;

[0079] (13) CD4附着抑制剂,选自:ibalizumab (TMB-355) 和BMS-068 (BMS-663068);

[0080] (14) 药代动力学增强剂,选自:利托那韦(ritonavi),可比司他(cobicistat)和SPI-452;和

[0081] (15) 其他治疗HIV的药物,选自:BAS-100,SPI-452,REP 9,SP-01A,TNX-355,DES6,ODN-93,ODN-112,VGV-1,PA-457(贝韦立马(bevirimat)),HRG214,VGX-410,KD-247,AMZ 0026,CYT 99007A-221 HIV,DEBIO-025,BAY 50-4798,MDX010(易普利姆玛(ipilimumab)),PBS 119,ALG 889和PA-1050040(PA-040),

[0082] 及它们的组合。

[0083] 在某些实施方案中,本文公开的代谢物或其药学上可接受的盐与两种、三种、四种或更多种其他治疗剂组合。所述两种、三种、四种或更多种其他治疗剂可以是选自同一类治疗剂的不同治疗剂,或者它们可以选自不同类的治疗剂。在一个具体的实施方案中,本文公开的代谢物或其药学上可接受的盐与HIV逆转录酶核苷酸或核苷抑制剂和HIV逆转录酶非核苷抑制剂组合。在另一个具体的实施方案中,本文公开的代谢物或其药学上可接受的盐与HIV逆转录酶核苷酸或核苷抑制剂和HIV蛋白酶抑制化合物组合。在另一个实施方案中,本文公开的代谢物或其药学上可接受的盐与HIV逆转录酶核苷酸或核苷抑制剂、HIV逆转录酶非核苷抑制剂和HIV蛋白酶抑制化合物组合。在另一个实施方案中,本文公开的代谢物或其药学上可接受的盐与HIV逆转录酶核苷酸或核苷抑制剂、HIV逆转录酶非核苷抑制剂和药代动力学增强剂组合。

[0084] 在某些实施方案中,当本文公开的代谢物与一种或多种如上所述的其他治疗剂组合时,组合物的组分以同时或连续的方案施用。当连续施用时,可以分两次或更多次给药来施用该组合。

[0085] 在某些实施方案中,本文公开的代谢物与一种或多种其他治疗剂组合以单一剂型同时施用于患者,例如作为用于口服施用的固体剂型(例如,固定剂量的组合片剂)。

[0086] 在某些实施方案中,本文公开的代谢物与一种或多种其他治疗剂一起施用。本文公开的代谢物或其药学上可接受的盐与一种或多种另外的治疗剂的共同施用通常是指同时或连续施用本文公开的化合物和一种或多种另外的治疗剂,使得治疗有效量的代谢物和一种或多种其他治疗剂均存在于患者体内。

[0087] 共同施用包括在施用单位剂量的一种或多种其他治疗剂之前或之后施用单位剂量的本文公开的代谢物,例如,在施用一种或多种其他治疗剂的几秒钟、几分钟或几小时内施用本文公开的代谢物。例如,在一些实施方案中,首先施用单位剂量的本文公开的代谢物,然后在几秒钟或几分钟内施用单位剂量的一种或多种其他治疗剂。可选择地,在其他实施方案中,首先施用单位剂量的一种或多种其他治疗剂,然后在几秒或几分钟内施用单位剂量的本文公开的代谢物。在一些实施方案中,首先施用单位剂量的本文公开的代谢物,然后在几小时(例如1至12小时)后,施用单位剂量的一种或多种其他治疗剂。在其他实施方案中,首先施用单位剂量的一种或多种其他治疗剂,然后在几小时(例如1至12小时)后,施用单位剂量的本文公开的代谢物。

[0088] 药物制剂和剂型

[0089] 本文公开的药物组合物可以通过药学领域众所周知的方法来制备。例如,在某些实施方案中,打算通过注射施用的药物组合物可以通过将本发明的代谢物与无菌蒸馏水组合以形成溶液来制备。在一些实施方案中,添加表面活性剂以促进均匀溶液或悬浮液的形成。

成。表面活性剂是与本发明的化合物非共价相互作用从而促进化合物在水性递送系统中的溶解或均匀悬浮的化合物。

[0090] 本发明的代谢物或其药学上可接受的盐可以以治疗有效量施用,该治疗有效量将取决于多种因素而变化,所述多种因素包括:所用具体化合物的活性;该化合物的代谢稳定性和作用时间;患者的年龄、体重、总体健康状况、性别和饮食;施用方式和时间;排泄速率;药物组合;特定疾病或状况的严重程度;和受试者正在接受的治疗。

[0091] 将通过具体实施例更详细地描述本发明。提供以下实施例用于说明性目的,并且不旨在以任何方式限制本发明。本领域技术人员将容易地认识到可以改变或修改以产生基本相同结果的各种非关键参数。

[0092] 实施例

[0093] 实施例1:评估比卡格韦在健康受试者中的药代动力学、代谢和排泄的第1期研究结果

[0094] 研究设计

[0095] 该研究的目的是:(1)确定施用单一口服剂量的放射性标记的碳-14 (^{14}C)比卡格韦后比卡格韦的质量平衡;(2)在可能的情况下评估比卡格韦及其代谢物的药代动力学(PK);(3)确定在施用单一口服剂量的放射性标记的 ^{14}C 比卡格韦后人体内比卡格韦的代谢情况;和(4)评估比卡格韦的安全性和耐受性。

[0096] 这是一项第1期、开放标签、单中心、质量平衡研究,旨在评估在健康受试者中施用单一口服剂量的放射性标记的 ^{14}C 比卡格韦后比卡格韦的PK、代谢和排泄。总共招募了八名患者。如研究人员在计划的首次给药前不超过28天进行筛选评估所确定的,受试者为年龄在18至45岁(含)之间的健康男性非吸烟者,体重指数(BMI)为19至30kg/m²(含),12导联心电图(ECG)正常,肾功能正常,无明显病史,并且总体健康状态良好。

[0097] 治疗包括单一口服剂量,然后是6至21天的样品收集期,其确切持续时间取决于放射性标记药物的回收率。剂量为以约40mL乙醇溶液形式(4:6[v/v]水:乙醇,用HCl调节pH)口服施用的100mg比卡格韦(99mg非放射性标记的比卡格韦[以钠盐形式]加上约100 μCi [1mg]放射性标记的 ^{14}C 比卡格韦)。施用后,将给药容器漂洗两次,每次漂洗用约50mL的红莓汁,并施用于受试者。整个研究药物溶液和红莓汁冲洗液(总量约140mL)在10分钟窗口内服用。

[0098] 每个采样时间提供尿液、粪便和两种样品中回收的总 ^{14}C 放射性剂量的百分比和累积百分比的单个数据和总结统计。在时间线性和半对数刻度中呈现尿液、粪便和两种样品中回收的总 ^{14}C 放射性剂量的单个、平均(标准偏差[SD])和中位(第一四分位数[Q1]、第三四分位数[Q3])累积百分比随时间的分布。

[0099] 呈现总 ^{14}C 放射性的每个采样时间的血浆、全血、尿液和粪便样品的个体受试者浓度数据和总结统计。确定每个受试者的全血与血浆总 ^{14}C 放射性浓度之比,并用描述性统计表制成表格。此外,还呈现了比卡格韦的每个采样时间的个体受试者浓度数据以及血浆和尿液样品的总结统计。

[0100] 血浆、尿液和粪便中的 ^{14}C 比卡格韦代谢物分析

[0101] 通过高效液相色谱(HPLC)-MS/TopCount方法在代谢物分析结果中总共鉴定出比卡格韦的20种代谢物。这些代谢物通过几种生物转化途径生成,包括:直接葡萄糖苷酸化(M15

和M58),脱氢(M51和M52),羟基化(M21、M23、M54和M55),失去氟的羟基化(M22和M53),羟基-比卡格韦的硫酸化或葡糖醛酸缀合(M20、M35、M12、M59和M45),脱氟-羟基-比卡格韦的硫酸化或葡糖醛酸或半胱氨酸缀合(M56、M16、M57、M9和M37)(图1)。

[0102] 血浆:用给药后0至144小时之间针对各个受试者收集的样品进行血浆中的代谢物分析和定量。在人血浆中鉴定出比卡格韦和13种代谢物。 $[^{14}\text{C}]$ 比卡格韦是主要的血液循环放射性成分,M20(羟基-比卡格韦-硫酸盐)和M15(比卡格韦-葡糖苷酸)是血浆中的主要代谢物,分别占总放射性的血浆AUC_{0-72h}(浓度时间曲线下的面积)的67.9%、20.1%和8.6%。次要代谢物M21(羟基-比卡格韦)、M52(脱氢产物)和M23/M51(羟基-比卡格韦/脱氢产物)相对于总放射性的AUC_{0-72h}小时比率分别为2.0%、0.6%和0.2%。给药后144小时,所有代谢物均为BLQ(低于定量限),表明没有长期存在的代谢物。

[0103] 尿液:在给药后0至96小时时期内,对各个受试者收集的样品进行尿液中的代谢物分析和定量。在人尿液中鉴定出比卡格韦和20种代谢物。M15(与M58共洗脱,比卡格韦-葡糖苷酸)是尿液中的主要放射性成分,占施用剂量的21.4%。微量或痕量代谢物(见图1)低于剂量的2.2%。回收的未改变的比卡格韦在尿液中含量低(剂量的3.6%),与比卡格韦的LC/MS/MS结果一致。

[0104] 粪便:对各个受试者收集的粪便样品进行粪便中的代谢物分析和定量。未改变的母体、M9(脱氟-羟基-比卡格韦-半胱氨酸缀合物)、M21/M22(羟基-比卡格韦/脱氟-羟基-比卡格韦共洗脱)和M23(羟基-比卡格韦)平均分别占施用剂量的30.6%、13.0%、8.1%和3.6%(在给药后0至144小时内来自8位受试者的平均量)。

[0105] 代谢物的鉴定:通过LC-MS/TopCount方法鉴定代谢物。首先,在LTQ离子阱质谱仪和LTQ轨道阱(Orbitrap)高分辨率质谱仪上获得真实的比卡格韦和 $[^{14}\text{C}]$ 比卡格韦参考标准品的产物离子质谱图。然后提出了其主要的碎片化模式,并确定了相应碎片离子的元素组分。其次,将在LC放射色谱图上观察到的代谢物的保留时间与在以全扫描正离子化模式运行的LC-MS色谱图上的相应保留时间进行比较,并确定代谢物的分子离子。然后获得潜在代谢物的分子离子的产物离子质谱。还可以在LTQ轨道阱高分辨率质谱仪上获得准确的质谱图,以确认提出的分子离子及其产物离子的化学式。提出了似乎合理的裂解途径和假定的代谢物结构(图1)。

[0106] 代谢物M15和M58在LC-MS色谱图中分别在约25.74分钟和25.44分钟时被洗脱,并具有m/z 626处的分子离子。这些离子的精确质量测量提供 $\text{C}_{27}\text{H}_{27}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_{11}^+$ 的化学分子式,质量误差为0.02ppm至0.2ppm,表明向母体分子离子添加了 $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ 部分。这些分子离子的CID导致相似的裂片化,并在m/z 450处显示主要离子,这对应于分子离子中性损失-176Da。m/z 450处离子的MS³显示与比卡格韦的参考标准品相匹配的光谱,表明M15和M58是比卡格韦的葡糖苷酸。

[0107] 代谢物M54、M21和M23在LC-MS色谱图上分别在约31.40分钟、33.18分钟和33.97分钟时被洗脱,并且均具有m/z 466处的分子离子。这些离子的准确质量测量提供 $\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_6^+$ 的化学式,质量误差为0.2ppm至0.4ppm,表明向母体分子离子添加了O原子(+16Da)。M23分子离子的CID在m/z 448、423、307和289处产生主要离子。M21和M54的分子离子CID在m/z 448、423、323、305和289处产生主要离子。这些产物离子的准确质量测量证实了其化学式。MS谱图表明M23、M21和M54是比卡格韦的单羟基化代谢物。

[0108] 代谢物M20在LC-MS色谱上在29.92分钟时被洗脱,并具有m/z 546处的分子离子。该离子的准确质量测量提供 $C_{21}H_{19}F_3N_3O_9S^+$ 的化学式,质量误差为0.3ppm,表明向母体分子离子添加了 SO_4 部分。该分子离子的CID在m/z 466处产生主要离子,这对应于母体分子离子中性损失 SO_3 部分(-80Da)。MS3谱图在m/z 448、423、307和289处产生碎片离子。M20的质谱表明它是比卡格韦的羟基化产物的硫酸盐缀合物。

[0109] 代谢物定量:获得合并血浆、尿液和粪便样品的LC放射色谱图。 $[^{14}C]$ -比卡格韦及其代谢物的定量基于放射色谱图上其相应峰的积分以及相应样品中回收的放射性浓度/放射性剂量。排泄物中比卡格韦及其代谢物的浓度报告为施用剂量的百分比。血浆样品中测得的浓度报告为ng当量比卡格韦/mL。

[0110] 放射性回收率:粪便匀浆和血浆的平均提取回收率分别为95.5%和100.4%。干燥粪便和血浆提取残留物中的平均重构回收率分别为99.9%和100.3%。尿液离心过程的回收率为100.8%。尿液浓缩过程的回收率为100.6%。HPLC柱的放射性回收率为99.3%。

[0111] 合并粪便中M21和M22代谢物的分离和定量

[0112] 液相色谱用于分离合并粪便样本中的M21(羟基-比卡格韦)和M22(脱氟-羟基-比卡格韦),因为这两种代谢物在代谢物分析过程中共洗脱。M22洗脱为单个峰,并定量了放射性,然而M21与M23共洗脱。通过从M21/M22混合物中减去M22来计算M21的百分比。

[0113] 在每个个体受试者汇集的粪便样品中,在给药后的144小时,M21和M22平均分别占剂量的4.8%和3.3%。在每个收集间隔汇集的粪便样本中,在给药后的144小时,M21和M22分别占剂量的2.9%和4.1%。这些分析表明,羟基-比卡格韦(M21)和脱氟-羟基-比卡格韦(M22)的水平相似,约为剂量的3%至4%。

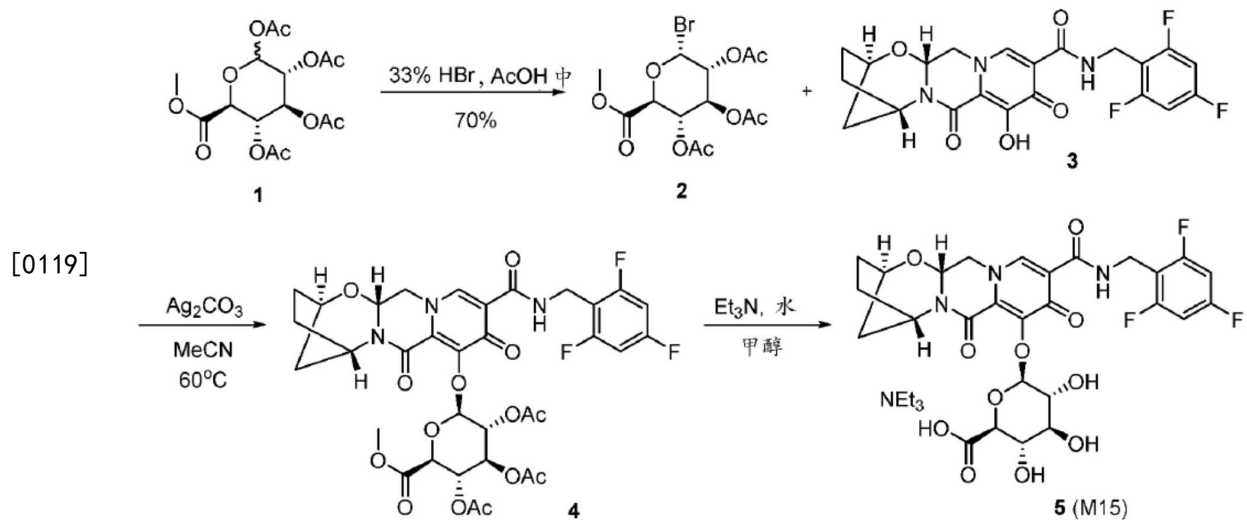
[0114] 结果概述

[0115] 药代动力学结果:该质量平衡研究表明,比卡格韦的回收相对于尿液主要来自粪便。代谢是比卡格韦在人体内的主要清除途径。通过高效液相色谱(HPLC)-MS/TopCount方法鉴定出总共20种比卡格韦的代谢物。直接葡萄糖苷酸化、羟基化、脱氟、脱氢和氧化代谢物的第II期缀合是比卡格韦的主要代谢途径。

[0116] 在人体血浆中, $[^{14}C]$ 比卡格韦是主要的血液循环放射性成分,M20(羟基-比卡格韦的硫酸盐)和M15(比卡格韦的葡萄糖醛酸)是血浆中的主要代谢物,分别是总放射性的血浆AUC0-72h的约67.9%、20.1%和8.6%。在人尿中,M15(与M58共同洗脱,均为比卡格韦的直接葡萄糖苷酸)是主要代谢物(剂量的21.4%)。按时间间隔汇集的粪便样品和单个受试者的放射性主要是由于比卡格韦(剂量的31%至34%),脱氟-羟基-比卡格韦的半胱氨酸结合物(剂量的10%至13%),与脱氟-羟基-比卡格韦共洗脱的羟基-比卡格韦(共同洗脱峰剂量的7%至8%),以及次要氧化产物。M21(羟基-比卡格韦)和M22(脱氟-羟基-比卡格韦)的水平相似,平均分别为人类粪便中M21/M22混合物中剂量的3%至4%。

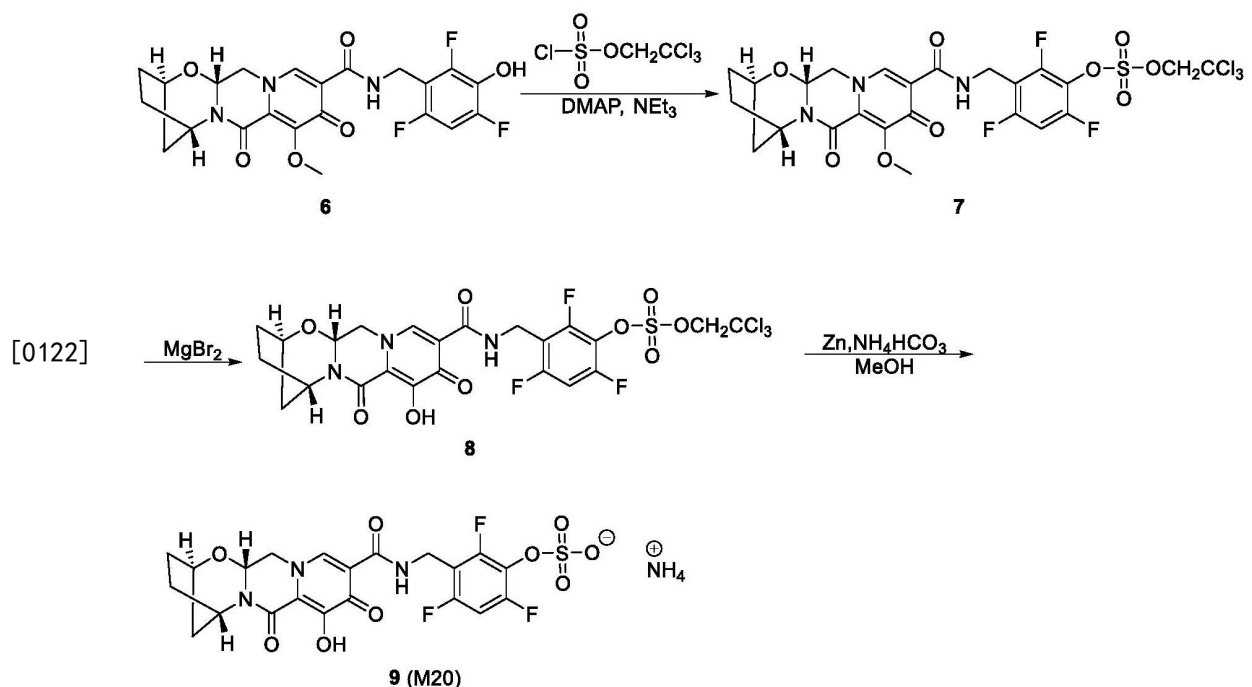
[0117] 实施例2:M15、M20和M23的合成和表征

[0118] M15的制备



[0120] 1与33% HBr在乙酸中的异头溴化反应产生溴化物2, 结晶产率为70%。在 Ag_2CO_3 存在下在乙腈中于60°C的温度下用溴化物2处理酚3, 产生化合物4, 反相色谱法后产率为75%。在甲醇/水中用三乙胺对4进行脱保护, 彻底转化为葡糖醛酸5 (M15)。由于在反应中存在的3的量开始增加, 因此反应以90%的转化率停止。通过反相色谱法用在色谱溶剂中的0.1% TFA纯化混合物。冷冻干燥后分离出游离酸, 然而其含有大量的3。发现游离酸5在中性或酸性条件下均不稳定。M15 (5) 的三乙胺盐似乎是稳定的。使用与之前相同的方法纯化另一批, 但是在冷冻干燥之前用三乙胺中和TFA。该化合物对该条件稳定, 但是含有大量的三氟乙酸三乙胺。并非所有盐都被去除。将该物质通过反相色谱法纯化, 但是在溶剂中没有TFA。冷冻干燥后, 以高纯度和24%的总收率分离出M15 (5) 的三乙胺盐。

[0121] M20的制备



[0123] 步骤1.

[0124] 在室温下搅拌化合物6 (333mg, 0.70mmol)、4-(二甲基氨基)吡啶 (85mg, 0.70mmol) 和三乙胺 (0.2mL, 1.44mmol) 在四氢呋喃 (10mL) 中的溶液, 同时在约2分钟内加入2, 2, 2-三

氯乙基氯硫酸酯 (218mg, 0.88mmol) 在四氢呋喃 (2.5mL) 中的溶液。3.5 小时后, 加入另外的三乙胺 (0.1mL, 0.72mmol) 和 2,2,2-三氯乙基氯硫酸酯 (100mg, 0.40mmol)。加入 1.5 小时后, 将反应混合物用乙酸乙酯 (50mL) 稀释, 并用水 (x 1)、10% 柠檬酸 (x 1)、水 (x 1) 和盐水 (x 1) 洗涤。水相用乙酸乙酯 (x 1) 萃取后, 合并有机相, 干燥 (MgSO_4) 并浓缩。残余物通过 CombiFlash (40g 柱) 纯化, 用 0% 至 10% 甲醇的二氯甲烷溶液洗脱, 得到 458mg (95%) 的化合物 7。 ^1H NMR (400MHz, 氯仿-d) δ 10.40 (t, $J=5.8\text{Hz}$, 1H), 8.33 (s, 1H), 6.86 (td, $J=9.4$, 2.2Hz, 1H), 5.37-5.30 (m, 2H), 4.95 (s, 2H), 4.67 (d, $J=5.9\text{Hz}$, 2H), 4.63 (s, 1H), 4.19 (dd, $J=12.7$, 3.9Hz, 1H), 4.02 (s, 3H), 3.98 (dd, $J=12.7$, 9.2Hz, 1H), 2.13-1.95 (m, 4H), 1.83 (qd, $J=8.7$, 7.6, 3.5Hz, 1H), 1.57 (ddd, $J=12.3$, 4.1, 2.9Hz, 1H)。 ^{19}F NMR (376MHz, 氯仿-d) δ -110.32 (dt, $J=9.7$, 5.3Hz), -122.76 (dd, $J=9.9$, 5.6Hz), -125.40 (d, $J=4.7\text{Hz}$)。LCMS-ESI⁺ (m/z): $\text{C}_{24}\text{H}_{22}\text{Cl}_3\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_9\text{S}$ 的 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 的计算值: 690.01; 实测值: 690.27。

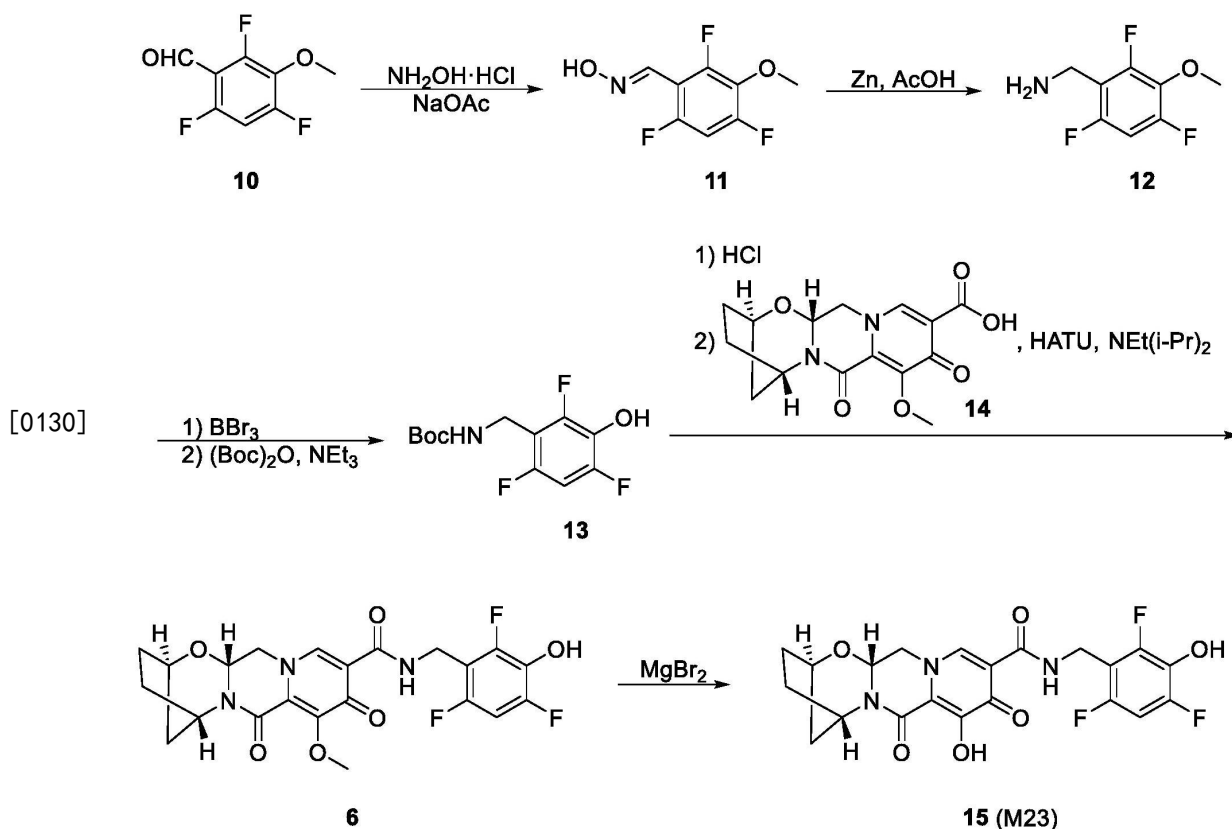
[0125] 步骤 2.

[0126] 在室温下搅拌化合物 7 (255mg, 0.37mmol) 在乙腈 (3mL) 中的溶液, 同时加入溴化镁 (180mg, 0.98mmol)。将得到的悬浮液在 50°C 浴中搅拌。30 分钟后, 将反应混合物在 0°C 下搅拌, 同时添加几滴 0.1N HCl, 直到不溶物溶解为止。将所得溶液用水 (30mL) 稀释后, 将产物用二氯甲烷 (25mL \times 3) 萃取。将合并的萃取液干燥 (Na_2SO_4) 并浓缩。将残余物通过 CombiFlash (40g 柱) 纯化, 用 0 至 15% 甲醇的二氯甲烷溶液洗脱, 得到 178mg (71%) 的化合物 8。 ^1H NMR (400MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 12.46 (s, 1H), 10.44 (t, $J=5.9\text{Hz}$, 1H), 8.42 (s, 1H), 7.63 (td, $J=10.5$, 9.9, 2.0Hz, 1H), 5.43 (dd, $J=9.5$, 4.0Hz, 1H), 5.36 (s, 2H), 5.09 (s, 1H), 4.72-4.48 (m, 4H), 4.01 (dd, $J=12.7$, 9.5Hz, 1H), 1.93 (s, 4H), 1.83 (d, $J=12.1\text{Hz}$, 1H), 1.62-1.50 (m, 1H)。 ^{19}F NMR (376MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ -110.83 (dd, $J=9.8$, 5.2Hz), -124.08 (dd, $J=10.9$, 5.5Hz), -126.44。LCMS-ESI⁺ (m/z): $\text{C}_{23}\text{H}_{20}\text{Cl}_3\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_9\text{S}$ 的 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 的计算值: 675.99; 实测值: 676.26。

[0127] 步骤 3.

[0128] 在室温下搅拌化合物 8 (50mg, 0.074mmol) 在甲醇 (2.5mL) 中的溶液, 同时加入碳酸氢铵 (721mg, 9.12mmol) 和锌粉 (217mg, 3.32mmol)。将得到的悬浮液在室温搅拌 18 小时。将反应混合物在室温下浓缩, 将残余物真空干燥 30 分钟。将残留的固体与 0.01N 碳酸氢铵 (50mL) 一起超声研磨约 2 分钟, 然后将所得的浆液在室温下放置 30 分钟, 然后通过硅藻土过滤。用另外的 0.01N 碳酸氢铵 (10mL) 洗涤烧瓶和硅藻土垫后, 将合并的滤液和洗涤液加载到反相 CombiFlash 柱 (15.5g) 上, 该柱先前用约 200mL 的于约 50% 乙腈水溶液中的 0.01M 碳酸氢铵、然后用于 100% 水中的 0.01M 碳酸氢铵平衡。用洗脱 CombiFlash 的溶剂 A 中的 0% 至 45% 的溶剂 B (溶剂 A: 在 100% 水中的 0.01M 碳酸氢铵; 溶剂 B: 在 80% 的乙腈于水的溶液中的 0.01M 碳酸氢铵) 洗脱柱, 合并含有产物的级分并冷冻干燥得到 31mg (75%) 铵盐形式的化合物 9 (M20)。LCMS-ESI⁻ (m/z): $\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{Cl}_3\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_9\text{S}$ 的 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 的计算值: 690.01; 实测值: 690.27。

[0129] M23 的制备



[0131] 步骤1.

[0132] 在室温下将2,4,6-三氟-3-甲氧基苯甲醛(**10**, 2990mg, 15.7mmol)、盐酸羟胺(1352mg, 19.5mmol)和乙酸钠(1598mg, 19.5mmol)在乙醇(60mL)中的悬浮液剧烈搅拌2.5小时。将悬浮液用水(60mL)稀释,并在冰浴中搅拌1小时。将所得固体过滤,用冷的50%乙醇水溶液洗涤,并真空干燥过夜,得到2942mg(91%)化合物**11**。 ^1H NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ 11.86(s, 1H), 8.08(s, 1H), 7.38(td, $J=11.0, 2.2\text{Hz}$, 1H), 3.90(s, 3H)。 ^{19}F NMR(376MHz, DMSO-d_6) δ -117.25(dd, $J=10.9, 3.5\text{Hz}$), -125.34(ddd, $J=11.9, 8.6, 3.6\text{Hz}$), -128.35(dd, $J=8.5, 2.2\text{Hz}$)。LCMS-ESI $^+$ (m/z): calculated for $\text{C}_8\text{H}_7\text{F}_3\text{NO}_2$ 的 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 的计算值:206.04;实测值:206.00。

[0133] 步骤2.

[0134] 在65℃下搅拌化合物**11**(601mg, 0.98mmol)在乙酸(6mL)中的溶液,同时在30分钟内分批添加锌粉(1500mg, 7.65mmol)。添加后,将混合物在65℃下搅拌。1.5小时后,将反应混合物过滤并将滤液浓缩至干。将残余物溶于水,并用乙醚($\times 1$)洗涤。将有机部分用水和2滴乙酸萃取后,合并两个含水级分,用饱和 NaHCO_3 水溶液稀释直至变为中性,然后用乙酸乙酯($\sim 25\text{ mL} \times 5$)萃取。合并萃取物,干燥(MgSO_4),浓缩,得到440mg(79%)相应的粗胺**12**。LCMS-ESI $^+$ (m/z): $\text{C}_8\text{H}_9\text{F}_3\text{NO}$ 的 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 的计算值:192.06;实测值:191.86。

[0135] 步骤3.

[0136] 在室温下搅拌上述胺**12**(440mg, 2.30mmol)在二氯甲烷(1.5mL)中的溶液,同时加入1M三溴化硼在二氯甲烷(7mL, 7mmol)中的溶液。2小时后,将另外的1M三溴化硼的二氯甲烷溶液(1mL, 1mmol)加入溶液中。自加入2小时后,将反应混合物在冰浴中冷却,并缓慢加入甲醇(15mL)。浓缩溶液,并在浓缩之前将残余的油用甲醇($\sim 15\text{mL}$)溶解,重复4次。将得到

的残余物溶解在甲醇中,并在冰浴中搅拌,然后添加三乙胺(1.5mL,10.76mmol),随后添加二碳酸二叔丁酯(593mg,2.72mmol)。将所得混合物在0℃下搅拌2小时,然后在室温下搅拌过夜。浓缩所得溶液后,将残余物溶于乙酸乙酯(≈30mL)和水(≈30mL)中,并用10%柠檬酸酸化。分离出两个级分,并将含水级分用乙酸乙酯(×1)萃取。用盐水(×1)洗涤有机级分后,将合并的有机级分干燥(MgSO₄)并浓缩。残余物通过CombiFlash(40g柱)纯化,用于己烷中的0至100%EA洗脱,得到530mg(83%)的化合物13。¹H NMR(400MHz,氯仿-d) δ6.70(ddd, J=10.3,9.4,2.3Hz,1H),5.62(br,1H),4.89(s,1H),4.37(d, J=5.8Hz,2H),1.44(s,9H)。¹⁹F NMR(376MHz,氯仿-d) δ-125.17--126.42(m,1F),-132.92--134.28(m,1F),-137.39(m,1F)。LCMS-ESI⁺(m/z):C₈H₇F₃NO₃的[M-C₄H₈+H]⁺的计算值:222.04;实测值:221.95。

[0137] 步骤4.

[0138] 在0℃下搅拌化合物13(530mg,1.91mmol)在二氯甲烷(4.8mL)中的溶液,同时加入于二噁烷中的4M HCl(4.8mL,19.2mmol)。添加后,将混合物在室温下搅拌。1.75小时后,将反应混合物浓缩,并将残留的白色固体与甲苯(≈20 mL x 2)共蒸发,然后真空干燥过夜,得到399mg(98%)粗品胺盐酸盐。

[0139] 在室温下搅拌酸14(600mg,1.87mmol)、上述胺HCl盐(399mg,1.87mmol)和2-(7-氮杂-1H-苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基脲六氟磷酸盐(HATU,748mg,1.97mmol)的在二氯甲烷(12mL)中的悬浮液,同时加入N,N-二异丙基乙胺(1.65mL,9.47mmol)。15分钟后,将另外的HATU(712mg,1.87mmol)、N,N-二异丙基乙胺(1.65mL,9.47mmol)和DMF(3m)加入到混合物中。自添加15分钟后,将溶液浓缩以去除大部分二氯甲烷,并将残余物用甲醇(25mL)稀释。在室温下搅拌所得溶液1小时后,将其浓缩以去除大部分甲醇,并用乙酸乙酯(≈70 mL)稀释,然后用氯化铵水溶液(x 2)、NaHCO₃水溶液(x 2)和盐水(x 1)洗涤。用乙酸乙酯(≈75 mL×1)萃取含水级分后,合并有机级分,干燥(MgSO₄)并浓缩。将残余物通过CombiFlash(80g柱)纯化,用于二氯甲烷中的0%至11%甲醇洗脱,得到647mg(72%)的化合物6。¹H NMR(400MHz,氯仿-d) δ10.32(t, J=5.8Hz,1H),8.33(s,1H),7.25(s,1H),6.65(ddd, J=10.7,9.4,2.2Hz,1H),5.36(dd, J=9.6,3.7Hz,2H),4.68-4.53(m,3H),4.25(dd, J=12.8,3.8Hz,1H),4.02(dd, J=13.0,9.9Hz,1H),3.99(s,3H),2.14-1.93(m,4H),1.91-1.78(m,1H),1.61-1.52(m,1H)。¹⁹F NMR(376MHz,氯仿-d) δ-125.85(d, J=9.2Hz),-132.78(t, J=10.6Hz),-136.03(d, J=10.7Hz)。LCMS-ESI⁺(m/z):C₂₂H₂₁F₃N₃O₆的[M+H]⁺的计算值:480.14;实测值:480.27。

[0140] 步骤5

[0141] 在室温下向化合物6(300mg,0.63mmol)于乙腈(≈10 mL)中的溶液中加入溴化镁(299mg,1.63mmol),并将得到的混合物在50℃浴中搅拌20分钟。浓缩反应混合物,并将残余物用水(100mL)和二氯甲烷(100mL)研磨。在冰浴中搅拌该悬浮液,并加入1N HCl以使该混合物呈强酸性(pH, ≈2)。过滤不溶产物后,分离两个级分,并将含水级分用二氯甲烷(≈100mL×2)萃取。将合并的有机级分干燥(MgSO₄),浓缩,并通过CombiFlash(24g柱)纯化,用于二氯甲烷中的0%至20%甲醇洗脱。将获得的产物与先前获得的固体产物合并,溶解在甲醇中,过滤以去除残渣,并浓缩以得到无定形固体。将无定形固体在乙腈

(~10 mL)中结晶,并将形成的晶体过滤,用冷乙腈洗涤,然后真空干燥,得到209mg (72%)的化合物15 (M23)。¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ 12.44 (s, 1H), 10.33 (t, J=5.7Hz, 1H), 10.11 (s, 1H), 8.44 (s, 1H), 7.27-7.01 (m, 1H), 5.44 (dd, J=9.6, 4.1Hz, 1H), 5.09 (d, J=3.8Hz, 1H), 4.67 (dd, J=12.9, 4.1Hz, 1H), 4.60 (s, 1H), 4.59-4.43 (m, 2H), 4.02 (dd, J=12.7, 9.6Hz, 1H), 1.93 (d, J=5.1Hz, 4H), 1.84 (d, J=12.1Hz, 1H), 1.57 (dt, J=12.2, 3.5Hz, 1H)。¹⁹F NMR (376MHz, DMSO-d₆) δ -127.13, -131.52 (t, J=11.2Hz), -134.59 (d, J=11.4Hz)。LCMS-ESI⁺ (m/z): C₂₁H₁₉F₃N₃O₆的 [M+H]⁺的计算值:466.12;实测值:466.26。

[0142] 实施例3:M15的化学结构的确认

[0143] 一般方法

[0144] 由于实验室设备的正常精度限制,所有时间、离心速度、温度和体积都是近似值。除非另有说明,否则按照下表所述进行离心。

[0145] 表1

	基质	力	时间(分钟)	温度
[0146]	血浆 ^a	2800 x g	10	环境温度
	血浆 ^b	1400 x g	10	环境温度

[0147] g 重力.

[0148] a 萃取步骤.

[0149] b 重建步骤.

[0150] 血浆

[0151] 在分析之前和之后,将本实施例中使用的血浆样品储存在约-70℃。合并并在给药后8小时从人类男性受试者获得的血浆样品,包括每种样品按重量计0.4g。通过液体闪烁计数(LSC)测定合并样品中的放射性。

[0152] 将约1g的合并血浆样品与3mL的于乙腈(ACN)中的0.2% (v/v) 甲酸(FA)合并,超声处理,涡旋混合,离心,然后去除上清液。重复提取,并合并各个上清液。通过LSC分析重复的等分试样以确定提取回收率,为96.6%。

[0153] 将合并的上清液在氮气下蒸发至干,并在350μL的反渗透水:于乙腈(ACN)中的0.2% (v/v) 甲酸(FA):甲醇:(4:1:2, v:v:v)中重构。样品经超声处理,涡旋混合,离心,并通过LSC分析重复的等分试样,以确定重构回收率为104%。通过LC-MS分析重构的样品,以10秒的间隔将洗脱液级分收集到含有固体闪烁剂的96孔板中。使用TopCount分析确定每个孔中的放射性,并根据放射性计数产生放射化学谱。

[0154] 血浆样品与M15标准品的共同色谱

[0155] 通过将40μL合并的8小时血浆样品与40μL M15的标准溶液(500ng/mL)合并来制备其他血浆样品。使用以下仪器和条件通过LC-MS分析样品:

[0156] LC-MS仪器

	自动进样器:	Acquity 样品管理器 FTN (10°C)
	二元泵:	Acquity I 类二元溶剂管理器
[0157]	柱温箱:	Acquity 柱管理器(25°C)
	级分收集器:	LEAP Technologies PAL HTS-xt (15°C)
	质谱仪:	Vion IMS Q-TOF

[0158] LC-MS条件

	离子化接口:	正锁质量电喷雾接口
	HPLC 柱:	Phenomenex, Luna C18(2), 4.6 x 250 mm, 5 μ m
	保护柱:	Phenomenex, KrudKatcher Ultra
	流动相 A:	于水中的 0.1% (v/v) 甲酸
	流动相 B:	于乙腈中的 0.1% (v/v) 甲酸

	梯度:	时间(分钟)	%A	%B
		0.0	85	15
		0.1	85	15
		4.0	85	15
		40.0	60	40
[0159]		44.0	0	100
		54.0	0	100
		56.0	85	15
		64.0	85	15

流速: 1.0 mL/分钟; 分流比 1:3, 质谱仪: 级分收集器

	全谱扫描:	m/z 50 – 1000, 200 ms 扫描时间
	Auto MS2 扫描	m/z 50 – 1000, 300 ms 扫描时间
	毛细管电压:	3500 V
	干燥气体温度:	450°C
	源温度:	120°C

[0160] 代谢物鉴定

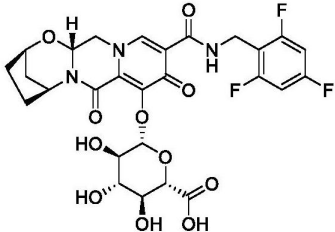
[0161] 使用LC-MS分析人血浆样品, 并确认代谢物M15与标准品是相同组分。表2列出了血浆样品分析得出的M15的结构、母体质量和特征产物离子。表3列出了代表性准确质量数据的总结。

[0162] 标准溶液中M15的提取离子色谱图如图2所示。合并血浆样品中M15的放射性色谱

图和提取离子色谱图如图3所示。比较标准品、合并血浆样品和共注入样品的提取离子色谱图如图4所示。为确认M15和标准品M15是相同的组分，M15标准溶液和人血浆样品分别进行分析并共注入。当单独分析时，M15在M15标准溶液和人血浆样品中的保留时间分别为26.24分钟和26.28分钟(图1和图2)。当共注入M15标准溶液和血浆样品时，观察到一个峰，保留时间为26.28分钟，如图4所示。

[0163] 图5示出了通过分析M15的标准溶液获得的M15的代表性MS前体和MS/MS产物离子质谱图。MS前体离子质谱图显示在m/z 626处的质子化的分子离子。MS/MS产物离子质谱图显示在m/z 450、289、261和145处的碎片离子。图6示出了通过分析研究样品获得的代谢物M15的代表性MS前体和MS/MS产物离子质谱图，MS/MS产物离子质谱实质上与该标准品相同。代谢物M15的元素组成已使用准确的质量分析确认，并在表3中显示。

[0164] 表2.

代谢物名称	保留时间(分钟)	[M + H] ⁺	拟议代谢物鉴定	特征产物	
				离子(m/z)	基质
[0165] M15	26.28 ^a	626		450, 289, 261, 145	血浆

[0166] a分析血浆样品获得的保留时间(图3)。

[0167] 表3.

代谢物名称	代谢物					
	实测质量	理论质量	拟议式	Δ mDa	Δ ppm	
[0168] M15	626.1600	626.1592	$C_{27}H_{27}F_3N_3O_{11}^+$	0.80	1.3	

[0169] Δ mDa = (实测质量 - 理论质量) * 1000。

[0170] Δ ppm = (Δ mDa / 理论质量) * 1000。

[0171] 实施例4: M20的化学结构的确认

[0172] 由于实验室设备的正常精度限制，因此所有离心速度、温度和体积都是近似值。除非另有说明，否则在室温下以约2800x g的速度进行离心10分钟。

[0173] 溶液

[0174] 以下溶液用于样品制备程序。

溶液名称

组成

[0175] M20 的标准溶液 于反渗水: 甲醇: 于乙腈中的 0.2% (v/v) 甲酸(4:2:1, v/v/v) 中的 2 μ g/mL

[0176] 血浆

[0177] 合并给药后8小时从人类男性受试者获得的血浆样品，包括200 μ L的每种样品。通过液体闪烁计数(LSC)测定每个合并样品中的放射性。

[0178] 将合并的血浆样品与3mL的于乙腈 (ACN) 中的0.2% (v/v) 甲酸 (FA) 合并,进行超声处理,涡旋混合,离心,然后去除上清液。重复提取,并合并各个上清液。通过LSC分析重复的等分试样以确定提取回收率,为98.6%。将合并的上清液在氮气下蒸发至干,并在350 μ L的反渗水:甲醇:于CAN中的0.2% (v/v) FA (4:2:1, v:v:v) 中重构。样品经超声处理,涡旋混合,离心,并通过LSC分析重复的等分试样,以确定重构回收率为100%。通过LC-MS分析重构的样品,将洗脱液级分以10秒的间隔收集到含有固体闪烁剂的96孔板中。使用TopCount分析确定每个孔中的放射性,并根据放射性计数生成放射化学谱。

[0179] 血浆样品与M20标准品的共同色谱法

[0180] 可以通过将100 μ L的重构的8小时合并血浆样品与50 μ L的M20的标准溶液合并来制备其他样品。所得样品含有约1:1的比卡格韦:M20比例。使用以下仪器和条件通过LC-MS分析样品。

[0181] LC-MS仪器

	控制器:	Shimadzu/Prominence CBM-20A
	泵:	Shimadzu/Nexera LC-30AD
	自动注射器:	Shimadzu/Nexera SIL-30ACMP (15°C)
[0182]	柱温箱:	Shimadzu/Prominence CTO-20AC (25°C)
	脱气器:	Shimadzu/Prominence DGU-20A5R
	质谱仪:	Thermo Fisher Scientific Q Exactive
	级分收集器:	Leap Technologies PAL HTC-xt (15°C)

[0183] LC-MS条件

离子化接口:	正加热电喷雾接口(HESI)		
HPLC 柱:	Phenomenex, Luna C18 (2), 4.6 x 250 mm, 5 μ m		
保护柱:	Phenomenex C18, 3 x 4 mm		
流动相 A:	于水中的 0.1% (v/v) 甲酸		
流动相 B:	于乙腈中的 0.1% (v/v) 甲酸		
梯度	时间(分钟)	%A	%B
	0.0	85	15
	4.0	85	15
	40.0	60	40
[0184]	44.0	0	100
	54.0	0	100
	56.0	85	15
	64.0	85	15
流速:	1.00 mL/分钟; 分流比 25:75 质谱仪: 级分收集器		
全谱扫描:	m/z 150 – 900, 70,000 分辨率下		
依赖性扫描:	MS2, 17,500 分辨率下		
源电压:	+ 4.5 kV		
S-Lens RF 水平	40		

[0185] 代谢物鉴定

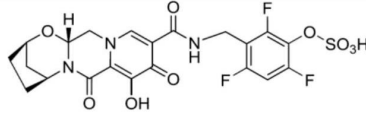
[0186] 表5列出了作为标准品和血浆样品中的M20的结构、母体质量和特征产物离子。表6列出了代表性的准确质量数据总结。

[0187] 图7显示了标准溶液中M20的提取离子色谱图。图8显示了合并血浆样品中M20的提取离子色谱图和放射色谱图。比较标准品、合并血浆样品和共注入样品的提取离子色谱图如图9所示。为确认标准溶液中的M20和M20是相同的组分, M20标准溶液和人血浆样品分别进行分析并共同注入。当单独分析时, M2在M20标准溶液和人血浆样品中的保留时间分别为36.96分钟和37.94分钟(图9)。当共注入M20标准溶液和血浆样品时, 观察到一个峰, 保留时间为37.29分钟。

[0188] 在m/z 546处观察到M20的质子化分子离子(数据未显示)。通过分析M20的标准溶液获得的M20的代表性产物离子质谱图如图10所示。质谱图显示m/z 466(SO₃损失)、307(m/

z 289加水)、289和161处的产物离子。从人血浆样品中获得的M20的代表性产物离子质谱图如图11所示,实质上与标准品相同。使用准确的质量分析确认M20的元素组成,如表6所示。

[0189] 表5.

代谢物名称	保留时间 (分钟)	[M + H] ⁺	拟议的代谢物鉴定	特征产物离子 (m/z)	基质
M20	36.96 ^a	546		466,	血浆
	37.94 ^b			307, 289, 161	

a 通过分析 M20 的标准溶液获得的保留时间(图 7)。

b 通过分析血浆样品获得的保留时间(图 8)。

[0191] 表6.

代谢物名称	实测质量	理论质量	拟议的式	Δ mDa	Δ ppm
M20	546.0793	546.0789	C ₂₁ H ₁₉ F ₃ N ₃ O ₉ S ⁺	0.40	0.7

[0193] Δ mDa = (实测质量 - 理论质量) * 1000。

[0194] Δ ppm = (Δ mDa / 理论质量) * 1000。

[0195] 实施例5: BIC、M15、M20和M23的人MRP2抑制潜力的体外评估

[0196] 测定方法学

[0197] 在以下分析中研究了比卡格韦及其代谢物(M15、M20和M23)对肝外排转运子多药耐药蛋白2(MRP2; ABCC2)的抑制作用。转运子抑制测定的细胞和实验条件总结在下表7中。BIC可以根据例如WO 2014/100212中描述的程序合成。根据本文所述的程序制备M15、M20和M23。所有其他材料均由SOLVO Biotechnology购买,根据其认证的ISO 9001:2008系统的SOLVO标准操作程序(SOP)进行实验。批号和产品信息由SOLVO Biotechnology记录。

[0198] 表7.

转运子	系统	模型底物	阳性对照
MRP2	膜囊泡	³ H-E ₂ 17BG	苯溴马隆

[0200] (E₂17BG) 雌二醇-17 β -葡糖苷酸

[0201] 抑制膜囊泡中的转运

[0202] 在不存在或存在ATP的情况下,将测试化合物和阳性对照与膜囊泡制品(总蛋白: 50 μ g/孔)和模型底物一起孵育。将反应混合物在37 $^{\circ}$ C下预孵育15分钟。通过添加25 μ L的分别预孵育的12mM MgATP或AMP测定缓冲液(用于背景对照)来开始反应。5分钟后,通过添加200 μ L冰冷的洗涤缓冲液来终止反应,并通过安装在96孔板(滤板)上的玻璃纤维滤器立即过滤。将过滤器洗涤,干燥,并通过液体闪烁确定经过滤的囊泡内部的底物量。平行测试阳性对照抑制剂。缺乏转运子表达的对照膜用作阴性对照。所有测定一式两份进行。

[0203] 根据以下公式计算出级分的转运活度:

$$[0204] \quad \text{活度}\% = (A-B) / (C-D) \times 100$$

[0205] 其中A是在TA和ATP的存在下底物的转移量,B是在TA的存在下底物的转移量,C是在溶剂和ATP的存在下底物的转移量,D是在溶剂的存在下底物的移位置。

[0206] 转运子测定中的IC₅₀测定

[0207] IC₅₀定义为将最大转运子特异性转运抑制50%所需的测试制品浓度。使用GraphPad Prism 5(GraphPad Software Inc.,San Diego,CA),将%抑制对浓度非线性拟合到具有可变的Hill系数的S形曲线来计算IC₅₀值。如果在最高测试浓度下%抑制小于50%,则无法确定IC₅₀。相对抑制结果<20%时未观察到抑制作用(NIO),直至最高测试浓度也未观察到浓度依赖性转运。

[0208] 抑制数据总结在表8中。在每个测定中,200μM的阳性对照苯溴马隆显示出≥99%的抑制。BIC在高达100μM的浓度下未显示出MRP2介导的E217βG的抑制。M15和M20显示出剂量依赖性抑制的MRP2介导的E217βG的转运,计算的IC₅₀值分别为256μM和45μM。在测定缓冲液中在最高调查浓度300μM观察到M20的沉淀。在100μM的最高测试浓度下,M23表现出对MRP2介导的转运的43%抑制。

[0209] 表8.

摄取转运子抑制测定		
化合物	观察到的最大抑制 (对照的 %)	IC ₅₀ (μM)
[0210] BIC	0% 在 100 μM 下	NIO
M15	53% 在 300 μM 下	256
M20	98% 在 300 μM 下	45
M23	43% 在 100 μM 下	>100

[0211] 实施例6:BIC、M15、M20和M23的人OATP抑制潜力的体外评估

[0212] 测定方法学

[0213] 在以下测定中研究了BIC及其代谢物(M15、M20和M23)对人摄取转运子有机阴离子转运多肽1B1、1B3和2B1(OATP1B1、OATP1B3、OATP2B1;SLC)的抑制。

[0214] 转运子抑制测定的细胞和实验条件总结在下表9中。BIC可以根据例如WO 2014/100212中描述的程序合成。根据本文所述的程序制备M15、M20和M23。

[0215] 表9.

转运子	测试系统	模型底物	阳性对照
[0216] OATP1B1/OATP1B 3	CHO 细胞	Fluo-3	利福平
OATP1B1/OATP1B 3	HEK293FT 细胞	³ H-E ₂ 17βG	利福平
OATP2B1	MDCKII	³ H-E3S	氟伐他汀

[0217] (HEK293FT)用SV40大T抗原转化的快速生长的人类胚胎肾细胞

[0218] (E₂17βG)雌二醇-17β-葡萄糖苷酸

[0219] (E3S)雌酮-3-硫酸盐

[0220] (MDCKII)Madin Darby犬肾脏亚克隆II

[0221] 使用Fluo-3作为探针底物的OATP1B1和OATP1B3抑制测定

[0222] 野生型或用编码人OATP1B1或OATP1B3基因转染的中国仓鼠卵巢(CHO)细胞保存在含以下成分的Dulbecco改进的Eagle培养基(DMEM)中:1000mg/L D-葡萄糖,L-谷氨酰胺,25mM HEPES缓冲液,110mg/L丙酮酸钠,1%Pen/Strep,10%胎牛血清,0.05mg/mL L-脯氨酸和0.5mg/mL遗传霉素G-418。将细胞保存在设定为37℃、90%湿度和5%CO₂的培养箱中。将过表达OATP1B1或OATP1B3的CHO细胞接种到BioCoat聚D-赖氨酸包被的底部透明的96孔黑色细胞培养板中,密度为1 × 10⁵细胞/孔。将丁酸钠(10mM)添加到OATP1B1和OATP1B3细胞中以增加蛋白质表达水平,并使细胞生长在一夜之间聚集。测定缓冲液包含142mM NaCl、5mM KCl、1mM KH₂PO₄、1.2mM MgSO₄、1.5mM CaCl₂、5mM葡萄糖和12.5mM HEPES(pH 7.4)。去除培养基后和在添加测试化合物之前,将细胞用37℃测定缓冲液洗涤两次,然后用测定缓冲液预孵育0.5小时。将测试化合物在DMSO中以最终测试浓度的250倍进行系列稀释,以形成化合物加标溶液(compound spiking solutions)。然后将化合物加标到含有2μM Fluo-3的测定缓冲液中,并与细胞孵育1小时。去除含有Fluo-3和测试化合物的测定缓冲液后,将细胞用200μl冰冷的测定缓冲液洗涤3次,然后在室温下在含有于1mM CaCl₂溶液中的0.05%SDS的裂解液中裂解15分钟。确定Fluo-3荧光在485nm激发和530nm发射下的底物积累。

[0223] 使用³H-E₂17βG作为探针底物的OATP1B1和OATP1B3抑制测定

[0224] 在测定前24小时接种HEK293FT-Mock和OATP转染的细胞(各1×10⁵个细胞)。在各种浓度的测试化合物或阳性对照利福平的存在下,将预冲洗的细胞与1μM ³H-E₂17βG在HK缓冲液中孵育3分钟。实验后,将细胞用Krebs-Henseleit缓冲液冲洗并用0.1M NaOH裂解。细胞内底物的量通过液体闪烁读取器确定。

[0225] OATP2B1抑制测定

[0226] 在测定前24小时接种MDCKII-Mock和OATP2B1转染的细胞(各1×10⁵个细胞)。在各种浓度的测试化合物或阳性对照氟伐他汀的存在下,将预冲洗的细胞与0.2μM ³H-E3S在HK缓冲液中孵育2分钟。实验后,将细胞用Krebs-Henseleit缓冲液冲洗并用0.1M NaOH裂解。细胞内底物的量通过液体闪烁读取器确定。

[0227] OATP抑制测定的数据分析

[0228] 抑制百分比根据以下公式计算:

[0229] 抑制% = $[1 - \{[OATP]_i - [WT]_{ni}\} / \{[OATP]_{ni} - [WT]_{ni}\}] * 100$

[0230] 其中:

[0231] [OATP]_i表示OATP1B1、OATP1B3或OATP2B1细胞在测试化合物存在下的底物积累;

[0232] [OATP]_{ni}表示OATP1B1、OATP1B3或OATP2B1细胞分别在不存在测试化合物的情况下的底物积累;和

[0233] [WT]_{ni}表示野生型细胞或模式细胞(Mock cell)在不存在测试化合物的情况下的底物积累。

[0234] 转运子测定中的 IC_{50} 测定

[0235] 根据实施例5中所述的程序测定 IC_{50} 。每种转运子的阳性对照抑制剂在每种测定中显示出>80%的抑制。测定的BIC、M15、M20和M23的最高浓度分别为100 μ M、100 μ M、300 μ M和100 μ M。对于抑制<20%的化合物未确定 IC_{50} 或未观察到剂量依赖性抑制。结果报告为NIO(未观察到相互作用)。

[0236] BIC在100 μ M的最高测试浓度下未显示出对OATP1B1介导的雌二醇-17 β -葡萄糖苷酸(E_2 17 β G)转运的抑制作用。在100 μ M的最高测试浓度下,BIC抑制了OATP2B1细胞摄取的17%的雌酮-3-硫酸盐。表10总结了BIC的数据。

[0237] 表10.

转运子	使用的探针底物	在最高测试浓度下的最大抑制(对照的%)	IC_{50} (μ M)
[0238] OATP1B1	E_2 17 β G	100 μ M 下 0%抑制	NIO
OATP1B3	E_2 17 β G	100 μ M 下 6%抑制	NIO
OATP2B1	E3S	100 μ M 下 17%抑制	NIO

[0239] 在100 μ M的最高测试浓度下,M15对OATP1B1介导的Fluo-3转运显示39%的抑制,而对OATP1B3介导的Fluo-3转运没有抑制。表15总结了M15的数据。

[0240] 表11.

转运子	使用的探针底物	在最高测试浓度下的最大抑制(对照的%)	IC_{50} (μ M)
[0241] OATP1B1	Fluo-3	100 μ M 下 39%抑制	>100
OATP1B3	Fluo-3	100 μ M 下 0%抑制	NIO

[0242] 在100 μ M的最高测试浓度下,M20对OATP1B1介导的雌二醇-17 β -葡萄糖苷酸(E_2 17 β G)的转运显示出12%抑制,而对OATP1B3介导的雌二醇-17 β -葡萄糖苷酸(E_2 17 β G)的转运显示出49%抑制。M20抑制OATP1B1介导的Fluo-3转运, IC_{50} 值为90.1 μ M,在100 μ M下抑制18%的OATP1B3介导的Fluo-3转运。在100 μ M的最高测试浓度下,M20抑制了26%的OATP2B1细胞摄取的雌酮-3-硫酸盐。表20总结了M20的数据。

[0243] 表12.

转运子	使用的探针底物	在最高测试浓度下的最大抑制(对照的%)	IC ₅₀ (μM)
[0244] OATP1B1	E ₂ 17βG	100 μM 下 12%抑制	NIO*
OATP1B3	E ₂ 17βG	100 μM 下 49%抑制	>100*
OATP1B1	Fluo-3	100 μM 下 54%抑制	90.1
OATP1B3	Fluo-3	100 μM 下 18%抑制	NIO
OATP2B1	E3S	100 μM 下 26%抑制	>100*

[0245] *在测定缓冲液中在300μM测试浓度下观察到的测试化合物的沉淀。300μM的数据未用于测定IC₅₀值。

[0246] M23抑制OATP1B1介导的Fluo-3转运, IC₅₀值为99.9μM, 在100μM的最高测试浓度下, M23抑制20%的OATP1B3介导的Fluo-3转运。表13总结了M23的数据。

[0247] 表13.

转运子	使用的探针底物	在最高测试浓度下的最大抑制(对照的%)	IC ₅₀ (μM)
[0248] OATP1B1	Fluo-3	100 μM 下 51%抑制	99.9
OATP1B3	Fluo-3	100 μM 下 20%抑制	NIO

[0249] 总体而言, BIC在浓度达到100μM下对OATP1B1、OATP1B3和OATP2B1介导的转运均无剂量依赖性抑制。M15、M20和M23抑制OATP1B1介导的Fluo-3转运, IC₅₀分别>100μM、90.1μM和99.9μM。M15、M20和M23在浓度达到100μM下, 对OATP1B3介导的Fluo-3转运的抑制很小甚至没有。M20对OATP1B1介导的E₂17βG转运没有剂量依赖性抑制, 但同时抑制OAT1B3介导的E₂17βG转运和OATP2B1介导的雌酮-3-硫酸盐转运, IC₅₀>100μM。对于在最高测试浓度下抑制≤20%, 没有报道IC₅₀值。

[0250] 实施例7: 比卡格韦及其代谢物对人肝微粒体胆红素葡萄糖苷酸化的抑制潜力的体外评估

[0251] 在本实施例中, 通过胆红素葡萄糖苷酸化测定, 确定了比卡格韦及其代谢物M15、M20和M23降低人肝微粒体UGT1A1催化活性的潜力。在该测定中, 在存在和不存在比卡格韦及其代谢物的情况下, 定量从胆红素底物形成酶特异性代谢物的速率, 并确定其IC₅₀值。这项研究对于评估比卡格韦和/或其代谢物是否有可能与其他药物和与内源性化合物发生药代动力学相互作用。在该测定中, 为了确定IC₅₀值, 在体外评估了比卡格韦及其代谢物对主要的人葡萄糖苷酸化酶、负责胆红素缀合的尿苷二磷酸葡萄糖苷酸转移酶1A1 (UGT1A1) 的抑制作用。

[0252] 材料

[0253] 可以根据例如WO 2014/100212中描述的程序合成BIC。根据本文所述的程序制备M15、M20和M23。除阿扎那韦 (Toronto Research Chemicals, North York ON) 外, 测定中使用的其他试剂均购自Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) 或BD Biosciences (Woburn, MA)。人肝

微粒体级分由BD Biosciences (Woburn, MA) 提供。开始测定之前,立即新鲜准备胆红素底物。

[0254] 酶抑制测定

[0255] 胆红素通过UGT1A1代谢,产生两个酰基单葡萄糖苷酸和酰基二葡萄糖苷酸。对于哪个目标丙酸酯(C8或C12)首先被代谢没有明确的优先选择。已经证明阿扎那韦是这种活性的有效的选择性抑制剂,因此是适当的阳性对照。测定的条件被确定为相对于微粒体蛋白质浓度和孵育时间是线性的。在测定条件下,形成胆红素单葡萄糖苷酸的 K_m 确定为 $0.98\mu\text{M}$,这里使用的 $0.8\mu\text{M}$ 底物浓度 $\leq K_m$ 。一式两份测定微粒体UGT1A1活性。最终的反应混合物由 0.2mg/mL 肝微粒体蛋白、 $100\mu\text{g}$ 阿拉霉素(alamethicin)/ mg 微粒体蛋白、 5mM UDP-葡萄糖醛酸、 5mM 氯化镁、 5mM D-蔗糖1,4-内酯(SACLAC)、 $0.8\mu\text{M}$ 胆红素和 0.1M 磷酸钾缓冲液pH 7.4组成。将稀释后的微粒体级分与阿拉霉素、氯化镁和SACLAC在冰上孵育15分钟。然后加入底物和抑制剂,并将混合物加热至 37°C 保持0.5分钟。通过加入于磷酸钾缓冲液中的UDP葡萄糖醛酸来引发反应。在摇动且无光照射的情况下,于 37°C 下继续孵育2分钟。通过加入一体积的于甲醇中的 200mM 抗坏血酸来终止反应,含有 200nM 2-(N-(2-乙基苯基)甲基磺酰胺基)-N-(2-(吡啶-2-基硫基)乙基)乙酰胺作为内标品。将样品在 4°C 下以 3600rpm 离心5分钟,然后将上清液等分试样经过LC-MS/MS,以监测从胆红素形成单葡萄糖苷酸。

[0256] 液相色谱-质谱(LC-MS)

[0257] 使用Shimadzu UFLC XR UPLC系统进行分析。所用的色谱柱为保持在 60°C 的Thermo-Hypersil Gold $1.9\mu\text{m}$ C18色谱柱($30\times 2.1\text{mm}$)。流动相为:A:含有 0.1% (v/v)甲酸的水,和B:含有 0.1% (v/v)甲酸的乙腈,以 0.7mL/min 的速度泵送。在2分钟内通过一系列线性梯度洗脱。质谱仪是Applied Biosciences SCIEX QTRAP 5500三重四极杆质谱仪,具有在正离子模式下运行的电喷雾接口。通过代谢物/内标品峰面积比(PAR)进行定量。自动进样器中储存的提取样品显示胆红素葡萄糖苷酸信号不稳定。损失为 $\sim 0.1\%$ /分钟。

[0258] 数据分析

[0259] LC-MS/MS分析

[0260] 胆红素葡萄糖苷酸标准品不能在市场上买到,因此胆红素单葡萄糖苷酸和胆红素二葡萄糖苷酸峰通过其MS性质鉴定。单葡萄糖苷酸和二葡萄糖苷酸的MS/MS跃迁($[M+H]^+$)分别为 m/z 761.2/475.1和937.2/475.1。将两种单葡萄糖苷酸的PAR值合并以进行定量。将在抑制剂存在下的PAR值与媒介物对照(无比卡格韦、M15、M20、M23或阳性对照抑制剂)的PAR值进行比较,并将活性表示为剩余对照活性的百分比。

[0261] IC_{50} 测定

[0262] 从代谢物的形成速率计算反应速度,并将其与媒介物对照(100% 活性)相比较。使用GraphPad Prism 7.03和S型三参数抑制模型通过非线性回归计算 IC_{50} 值。测试化合物的弱抑制必须限制模型的较低平稳值(当UGT1A1被完全抑制时的残余活性)以产生有意义的 IC_{50} 值。在测试期间,四次确定阿扎那韦的抑制能力,每个浓度在每次测定中一式两份测试。汇总所有运行的数据,并进行整体拟合以确定较低的坪值。最佳拟合值为 10.96% 剩余活性(标准误差 2.94%)。通过非线性回归计算比卡格韦及其代谢物的 IC_{50} 值,较低的坪值受该值约束。对于阿扎那韦,将四次重复运行的 IC_{50} 值合并以得到该阳性对照抑制剂的总几何平均值和可乘标准偏差。

[0263] 结果

[0264] 评估了比卡格韦、M15、M20和M23对人肝微粒体胆红素单葡萄糖苷酸化活性的抑制作用。表14总结了抑制能力和阳性对照抑制剂阿扎那韦。阳性对照抑制剂阿扎那韦如预期的那样降低了UGT1A1的活性,从而确认用于测定的令人满意的孵育条件(表1)。在四次运行中获得的阿扎那韦的几何平均 IC_{50} 值为 $1.2\mu\text{M}$ 。浓度达到 $300\mu\text{M}$ 的比卡格韦及其葡萄糖苷酸代谢物(M15)对UGT1A1活性的抑制很小或没有抑制(抑制 $<2\%$)。在这两种测试化合物的高浓度下,酶活性受到适度刺激,在 $200\mu\text{M}$ 比卡格韦时峰值增加 76% ,在 $200\mu\text{M}$ M15时峰值增加 21% 。比卡格韦代谢物M20和M23是人肝胆红素葡萄糖苷酸化的弱抑制剂, IC_{50} 值分别为 $153\mu\text{M}$ 和 $256\mu\text{M}$ 。

[0265] 表14.

活性	计算的 IC_{50} (μM)				
	阿扎那韦 (对照)	比卡格 韦	M15	M20	M23
肝胆红素单葡萄糖 苷酸化	$1.2 (1.44)^a$	$> 300^b$ (NIO)	$> 300^b$ (NIO)	153^c	256^c

[0267] NIO未观察到抑制(在 $0\mu\text{M}$ 至 $300\mu\text{M}$ 的浓度范围内,抑制 $<2\%$)

[0268] a. 一式两份,四次测定的几何平均值和可乘标准偏差。

[0269] b. 适合度未收敛。测试的最大浓度为 $300\mu\text{M}$ 。

[0270] c. 使用8个重复数据点的最佳拟合值

[0271] 在浓度达到 $300\mu\text{M}$ 时,比卡格韦或M15对人肝微粒体胆红素葡萄糖苷酸化有很小或没有抑制(UGT1A1催化的活性)。M20和M23是弱抑制剂,计算的 IC_{50} 值分别为 $153\mu\text{M}$ 和 $256\mu\text{M}$ 。

[0272] 实施例8:在来自不同物种的冷冻保藏的肝细胞中检测到的BIC的代谢物

[0273] 将冷冻保存的肝细胞与放射性标记的BIC孵育4小时,以鉴定代谢物、确定其丰度并将非临床物种与人进行比较。表15总结了在冷冻保存的肝细胞中与 $[^{14}\text{C}]$ BIC ($20\mu\text{M}$) 孵育后母体药物和鉴定出的代谢物的百分比,其拟议的身份如图12所示。代谢途径包括羟基化(3个变体)、N-脱烷基和直接葡萄糖苷酸化。在非临床物种中也观察到所有人类代谢物。使用代表全部肝代谢酶的肝细胞系统,看来BIC的代谢在猴子和狗中广泛,而在大鼠和人中较低。

[0274] 表15.

被分析物 ^a	身份	放射色谱的级分(%)			
		Wister-Han 大鼠	比格犬	食蟹猴	人
BIC	母体	91.5	78.7	52.4	93.9
M305	N-脱烷基化	1.7	8.7	2.4	1.2
M465a	羟基化-1	1.2	1.4	2.7	-
M465b	羟基化-2	-	0.2	11.6	0.6
M465c	羟基化-3	-	3.6	-	-
M611	葡萄糖缀合	-	0.8	4.4	-
M625	葡糖苷酸缀合	5.2	6.6	21.7	4.3
M641	羟基化/葡糖苷酸化	-	-	4.1	-
总量	-	99.6	100	99.3	100

[0276] a被分析物的代谢物识别号与其分子量相对应,例如M305=分子量为305Da的代谢物。

[0277] 实施例9.不同物种的体内BIC代谢

[0278] 在向小鼠、大鼠、猴子和人单次口服施用¹⁴C]BIC后确定比卡格韦代谢。剖析在体内口服施用¹⁴C]BIC后获得的合并的血浆、尿液、胆汁和粪便样品,并在转基因小鼠、Wistar-Han大鼠、猴子和健康人受试者中提供已鉴定代谢物的完整列表。综合结果表明,BIC主要通过肝脏代谢消除,然后排泄到粪便和尿液中。代谢途径包括羟基化、氧化脱氟、直接葡糖苷酸化和氧化,然后是第II期缀合。与大鼠和人相比,在猴子中,BIC通过氧化途径代谢的程度更大。口服施用¹⁴C]BIC后的血浆分析结果示于下表16。

[0279] 表16.

组分	AUC 合并血浆 ^a 中总放射性的%			
	转基因小鼠	Wistar Han 大鼠	食蟹猴	人
BIC	95.5	76.5	80.2	67.9
M12	1.86	2.18	ND	ND
M15	ND	ND	0.55	8.6
M20	ND	11.3	0.77	20.1
M21/M22	ND	1.18	ND	2.0
M23	ND	2.36	ND	0.2c
M42	ND	ND	12.2	ND
其他 ^b	0.64	2.36	3.44	0.6
总量	98.0	95.9	97.2	99.4

[0281] ND=未检测到

[0282] ^a ACC合并血浆=转基因小鼠给药后从0至48小时、大鼠给药后0至168小时、猴子给药后从0至72小时以及人类受试者给药后从0至72小时的血浆¹⁴C浓度-时间曲线下的面

积。

[0283] ^b其他=其他代谢物的总和;小鼠中的每种成分<1%;大鼠、猴子和人中<1.5%。

[0284] ^c与M51共洗脱。

[0285] 所有参考文献,包括出版物、专利和专利文件,均通过引用并入本文,如同通过引用单独并入一样。本公开提供了对各种实施例和技术的引用。然而,应当理解,在不脱离本公开的精神和范围的情况下,可以进行许多变化和修改。

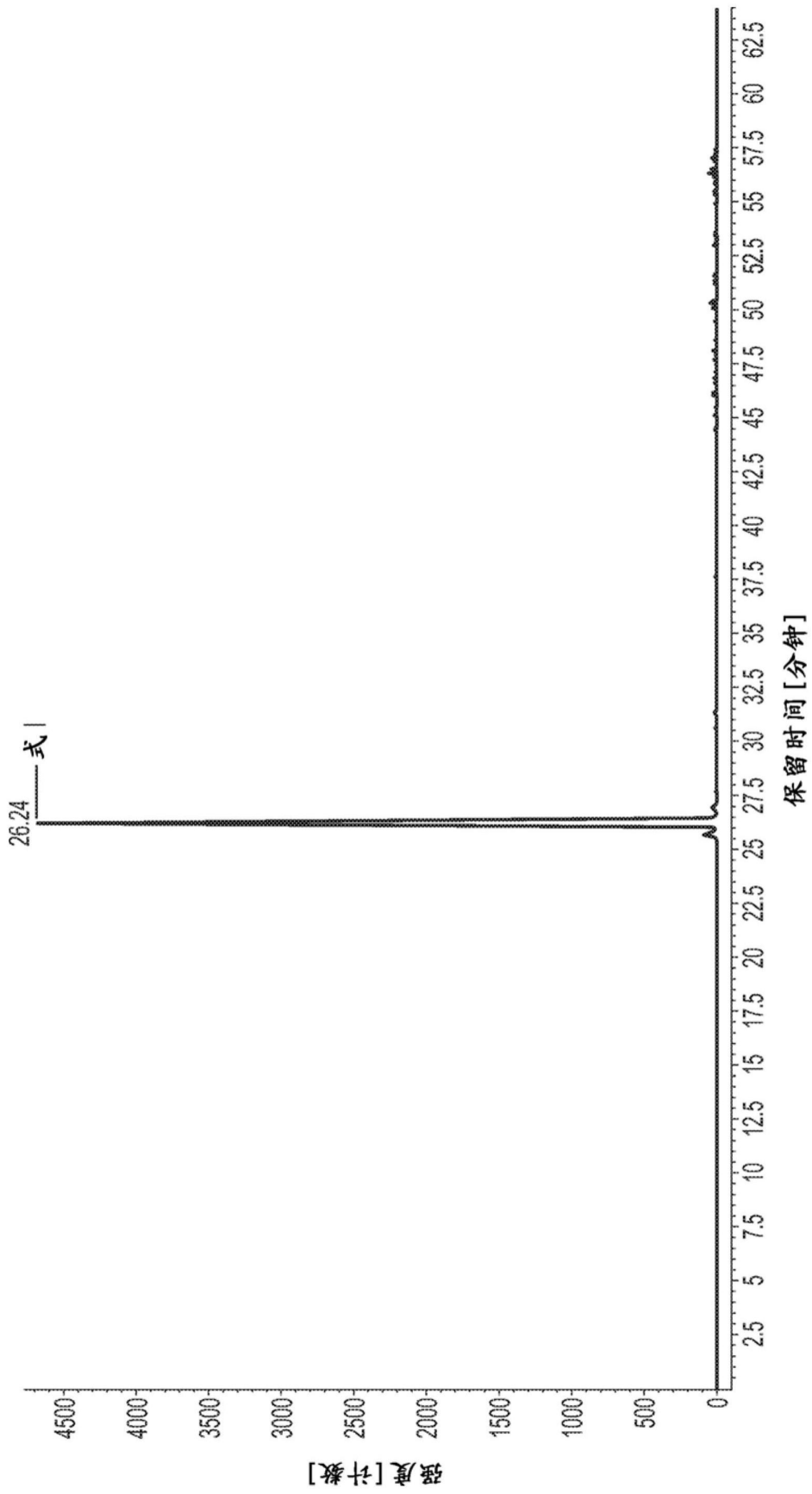


图2

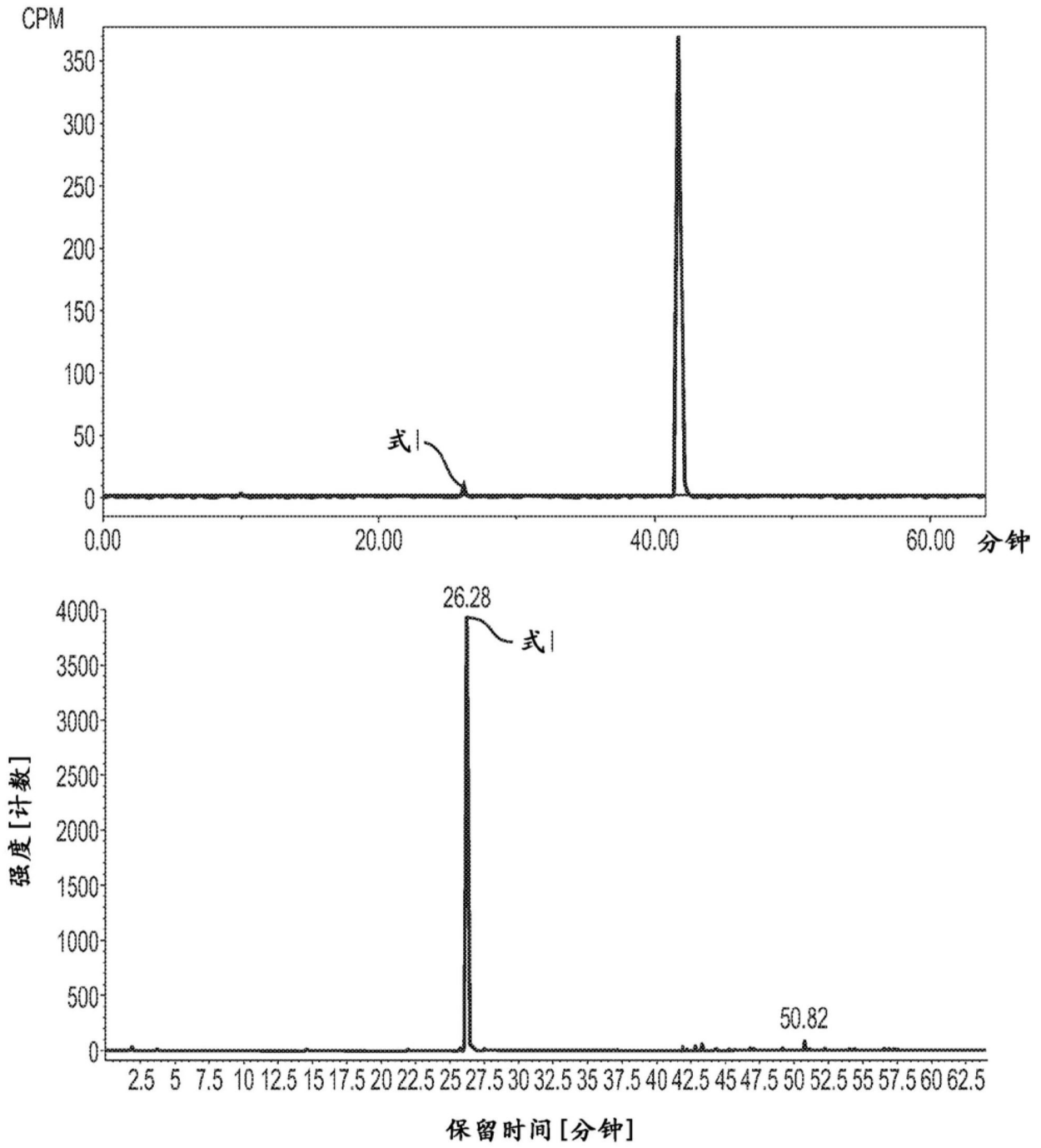


图3

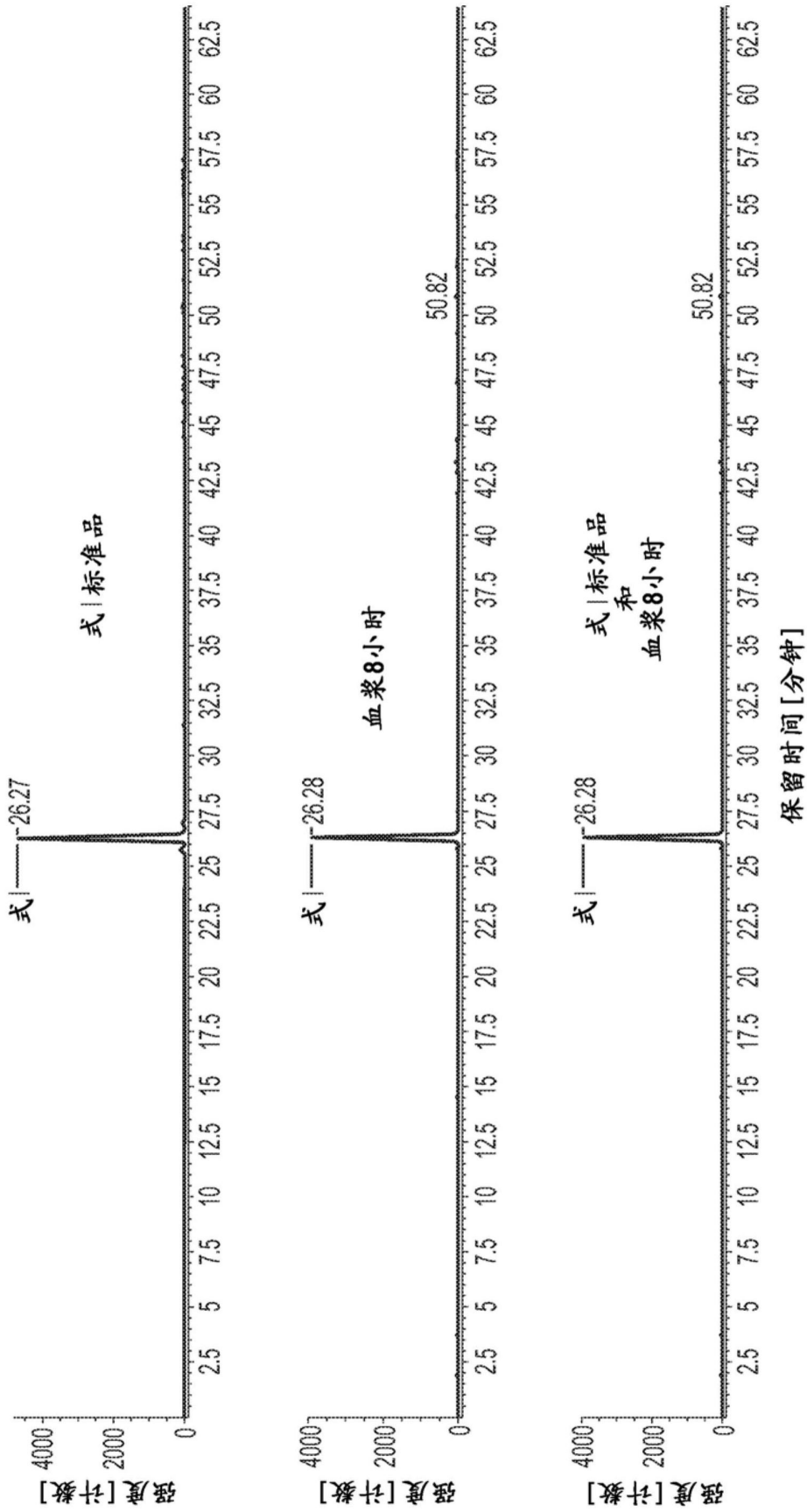


图4

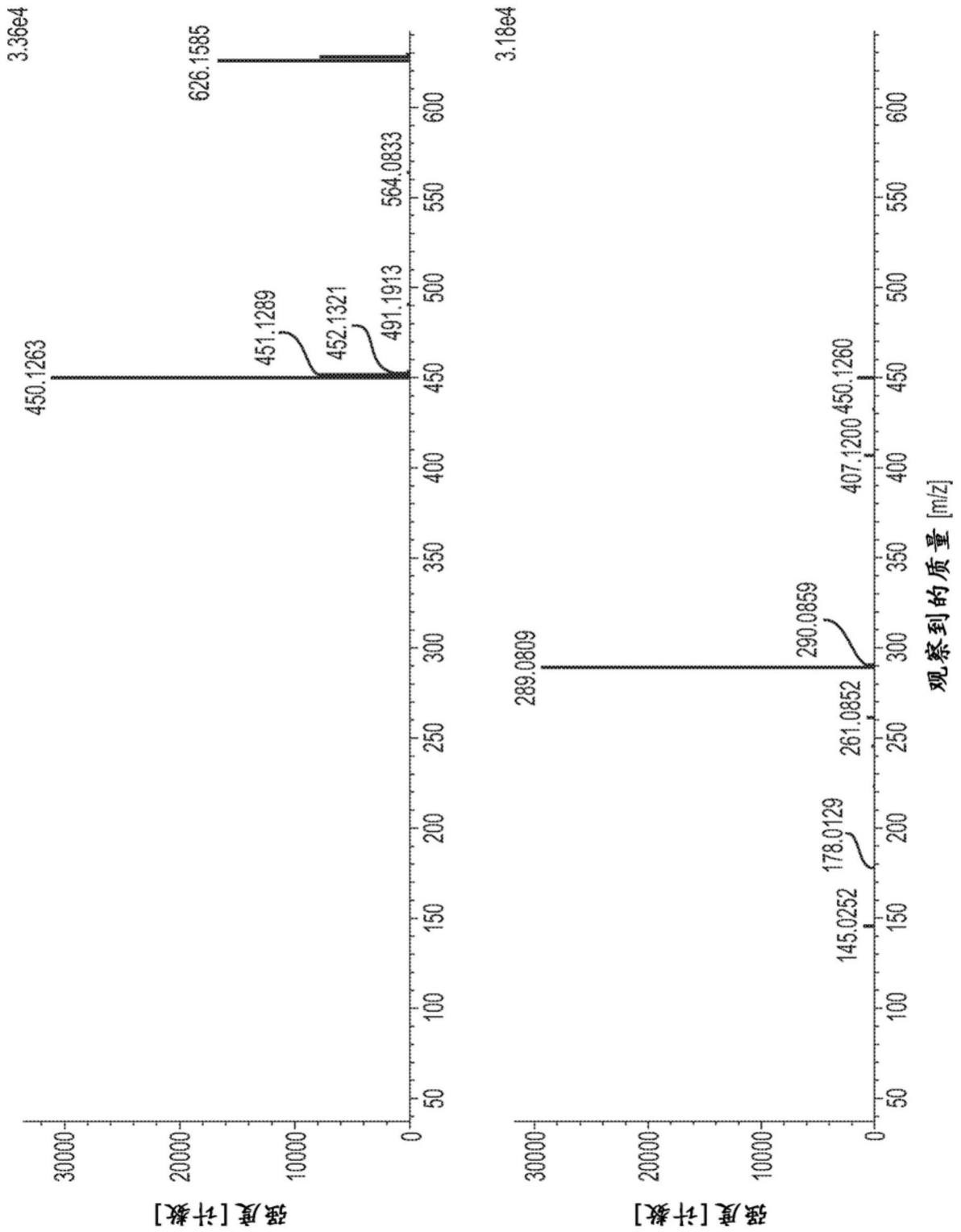


图5A

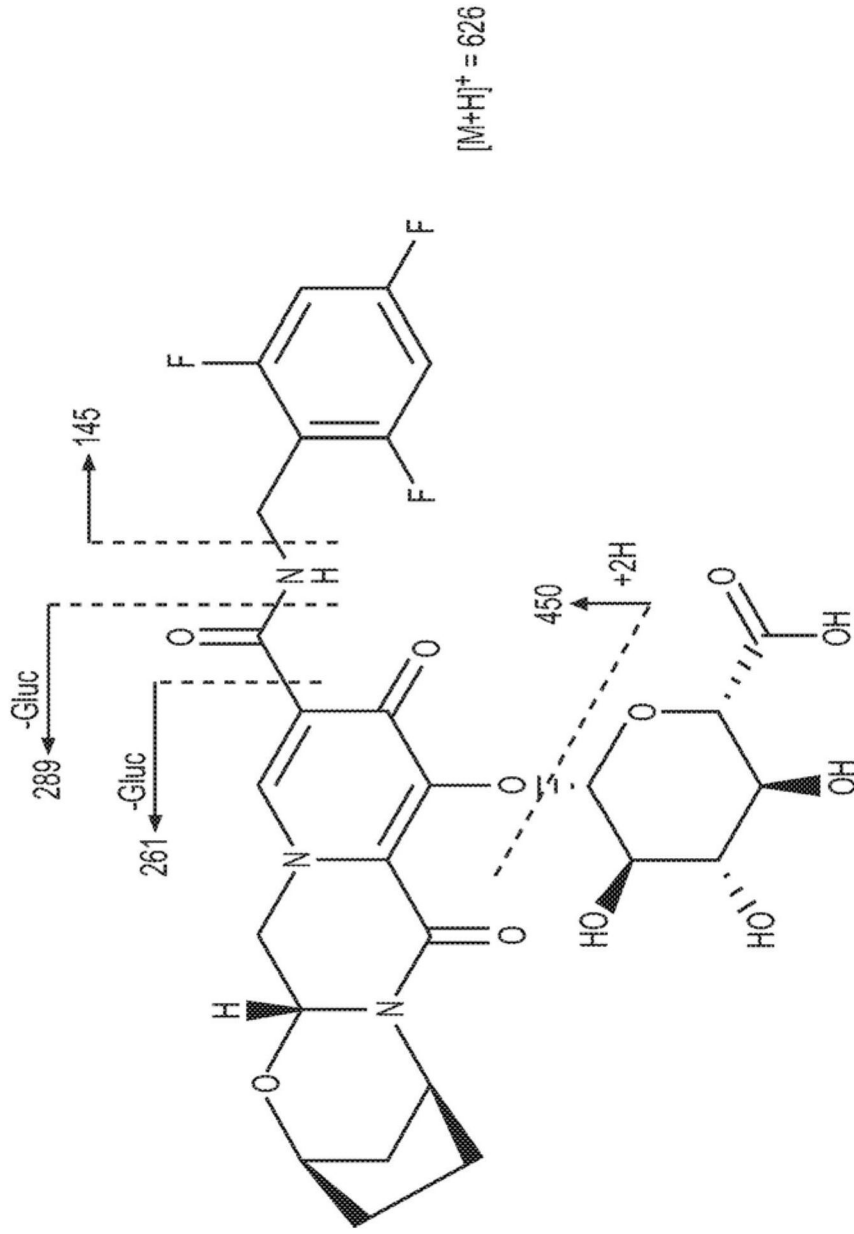


图5B

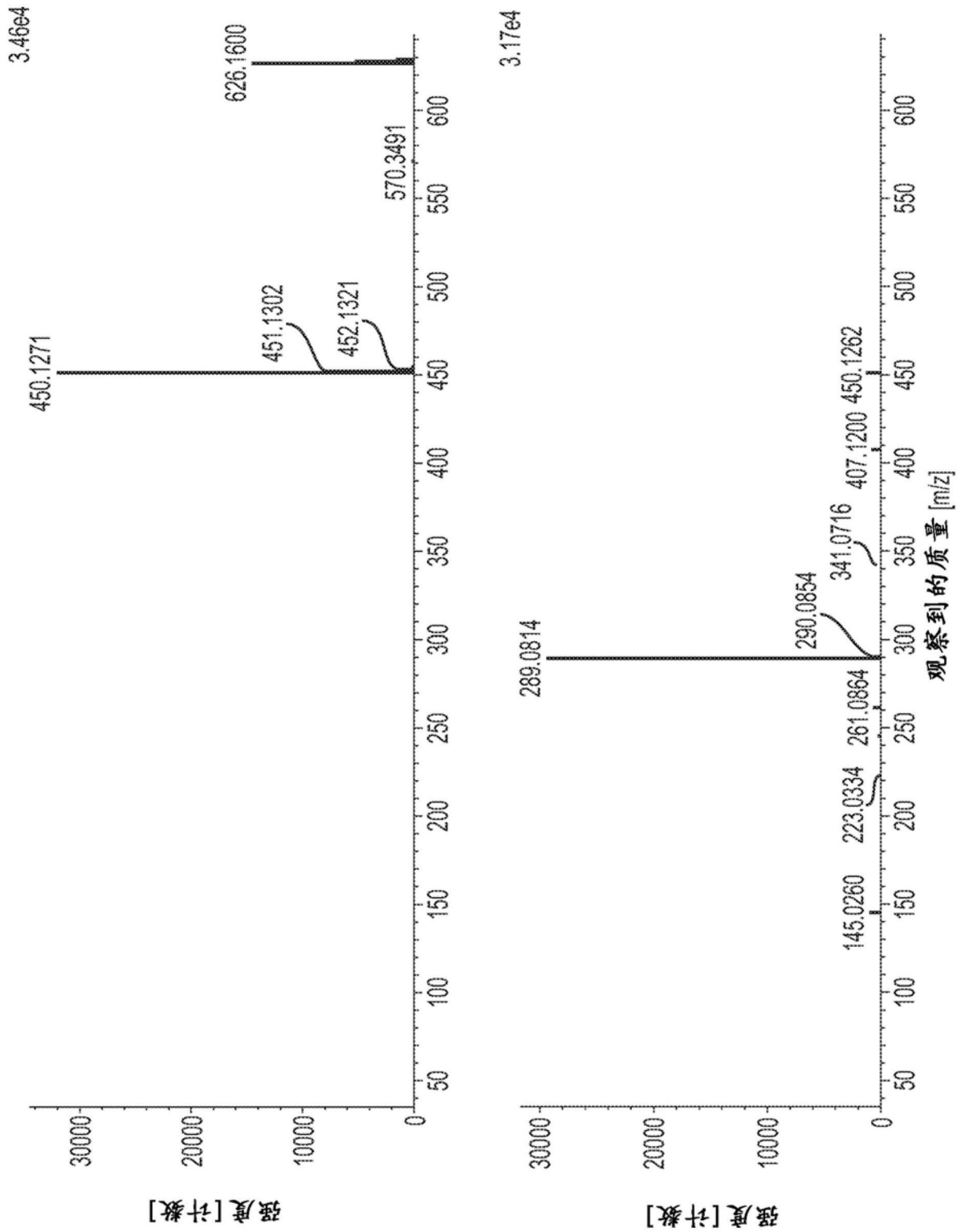


图6

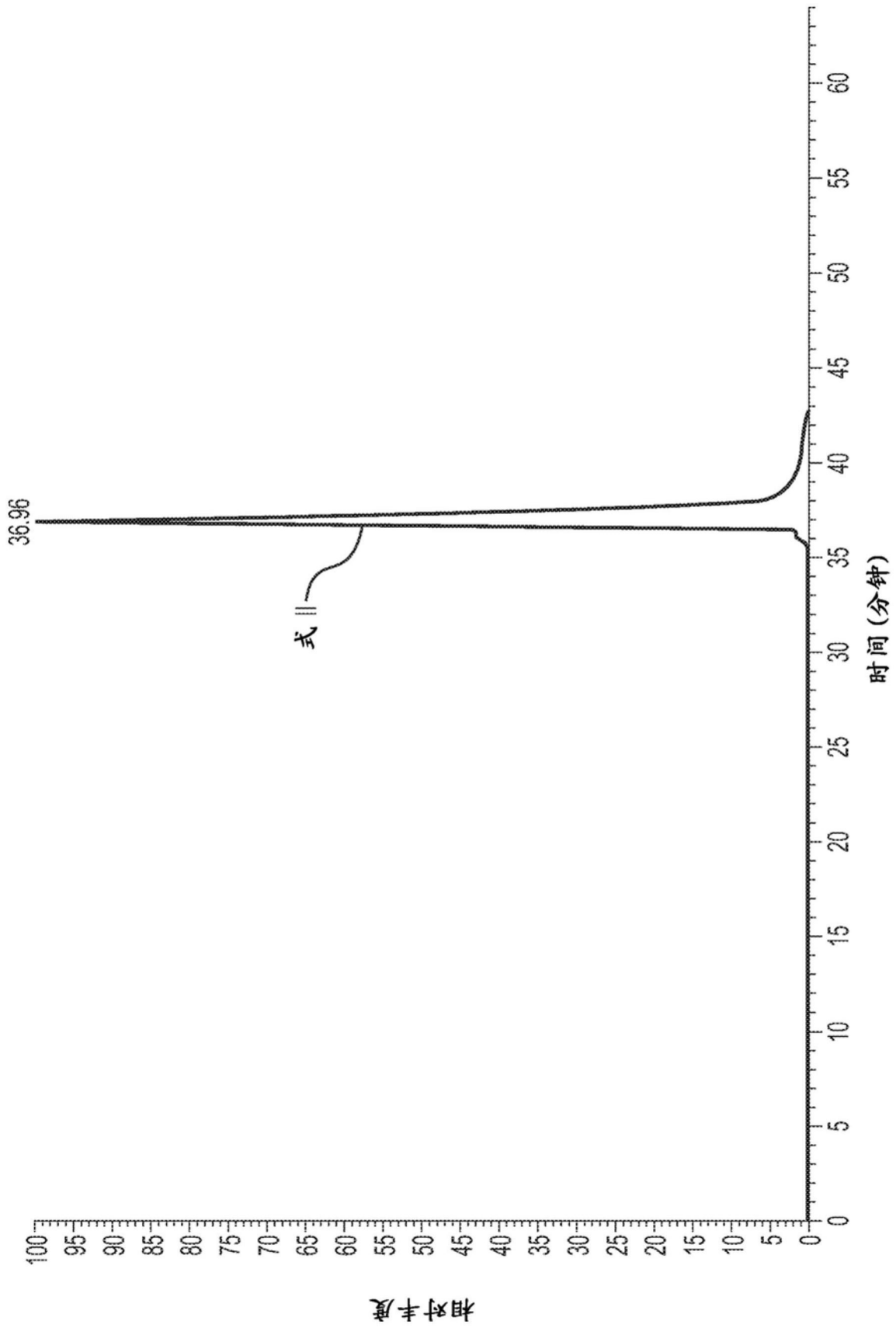


图7

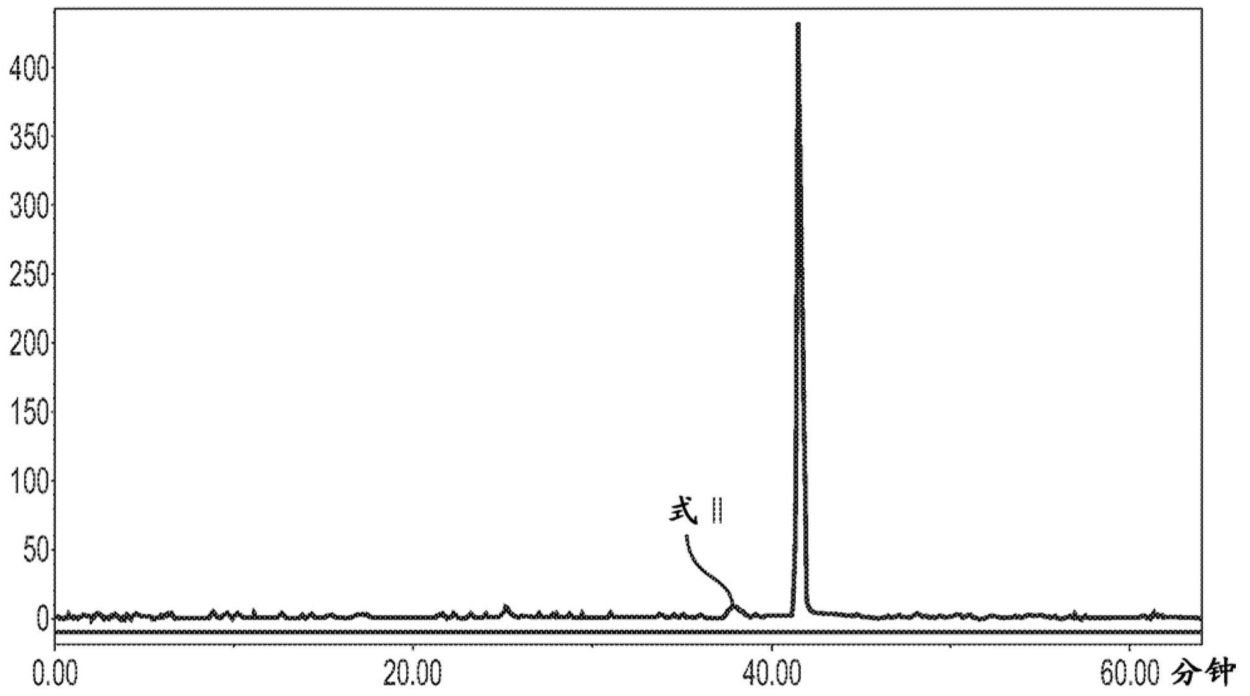
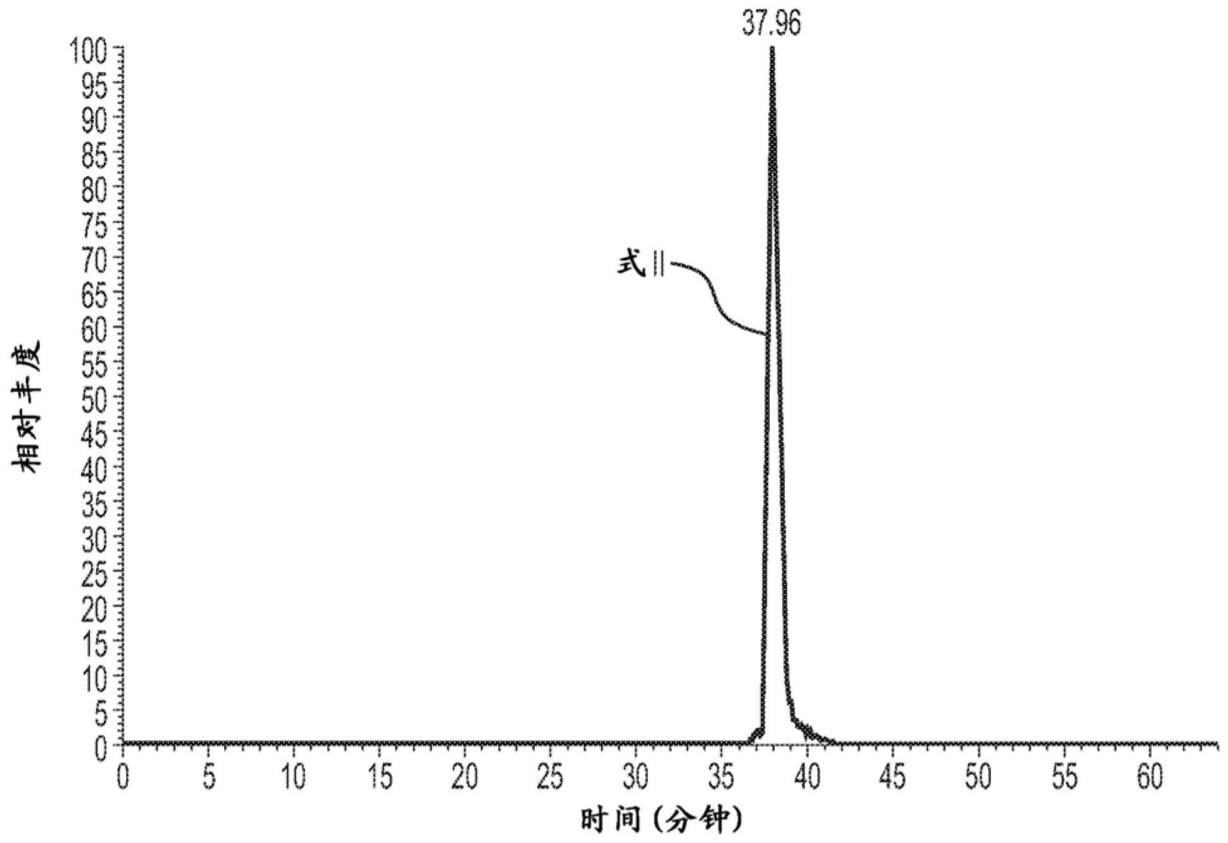


图8

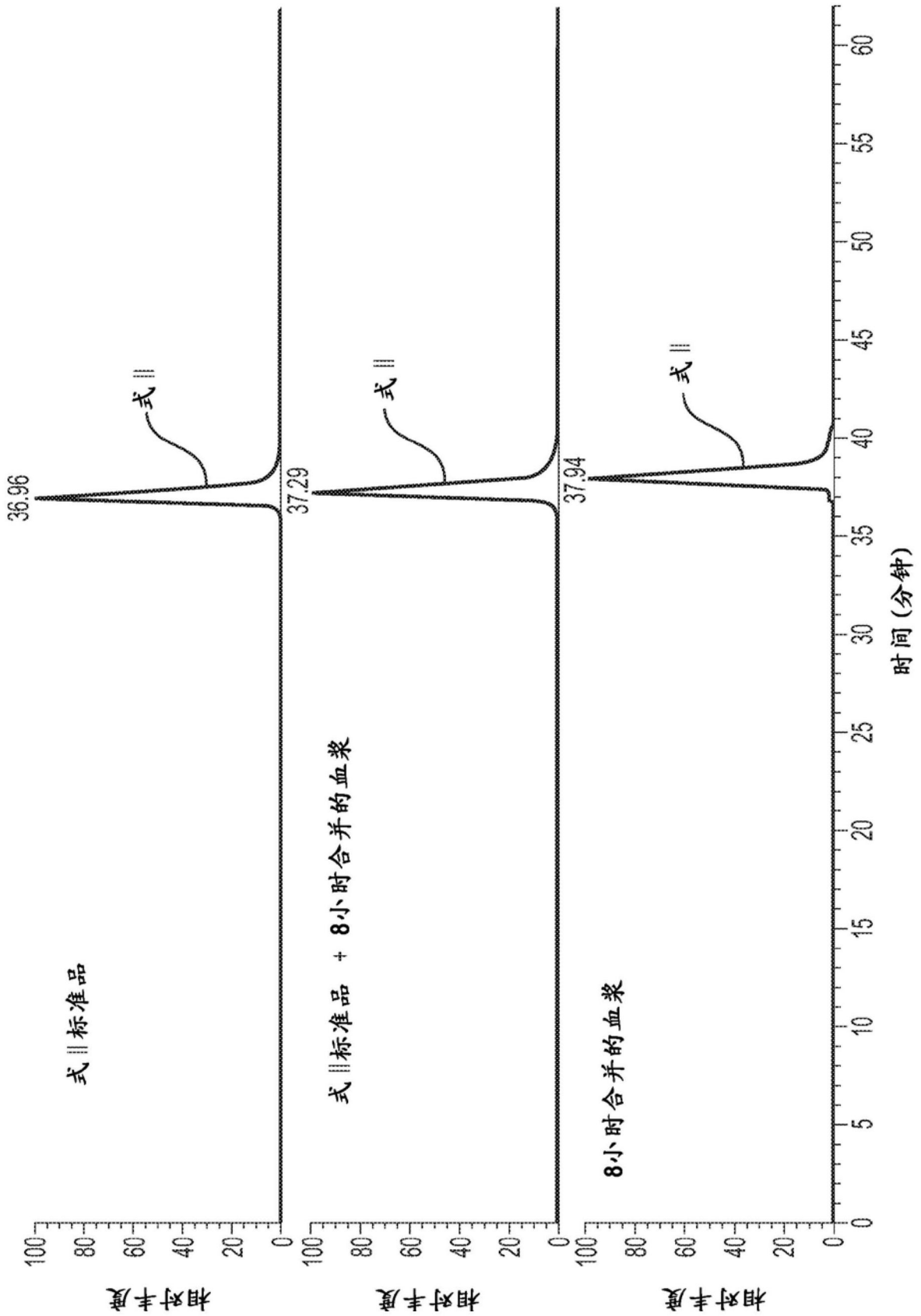


图9

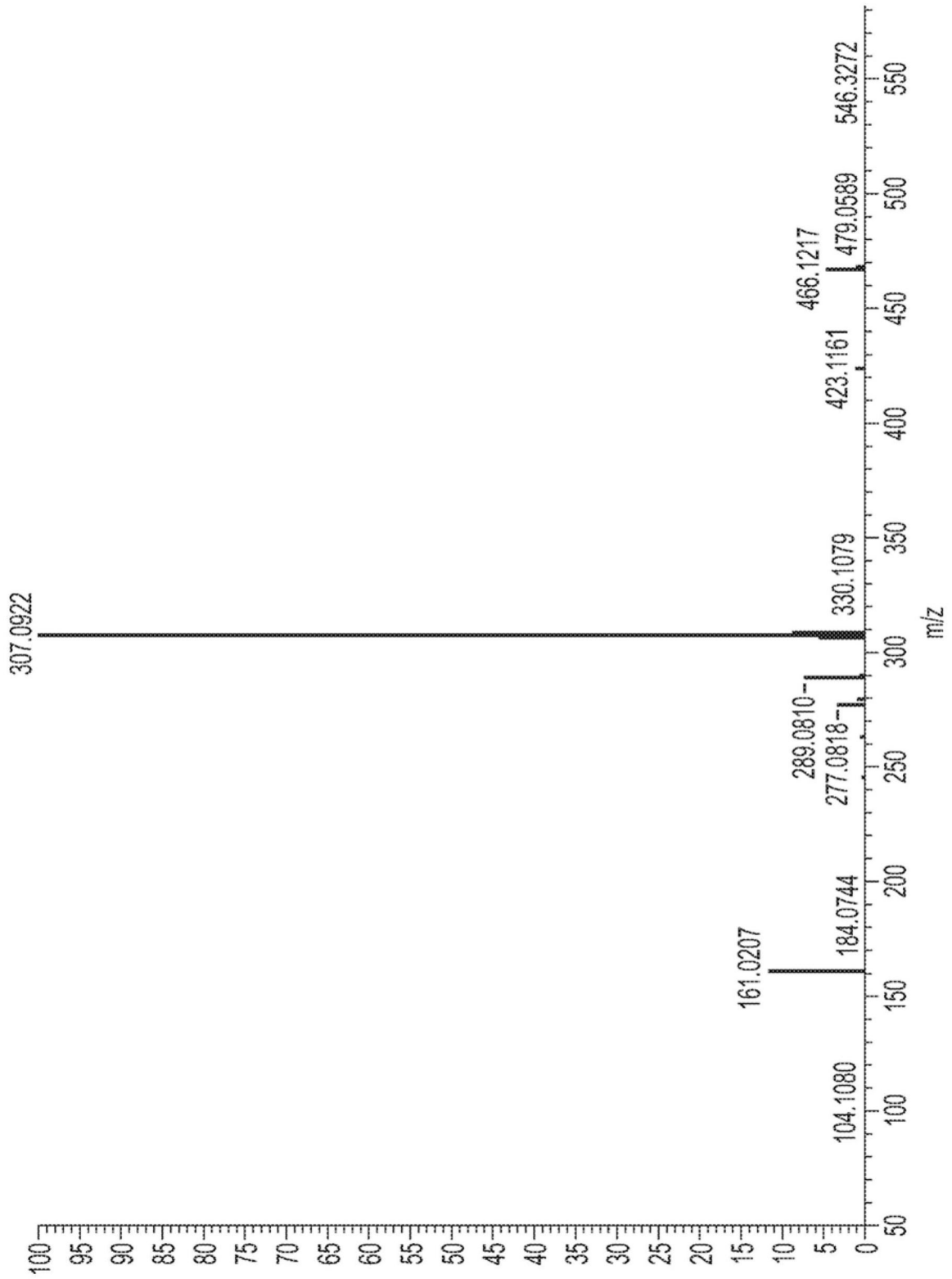


图10A

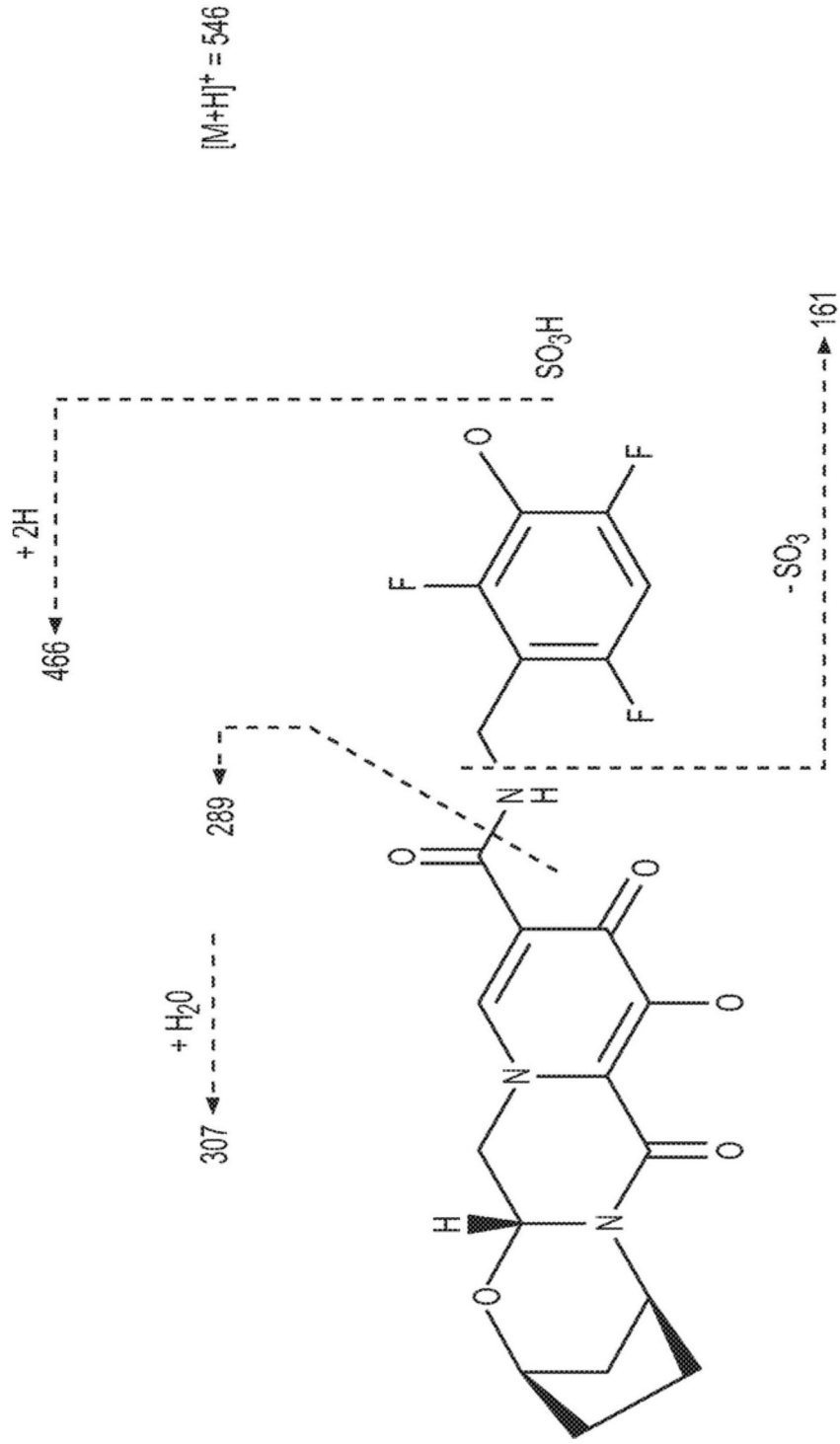


图10B

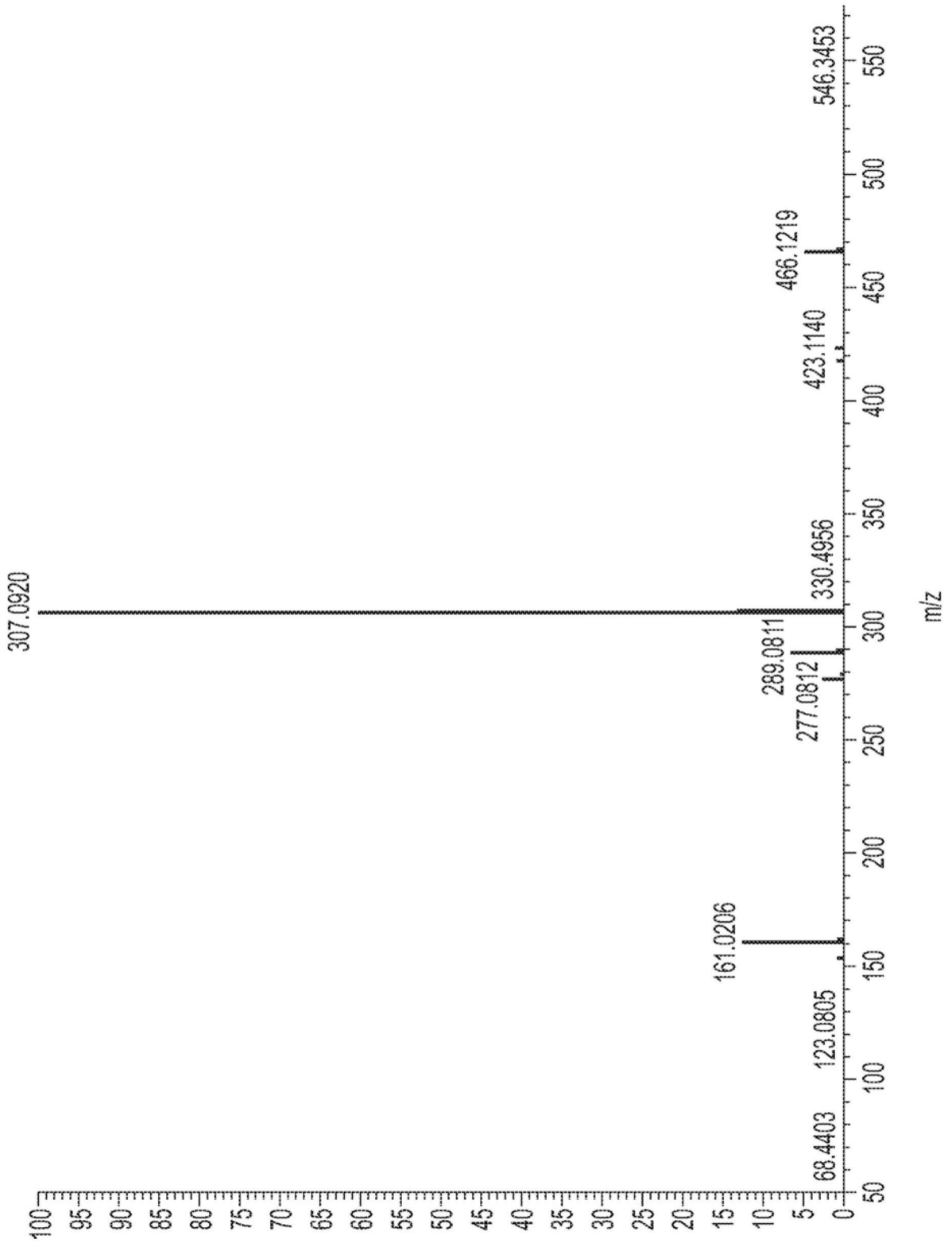
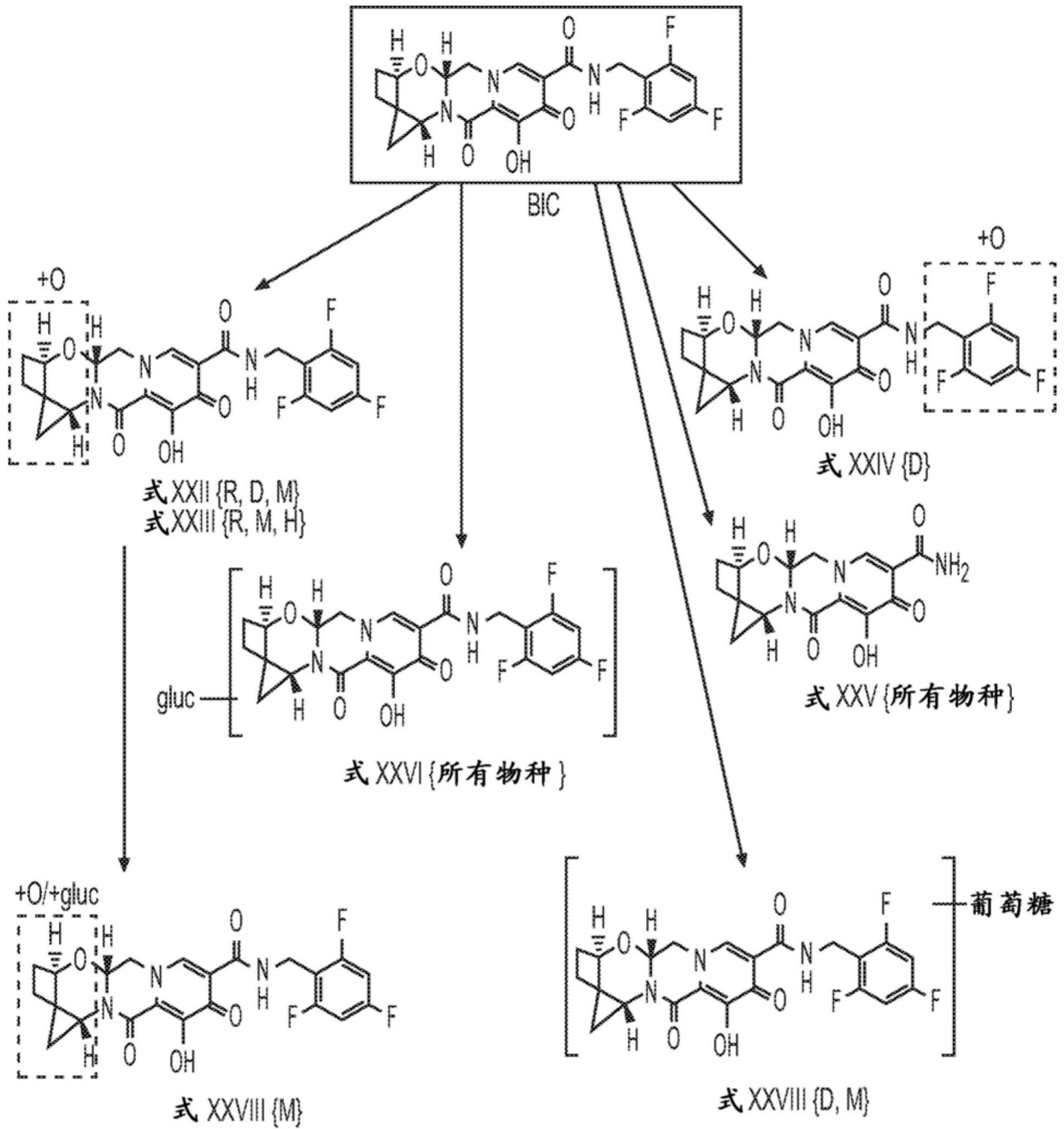


图11



R: 大鼠
 D: 狗
 M: 猴子
 H: 人
 Gluc: 葡萄糖苷酸缀合

图12