



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101815533 A

(43) 申请公布日 2010.08.25

(21) 申请号 200880022055.5

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2008.05.05

A61K 45/06 (2006.01)

(30) 优先权数据

A61P 31/12 (2006.01)

60/927,581 2007.05.04 US

A61K 31/7068 (2006.01)

60/931,425 2007.05.23 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2009.12.25

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2008/005758 2008.05.05

(87) PCT申请的公布数据

W02008/137126 EN 2008.11.13

(71) 申请人 弗特克斯药品有限公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 A·邝 N·马尼 周毅 林超

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001

代理人 关立新 郭文洁

权利要求书 4 页 说明书 18 页 序列表 5 页
附图 0 页

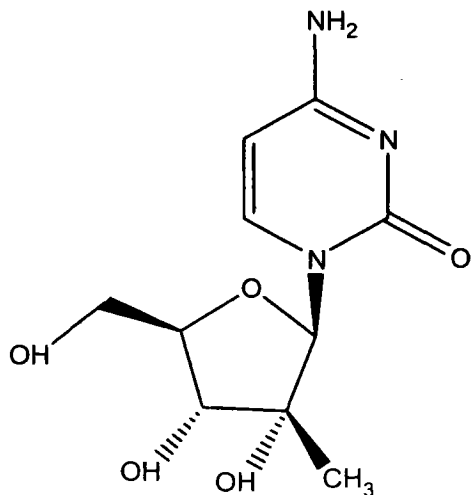
(54) 发明名称

用于治疗 HCV 感染的组合治疗

(57) 摘要

本发明涉及用于 HCV 治疗的包含蛋白酶抑制剂和聚合酶抑制剂的治疗组合。本发明也涉及包含 VX-950 和聚合酶抑制剂的治疗组合。应用本发明治疗组合治疗患者内的 HCV 感染或减轻其一种或多种症状的方法,也在本发明的范围内。本发明还提供包含本发明组合物的药盒。

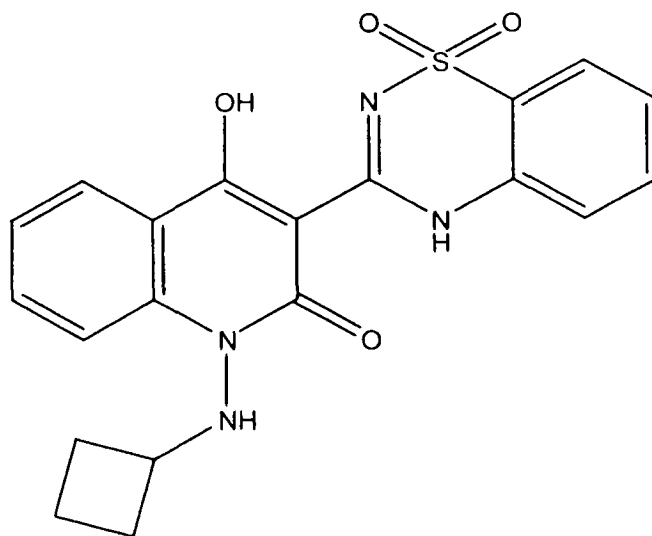
1. 包含蛋白酶抑制剂和聚合酶抑制剂的治疗组合。
2. 包含 VX-950 和聚合酶抑制剂的治疗组合。
3. 权利要求 2 的治疗组合,其中聚合酶抑制剂为式 (I) 化合物



(I)

或其药学上可接受的盐。

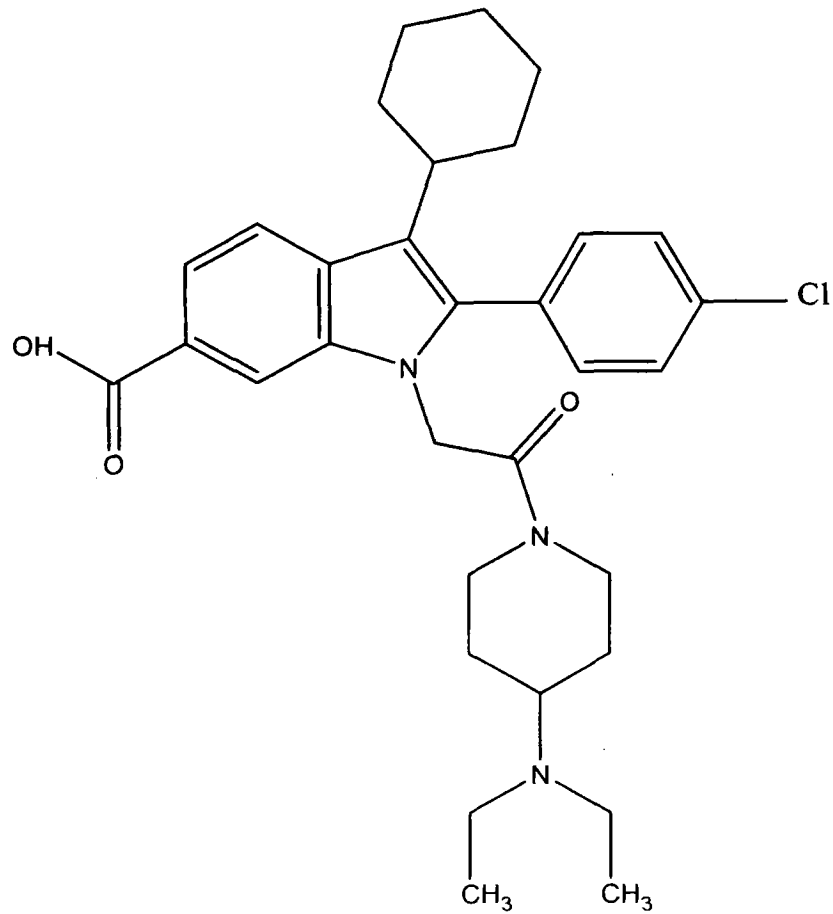
4. 权利要求 2 的治疗组合,其中聚合酶抑制剂为式 (II) 化合物



(II)

或其药学上可接受的盐。

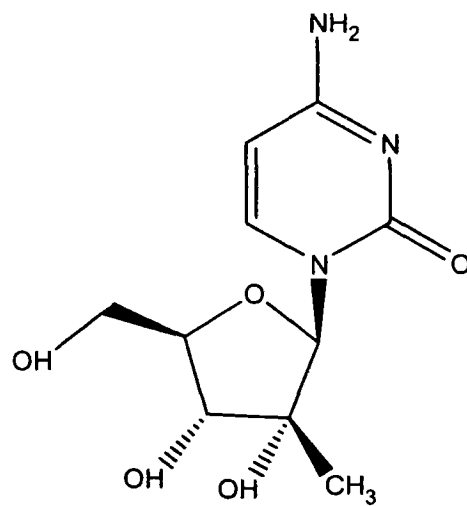
5. 权利要求 2 的治疗组合,其中聚合酶抑制剂为式 (III) 化合物



(III)

或其药学上可接受的盐。

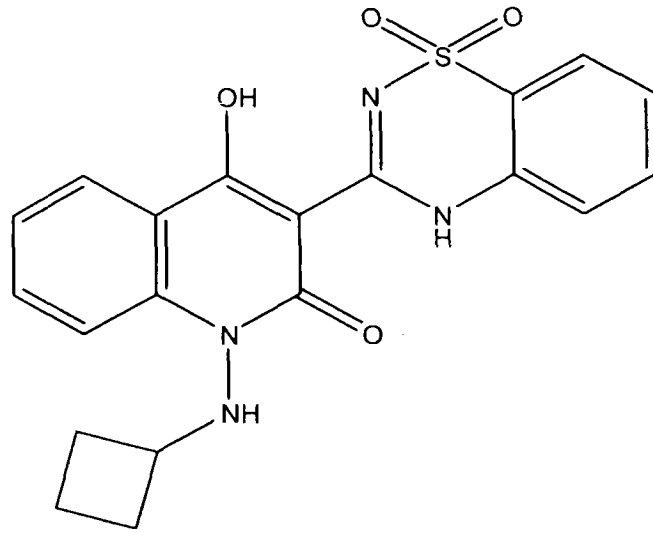
6. 治疗组合,其包含 VX-950 和式 (I) 化合物



(I)

或其药学上可接受的盐。

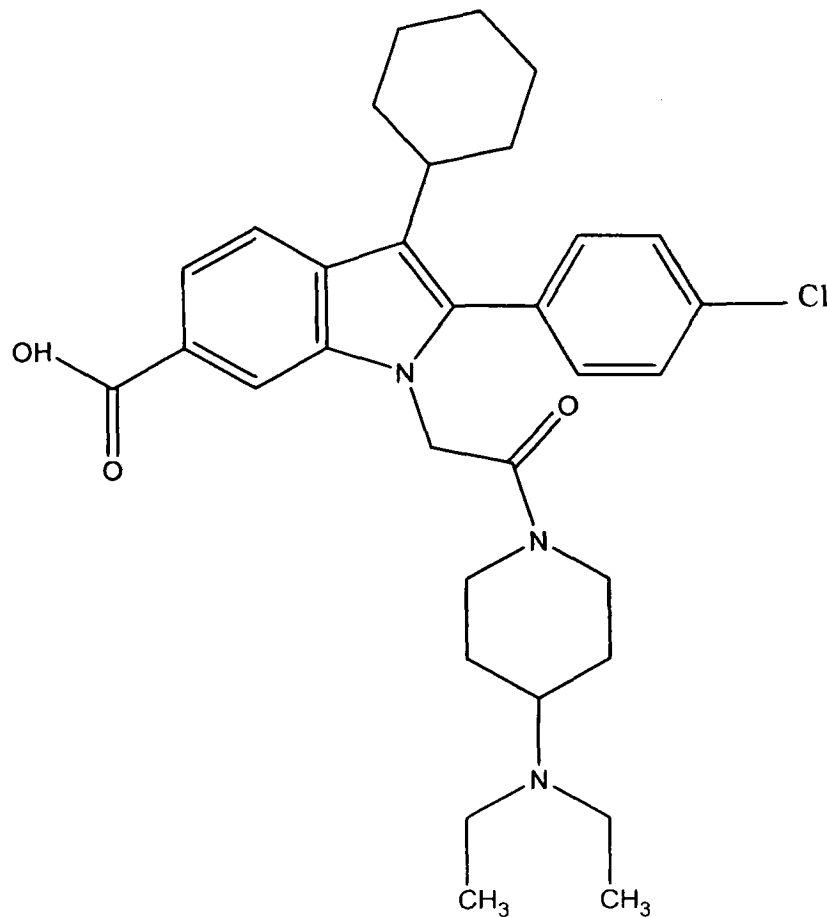
7. 治疗组合,其包含 VX-950 和式 (II) 化合物



(II)

或其药学上可接受的盐。

8. 治疗组合,其包含 VX-950 和式 (III) 化合物



(III)

或其药学上可接受的盐。

9. 药盒,其包括:(i) 根据权利要求 1-8 任何一项的治疗组合;和利用所述组合的说明

书。

10. 药盒,其包括:(i)多个 VX-950 制剂;(ii)多个聚合酶抑制剂制剂;和(iii)利用所述制剂的说明书。

11. 治疗患者内 HCV 感染或减轻其一种或多种症状的方法,其包括给患者施用根据权利要求 1-8 任何一项治疗组合的步骤。

12. 根据权利要求 11 的方法,其中 HCV 感染为基因型。

13. 根据权利要求 11 或 12 的方法,其中所述患者为首次治疗的患者。

14. 根据权利要求 11 或 12 的方法,其中所述患者对干扰素单一疗法是非响应性的。

15. 根据权利要求 11 或 12 的方法,其中所述患者对应用利巴韦林和干扰素的组合治疗是非响应性的。

16. 在需要的患者中减少 HCV-RNA 水平的方法,其包括给所述患者施用根据权利要求 1-8 任何一项治疗组合的步骤。

17. 根据权利要求 16 的方法,其中所述患者的 HCV-RNA 水平被减少至小于可探测的水平。

18. 药物方案,其包括给需要的患者施用根据权利要求 1-8 任何一项的治疗组合,直至患者的 HCV-RNA 水平低于可探测的水平。

19. 治疗患者内的 HCV 感染或减轻其一种或多种症状的方法,其包括施用包含式 I、II 或 III 的聚合酶抑制剂的组合物。

20. 权利要求 19 的方法,其中患者感染 HCV 变体。

21. 权利要求 20 的方法,其中组合物进一步包含 VX-950。

22. 治疗患者内的 HCV 感染或减轻其一种或多种症状的方法,其包括施用包含式 I、II 或 III 的聚合酶抑制剂和 VX-950 的组合物。

23. 权利要求 22 的方法,其中患者感染 HCV 变体。

24. 消除或减少细胞 HCV 感染的方法,其包括用包含式 I、II 或 III 的聚合酶抑制剂的组合物接触细胞。

25. 权利要求 24 的方法,其中细胞包含 HCV 变体。

26. 权利要求 25 的方法,其中组合物进一步包含 VX-950。

27. 消除或减少细胞 HCV 感染的方法,其包括用包含式 I、II 或 III 的聚合酶抑制剂和 VX-950 的组合物接触细胞。

28. 权利要求 27 的方法,其中细胞包含 HCV 变体。

用于治疗 HCV 感染的组合治疗

相关申请的交叉参照

[0001] 本申请要求 2007 年 5 月 4 日提交的美国临时申请序列第 60/927, 581 号和 2007 年 5 月 23 日提交的美国临时申请序列第 60/931, 425 号的优先权, 在此引入其全部内容作为参考。

发明背景

[0002] 丙型肝炎病毒 (“HCV”) 感染是令人瞩目的人类医学问题。HCV 被认为是大多数非甲非乙型肝炎病例的致病因素, 据估计全球人类血清流行率为 3% [A. Alberti 等, “Natural History of Hepatitis C,” *J. Hepatology*, 31, (Suppl. 1), 第 17-24 页 (1999)]。仅在美国, 已有近四百万人感染 [M.J. Alter 等, “The Epidemiology of Viral Hepatitis in the United States,” *Gastroenterol. Clin. North Am.*, 23, 第 437-455 页 (1994); M. J. Alter “Hepatitis C Virus Infection in the United States,” *J. Hepatology*, 31, (Suppl. 1), 第 88-91 页 (1999)]。

[0003] 当首次暴露于 HCV, 仅有约 20% 的感染个体发展为急性临床肝炎, 而其他感染似乎自发地消退。不过, 在几乎 70% 的情形中, 病毒建立起慢性感染并持续数十年 [S. Iwarson, “The Natural Course of Chronic Hepatitis,” *FEMS Microbiology Reviews*, 14, 第 201-204 页 (1994); D. Lavanchy, “Global Surveillance and Control of Hepatitis C,” *J. Viral Hepatitis*, 6, 第 35-47 页 (1999)]。这通常导致复发和进行性恶化性肝脏炎症, 其经常引起更为严重的疾病状态, 例如肝硬化和肝细胞癌 [M. C. Kew, “Hepatitis C and Hepatocellular Carcinoma,” *FEMS Microbiology Reviews*, 14, 第 211-220 页 (1994); I. Saito 等, “Hepatitis C Virus Infection is Associated with the Development of Hepatocellular Carcinoma,” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 第 6547-6549 页 (1990)]。不幸的是, 没有普遍有效的治疗可以削弱慢性 HCV 的进展。

[0004] HCV 基因组编码 3010-3033 个氨基酸的多蛋白 [Q. L. Choo 等, “Genetic Organization and Diversity of the Hepatitis C Virus,” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 第 2451-2455 页 (1991); N. Kato 等, “Molecular Cloning of the Human Hepatitis C Virus Genome From Japanese Patients with Non-A, Non-B Hepatitis,” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 第 9524-9528 页 (1990); A. Takamizawa 等, “Structure and Organization of the Hepatitis C Virus Genome Isolated From Human Carriers,” *J. Virol.*, 65, 第 1105-1113 页 (1991)]。HCV 非结构性 (NS) 蛋白被假定为病毒复制提供必需的催化性机构。NS 蛋白起源于多蛋白的蛋白水解性裂解 [R. Bartenschlager 等, “Nonstructural Protein 3 of the Hepatitis C Virus Encodes a Serine-Type Proteinase Required for Cleavage at the NS3/4 and NS4/5 Junctions,” *J. Virol.*, 67, 第 3835-3844 页 (1993); A. Grakoui 等, “Characterization of the Hepatitis C Virus-Encoded Serine Proteinase: Determination of Proteinase-Dependent Polyprotein Cleavage Sites,” *J. Virol.*, 67, 第 2832-2843 页 (1993); A. Grakoui 等, “Expression

and Identification of Hepatitis C Virus Polyprotein Cleavage Products,” J. Virol., 67, 第 1385-1395 页 (1993); L. Tomei 等, “NS3 is a serine protease required for processing of hepatitis C virus polyprotein”, J. Virol., 67, 第 4017-4026 页 (1993)]。

[0005] HCV NS 蛋白 3(NS3) 含有丝氨酸蛋白酶活性, 这有助于加工大多数病毒酶, 因而其被视为病毒复制和感染性所必需的。已知在黄热病病毒 NS3 蛋白酶中的突变会降低病毒的感染性 [Chambers, T. J. 等, “Evidence that the N-terminal Domain of Nonstructural Protein NS3 From Yellow Fever Virus is a Serine Protease Responsible for Site-Specific Cleavages in the Viral Polyprotein,” Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 第 8898-8902 页 (1990)]。已经显示 NS3 的前 181 个氨基酸 (病毒多蛋白的第 1027-1207 个残基) 含有加工 HCV 多蛋白全部四个下游位点的 NS3 丝氨酸蛋白酶结构域 [C. Lin 等, “Hepatitis C Virus NS3 Serine Proteinase: Trans-Cleavage Requirements and Processing Kinetics”, J. Virol., 68, 第 8147-8157 页 (1994)]。

[0006] HCV NS3 丝氨酸蛋白酶及其有关辅因子 NS4A 有助于加工全部病毒酶, 因而被视为病毒复制所必需的。这种加工似乎类似于由人免疫缺陷病毒天冬氨酰蛋白酶所进行的加工, 该蛋白酶也参与病毒酶加工。HIV 蛋白酶抑制剂抑制病毒蛋白质加工, 其为有效的人用抗病毒剂, 这表明干扰病毒生命周期的这一阶段可以获得治疗活性剂。所以, HCV NS3 丝氨酸蛋白酶也是一个有吸引力的药物发现靶标。

[0007] 直到最近, HCV 疾病唯一建立的疗法是干扰素治疗。不过, 干扰素具有显著的副作用 [M. A. Walker 等, “Hepatitis C Virus: An Overview of Current Approaches and Progress,” DDT, 4, 第 518-29 页 (1999); D. Moradpour 等, “Current and Evolving Therapies for Hepatitis C,” Eur. J. Gastroenterol. Hepatol., 11, 第 1199-1202 页 (1999); H. L. A. Janssen 等 “Suicide Associated with Alfa-Interferon Therapy for Chronic Viral Hepatitis,” J. Hepatol., 21, 第 241-243 页 (1994); P. F. Renault 等, “Side Effects of Alpha Interferon,” Seminars in Liver Disease, 9, 第 273-277 页 (1989)], 且仅在一部分 (约 25%) 病例中产生长期的缓解作用 [O. Weiland, “Interferon Therapy in Chronic Hepatitis C Virus Infection”, FEMS Microbiol. Rev., 14, pp. 279-288 (1994)]。最近介绍了聚乙二醇化形式的干扰素 (PEG-INTRON[®] 和 PEGASYS[®]) 和利巴韦林与聚乙二醇化干扰素 (REBETROL[®]) 的组合治疗, 这使得缓解率仅有适度提高, 副作用仅有部分减少。而且, 有效抗-HCV 疫苗的前景仍然是不确定的。

[0008] 因而, 需要更有效的抗-HCV 疗法。这类抑制剂将具有治疗潜力作为蛋白酶抑制剂, 尤其作为丝氨酸蛋白酶抑制剂, 更尤其作为 HCV NS3 蛋白酶抑制剂。具体而言, 这类化合物可以用作抗病毒剂, 特别是用作抗-HCV 剂。

发明概述

[0009] 本发明涉及包含 VX-950 和聚合酶抑制剂的治疗组合。

[0010] 本发明还涉及治疗患者内的 HCV 感染或减轻其一种或多种症状的方法, 包括给所述患者施用本发明的治疗组合。

[0011] 本发明的再一个目的是提供用于患者内的 HCV 感染的药物方案。发明详述定义

[0012] 为了本发明的目的,化学元素根据 CAS 版本, Handbook of Chemistry and Physics, 第 75 版的元素周期表进行鉴定。此外,有机化学的一般法则描述于“Organic Chemistry”, Thomas Sorrell, University Science Books, Sausalito :1999, 和“March's Advanced Organic Chemistry”, 第 5 版, Ed. :Smith, M. B. 和 March, J., John Wiley & Sons, New York :2001, 其全部内容在此引入作为参考。

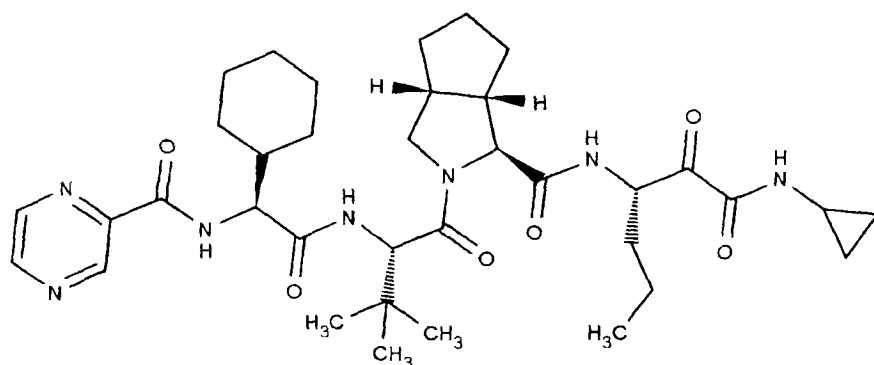
[0013] 如本文所述,本发明化合物可任选被一个或多个取代基取代,或通过本发明的特定组、亚组、和种类作为举例说明。

[0014] 如本文所用,“患者”是指哺乳动物,包括人类。

[0015] 本文所用的术语“聚合酶抑制剂,”是指抑制 HCV RNA 依赖性 RNA 聚合酶 (RdRp) 活性的化合物。下述发明的聚合酶抑制剂包括但不限于式 I、II 和 III 的化合物。聚合酶抑制剂可为核苷或非核苷抑制剂。核苷聚合酶抑制剂结合酶的底物;而非核苷聚合酶结合不同的位点却依然能抑制该酶,例如变构抑制剂。

[0016] 本文所用的术语“蛋白酶抑制剂,”是指为有效抑制哺乳动物 HCV NS3 蛋白酶功能的试剂(化合物或生物制品)。下述发明的蛋白酶抑制剂包括但不限于 VX-950。

[0017] 如本文所用,“VX-950”是指以下所示的 HCV 抑制剂,且描述于 PCT 公布号 WO 02/18369, 在此将其全部内容引入作为参考。



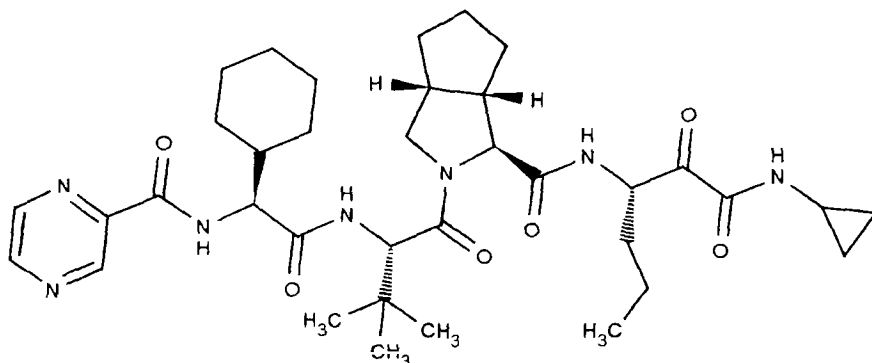
[0018] 本文所用的术语“治疗组合”意指一种或多种活性药物即具有治疗实用性的化合物的组合。一般地,本发明治疗组合中的各种这样的化合物将以包含该种化合物和药学上可接受的载体的药物组合物存在。本发明治疗组合中的化合物可以同时或作为方案的一部分分开施用。

[0019] 除非另有说明,本文所述的结构还表示包括该结构的所有异构体(例如对映体、立体异构体、和几何异构体(或构象异构体))形式;例如各个不对称中心的 R 和 S 构型,(Z) 和 (E) 双键异构体,以及 (Z) 和 (E) 构象异构体。因此本发明化合物的单一立体化学的异构体以及对映体、立体异构体、和几何异构体(或构象异构体)的混合物均在本发明的范围内。除非另有说明,本发明化合物的所有互变异构形式均在本发明的范围内。此外,除非另有说明,本文所述的结构还表示包括仅存在一种或多种同位素富集原子上不同的化合物。例如,除了氘或氚代替氢、或 ^{13}C - 或 ^{14}C - 富集碳代替碳之外具有所述结构的化合物均在本发明的范围内。这样的化合物有用于例如作为生物测定的分析工具或探针。治疗组合

[0020] 本发明涉及用于 HCV 治疗的包含蛋白酶抑制剂和聚合酶抑制剂的治疗组合。蛋白酶抑制剂

[0021] 在本发明的一个方面,蛋白酶抑制剂为 VX-950。

[0022] VX-950, 具有其下示结构的 HCV 抑制剂, 是这样的所需化合物。VX-950 描述于 PCT 公布号 WO 02/18369, 在此将其全部内容引入作为参考。



[0023] VX-950, 有效和特异的 NS3-4A 蛋白酶抑制剂, 被证实在感染 HCV 基因型第 1 型 (genotype 1) 的受试者 Ib 相试验中具有实质的抗病毒活性 (Study VX04-950-101)。受试者对治疗响应的程度和观察到的病毒反弹速率部分是由于基因型对蛋白酶抑制剂的敏感性差异。HCV 的快速复制速率随同其聚合酶的弱保真度会引起其基因组突变积累 [P. Simmonds, "Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus-15 yearson," J. Gen. Virol., 85, pp. 3173-88 (2004)]。蛋白酶区域的序列变异性对酶的催化性效率或抑制剂结合的影响程度是未知的。此外, 在用抗病毒治疗治疗的受试者中多数具有显著序列变异的病毒基因组的生殖存在潜在出现的耐药性病毒问题。事实上, 对抗病毒药物例如 HIV 蛋白酶抑制剂的耐药性是已被充分纪录的 [Johnson 等, Top. HIV Med., 12, pp. 119-24 (2004)]。在 HCV 蛋白酶抑制剂存在下, 已经显示出在体外发展耐药性突变 [Lin 等, "In vitro studies of cross-resistance mutations against two hepatitis C virus serine protease inhibitors, VX-950 and BILN 2061," J. Biol. Chem., 280, pp. 36784-36791 (2005), 在此将其全部内容引入作为参考; Lin 等, "In vitro resistance studies of hepatitis C virus serine protease inhibitors, VX-950 and BILN 2061: Structural analysis indicates different resistance mechanisms," J. Biol. Chem., 279, pp. 17508-17514 (2004), 在此将其全部内容引入作为参考; Lu 等, Antimicrob Agents Chemother., 48, pp. 2260-6 (2004); Trozzi 等, "In vitro selection and characterization of hepatitis C virus serine protease variants resistant to an active-site peptide inhibitor," J. Virol. 77, pp. 3669-79 (2003)]。已经在 NS3 基因的 R155Q、A156T、和 D168V/A/Y 位置发现了对抗蛋白酶抑制剂 BILN 2061 的突变, 但在 NS4 区域或在蛋白酶切割位点还没有观察突变。还在体外 A156S 位置发现了对抗 VX-950 的突变。还在位点 156 (A156V/T) 显示体外发展抗 VX-950 和 BILN 2061 的交叉抗性突变 (Lin 等, 2005, supra)。

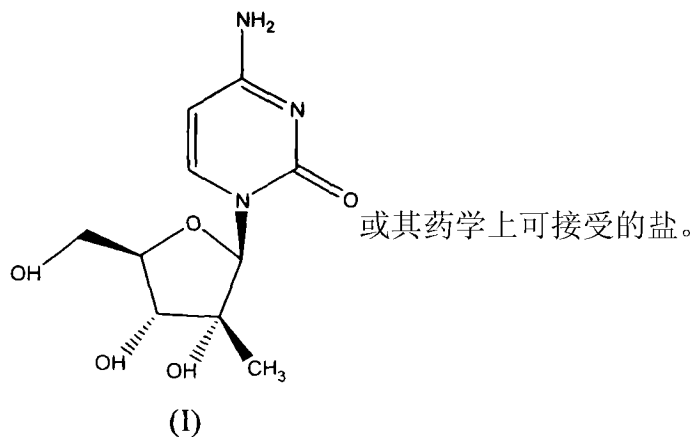
[0024] 在另外的实施方案中, 其蛋白酶抑制剂描述于国际专利申请公布号 W02007/025307, 在此将其全部内容引入。

[0025] 在又另外的实施方案中, 其蛋白酶抑制剂描述于一篇或多篇以下的出版物中: W0 1997/43310、US20020016294、W02001/81325、W02002/08198、W02001/77113、W02002/08187、W02002/08256、W02002/08244、W02003/006490、W02001/74768、W01999/50230、W01998/17679、W02002/48157、US20020177725、W02002/060926、US20030008828、

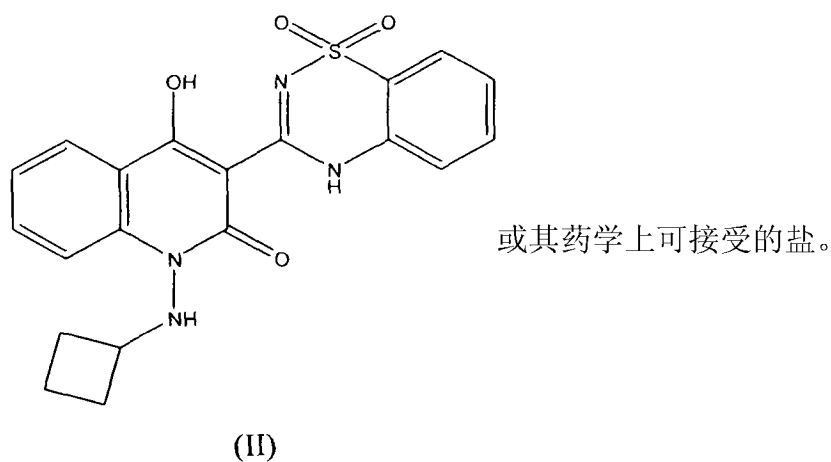
W02002/48116、W02001/64678、W02001/07407、W01998/46630、W02000/59929、W01999/07733、W02000/09588、US20020016442、W02000/09543、W01999/07734、US 6, 018, 020、US6, 265, 380、US 6, 608, 027、US20020032175、US20050080017、W01998/22496、US 5, 866, 684、W02002/079234、W02000/31129、W01999/38888、W01999/64442、W02004/072243、和 W02002/18369, 在此将其所有全部的内容引入作为参考。聚合酶抑制剂

[0026] 聚合酶抑制剂可为核苷或非核苷抑制剂。

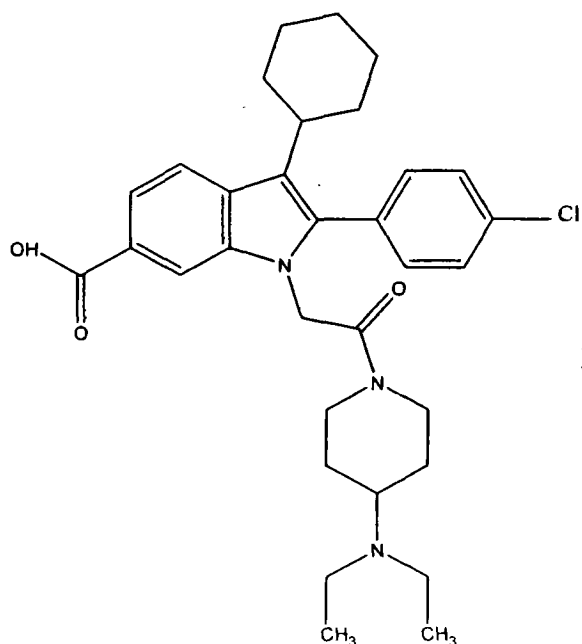
[0027] 在第一个方面的实施方案中, 聚合酶抑制剂为式 (I) 化合物



[0028] 在第一个方面的另一实施方案中, 聚合酶抑制剂为式 (II) 化合物



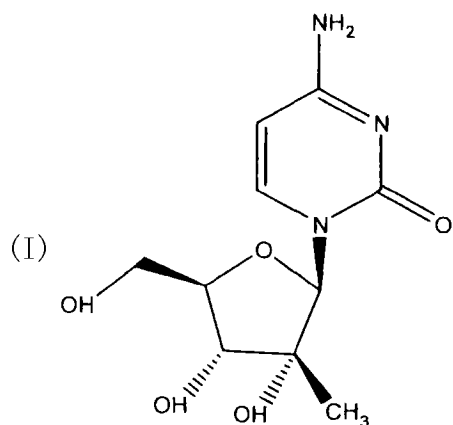
[0029] 在第一个方面的又一实施方案中, 聚合酶抑制剂为式 (III) 化合物



或其药学上可接受的盐。

(III)

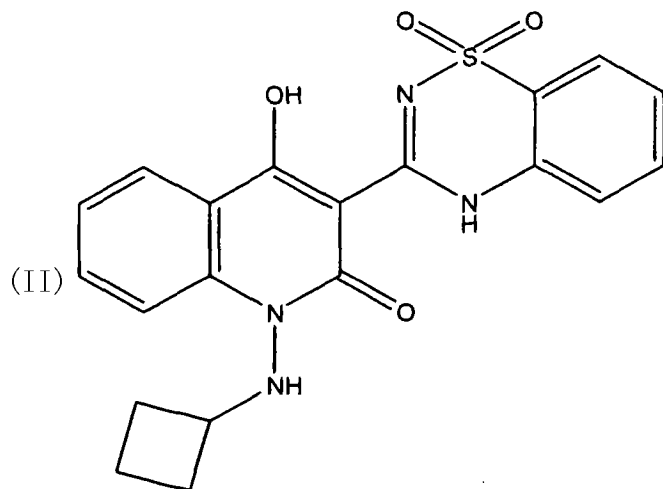
[0030] 在一个方面中,本发明提供 VX-950 和 聚合酶抑制剂化合物



或其药学上可接受盐的治疗组合。

(I)

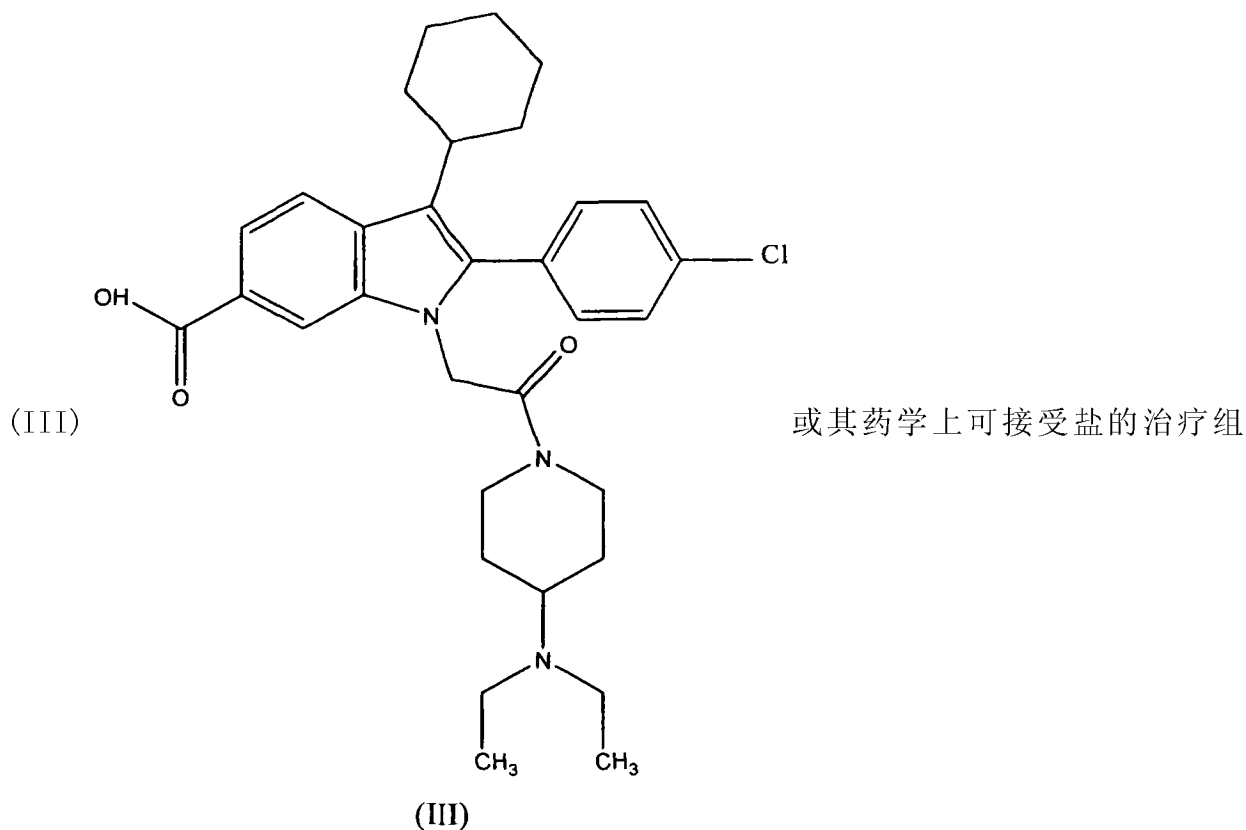
[0031] 在一个方面中,本发明提供 VX-950 和 聚合酶抑制剂化合物



或其药学上可接受盐的治疗组合。

(II)

[0032] 在一个方面中,本发明提供 VX-950 和 聚合酶抑制剂化合物



合。

[0033] 在另外的实施方案中, 聚合酶抑制剂选自本领域已知的抑制剂。例如, 聚合酶抑制剂描述于一篇或多篇以下的国际专利申请公布号中: W02008/011337; W02006/093801; W02005/019191; W02004/041818; W02007/150001; W02006/066079; W02006/137706; W02006/011719; W02004/108719; W02004/108068; W02004/033450; W02003/084953; W02008/019477; W02007/019674; W02006/007693; W02005/080388; W02004/065367; W02004/064925; W02003/010141; W02003/010140; W02003/007945; W02002/004425; W02008/021928; W02008/021927; W02007/143521; W02006/020082; W02004/014852; W02004/014313; W02003/026587; W02003/002518; W02002/079187; W02008/011521; W02008/008912; W02006/138744; W02007/039144; W02006/045613; W02006/045615; W02005/103045; W02005/092863; W02005/079799; W02004/076415; W02004/037818; W02004/009543; W02003/037894; W02003/037893; W02007/082554; W02007/028789; W02006/119975; W02006/046030; W02006/046039; W02006/029912; W02006/027628; W02006/008556; W02005/034941; W02004/087714; W02003/062211; W02002/006246; W02006/052013; W02005/080399; W02005/049622; W02005/014543; W02003/000254; W02007/023381; W02006/018725; W02004/074270; W02004/073599; W02003/082848; W02004/002977; W02004/002944; W02004/002940; W02006/117306; W02006/050035; W02002/100851; W02007/147794; W02007/088148; W02007/071434; W02006/100106; W02006/119646; W02005/112640; W02004/052885; W02004/052879; W02004/041201; W02007/092558; W02005/016932; W02004/091724; W02003/099824; W02003/099275; W02008/009078; W02007/034127; W02007/041632; W02007/005779; W02007/002639; W02006/065590; W02006/019831; W02004/080453; W02003/101993; W02003/082265;

W02001/077091 ;和 W01994/12192。在此以其全部引入各个上述公布的全部内容。

[0034] 在另外的实施例中,其聚合酶抑制剂描述于一篇或多篇以下的美国专利申请公布号中:US2004167123 ;US2004162285 ;US20040097492 ;US20040087577 ;US20070275947 ;US20070275930 ;US20070270406 ;US20070270405 ;US2005075376 ;US20070032488 ;US20030050320 ;US2005154056 ;US2006040927 ;US2006094706 ;US2006258682 ;US2006223834 ;US2006217390 ;US2006019976 ;US2005107364 ;US2006183751 ;US2006063821 ;和 US2005176701。在此以其全部引入各个上述公布的全部内容。

[0035] 在还进一步的实施例中,聚合酶抑制剂描述于美国专利号 7,112,600 或欧洲专利号 EP 1321463 中。在此引入各个上述公布的全部内容。

[0036] 在还进一步的实施方案中,聚合酶抑制剂选自 A-837093,由 Abbott Laboratories 研发;GS-9190,由 Gilead Sciences 研发;PF-868 和 PF-554,由 Pfizer 研发;R1479、R1626(R1479 的药物前体)、R7128、和 R1728,由 Roche Pharmaceuticals 研发;PST 7081 由 Pharmasset and Roche Pharmaceuticals 研发;IDX102、IDX184、NM107、称为瓦洛他滨 (Valopicitabine) 的 NM283(NM107 的药物前体),由 Idenix 研发;以及 VCH-916 和 VCH-759,由 ViroChem 研发;和 HCV-796,由 Wyeth 研发。其它聚合酶抑制剂由 Genelabs ;Boehringer Ingelheim ;Anadys ;Celera ;Schering ;和 Medavir 研发。

[0037] 根据另一个方面,本发明提供用于治疗患者 HCV 感染的药盒。本发明的药盒包括任何一种本发明的治疗组合。药盒进一步包括用于利用治疗组合的说明书。可制做药盒以符合患者的种类和类型或其它临床上相关因素的需要,所述因素例如年龄、体重、并发疾病 / 状况、HCV 感染的严重性和阶段、对先前治疗的响应性或非响应性、副作用的倾向等等。例如可制做药盒的治疗组合以适合体重例如 75kg 的患者的剂量。或者,可制做药盒的治疗组合以适合体重例如小于或等于 75kg 的患者的剂量。或者,可制做药盒的治疗组合以儿科应用的,其中儿童剂量依赖于因素例如年龄、体重、疾病的严重性等而变化。

[0038] 根据另一个方面,本发明提供药盒,其包括:(i) 多个 VX-950 组合物;(ii) 多个聚合酶抑制剂组合物;和 (iii) 利用上述组合物的说明书。

[0039] 在一个方面中,本发明提供应用本发明治疗组合治疗患者内 HCV 感染或减轻其一种或多种症状的方法。

[0040] 在一个实施方案中,HCV 感染为基因型。

[0041] 在另一个实施方案中,所述患者为首次治疗的患者。

[0042] 在另一个实施方案中,所述患者对干扰素单一疗法是非响应性的。

[0043] 在另一个实施方案中,所述患者对应用利巴韦林 (ribavirin) 和干扰素的组合治疗是非响应性的。

[0044] 在一个方面中,本发明提供在需要的患者中减少 HCV-RNA 水平的方法,包括给所述患者施用本发明治疗组合的步骤。

[0045] 在本发明的实施方案中,患者的 HCV-RNA 水平被减少至小于可探测的水平。

[0046] 在一个方面中,本发明提供药物方案,包括给需要的患者施用本发明的治疗组合,直至患者的 HCV-RNA 水平低于可探测的水平。制剂、给药、和用途

[0047] 如果在治疗组合中采用本发明化合物的药学上可接受的盐,这些盐优选是由无机或有机酸和碱衍生的。在这类酸盐中包括如下:乙酸盐、己二酸盐、藻酸盐、天冬氨酸盐、苯

甲酸盐、苯磺酸盐、硫酸氢盐、丁酸盐、柠檬酸盐、樟脑酸盐、樟脑磺酸盐、环戊烷 - 丙酸盐、二葡萄糖酸盐、十二烷基硫酸盐、乙磺酸盐、富马酸盐、葡庚酸盐 (glucoheptanoate)、甘油磷酸盐、半硫酸盐、庚酸盐、己酸盐、盐酸盐、氢溴酸盐、氢碘酸盐、2- 羟基乙磺酸盐、乳酸盐、马来酸盐、甲磺酸盐、2- 萘磺酸盐、烟酸盐、草酸盐、扑酸盐、果胶酸盐、过硫酸盐、3- 苯基丙酸盐、苦味酸盐、新戊酸盐、丙酸盐、琥珀酸盐、酒石酸盐、硫氰酸盐、甲苯磺酸盐和十一烷酸盐。碱盐包括铵盐；碱金属盐，例如钠和钾盐；碱土金属盐，例如钙和镁盐；有机碱的盐，例如二环己胺盐、N- 甲基 -D- 葡萄糖胺；和氨基酸的盐，例如精氨酸、赖氨酸的盐等。

[0048] 而且，含碱性氮的基团可以被试剂季铵化，所述试剂例如低级烷基卤化物，例如甲基、乙基、丙基和丁基的氯化物、溴化物和碘化物；硫酸二烷基酯，例如硫酸二甲基、二乙基、二丁基和二戊基酯；长链卤化物，例如癸基、月桂基、肉豆蔻基和硬脂基的氯化物、溴化物和碘化物；芳烷基卤化物，例如苄基和苯乙基的溴化物以及其他。由此得到水或油可溶性或可分散性的产物。

[0049] 用在本发明组合物和方法中的化合物还可以通过添加适当的官能度加以修饰，以增强选择性生物学性质。这类修饰是本领域已知的，包括增加渗入指定生物系统（例如血液、淋巴系统、中枢神经系统）的生物渗透性、增加口服生物利用度、增加溶解度以便注射给药、改变代谢和改变排泄速率的那些修饰。

[0050] 可用在这些组合物中的药学上可接受的载体包括但不限于离子交换剂、氧化铝、硬脂酸铝、卵磷脂、血清蛋白（例如人血清白蛋白）、缓冲物质（例如磷酸盐、甘氨酸、山梨酸、山梨酸钾）、饱和植物脂肪酸的偏甘油酯混合物、水、盐或电解质（例如硫酸鱼精蛋白、磷酸氢二钠、磷酸氢钾、氯化钠、锌盐、胶体二氧化硅、三硅酸镁）、聚乙烯吡咯烷酮、以纤维素为基础的物质、聚乙二醇、羧甲基纤维素钠、聚丙烯酸酯、蜡、聚乙烯 - 聚氧丙烯嵌段聚合物、聚乙二醇和羊毛脂。

[0051] 将本发明的治疗组合配制成用于哺乳动物施用的药物。在一个实施方案中，所述哺乳动物为人类。

[0052] 本发明的这类药物组合物可以通过口服、肠胃外、通过吸入喷雾、局部、直肠、鼻、颊、阴道或经由植入型贮库给药。本文所用的术语“肠胃外”包括皮下、静脉内、肌内、关节内、滑膜内、胸骨内、鞘内、肝内、损伤内与颅内注射或输注技术。优选地，组合物是口服或静脉内给药的。

[0053] 本发明组合物的无菌可注射形式可以是水性或油性混悬液。这些混悬液可以按照本领域已知的技术、利用适合的分散或润湿剂和悬浮剂加以配制。无菌的可注射制剂还可以是在无毒的肠胃外可接受的稀释剂或溶剂中的无菌可注射的溶液或混悬液，例如在 1, 3- 丁二醇中的溶液。可以采用的可接受的媒介和溶剂有水、林格氏溶液和等渗的氯化钠溶液。另外，无菌的不挥发油也经常被用作溶剂或悬浮介质。为此，可以采用任何温和的不挥发油，包括合成的单 - 或二 - 甘油酯。脂肪酸如油酸及其甘油酯衍生物可用于制备注射剂，可为天然的药学上可接受的油，例如橄榄油或蓖麻油，尤其是它们的聚氧乙烯化形式。这些油溶液或混悬液还可以含有长链醇稀释剂或分散剂，例如羧甲基纤维素或类似的分散剂，它们普遍用于配制药学上可接受的剂型中，包括乳剂和混悬剂。出于制剂的目的，还可以使用其他常用的表面活性剂，例如吐温类、司盘类，和其他乳化剂或生物利用度增强剂，它们普遍用于制备药学上可接受的固体、液体或其他的剂型中。

[0054] 在一个实施方案中,在组合治疗中应用每日约 0.01 ~ 约 100mg/kg 体重的 VX-950 的剂量水平,用于预防和治疗抗病毒尤其抗 HCV 介导的疾病。在另一个实施方案中,在组合治疗中应用每日约 0.5 ~ 约 75mg/kg 体重的 VX-950 的剂量水平,用于预防和治疗抗病毒尤其抗 HCV 介导的疾病。一般地,每日约 1 ~ 约 5 次施用或者替代选择地连续输注本发明的药物组合物。这样的给药可用作慢性或急性治疗。可与载体物质结合以制备单一剂型的活性成分的量将依赖于治疗的宿主和给药的特定方式而变化。一般制剂将含有约 5% ~ 约 95% 活性化合物 (w/w)。在一个实施方案中,这样的制剂含有约 20% ~ 约 80% 活性化合物。

[0055] 在一个实施方案中,本文所述的聚合酶抑制剂化合物每日约 0.01 ~ 约 100mg/kg 体重的剂量水平用于组合中,以预防和治疗抗病毒尤其抗 HCV 介导的疾病。在另一个实施方案中,本文所述的聚合酶抑制剂化合物每日约 0.5 ~ 约 75mg/kg 体重的剂量水平用于组合治疗中,以预防和治疗抗病毒尤其抗 HCV 介导的疾病。一般地,每日约 1 ~ 约 5 次施用或者替代选择地连续输注本发明的药物组合物。这样的给药可用作慢性或急性治疗。可与载体物质结合以制备单一剂型的活性成分的量将依赖于治疗的宿主和给药的特定方式而变化。一般制剂将含有约 5% ~ 约 95% 活性化合物 (w/w)。在一个实施方案中,这样的制剂含有约 20% ~ 约 80% 活性化合物。

[0056] 本发明药物组合物可以按任意口服可接受的剂型口服给药,包括但不限于胶囊剂、片剂、水性混悬剂或溶液剂。在口服片剂的情况下,常用的载体包括乳糖和玉米淀粉。通常还加入润滑剂,例如硬脂酸镁。就以胶囊剂型口服给药而言,有用的稀释剂包括乳糖和干燥的玉米淀粉。当口服用药需要水性混悬剂时,活性成分是与乳化剂和悬浮剂联用的。如果需要的话,还可以加入某些甜味剂、矫味剂或着色剂。

[0057] 替代选择地,本发明药物组合物可以按直肠给药的栓剂形式给药。它们可以这样制得:将药物与适合的无刺激性赋形剂混合,所述赋形剂在室温下是固体,但是在直肠温度下是液体,因此其将在直肠内融化以释放药物。这类材料包括可可脂、蜂蜡和聚乙二醇。

[0058] 本发明的药物组合物也可局部给药,尤其当治疗靶标包括容易被局部用药接近的区域或器官时,包括眼、皮肤或下部肠道的疾病。适合的局部制剂容易根据每种这些区域或器官加以制备。

[0059] 下部肠道的局部用药可以以直肠栓剂(见上)或适合的灌肠剂进行。还可以应用局部透皮贴剂。

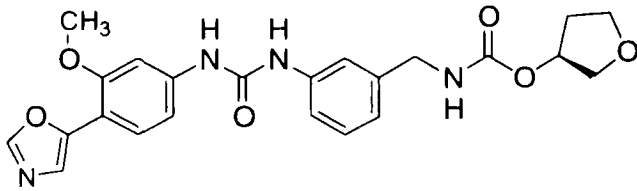
[0060] 就局部用药而言,药物组合物可配制成适合的软膏剂,其包含悬浮或溶解在一种或多种载体中的活性成分。用于本发明化合物局部给药的载体包括但不限于矿物油、液体凡士林、白凡士林、丙二醇、聚氧乙烯、聚氧丙烯化合物、乳化蜡和水。替代选择地,药物组合物可配制成适合的洗剂或霜剂,其包含悬浮或溶解在一种或多种药学上可接受的载体中的活性成分。适合的载体包括但不限于矿物油、脱水山梨醇单硬脂酸酯、聚山梨醇酯 60、十六烷基酯蜡、鲸蜡醇 (cetaryl alcohol)、2-辛基十二烷醇、苯醇和水。

[0061] 就眼用而言,药物组合物可配制成在等渗的经 pH 调节的无菌盐水中的微粉化混悬剂,或者优选为在等渗的经 pH 调节的无菌盐水中的溶液,其中含有或没有防腐剂如苯扎氯铵。替代选择地,就眼用而言,药物组合物可配制成软膏剂,例如凡士林。

[0062] 本发明的药物组合物还可以借助鼻气雾剂或吸入剂给药。这样的组合物是按照药物制剂领域熟知的技术制备的,且可以制成在盐水中的溶液剂,其应用苯醇或其他适合的

防腐剂、增强生物利用度的吸收促进剂、碳氟化合物、和 / 或其他常规的增溶剂或分散剂。

[0063] 本发明的治疗组合还可包含另一种抗病毒剂、优选抗-HCV 剂。这类抗病毒剂包括但不限于免疫调节剂,例如 α -、 β - 与 γ -干扰素、聚乙二醇化衍生的干扰素- α 化合物,和胸腺素;其他抗病毒剂,例如利巴韦林、金刚烷胺和替比夫定;其他丙型肝炎蛋白酶抑制剂(NS2-NS3 抑制剂和 NS3-NS4A 抑制剂);HCV 生命周期中其他靶标抑制剂,包括螺旋酶、聚合酶和金属蛋白酶抑制剂;内部核糖体进入的抑制剂;广谱病毒抑制剂,例如 IMPDH 抑制剂(例如美国专利 5,807,876、6,498,178、6,344,465、6,054,472、WO 97/40028、WO 98/40381、WO 00/56331 的化合物、和麦考酚酸及其衍生物,包括但不限于 VX-497、VX-148 和 / 或 VX-944);或者任意上述的组合。还参见 W.Markland 等, *Antimicrobial & Antiviral Chemotherapy*, 44, 第 859 页 (2000) 和美国专利号 6,541,496。



[0064] 根据另一个方面,本发明提供治疗患者内的 HCV 感染或减轻其一种或多种症状的方法,包括施用包含式 I、II 或 III 的聚合酶抑制剂的组合物。在一个实施方案中,患者感染 HCV 变体。在另一个实施方案中,组合物进一步包含 VX-950。

[0065] 根据另一个方面,本发明提供治疗患者内的 HCV 感染或减轻其一种或多种症状的方法,包括施用包含式 I、II 或 III 的聚合酶抑制剂和 VX-950 的组合物。在一个实施方案中,患者感染 HCV 变体。

[0066] 根据另一个方面,本发明提供消除或减少细胞 HCV 感染的方法,包括施用包含式 I、II 或 III 的聚合酶抑制剂的组合物。在一个实施方案中,细胞包含 HCV 变体。在另一个实施方案中,组合物进一步包含 VX-950。

[0067] 根据另一个方面,本发明提供消除或减少细胞 HCV 感染的方法,包括施用包含式 I、II 或 III 的聚合酶抑制剂和 VX-950 的组合物。在一个实施方案中,细胞包含 HCV 变体。

[0068] 在本文中使用下述定义(涉及本申请提交日时可获得产品的商标):

“Peg-Intron”意指 PEG-INTRON[®],聚乙二醇化干扰素 α -2b(peginterferon α -2b),获自 Schering Corporation, Kenilworth, NJ; “Intron”意指 INTRON-A[®],干扰素 α -2b,获自 Schering Corporation, Kenilworth, NJ; “利巴韦林”意指利巴韦林(1- β -D-呋喃核糖基-1H-1,2,4-三唑-3-甲酰胺),获自 ICN Pharmaceuticals, Inc., Costa Mesa, CA; 描述于第十二版的 Merck Index, 第 8365 条中; 还获自 Schering Corporation, Kenilworth, NJ 的 REBETROL[®], 或获自 Hoffmann-La Roche, Nutley, NJ 的 COPEGASUS[®]; “Pegasys”意指 PEGASYS[®], 聚乙二醇化干扰素 α -2a, 获自 Hoffmann-La Roche, Nutley, NJ; “Roferon”意指 ROFERON[®], 重组干扰素 α -2a, 获自 Hoffmann-La Roche, Nutley, NJ; “Berefor”意指 BEREFOR[®], 干扰素 α -2, 获自 Boehringer Ingelheim Pharmaceutical, Inc., Ridgefield, CT; SUMIFERON[®], 天然 α 干扰素的纯化掺合物, 例如 Sumiferon, 例如获自 Sumitomo, 日本; WELLFERON[®], 干扰素 α n1, 获自 Glaxo Wellcome Ltd.,

Great Britain; 和 ALFERON[®], 天然 α 干扰素的混合物, 由 Interferon Sciences 制备, 并获自 Purdue Frederick Co., CT。

[0069] 本文所用的术语“干扰素”意指高度同源的物种特异性蛋白质的家族成员, 其抑制病毒复制和细胞增殖, 并调节免疫应答, 例如干扰素 α 、干扰素 β 、或干扰素 γ 。Merck Index, 第 5015 条, 第 12 版。

[0070] 本发明的治疗组合可利用天然 α 干扰素 2a。或者, 本发明的治疗组合可利用天然 α 干扰素 2b。本发明的治疗组合可利用重组 α 干扰素 2a 或 2b。另外, 本发明可利用聚乙二醇化的 α 干扰素 2a 或 2b。适合本发明的干扰素包括: (a) INTRON- A[®] (干扰素 α -2B, Schering Plough), (b) PEG- INTRON[®], (c) PEGASYS[®], (d) ROFERON[®], (e) BEREFOR[®], (f) SUMIFERON[®], (g) WELLFERON[®], (h) 复合 α 干扰素 (consensus alpha interferon), 获自 Amgen, Inc., Newbury Park, CA, (i) ALFERON[®]; (j) VIRAFERON[®]; (k) INFERGEN[®]; 和 (l) ALBUFERON[™]。

[0071] 正如熟练技术人员所认可的, 蛋白酶和聚合酶抑制剂应优选口服给药。干扰素通常不是口服给药。尽管如此, 本文没有任何事物将本发明的方法或组合受限于任何具体的剂型或方案。因而, 根据本发明组合的每种组分可以是分开、一起或者以其任意组合地施用。

[0072] 在一个实施方案中, 蛋白酶抑制剂和聚合酶抑制剂在分开的剂型中施用。在一个实施方案中, 任何另外的试剂与蛋白酶抑制剂一起作为单一剂型的一部分施用或作为分开的剂型施用。因为本发明涉及化合物的组合, 所以每种化合物的具体量可以依赖于组合中的每种其他化合物的具体量。正如熟练技术人员所认可的, 干扰素的剂量通常是以 IU 定量 (例如约 4 百万 IU 至约 12 百万 IU)。

[0073] 因此, 可以与本发明化合物组合使用的试剂 (无论充当免疫调节剂或其他方面) 包括但不限于: Albuferon[™] (白蛋白-干扰素 α), 获自 Human Genome Sciences; PEG- INTRON[®] (聚乙二醇化干扰素 α -2b, 获自 Schering Corporation, Kenilworth, NJ); INTRON- A[®] (干扰素 α -2b, 获自 Schering Corporation, Kenilworth, NJ); 利巴韦林 (1- β -D- 呋喃核糖基-1H-1,2,4- 三唑-3- 甲酰胺), 获自 ICN Pharmaceuticals, Inc, Costa Mesa, CA; 描述于第十二版的 Merck Index, 第 8365 条中); REBETROL[®] (Schering Corporation, Kenilworth, NJ), COPEGUS[®] (Hoffmann-La Roche, Nutley, NJ); PEGASYS[®] (聚乙二醇化干扰素 α -2a 获自 Hoffmann-La Roche, Nutley, NJ); ROFERON[®] (重组干扰素 α -2a, 获自 Hoffmann-La Roche, Nutley, NJ); BEREFOR[®] (干扰素 α -2, 获自 Boehringer Ingelheim Pharmaceutical, Inc., Ridgefield, CT); SUMIFERON[®] (天然 α 干扰素的纯化掺合物, 例如 Sumiferon, 例如获自 Sumitomo, 日本); WELLFERON[®] (干扰素 α n1, 获自 Glaxo Wellcome Ltd., Great Britain); ALFERON[®] (天然 α 干扰素的混合物, 由 Interferon Sciences 制备, 并获自 Purdue Frederick Co., CT); α -干扰素; 天然 α 干扰素 2a; 天然 α 干扰素 2b; 聚乙二醇化 α 干扰素 2a 或 2b; 同义 α 干扰素 (Amgen, Inc., Newbury Park,

CA) ; VIRAFERON[®]; INFERGEN[®]; REBETRON[®] (Schering Plough, 干扰素 α -2B+ 利巴韦林); 聚乙二醇化干扰素 α (Reddy, K. R. 等“Efficacy and Safety of Pegylated(40-kd) Interferon alpha-2a Compared with Interferon alpha-2a in Noncirrhotic Patients with Chronic Hepatitis C (Hepatology, 33, pp. 433-438 (2001) ; 同义干扰素 (Kao J. H., 等, “Efficacy of Consensus Interferon in the Treatment of Chronic Hepatitis,” J. Gastroenterol. Hepatol., 15, pp. 1418-1423 (2000) ; 类成淋巴细胞性或“天然”干扰素; 干扰素 τ (Clayette, P. 等, “IFN-tau, A New Interferon Type I with Antiretroviral activity,” Pathol. Biol., (Paris) 47, pp. 553-559 (1999) ; 白介素 -2 (Davis, G. L. 等, “Future Options for the Management of Hepatitis C,” Seminars in Liver Disease, 19, pp. 103-112 (1999) ; 白介素 -6 (Davis 等 “Future Options for the Management of Hepatitis C,” Seminars in Liver Disease, 19, pp. 103-112 (1999) ; 白介素 -12 (Davis, G. L. 等, “Future Options for the Management of Hepatitis C,” Seminars in Liver Disease, 19, pp. 103-112 (1999) ; 和增强 1 型辅助 T 细胞应答形成的化合物 (Davis 等, “Future Options for the Management of Hepatitis C,” Seminars in Liver Disease, 19, pp. 103-112 (1999))。也包括刺激细胞中干扰素合成的化合物 (Tazulakhova, E. B. 等, “Russian Experience in Screening, analysis, and Clinical Application of Novel Interferon Inducers,” J. Interferon Cytokine Res., 21 pp. 65-73), 包括但不限于双链 RNA, 单独或者与妥布霉素的组合, 和咪喹莫特 (3M Pharmaceuticals ; Sauder, D. N. “Immunomodulatory and Pharmacologic Properties of Imiquimod,” J. Am. Acad. Dermatol., 43 pp. S6-11 (2000))。

[0074] 刺激细胞中干扰素合成的化合物 (Tazulakhova, E. B. 等, “Russian Experience in Screening, analysis, and Clinical Application of Novel Interferon Inducers,” J. Interferon Cytokine Res., 21, pp. 65-73) 包括但不限于双链 RNA, 单独或者与妥布霉素的组合, 和咪喹莫特 (3M Pharmaceuticals ; Sauder, D. N. “Immunomodulatory and Pharmacologic Properties of Imiquimod,” J. Am. Acad. Dermatol., 43 pp. S6-11 (2000))。

[0075] 其他非免疫调节或免疫调节的化合物可以与本发明化合物组合使用, 包括但不限于, WO 02/18369 中详细说明的那些, 在此将其引入作为参考 (参见例如, 第 273 页第 9-22 行, 和第 274 页第 4 行至第 276 页第 11 行)。

[0076] 本发明也可涉及施用细胞色素 P450 单加氧酶抑制剂。CYP 抑制剂可通过 CYP 抑制而用于增加化合物的肝浓度和 / 或增加化合物的血浓度。

[0077] 如果本发明的实施方案涉及 CYP 抑制剂, 在本发明的方法中可以使用改善相关 NS3/4A 蛋白酶药动学的任何 CYP 抑制剂。这些 CYP 抑制剂包括但不限于利托那韦 (WO 94/14436)、酮康唑、醋竹桃霉素、4- 甲基吡唑、环孢菌素、氯美噻唑、西咪替丁、伊曲康唑、氟康唑、咪康唑、氟伏沙明、氟西汀、奈法唑酮、舍曲林、茚地那韦、奈非那韦、安泼那韦 (amprenavir)、福沙那韦 (fosamprenavir)、沙奎那韦、洛匹那韦、地拉夫定、红霉素、VX-944 和 VX-497。优选的 CYP 抑制剂包括利托那韦、酮康唑、醋竹桃霉素、4- 甲基吡唑、环孢菌素和氯美噻唑。至于利托那韦优选的剂型参见美国专利号 6, 037, 157, 在此引入这些文献: 美国专利号 5, 484, 801、美国专利申请 08/402, 690、和国际申请 WO 95/07696 和 WO 95/09614)。

[0078] 测定化合物抑制细胞色素 P450 单加氧酶活性能力的方法是已知的 (参见美国专

利号 6, 037, 157 和 Yun 等, Drug Metabolism & Disposition, 21, pp. 403-407 (1993)。

[0079] 如果必要的话, 随着患者状况的改善, 可以给予本发明化合物、组合物或组合的维持剂量。随后, 可以根据症状的变化减少给药的剂量或者频率或者剂量和频率, 至已改善的状况得以保持的水平, 当症状已经减轻至所需水平时, 应当停止治疗。不过, 一旦疾病症状有任何复发, 患者可能需要在长期基础上接受间歇性治疗。

[0080] 也应当理解, 任何特定患者的具体剂量和治疗方案将依赖于多种因素, 包括所采用的具体化合物的活性、年龄、体重、一般健康状况、性别、饮食、给药时间、排泄速率、药物组合、主治医师的判断和所治疗的特定疾病的严重性。活性成分的量也将依赖于特定的所述化合物和组合物中其它抗病毒剂的存在与否及其属性。

[0081] 本发明提供通过给所述患者施用药学上可接受的本发明组合物治疗病毒感染患者的方法, 所述病毒是以病毒性编码病毒生活周期所必需的丝氨酸蛋白酶为特征的。在一个实施方案中, 本发明的方法用于治疗患有 HCV 感染的患者。这样的治疗可以完全根除病毒感染或者减少其严重性。在另一个实施方案中, 所述患者为人类。

[0082] 本发明的方法可还包括给所述患者施用抗病毒剂、优选抗-HCV 剂步骤。这类抗病毒剂包括但不限于免疫调节剂, 例如 α -、 β - 与 γ - 干扰素、聚乙二醇化衍生的干扰素- α 化合物, 和胸腺素; 其他抗病毒剂, 例如利巴韦林、金刚烷胺和替比失定; 其他丙型肝炎蛋白酶抑制剂 (NS2-NS3 抑制剂和 NS3-NS4A 抑制剂); HCV 生命周期中其他靶标抑制剂, 包括但不限于螺旋酶和其它聚合酶抑制剂; 内部核糖体进入的抑制剂; 广谱病毒抑制剂, 例如 IMPDH 抑制剂 (例如美国专利 5, 807, 876 和 6, 498, 178 中公开的 VX-497 和其它 IMPDH 抑制剂, 麦考酚酸及其衍生物); 细胞色素 P-450 抑制剂, 例如利托那韦; 或者任意上述的组合。

[0083] 此类另外的试剂可作为包含本发明化合物和其他抗病毒剂单一剂型的部分给所述患者施用。替代选择地, 另外的试剂可作为多元剂型的部分与本发明化合物分开施用, 其中所述另外的试剂在包含本发明化合物的组合物之前、一起或之后施用。

[0084] 本发明也可用作旨在给患者施用的预处理生物物质的方法, 包括使所述生物物质与药学上可接受的包含本发明化合物的组合物相接触的步骤。这样的生物物质包括但不限于血液及其组分, 例如血浆、血小板、血细胞亚群等; 器官, 例如肾、肝、心、肺等; 精子和卵子; 骨髓及其组分; 和其他所要给患者输注的流体, 例如盐水、葡萄糖等。

[0085] 本发明也可利作处理物质的方法, 所述物质可潜在地接触特征在于生活周期必需病毒性编码丝氨酸蛋白酶的病毒。该方法包括用根据本发明的化合物接触所述物质的步骤。这样的物质包括但不限于外科器械和衣物 (例如衣服、手套、围裙、长外衣、口罩、眼镜、鞋袜等); 实验室器械和衣物 (例如衣服、手套、围裙、长外衣、口罩、眼镜、鞋袜等); 采血仪器和物质; 和侵入性装置, 例如分流器和支架。

[0086] 在此引入本文件所引用的所有文献作为参考。IV. 制备和实施例

[0087] 为了可以更加充分地理解本文所述的本发明, 提供了下列实施例。应当理解这些实施例仅仅是为了说明的目的, 而不应以任何方式解释为限制本发明。VI. 检测和测量化合物抑制性质的测定 A. HCV 复制子细胞

[0088] 将 Huh-7 细胞繁殖于添加 10% 热灭活的 FBS (胎牛血清)、2mM L- 谷氨酰胺、和非必需氨基酸 (JRH) 的达尔伯克改良伊格尔培养基 (DMEM, JRH Biosciences, Lenexa, Kansas) 中。如 Lohmann 等 (1999) 所述, 用与复制子 I377neo/NS3-3' wt 相同的体外转录

HCV 复制子 RNA 将这些细胞转染。挑选稳定的细胞克隆,且在 250 μ g/mL G418 (Invitrogen, Carlsbad, California) 存在下维持。为了组合研究,在以后的 HCV 复制子测定中将克隆之一,24-2,用作野生型。如先前所述 [Chao Lin 等,“In Vitro Resistance Studies of Hepatitis C Virus Serine protease inhibitors, VX-950 and BILN 2061: Structural Analysis Indicates Different Resistance Mechanisms,” *Journal of Biological Chemistry*, 279(17); pp. 17508-17514 (2004)], 在 mADE 野生型复制子的背景中构建 HCV NS3 蛋白酶变体复制子。将复制子细胞繁殖于添加 10% FBS、2mM L- 谷氨酰胺、非必需氨基酸、和 250 μ g/mL G418 的 DMEM 中。根据达融合度在新鲜的培养基中将细胞每周分开两次。每个 24-2 复制子细胞大约有 200-300 复制份数的 HCV RNA。

[0089] 按照厂商的说明书,应用 Quantigene Discover XL 试剂盒 (Panomics Inc, Fremont California) 测量细胞的 HCV 复制子的 RNA。简而言之,应用 HCV 特异的寡核苷酸 (基于基因库数据库中的 HCV 1b 基因组序列 AJ238799 的 5' UTR 区域设计), 将经化合物处理的复制子细胞溶化并固定在俘获板上过夜,按照厂商的说明书应用寡核苷酸探针装置,测量俘获的 RNA 的相对量。B. 2-天 HCV 复制子 IC₅₀ 测定

[0090] 在测定的前一天,在 96-孔板上以每孔上板接种 10,000 个复制子细胞,在添加 10% 热灭活的 FBS (JRH Biosciences, Lenexa, Kansas)、2mM L- 谷氨酰胺 (Invitrogen)、非必需氨基酸 (Invitrogen) 和 250 μ g/mL G418 (Invitrogen) 的 DMEM (Invitrogen, Carlsbad, California) 中让其附着并生长过夜。第二天,除去培养基,加入用含有 2% FBS 和 0.5% DMSO (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) 且没有 G418 的 DMEM 连续稀释的抗病毒剂。将复制子细胞与抗病毒剂一起孵育 48 小时。按照厂商的说明书应用 Quantigene Discover XL 试剂盒 (Panomics Inc., Fremont California), 测量细胞的 HCV 复制子的 RNA。简而言之,应用 HCV 特异的寡核苷酸,将经化合物处理的复制子细胞溶化并固定在俘获板上过夜,按照厂商的说明书应用寡核苷酸探针装置,测量俘获的 RNA 的相对量。除非另有说明,每个数据点表示三次平行测定的平均值。IC₅₀ 为与未处理的复制子细胞对照组相比,细胞 HCV 复制子的 RNA 水平减少 50% 时的化合物的浓度。为了监测化合物对细胞增殖或细胞生存力的影响,将复制子细胞用连续稀释的化合物处理 48 小时,其后应用 CellTiterGlo assay (Promega, Madison, Wisconsin) 确定细胞生存力。基于至少两次平行测定得到各个 CC₅₀, 且其为与未处理的细胞对照组相比活细胞数目减少 50% 时的化合物的浓度。应用 4-参数曲线拟合在 SoftMax Pro 程序 (Molecular Devices, Sunnyvale, California) 中确定 IC₅₀ 和 CC₅₀。C. 协同作用和拮抗作用测定

[0091] 应用 Bliss 独立模型 [W.R. Greco 等,“The search for synergy: a critical review from a response surface perspective,” *Pharmacol. Rev.*, 47, pp. 331-385 (1995)], 评价药物-药物组合的效果。应用 MacSynergy (一种由 Prichard 和 Shipman 开发的三维分析方法) [M.N. Prichard and C. Shipman, Jr., “A three-dimensional model to analyze drug-drug interactions,” *Antivir. Res.*, 14, pp. 181-205 (1990)], 对实验数据进行了分析。在此模型中,根据个体化合物的剂量响应曲线由方程 $Z = X + Y(1 - X)$ 计算理论的叠加效应,其中 X 和 Y 分别代表第 1 个单独药物和第 2 个单独药物所产生的抑制,和 Z 代表第 1 个药物和第 2 个药物的组合所产生的效应。如果该组合仅仅是叠加作用,理论的叠加表面减去实际的实验表面,得到的表面会以 0% 抑制的水平

面出现。在这个平面上的任何高峰将表明存在协同作用,而低于它的任何凹陷将表明存在拮抗作用。将实验剂量响应表面的 95%置信区间用于评估统计学数据。计算高峰或凹陷的体积,以定量所产生的总的协同或拮抗作用。

[0092] 应用上述测定,本发明的治疗组合被确定为有用的 HCV 复制抑制剂。

[0093] 实施例 1:在用 bDNA(分枝 DNA)定量的 2-天的复制子测定中,以棋盘格式进行了 VX-950 和聚合酶抑制剂的组合测试。结果显示在表 6 中。VX-950 和式 I 聚合酶抑制剂的组合产生了叠加至适度的协同效应。VX-950 和式 II 聚合酶抑制剂的组合产生了叠加至适度的协同效应。VX-950 和式 III 聚合酶抑制剂的组合产生了叠加效应。表 6:用 bDNA 定量的 2-天的复制子测定

蛋白酶抑制剂	聚合酶抑制剂	棋盘式组合的结果	VX-950 IC ₅₀	聚合酶抑制剂 IC ₅₀	协同作用	对数体积
VX-950	式 I	叠加 / 适度协同作用	0.42 μ M	7.21 μ M	21.95	3.15
VX-950	式 II	叠加 / 适度协同作用	0.34 μ M	1.04 μ M	45.13	6.48
VX-950	式 III	叠加作用	0.31 μ M	0.70 μ M	0.37	0.05

[0094] 实施例 2:在 2-天的 HCV 复制子 IC₅₀ 测定中评估 NS3 蛋白酶变体对利巴韦林和干扰素的敏感性。该变体如下:在第 36 位野生型缬氨酸突变为丙氨酸 (V36A) 或蛋氨酸 (V36M),在第 54 位野生型苏氨酸突变为丙氨酸 (T54A),在第 155 位野生型精氨酸突变为赖氨酸 (R155K),在第 155 位野生型精氨酸突变为苏氨酸 (R155T) 和在第 155 位野生型精氨酸突变为蛋氨酸 (R155M)。如表 7 所示,这些结果表明这些变体对利巴韦林和干扰素的敏感性。倍数变化 (fold change) 为同一抑制剂的 NS3 蛋白酶突变体 IC₅₀ 对其野生型 IC₅₀ 的比例。将在第 156 位野生型丙氨酸突变为苏氨酸 (A156T) 和在第 156 位野生型丙氨酸突变为缬氨酸 (A156V) 的复制子的敏感性与野生型进行对比 (Lin, 等, 2005, supra)。表 7: NS3 变体和利巴韦林或干扰素的 2-天的 HCV 复制子的 IC₅₀ 测定

复制子		其它抑制剂			
蛋白酶域		IFN- α (单位/ml)		利巴韦林(μ M)	
Conl Seq.	变化	平均 IC ₅₀ (μ M)	倍数变化	平均 IC ₅₀ (μ M)	倍数变化
野生型(mADE)	-	11.6 \pm 1.1	1.0	57.8 \pm 17.6	1.0
Val 36	V36M	11.3 \pm 5.9	1.0	32.9 \pm 17.8	0.6
	V36A	10.3 \pm 6.0	0.9	43.1 \pm 21.3	0.7
Arg 155	R155K	15.2 \pm 12.3	1.3	37.2 \pm 17	0.6
	R155T	4.8 \pm 3.3	0.4	32.4 \pm 17.7	0.6
	R155M	4.9 \pm 1.0	0.4	38.9 \pm 4.7	0.7
Val 36/Arg 155	V36M-R155K	10.1 \pm 5.9	0.9	40.6 \pm 6.1	0.7
	V36M-R155T	3.1 \pm 0.2	0.3	36.4 \pm 1.3	0.6
	V36A-R155K	6.8 \pm 0.5	0.6	35.8 \pm 2.2	0.6
	V36A-R155T	3.9 \pm 2.1	0.3	41.7 \pm 21.6	0.7
Thr 54	T54A	3.9 \pm 0.5	0.3	21.7 \pm 11.1	0.4

[0095] 实施例 3: 在 2-天的 HCV 复制子 IC₅₀ 测定中评估 NS3 蛋白酶变体对 VX-950 [Sarrazin, 等, "Dynamic Hepatitis C Virus Genotypic and Phenotypic Changes in Patients Treated With the Protease Inhibitor Telaprevir," *Gastroenterology* 132, pp. 1767-1777 (2007), 在此将其全文引入作为参考] 和式 I、II 和 III 的聚合酶抑制剂的敏感性。该变体如下: 在第 36 位野生型缬氨酸突变为丙氨酸 (V36A) 或蛋氨酸 (V36M), 在第 54 位野生型苏氨酸突变为丙氨酸 (T54A), 在第 155 位野生型精氨酸突变为赖氨酸 (R155K), 在第 156 位野生型丙氨酸突变为苏氨酸 (A156T) 和在第 156 位野生型丙氨酸突变为缬氨酸 (A156V)。也测试了有两个突变的变体: V36M+R155K。如表 8 所示, 这些结果表明这些变体对 VX-950 和式 I、II 和 III 的敏感性。倍数变化为同一抑制剂的 NS3 蛋白酶突变体 IC₅₀ 对其野生型 IC₅₀ 的比率。表 8: NS3 变体和 VX-950, 式 I、II 和 III 的 2-天的 HCV 复制子 IC₅₀ 测定

复制子	HCV 蛋白酶抑制剂		HCV 聚合酶抑制剂					
	VX-950		式 I		式 II		式 III	
	平均 IC ₅₀ ± STDEV	倍数 变化	平均 IC ₅₀ ± STDEV	倍数 变化	平均 IC ₅₀ ± STDEV	倍数 变化	平均 IC ₅₀ ± STDEV	倍数 变化
野生型	0.46 ± 0.101	1 ± 0.2	1.343 ± 0.473	1.0	0.347 ± 0.108	1.0	0.313 ± 0.032	1.0
V36M	338 ± 0.775	7.3 ± 1.7	1.589 ± 0.361	1.2	0.36 ± 0.164	1.0	0.227 ± 0.064	0.7
V36A	3.567 ± 1.05	7.7 ± 2.3	2.148 ± 0.874	1.6	0.571 ± 0.093	1.6	0.369 ± 0.066	1.2
R155K	3.587 ± 0.283	7.8 ± 0.6	2.371 ± 0.678	1.8	0.45 ± 0.023	1.3	0.39 ± 0.065	1.2
V36M+ R155K	30.61 ± 0.637	≥65.2	2.716 ± 1.384	2.0	0.578 ± 0.331	1.7	0.419 ± 0.197	1.3
T54A	3.043 ± 0.819	6.6 ± 1.8	1.976 ± 0.388	1.5	0.564 ± 0.111	1.6	0.337 ± 0.045	1.1
A156T	>30*	>65.2	1.27 ± 0.185	0.9	0.326 ± 0.003	0.9	0.306 ± 0.01	1.0
A156V	>30*	>65.2	1.313 ± 0.216	1.0	0.264 ± 0.045	0.8	0.297 ± 0.066	0.9

STDEV 为标准偏差

其它实施方案

[0096] 应该理解, 虽然本发明结合其详细的说明进行了描述, 但上述说明旨在举例说明而不限制由所附权利要求书的范围确定的本发明范围。其它方面、优点和修改均在所附权利要求书的范围内。

序列表

<110> 顶点药剂结合
 <120> 用于治疗 HCV 感染的组合治疗
 <130> VPI/07-115 ;125805/00481
 <160> 6
 <170> 专利版本 3.3

<210> 1
 <211> 695
 <212> PRT
 <213> 肝炎 C 病毒

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1).. (10)
 <223> 组氨酸标记

<400> 1

```

Met Ser His His His His His His Ala Met Ala Pro Ile Thr Ala Tyr
1           5           10           15
Ala Gln Gln Thr Arg Gly Leu Leu Gly Cys Ile Ile Thr Ser Leu Thr
           20           25           30
Gly Arg Asp Lys Asn Gln Val Glu Gly Glu Val Gln Ile Val Ser Thr
           35           40           45
Ala Thr Gln Thr Phe Leu Ala Thr Cys Ile Asn Gly Val Cys Trp Thr
           50           55           60
Val Tyr His Gly Ala Gly Thr Arg Thr Ile Ala Ser Pro Lys Gly Pro
65           70           75           80
Val Ile Gln Met Tyr Thr Asn Val Asp Gln Asp Leu Val Gly Trp Pro
           85           90           95
Ala Pro Gln Gly Ser Arg Ser Leu Thr Pro Cys Thr Cys Gly Ser Ser
           100          105          110
Asn Leu Tyr Leu Val Thr Arg His Ala Asp Val Ile Pro Val Arg Arg
           115          120          125
Arg Gly Asp Ser Arg Gly Ser Leu Leu Ser Pro Arg Pro Ile Ser Tyr
           130          135          140
Leu Lys Gly Ser Ser Gly Gly Pro Leu Leu Cys Pro Ala Gly His Ala
145          150          155          160

```


Val Gly Leu Phe Arg Ala Ala Val Cys Thr Arg Gly Val Thr Lys Ala
 165 170 175
 Val Asp Phe Ile Pro Val Glu Asn Leu Glu Thr Thr Met Arg Ser Pro
 180 185 190
 Val Phe Thr Asp Asn Ser Ser Pro Pro Ala Val Pro Gln Ser Phe Gln
 195 200 205
 Val Ala His Leu His Ala Pro Thr Gly Ser Gly Lys Ser Thr Lys Val
 210 215 220
 Pro Ala Ala Tyr Ala Ala Gln Gly Tyr Lys Val Leu Val Leu Asn Pro
 225 230 235 240
 Ser Val Ala Ala Thr Leu Gly Phe Gly Ala Tyr Met Ser Lys Ala His
 245 250 255
 Gly Val Asp Pro Asn Ile Arg Thr Gly Val Arg Thr Ile Thr Thr Gly
 260 265 270
 Ser Pro Ile Thr Tyr Ser Thr Tyr Gly Lys Phe Leu Ala Asp Gly Gly
 275 280 285
 Cys Ser Gly Gly Ala Tyr Asp Ile Ile Ile Cys Asp Glu Cys His Ser
 290 295 300
 Thr Asp Ala Thr Ser Ile Leu Gly Ile Gly Thr Val Leu Asp Gln Ala
 305 310 315 320
 Glu Thr Ala Gly Ala Arg Leu Val Val Leu Ala Thr Ala Thr Pro Pro
 325 330 335
 Gly Ser Val Thr Val Ser His Pro Asn Ile Glu Glu Val Ala Leu Ser
 340 345 350
 Thr Thr Gly Glu Ile Pro Phe Tyr Gly Lys Ala Ile Pro Leu Glu Val
 355 360 365
 Ile Lys Gly Gly Arg His Leu Ile Phe Cys His Ser Lys Lys Lys Cys
 370 375 380
 Asp Glu Leu Ala Ala Lys Leu Val Ala Leu Gly Ile Asn Ala Val Ala
 385 390 395 400
 Tyr Tyr Arg Gly Leu Asp Val Ser Val Ile Pro Thr Asn Gly Asp Val
 405 410 415
 Val Val Val Ser Thr Asp Ala Leu Met Thr Gly Phe Thr Gly Asp Phe
 420 425 430
 Asp Ser Val Ile Asp Cys Asn Thr Cys Val Thr Gln Thr Val Asp Phe
 435 440 445
 Ser Leu Asp Pro Thr Phe Thr Ile Glu Thr Thr Thr Leu Pro Gln Asp
 450 455 460
 Ala Val Ser Arg Thr Gln Arg Arg Gly Arg Thr Gly Arg Gly Lys Pro

465	470	475	480
Gly Ile Tyr Arg Phe Val Ala Pro Gly Glu Arg Pro Ser Gly Met Phe			
	485	490	495
Asp Ser Ser Val Leu Cys Glu Cys Tyr Asp Ala Gly Cys Ala Trp Tyr			
	500	505	510
Glu Leu Met Pro Ala Glu Thr Thr Val Arg Leu Arg Ala Tyr Met Asn			
	515	520	525
Thr Pro Gly Leu Pro Val Cys Gln Asp His Leu Glu Phe Trp Glu Gly			
	530	535	540
Val Phe Thr Gly Leu Thr His Ile Asp Ala His Phe Leu Ser Gln Thr			
545	550	555	560
Lys Gln Ser Gly Glu Asn Phe Pro Tyr Leu Val Ala Tyr Gln Ala Thr			
	565	570	575
Val Cys Ala Arg Ala Gln Ala Pro Pro Pro Ser Trp Asp Gln Met Trp			
	580	585	590
Lys Cys Leu Ile Arg Leu Lys Pro Thr Leu His Gly Pro Thr Pro Leu			
	595	600	605
Leu Tyr Arg Leu Gly Ala Val Gln Asn Glu Val Thr Leu Thr His Pro			
	610	615	620
Ile Thr Lys Tyr Ile Met Thr Cys Met Ser Ala Asp Leu Glu Val Val			
625	630	635	640
Thr Ser Thr Trp Val Leu Val Gly Gly Val Leu Ala Ala Leu Ala Ala			
	645	650	655
Tyr Cys Leu Ser Thr Gly Cys Val Val Ile Val Gly Arg Ile Val Leu			
	660	665	670
Ser Gly Lys Pro Ala Ile Ile Pro Asp Arg Glu Val Leu Tyr Gln Glu			
	675	680	685
Phe Asp Glu Met Glu Glu Cys			
	690	695	

<210>2

<211>10

<212>PRT

<213> 人工

<220>

<223> 合成肽

<220>

<221>MOD_RES

<222>(5).. (5)

<223>(α) 氨基丁酸

<400>2

Glu Asp Val Val Xaa Cys Ser Met Ser Tyr

1 5 10

<210>3

<211>16

<212>PRT

<213> 人工

<220>

<223> 合成肽

<400>3

Lys Lys Gly Ser Val Val Ile Val Gly Arg Ile Val Leu Ser Gly Lys

1 5 10 15

<210>4

<211>23

<212>PRT

<213> 人工

<220>

<223> 合成肽

<400>4

Lys Lys Gly Ser Val Val Ile Val Gly Arg Ile Val Leu Ser Gly Lys

1 5 10 15

Pro Ala Ile Ile Pro Lys Lys

20

<210>5

<211>15

<212>PRT

<213> 人工

<220>

<223> 合成肽

<220>

<221>MOD_RES

<222>(5)..(5)

<223>(α) 氨基丁酸

<220>

<221>MOD_RES

<222>(12)..(12)

<223>Asp(EDANS)

<400>5

Glu Asp Val Val Xaa Cys Ser Met Ser Tyr Thr Asp Lys Lys Lys

1

5

10

15

<210>6

<211>14

<212>PRT

<213> 人工

<220>

<223> 合成肽

<220>

<223>MOD_ReS

<222>(1)..(1)

<223>FITC-2- 氨基己酸 (aminohexanoic acid)

<220>

<221>MOD_RES

<222>(6)..(6)

<223>(α) 氨基丁酸

<400>6

Xaa Glu Asp Val Val Xaa Cys Ser Met Ser Tyr Thr Lys Lys

1

5

10