



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1972696 B

(45) 授权公告日 2010.08.11

(21) 申请号 200580021151.4 (51) Int. Cl.
A61K 31/70(2006.01)
C07H 19/00(2006.01)

(22) 申请日 2005.06.20

(30) 优先权数据
60/582,667 2004.06.24 US
60/619,746 2004.10.18 US

(85) PCT申请进入国家阶段日
2006.12.25

(86) PCT申请的申请数据
PCT/US2005/021684 2005.06.20

(87) PCT申请的公布数据
W02006/012078 EN 2006.02.02

(73) 专利权人 默沙东公司
地址 美国新泽西州

(72) 发明人 M·麦科斯 D·B·奥尔森

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001
代理人 邹锋 黄可峻

(56) 对比文件
US 6638919 B2, 2003.10.28, 说明书第 1 至 18 栏.
US 6475985 B1, 2002.11.05, 说明书图 1 至图 9.
US 6660721 B2, 2003.12.09, 说明书第 4 至第 12 栏.

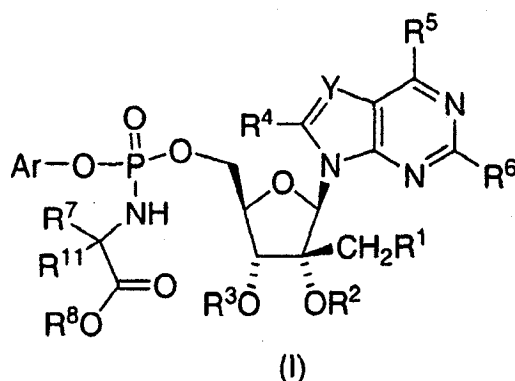
审查员 卢立明

权利要求书 2 页 说明书 23 页

(54) 发明名称
用于治疗 RNA 依赖性 RNA 病毒感染的核苷氨基磷酸芳基酯

(57) 摘要
本发明提供 RNA 依赖性 RNA 病毒聚合酶的抑制剂的前体——核苷氨基磷酸芳基酯。这些化合物是 RNA 依赖性 RNA 病毒复制抑制剂的前体,其用于治疗 RNA 依赖性 RNA 病毒感染。它们特别可用作丙型肝炎病毒 (HCV) NS5B 聚合酶的抑制剂的前体、HCV 复制的抑制剂的前体、和 / 或治疗丙型肝炎感染。本发明还描述了包含单独或与其它抗 RNA 依赖性 RNA 病毒感染 (特别是 HCV 感染) 的活性剂联合的所述核苷氨基磷酸芳基酯的药物组合物。还公开了使用本发明的核苷氨基磷酸芳基酯抑制 RNA 依赖性 RNA 聚合酶、抑制 RNA 依赖性 RNA 病毒复制,和 / 或治疗 RNA 依赖性 RNA 病毒感染的方法。

1. 结构式 I 的化合物：



或其药学上可接受的盐,其中

Y 是 N;

Ar 是未取代的或被 1~3 个独立选自下列组的取代基取代的苯基: 卤素、 C_{1-4} 烷基、 C_{1-4} 烷氧基、 C_{1-4} 烷硫基、氰基、硝基、氨基、羧基、三氟甲基、 C_{1-4} 烷基氨基、二(C_{1-4} 烷基)氨基、 C_{1-4} 烷基羰基、 C_{1-4} 烷基羰基氧基和 C_{1-4} 烷基氧基羰基;

R^1 是氢;

R^2 和 R^3 各自是氢;

R^4 是氢;

R^5 和 R^6 各自独立地选自氢、羟基、卤素、 C_{1-4} 烷氧基、氨基、 C_{1-4} 烷基氨基、二(C_{1-4} 烷基)氨基;

R^7 是氢或未取代的 C_{1-5} 烷基;

R^8 是氢或未取代的 C_{1-6} 烷基;和

R^{11} 是氢或甲基。

2. 根据权利要求 1 的化合物,其中 R^5 和 R^6 各自独立地选自氢、羟基和氨基。

3. 根据权利要求 2 的化合物,其中 R^5 是羟基或氨基, R^6 是氢或氨基。

4. 根据权利要求 1 的化合物,其中 Ar 是未取代的苯基。

5. 根据权利要求 1 的化合物,其中 R^{11} 是氢, R^7 选自氢、甲基、乙基、正丙基、异丙基、异丁基和 2-甲基-1-丙基。

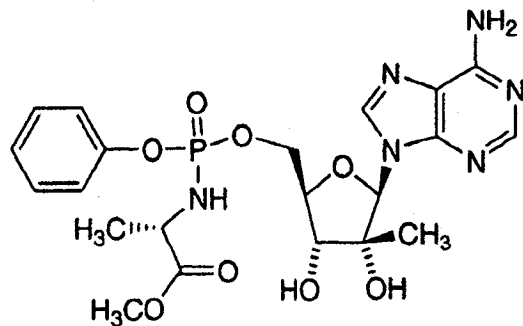
6. 根据权利要求 5 的化合物,其中 R^7 是甲基。

7. 根据权利要求 1 的化合物,其中 R^8 是 C_{1-6} 烷基。

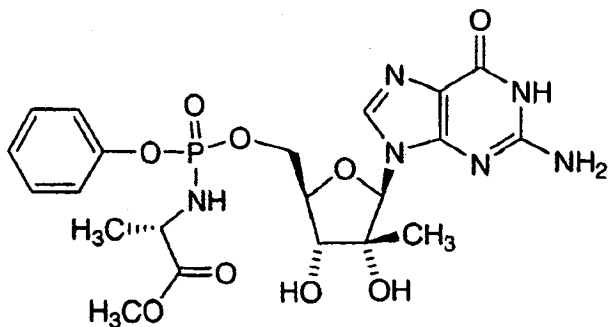
8. 根据权利要求 7 的化合物,其中 R^8 是甲基。

9. 根据权利要求 1 的化合物,其中 Ar 是未取代的苯基, R^7 是甲基, R^8 是甲基, R^{11} 是氢。

10. 根据权利要求 9 的化合物,其选自:



和



;

或其药学上可接受的盐。

11. 一种药物组合物,其包含权利要求 1 的化合物和药学上可接受的载体。

12. 权利要求 1 的化合物在制备用于在哺乳动物中治疗丙型肝炎病毒感染的药物中的用途。

用于治疗 RNA 依赖性 RNA 病毒感染的核苷氨基磷酸芳基酯

技术领域

[0001] 本发明涉及核苷氨基磷酸芳基酯、其合成法以及作为 RNA 依赖性 RNA 病毒聚合酶的抑制剂的前体的用途。本发明的化合物是 RNA 依赖性 RNA 病毒复制抑制剂的前体,并且用于治疗 RNA 依赖性 RNA 病毒感染。它们特别可用作丙型肝炎病毒 (HCV) NS5B 聚合酶的抑制剂的前体、HCV 复制抑制剂的前体、以及用于治疗丙型肝炎感染。

[0002] 发明背景

[0003] 丙型肝炎病毒 (HCV) 感染是引起慢性肝病 (例如肝硬化和肝细胞癌) 的一个主要健康问题,受感染者的人数估计占世界人口的 2 ~ 15%。根据美国疾病控制中心报道,在美国估计有 4.5 百万人感染。根据世界卫生组织报道,全世界有超过 2 亿的感染人群,且每年至少有 3 ~ 4 百万人感染。一旦感染,约 20% 的人清除病毒,但在其余的受感染者中, HCV 却存留一生。10 ~ 20% 的长期被感染者最后发展为肝脏损伤性的肝硬化或癌症。该病毒性疾病通过受污染的血液和血液制品、受污染的针而经肠胃外传播,或者通过受感染母体或母体携带者的通过性途径或垂直途径传染给后代。目前对于 HCV 感染的治疗方法仅限于单独使用或与核苷类似物病毒唑联合使用重组干扰素 - α , 它们的临床效果都是有限的。此外,对于 HCV 还没有已建定的疫苗。因此,急需有效抵抗慢性 HCV 感染的改良治疗剂。有关 HCV 感染的治疗技术的现状的综述参阅: B. Dymock 等“Novel approaches to the treatment of hepatitis C virus infection,” Antiviral Chemistry & Chemotherapy, 11: 79-96 (2000); H. Rosen 等“Hepatitis C virus: current understanding and prospects for future therapies,” Molecular Medicine Today, 5: 393-399 (1999); D. Moradpour 等, “Current and evolving therapies for hepatitis C,” European J. Gastroenterol. Hepatol., 11: 1189-1202 (1999); R. Bartenschlager, “Candidate Targets for Hepatitis C Virus-Specific Antiviral Therapy,” Intervirology, 40: 378-393 (1997); G. M. Lauer 和 B. D. Walker, “Hepatitis C Virus Infection,” N. Engl. J. Med., 345: 41-52 (2001); B. W. Dymock, “Emerging therapies for hepatitis C virus infection,” Emerging Drugs, 6: 13-42 (2001); 和 C. Crabb, “Hard-Won Advances Spark Excitement about Hepatitis C,” Science: 506-507 (2001); 其全部内容在此引为参考。

[0004] 目前已经采取了不同的 HCV 治疗方法,包括抑制病毒性丝氨酸蛋白酶 (NS3 蛋白酶)、解旋酶和 RNA 依赖性 RNA 聚合酶 (NS5B), 以及开发疫苗。

[0005] HCV 病毒是一种具备约 9600 碱基的单个寡核糖核苷酸基因组序列 (其编码约 3010 个氨基酸的多蛋白) 的有包膜的正链 RNA 病毒。HCV 基因的蛋白质产物由结构性蛋白质 C、E1 和 E2, 以及非结构性蛋白质 NS2、NS3、NS4A 和 NS4B 以及 NS5A 和 NS5B 组成。据信非结构性 (NS) 蛋白为病毒复制提供了催化机构。NS3 蛋白酶从多蛋白链释放 NS5B, RNA 依赖性 RNA 聚合酶。HCV NS5B 聚合酶是从单链病毒 RNA (其作为 HCV 复制循环的模板) 合成双链 RNA 所需要的。因此, NS5B 聚合酶被认为是 HCV 复制复合体中的必要成分 [参阅 K. Ishi 等“Expression of Hepatitis C Virus NS5B Protein: Characterization of Its RNAPolymerase Activity and RNA Binding,” Hepatology. 29: 1227-1235 (1999)

和 V.Lohmann 等“Biochemical and Kinetic Analyses of NS5B RNA-Dependent RNA Polymerase of the Hepatitis C Virus, ” Virology, 249 :108-118(1998)]. 因此, HCV NS5B 聚合酶的抑制阻止了双链 HCV RNA 的形成, 并因此构成了一诱人的开发 HCV 特异性抗病毒疗法的方法。

[0006] 有关具有治疗 HCV 感染的潜在作用的 HCV NS5B 聚合酶的抑制剂的开发的综述参阅 M.P.walker 等“Promising candidates for the treatment of chronic hepatitis C, ” Expert Opin.Invest.Drugs. 12 :1269-1280(2003) 和 P.Hoffmann 等“Recent patents on experimental therapy for hepatitis C virus infection(1999-2002),” Expert Opin.Ther.Patents. ” “13 :1707-1723(2003)。在 A.E.Eldrup 等“Structure-Activity Relationship of Purine Ribonucleosides for Inhibition of HCV RNA-Dependent RNA Polymerase, ” J. Med. Chem. , 47 :2283-2295(2004) 中报道了嘌呤核糖核苷抗 HCV 聚合酶的活性。仍然需要在结构上不同的核苷衍生物, 作为 HCV 聚合酶抑制剂用于 HCV 治疗的治疗性疗法。

[0007] 现已发现本发明的核苷氨基磷酸芳基酯是 RNA 依赖性 RNA 病毒复制 (特别是 HCV 复制) 的有效的抑制剂的前体。所述氨基磷酸酯在体内转化为其核苷 5'-磷酸 (核苷酸) 衍生物, 后者转化为相应的核苷 5'-三磷酸衍生物——RNA 依赖性 RNA 病毒聚合酶 (特别是 HCV NS5B 聚合酶) 的抑制剂。本发明的核苷氨基磷酸酯可以用于治疗 RNA 依赖性 RNA 病毒感染 (特别是 HCV 感染)。

[0008] 因此, 本发明的另一个目的在于提供核苷氨基磷酸芳基酯, 其被用作 RNA 依赖性 RNA 病毒聚合酶的抑制剂的前体, 特别用作 HCV NS5B 聚合酶的抑制剂的前体。

[0009] 本发明的另一个目的在于提供核苷氨基磷酸芳基酯, 其被用作 RNA 依赖性 RNA 病毒复制抑制剂的前体, 特别用作丙型肝炎病毒复制抑制剂的前体。

[0010] 本发明的另一个目的在于提供核苷氨基磷酸芳基酯, 其被用于治疗 RNA 依赖性 RNA 病毒感染, 特别是用于治疗 HCV 感染。

[0011] 本发明的另一个目的在于提供药物组合物, 其包含本发明的核苷氨基磷酸芳基酯和药学上可接受的载体。

[0012] 本发明的另一个目的在于提供包含本发明的核苷氨基磷酸芳基酯用作 RNA 依赖性 RNA 病毒聚合酶抑制剂的前体、特别是作为 HCV NS5B 聚合酶抑制剂的前体的药物组合物。

[0013] 本发明的另一个目的在于提供包含本发明的核苷氨基磷酸芳基酯用作 RNA 依赖性 RNA 病毒复制抑制剂的前体、特别是作为 HCV 复制抑制剂的前体的药物组合物。

[0014] 本发明的另一个目的在于提供包含本发明的核苷氨基磷酸芳基酯用于治疗 RNA 依赖性 RNA 病毒感染、特别是用于 HCV 感染的药物组合物。

[0015] 本发明的另一个目的在于提供包含与其它抗 RNA 依赖性 RNA 病毒 (特别是 HCV) 的活性剂联合的本发明核苷氨基磷酸芳基酯的药物组合物。

[0016] 本发明的另一个目的在于提供抑制 RNA 依赖性 RNA 病毒聚合酶, 特别是抑制 HCV NS5B 聚合酶的方法。

[0017] 本发明的另一个目的在于提供抑制 RNA 依赖性 RNA 病毒复制, 特别是抑制 HCV 复制的方法。

[0018] 本发明的另一个目的在于提供治疗 RNA 依赖性 RNA 病毒感染, 特别是治疗 HCV 感

染的方法。

[0019] 本发明的另一个目的在于提供与其他抗 RNA 依赖性 RNA 病毒的活性剂联合治疗 RNA 依赖性 RNA 病毒感染的方法,特别是与其他抗 HCV 活性剂联合治疗 HCV 感染的方法。

[0020] 本发明的另一个目的在于提供核苷氨基磷酸芳基酯及其药物组合物作为药物用于抑制 RNA 依赖性 RNA 病毒复制和 / 或治疗 RNA 依赖性 RNA 病毒感染,特别是用于抑制 HCV 复制和 / 或治疗 HCV 感染。

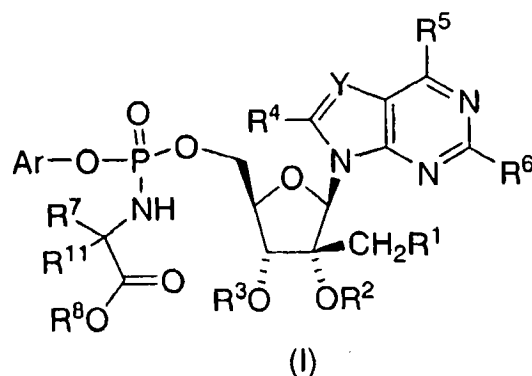
[0021] 本发明的另一个目的在于提供本发明的核苷氨基磷酸芳基酯及其药物组合物在制造用于抑制 RNA 依赖性 RNA 病毒复制和 / 或治疗 RNA 依赖性 RNA 病毒感染,特别是用于抑制 HCV 复制和 / 或治疗 HCV 感染的药物中的用途。

[0022] 从下述详细说明中,上述及其他目的将变得显而易见。

[0023] 发明概述

[0024] 本发明涉及下面立体化学构型表示的结构式 I 的化合物:

[0025]



[0026] 或其药学上可接受的盐,其中

[0027] Y 是 CR⁹ 或 N;

[0028] Ar 是未取代的或被 1 ~ 3 个独立选自下列组的取代基取代的苯基:卤素、C₁₋₄ 烷基、C₁₋₄ 烷氧基、C₁₋₄ 烷硫基、氰基、硝基、氨基、羧基、三氟甲基、C₁₋₄ 烷基氨基、二(C₁₋₄ 烷基)氨基、C₁₋₄ 烷基羰基、C₁₋₄ 烷基羰基氧基和 C₁₋₄ 烷基氧基羰基;

[0029] R¹ 选自氢、氟、叠氮基、氨基、羟基、C₁₋₃ 烷氧基、巯基和 C₁₋₃ 烷硫基;

[0030] R² 和 R³ 独立地选自氢、甲基、C₁₋₁₆ 烷基羰基、C₂₋₁₈ 烯基羰基、C₁₋₁₀ 烷基氧基羰基、C₃₋₆ 环烷基羰基、C₃₋₆ 环烷基氧基羰基;

[0031] R⁴ 是氢、卤素、甲基、叠氮基或氨基;

[0032] R⁵ 和 R⁶ 独立地选自氢、羟基、卤素、C₁₋₄ 烷氧基、氨基、C₁₋₄ 烷基氨基、二(C₁₋₄ 烷基)氨基、C₃₋₆ 环烷基氨基、二(C₃₋₆ 环烷基)氨基、苄基氨基、二苄基氨基或 C₄₋₆ 杂环烷基,其中烷基、环烷基、苄基和杂环烷基是未取代的或被 1 ~ 5 个独立选自卤素、羟基、氨基、C₁₋₄ 烷基和 C₁₋₄ 烷氧基的基团取代;

[0033] R⁷ 是氢、C₁₋₅ 烷基、苯基或苄基;

[0034] 其中烷基是未取代的或被一个选自羟基、甲氧基、氨基、羧基、氨基甲酰基、胍基、巯基、甲硫基、1H-咪唑基和 1H-吡啶-3-基的取代基取代;其中苯基和苄基是未取代的或被 1 ~ 2 个独立选自卤素、羟基和甲氧基的取代基取代;

[0035] R⁸ 是氢、C₁₋₆ 烷基、C₃₋₆ 环烷基、苯基或苄基;

[0036] 其中烷基和环烷基是未取代的或被 1~3 个独立选自卤素、羟基、羧基、 C_{1-4} 烷氧基的取代基取代；其中苯基和苄基是未取代的或被 1~3 个独立选自卤素、羟基、氰基、 C_{1-4} 烷氧基和三氟甲基的取代基取代；

[0037] R^9 选自氢、氟、氰基、 C_{1-3} 烷基、 $NHCONH_2$ 、 $CONR^{10}R^{10}$ 、 $CSNR^{10}R^{10}$ 、 $COOR^{10}$ 、 $C(=NH)NH_2$ 、羟基、 C_{1-3} 烷氧基、氨基、 C_{1-4} 烷基氨基和二 (C_{1-4} 烷基) 氨基；

[0038] 每个 R^{10} 独立表示氢或 C_{1-6} 烷基；

[0039] R^{11} 是氢或甲基。

[0040] 式 I 的化合物可以用作 RNA 依赖性 RNA 病毒聚合酶（特别是 HCVNS5B 聚合酶）的抑制剂的前体。其还是 RNA 依赖性 RNA 病毒复制（特别是 HCV 复制）抑制剂的前体，并用于治疗 RNA 依赖性 RNA 病毒感染（特别是治疗 HCV 感染）。

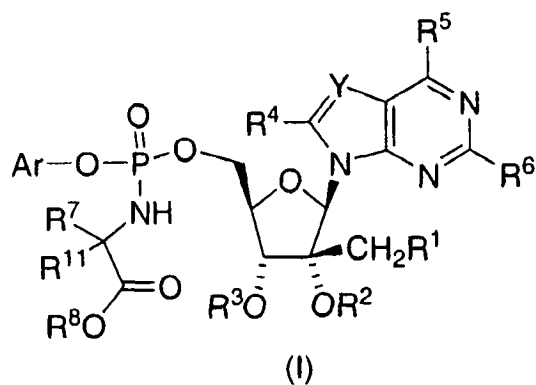
[0041] 本发明的氨基磷酸芳基酯是作为相应的核苷 5' - 单磷酸酯的前药进行作用的，对于其作用机制没有限制。内源性激酶将 5' - 单磷酸酯转变成其 5' - 三磷酸酯衍生物——RNA 依赖性 RNA 病毒聚合酶的抑制剂。因此，氨基磷酸芳基酯比核苷本身具有更有效的靶细胞渗透，可能对代谢降解的敏感性更小，并能够靶向特定组织（例如肝脏），从而在较低的抗病毒试剂总剂量下得到更广泛的治疗指数。

[0042] 本发明还包括包含单独或与其他抗 RNA 依赖性 RNA 病毒（特别是抗 HCV）的活性剂组合的该化合物的药物组合物、以及抑制 RNA 依赖性 RNA 病毒复制和治疗 RNA 依赖性 RNA 病毒感染的方法。

[0043] 发明的详细说明

[0044] 本发明涉及下面立体化学构型表示的结构式 I 的化合物：

[0045]



[0046] 或其药学上可接受的盐，其中

[0047] Y 是 CR^9 或 N；

[0048] Ar 是未取代的或被 1~3 个独立选自下列组的取代基取代的苯基：卤素、 C_{1-4} 烷基、 C_{1-4} 烷氧基、 C_{1-4} 烷硫基、氰基、硝基、氨基、羧基、三氟甲基、 C_{1-4} 烷基氨基、二 (C_{1-4} 烷基) 氨基、 C_{1-4} 烷基羰基、 C_{1-4} 烷基羰基氧基和 C_{1-4} 烷基氧基羰基；

[0049] R^1 选自氢、氟、叠氨基、氨基、羟基、 C_{1-3} 烷氧基、巯基和 C_{1-3} 烷硫基；

[0050] R^2 和 R^3 独立地选自氢、甲基、 C_{1-16} 烷基羰基、 C_{2-18} 烯基羰基、 C_{1-10} 烷基氧基羰基、 C_{3-6} 环烷基羰基、 C_{3-6} 环烷基氧基羰基；

[0051] R^4 是氢、卤素、甲基、叠氨基或氨基；

[0052] R^5 和 R^6 各自独立地选自氢、羟基、卤素、 C_{1-4} 烷氧基、氨基、 C_{1-4} 烷基氨基、二 (C_{1-4} 烷

基)氨基、 C_{3-6} 环烷基氨基、二(C_{3-6} 环烷基)氨基、苄基氨基、二苄基氨基或 C_{4-6} 杂环烷基,其中烷基、环烷基、苄基和杂环烷基是未取代的或被1~5个独立选自卤素、羟基、氨基、 C_{1-4} 烷基和 C_{1-4} 烷氧基的基团取代;

[0053] R^7 是氢、 C_{1-5} 烷基、苯基或苄基;

[0054] 其中烷基是未取代的或被一个选自羟基、甲氧基、氨基、羧基、氨基甲酰基、胍基、巯基、甲硫基、1H-咪唑基和1H-吡啶-3-基的取代基取代;其中苯基和苄基是未取代的或被1~2个独立选自卤素、羟基和甲氧基的取代基取代;

[0055] R^8 是氢、 C_{1-6} 烷基、 C_{3-6} 环烷基、苯基或苄基;

[0056] 其中烷基和环烷基是未取代的或被1~3个独立选自卤素、羟基、羧基、 C_{1-4} 烷氧基的取代基取代;其中苯基和苄基是未取代的或被1~3个独立选自卤素、羟基、氰基、 C_{1-4} 烷氧基和三氟甲基的取代基取代;

[0057] R^9 选自氢、氟、氰基、 C_{1-3} 烷基、 $NHCONH_2$ 、 $CONR^{10}R^{10}$ 、 $CSNR^{10}R^{10}$ 、 $COOR^{10}$ 、 $C(=NH)NH_2$ 、羟基、 C_{1-3} 烷氧基、氨基、 C_{1-4} 烷基氨基和二(C_{1-4} 烷基)氨基;

[0058] 每个 R^{10} 独立表示氢或 C_{1-6} 烷基;

[0059] R^{11} 是氢或甲基。

[0060] 式I的化合物可以用作RNA依赖性RNA病毒聚合酶的抑制剂的前体。其还是RNA依赖性RNA病毒复制抑制剂的前体,并可用于治疗RNA依赖性RNA病毒感染。

[0061] 在本发明化合物的一个实施方式中,Y是N, R^1 是氢或氟,且 R^2 和 R^3 是氢。在该类实施方式中 R^4 是氢。

[0062] 在本发明化合物的第二个实施方式中,Y是 CR^9 , R^1 是氢或氟,且 R^2 和 R^3 是氢。在该类实施方式中 R^9 是氢或氟,在该类的子类中, R^4 是氢。

[0063] 在本发明化合物的第三个实施方式中,Ar是未取代的苯基。

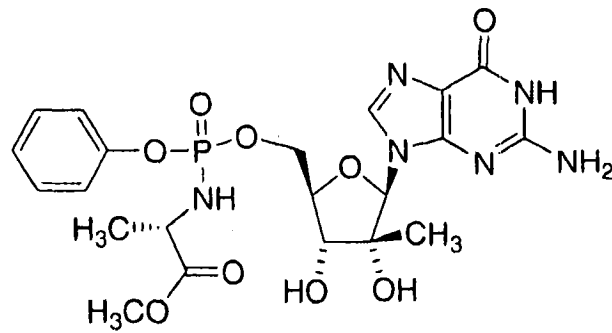
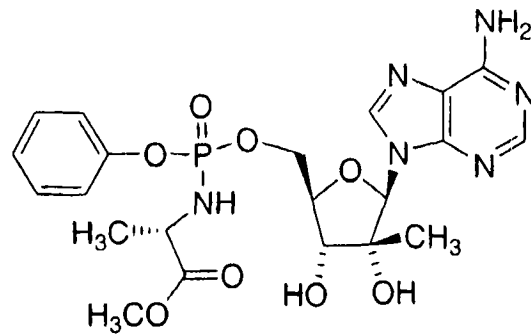
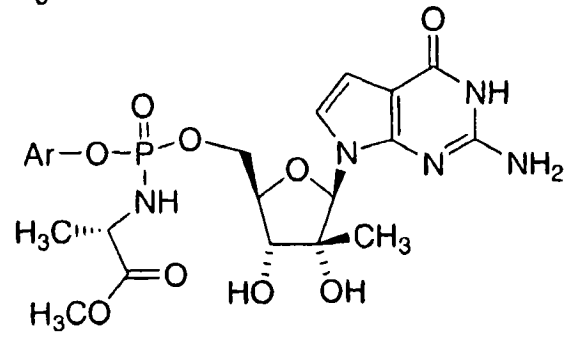
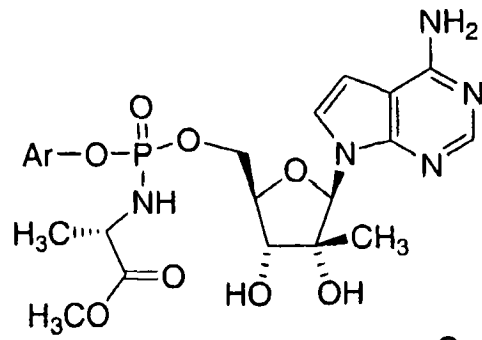
[0064] 在本发明化合物的第四个实施方式中, R^{11} 是氢, R^7 选自氢、甲基、乙基、正丙基、异丙基、异丁基、2-甲基-1-丙基、羟基甲基、巯基甲基、羧基甲基、氨基甲酰基甲基、1-羟基乙基、2-羧基乙基、2-氨基甲酰基乙基、2-甲硫基乙基、4-氨基-1-丁基、3-氨基-1-丙基、3-胍基-1-丙基、1H-咪唑-4-基甲基、苯基、4-羟基苄基和1H-吡啶-3-基甲基。在该类实施方式中 R^7 是甲基或苄基。

[0065] 在本发明化合物的第五个实施方式中, R^8 是 C_{1-6} 烷基、环己基、苯基或苄基。在该类实施方式中 R^8 是甲基。

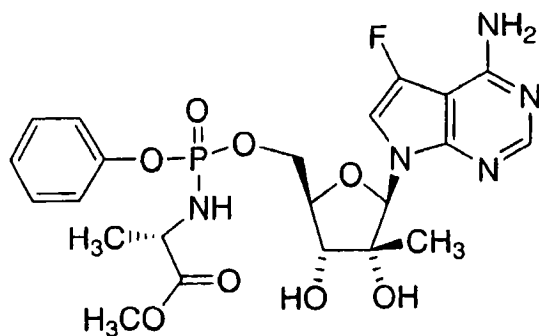
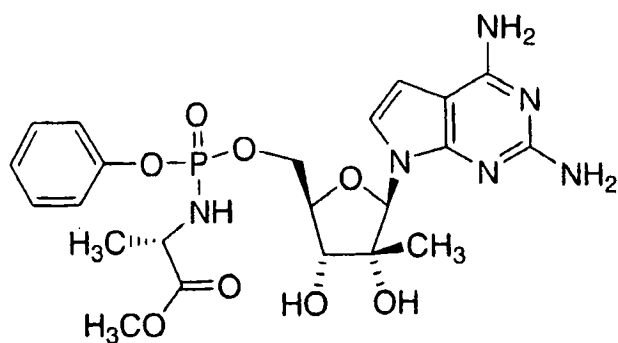
[0066] 在本发明化合物的第六个实施方式中,Ar是未取代的苯基、 R^7 是甲基或苄基、 R^8 是甲基、 R^{11} 是氢。

[0067] 结构式I的本发明化合物,其用作RNA依赖性RNA病毒聚合酶的抑制剂的前体,举例但非限制的实例如下:

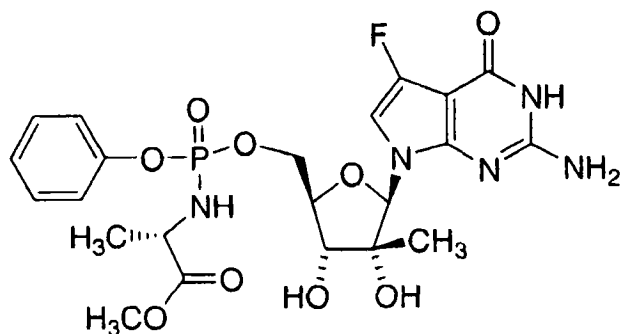
[0068]



[0069]



和



;

[0070] 或其药学上可接受的盐。

[0071] 在本发明的一个实施方式中,本发明的核苷氨基磷酸芳基酯可以用作正义单链 RNA 依赖性 RNA 病毒聚合酶的抑制剂、正义单链 RNA 依赖性 RNA 病毒复制抑制剂,和 / 或用于治疗正义单链 RNA 依赖性 RNA 病毒感染。在该类实施方式中,正义单链 RNA 依赖性 RNA 病毒是黄病毒科 (Flaviviridae) 病毒或小核糖核酸病毒科 (Picornaviridae) 病毒。在该类的子类中,小核糖核酸病毒科病毒是鼻病毒、脊髓灰质炎病毒或甲型肝炎病毒。在该类的第二子类中,黄病毒科病毒包括丙型肝炎病毒、黄热病病毒、登革热病毒、西尼罗河病毒、日本脑炎病毒、Banza 病毒和牛病毒性腹泻病毒 (BVDV)。在该子类的子类中,黄病毒科病毒为丙型肝炎病毒。

[0072] 本发明的另一方面涉及在哺乳动物中抑制 RNA 依赖性 RNA 病毒聚合酶的方法、抑制 RNA 依赖性 RNA 病毒复制的方法、和 / 或治疗 RNA 依赖性 RNA 病毒感染的方法,其包括对哺乳动物给药治疗有效量的结构式 I 的化合物。

[0073] 本发明此方面的一个实施方式中, RNA 依赖性 RNA 病毒聚合酶是正义单链 RNA 依赖性 RNA 病毒聚合酶。在该类实施方式中,正义单链 RNA 依赖性 RNA 病毒聚合酶是黄病毒科病毒聚合酶或小核糖核酸病毒科病毒聚合酶。在该类的子类中,小核糖核酸病毒科病毒聚合酶是鼻病毒聚合酶、脊髓灰质炎病毒聚合酶或甲型肝炎病毒聚合酶。在该类的第二子类中,

黄病毒科病毒聚合酶包括丙型肝炎病毒聚合酶、黄热病病毒聚合酶、登革热病毒聚合酶、西尼罗河病毒聚合酶、日本脑炎病毒聚合酶、Banza 病毒聚合酶和牛病毒性腹泻病毒 (BVDV) 聚合酶。在该子类的子类中,黄病毒科病毒聚合酶为丙型肝炎病毒聚合酶。

[0074] 本发明此方面的第二个实施方式中, RNA 依赖性 RNA 病毒复制是正义单链 RNA 依赖性 RNA 病毒复制。在该类实施方式中,正义单链 RNA 依赖性 RNA 病毒复制是黄病毒科病毒复制或小核糖核酸病毒科病毒复制。在该类的子类中,小核糖核酸病毒科病毒复制是鼻病毒复制、脊髓灰质炎病毒复制或甲型肝炎病毒复制。在该类的第二子类中,黄病毒科病毒复制包括丙型肝炎病毒复制、黄热病病毒复制、登革热病毒复制、西尼罗河病毒复制、日本脑炎病毒复制、Banza 病毒复制和牛病毒性腹泻病毒复制。在该子类的子类中,黄病毒科病毒复制为丙型肝炎病毒复制。

[0075] 本发明此方面的第三个实施方式中, RNA 依赖性 RNA 病毒感染是正义单链 RNA 依赖性 RNA 病毒感染。在该类实施方式中,正义单链 RNA 依赖性 RNA 病毒感染是黄病毒科病毒感染或小核糖核酸病毒科病毒感染。在该类的子类中,小核糖核酸病毒科病毒感染是鼻病毒感染、脊髓灰质炎病毒感染或甲型肝炎病毒感染。在该类的第二子类中,黄病毒科病毒感染包括丙型肝炎病毒感染、黄热病病毒感染、登革热病毒感染、西尼罗河病毒感染、日本脑炎病毒感染、Banza 病毒感染和牛病毒性腹泻病毒感染。在该子类的子类中,黄病毒科病毒感染为丙型肝炎病毒感染。

[0076] 在本说明书中,下列术语具有如下的意义:

[0077] 上述烷基是指包括指定长度的直链或支链烷基。该烷基的实例是甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、仲丁基、叔丁基、戊基、异戊基、己基、异己基等。

[0078] 术语“烯基”是指 2~6 个总碳原子数(或该范围内任何碳原子数)的直链或支链烯烃(例如乙烯基、丙烯基、丁烯基、戊烯基等)。

[0079] 术语“炔基”是指 2~6 个总碳原子数(或该范围内任何碳原子数)的直链或支链炔烃(例如乙炔基、丙炔基、丁炔基、戊炔基等)。

[0080] 术语“环烷基”是指 3~8 个总碳原子数(或该范围内任何碳原子数)的环状烷烃(例如环丙基、环丁基、环戊基、环己基、环庚基或环辛基)。

[0081] 术语“环杂烷基”包括含 1~2 个选自氮、氧和硫的杂原子的非芳香杂环。实例为 4~6- 员环杂烷基,包括氮杂环丁烷基、吡咯烷基、哌啶基、吗啉基、硫代吗啉基、咪唑烷基、四氢呋喃基、四氢吡喃基、四氢噻吩基、哌嗪基等。

[0082] 术语“烷氧基”是指规定碳原子数(例如 C_{1-4} 烷氧基)或该范围内任何碳原子数(例如甲氧基 (MeO-)、乙氧基、异丙氧基等)的直链或支链烃氧化物。

[0083] 术语“烷硫基”是指规定碳原子数(例如 C_{1-4} 烷硫基)或该范围内任何碳原子数(例如甲硫基 (MeS-)、乙硫基、异丙硫基等)的直链或支链烷基硫。

[0084] 术语“烷基氨基”是指规定碳原子数(例如 C_{1-4} 烷基氨基)或该范围内任何碳原子数(例如甲氨基、乙氨基、异丙氨基、叔丁氨基等)的直链或支链烷基胺。

[0085] 术语“烷基磺酰”是指规定碳原子数(例如 C_{1-6} 烷基磺酰)或该范围内任何碳原子数(例如甲磺酰 (MeSO₂-)、乙磺酰、异丙磺酰等)的直链或支链烷基磺。

[0086] 术语“烷基氧基羰基”是指规定碳原子数(例如 C_{1-4} 烷基氧基羰基)或该范围内任何碳原子数(例如甲基氧基羰基 (MeOCO-)、乙基氧基羰基、丁基氧基羰基)的本发明羧酸衍

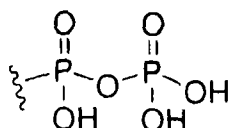
生物直链或支链酯。

[0087] 术语“卤素”是指氟、氯、溴和碘。

[0088] 术语“磷酰基”是指 $-P(O)(OH)_2$ 。

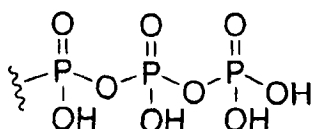
[0089] 术语“二磷酰基”是指具有下列结构的基团：

[0090]



[0091] 术语“三磷酰基”是指具有下列结构的基团：

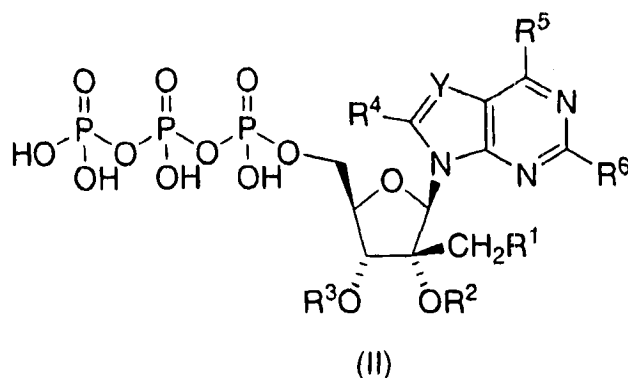
[0092]



[0093] 术语“取代”应当认为包括被给定的取代基多重取代。在说明书或权利要求所述的多重取代基残基中，取代化合物可以独立地被一个或多个说明书的或权利要求所述的取代基残基一次或多次取代。

[0094] 术语“5'-三磷酸酯”是指本发明的核苷化合物的5'-羟基的三磷酸酯衍生物，其具有下列结构通式 II：

[0095]



[0096] 其中 Y 和 $R^1 \sim R^6$ 定义如上。

[0097] 术语“组合物”，例如在“药物组合物”中，包括：含活性成分的产物和形成载体的惰性成分的产物，以及通过组合、络合或聚集任何两种或多种所述成分、或解离一种或多种所述成分、或经一种或多种所述成分的其他类型反应直接或间接得到的其他产物。因此，本发明的药物组合物包含本发明的化合物与药学上可接受的载体混合制得的任何组合物。

[0098] 术语化合物的“给药”和“用药”应当理解为向所需个体提供本发明的化合物或本发明化合物的前药。

[0099] 本发明的另一方面涉及联合一种或多种可用于治疗 HCV 感染的药剂使用本发明的化合物抑制 HCV NS5B 聚合酶的方法、联合一种或多种可用于治疗 HCV 感染的药剂使用本发明的化合物抑制 HCV 复制的方法，或联合一种或多种可用于治疗 HCV 感染的药剂使用本发明的化合物治疗 HCV 感染的方法。这种抗 HCV 的活性剂包括但不限于：病毒唑、左旋韦

林 (levovirin)、viramidine、胸腺素 α -1、干扰素 β 、干扰素 α 、PEG 化 (pegylated) 干扰素 α (PEG 干扰素 α)、干扰素 α 和病毒唑的组合、PEG 干扰素 α 和病毒唑的组合、干扰素 α 和左旋韦林的组合、PEG 干扰素 α 和左旋韦林的组合。干扰素 α 包括但不限于重组干扰素 α 2a (例如从 Hoffmann-LaRoche, Nutley, NJ 购得的 Roferon 干扰素)、PEG 化干扰素 α 2a (Pegasys™)、干扰素 α 2b (例如从 ScheringCorp., Kenilworth, NJ 购得的 Intron-A 干扰素)、PEG 化干扰素 α 2b (PegIntron™)、重组共有序列干扰素 (consensus interferon) (例如干扰素 alphacon-1) 和纯化干扰素 α 产品。Amgen's 重组共有序列干扰素的商品名是 **Infergen®**。左旋韦林是病毒唑的 L-对映异构体, 其具有类似于病毒唑的免疫调节活性。Viramidine 表示 WO 01/60379 (转让给 ICN Pharmaceuticals) 中公开的病毒唑的类似物。根据本发明的方法, 该组合的单个成分可以在治疗的不同时期分别给药或以分开的或单一的组的形式同时给药。因此本发明应理解为包含这种同时或交替治疗的全部方案, 且术语“给药”应做相应的解释。很明显, 本发明的化合物与用于治疗 HCV 感染的其他药剂组合在原则上包括与任何用于治疗 HCV 感染的药物组合物的任何组合。当本发明的化合物或其药学上可接受的盐与第二抗 HCV 的活性治疗剂联合使用时, 每种化合物的剂量既可以与其单独使用时的剂量相同, 也可以不同。

[0100] 用于治疗 HCV 感染时, 本发明的化合物还可以联合 HCV NS3 丝氨酸蛋白酶抑制剂进行给药。HCV NS3 丝氨酸蛋白酶是一种基本病毒酶。且已经将它们描述为抑制 HCV 复制的优异标靶。HCV NS3 蛋白酶抑制剂的底物和非底物基抑制剂公开于 WO 98/22496、WO98/46630、WO 99/07733、WO 99/07734、WO 99/38888、WO 99/50230、WO 99/64442、WO 00/09543、WO 00/59929、GB-2337262、WO02/48116、WO 02/48172 和美国专利 US 6, 323, 180。HCV NS3 蛋白酶作为用于开发 HCV 复制抑制剂和用于治疗 HCV 感染的标靶的内容如 B. W. Dymock, "Emerging therapies for hepatitis C virus infection," Emerging Drugs, 6:13-42 (2001) 所述。

[0101] 病毒唑、左旋韦林和 viramidine 可以通过抑制细胞内酶肌苷单磷酸酯脱氢酶 (IMPDH) 来调节细胞内鸟嘌呤核苷酸库, 从而发挥它们的抗 HCV 效果。IMPDH 是从头鸟嘌呤核苷酸生物合成路线上的限速酶。病毒唑很容易细胞内磷酸化, 且该单磷酸酯衍生物是 IMPDH 的抑制剂。因此, 抑制 IMPDH 代表了发现 HCV 复制抑制剂的另一个有用标靶。因此, 本发明的化合物也可以与以下物质联合给药: IMPDH 抑制剂, 例如 VX-497, 如 WO 97/41211 和 WO 01/00622 (转让给 Vertex) 所述; 另一种 IMPDH 抑制剂, 如 WO 00/25780 (转让给 Bristol-MyersSquibb); 或 mycophenolate mofetil (参阅 A. C. Allison 和 E. M. Eugui, Agents Action. 44(Suppl.):165(1993)) 所述。

[0102] 用于治疗 HCV 感染时, 本发明的化合物还可以联合抗病毒剂金刚烷胺 (1-氨基金刚烷) (该药剂的详细说明参阅 J. Kirschbaum, Anal. Profiles Drug Subs. 12:1-36(1983)) 给药。

[0103] 本发明的化合物还可与抗病毒 2'-C-分支核糖核苷联合治疗 HCV 感染, 所述 2'-C-分支核糖核苷如 R. E. Harry-O'kuru 等, J. Org. Chem. 62:1754-1759(1997); M. S. Wolfe 等, Tetrahedron Lett. 36:7611-7614(1995); 美国专利 US 3, 480, 613 (Nov. 25, 1969); 国际专利申请 WO01/90121 (29 November 2001); 国际专利申请 WO 01/92282 (6 December 2001); 国际专利申请 WO 02/32920 (25 April 2002); 国际专利申

请 W004/002999 (8 January 2004) ;国际专利申请 WO 04/003000 (8 January 2004) ;国际专利申请 WO 04/002422 (8 January 2004) 所述 ;其全文在此引为参考。该 2'-C- 分支核糖核苷包括但不限于 2'-C- 甲基胞苷、2'-C- 甲基尿苷、2'-C- 甲基腺苷、2'-C- 甲基鸟苷和 9-(2-C- 甲基 - β -D- 呋喃核糖基)-2,6- 二氨基嘌呤以及核糖 C-2'、C-3'、C-5' 羟基的相应氨基酸酯和 5'-磷酸酯衍生物相应的任选取代的环状 1,3- 丙二醇酯。

[0104] 本发明的化合物还可与其他具有抗 HCV 特性的核苷组合治疗 HCV 感染,例如,如 WO 02/51425 (4 July 2002), 转让给 MitsubishiPharma Corp. ;WO 01/79246、WO 02/32920 和 WO 02/48165 (20 June 2002), 转让给 Pharmasset, Ltd. ;WO 01/68663 (20 September 2001), 转让给 ICN Pharmaceuticals ;WO 99/43691 (2 Sept. 1999) ;W002/18404 (7 March 2002), 转让给 Hoffmann-LaRoche ;U. S. 2002/0019363 (14 Feb. 2002) ;WO 02/100415 (19 Dec. 2002) ;W003/026589 (3 Apr. 2003) ;WO 03/026675 (3 Apr. 2003) ;WO 03/093290 (13 Nov. 2003) ;US 2003/0236216 (25 Dec. 2003) ;US 2004/0006007 (8 Jan. 2004) ;WO 04/011478 (5 Feb. 2004) ;WO 04/013300 (12 Feb. 2004) ;US 2004/0063658 (1 Apr. 2004) 和 WO 04/028481 (8 Apr. 2004) 所述的那些。

[0105] 本发明的化合物还可与 HCV 聚合酶的非核苷抑制剂组合治疗 HCV 感染,例如,如 WO 01/77091 (18 Oct. 2001), 转让给 Tularik, Inc. ;WO 01/47883 (5 July 2001), 转让给 Japan Tobacco, Inc. ;W002/04425 (17 January 2002), 转让给 Boehringer Ingelheim ;W002/06246 (24 Jan. 2002), 转让给 Istituto di Ricerche di BiologiaMoleculare P. Angeletti S. P. A. ;和 WO 02/20497 (3 March 2002) 所述的那些。

[0106] “药学上可接受的”是指载体、稀释剂或赋形剂必须与制剂的其他成分相容,且对接受者无害。

[0107] 含本发明的核苷氨基磷酸芳基酯与药学上可接受的载体的药物组合物也包括在本发明内。本发明的另一个实例是通过将任何上述化合物与药学上可接受的载体结合制得的药物组合物。本发明的另一个实例是制备药物组合物的方法,包括将任何上述化合物与药学上可接受的载体结合。

[0108] 本发明还包括含有效量的本发明化合物和药学上可接受的载体、用于抑制 RNA 依赖性 RNA 病毒聚合酶,特别是 HCV NS5B 聚合酶的药物组合物。本发明还包括用于治疗 RNA 依赖性 RNA 病毒感染,特别是 HCV 感染的药物组合物,以及抑制 RNA 依赖性 RNA 病毒聚合酶,特别是 HCV NS5B 聚合酶的方法,和治疗 RNA 依赖性的病毒复制,特别是 HCV 复制的方法。此外,本发明涉及含治疗有效量的本发明化合物与另一治疗有效量的抗 RNA 依赖性 RNA 病毒(特别是抗 HCV) 活性剂的药物组合物。抗 HCV 的活性剂包括但不限于,病毒唑、左旋韦林、viramidine、胸腺素 α -1、HCV NS3 丝氨酸蛋白酶抑制剂、干扰素 - α 、PEG 化干扰素 - α (PEG 干扰素 - α)、干扰素 - α 和病毒唑的组合、PEG 干扰素 - α 和病毒唑的组合、干扰素 - α 和左旋韦林的组合、PEG 干扰素 - α 和左旋韦林的组合。干扰素 - α 包括但不限于重组干扰素 - α 2a (例如从 Hoffmann-LaRoche, Nutley, NJ 购得的 Roferon 干扰素)、干扰素 - α 2b (例如从 Schering Corp., Kenilworth, NJ 购得的 Intron-A 干扰素)、共有序列干扰素和纯化干扰素 - α 产品。对于病毒唑及其抗 HCV 活性的论述参阅 J. O. Saunders 和 S. A. Raybuck, " Inosine Monophosphate Dehydrogenase :Consideration of Structure, Kinetics, and Therapeutic Potential, " Ann. Rep. Med. Chem., 35 :201-210 (2000)。

[0109] 本发明另一方面提供核苷氨基磷酸芳基酯及其药物组合物用于制备抑制 RNA 依赖性 RNA 病毒复制（特别是 HCV 复制），和 / 或治疗 RNA 依赖性 RNA 病毒感染（特别是 HCV 感染）的药物的用途。本发明另一方面提供核苷氨基磷酸芳基酯及其药物组合物用作抑制 RNA 依赖性 RNA 病毒复制（特别是 HCV 复制），和 / 或治疗 RNA 依赖性 RNA 病毒感染（特别是 HCV 感染）的药物。

[0110] 本发明的药物组合物包含作为活性成分的结构式 I 的化合物或其药学上可接受的盐，并可还包含药学上可接受的载体和任选地其他治疗成分。

[0111] 所述组合物包括如下组合物，其适合于口服、直肠、局部、肠胃外（包括皮下、肌肉内和静脉内）、眼（眼用药）、肺部（鼻或口腔吸入）或鼻给药，在任何给出的情形中最合适的途径取决于所需治疗的状况的性质和严重程度，以及活性成分的特征。它们可以方便地以单元剂量形式存在，并且可以通过药学领域熟知的任何方法制备。

[0112] 在实际使用中，结构式 I 的化合物可作为活性成分根据常规的药物混配技术与药物载体紧密混合。该载体可以是各种形式，取决于希望给药的制剂形式，例如口服或肠胃外（包括静脉内）。在制备组合物的口服剂量形式时，可以使用任何常见的药物介质，例如在口服液体制剂例如悬浮液、酏剂和溶液情况下，水、二醇、油、醇、调味剂、防腐剂、着色剂等；或在口服固体制剂例如粉末、硬和软胶囊和片剂情况下，载体比如淀粉、糖、微晶纤维素、稀释剂、成粒剂、润滑剂、粘合剂、崩解剂等，其中相对于液体制剂更优选固体口服制剂。

[0113] 由于易于给药，片剂和胶囊代表最有利的口服剂量单元形式，在此时显然是使用固体药物载体。如果需要，可以通过标准的含水或非水工艺对片剂进行包衣。这种组合物和制剂应包含至少 0.1% 的活性化合物。这些组合物中活性化合物的百分比当然可以改变，可适宜地在约 2% ~ 约 60% 单元重量。在这种治疗上可用组合物中的活性化合物的量使得得到有效的剂量。该活性化合物还可以鼻内给药，例如以液体滴剂或喷雾剂的形式存在。

[0114] 片剂、丸、胶囊等还可以包含粘合剂，例如黄蓍胶、阿拉伯胶、玉米淀粉或明胶；赋形剂比如磷酸二钙；崩解剂比如玉米淀粉、马铃薯淀粉、藻酸；润滑剂比如硬脂酸镁；和甜味剂比如蔗糖、乳糖或糖精。当剂量单元形式为胶囊时，它除上述类型的材料外还可以包含液体载体，例如脂油。

[0115] 多种其他材料可以作为包衣存在或用来改进剂量单元的物理形式。例如片剂可以涂有虫胶、糖或两者皆有。糖浆或酏剂，除活性成分外，还可以包含蔗糖作为甜味剂，对羟基苯甲酸甲酯和对羟基苯甲酸丙酯作为防腐剂，染料，和调味剂例如樱桃或橙味香料。

[0116] 结构式 I 的化合物还可以肠胃外给药。可以在与表面活性剂（例如羟基 - 丙基纤维素）适当混合的水中制备这些活性化合物的溶液或悬浮液。可以在甘油、液体聚乙二醇及其在油中的混合物中制备分散体。在普通储存条件和使用下，这些制剂含有防腐剂以防止微生物生长。

[0117] 适合注射用的药物形式包括无菌水溶液或分散体，以及用于临时制备无菌注射液或分散体的无菌粉末。在所有的情况中，药物形式都必须是无菌的，且必须呈流动态达到容易注射的程度。它在制备和储存条件下中必须稳定，且必须在防止抗微生物（例如细菌和真菌）污染作用的条件下保存。载体可以是溶剂或分散介质，其中包含例如水、乙醇、多元醇（例如甘油、丙二醇和液体聚乙二醇）、其适当的混合物和植物油。

[0118] 可以采用任何适当的给药途径对哺乳动物（尤其是人类）使用有效剂量的本发明

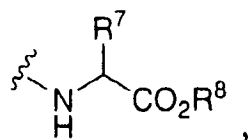
化合物。例如可以采用口服、直肠、局部、肠胃外、眼、肺部、鼻等途径。剂量形式包括片剂、锭剂、分散体、悬浮液、溶液、胶囊、乳剂、软膏剂、气雾剂等。优选结构式 I 的化合物以口服给药。

[0119] 对于向人类口服给药,在分剂量 (divided doses) 中,剂量范围为 0.01 ~ 1000mg/kg 体重。在一个实施方式中,在分剂量中,剂量范围是 0.1 ~ 100mg/kg 体重。在另一个实施方式中,在分剂量中,剂量范围是 0.5 ~ 20mg/kg 体重。对于口服给药,组合物优选形式为片剂或胶囊,包含 1.0 ~ 1000 毫克的活性成分,特别是 1、5、10、15、20、25、50、75、100、150、200、250、300、400、500、600、750、800、900 和 1000 毫克的活性成分,以根据需治疗的患者的症状调整剂量。

[0120] 使用的活性成分的有效剂量可以变化,其取决于使用的具体化合物、给药模式、被治疗的状况和被治疗的状况的程度。本领域技术人员可以很容易确定这样的剂量。可以调整该剂量方案以提供最佳的治疗反应。

[0121] 本发明的化合物包含一个或多个不对称中心,因此可以以外消旋物和外消旋混合物、单个对映异构体、非对映异构体混合物和单个非对映异构体存在。当 R¹¹ 是氢且与结构式 I 中磷原子连接的氨基酰基残基中的 R⁷ 在下式中不是氢时,

[0122]

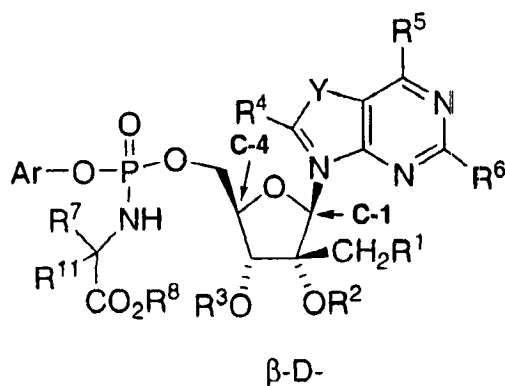


[0123] 所述氨基酸残基包含不对称中心,并且意图包括单独的 R- 和 S- 立体异构体以及 RS- 立体异构体混合物。在一个实施方式中,在产生立体化学的 (stereogenic) 碳原子上的立体化学对应于 S- 氨基酸的立体化学,即天然存在的 α - 氨基酸的立体化学。

[0124] 结构式 I 的化合物中四取代的磷构成另一不对称中心,并且本发明的化合物意图包括该磷原子上的所有两种立体化学构型。

[0125] 本发明意在包括,具有下述结构式所示的五- 员呋喃糖环 β -D 立体化学构型的核苷氨基磷酸芳基酯,即这样的核苷氨基磷酸芳基酯,其中五- 员呋喃糖环的 C-1 和 C-4 取代基具有 β - 立体化学构型 (粗线表示“向上”的立体取向)。

[0126]

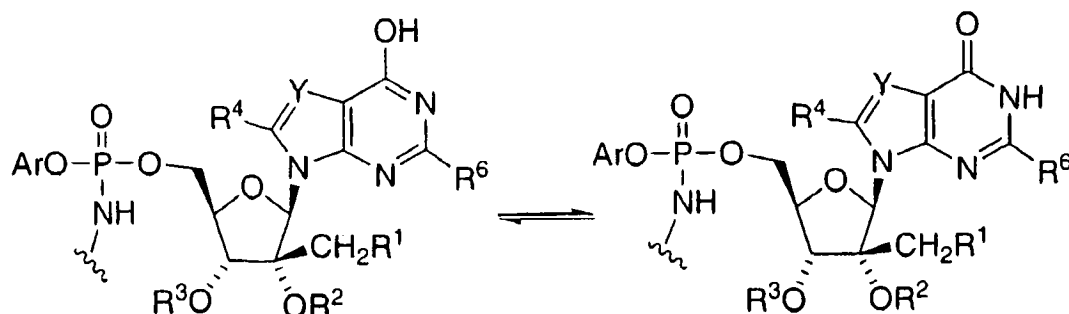


[0127] 本文描述的某些化合物含有烯属双键,除非另外特别说明,意在包括 E 和 Z 两种几何异构体。

[0128] 本文描述的某些化合物可以以互变异构体存在,例如酮- 烯醇互变异构体。单个

互变异构体及其混合物包括在结构式 I 的化合物中。意图包括在本发明化合物中的酮-烯醇互变异构体的实例举例说明如下：

[0129]



[0130] 结构式 I 的化合物可以分离成单个的非对映异构体,通过例如从适的溶剂中(例如甲醇、乙酸乙酯或其混合物)分级结晶进行,或通过使用旋光固定相经手性色谱法进行。

[0131] 另外,结构式 I 的化合物的任何立体异构体也可以使用已知构型的光学纯起始原料或试剂通过立体专一性合成得到。

[0132] 本发明的化合物可以以药学上可接受的盐的形式给药。术语“药学上可接受的盐”是指从药学上可接受的无毒碱或酸(包括无机或有机碱和无机或有机酸)制备的盐。包含在术语“药学上可接受的盐”中的碱性化合物的盐指通常由游离碱与适当的有机或无机酸反应制备的本发明化合物的无毒盐。本发明的碱性化合物的代表性盐,包括但不限于:乙酸盐、苯磺酸盐、苯甲酸盐、碳酸氢盐、硫酸氢盐、酒石酸氢盐、硼酸盐、溴化物、樟脑磺酸盐、碳酸盐、氯化物、克拉维酸盐、柠檬酸盐、二盐酸化物、乙二胺四乙酸盐、乙二磺酸盐(edisylate)、丙酸酯月桂硫酸盐(estolate)、乙磺酸盐(esylate)、富马酸盐、葡庚糖酸盐、葡糖酸盐、谷氨酸盐、甘苯砷盐(glycollylarsanilate)、hexylresorcinate、哈胺、氢溴酸盐、盐酸盐、羟基萘甲酸盐、碘化物、isothionate、乳酸盐、乳糖醛酸盐(lactobionate)、月桂酸盐、苹果酸盐、马来酸盐、扁桃酸盐、甲磺酸盐、甲基溴化物、甲基硝酸盐、甲基硫酸盐、粘酸盐、萘磺酸盐(napsylate)、硝酸盐、N-甲基葡萄糖胺铵盐、油酸盐、乙二酸盐、双羟萘酸盐、棕榈酸盐、泛酸盐、磷酸盐/磷酸氢盐、多聚半乳糖醛酸盐(polygalacturonate)、水杨酸盐、硬脂酸盐、硫酸盐、碱式醋酸盐、琥珀酸盐、丹宁酸盐、酒石酸盐、8-氯茶碱盐、甲苯磺酸盐、三乙基碘化物和戊酸盐。此外,当本发明的化合物带有酸性结构部分时,其适当的药学上可接受的盐,包括但不限于,来自无机碱(包括铝、铵、钙、铜、铁、亚铁、锂、镁、锰、亚锰、钾、钠、锌等)的盐。特别优选铵、钙、镁、钾、钠盐。来自药学上可接受的有机无毒碱的盐包括伯胺、仲胺、叔胺、环胺和碱离子交换树脂比如精氨酸、甜菜碱、咖啡因、胆碱、N,N-二苄基乙二胺、二乙胺、2-二乙氨基乙醇、2-二甲氨基乙醇、乙醇胺、乙二胺、N-乙基吗啉、N-乙基哌啶、葡萄糖胺(glucamine)、葡糖胺(glucosamine)、组氨酸、哈胺、异丙胺、赖氨酸、甲基葡萄糖胺、吗啉、哌嗪、哌啶、多胺树脂、普鲁卡因、嘌呤类、可可碱、三乙胺、三甲胺、三丙胺、缓血酸胺等的盐。

[0133] 此外,如果本发明的化合物中存在羧酸(-COOH)或羟基基团时,可以采用药学上可接受的羧酸衍生物的前药酯类(例如甲酯、乙酯或特戊酰氧甲酯)或核糖 C-2'、C-3' 和 C-5' 羟基的前药酰基衍生物(例如 O-乙酰基、O-特戊酰基、O-苯甲酰基、O-氨基酰基)。包括本领域已知的用于改进生物利用率、组织分布、溶解度和水解特征的那些酯和酰基,用

于缓释或前药制剂。所考虑的该衍生物可以在体内很容易转化成所需的化合物。因此,在本发明的治疗方法中,术语“给药”和“用药”是指包括使用具体公开的化合物,或虽然没有具体公开但在哺乳动物(包括人类患者)给药后可以在体内转化成该指定化合物的化合物,对所描述的病毒感染进行治疗。适当的前药衍生物的选择与制备的常规程序描述在例如“Design of Prodrugs”, H. Bundgaard 编辑, Elsevier, 1985, 其全文在此引为参考。

[0134] 本发明氨基磷酸芳基酯的制备

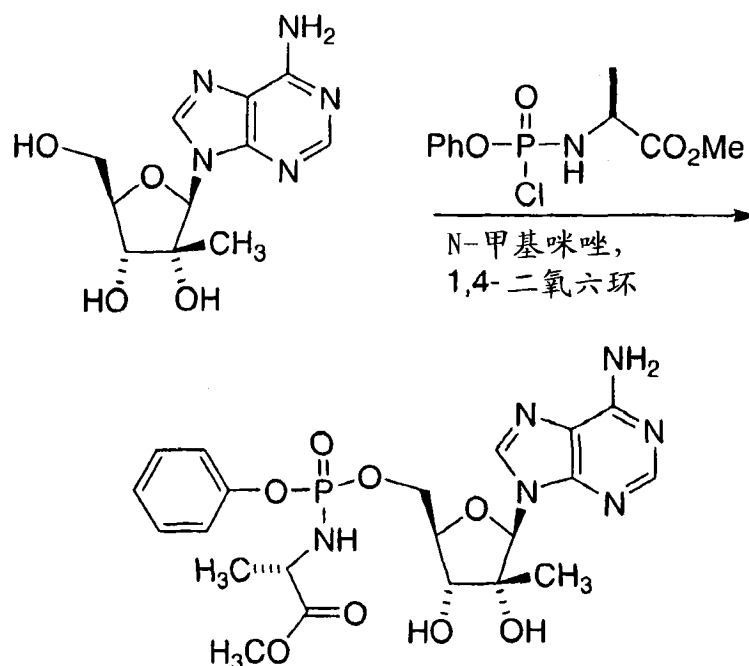
[0135] 在国际专利申请公开 WO 02/057287 (25 July 2002) 和 W002/057425 (25 July 2002) 中描述了用于磷酸化反应的核苷中间体的制备。用于磷酸化反应的氯化磷酸芳基酯 (aryl phosphorochloridates) 根据美国专利 6, 455, 513 描述的方法制备, 其全文在此引为参考。生成本发明的氨基磷酸芳基酯的磷酸化反应根据美国专利 US 6, 455, 513 和 C. McGuigan 等, *J. Med. Chem.*, 36 :1048 (1993) 描述的方法进行。

[0136] 下列实施例用于举例说明制备本发明化合物的条件。这些实施例并非意图以任何方式限制本发明的范围, 不应对其作这种解释。核苷和核苷酸合成领域的技术人员很容易理解, 可以使用已知的对下列制备工序条件和过程的变型来制备本发明的这些化合物和其他化合物。除非另作说明, 所有的温度规定是摄氏度。

[0137] 实施例 1 和 2

[0138] 2'-C-甲基腺苷 5'-[甲氧基-(S)-丙氨酰基磷酸苯基酯]

[0139]



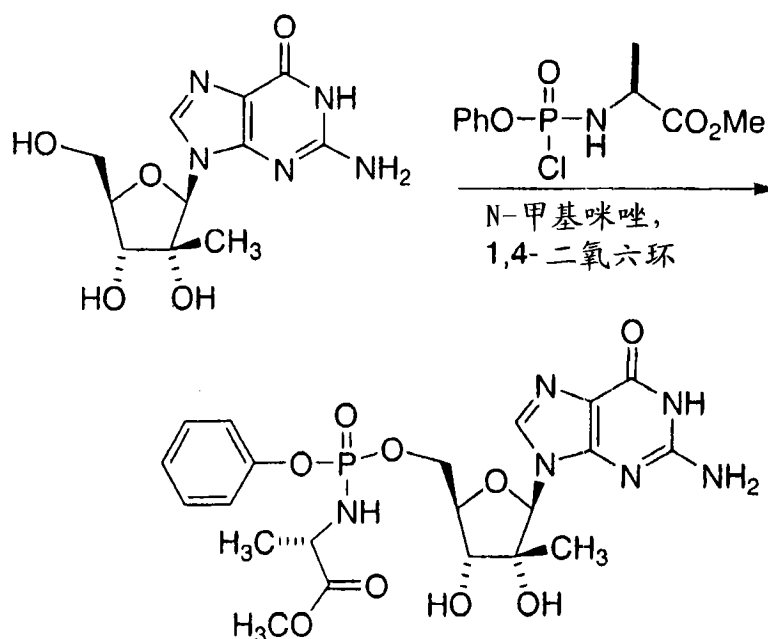
[0140] 在室温下将 2'-C-甲基腺苷 (500mg), 甲氧基-(S)-丙氨酰基氯化磷酸苯基酯 [1.3g, 根据 *J. Med. Chem.*, 36 :1048 (1993) 制备], N-甲基咪唑 (0.8mL) 和 1,4-二氧六环 (10mL) 的溶液搅拌 18 小时。浓缩该反应化合物, 放入饱和的碳酸氢钠水溶液中, 并用氯仿萃取三次。该氯仿萃取物在无水硫酸镁上干燥, 过滤, 浓缩得到棕褐色固体。所需的产物在硅胶上使用色谱法使用 10% 甲醇 / 二氯甲烷作为洗脱液纯化, 然后冻干得到无色固体——为磷原子上非对映异构体的混合物。使用反相液相色谱 (Kromasil C8, 4.6×250mm, 梯度 20%~50% 乙腈溶于 0.1% 三氟乙酸水溶液, 历时 15 分钟, 1.5mL/分钟) 分离所述非对映

异构体,得到呈无色固体的每个非对映异构体。各异构体的质谱 :m/z = 523。

[0141] 实施例 3 和 4

[0142] 2'-C- 甲基鸟苷 5'-[甲氧基 -(S)- 丙氨酰基磷酸苯基酯]

[0143]

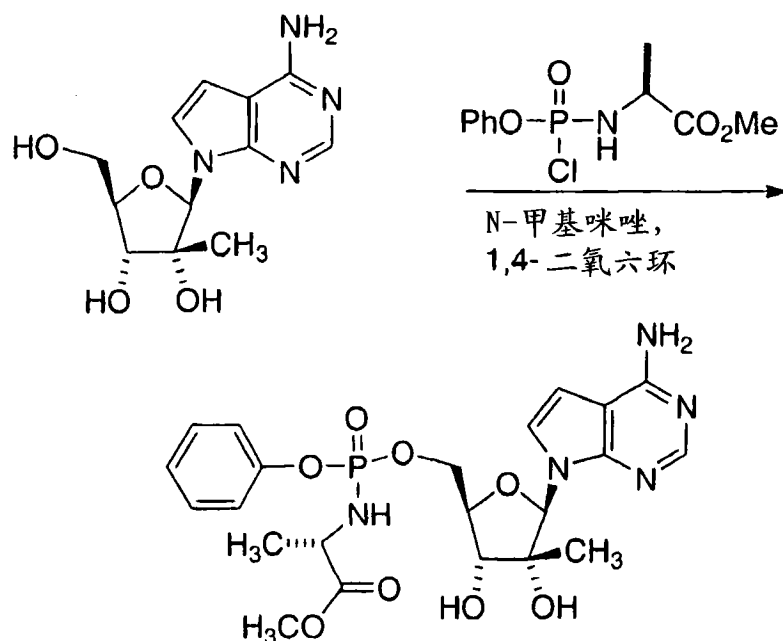


[0144] 在室温下将 2'-C- 甲基鸟苷 (40mg), 1,4- 二氧六环 (2mL), N- 甲基咪唑 (70 μ L) 和所述氯化磷酸酯 (73mg) 的溶液搅拌一整夜。浓缩混合物除去二氧六环, 混合物在饱和的碳酸氢钠水溶液和氯仿之间分配。所需的产物留在含水的级分中。非对映异构体混合物的水溶液经过反相液体色谱 (Kromasil C8, 4.6 \times 250mm, 梯度 20% ~ 50% 乙腈溶于 0.1% 三氟乙酸水溶液, 历时 15 分钟, 1.5mL/ 分钟) 得到呈无色固体的各非对映异构体。各异构体的质谱 :m/z = 539。

[0145] 实施例 5 和 6

[0146] 4- 氨基 -7-(2-C- 甲基 - β -D- 呋喃核糖基) -7H- 吡咯并 [2,3-d] 嘧啶 5'-[甲氧基 -(S)- 丙氨酰基磷酸苯基酯]

[0147]



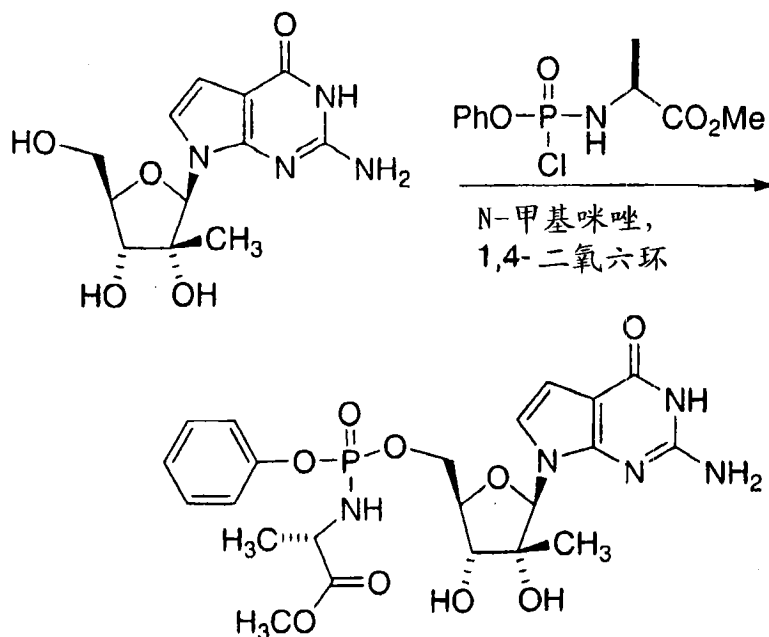
[0148] 以 4-氨基-7-(2-C-甲基-β-D-呋喃核糖基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶为起始原料,按照实施例 1 和 2 相同方法制备实施例 5 和 6,得到非对映异构体混合物,非对映异构体混合物使用实施例 1 和 2 的条件通过反相液相色谱拆分。各异构体的质谱: $m/z = 522$ 。

[0149] $^1\text{H NMR}(\text{CD}_3\text{OD}, 500\text{MHz})$: 异构体 A: δ 0.80(s, 3H), 1.30(d, 3H), 3.66(s, 3H) 和 6.30(s, 1H); 异构体 B: δ 0.84(s, 3H), 1.34(d, 3H), 3.62(s, 3H) 和 6.28(s, 1H)。

[0150] 实施例 7 和 8

[0151] 2-氨基-7-(2-C-甲基-β-D-呋喃核糖基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4(3H)-酮
5'-[甲氧基-(S)-丙氨酰基磷酸苯基酯]

[0152]



[0153] 以 2-氨基-7-(2-C-甲基-β-D-呋喃核糖基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4(3H)-酮为起始原料,按照制备实施例 3 和 4 的步骤制备实施例 7 和 8,得到非对映异构体混合物。使用实施例 3 和 4 的条件通过反相液相色谱分离非对映异构体。各异构体的

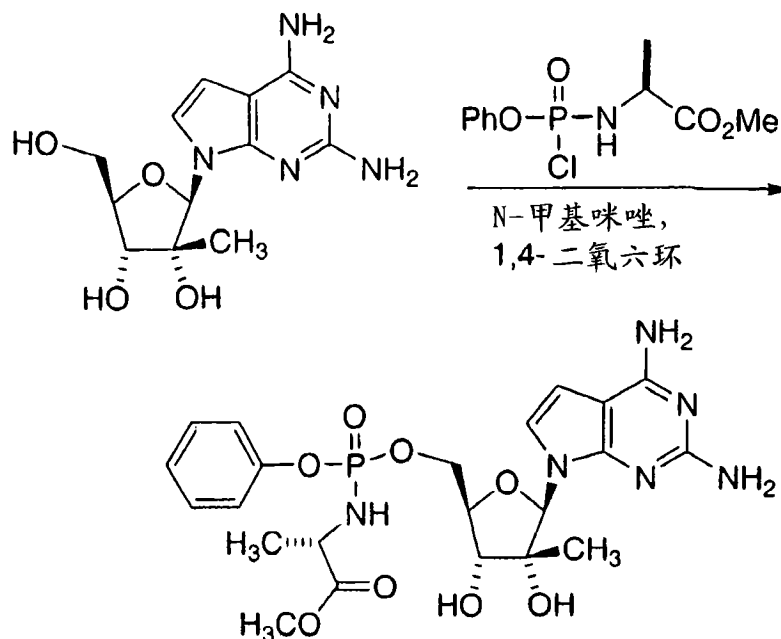
质谱 : $m/z = 538$ 。

[0154] ^1H NMR(CD_3OD , 500MHz) : 异构体 A : δ 0.85(s, 3H), 1.31(d, 3H), 3.67(s, 3H) 和 6.10(s, 1H) ; 异构体 B : δ 0.87(s, 3H), 1.35(d, 3H), 3.63(s, 3H) 和 6.05(s, 1H)。

[0155] 实施例 9 和 10

[0156] 2,4-二氨基-7-(2-C-甲基- β -D-呋喃核糖基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶 5'-[甲氧基-(S)-丙氨酰基磷酸苯基酯]

[0157]



[0158] 以 2,4-二氨基-7-(2-C-甲基- β -D-呋喃核糖基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶为起始原料,按照实施例 1 和 2 相同方法制备实施例 9 和 10,得到非对映异构体混合物,非对映异构体混合物使用实施例 1 和 2 的条件通过反相液相色谱拆分。各异构体的质谱 : $(M+1)$ $m/z = 537$ 。

[0159] ^1H NMR(CD_3OD , 500MHz) : 异构体 A : δ 0.89(s, 3H), 1.32(d, 3H), 3.64(s, 3H) 和 6.12(s, 1H) ; 异构体 B : δ 0.91(s, 3H), 1.35(d, 3H), 3.62(s, 3H) 和 6.10(s, 1H)。

[0160] 生物试验

[0161] 用于测量 HCV NS5B 聚合酶和 HCV 复制的抑制的试验描述如下。

[0162] 下列试验用于测量本发明的化合物作为 HCV NS5B RNA 依赖性 RNA 聚合酶 (RdRp) 的抑制剂的有效性。

[0163] A. HCV NS5B 聚合酶的抑制试验 :

[0164] 该试验用于测量本发明的核苷氨基磷酸芳基酯在杂聚 RNA 模板上抑制丙型肝炎病毒 (HCV) RNA 依赖性 RNA 聚合酶 (NS5B) 酶活性的能力。

[0165] 程序 :

[0166] 试验缓冲液条件 : (50 μL - 总量 / 反应)

[0167] 20mM Tris, pH 7.5

[0168] 50 μM EDTA

[0169] 5mM DTT

- [0170] 2mM MgCl₂
- [0171] 80mM KCl
- [0172] 0.4U/μL RNAsin (Promega, 原液为 :40 单元 / μL)
- [0173] 0.75 μg t500 (500-nt RNA, 其来自丙型肝炎基因组的 NS2/3 区序列使用 T7 失控转录制得)
- [0174] 1.6 μg 纯化丙型肝炎 NS5B (21 个氨基酸 C 端截短形成)
- [0175] 1 μM A、C、U、GTP (核苷三磷酸酯混合物)
- [0176] [α-³²P]-GTP 或 [α-³³P]-GTP
- [0177] 化合物在多种浓度下测试, 最长达 100 μM 终浓度。
- [0178] 制备适量的包括酶和模板 t500 的反应缓冲剂。将本发明的核苷衍生物移液入 96 孔板的孔中。制备核苷三磷酸酯 (NTP' s) 混合物, 包括放射性标记的 GTP 在内, 并移液入 96 孔板的孔中。添加酶-模板反应溶液后开始反应, 并在室温下进行 1~2 小时。
- [0179] 加入 20 μL 0.5M EDTA, pH 8.0 猝灭反应。包括空白反应 (其中, 在加入反应缓冲剂之前向 NTP' s 中加入猝灭溶液)。
- [0180] 50 μL 猝灭的反应物点到 DE81 滤盘 (Whatman) 上, 并干燥 30 分钟。使用 0.3M 甲酸铵, pH 8 (150mL/ 每次洗涤, 直到 1mL 洗涤液的 cpm 小于 100, 通常为 6 次洗涤) 洗涤过滤器。在 5mL 闪烁流体中使用闪烁计数器对过滤器进行计数。
- [0181] 根据下列等式计算抑制百分比:
- [0182] 抑制 % = [1 - (测试反应中 cpm - 空白中 cpm) / (对照反应中 cpm - 空白中 cpm)] × 100。
- [0183] 在 HCV NS5B 聚合酶试验中测试的代表性化合物显示 IC₅₀ 小于 100 微摩尔。
- [0184] B. HCV RNA 复制的抑制试验:
- [0185] 还在含亚基因组 HCV 复制子的培养肝癌 (HuH-7) 细胞中评价本发明的化合物影响丙型肝炎病毒 RNA 复制的能力。试验详情描述如下。该复制子试验是在对 V. Lohmann, F. Korner, J.-O. Koch, U. Herian, L. Theilmann 和 R. Bartenschlager, "Replication of a Sub-genomic Hepatitis C Virus RNAs in a Hepatoma Cell Line", *Science* 285: 110 (1999) 的试验进行了修进的条件进行的。
- [0186] 方案
- [0187] 该试验是原位核糖核酸酶保护, 基于闪烁亲近的板试验 (SPA)。将 10000 ~ 40000 个细胞置于 96 孔 cytostar 板 (Amersham) 中 100 ~ 200 μL 含 0.8mg/mL G418 的培养基中。在 0 ~ 18 小时内向细胞加入各种浓度 (最长达 100 μM 溶于 1% DMSO) 的化合物, 然后培养 24 ~ 96 小时。使细胞固定 (20 分钟, 10% 福尔马林), 可渗透 (20 分钟, 0.25% TritonX-100/PBS) 并使用与 RNA 病毒基因组中所含的 (+) 链 NS5B (或其他基因) 互补的单链 ³³P RNA 探针杂交 (整夜, 50°C)。洗涤细胞, 用 RNase 处理, 洗涤, 加热至 65°C, 并在 Top-Count 中计数。复制的抑制读取为每分钟计数 (cpm) 的减少。
- [0188] 被选择含有亚基因组复制子的人类 HuH-7 肝癌细胞携带一胞质 RNA, 其由 HCV 5' 非翻译区 (NTR)、新霉素可选标记、EMCV IRES (内部核糖体进入部位) 和 HCV 非结构蛋白 NS3 至 NS5B、随后是 3' NTR 组成。
- [0189] 在复制试验中测试的代表性化合物显示 EC₅₀ 小于 100 微摩尔。

[0190] C. 细胞内代谢试验

[0191] 还评价本发明的化合物进入人类肝癌细胞系并在细胞内转化成相应的核苷 5' - 单 -、二 - 和三磷酸酯的能力。

[0192] HuH-7 和 HBI10A 两个细胞系用于本发明化合物的细胞内代谢研究。HuH-7 是人类肝癌细胞系, HBI10A 表示衍生自携带 HCV 双顺反子复制子的 HuH-7 细胞的克隆系。HuH-7 细胞置于含 10% 胎牛血清的完全 Dulbecco 氏改良 Eagle 氏培养基中, HBI10A 细胞置于含 G418 (0.8mg/mL) 的同样培养基中, 1.5×10^6 细胞 / 60-mm 皿, 以至于在加入化合物时有 80% 的细胞汇合。氟化物以 $2 \mu\text{M}$ 在细胞培养基中培养 3 或 23 小时。收集细胞, 用磷酸盐缓冲的盐水洗涤并计数。然后在 70% 甲醇、20mM EDTA、20mM EGTA 中提取细胞, 并离心。干燥该胞溶产物, 在连接至在线 β -RAM 闪烁探测器 (IN/US Systems) 的 Waters Millenium 系统上使用离子对反相 (C-18) HPLC 分析放射性标记的核苷酸。HPLC 流动相由 (a) 含 2mM 四丁铵氢氧化物的 10mM 磷酸钾和 (b) 含 10mM 磷酸钾和 2mM 四丁铵氢氧化物的 50% 甲醇组成。通过和标准比较保留时间进行峰鉴别。活性表示为在 10^6 HuH-7 或 HBI10A 细胞中检测的核苷酸的皮摩尔数。

[0193] 还在下述的反筛选中评价本发明的核苷氨基磷酸芳基酯的细胞毒性和抗病毒特异性。

[0194] C. 反筛选

[0195] 在下列试验中测量本发明核苷氨基磷酸芳基酯抑制人类 DNA 聚合酶的能力。

[0196] a. 人类 DNA 聚合酶 α 和 β 的抑制:

[0197] 反应条件:

[0198] 50 μL 反应体积

[0199] 反应缓冲剂组分:

[0200] 20mM Tris-HCl, pH 7.5

[0201] 200 $\mu\text{g/mL}$ 牛血清白蛋白

[0202] 100mM KCl

[0203] 2mM β -巯基乙醇

[0204] 10mM MgCl_2

[0205] 1.6 μM dA, dG, dC, dTTP

[0206] α - ^{33}P -dATP

[0207] 酶和模板:

[0208] 0.05mg/mL 缺口的 (gapped) 鱼精 (fish sperm) DNA 模板

[0209] 0.01U/ μL DNA 聚合酶 α 或 β

[0210] 缺口鱼精 DNA 模板的制备

[0211] 将 5 μL 1M MgCl_2 加入 500 μL 活化的鱼精 DNA (USB 70076);

[0212] 升温至 37°C, 并加入 30 μL 65U/ μL 的核酸外切酶 III (GibcoBRL18013-011);

[0213] 在 37°C 下培养 5 分钟;

[0214] 通过加热至 65°C 10 分钟终止反应;

[0215] 取 50 ~ 100 μL 等份装载到用 20mM Tris-HCl, pH 7.5 平衡的 Bio-spin 6 色谱柱 (Bio-Rad 732-6002) 上;

[0216] 通过在 1000Xg 下离心洗脱 4 分钟；

[0217] 收集洗脱物，并在 260nm 下测定吸光度用来测定浓度。

[0218] DNA 模板稀释入适量的 20mM Tris-HCl, pH7.5, 酶稀释入适量的 20mM Tris-HCl (含 2mM β -巯基乙醇) 和 100mM KCl。模板和酶移液入微量离心管或 96 孔板中。还分别使用酶稀释缓冲剂和测试化合物溶剂准备排除酶的空白反应和排除测试化合物的对照反应。使用含上面所列组分的反应缓冲剂启动反应。该反应在 37°C 下温育 1 小时。加入 20 μ L 0.5M EDTA 猝灭反应。50 μ L 猝灭的反应物点到 WhatmanDE81 滤盘上并风干。用 150mL 0.3M 甲酸铵, pH 8, 反复洗涤滤盘, 直到 1mL 洗涤液 < 100cpm。用 150mL 绝对乙醇洗涤盘两次, 用 150mL 无水乙醚洗涤一次, 干燥, 在 5mL 闪烁流体中计数。

[0219] 根据下列等式计算抑制百分比：

[0220] 抑制 % = $[1 - (\text{测试反应中 cpm} - \text{空白中 cpm}) / (\text{对照反应中 cpm} - \text{空白中 cpm})] \times 100$ 。

[0221] b. 人类 DNA 聚合酶 γ 的抑制：

[0222] 测量对人类 DNA 聚合酶 γ 的抑制的效力, 反应物包括: 0.5ng/ μ L 酶; 10 μ M dATP, dGTP, dCTP 和 TTP; 2 μ Ci/反应 [α -³³P]-dATP, 和 0.4 μ g/ μ L 活化的鱼精 DNA (从 US Biochemical 购得) 于含 20mM Tris pH 8, 2mM β -巯基乙醇、50mM KCl、10mM MgCl₂ 和 0.1 μ g/ μ L BSA 的缓冲剂中。该反应在 37°C 下进行 1 小时, 通过加入 0.5M EDTA 至终浓度为 142mM 猝灭反应。通过阴离子交换滤器结合和闪烁计数量化产物的形成。在最高达 50 μ M 测试化合物。

[0223] 根据下列等式计算抑制百分比：

[0224] 抑制 % = $[1 - (\text{测试反应中 cpm} - \text{空白中 cpm}) / (\text{对照反应中 cpm} - \text{空白中 cpm})] \times 100$ 。

[0225] 在下列试验中测量本发明的核苷氨基磷酸芳基酯抑制 HIV 感染性和 HIV 传播的能力。

[0226] c. HIV 感染性试验

[0227] 使用表达 CXCR4 和 CCR5 二者 (选择用于低背景 β -半乳糖苷酶 (β -gal) 表达的 HeLa Magi 细胞变体进行反应。细胞感染 48 小时, 使用化学发光底物 (Galactolight Plus, Tropix, Bedford, MA) 量化由整合的 HIV-1LTR 启动子产生的 β -gal。在始于 100 μ M 连续两倍稀释液中进行抑制剂滴定 (平行两份); 相对于对照感染计算在每个浓度时的抑制百分比。

[0228] d. HIV 传播的抑制

[0229] 本发明的化合物抑制人类免疫缺陷病毒 (HIV) 传播的能力是通过美国专利 US. 5, 413, 999 (May 9, 1995), 和 J. P. Vacca 等, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91 :4096-4100 (1994) 中所描述的方法进行测量的, 其全部内容在此引为参考。

[0230] 还在如下试验中所述, 在基于 MTS- 细胞的试验中, 针对含亚基因组 HCV 复制子的培养肝癌 (HuH-7) 细胞的细胞毒性对本发明的核苷氨基磷酸芳基酯进行了筛选。Huh-7 细胞系如 H. Nakabayashi 等, *Cancer Res.*, 42 :3858 (1982) 所述。

[0231] e. 细胞毒性试验：

[0232] 细胞培养物在适当的培养基中制得, 对悬浮培养物, 浓度约 1.5×10^5 细胞 /mL, 温

育 3 天,对附着培养物,浓度在 5.0×10^4 细胞 /mL,温育 3 天。99 μ L 细胞培养物转入 96 孔组织培养物处理过的板中,加入 1 μ L 100 倍终浓度的溶于 DMSO 的测试化合物。该板在 37°C 下 5% CO₂ 中温育一指定时间段。温育期过后,向每个孔中加入 20 μ L CellTiter 96Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay 试剂 (MTS) (Promega),该板在 37°C 下 5% CO₂ 中再温育一段时间,最多 3 小时。振荡该板以充分混合,使用板读取器在 490nm 下读取吸光度。在加入 MTS 试剂前准备已知细胞数的悬浮培养细胞的标准曲线。代谢活性细胞还原 MTS 为甲臞。甲臞在 490nm 吸收。比较在 490nm 下有化合物存在的吸光度和没有加入任何化合物的细胞中的吸光度。

[0233] 参阅:Cory,A.H.等,“Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture,”Cancer Commun. 3:207(1991)。

[0234] 采用下列试验测量本发明的化合物抗其他 RNA 依赖性 RNA 病毒的活性。

[0235] a. 化合物体外抗鼻病毒的抗病毒活性测定(细胞病变效果抑制试验)

[0236] 试验条件如 Sidwell 和 Huffman,“Use of disposable microtissue culture plates for antiviral and interferon induction studies,”Appl. Microbiol. 22:797-801(1971) 所述。

[0237] 病毒:

[0238] 如 Sidwell 和 Huffman 参考文献中所述,鼻病毒 2 型 (RV-2),HGP 株,与 KB 细胞和培养基 (0.1% NaHCO₃, 不含抗生素) 一起使用。从 ATCC 获得的病毒,来自于患轻度急性发热性上呼吸道疾病的成年男性的咽喉拭子。

[0239] 鼻病毒 9 型 (RV-9),211 株,和鼻病毒 14 型 (RV-14), Tow 株,也从 Rockville, MD 的美国典型培养物保藏中心 (ATCC) 获得。RV-9 来自人类咽喉洗涤物,并且 RV-14 来自患上呼吸道疾病的年轻成人的咽喉拭子。这两种病毒与 HeLa Ohio-1 细胞 (Dr. Fred Hayden, Univ. of VA) (为人类颈上皮样癌细胞) 一起使用。含 5% 胎牛血清 (FBS) 和 0.1% NaHCO₃ 的 MEM (Eagle 氏极限必需培养基) 作为生长培养基。

[0240] 所述三种病毒的抗病毒测试培养基是含 5% FBS、0.1% NaHCO₃、50 μ g 庆大霉素 / mL 和 10mM MgCl₂ 的 MEM。

[0241] 用于试验本发明化合物的最大浓度为 2000 μ g/mL。加入测试化合物后,大约 5 分钟后,向试验板中加入病毒。适当的对照也进行。试验板在 37°C 下,湿润空气和 5% CO₂ 中温育。通过在显微镜下观察形态变化,监测对照细胞的细胞毒性。病毒 CPE 数据和毒性对照数据的回归分析得出 ED50 (50% 有效剂量) 和 CC50 (50% 细胞毒浓度)。通过如下公式计算选择指数 (SI): $SI = CC50 \div ED50$ 。

[0242] b. 化合物体外抗登革热、Banza 和黄热病的抗病毒活性的测定 (CPE 抑制试验)

[0243] 上述 Sidwell 和 Huffman 参考文献提供了试验的详情。

[0244] 病毒:

[0245] 从疾病控制中心获得登革热病毒 2 型,新几内亚株。两个非洲绿猴肾细胞系用于培养该病毒 (Vero), 并进行抗病毒测试 (MA-104)。由感染的小鼠脑制备的黄热病病毒,17D 株,和从南非发热男孩的血清分离的 Banza 病毒, H336 株,均得自 ATCC。Vero 细胞被用于这两种病毒和试验。

[0246] 细胞和培养基:

[0247] MA-104 细胞 (BioWhittaker, Inc., Walkersville, MD) 和 Vero 细胞 (ATCC) 用于培养基 199 (含 5% FBS 和 0.1% NaHCO₃, 不含抗生素)。

[0248] 用于登革热、黄热病和 Banzī 病毒的试验培养基是 MEM, 含 2% FBS、0.18% NaHCO₃、50 μg 庆大霉素 /mL。

[0249] 根据 Sidwell 和 Huffman 参考文献和类似上述鼻病毒抗病毒测试的方式进行本发明的化合物的抗病毒测试。对于每种所述病毒, 在 5 ~ 6 天后达到足够的细胞病变效应 (CPE) 读数。

[0250] c. 化合物在体外抗西尼罗河病毒的抗病毒活性的测定 (CPE 抑制试验)

[0251] 上述 Sidwell 和 Huffman 参考文献提供了试验的详情。西尼罗河病毒, 来源于乌鸦脑的纽约分离物, 从疾病控制中心获得。Vero 细胞如上生长和使用。试验培养基是 MEM, 含 1% FBS、0.1% NaHCO₃、50 μg 庆大霉素 /mL。

[0252] 根据类似于用于鼻病毒活性试验的方式的 Sidwell 和 Huffman 方法进行本发明化合物的抗病毒测试。在 5 ~ 6 天后达到足够的细胞病变效应 (CPE) 读数。

[0253] d. 化合物在体外抗鼻病毒、黄热病病毒、登革热病毒、Banzī 病毒和西尼罗河病毒的抗病毒活性测定 (中性红摄取试验)

[0254] 进行上述 CPE 抑制试验后, 使用另外的细胞病变检测方法, 其描述在 “Microtiter Assay for Interferon: Microspectrophotometric Quantitation of Cytopathic Effect,” Appl. Environ. Microbiol. 31:35-38 (1976)。使用 Model EL309 微量板读取器 (Bio-Tek Instruments Inc.) 读取试验板。如上计算 ED50 和 CD50。

[0255] 药物制剂的实例

[0256] 作为本发明化合物的口服组合物一个具体实施方式, 将 50mg 实施例 1 或实施例 2 的化合物与充分细碎的乳糖配制, 总量为 580 ~ 590mg, 并填充 0 号硬明胶胶囊中。

[0257] 已经参照具体实施方式描述并举例说明了本发明, 但本领域技术人员应该理解, 其中可进行各种变化、改进和替换而不脱离本发明的精神和范围。例如, 由于针对 HCV 感染程度, 被病人的响应度不同, 结果, 除上文所述的优选剂量外的有效剂量可能是适用的。同样, 观察到的药理学反应可能根据和依赖于所选特定活性化合物或是否存在药物载体以及制剂类型和使用的用药模式而变化, 且遵循本发明目的和实践考虑了这样的预期变化或结果差异。因此, 本发明仅仅被权利要求范围限制, 且权利要求在合理情况下尽可能广泛地进行解释。