(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111527098 A
(43)申请公布日 2020.08.11

(21)申请号 201880078576.6

(22)申请日 2018.12.05

(30)优先权数据
1720279.7 2017.12.05 GB

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2020.06.04

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/GB2018/053525 2018.12.05

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2019/110991 EN 2019.06.13

(71)申请人 努卡那公共有限公司
地址 英国苏格兰

(72)发明人 休·格里菲斯 米凯拉·塞尔皮
法布里齐奥·佩尔图萨蒂
马格达莱纳·斯卢沙齐克

(74)专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262
代理人 高瑜 郑霞

(51)Int.Cl.
*C07H 19/10*(2006.01)
*C07H 19/20*(2006.01)
*A61K 31/7052*(2006.01)
*A61P 35/00*(2006.01)

权利要求书12页 说明书58页 附图5页

(54)发明名称

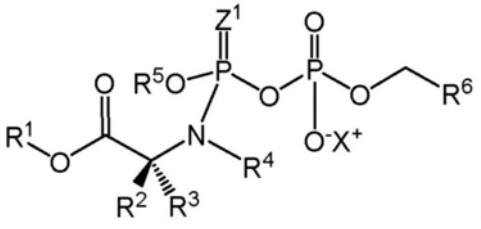
# 作为抗癌化合物的核苷的二磷酸氨基磷酸酯的盐

(57)摘要

本发明涉及包含核苷药物例如氯法拉滨的二磷酸氨基磷酸酯的盐的化合物。该化合物可用于治疗癌症,例如白血病。

CN 111527098 A

1.一种式(I)的化合物,或其药学上可接受的盐:



(I)

其中

$R^1$在每次出现时独立地选自:$C_1$-$C_{24}$-烷基、$C_3$-$C_{24}$-烯基、$C_3$-$C_{24}$-炔基、$C_0$-$C_4$-亚烷基-$C_3$-$C_8$-环烷基以及$C_0$-$C_4$-亚烷基-芳基;

$R^2$和$R^3$在每次出现时各自独立地选自H、$C_1$-$C_6$-烷基和$C_1$-$C_3$-亚烷基-$R^7$;或者$R^2$和$R^3$与它们被附接至的原子一起形成3元至6元环烷基或杂环烷基基团;

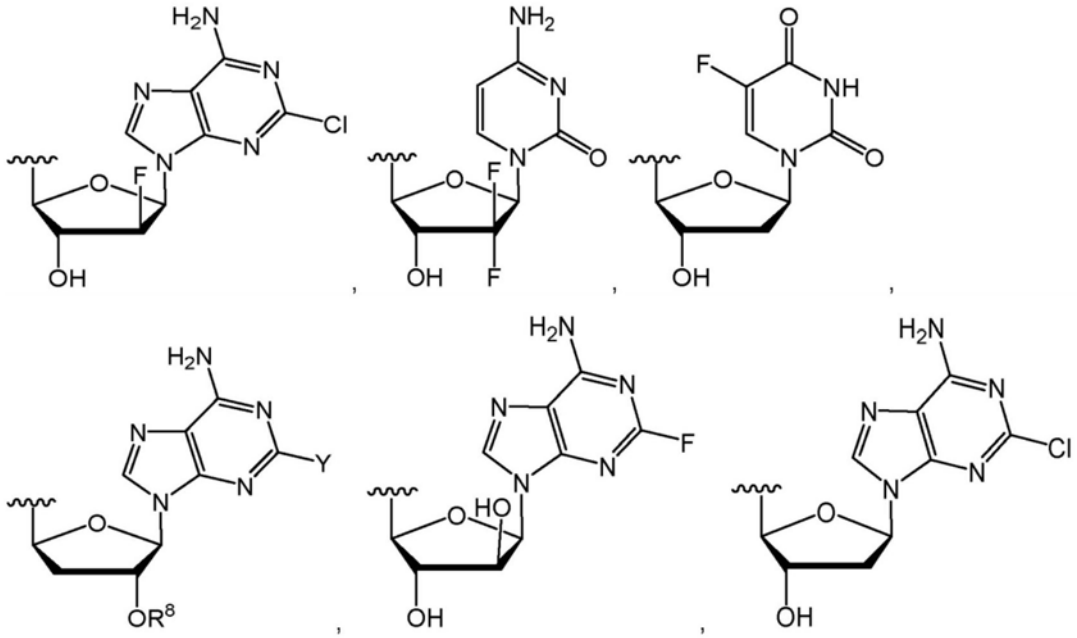
$R^4$在每次出现时独立地是H或$C_1$-$C_4$-烷基;

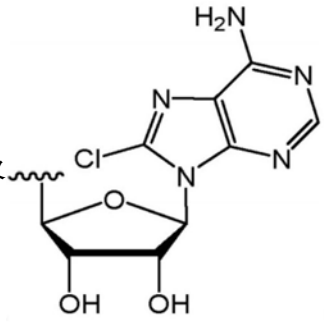
或者$R^4$、选自$R^2$和$R^3$的基团以及它们被附接至的原子能够形成3元至6元杂环烷基基团;

$R^5$在每次出现时独立地选自芳基,5元、6元、9元或10元杂芳基,$C_3$-$C_8$-环烷基,3元至7元杂环烷基,$C_1$-$C_3$-亚烷基-$R^{5a}$以及$C_1$-$C_8$-烷基,所述芳基任选地被稠合至$C_6$-$C_8$-环烷基;

$R^{5a}$在每次出现时独立地选自芳基,5元、6元、9元或10元杂芳基,$C_3$-$C_8$-环烷基,3元至7元杂环烷基,所述芳基任选地被稠合至$C_6$-$C_8$-环烷基;

$R^6$独立地选自:

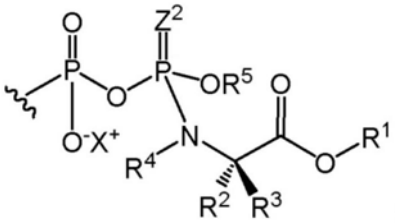


以及 

；

$R^7$在每次出现时独立地选自芳基、咪唑、吲哚、$SR^a$、$OR^a$、$CO_2R^a$、$CO_2NR^aR^a$、$NR^aR^b$以及NH(=NH)$NH_2$；

$R^8$独立地选自H和



；

$Z^1$和$Z^2$各自独立地选自O和S；

Y独立地选自H、F、Cl以及OMe；

X在每次出现时独立地是药学上可接受的阳离子；

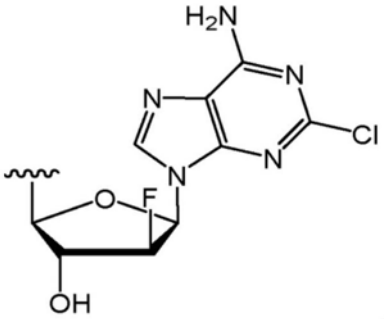
其中任何芳基基团是苯基或萘基；

其中在$R^1$、$R^2$、$R^3$、$R^4$、$R^5$或$R^7$中的任何一种是烷基、环烷基、杂环烷基、芳基或杂芳基的情况下，所述烷基、环烷基、杂环烷基、芳基或杂芳基基团任选地被从1个至4个选自以下的取代基取代：卤素、硝基、氰基、$NR^aR^a$、$NR^aS(O)_2R^a$、$NR^aC(O)R^a$、$NR^aCONR^aR^a$、$NR^aCO_2R^a$、$OR^a$、$SR^a$、$SOR^a$、$SO_3R^a$、$SO_2R^a$、$SO_2NR^aR^a$、$CO_2R^a$、$C(O)R^a$、$CONR^aR^a$、$CR^aR^aNR^aR^a$、$C_1$-$C_4$-烷基、$C_2$-$C_4$-烯基、$C_2$-$C_4$-炔基以及$C_1$-$C_4$-卤代烷基；

其中$R^a$在每次出现时独立地选自：H和$C_1$-$C_4$-烷基；并且$R^b$在每次出现时独立地选自：H和$C_1$-$C_4$-烷基以及C(O)-$C_1$-$C_4$-烷基。

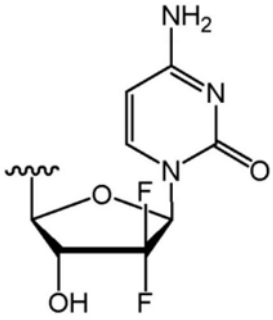
2.如权利要求1所述的化合物，其中$R^4$是H。

3.如权利要求1或权利要求2所述的化合物，其中$R^6$是



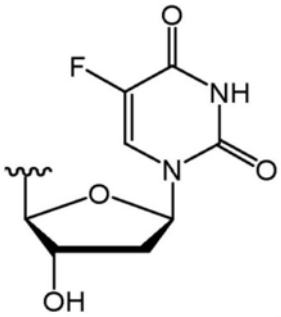
。

4.如权利要求1或权利要求2所述的化合物，其中$R^6$是



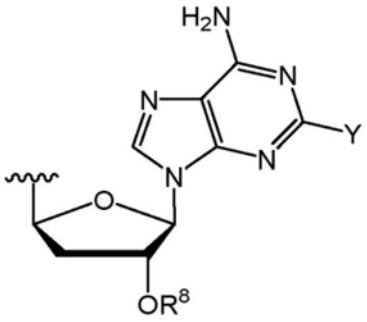
。

5.如权利要求1或权利要求2所述的化合物,其中$R^6$是



。

6.如权利要求1或权利要求2所述的化合物,其中$R^6$是



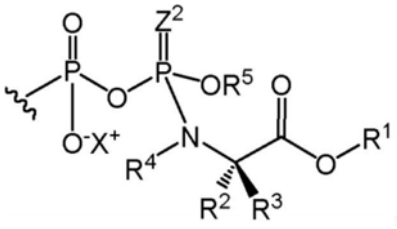
。

7.如权利要求6所述的化合物,其中Y是H。

8.如权利要求6所述的化合物,其中Y是F。

9.如权利要求6至8中任一项所述的化合物,其中$R^8$是H。

10.如权利要求6至8中任一项所述的化合物,其中$R^8$是

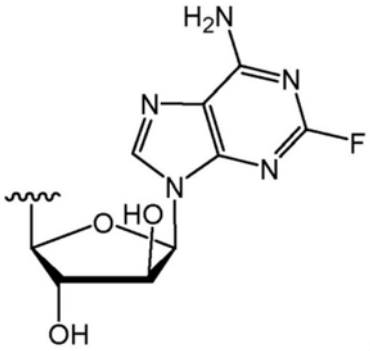


。

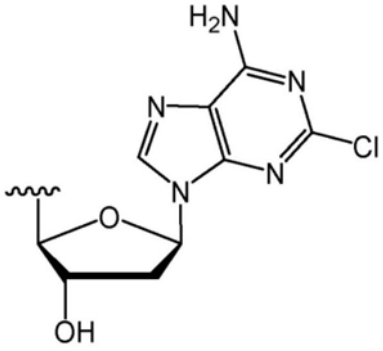
11.如权利要求10所述的化合物,其中$Z^2$是O。

12.如权利要求10所述的化合物,其中$Z^2$是S。

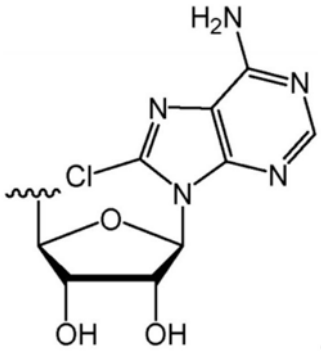
13.如权利要求1或权利要求2所述的化合物,其中$R^6$是



14.如权利要求1或权利要求2所述的化合物,其中$R^6$是



15.如权利要求1或权利要求2所述的化合物,其中$R^6$是



16.如权利要求1至15中任一项所述的化合物,其中$R^1$选自$C_5$-$C_7$-环烷基、$C_1$-$C_8$-烷基以及苄基。

17.如权利要求16所述的化合物,其中$R^1$是苄基。

18.如权利要求16所述的化合物,其中$R^1$是$C_1$-$C_8$烷基,例如乙基。

19.如权利要求1至18中任一项所述的化合物,其中$R^3$是H。

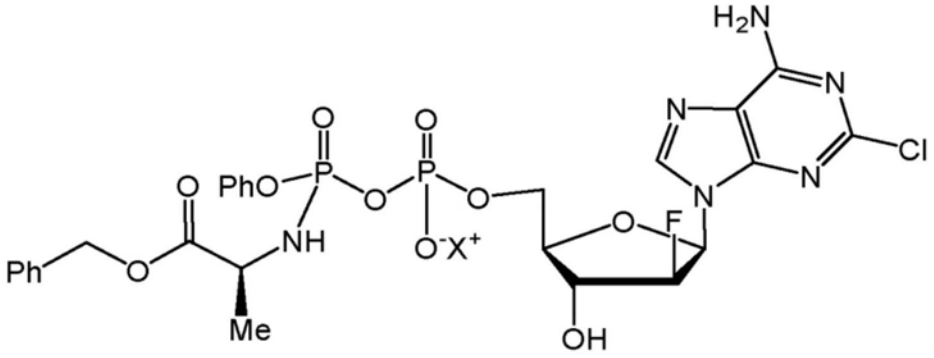
20.如权利要求1至19中任一项所述的化合物,其中$R^2$是$C_1$-$C_4$-烷基。

21.如权利要求1至19中任一项所述的化合物,其中$R^2$是H。

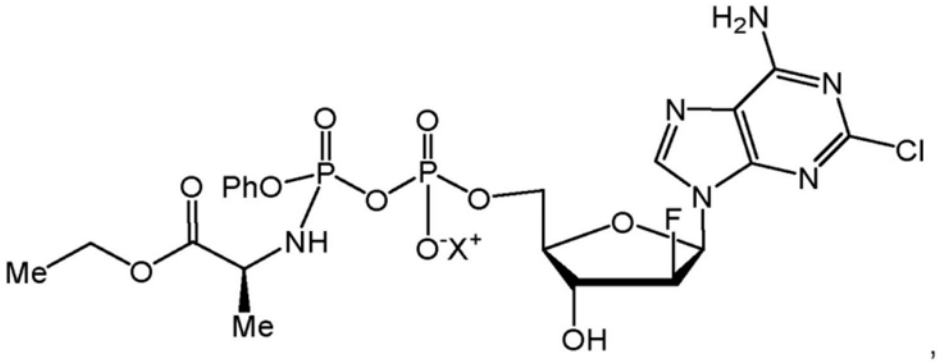
22.如权利要求1至21中任一项所述的化合物,其中$R^5$是苯基。

23.如权利要求1至21中任一项所述的化合物,其中$R^5$是萘基。

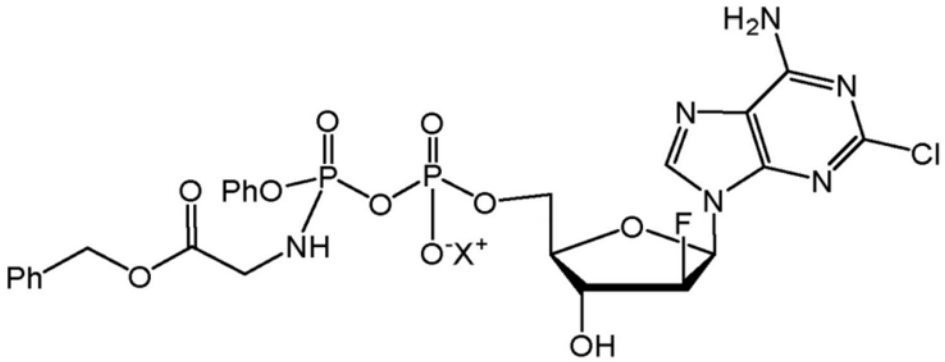
24.如权利要求1所述的化合物,其中所述式(I)的化合物选自:



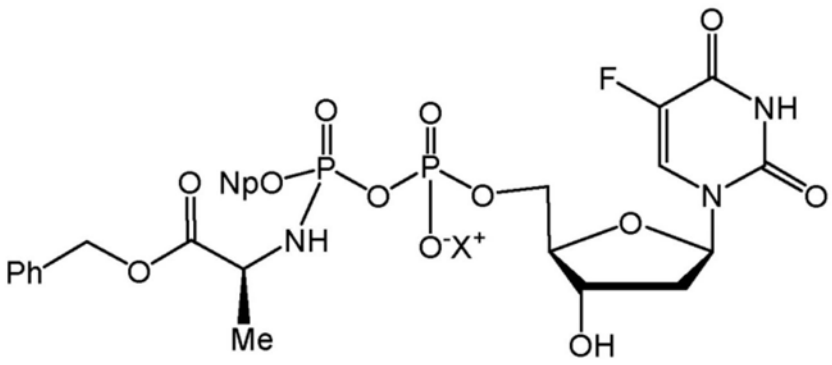
,



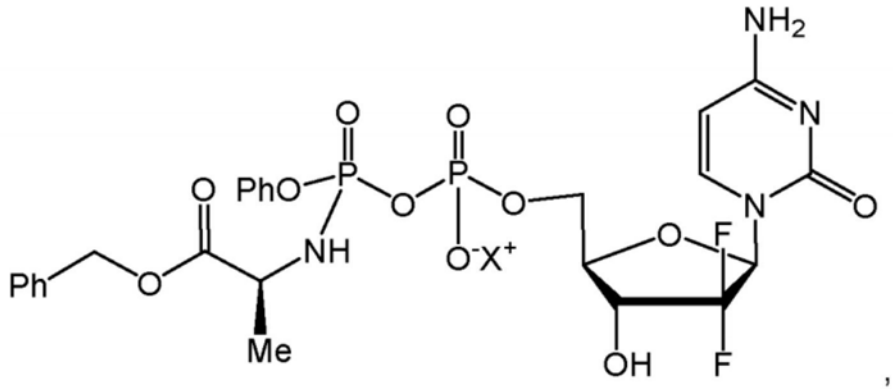
,



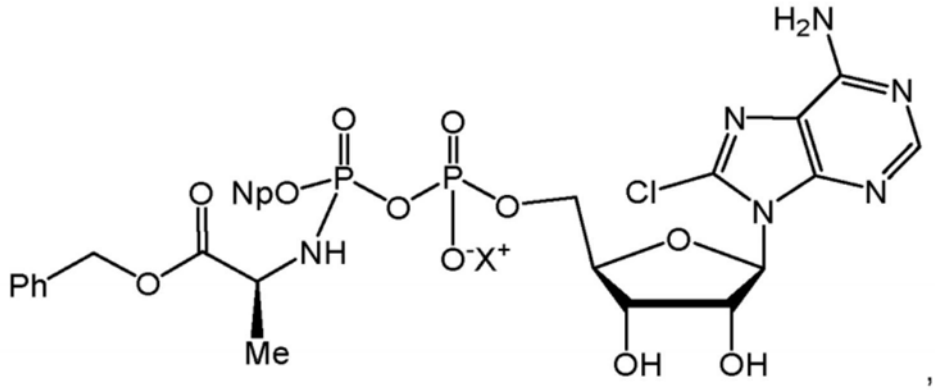
,



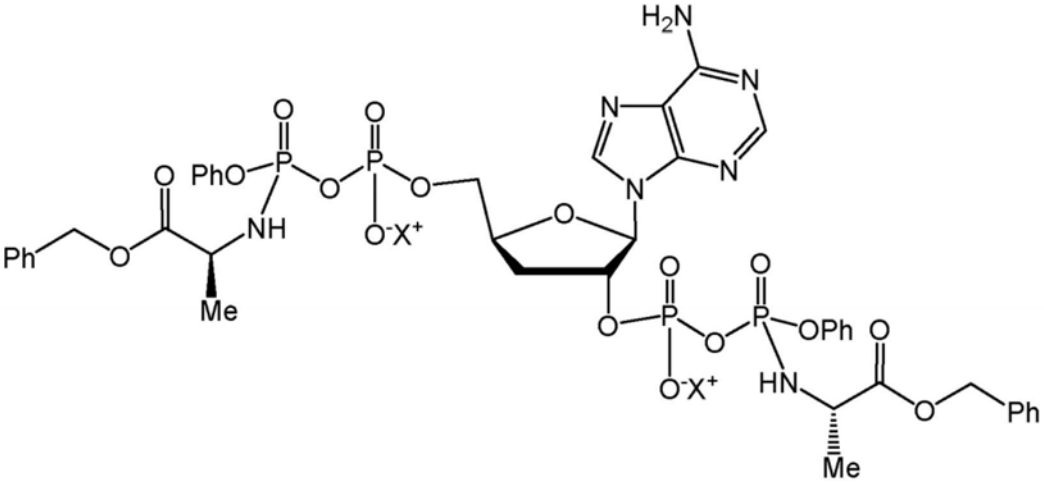
,

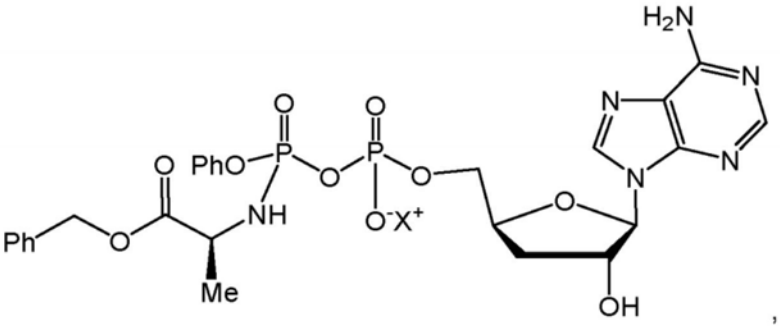


,

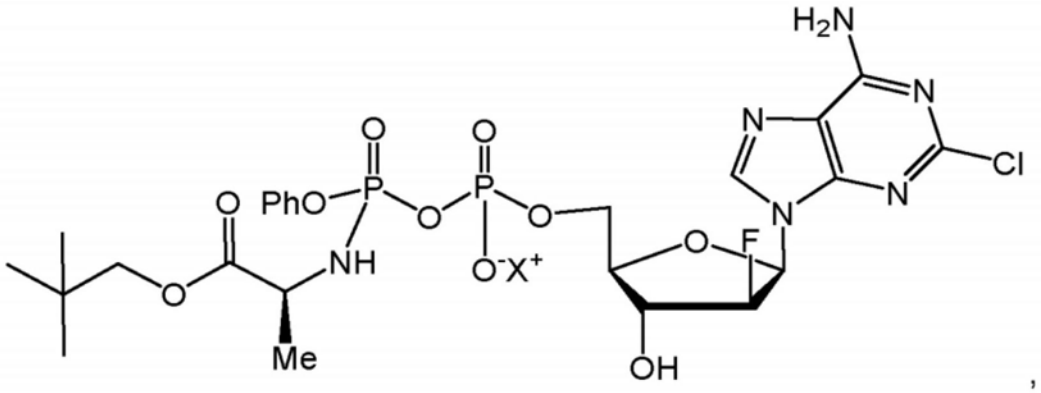


,

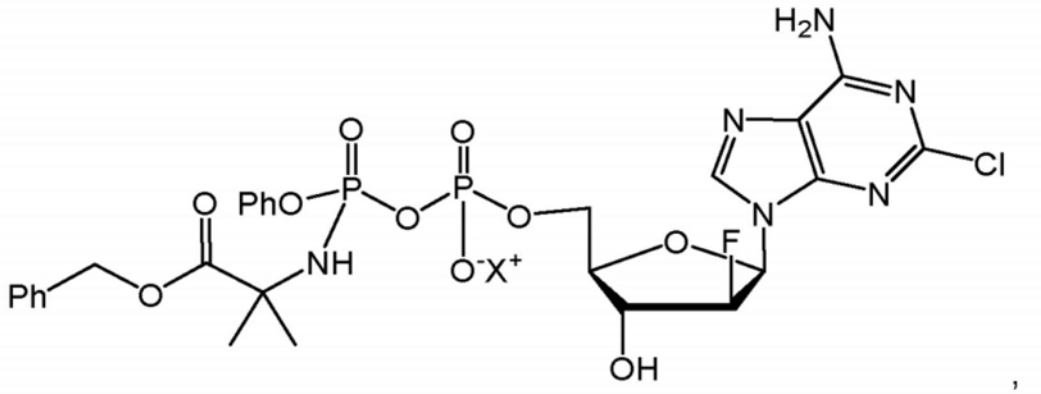




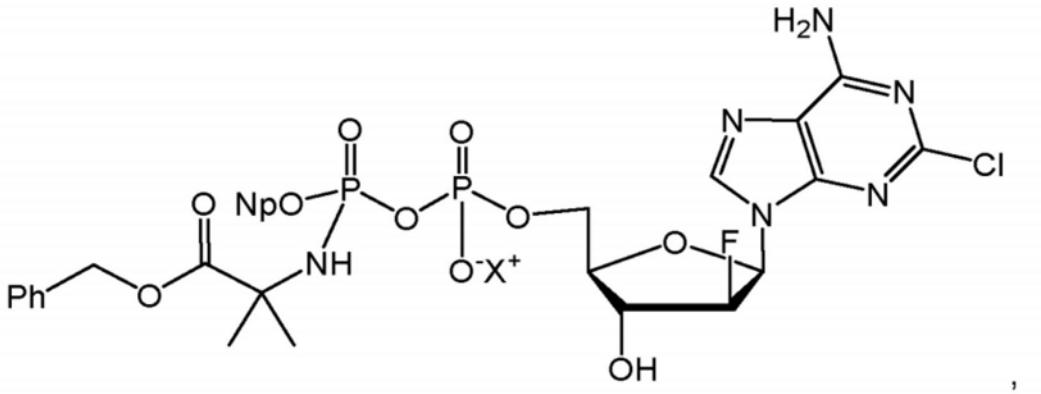
,



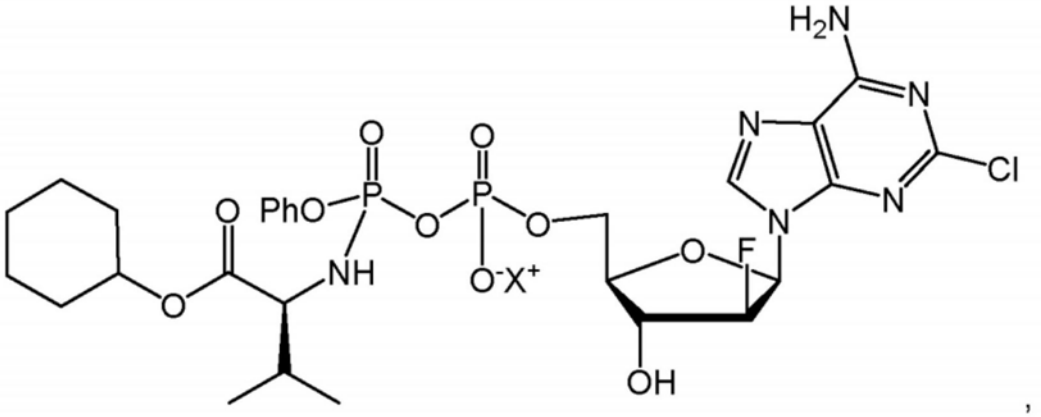
,



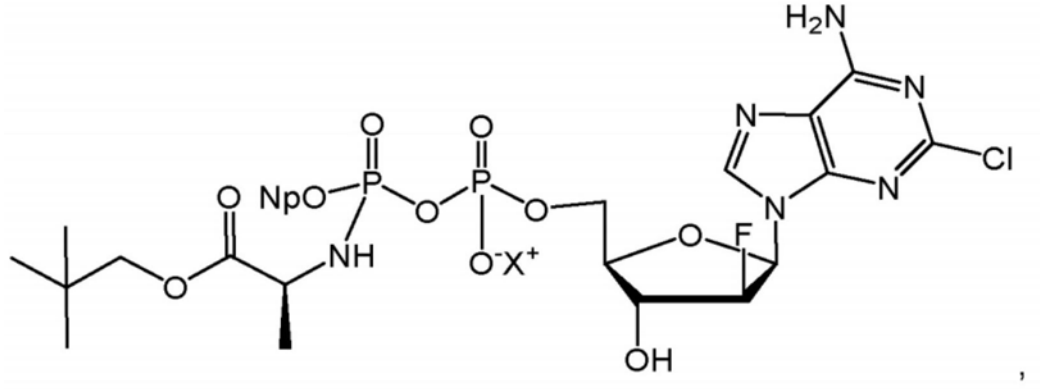
,



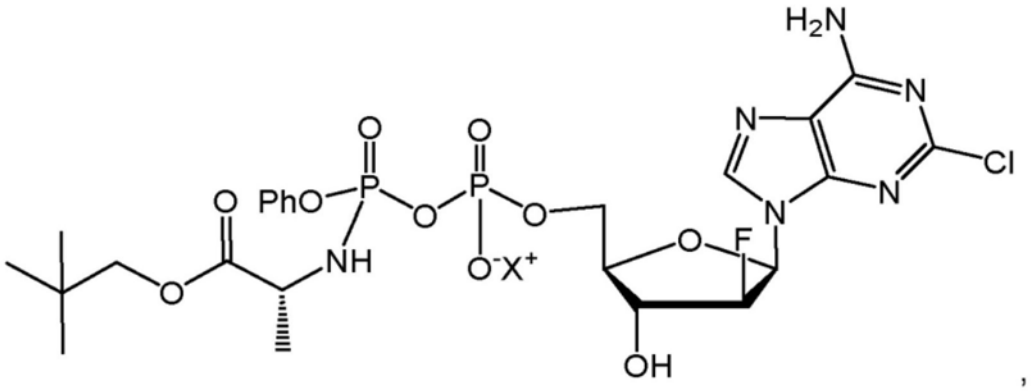
,



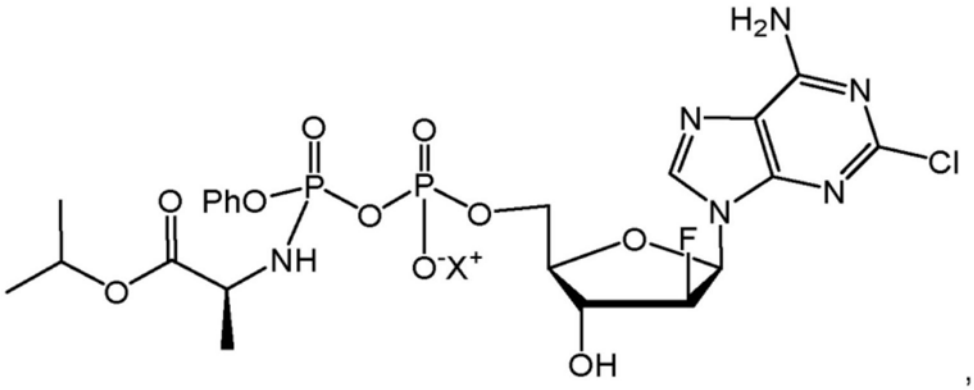
,


H2N
N
N
Cl
N
N
NpO
P
O
P
O
O
O
NH
O-X+
O
F
OH

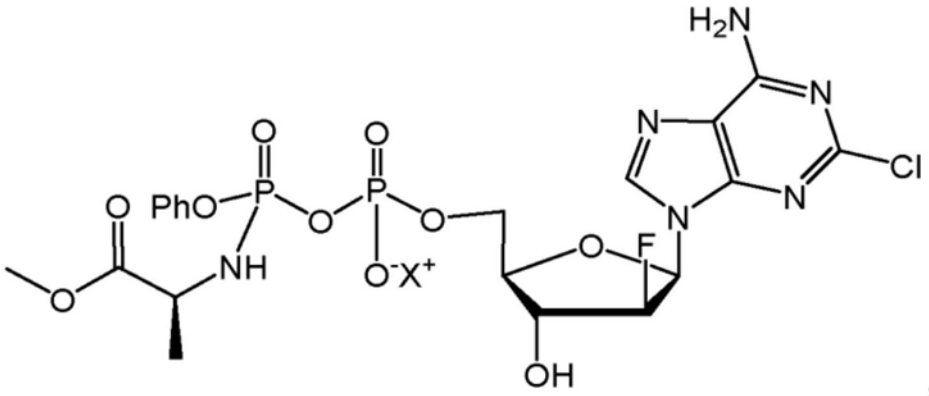
,


H2N
N
N
Cl
N
N
PhO
P
O
P
O
O
O
NH
O-X+
O
F
OH

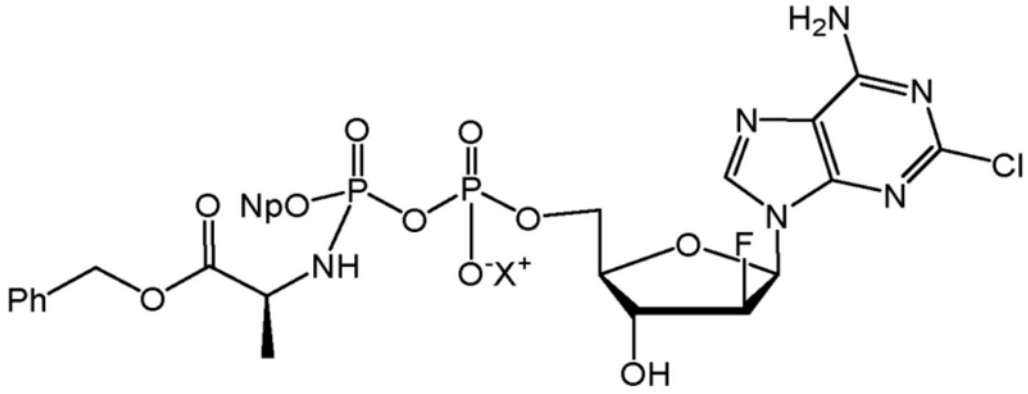
,


H2N
N
N
Cl
N
N
PhO
P
O
P
O
O
O
NH
O-X+
O
F
OH

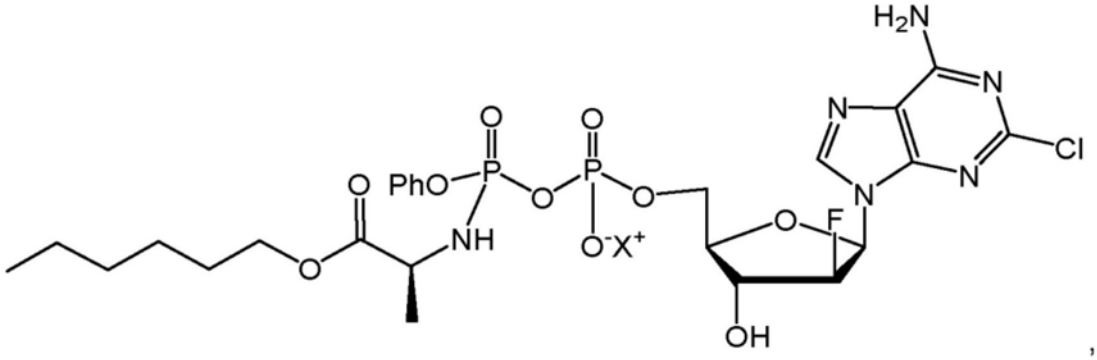
,


H2N
N
N
Cl
N
N
PhO
P
O
P
O
O
O
NH
O-X+
O
F
OH

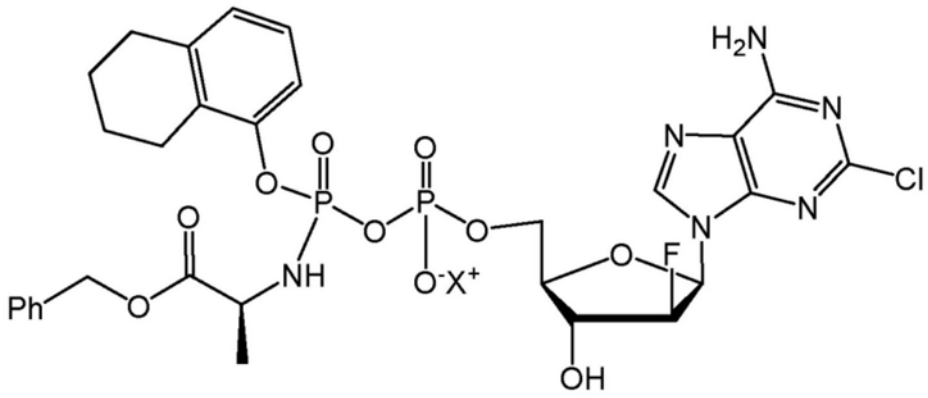
,


H2N
N
N
Cl
N
N
NpO
P
O
P
O
O
O
NH
O-X+
O
F
Ph
OH

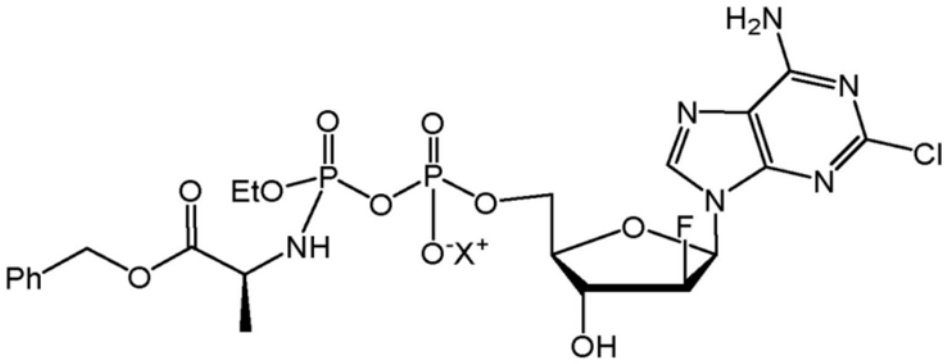
,


H2N
N
N
Cl
N
N
PhO
P
O
P
O
O
O
NH
O-X+
O
F
OH

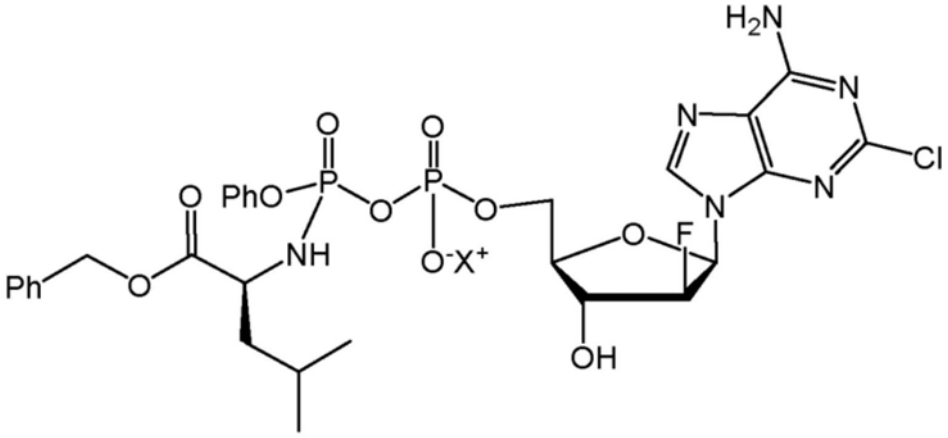
,


H2N
N
N
Cl
N
N
O
P
O
P
O
O
O
NH
O-X+
O
F
Ph
OH

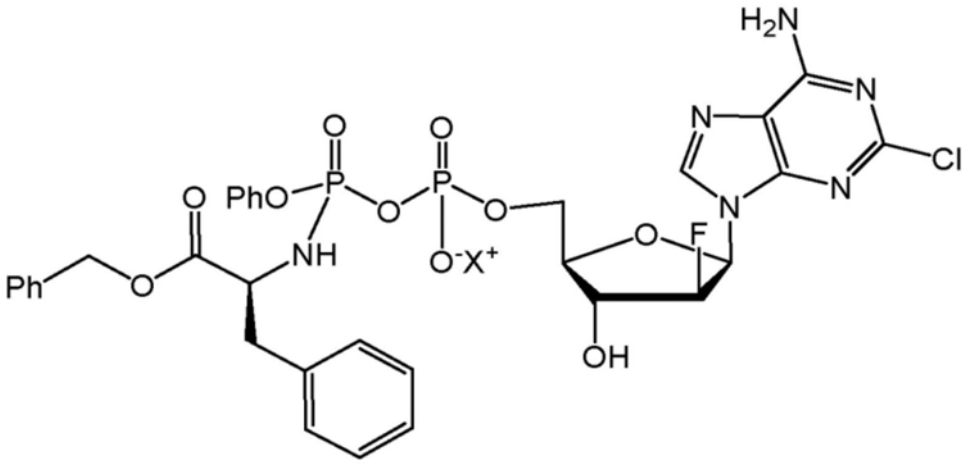
,



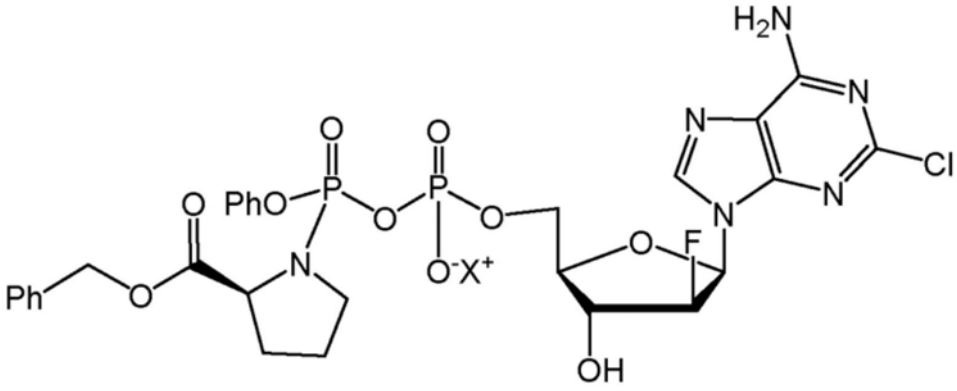
,



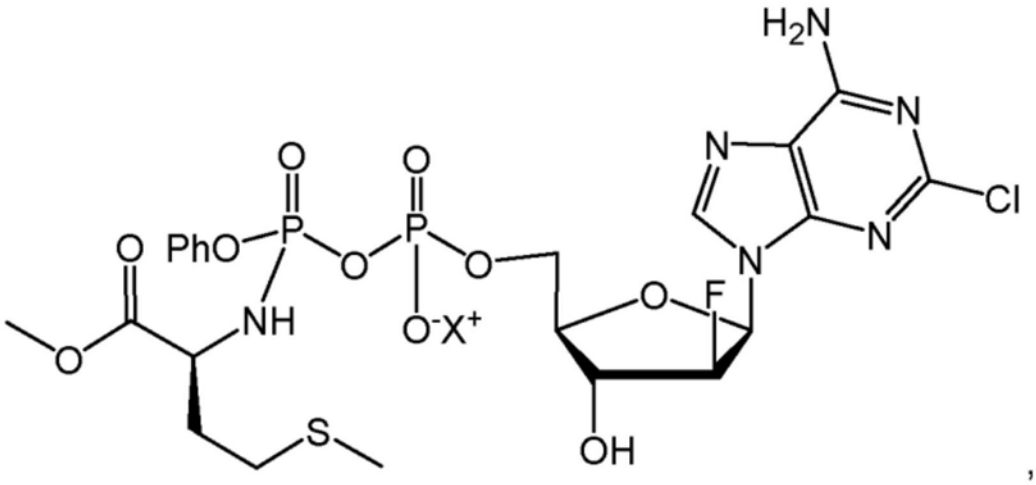
,



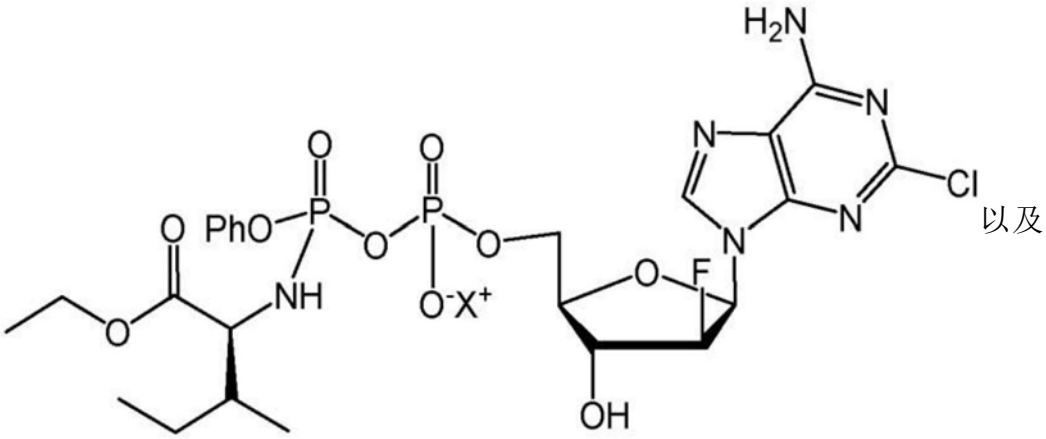
,



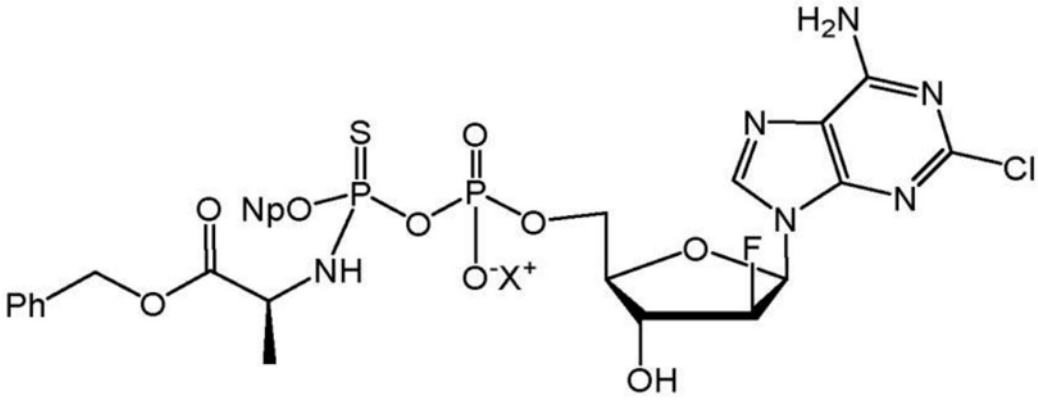
,



,



以及



。

25.如权利要求1至24中任一项所述的化合物,其中$X^+$是金属阳离子或铵阳离子。

26.如权利要求1至25中任一项所述的化合物,用于医学用途。

27.如权利要求1至25中任一项所述的化合物,用于治疗癌症。

28.如权利要求27所述的用于使用的化合物,其中所述癌症是白血病或淋巴瘤。

29.如权利要求28所述的用于使用的化合物,其中所述癌症是选自由以下组成的组的白血病:急性髓样白血病(AML)、急性淋巴样白血病(ALL)、慢性髓样白血病(CML)、慢性淋巴样白血病(CLL)以及双表型急性白血病(BAL)。

30.如权利要求28所述的用于使用的化合物,其中所述癌症是选自由以下组成的组的淋巴瘤:霍奇金淋巴瘤和非霍奇金淋巴瘤。

31.一种药物组合物,包含如权利要求1至25中任一项所述的化合物以及至少一种药学

上可接受的赋形剂。

# 作为抗癌化合物的核苷的二磷酸氨基磷酸酯的盐

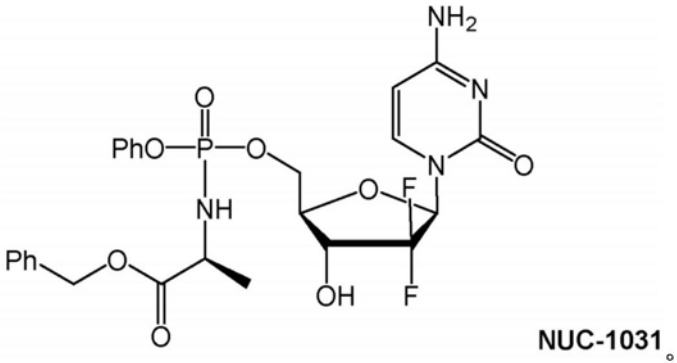
[0001] 本发明提供了可用于治疗癌症例如白血病的化合物。化合物包括二磷酸氨基磷酸酯(diphosphate phosphoramidate)的盐。本发明还提供了所述化合物的制剂和所述化合物的用途。

[0002] 发明背景

[0003] 基于核苷的药物在人类疾病的治疗中已经变成强有力的工具。在癌症的治疗中，特别地，核苷药物诸如吉西他滨、氯法拉滨、阿糖胞苷、氟达拉滨的使用是普遍的。

[0004] 然而，所有核苷药物的有效性可能受到固有耐受机制和获得性耐受机制两者的限制。

[0005] 可以改善核苷药物的效力的一种方式是通过作为ProTide类别的药物施用。ProTide类别的药物是一磷酸化核苷的前药，并且已经被示出在抗病毒和肿瘤学两者的领域中是特别有效的治疗剂。这些化合物看起来避免许多限制亲本核苷(parent nucleoside)的效用的耐受机制(参见，例如，'Application of ProTide Technology to Gemcitabine:A Successful Approach to Overcome the Key Cancer Resistance Mechanisms Leads to a New Agent(NUC-1031)in Clinical Development'，Slusarczyk等人，J.Med.Chem.，2014，57，1531-1542；McGuigan等人，Phosphoramidate ProTides of the anticancer agent FUDR successfully deliver the preformed bioactive monophosphate in cells and confer advantage over the parent nucleoside，J.Med.Chem.，2011，54，7247-7258；和Vande Voorde等人，The cytostatic activity of NUC-3073，a phosphoramidate prodrug of 5-fluoro-2'-deoxyuridine，is independent of activation by thymidine kinase and insensitive to degradation by phosphorolytic enzymes，Biochem.Pharmacol.，2011，82，441-452；WO2005/012327；WO2006/100439；WO2012/117246以及WO2016/083830)。示例性ProTide是NUC-1031，NUC-1031是吉西他滨的ProTide：

[0006] 

NUC-1031。

[0007] 虽然ProTide策略已经被证明对某些核苷类是非常有效的，但是该策略对其他核苷药物不那么有效。因此，对发现加强核苷药物分子的另外的方法存在需求。

[0008] ProTide类别的药物还可以在含水溶剂中是难溶的并且这可以使得施用具有挑战性。

[0009] 本发明的某些实施方案的目的是提供一种治疗剂，所述治疗剂在使用中在预防或

治疗癌症方面具有治疗效力。

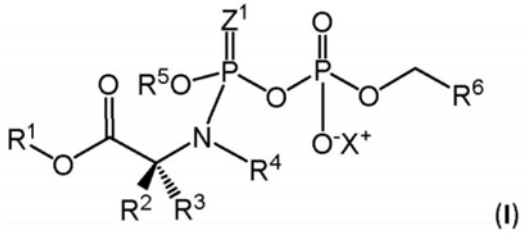
[0010] 本发明的某些实施方案的目的是提供一种治疗剂,所述治疗剂在使用中在预防或治疗癌症方面具有比亲本核苷或相应的ProTide大的治疗效力。

[0011] 本发明的某些实施方案的目的是提供一种治疗剂,所述治疗剂比相应的ProTide被更方便地施用。

[0012] 本发明的某些实施方案解决上文陈述的目的中的一些或全部。

[0013] 发明陈述

[0014] 在本发明的第一方面中,提供了式(I)的化合物,或其药学上可接受的盐:

[0015] 

(I)

[0016] 其中

[0017] $R^1$在每次出现时独立地选自:$C_1$-$C_{24}$-烷基、$C_3$-$C_{24}$-烯基、$C_3$-$C_{24}$-炔基、$C_0$-$C_4$-亚烷基-$C_3$-$C_8$-环烷基以及$C_0$-$C_4$-亚烷基-芳基;

[0018] $R^2$和$R^3$在每次出现时各自独立地选自H、$C_1$-$C_6$-烷基和$C_1$-$C_3$-亚烷基-$R^7$;或者$R^2$和$R^3$与它们被附接至的原子一起形成3元至6元环烷基或杂环烷基基团;

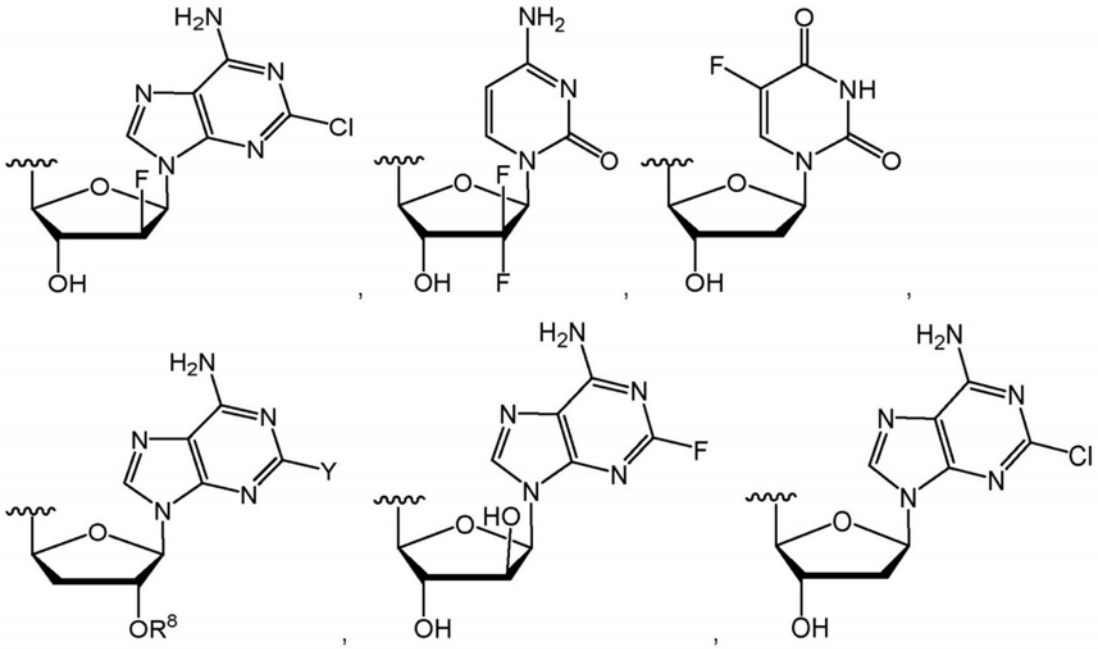
[0019] $R^4$在每次出现时独立地是H或$C_1$-$C_4$-烷基;

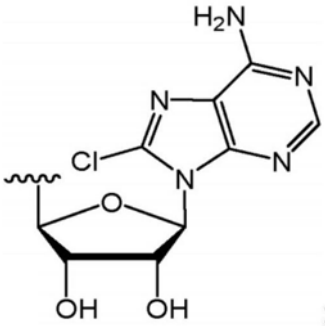
[0020] 或者$R^4$、选自$R^2$和$R^3$的基团以及它们被附接至的原子能够形成3元至6元杂环烷基基团;

[0021] $R^5$在每次出现时独立地选自芳基,5元、6元、9元或10元杂芳基,$C_3$-$C_8$-环烷基,3元至7元杂环烷基,$C_1$-$C_3$-亚烷基-$R^{5a}$以及$C_1$-$C_8$-烷基,所述芳基任选地被稠合至$C_6$-$C_8$-环烷基;

[0022] $R^{5a}$在每次出现时独立地选自芳基,5元、6元、9元或10元杂芳基,$C_3$-$C_8$-环烷基,3元至7元杂环烷基,所述芳基任选地被稠合至$C_6$-$C_8$-环烷基;

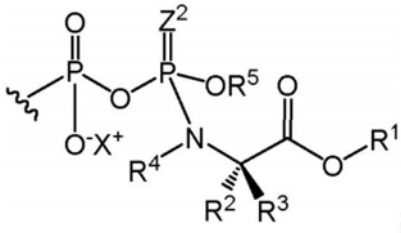
[0023] $R^6$独立地选自:

[0024] 

[0025] 以及  ;

[0026] $R^7$在每次出现时独立地选自芳基、咪唑、吲哚、$SR^a$、$OR^a$、$CO_2R^a$、$CO_2NR^aR^a$、$NR^aR^b$以及$NH(=NH)NH_2$;

[0027] $R^8$独立地选自H和

[0028]  ;

[0029] $Z^1$和$Z^2$各自独立地选自O和S;

[0030] Y独立地选自H、F、Cl以及OMe;

[0031] X在每次出现时独立地是药学上可接受的阳离子;

[0032] 其中任何芳基基团是苯基或萘基;

[0033] 其中在$R^1$、$R^2$、$R^3$、$R^4$、$R^5$或$R^7$中的任何一种是烷基、环烷基、杂环烷基、芳基或杂芳基的情况下,所述烷基、环烷基、杂环烷基、芳基或杂芳基基团任选地被从1个至4个选自以下的取代基取代:卤素、硝基、氰基、$NR^aR^a$、$NR^aS(O)_2R^a$、$NR^aC(O)R^a$、$NR^aCONR^aR^a$、$NR^aCO_2R^a$、$OR^a$、$SR^a$、$SOR^a$、$SO_3R^a$、$SO_2R^a$、$SO_2NR^aR^a$、$CO_2R^a$、$C(O)R^a$、$CONR^aR^a$、$CR^aR^aNR^aR^a$、$C_1$-$C_4$-烷基、$C_2$-$C_4$-烯基、$C_2$-$C_4$-炔基以及$C_1$-$C_4$-卤代烷基;

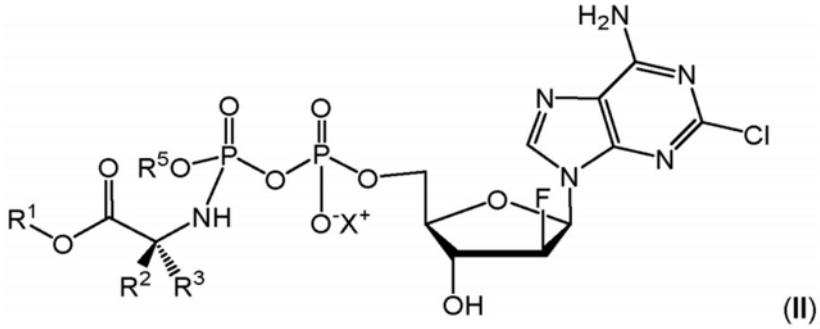
[0034] 其中$R^a$在每次出现时独立地选自:H和$C_1$-$C_4$-烷基;并且$R^b$在每次出现时独立地选自:H、$C_1$-$C_4$-烷基以及C(O)-$C_1$-$C_4$-烷基。

[0035] 本发明人已经发现,式(I)的氨基磷酸酯化二磷酸酯(phosphoramidated diphosphate)针对包括实体瘤和血液癌细胞系的一系列癌细胞系具有良好的活性。在许多情况下,式(I)的二磷酸酯比相应的ProTide是更活性的。

[0036] 已知由于P-O-P基团的键的裂解,文献中报告的二磷酸酯前药,诸如例如基于甘油酯的核苷焦磷酸二酯(K.Y.Hostetler等人,J.Biol.Chem.1990,265,6112-6117;G.M.T.can Wijk,K.Y.Hostetler等人,Biochim.Biophys.Acta Lipids Lipid Metab.1991,1084,307-310)是不稳定的,因此释放相应的核苷一磷酸酯而不是期望的二磷酸酯。然而,本发明人已经发现二磷酸氨基磷酸酯的α-磷酸酯基团的去质子化提供高稳定性。本发明的化合物的离子性质还意味着它们比相应的ProTide在水中是更可溶的。

[0037] 需要许多酶促工艺以将ProTide转化成相应的一磷酸酯核苷酸(monophosphate nucleotide),包括通过羧酸酯酶的酯裂解以及由一磷酸酯核苷氨基磷酸酯酶(monophosphate nucleoside phosphoramidase)型酶裂解所得到的氨基酸。本发明的二磷酸氨基磷酸酯是较大的分子,具有不同的形状,并且它们是离子型的,这使得人们怀疑它们是否将以相同的方式与相关的酶相互作用用于转化成二磷酸酯核苷酸。实际上,在初步数据中,本发明人已经示出式(I)的二磷酸氨基磷酸酯相对于羧肽酶例如羧肽酶Y是稳定的,羧肽酶Y是在ProTide类别的药物转化成一磷酸酯中进行酯裂解步骤的酶。然而,式(I)的二磷酸氨基磷酸酯在细胞中仍然是活性的,这表明与ProTide类别的药物相比,正在发生可选择的作用机制。本发明人还已经示出,在氨基磷酸酯磷(式I中的$OR^5$)上存在烷氧基基团的情况下,本发明的化合物是活性的。在ProTide类别的药物中,通常不是这种情况,并且仅在该位置处具有芳氧基基团的化合物提供良好的活性。这被理解为是因为芳氧基基团在ProTide类别的药物的活化期间充当离去基团。再次,这指示本发明的二磷酸氨基磷酸酯经由与ProTide类别的药物不同的机制被活化。

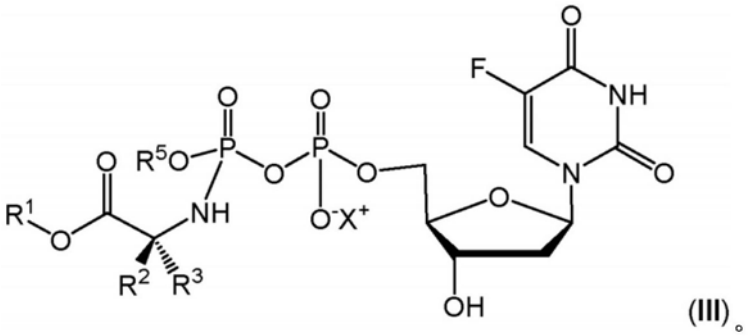
[0038] 在实施方案中,式(I)的化合物是式(II)的化合物:

[0039] 

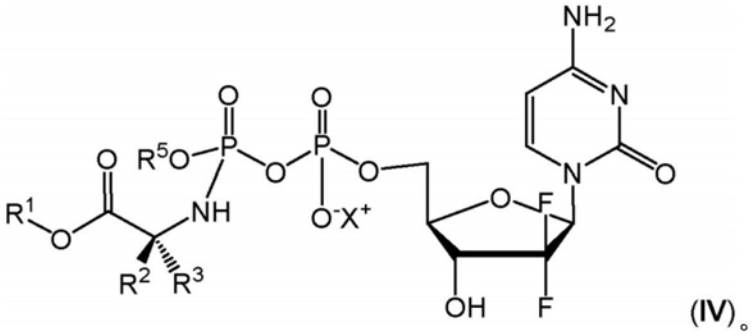
(II)。

[0040] 氯法拉滨的二磷酸氨基磷酸酯,诸如式(II)的那些,比相应的ProTide针对包括血液细胞系的许多癌细胞系是更活性的。

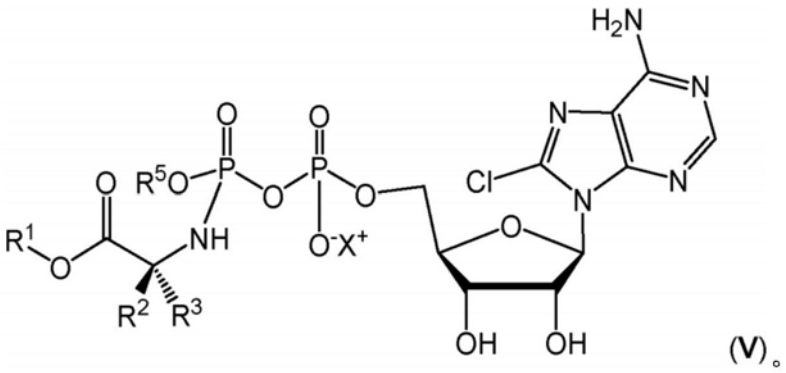
[0041] 在实施方案中,式(I)的化合物是式(III)的化合物:

[0042] 
(III)。

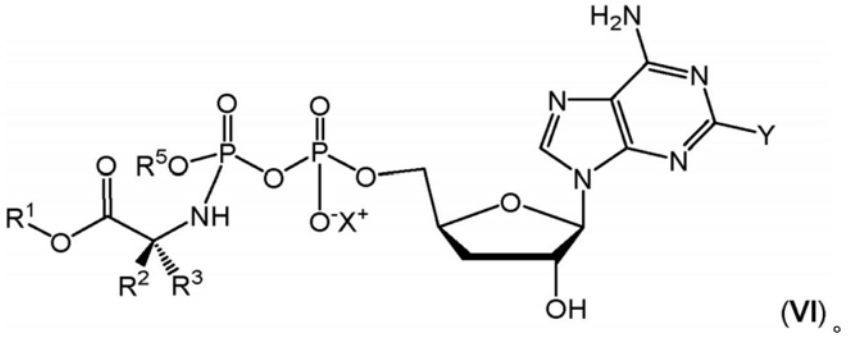
[0043] 在实施方案中,式(I)的化合物是式(IV)的化合物:

[0044] 
(IV)。

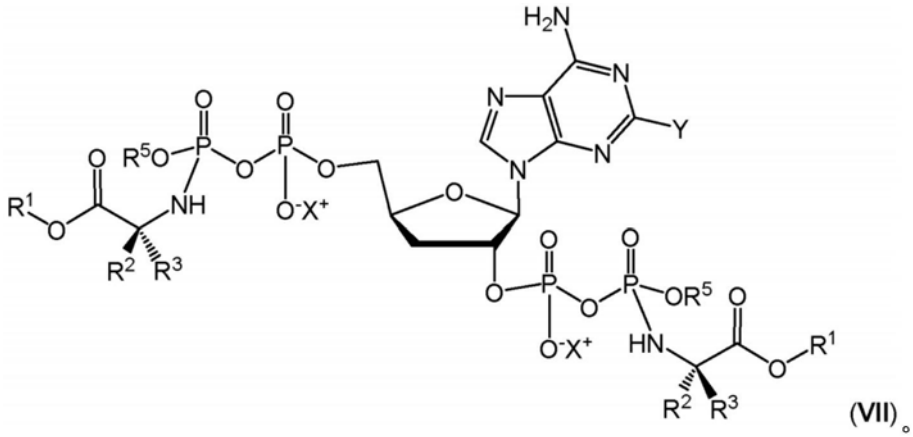
[0045] 在实施方案中,式(I)的化合物是式(V)的化合物:

[0046] 
(V)。

[0047] 在实施方案中,式(I)的化合物是式(VI)的化合物:

[0048] 
(VI)。

[0049] 在实施方案中,式(I)的化合物是式(VII)的化合物:

[0050] 

(VII)。

[0051] 在这些实施方案中，可能的是，$R^1$、$R^2$、$R^3$、$R^5$和X在两次出现时是相同的。

[0052] 以下陈述适用于式(I)至式(VII)中的任何一个的化合物。这些陈述是独立的且可互换的。换句话说，在以下陈述中的任一个中描述的任何特征可以(在化学上允许的情况下)与在下面的一个或更多个其他陈述中描述的特征组合。特别地，在化合物在本说明书中被例示或例证的情况下，描述以任何水平的共性表达的该化合物的特征的下面陈述中的任何两个或更多个可以被组合，以便代表被预期为在本说明书中形成本发明的公开内容的部分的主题。

[0053] $R^1$在每次出现时可以独立地选自：$C_1$-$C_{24}$-烷基、$C_3$-$C_{24}$-烯基、$C_3$-$C_{24}$-炔基、$C_0$-$C_4$-亚烷基-$C_3$-$C_6$-环烷基以及$C_0$-$C_4$-亚烷基-芳基。

[0054] $R^1$在每次出现时可以独立地选自：$C_1$-$C_{24}$-烷基、$C_0$-$C_4$-亚烷基-$C_3$-$C_8$-环烷基以及$CH_2$-芳基。$R^1$在每次出现时可以独立地选自：$C_1$-$C_{10}$-烷基、$C_4$-$C_6$-环烷基以及苄基。$R^1$在每次出现时可以独立地选自：$C_1$-$C_8$-烷基、$C_6$-环烷基以及苄基。

[0055] $R^1$可以是$C_1$-$C_8$烷基。

[0056] $R^1$可以被选择为使得其包含三个或更多个碳原子。$R^1$可以被选择为使得其包含五个或更多个碳原子。因此，$R^1$可以被选择为使得其包含六个或更多个碳原子。$R^1$被优选地选择为使得其仅包含碳原子和氢原子。$R^1$可以选自$C_5$-$C_7$-环烷基、$C_5$-$C_8$-烷基和苄基，任选地其中所述基团是未被取代的。$R^1$可以是未被取代的苄基。$R^1$可以是新戊基。$R^1$可以是乙基。

[0057] 可能的是，$R^3$是H。可能的是，$R^3$是$C_1$-$C_4$-烷基。可能的是，$R^3$是甲基。可能的是，$R^2$选自$C_1$-$C_6$-烷基和$C_1$-$C_3$-亚烷基-$R^7$。可能的是，$R^2$是$C_1$-$C_4$-烷基。可能的是，$R^2$选自甲基和异丙基。$R^2$可以是甲基。$R^2$可以是H。

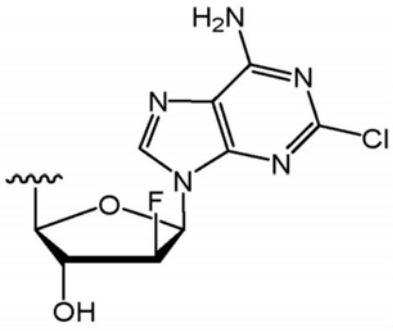
[0058] $R^4$优选地是H。

[0059] 可能的是，$R^4$、选自$R^2$和$R^3$的基团以及它们被附接至的原子形成3元至6元杂环烷基基团。可能的是，$R^4$、选自$R^2$和$R^3$的基团以及它们被附接至的原子不形成3元至6元杂环烷基基团。可能的是，$R^2$和$R^3$在每次出现时各自独立地选自H、$C_1$-$C_6$-烷基和$C_1$-$C_3$-亚烷基-$R^7$；或者$R^2$和$R^3$与它们被附接至的原子一起形成3元至6元杂环烷基基团；并且$R^4$在每次出现时独立地是H或$C_1$-$C_4$-烷基。

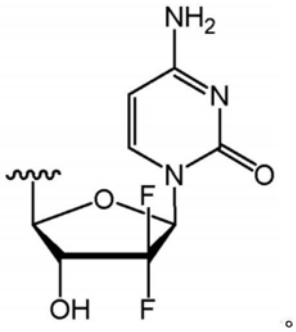
[0060] 可能的是，$R^5$是被取代的或未被取代的苯基，所述苯基可以任选地被稠合至$C_6$-$C_8$-环烷基环，例如环己烷环。可能的是，$R^5$是被取代的或未被取代的苯基。可能的是，$R^5$是被取代的或未被取代的萘基(例如1-萘基)。优选地，$R^5$选自未被取代的苯基或未被取代的萘基(例如1-萘基)。因此，$R^5$可以是未被取代的苯基。可选择地，$R^5$可以是未被取代的萘基(例如

1-萘基)。

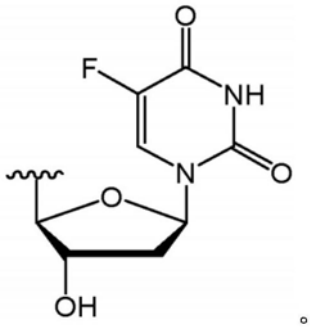
[0061] $R^6$可以是

[0062]  。

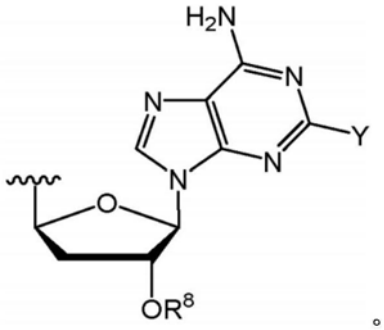
[0063] $R^6$可以是

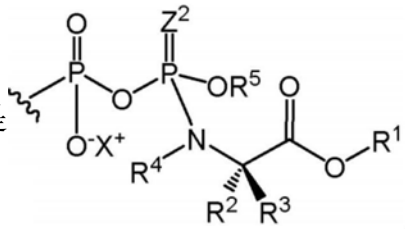
[0064]  。

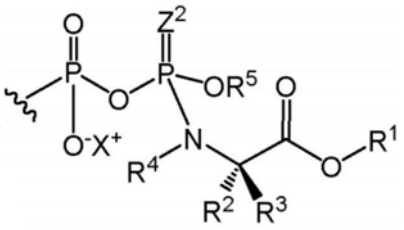
[0065] $R^6$可以是

[0066]  。

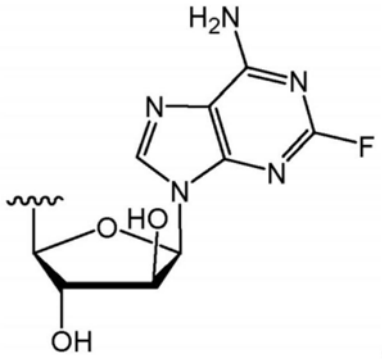
[0067] $R^6$可以是

[0068]  。Y可以是H。Y可以是F。

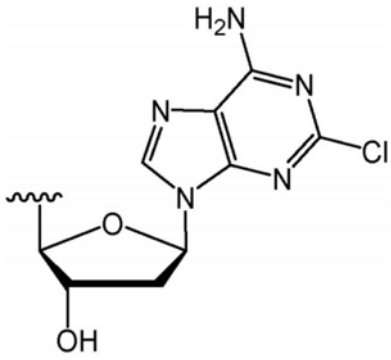
[0069] $R^8$可以是H。$R^8$可以是  。$Z^2$可以是S。$Z^2$可以是O。

[0070] 在$R^8$是  的情况下，可能的是，$R^1$、$R^2$、$R^3$、$R^5$、X和$Z^2$在两次出现时是相同的。

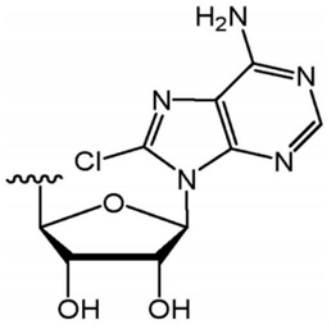
[0071] $R^6$可以是

[0072]  。

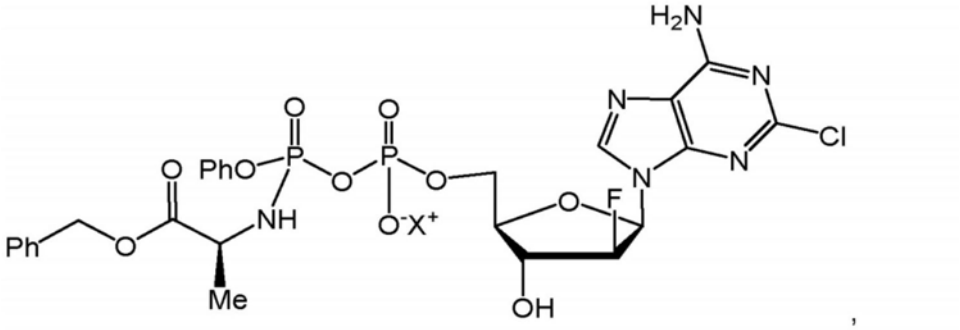
[0073] $R^6$可以是

[0074]  。

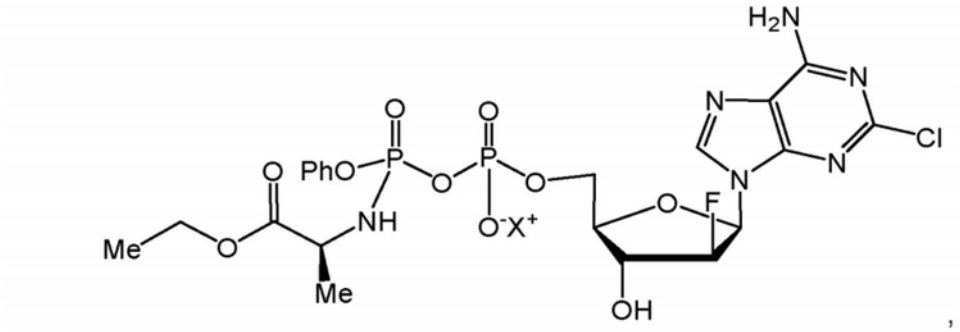
[0075] $R^6$可以是

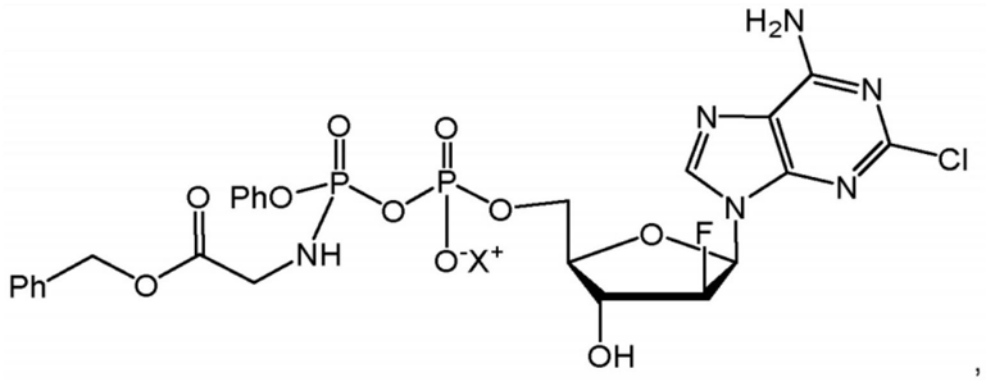
[0076]  。

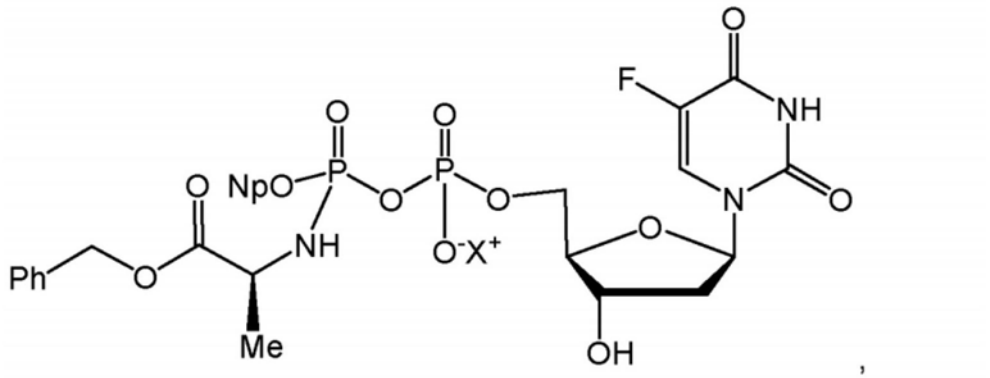
[0077] 式(I)的化合物可以选自：



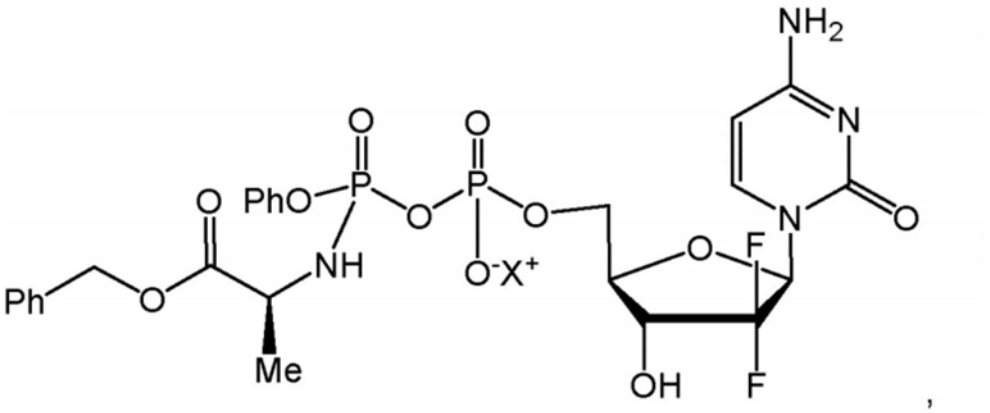
[0078]

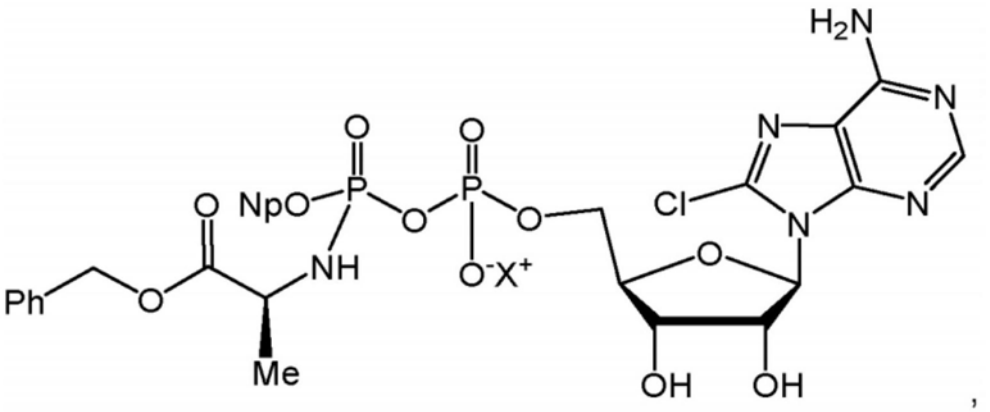


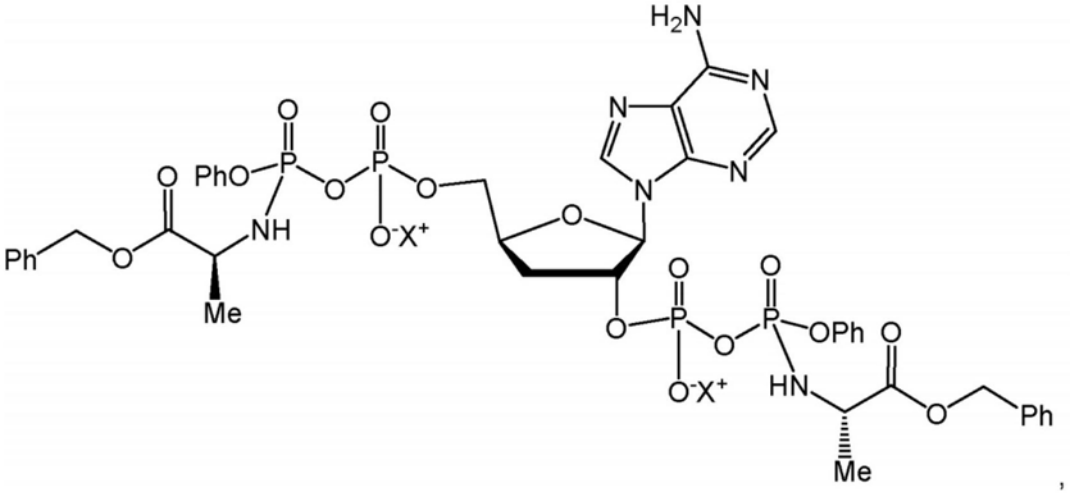




[0079]

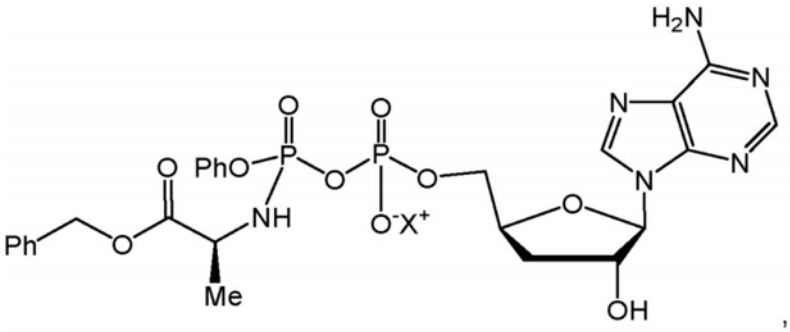




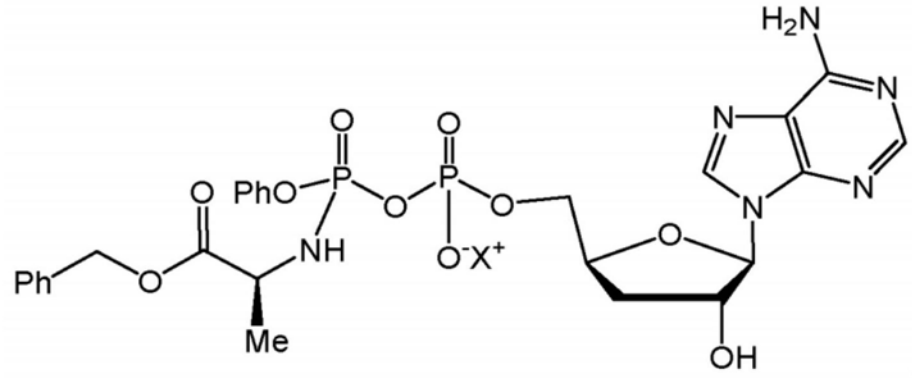


,

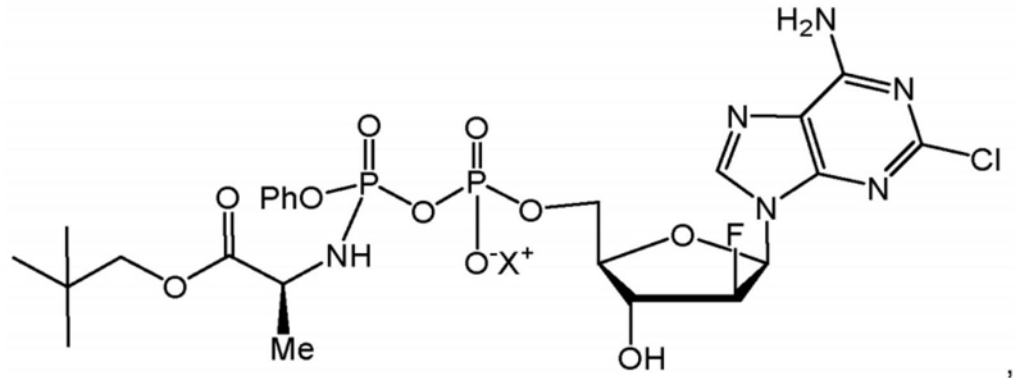
[0080]



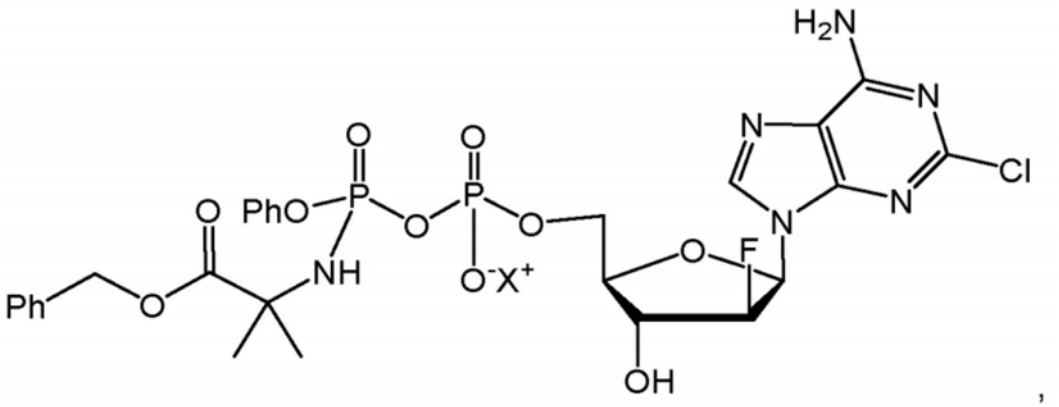
,



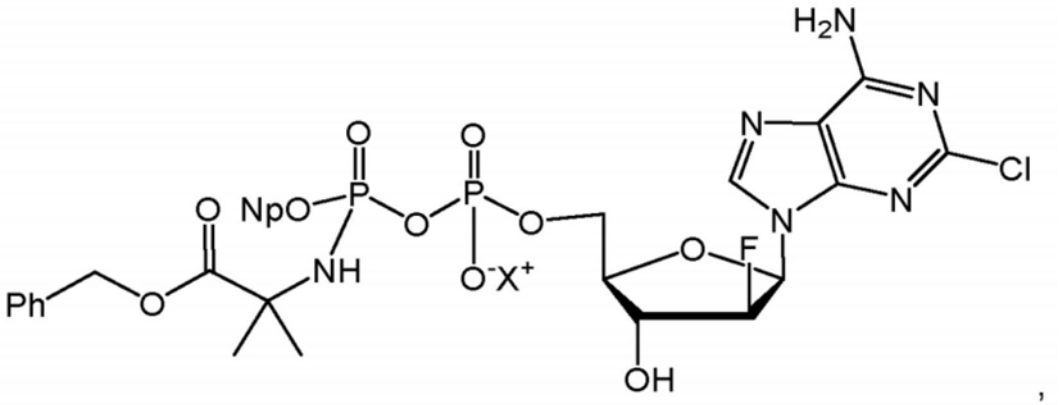
,



,

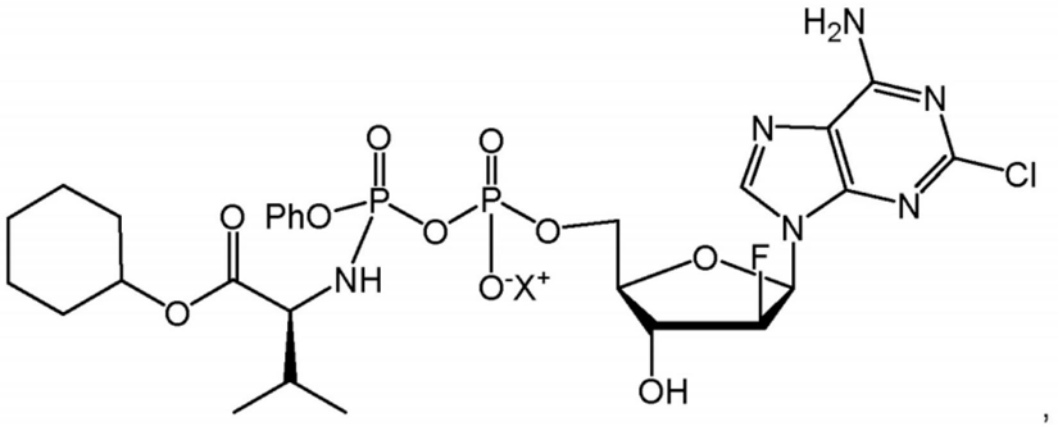


,

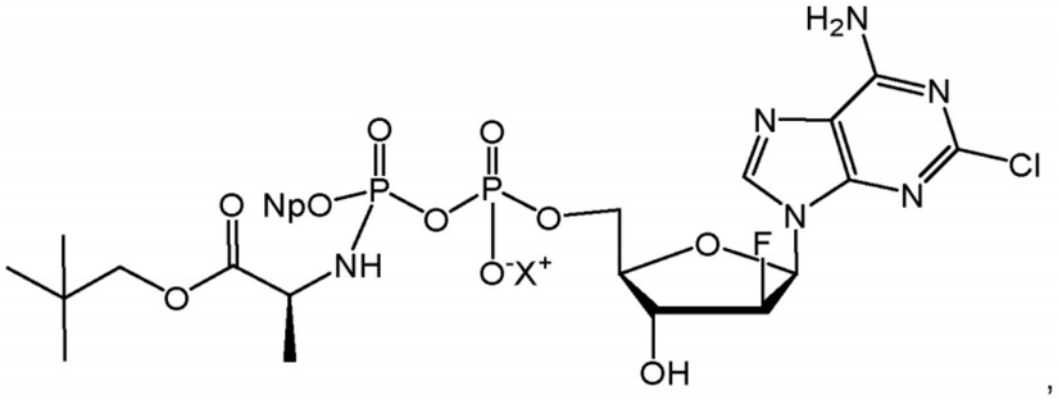


,

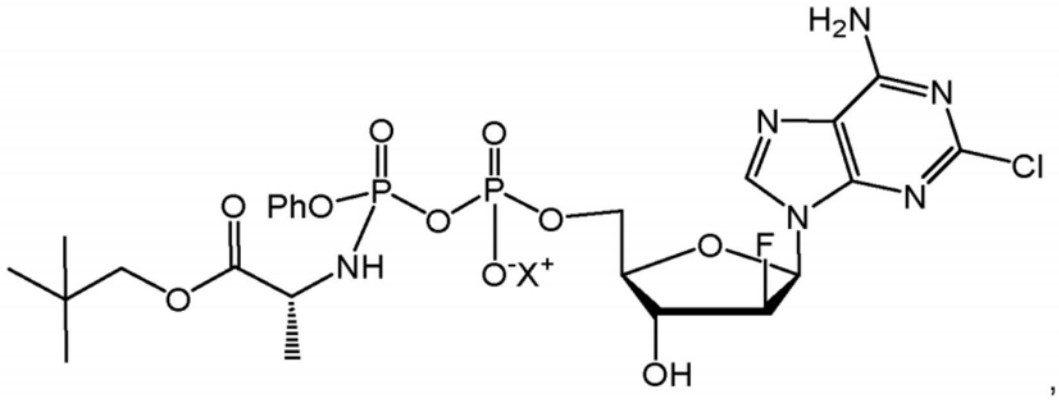
[0081]



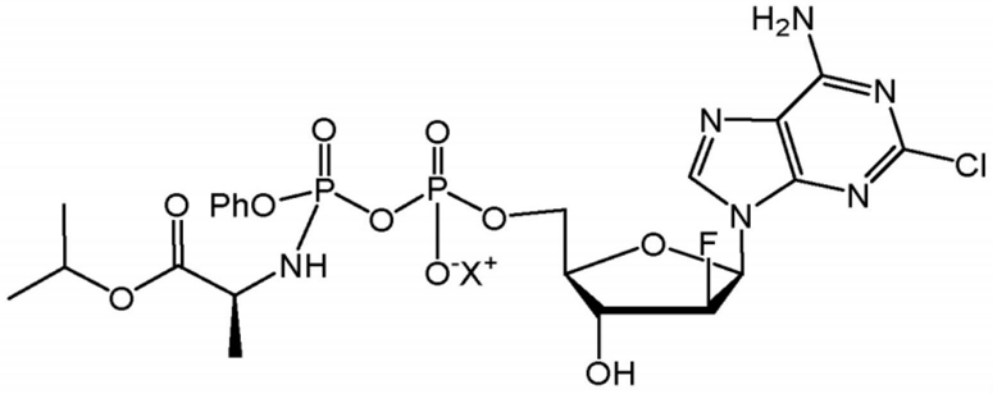
,



,

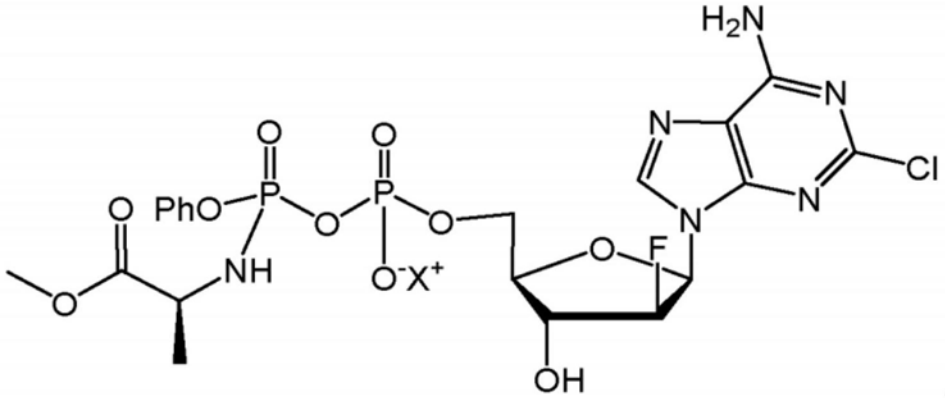


,

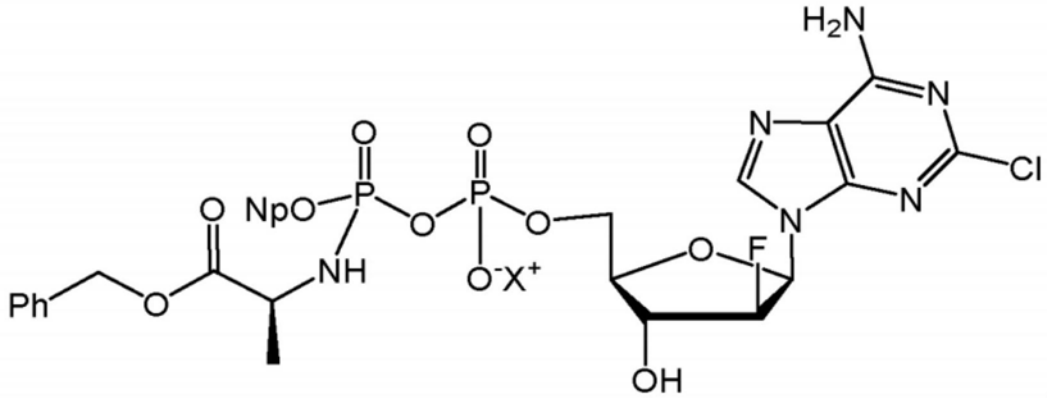


,

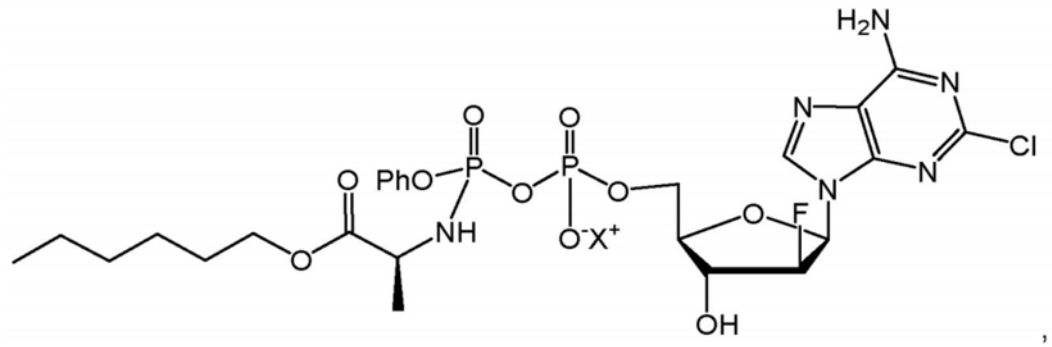
[0082]



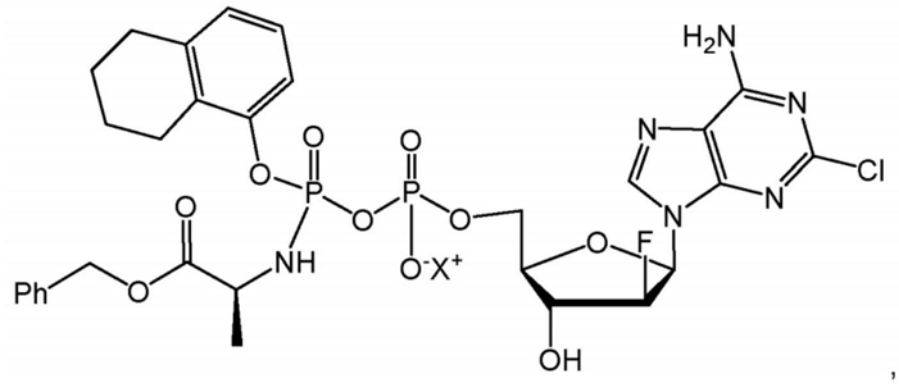
,



,

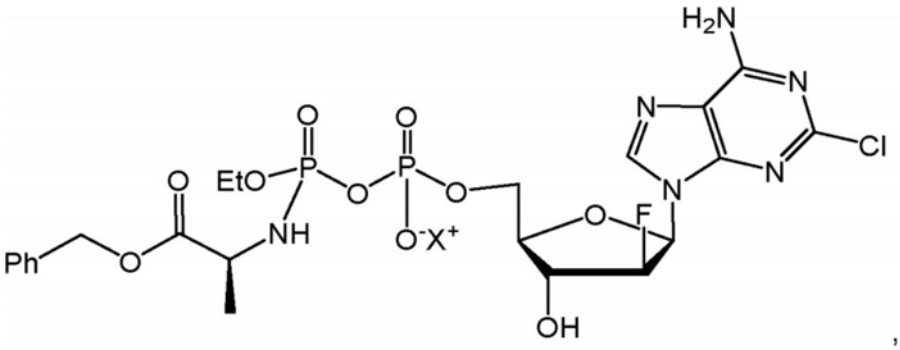


,

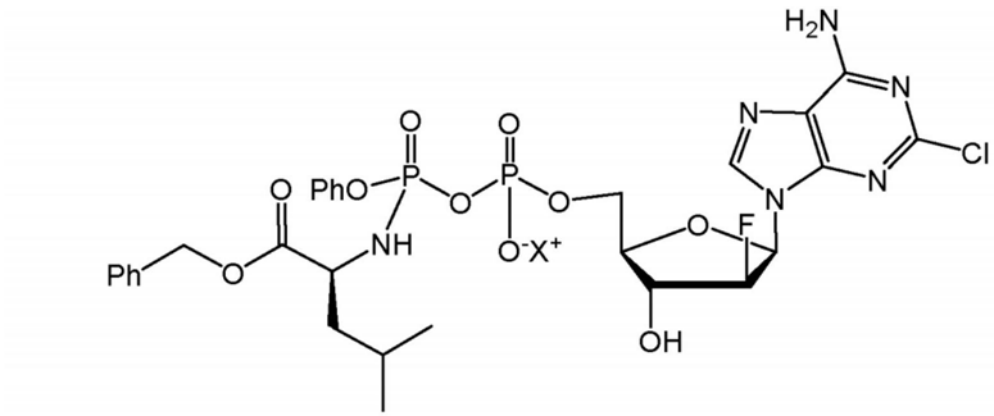


,

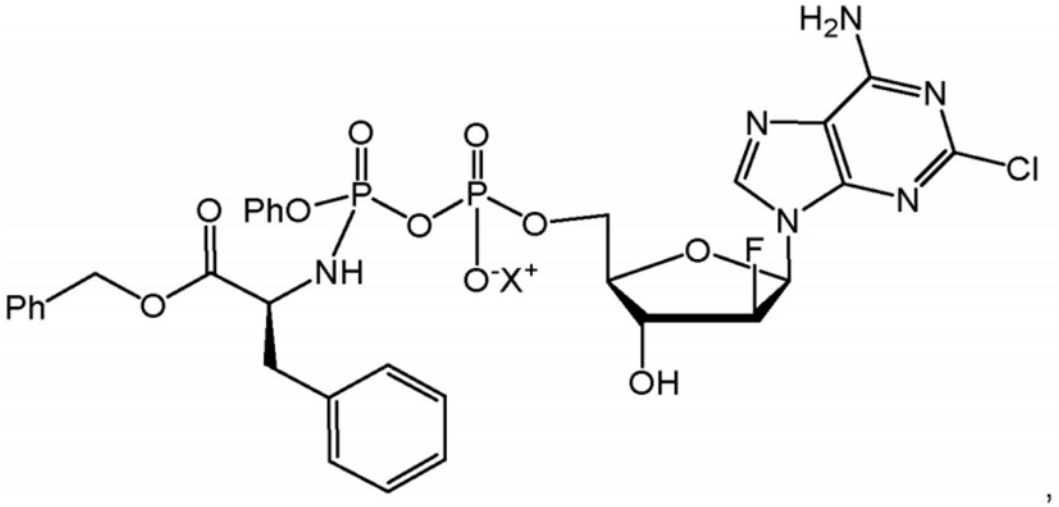
[0083]



,

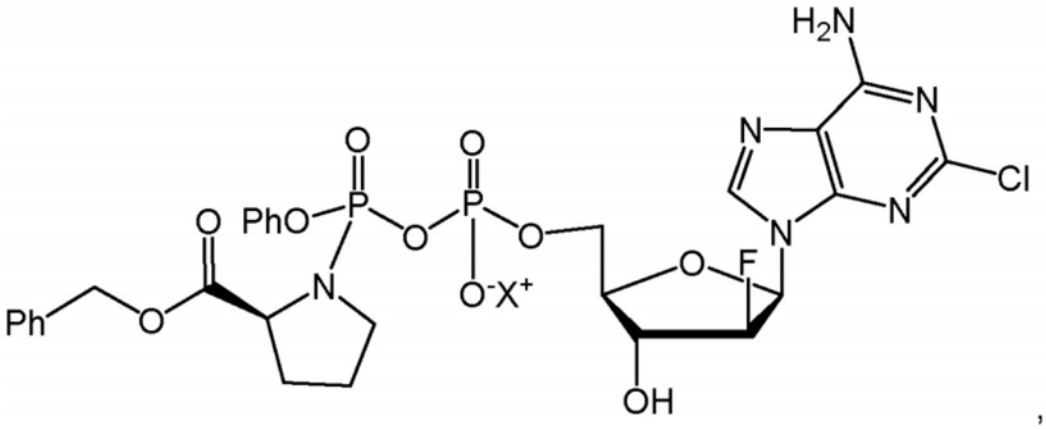


,

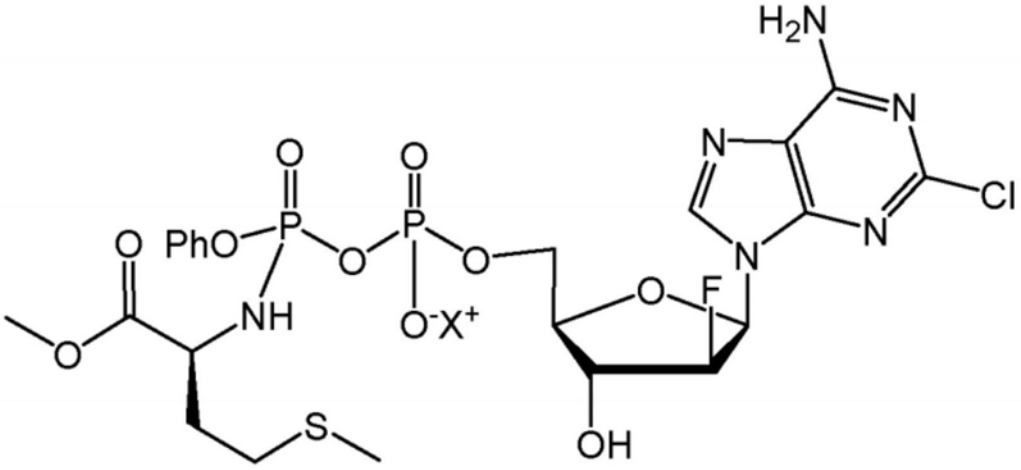


,

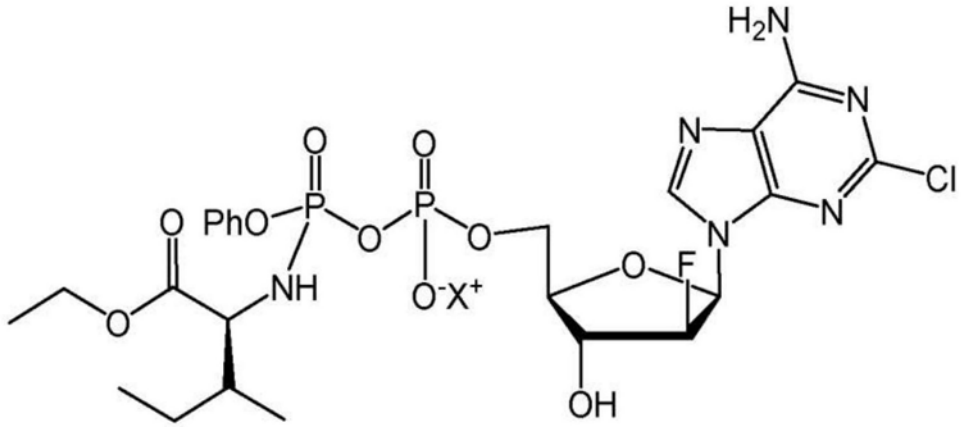
[0084]



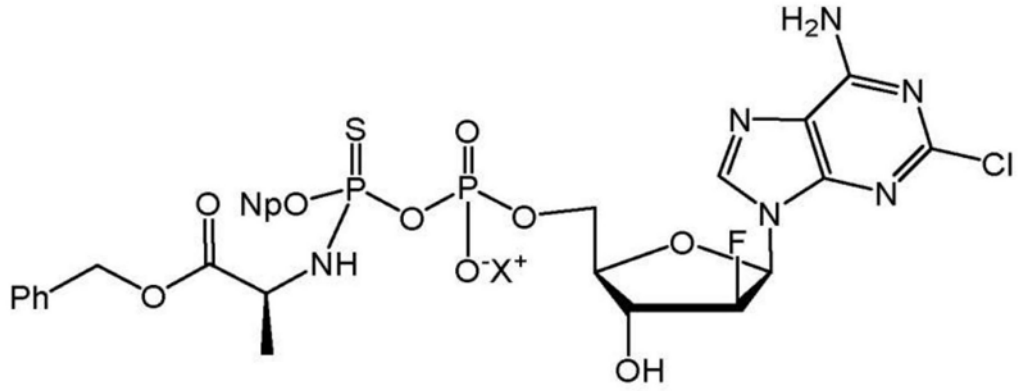
,



,

[0085] 


以及




。

[0086] $X^+$可以是金属阳离子，或其可以是铵阳离子。$X^+$可以是金属阳离子，例如碱金属或碱土金属的阳离子。$X^+$可以是铵阳离子，例如三烷基铵阳离子或氮杂环的铵阳离子。例证性阳离子包括衍生自铝阳离子、精氨酸阳离子、苄星青霉素(benzathine)阳离子、钙阳离子、胆碱阳离子、二乙胺阳离子、二乙醇胺(diolamine)阳离子、甘氨酸阳离子、赖氨酸阳离子、镁阳离子、葡甲胺阳离子、乙醇胺(olamine)阳离子、钾阳离子、钠阳离子、氨丁三醇阳离子、三乙胺阳离子和锌阳离子的阳离子。$X^+$可以是三乙胺阳离子。

[0087] 本发明的化合物包括在被键合至$OR^5$的磷原子(β-磷)处的手性中心。化合物可以作为磷酸酯非对映异构体的混合物存在、作为磷原子处的(S)-差向异构体以大体上非对映异构体上纯的形式存在或作为磷原子处的(R)-差向异构体以大体上非对映异构体上纯的形式存在。为了本发明的目的，‘大体上非对映异构体上纯的’被定义为大于约90％的非对映异构体纯度(diastereomeric purity)。如果作为大体上非对映异构体上纯的形式存在，则该化合物可以具有大于95％、98％、99％或甚至99.5％的非对映异构体纯度。可选择地，化合物可以作为磷酸酯非对映异构体的混合物存在。

[0088] 化合物的(R)-差向异构体和/或(S)-差向异构体可以通过色谱法，例如任选地使用手性柱的HPLC，以大体上非对映异构体上纯的形式获得。可选择地，化合物的(R)-差向异构体和/或(S)-差向异构体可以通过从合适的溶剂或溶剂体系中结晶，以大体上非对映异构体上纯的形式获得。

[0089] 根据本发明的第二方面，提供了用于治疗方法的式(I)的化合物或其药学上可接受的盐。

[0090] 根据本发明的第三方面，提供了用于预防或治疗癌症的式(I)的化合物或其药学

上可接受的盐。

[0091] 根据本发明的第四方面，提供了式(I)的化合物或其药学上可接受的盐在制造用于预防或治疗癌症的药物中的用途。

[0092] 根据本发明的第五方面，提供了一种预防或治疗癌症的方法，所述方法包括向需要这样的治疗的患者施用有效剂量的式(I)的化合物或其药学上可接受的盐。

[0093] 关于本发明的第三方面、第四方面和第五方面中的每个方面，本发明的实施方案包括癌症，所述癌症选自但不限于由以下组成的组：胰腺癌、膀胱癌、其他尿路上皮癌(urothelial cancer)(例如输尿管和肾盂的癌症)、胃肠癌(还被称为消化道癌，包括：食管癌、胃癌(gastric cancer)、胃癌(stomach cancer)、肠癌、小肠癌、结肠癌、结肠直肠癌、阑尾粘液(appendix mucinous)、杯状细胞类癌(goblet cell carcinoid)、肝癌、胆管癌、胆囊癌、肛门癌(anal cancer)和直肠癌)、肺癌、肾癌(renal cancer)(或肾癌(kidney cancer))、胆管癌(biliary cancer)、前列腺癌、胆管癌(cholangiocarcinoma)、神经内分泌癌(neuroendocrine cancer)、肉瘤、淋巴瘤、胸腺癌、多形性胶质母细胞瘤、未知原发性来源的癌症、间皮瘤、肾上腺癌、睾丸癌、中枢神经系统的癌症、基底细胞癌、Bowens病、其他皮肤癌(诸如恶性黑色素瘤、默克尔细胞瘤(merckel cell tumour)和罕见附属器肿瘤(rare appendage tumour))、眼表鳞状细胞瘤、生殖细胞瘤、白血病、多发性骨髓瘤、肺癌、肝癌、乳腺癌、头颈癌、神经母细胞瘤、甲状腺癌、口腔鳞状细胞癌、膀胱癌(urinary bladder cancer)、Leydig细胞瘤和妇科癌症(包括卵巢癌、输卵管的癌症、腹膜癌、子宫内膜癌、子宫癌和宫颈癌，包括上皮子宫颈癌(epithelia cervix carcinoma))。

[0094] 在某些实施方案中，癌症是白血病或淋巴瘤。

[0095] 癌症可以是白血病。

[0096] 取决于白血病是慢性的还是急性的以及在来源上是髓样的(myeloid)或淋巴样的(lymphoid)，存在四种主要类型的白血病。这些是：急性成髓细胞白血病(acute myeloblastic leukaemia)(AML)、急性成淋巴细胞白血病(acute lymphoblastic leukaemia)(ALL)、慢性骨髓性白血病(chronic myelogenous leukaemia)(CML)和慢性淋巴细胞白血病(chronic lymphocytic leukaemia)(CLL)。

[0097] 这些的混合物也是已知的，例如双表型急性白血病(BAL；其是AML和ALL的混合物)。

[0098] 在特定的实施方案中，白血病选自由以下组成的组：急性成髓细胞白血病(AML)、急性成淋巴细胞白血病(ALL)、慢性骨髓性白血病(CML)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)和双表型急性白血病(BAL；其是AML和ALL的混合物)。

[0099] 慢性淋巴细胞白血病(CLL)包括以下亚型：B细胞CLL(B-CLL)、B细胞幼淋巴细胞白血病(B-cell prolymphocytic leukaemia)(PLL)和T细胞慢性幼淋巴细胞白血病(T-PLL)以及在遗传水平不同的若干亚型。

[0100] 急性成淋巴细胞白血病(ALL)包括以下亚型：前体B细胞ALL(B-ALL)、前体T细胞ALL(T-ALL)、伯基特型ALL和费城染色体(Philadelphia chromosome)阳性(BCR-ABL融合)ALL。

[0101] 急性成髓细胞白血病(AML)包括以下亚型：髓样白血病、单核细胞性白血病和急性早幼粒细胞性白血病(APL)。

[0102] 慢性骨髓性白血病(CML)包括以下亚型:慢性粒细胞白血病(CGL)(CGL)、青少年CML(JCML)、慢性中性粒细胞白血病(CNL)、慢性粒单核细胞白血病(CMML)和非典型CML(aCML)。

[0103] 在特定的实施方案中,CLL、ALL、AML和CML的任何上文亚型适合于用本发明的化合物或包含其的药物组合物来治疗。

[0104] 可以被认为处于这四个主要组之外的其他形式的白血病包括:由红细胞前体引起的红白血病;以及已经进入血液的淋巴瘤。

[0105] 癌症可以是淋巴瘤,例如实体淋巴瘤。

[0106] 存在两种主要类型的淋巴瘤:霍奇金淋巴瘤和非霍奇金淋巴瘤。在这两种中的每种内,存在多种亚型。

[0107] 在特定的实施方案中,淋巴瘤选自由以下组成的组:霍奇金淋巴瘤和非霍奇金淋巴瘤。

[0108] 在特定的实施方案中,淋巴瘤选自由以下组成的组:伯基特氏淋巴瘤(BL)、套细胞淋巴瘤(MCL)、滤泡淋巴瘤(FL)、小淋巴细胞淋巴瘤(SLL)、惰性B细胞非霍奇金淋巴瘤(indolent B-cell non-Hodgkin's lymphoma)、组织细胞性淋巴瘤(又称免疫母细胞淋巴瘤;IBL)和弥漫性大B细胞淋巴瘤,弥漫性大B细胞淋巴瘤包括活化细胞样弥漫性大B细胞淋巴瘤(activated-cell like diffuse large B-cell lymphoma)(DLBCL-ABC)和生发中心B-细胞样弥漫性大B-细胞淋巴瘤(germinal center B-cell like diffuse large B-cell lymphoma)(DLBCL-GCB)。

[0109] 在某些实施方案中,癌症是胃肠癌,并且可以选自由以下组成的组:食管癌、胃癌(gastric cancer)、胃癌(stomach cancer)、肠癌、小肠癌、结肠癌、结肠直肠癌、阑尾粘液、杯状细胞类癌、肝癌、胆管癌、胆囊癌、肛门癌以及直肠癌。

[0110] 在某些实施方案中,癌症是妇科来源的,并且可以选自由以下组成的组:子宫癌、输卵管癌、子宫内膜癌、卵巢癌、腹膜癌以及子宫颈癌。合适地,卵巢癌可以是上皮性卵巢癌。合适地,腹膜癌可以是原发性腹膜癌。

[0111] 特别地,癌症可以选自但不限于胰腺癌、肺癌、膀胱癌、乳腺癌、胆管癌、淋巴瘤、白血病、胃肠癌以及妇科癌症。

[0112] 已经发现本发明的化合物即使在低氧条件下也保持活性。与低氧特别相关的癌症是胰腺癌和肾癌(renal cancer)(肾癌(kidney cancer))。

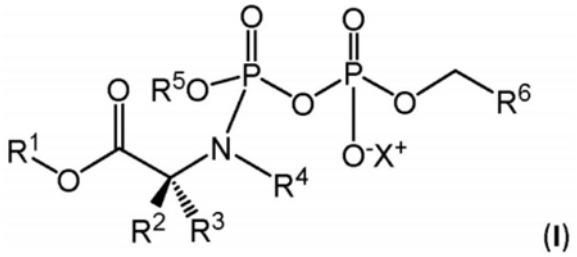
[0113] 癌症可以是复发性的。癌症可以是转移性的。癌症可以是先前未经治疗的。

[0114] 癌症可以是先前已经被治疗但是已经证明对先前治疗无响应的难治性癌症。可选择地,癌症患者可以不耐受先前的疗法,例如,可以产生使得患者对于用所施用的剂进一步治疗不耐受的副作用。

[0115] 根据本发明的第六方面,提供了包含式(I)的化合物或其药学上可接受的盐以及至少一种药学上可接受的赋形剂的药物组合物。药物组合物可以用于预防或治疗癌症,例如上文提及的癌症或癌症的组。

[0116] 式(I)的化合物可以如以下编号的段落中所描述:

[0117] 1.在本发明的第一方面中,提供了式(I)的化合物,或其药学上可接受的盐:

[0118] 

(I)

[0119] 其中

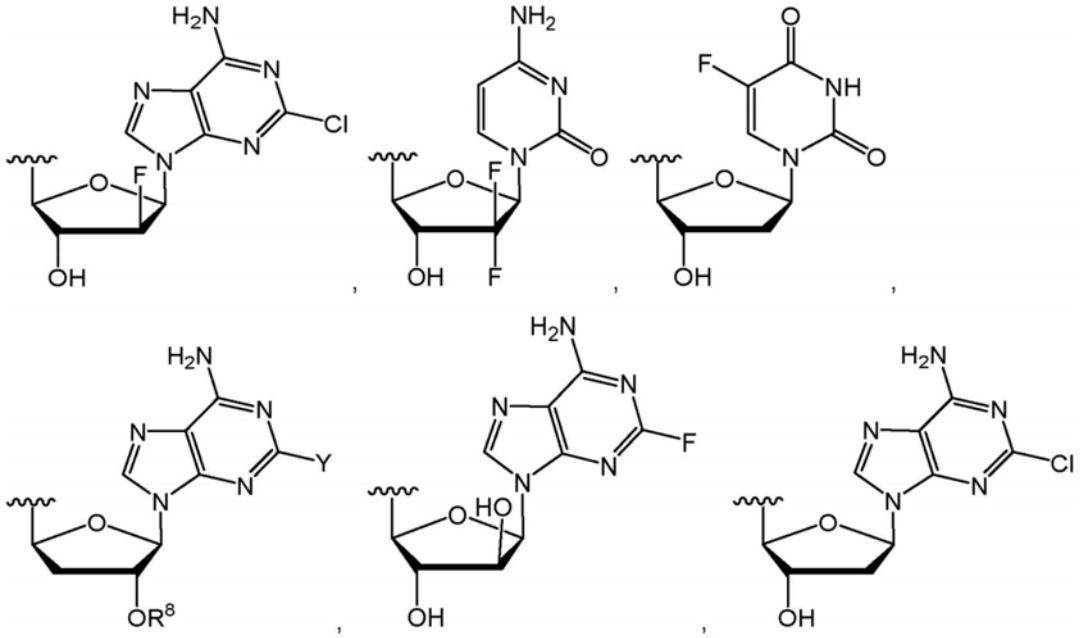
[0120] $R^1$在每次出现时独立地选自：$C_1$-$C_{24}$-烷基、$C_3$-$C_{24}$-烯基、$C_3$-$C_{24}$-炔基、$C_0$-$C_4$-亚烷基-$C_3$-$C_6$-环烷基或$C_0$-$C_4$-亚烷基-芳基。

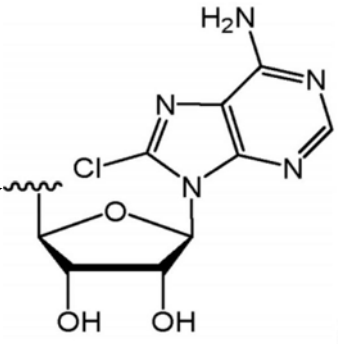
[0121] $R^2$和$R^3$在每次出现时各自独立地选自H、$C_1$-$C_6$-烷基和$C_1$-$C_3$-亚烷基-$R^7$；或者$R^2$和$R^3$与它们被附接至的原子一起形成3元至6元环烷基或杂环烷基基团；

[0122] $R^4$在每次出现时独立地是H或$C_1$-$C_4$-烷基；

[0123] $R^5$在每次出现时独立地选自芳基和5元、6元、9元或10元杂芳基；

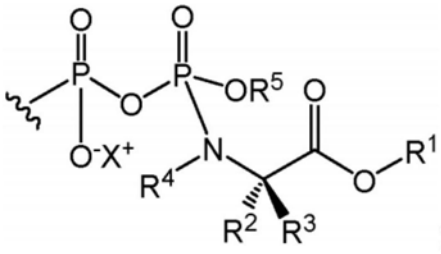
[0124] $R^6$独立地选自：

[0125] 

[0126] 以及  ；

[0127] $R^7$在每次出现时独立地选自芳基、咪唑、吲哚、$SR^a$、$OR^a$、$CO_2R^a$、$CO_2NR^aR^a$、$NR^aR^b$以及NH(=NH)$NH_2$；

[0128] $R^8$独立地选自H和

[0129] 

;

[0130] Y独立地选自H、F、Cl以及OMe；

[0131] X在每次出现时独立地是药学上可接受的阳离子；

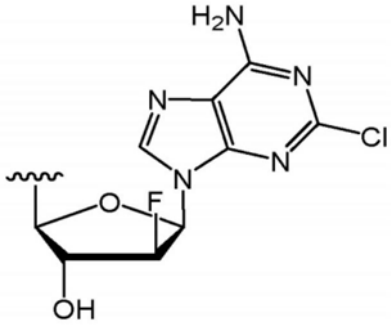
[0132] 其中任何芳基基团是苯基或萘基；

[0133] 其中在$R^1$、$R^2$、$R^3$、$R^4$、$R^5$或$R^7$中的任何一种是烷基、环烷基、杂环烷基、芳基或杂芳基的情况下，所述烷基、环烷基、杂环烷基、芳基或杂芳基基团任选地被从1个至4个选自以下的取代基取代：卤素、硝基、氰基、$NR^aR^a$、$NR^aS(O)_2R^a$、$NR^aC(O)R^a$、$NR^aCONR^aR^a$、$NR^aCO_2R^a$、$OR^a$、$SR^a$、$SOR^a$、$SO_3R^a$、$SO_2R^a$、$SO_2NR^aR^a$、$CO_2R^a$、$C(O)R^a$、$CONR^aR^a$、$CR^aR^aNR^aR^a$、$C_1$-$C_4$-烷基、$C_2$-$C_4$-烯基、$C_2$-$C_4$-炔基以及$C_1$-$C_4$-卤代烷基；

[0134] 其中$R^a$在每次出现时独立地选自：H和$C_1$-$C_4$-烷基；并且$R^b$在每次出现时独立地选自：H和$C_1$-$C_4$-烷基以及$C(O)$-$C_1$-$C_4$-烷基。

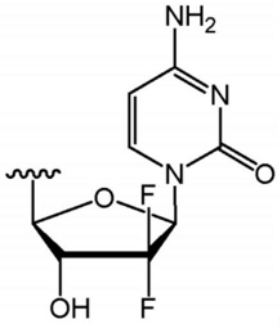
[0135] 2.如段落1所述的化合物，其中$R^4$是H。

[0136] 3.如段落1或段落2所述的化合物，其中$R^6$是

[0137] 

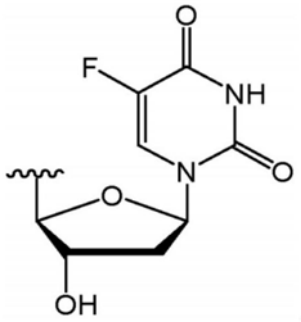
。

[0138] 4.如段落1或段落2所述的化合物，其中$R^6$是

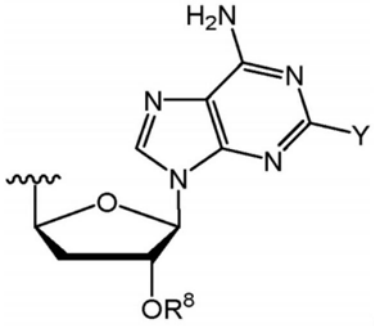
[0139] 

。

[0140] 5.如段落1或段落2所述的化合物，其中$R^6$是

[0141] 

[0142] 6.如段落1或段落2所述的化合物,其中$R^6$是

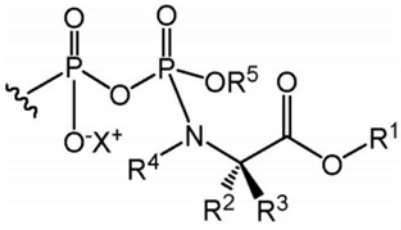
[0143] 

[0144] 7.如段落6所述的化合物,其中Y是H。

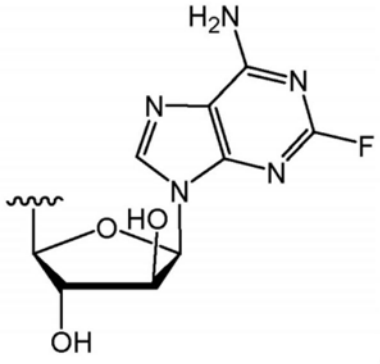
[0145] 8.如段落6所述的化合物,其中Y是F。

[0146] 9.如段落6至8中任一项所述的化合物,其中$R^8$是H。

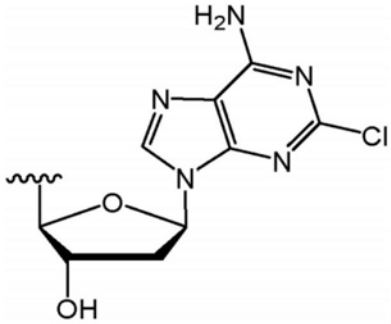
[0147] 10.如段落6至8中任一项所述的化合物,其中$R^8$是

[0148] 

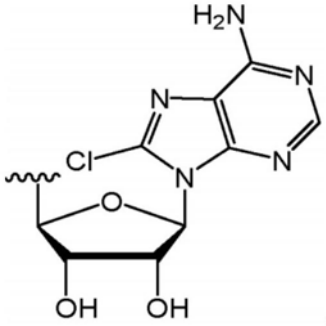
[0149] 11.如段落1或段落2所述的化合物,其中$R^6$是

[0150] 

[0151] 12.如段落1或段落2所述的化合物,其中$R^6$是

[0152] 

[0153] 13.如段落1或段落2所述的化合物,其中$R^6$是

[0154] 

[0155] 14.如权段落1至13中任一项所述的化合物,其中$R^1$选自$C_5$-$C_7$-环烷基、$C_1$-$C_8$-烷基以及苄基。

[0156] 15.如段落14所述的化合物,其中$R^1$是苄基。

[0157] 16.如段落14所述的化合物,其中$R^1$是$C_1$-$C_8$烷基,例如乙基。

[0158] 17.如段落1至16中任一项所述的化合物,其中$R^3$是H。

[0159] 18.如段落1至17中任一项所述的化合物,其中$R^2$是$C_1$-$C_4$-烷基。

[0160] 19.如段落1至17中任一项所述的化合物,其中$R^2$是H。

[0161] 20.如段落1至19中任一项所述的化合物,其中$R^5$是苯基。

[0162] 21.如段落1至19中任一项所述的化合物,其中$R^5$是萘基。

[0163] 22.如段落1至21中任一项所述的化合物,其中$X^+$是金属阳离子或铵阳离子。

[0164] 23.如段落1至22中任一项所述的化合物,用于医学用途。

[0165] 24.如段落1至23中任一项所述的化合物,用于治疗癌症。

[0166] 25.如段落24所述的用于使用的化合物,其中所述癌症是白血病或淋巴瘤。

[0167] 26.如段落25所述的用于使用的化合物,其中所述癌症是选自由以下组成的组的白血病:急性成淋巴细胞白血病、急性骨髓性白血病、骨髓增生异常综合征、急性早幼粒细胞白血病、急性淋巴细胞白血病、慢性骨髓性白血病、慢性淋巴细胞白血病、单核细胞性白血病(monoblastic leukaemia)以及毛细胞白血病。

[0168] 27.一种药物组合物,包含权利要求1至22中任一项所述的化合物以及至少一种药学上可接受的赋形剂。

[0169] 附图简述

[0170] 参考附图,在下文中进一步描述本发明的实施方案,在附图中:

[0171] 图1示出了(A)氯法拉滨,(B)实施例1和(C)实施例2的S形剂量-响应曲线。氯法拉滨和实施例1示出最高的效力。所有测定使用KG1a细胞进行,并且数据被表示为三个独立实

验的平均值(±SD)。

[0172] 图2示出了氯法拉滨、实施例1和实施例2的LSC靶向能力的分析。在常氧条件(normoxic condition)下,所有化合物在高于1x10$^{-7}$M的浓度示出干细胞靶向。所有数据是三个独立实验的平均值(±SD)。

[0173] 图3示出了在常氧条件和低氧条件下表达LSC表型的KG1a细胞的级分(fraction)的比较。(A)KG1a细胞在低氧条件下示出表达LSC表型的细胞的时间依赖性增加,(B)当细胞被转移到常氧培养条件中时,这被逆转。所有数据是四个独立实验的平均值(±SD)。

[0174] 图4示出了在常氧条件和低氧条件下,(A)氯法拉滨、(B)实施例1和(C)实施例2的平均$LD_{50}$值的比较。氯法拉滨在低氧条件下示出显著的效力损失。相比之下,本发明的化合物在低氧条件下保持其效力。所有数据是三个独立实验的平均值(±SD)。

[0175] 图5示出了在低氧条件(5%$O_2$)下在2小时暴露于(A)氯法拉滨、(B)实施例1和(C)实施例2后在纯化的LSC和大块肿瘤细胞(bulk tumour cell)中诱导的如通过γH2A.X磷酸化测定所测量的DNA损伤的比较。所有数据是三个独立实验的平均值(±SD)。

[0176] 详述

[0177] 术语'盐水'意图指的是氯化钠的水溶液。本发明的盐水溶液通常将是无菌的,并且通常将处于适合用于肠胃外施用的浓度。合适的浓度是多达2w/v%或多达1w/v%。为了优化摩尔渗透压浓度(osmolarity),在本发明的制剂中可以使用不同的盐水浓度,例如0.9%或0.45%。

[0178] 本发明的制剂可以用于治疗人类身体。它们可以用于治疗动物身体。

[0179] 本发明的制剂中的化合物可以以药学上可接受的盐的形式被获得、储存和/或施用。合适的药学上可接受的盐包括但不限于药学上可接受的无机酸的盐或药学上可接受的有机酸的盐,所述无机酸为诸如盐酸、硫酸、磷酸、硝酸、碳酸、硼酸、氨基磺酸和氢溴酸,所述有机酸为诸如乙酸、丙酸、丁酸、酒石酸、马来酸、羟基马来酸、富马酸、苹果酸、柠檬酸、乳酸、粘酸、葡糖酸、苯甲酸、琥珀酸、草酸、苯乙酸、甲磺酸、甲苯磺酸、苯磺酸、水杨酸、磺胺酸、天冬氨酸、谷氨酸、依地酸(edetic acid)、硬脂酸、棕榈酸、油酸、月桂酸、泛酸、丹宁酸、抗坏血酸和戊酸。合适的碱盐由形成无毒盐的碱形成。实例包括铝盐、精氨酸盐、苄星青霉素盐、钙盐、胆碱盐、二乙胺盐、二乙醇胺盐、甘氨酸盐、赖氨酸盐、镁盐、葡甲胺盐、乙醇胺盐、钾盐、钠盐、氨丁三醇盐和锌盐。还可以形成酸和碱的半盐,例如半硫酸盐、半草酸盐和半钙盐。

[0180] 对于上文提及的本发明的制剂,所施用的剂量当然将随着所采用的化合物、精确的施用方式、所期望的治疗和所指示的紊乱而变化。预计本发明的化合物的剂量水平、给药频率和治疗持续时间取决于制剂以及患者的临床适应症、年龄和合并(co-morbid)医学状况而不同。根据熟知的医学原理,本发明的化合物的用于治疗目的的剂量的大小将根据状况的性质和严重程度、动物或患者的年龄和性别以及施用的途径而自然地变化。

[0181] 药物制剂通常采取组合物的形式,在组合物中,活性化合物或其药学上可接受的盐与药学上可接受的佐剂、稀释剂或载体缔合。本发明的制剂中的一种这样的药学上可接受的佐剂、稀释剂或载体是极性非质子溶剂。用于合适的药物制剂的选择和制备的常规程序在例如"Pharmaceuticals-The Science of Dosage Form Designs",M.E.Aulton,Churchill Livingstone,1988中描述。

[0182] 制剂可以适合于局部应用(例如应用于皮肤或膀胱)、口服施用或肠胃外(例如静脉内)施用。

[0183] 在本发明的药物制剂中使用的任何溶剂应当是药物级别的,这意指溶剂具有致使其适合于施用(例如静脉内施用)至人类的杂质概况(impurity profile)。

[0184] 对于口服施用,本发明的制剂可以包含活性化合物,所述活性化合物与佐剂或载体例如乳糖、蔗糖、山梨醇、甘露醇;淀粉例如马铃薯淀粉、玉米淀粉或支链淀粉;纤维素衍生物;粘合剂例如明胶或聚乙烯吡咯烷酮;和/或润滑剂例如硬脂酸镁、硬脂酸钙、聚乙二醇、蜡、石蜡及类似物混合,并且然后压缩成片剂。如果需要包衣片剂,则如上文描述制备的芯可以用浓缩的糖溶液来包衣,所述浓缩的糖溶液可以包含例如阿拉伯树胶、明胶、滑石粉和二氧化钛。可选择地,片剂可以用溶解在容易挥发的有机溶剂中的合适的聚合物来包衣。

[0185] 为了制备软明胶胶囊,活性化合物可以与例如植物油或聚乙二醇混合。硬明胶胶囊可以包含使用上文提及的用于片剂的赋形剂的化合物的颗粒剂。活性化合物的液体制剂或半固体制剂也可以被填充到硬明胶胶囊中。

[0186] 用于口服应用的液体制品可以呈糖浆剂或悬浮液的形式,例如,包含本发明的化合物的溶液,余量(balance)是糖以及乙醇、水、甘油和丙二醇的混合物。任选地,这样的液体制品可以包含着色剂、调味剂、甜味剂(诸如糖精)、防腐剂和/或作为增稠剂的羧甲基纤维素或对本领域技术人员已知的其他赋形剂。

[0187] 制剂可以用于肠胃外(例如静脉内)施用。为了肠胃外(例如静脉内)施用,活性化合物可以作为无菌水溶液或无菌油性溶液来施用。优选地,活性化合物作为无菌水溶液被施用。水溶液还可以包含至少一种表面活性剂和/或有机溶剂。例证性有机溶剂包括二甲基乙酰胺、乙醇、乙二醇、N-甲基-吡咯烷酮、二甲基亚砜、二甲基甲酰胺以及异丙醇。例证性表面活性剂包括聚乙氧基化脂肪酸和脂肪酸酯及其混合物。合适的表面活性剂包括聚乙氧基化蓖麻油(例如,以商品名Kolliphor® ELP出售的聚乙氧基化蓖麻油);或聚乙氧基化硬脂酸(例如,以商品名Solutol®或Kolliphor® HS15出售的聚乙氧基化硬脂酸);或聚乙氧基化(例如聚氧乙烯(20))脱水山梨醇单油酸酯(例如以商品名Polysorbate 80或Tween®80出售的)。

[0188] 本发明的药物组合物将优选地包含从0.05%w至99%w(按重量计百分比)的本发明的化合物,更优选地从0.05%w至80%w的本发明的化合物,还更优选地从0.10%w至70%w的本发明化合物,并且甚至更优选地从0.10%w至50%w的本发明的化合物,所有按重量计的百分比基于总组合物。

[0189] 环糊精已经示出在药物递送中找到广泛应用(Rasheed等人,Sci.Pharm.,2008,76,567-598)。环糊精是环状寡糖的家族。它们充当‘分子笼(molecular cage)’,所述分子笼包封药物分子并且改变那些药物分子的性质诸如溶解度。环糊精包含(α-1,4)-连接的α-D-吡喃葡萄糖单元。环糊精可以包含6个、7个和8个吡喃葡萄糖单元(分别被指定为α-环糊精、β-环糊精和γ-环糊精)。药物制剂中使用的环糊精通常是β-环糊精。侧羟基基团可以用$C_1$-$C_6$被取代的或未被取代的烷基基团来烷基化。环糊精的实例是α-环糊精、β-环糊精、γ-环糊精、2-羟丙基-β-环糊精(HP-β-CD)、磺丁基醚β-环糊精钠盐、部分甲基化的β-环糊精。本发明的制剂还可以包含至少一种环糊精。

[0190] 术语$C_m$-$C_n$指的是具有m个至n个碳原子的基团。

[0191] 术语“烷基”指的是直链的或支链的烃基团。烷基基团是一价的。例如，$C_1$-$C_6$-烷基可以指的是甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、仲丁基、叔丁基、正戊基和正己基。烷基基团优选地是未被取代的。

[0192] 术语“亚烷基”指的是直链的烃链。亚烷基基团是二价的。例如，$C_1$-亚烷基可以指的是$CH_2$基团。$C_2$-亚烷基可以指的是-$CH_2CH_2$-基团。亚烷基基团优选地是未被取代的。

[0193] 术语“卤代烷基”指的是被至少一个卤素原子取代的烃链，所述卤素原子在每次出现时独立地选自：氟、氯、溴和碘。卤素原子可以存在于烃链上的任何位置处。例如，$C_1$-$C_4$-卤代烷基可以指的是氯甲基、氟甲基、三氟甲基、氯乙基例如1-氯甲基和2-氯乙基、三氯乙基例如1,2,2-三氯乙基、2,2,2-三氯乙基、氟乙基例如1-氟甲基和2-氟乙基、三氟乙基例如1,2,2-三氟乙基和2,2,2-三氟乙基、氯丙基、三氯丙基、氟丙基、三氟丙基。卤代烷基基团可以是氟烷基基团，即被至少一个氟原子取代的烃链。

[0194] 术语“烯基”指的是包含至少一个碳-碳双键的支链的或直链的烃链。双键可以作为E异构体或Z异构体存在。双键可以在烃链的任何可能的位置处。例如，“$C_2$-$C_4$-烯基”可以指的是乙烯基、烯丙基和丁烯基。烯基基团优选地是未被取代的。

[0195] 术语“炔基”指的是包含至少一个碳-碳三键的支链的或直链的烃链。三键可以在烃链的任何可能的位置处。例如，“$C_2$-$C_6$-炔基”可以指的是乙炔基、丙炔基、丁炔基。炔基基团优选地是未被取代的。

[0196] 术语“环烷基”指的是包含3个、4个、5个或6个碳原子的饱和的烃环体系。例如，“3元至6元环烷基”可以指的是环丙基、环丁基、环戊基、环己基。环烷基基团优选地是未被取代的。

[0197] 术语“杂环烷基”可以指的是在环体系中包含1个或2个独立地选自O、S和N的杂原子的饱和的或部分饱和的单环基团(换句话说，形成环体系的原子中的1个或2个选自O、S和N)。杂环烷基基团的实例包括：哌啶、哌嗪、吗啉、硫代吗啉、吡咯烷、四氢呋喃、四氢噻吩、四氢吡喃、二氢吡喃、二氧六环、吖庚因。杂环烷基基团优选地是未被取代的或被取代的。

[0198] 本发明还包括化合物的所有药学上可接受的同位素标记的形式的制剂，其中一个或更多个原子被具有相同原子序数但原子质量或质量数与自然界中通常发现的主要同位素的原子质量或质量数不同的原子替代。

[0199] 适合于包含在本发明的化合物中的同位素的实例包括氢的同位素诸如$^{2}H$和$^{3}H$，碳的同位素诸如$^{11}C$、$^{13}C$和$^{14}C$，氯的同位素诸如$^{36}Cl$，氟的同位素诸如$^{18}F$，碘的同位素诸如$^{123}I$和$^{125}I$，氮的同位素诸如$^{13}N$和$^{15}N$，氧的同位素诸如$^{15}O$、$^{17}O$和$^{18}O$，磷的同位素诸如$^{32}P$，以及硫的同位素诸如$^{35}S$。

[0200] 某些同位素标记的化合物，例如掺入放射性同位素的那些，在药物和/或底物组织分布研究中是有用的。放射性同位素氚即$^{3}H$和碳-14即$^{14}C$以及$^{18}F$，考虑到它们易于掺入和检测的现成手段，对于该目的是特别有用的。

[0201] 用更重的同位素诸如氘即$^{2}H$取代，可以提供由较大的代谢稳定性例如增加的体内半衰期或降低的剂量需求产生的某些治疗益处，并且因此在一些情况下可以是优选的。

[0202] 同位素标记的化合物通常可以通过本领域技术人员已知的常规技术或通过类似于使用合适的同位素标记的试剂替换先前采用的非标记的试剂所描述的工艺的工艺来制

备。

[0203] 用于治疗癌症(包括淋巴瘤或白血病)的治疗方法或制剂可以包括除了本发明的制剂之外的常规的外科手术或放射疗法或化学疗法。这样的化学疗法可以包括施用一种或更多种其他活性剂。

[0204] 在施用另外的活性剂作为本发明的治疗方法的一部分的情况下,这样的组合治疗可以通过治疗的单独的组分的同时、依次或分开的给药的方式来实现。这样的组合产品采用在上文中描述的治疗有效剂量范围内的本发明的化合物和在其被批准的剂量范围内的一种或更多种其他药学活性剂。

[0205] 因此,本发明的药物制剂可以包含另一种活性剂。

[0206] 一种或更多种其他活性剂可以是以下抗肿瘤剂类别中的一种或更多种:

[0207] (i)抗增殖药/抗肿瘤药及其组合,诸如烷基化剂(例如环磷酰胺、氮芥、苯达莫司汀、美法仑、苯丁酸氮芥、白消安、替莫唑胺和亚硝基脲);抗代谢物(例如,吉西他滨和抗叶酸剂(antifolate)诸如氟嘧啶如5-氟尿嘧啶和替加氟、雷替曲塞(ralitrexed)、甲氨蝶呤、培美曲塞、胞嘧啶阿拉伯糖苷和羟基脲);抗生素(例如,蒽环霉素类如阿霉素、博来霉素、多柔比星、道诺霉素、表柔比星、伊达比星、丝裂霉素-C、更生霉素和光辉霉素);抗有丝分裂剂(例如长春花生物碱类如长春新碱、长春花碱、长春地辛和长春瑞滨,以及紫杉烷类如紫杉醇和多西他赛(taxotere),以及保罗激酶(polokinase)抑制剂);蛋白酶体抑制剂,例如卡非佐米和硼替佐米;干扰素疗法;以及拓扑异构酶抑制剂(例如,表鬼臼毒素类如依托泊苷和替尼泊苷、安吖啶、拓扑替康、米托蒽醌以及喜树碱);

[0208] (ii)细胞生长抑制剂诸如抗雌激素类(例如三苯氧胺、氟维司群、托瑞米芬、雷洛昔芬、屈洛昔芬和艾多昔芬(iodoxyfene))、抗雄激素类(例如比卡鲁胺、氟他胺、尼鲁米特和乙酸环丙孕酮)、LHRH拮抗剂或LHRH激动剂(例如戈舍瑞林、亮丙瑞林和布舍瑞林)、孕激素类(例如乙酸甲地孕酮)、芳香化酶抑制剂(例如阿那曲唑、来曲唑、伏氯唑(vorazole)和依西美坦)以及5α-还原酶的抑制剂诸如非那雄胺;

[0209] (iii)抗侵入剂例如达沙替尼和博舒替尼(SKI-606),以及金属蛋白酶抑制剂、尿激酶纤溶酶原激活剂受体功能的抑制剂或乙酰肝素酶的抗体;

[0210] (iv)生长因子功能的抑制剂:例如,这样的抑制剂包括生长因子抗体和生长因子受体抗体例如抗erbB2抗体曲妥珠单抗(trastuzumab)[Herceptin™]、抗EGFR抗体帕尼单抗、抗erbB1抗体西妥昔单抗,酪氨酸激酶抑制剂例如表皮生长因子家族的抑制剂(例如,EGFR家族酪氨酸激酶抑制剂诸如吉非替尼、埃罗替尼和6-丙烯酰胺基-N-(3-氯-4-氟苯基)-7-(3-吗啉代丙氧基)-喹唑啉-4-胺(CI 1033),erbB2酪氨酸激酶抑制剂诸如拉帕替尼);肝细胞生长因子家族的抑制剂;胰岛素生长因子家族的抑制剂;细胞凋亡的蛋白调节物的调节剂(例如Bcl-2抑制剂);血小板衍生的生长因子家族的抑制剂,诸如伊马替尼和/或尼罗替尼(AMN107);丝氨酸/苏氨酸激酶的抑制剂(例如,Ras/Raf信号传导抑制剂诸如法尼基转移酶抑制剂,例如索拉非尼、替吡法尼和洛那法尼),通过MEK和/或AKT激酶的细胞信号传导的抑制剂、c-kit抑制剂、abl激酶抑制剂、PI3激酶抑制剂、Plt3激酶抑制剂、CSF-1R激酶抑制剂、IGF受体激酶抑制剂;极光激酶抑制剂和周期蛋白依赖性激酶抑制剂诸如CDK2抑制剂和/或CDK4抑制剂;

[0211] (v)抗血管生成剂,诸如抑制血管内皮生长因子的效应的那些抗血管生成剂,例如

抗血管内皮细胞生长因子抗体贝伐单抗(Avastin™);沙利度胺;来那度胺;以及例如VEGF受体酪氨酸激酶抑制剂诸如凡德他尼、瓦他拉尼(vatalanib)、舒尼替尼、阿西替尼和帕唑帕尼;

[0212] (vi)基因治疗方法,包括例如替换畸变基因诸如畸变的p53或畸变的BRCA1或BRCA2的方法;

[0213] (vii)免疫治疗方法,包括例如过继性细胞转移,诸如CAR T细胞疗法;抗体疗法诸如阿仑单抗、利妥昔单抗、替伊莫单抗(ibritumomab tiuxetan)(Zevalin®)和奥法木单抗;干扰素诸如干扰素α;白细胞介素诸如IL-2(阿地白介素);白细胞介素抑制剂例如IRAK4抑制剂;癌症疫苗,包括预防性疫苗和治疗疫苗,诸如HPV疫苗例如加德西(Gardasil)、希瑞适(Cervarix)、Oncophage和Sipuleucel-T(Provenge);以及toll样受体调节剂例如TLR-7或TLR-9拮抗剂;

[0214] (viii)细胞毒性剂例如氟达拉滨(福达华(fludara))、克拉屈滨、喷司他丁(Nipent™);

[0215] (ix)类固醇,诸如皮质类固醇,包括糖皮质激素和盐皮质激素,例如阿氯米松、二丙酸阿氯米松、醛固酮、安西奈德、倍氯米松、二丙酸倍氯米松、倍他米松、二丙酸倍他米松、倍他米松磷酸钠、戊酸倍他米松、布地奈德、氯倍他松、丁酸氯倍他松、丙酸氯倍他松、氯泼尼醇、可的松、醋酸可的松、可的伐唑、脱氧皮质酮、地奈德、去羟米松、地塞米松、地塞米松磷酸钠、异烟酸地塞米松、二氟可龙(difluorocortolone)、氟氯缩松(fluclorolone)、氟米松、氟尼缩松(flunisolide)、氟轻松(fluocinolone)、肤轻松缩丙酮(fluocinolone acetonide)、醋酸肤轻松(fluocinonide)、福可定丁酯、氟可的松、氟可龙、氟可龙己酸酯、氟可龙新戊酸酯、氟米龙、氟泼尼定、醋酸氟泼尼定、氟氢缩松(flurandrenolone)、氟替卡松、氟替卡松丙酸酯、哈西奈德、氢化可的松、醋酸氢化可的松、丁酸氢化可的松、醋丙氢可的松、丁丙氢化可的松、戊酸氢化可的松、艾可米松(icomethasone)、醋丁艾可米松、甲泼尼松、甲基强的松龙、莫米松、帕拉米松、糠酸莫米松一水合物、泼尼卡酯、泼尼松龙、泼尼松、替可的松、新戊酸替可的松、曲安西龙、曲安奈德缩丙酮(triamcinolone acetonide)、曲安西龙醇和其相应的药学上可接受的衍生物。可以使用类固醇的组合,例如该段落中提及的两种或更多种类固醇的组合;

[0216] (x)靶向疗法,例如PI3Kd抑制剂,例如艾代拉里斯(idelalisib)和哌立福辛;或检查点抑制剂化合物,包括抗PD-1分子、抗PD-L1分子和抗CTLA4分子,诸如纳武单抗、派姆单抗、pidilizumab、阿特珠单抗、德瓦鲁单抗(durvalumab)和阿维鲁单抗(avelumab)。

[0217] 一种或更多种其他活性剂还可以是抗生素。

[0218] 在整个本说明书的描述和权利要求中,词语“包括(comprise)”和“包含(contain)”以及它们的变型意指“包括但不限于”,并且它们不意图(并且不)排除其他部分、添加物、组分、整数或步骤。在整个本说明书的描述和权利要求中,除非上下文另外要求,否则单数涵盖复数。特别地,除非上下文另外要求,否则在使用不定冠词的情况下,本说明书应被理解为预期多个以及单个。

[0219] 结合本发明的特定方面、实施方案或实施例描述的特征、整数、特性、化合物、化学部分或组应被理解为可适用于本文描述的任何其他方面、实施方案或实施例,除非与其不相容。在本说明书(包括任何所附的权利要求、摘要和附图)中公开的所有特征和/或如此公

开的任何方法或工艺的所有步骤可以以任何组合被组合，除了其中这样的特征和/或步骤中的至少一些是相互地排他性的组合之外。本发明不限于任何前述实施方案的细节。本发明扩展至在本说明书(包括任何所附的权利要求、摘要和附图)中公开的特征中的任何新颖的特征或特征的任何新颖的组合，或扩展至如此公开的任何方法或工艺的步骤中的任何新颖的步骤或步骤的任何新颖的组合。

[0220] 读者的注意被引导至与本申请相关的本说明书同时提交的或在本说明书之前提交的并且随本说明书一起向公众开放查阅的所有论文和文献，并且所有这样的论文和文献的内容通过引用并入本文。

## 实施例

[0221] 在整个本说明书中，这些缩写具有以下含义。

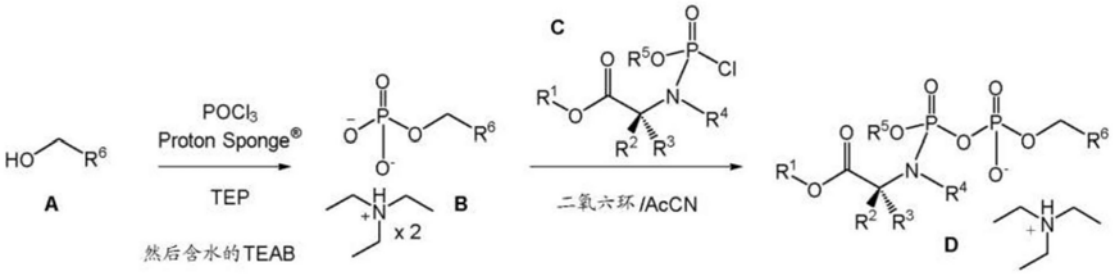
[0222]

| | | | |
|---|---|---|---|
| AcCN | 乙腈 | MS | 质谱法 |
| aq | 含水的 | NMR | 核磁共振 |
| DCM | 二氯甲烷 | Np | 1-萘基 |
| DMSO | 二甲基亚砜 | rt | 室温 |
| $EC_{50}$ | 半数最大有效浓度 | TEA | 三乙胺 |
| eq. | 当量 | TEAB | 三乙基碳酸氢铵缓冲液 |
| HPLC | 高压液相色谱法 | TEP | 磷酸三乙酯 |

[0223]

| | | | |
|---|---|---|---|
| h | 小时 | $t_R$ | 保留时间 |
| $IC_{50}$ | 半数最大抑制浓度 | | |

[0224] 用于合成二磷酸氨基磷酸酯的一般程序

[0225] 

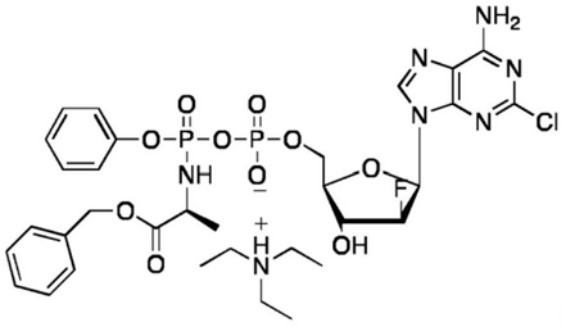

[0226] 将干燥的核苷A(～1.0mmol，1.0当量)溶解在5mL的磷酸三乙酯(TEP)中，并且在室温搅拌持续5min。将反应混合物冷却至4℃，并且添加干燥的1,8-双(二甲基氨基)萘(Proton Sponge®，1.5当量)，随后逐滴地添加$POCl_3$(1.3当量)。将所得到的悬浮液在4℃搅拌持续2小时-3小时。在此时间之后，向反应混合物添加冷的0.5M含水的三乙基碳酸氢铵缓冲液(TEAB)(pH 7.5)，并且将所得到的混合物搅拌持续30分钟，并且然后允许加温至室温并且搅拌持续另外的1h。TEP用叔丁基甲基醚(4×50mL)萃取，并且将水溶液蒸发并且在高真空下干燥过夜，以产生相应的作为玻璃状无色油或白色粉末的核苷5'-一磷酸三乙基铵盐(nucleoside 5'-monophosphate triethylammonium salt)B，其被用于下一步骤而不进一步纯化。核苷5'-一磷酸盐的形成通过负离子质谱法来证实。

[0227] TEAB的0.5M溶液通过在0℃-4℃将$CO_2$鼓泡通过0.5M在水中的三乙胺(TEA)溶液持续30min-45min(除非另外陈述,否则约7.4-7.6的pH)来制备。

[0228] 在第一步骤中核苷5'-一磷酸三乙基铵盐的合成遵循修改的参考文献来完成:El-Tayeb A.等人J.Med.Chem.2006,49(24),7076-7087。

[0229] 将核苷5'-一磷酸三乙基铵盐B(1mmol)在1,4-二氧六环/乙腈(20mL)的1:1混合物中的混合物在氩气气氛下在室温(rt)搅拌,并且逐滴地添加溶解在无水乙腈中的合适的氯磷酸酯(phosphorochloridate)C(1.0当量)。将所得到的反应混合物在rt搅拌持续18h。将粗制混合物在减压下蒸发,并且将残余物再溶解在DCM中并且吸附在用DCM/MeOH(92%/5%)的混合物中的TEA(3%)去活化的硅胶上。通过在预先装填有3CV的在DCM/MeOH(92%/5%)的混合物中的TEA(3%)的SNAP Ultra 50g柱体(cartridge)上的自动Biotage Isolera One以MeOH在DCM中的梯度(2%至20%,流量50mL/min)纯化(制备用于干燥负载的)粗制材料提供期望的化合物,所述化合物在Biotage Isolera One(具有作为洗脱剂的0.1M在AcCN(乙腈)中的TEAB在60min内从100%至0%的梯度、流量15mL/min的C18 SNAP Ultra 30g柱体)上,或通过在半制备型柱(Varian Pursuit XRs 5C18,150×21.22mm)上使用0.1M在AcCN中的TEAB在30min内从90/10至0/100的梯度的HPLC进一步再纯化。

[0230] 实施例1:2-氯-9-(2'-脱氧-2'-氟-β-D-阿拉伯呋喃糖基)腺嘌呤-5'-O-[苯基(苄氧基-L-丙氨酰基)]二磷酸三乙基铵盐。

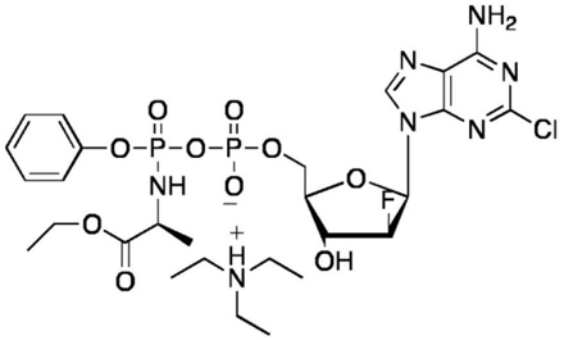
[0231] 

(1)

[0232] 由2-氯-9-(2'-脱氧-2'-氟-β-D-阿拉伯呋喃糖基)腺嘌呤-5'-一磷酸TEA盐(0.58g,0.98mmol)、苯基(苄氧基-L-丙氨酰基)氯磷酸酯(0.35g,0.98mmol),根据一般程序作为白色泡沫制备(0.04g,6%)。

[0233] $^{31}$P NMR(202MHz,MeOD):$\delta_P$-7.73(d,J=21.0Hz),-7.93(d,J=21.2Hz),-11.96(d,J=18.4Hz),-12.06(d,J=20.8Hz)。$^1$H NMR(500MHz,MeOD):$\delta_H$ 8.29,8.28(2x 0.5H,H-8),7.33-7.24(9H,m,H-Ar),7.18-7.14(1H,m,H-Ar),6.44,6.41(2x 0.5H,2x d,J=3.5Hz,H-1'),5.20-5.19(0.5H,m,H-2'),5.11(2H,明显的s,$OCH_2Ph$),5.10-5.08(0.5H,m,H-2'),4.58-4.54(1H,m,H-3'),4.26-4.24(2H,m,2x H-5'),4.16-4.13(2H,m,H-4',$NHCHCH_3$),3.08(6H,q,J=7.0Hz,3x $CH_2CH_3$),1.39,1.35(3H,2x d,J=7.0Hz,$NHCHCH_3$),1.26(9H,t,J=7.0Hz,3x $CH_2CH_3$)。MS(ES)负模式m/z:699($[M-H]^-$),精确质量:$C_{25}H_{28}ClFN_6O_{10}P_2$求定值700.93,实测值699.20($[M-H]^-$)。反相HPLC,用0.1M TEAB/AcCN在30min内从90/10至0/100洗脱,F=1mL/min,λ=254nm,$t_R$=14.05min。

[0234] 实施例2:2-氯-9-(2'-脱氧-2'-氟-β-D-阿拉伯呋喃糖基)腺嘌呤-5'-O-[苯基(乙氧基-L-丙氨酰基)]二磷酸三乙基铵盐。

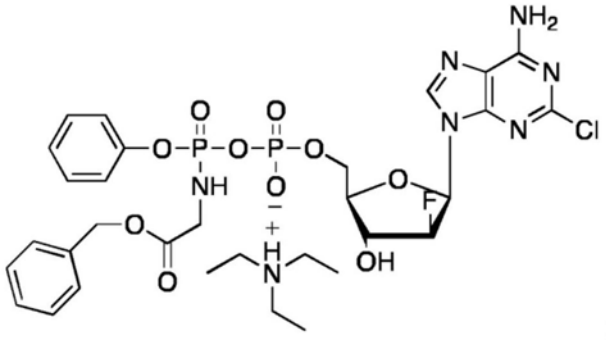
[0235] 

(2)

[0236] 由2-氯-9-(2'-脱氧-2'-氟-β-D-阿拉伯呋喃糖基)腺嘌呤-5'-一磷酸TEA盐(0.58g,0.98mmol)、苯基(乙氧基-L-丙氨酰基)氯磷酸酯(0.28g,0.98mmol),根据一般程序制备为白色固体(0.07g,10%)。

[0237] $^{31}$P NMR(202MHz,MeOD):$\delta_P$-7.72(d,J=20.2Hz),-7.89(d,J=20.2Hz),-11.94(d,J=18.2Hz),-12.10(d,J=18.2Hz)。$^{1}$H NMR(500MHz,MeOD):$\delta_H$ 8.29(1H,s,H-8),7.34-7.27(4H,m,H-Ar),7.17-7.15(1H,m,H-Ar),6.45,6.42(2x 0.5H,2x明显的t,J=1.5Hz,H-1'),5.24,5.10(2x 0.5H,2x明显的t,J=1.5Hz,H-2'),4.59,4.55(2x 0.5H,2x明显的t,J=2.0Hz,H-3'),4.26-4.24(2H,m,$OCH_2CH_3$),4.17-4.07(4H,m,H-5',$NHCHCH_3$,H-4'),3.05(6H,q,J=7.0Hz,3x $CH_2CH_3$),1.39,1.34(2x 1.5H,2x d,J=7.0$NHCHCH_3$),1.26-1.20(12H,m,$OCH_2CH_3$,3x $CH_2CH_3$)。MS(ES)负模式m/z:637([M-H]$^-$),精确质量:$C_{21}H_{26}ClFN_6O_{10}P_2$求定值638.86,实测值637.12([M-H]$^-$)。反相HPLC,用$H_2O$/AcCN在30min内从90/10至0/100洗脱,F=1mL/min,λ=254nm,两个非对映异构体的两个峰具有$t_R$=14.20min。

[0238] 实施例3:2-氯-9-(2'-脱氧-2'-氟-β-D-阿拉伯呋喃糖基)腺嘌呤-5'-O-[苯基(苄氧基-L-甘氨酰基)]二磷酸三乙基铵盐。

[0239] 

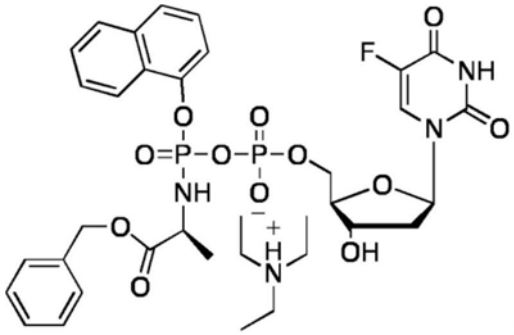
(3)

[0240] 由2-氯-9-(2'-脱氧-2'-氟-β-D-阿拉伯呋喃糖基)腺嘌呤-5'-一磷酸TEA盐(0.58g,0.98mmol)、苯基(苄氧基-L-甘氨酰基)氯磷酸酯(0.335g,0.98mmol),根据一般程序制备为白色固体(0.10g,13%)。

[0241] $^{31}$P NMR(202MHz,MeOD):$\delta_P$-6.70(d,J=20.2Hz),-11.86(d,J=22.2Hz)。$^{1}$H NMR(500MHz,MeOD):$\delta_H$ 8.30,8.29(2x 0.5H,2x d,J=2.0Hz,H-8),7.36-7.28(9H,m,H-Ar),7.18-7.14(1H,m,H-Ar),6.44,6.41(2x 0.5H,2x d,J=4.5Hz,H-1'),5.20-5.18(0.5H,m,H-2'),5.16(2H,明显的s,$OCH_2Ph$),5.09-5.07(0.5H,m,H-2'),4.61-4.55(1H,m,H-3'),4.29-4.25(2H,m,2x H-5'),4.17-4.13(1H,m,H-4'),3.96-3.84(2H,m,$NHCH_2$),2.89(6H,q,J=7.0Hz,3x $CH_2CH_3$),1.19(9H,t,J=7.0Hz,3x $CH_2CH_3$)。MS(ES)负模式m/z:685([M-H]$^-$),精确质量:$C_{25}H_{26}ClFN_6O_{10}P_2$求定值686,实测值685.119([M-H]$^-$)。反相HPLC,用0.1M TEAB/

AcCN在30min内从90/10至0/100洗脱,F＝1mL/min,λ＝254nm,$t_R$＝13.6min。

[0242] 实施例4:5-氟-2'-脱氧尿苷-5'-O-[1-萘基-(苄氧基-L-丙氨酰基)]二磷酸三乙基铵盐。

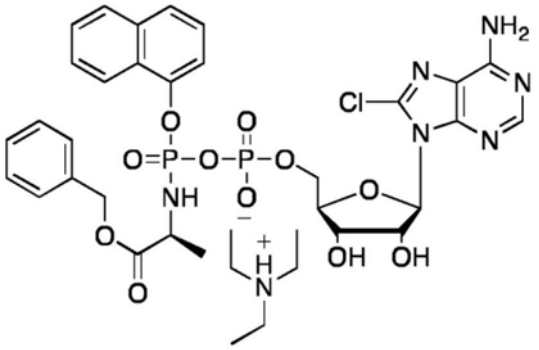
[0243] 

(4)

[0244] 由5-氟-2'-脱氧尿苷-5'-一磷酸TEA盐(1.07g,2.03mmol)、1-萘基(苄氧基-L-丙氨酰基)氯磷酸酯(0.82g,2.03mmol),根据一般程序制备为白色固体(0.16g,10%)。

[0245] $^{31}$P NMR(202MHz,MeOD):$\delta_P$-7.43(d,J＝22.2Hz),-7.79(d,J＝22.2Hz),-11.89(d,J＝20.2Hz),-12.02(d,J＝20.2Hz)。$^1$H-NMR(MeOD,500MHz)$\delta_H$ 8.39-8.35(1H,m,H-Ar),7.99(1H,明显的t,J＝6.0Hz,H-Ar),7.87-7.86(1H,m,H-Ar),7.69(1H,t,J＝7.0Hz,H-Ar),7.58(1H,明显的d,J＝7.0Hz,H-Ar),7.53-7.51(2H,m,H-Ar,H-6),7.43-7.36(1H,m,H-Ar),7.29-7.26(5H,m,H-Ar),6.26(1H,明显的q,J＝6.5Hz,H-1'),5.02-4.94(2H,2x明显的d,J＝13.5,J＝12.5Hz,$OCH_2Ph$),4.46-4.43(1H,m,H-3'),4.24-4.16(3H,m,3H,2x H-5',$NHCHCH_3$),4.03(1H,明显的s,H-4'),3.09(6H,q,J＝7.0Hz,3x $CH_2CH_3$),2.22-2.19(1H,m,H-2'),2.16-2.4(1H,m,H-2'),1.37(1.5H,d,J＝7.0Hz,$NHCHCH_3$),1.29(1.5H,d,J＝7.0Hz,$NHCHCH_3$),1.26(9H,t,J＝7.0Hz,3x $CH_2CH_3$)。MS(ES)负模式m/z:692($[M-H]^-$),精确质量:$C_{29}H_{30}FN_3O_{12}P_2$求定值693,实测值692.128($[M-H]^-$)。反相HPLC,用0.1M TEAB/AcCN在30min内从90/10至0/100洗脱,F＝1mL/min,λ＝254nm,$t_R$＝14.24min、14.34min。

[0246] 实施例5:8-氯腺苷-5'-O-[1-萘基-(苄氧基-L-丙氨酰基)]二磷酸三乙基铵盐。

[0247] 

(5)

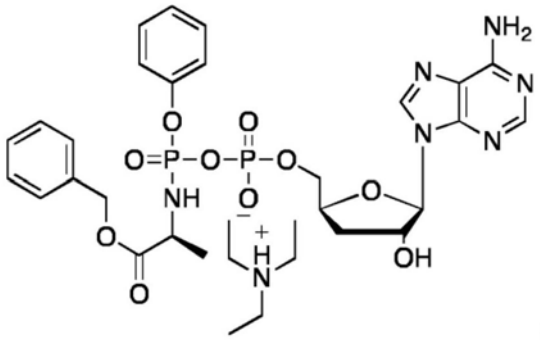
[0248] 由8-氯腺苷-5'-一磷酸TEA盐(0.46g,0.795mmol)、(1-萘基(苄氧基-L-丙氨酰基)氯磷酸酯(0.32g,0.795mmol),根据一般程序,在Biotage Isolera One(C18 30g柱体)上两次再纯化和HPLC(半制备型C18柱)之后制备为白色固体(0.02g,4%)。

[0249] $^{31}$P NMR(202MHz,MeOD):$\delta_P$-7.58(d,J＝22.2Hz),-8.0(d,J＝20.2Hz),-11.85(d,J＝22.2Hz),-12.05(d,J＝20.2Hz)。$^1$H NMR(500MHz,$CD_3OD$):$\delta_H$ 8.36-8.33(1H,m,H-Ar),8.14,8.10(2x 0.5H,2x s,H-2),7.86-7.84(1H,m,H-Ar),7.66(1H,d,J＝8.0Hz,H-Ar),

7.56-7.45(3H,m,H-Ar),7.38-7.33(1H,m,H-Ar),7.29-7.24(5H,m,H-Ar),6.02(1H,t,J＝6.0Hz,H-1'),5.35-5.32(1H,m,H-2'),5.00,4.98,4.97,4.94(2H,AB,$J_{AB}$＝12.3Hz,$OCH_2Ph$),4.54-4.50(1H,m,H-3'),4.40-4.33(1H,m,H-5'),4.26-4.13(3H,m,H-5',H-4',$NHCHCH_3$),3.06(6H,q,J＝7.0Hz,3x $CH_2CH_3$),1.36(1.5H,d,J＝7.0Hz,$NHCHCH_3$),1.26(1.5H,d,J＝7.0Hz,$NHCHCH_3$),1.25(9H,t,J＝7.0Hz,3x $CH_2CH_3$)。MS(ES)负模式m/z:747($[M-H]^-$),精确质量:$C_{30}H_{31}ClN_6O_{11}P_2$求定值749,实测值747.1102($[M-H]^-$)。反相HPLC,用0.1M TEAB/AcCN在30min内从90/10至0/100洗脱,F＝1mL/min,λ＝254nm,$t_R$＝14.32min、14.48min。

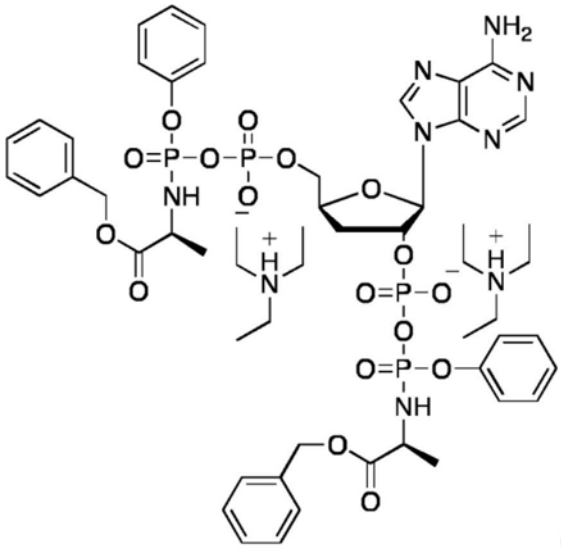
[0250] 实施例6和实施例7:3'-脱氧腺苷-5'-O-[苯基(苄氧基-L-丙氨酰基)]二磷酸三乙基铵盐(6)和3'-脱氧腺苷-5',2'-双-O-[苯基(苄氧基-L-丙氨酰基)]二磷酸三乙基铵盐(7)。

[0251] 由3'-脱氧腺苷-5'-一磷酸TEA盐(0.63g,1.186mmol)、苯基(苄氧基-L-丙氨酰基)氯磷酸酯(0.42g,1.186mmol)根据一般程序制备。将两种产物分离;3'-脱氧腺苷-5',2'-O-[苯基(苄氧基-L-丙氨酰基)]二磷酸三乙基铵盐(0.05g,5%)和作为无色膜的3'-脱氧腺苷-5'-O-[苯基(苄氧基-L-丙氨酰基)]二磷酸酯(0.01g,1.3%)。

[0252] 

(6)

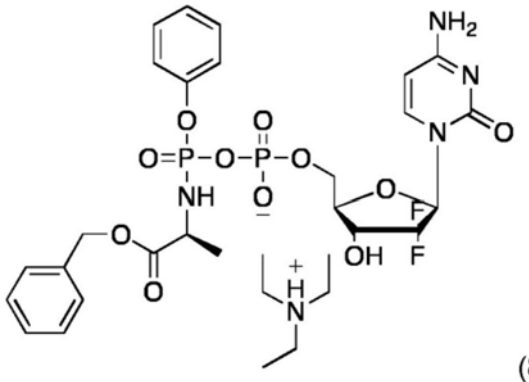
[0253] $^{31}P$ NMR(202MHz,MeOD):$\delta_P$-7.76(d,J＝21.0Hz),-8.03(d,J＝21.8Hz),-11.70(d,J＝20.4Hz),-11.81(d,J＝16.76Hz)。$^1H$ NMR(500MHz,$CD_3OD$):$\delta_H$ 8.45(1H,s,H-8),8.21(1H,s,H-2),7.34-7.23(9H,m,H-Ar),7.14-7.11(1H,m,H-Ar),6.02(1H,明显的s,H-1'),5.10(2H,AB体系明显的t,$J_{AB}$＝16.5Hz,$OCH_2Ph$),4.66-4.60(2H,m,H-2',H-4'),4.29-4.27(1H,m,H-5'),4.19-4.13(2H,m,H-5',$NHCHCH_3$),3.06(6H,q,J＝7.0Hz,3x $CH_2CH_3$),2.42-2.33(1H,m,H-3'),2.11-2.06(1H,m,H-3'),1.40(1.5H,d,J＝7.0Hz,$NHCHCH_3$),1.35(1.5H,d,J＝7.0Hz,$NHCHCH_3$),1.25(9H,t,J＝7.0Hz,3x $CH_2CH_3$)。MS(ES)负模式m/z:647($[M-H]^-$),精确质量:$C_{26}H_{30}N_6O_{10}P_2$求定值648,实测值647.154($[M-H]^-$)。反相HPLC,用0.1M TEAB/AcCN在20min内从90/10至0/100洗脱,F＝1mL/min,λ＝254nm,$t_R$＝8.20min。

[0254] 

(7)

[0255] $^{31}$P NMR(202MHz,MeOD):$\delta_P$-7.78(d,J＝20.4Hz),-7.84(d,J＝22.08Hz),-8.01(d,J＝21.0Hz),-12.08(d,J＝21.6Hz),-12.18(d,J＝22.0Hz),-13.50(d,J＝20.6Hz),-13.56(d,J＝20.2Hz)。$^1$H NMR(500MHz,$CD_3OD$):$\delta_H$ 8.20(0.5H,s,H-8),8.19(0.5H,s,H-8),8.04(1H,s,H-2),7.21-7.19(12H,m,H-Ar),7.14-6.97(8H,m,H-Ar),6.16(0.5H,s,H-1’),6.15(0.5H,s,H-1’),5.27(0.5H,明显的t,J＝7.0Hz,H-2’),5.15(0.5H,明显的t,J＝5.0Hz,H-2’),5.0-4.94(4H,m,2x $OCH_2Ph$),4.48-4.60(1H,m,H-4’),4.13-4.08(1H,m,H-5’),4.05-3.95(3H,m,H-5’,2x $NHCHCH_3$),3.06(12H,q,J＝7.0Hz,3x $CH_2CH_3$),2.50-2.42(1H,m,H-3’),2.27-2.20(1H,m,H-3’),1.26-1.17(6H,m,2x $NHCHCH_3$),1.25(18H,t,J＝7.0Hz,3x $CH_2CH_3$)。MS(ES)负模式m/z:1044([M-H]$^-$),精确质量:$C_{42}H_{47}N_7O_{17}P_4$求定值1045,实测值1044.232([M-H]$^-$)。反相HPLC,用0.1M TEAB/AcCN在30min内从90/10至0/100洗脱,F＝1mL/min,λ＝254nm,$t_R$＝9.75min、10.37min。

[0256] 实施例8:2’-脱氧-2’,2’-二氟-D-胞啶-5’-O-[苯基(苄氧基-L-丙氨酰基)]二磷酸三乙基铵盐。

[0257] 

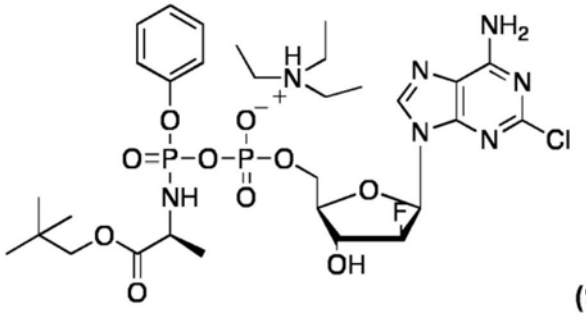
(8)

[0258] 由2’-脱氧-2’,2’-二氟-D-胞啶5’-一磷酸TEA盐(0.62g,1.13mmol)、苯基(苄氧基-L-丙氨酰基)氯磷酸酯(0.40g,1.13mmol),根据一般程序制备为白色固体(0.05g,6%)。

[0259] $^{31}$P NMR(202MHz,MeOD):$\delta_P$-7.65(d,J＝21.0Hz),-7.87(d,J＝21.0Hz),-12.12(d,J＝16.9Hz),-12.21(d,J＝21.4Hz)。$^1$H NMR(500MHz,MeOD):$\delta_H$ 7.83(1H,d,J＝7.5Hz,H-6),7.35-7.25(9H,m,H-Ar),7.16(1H,明显的t,J＝7.0Hz,H-Ar),6.27-6.24(1H,m,H-1’),

5.96,5.95(1H,2x d,J＝5.0Hz,H-5),5.13(2H,AB体系,明显的s,$OCH_2Ph$),4.37-4.25(3H,m,2x H-5',H-3'),4.18-4.12(1H,m,H-4'),4.00-3.97(1H,m,$NHCHCH_3$),3.20(6H,q,J＝7.0Hz,3x $CH_2CH_3$),1.40,1.35(3H,2x d,J＝7.5Hz,$NHCHCH_3$),1.31(9H,t,J＝7.5Hz,3x $CH_2CH_3$)。MS(ES)负模式m/z:659($[M-H]^-$),精确质量:$C_{25}H_{28}F_2N_4O_{11}P_4$求定值660,实测值659($[M-H]^-$)。反相HPLC,用0.1M TEAB/AcCN在30min内从90/10至0/100洗脱,F＝1mL/min,λ＝254nm,$t_R$＝12.55min、12.85min。

[0260] 实施例9:2-氯-9-(2'-脱氧-2'-氟-β-D-阿拉伯呋喃糖基)腺嘌呤-5'-O-[苯基(新戊氧基-L-丙氨酰基)]二磷酸三乙基铵盐。

[0261] 

(9)

[0262] 由2-氯-9-(2'-脱氧-2'-氟-β-D-阿拉伯呋喃糖基)腺嘌呤-5'-一磷酸TEA盐(0.77g,1.32mmol)、苯基(新戊氧基-L-丙氨酰基)氯磷酸酯(0.43g,1.32mmol)和TEA(0.53mL,3.81mmol),根据一般程序制备为白色固体(0.065g,6%)。

[0263] $^{31}P$ NMR(202MHz,$CD_3OD$):$\delta_P$-7.67(d,J＝21.0Hz),-7.93(d,J＝21.0Hz),-11.93(d,J＝21.21Hz),-12.04(d,J＝21.21Hz)。

[0264] $^{1}H$ NMR(500MHz,$CD_3OD$):$\delta_H$ 8.18(0.5H,s,H-8),8.17(0.5H,s,H-8),7.22-7.15(4H,m,H-Ar),7.12-7.09(1H,m,H-Ar),6.33(0.5H,t,J＝1.5Hz,H-1'),6.30(0.5H,t,J＝1.5Hz,H-1'),5.08(0.5H,明显的t,J＝1.5Hz,H-2'),4.96(0.5H,明显的t,J＝1.5Hz,H-2'),4.46(0.5H,明显的t,J＝2.0Hz,H-3'),4.43(0.5H,明显的t,J＝2.0Hz,H-3'),4.15-4.11(2H,m,H-5'),4.05-3.99(2H,m,$NHCHCH_3$,H-4'),3.72,3.69,3.63,3.61(2H,AB体系,J＝10.50Hz,$OCH_2C(CH_3)_3$),3.05(6H,q,J＝7.0Hz,$N(CH_2CH_3)_3$),1.31,1.25(2x 1.5H,2x d,J＝7.0$NHCHCH_3$),1.31(9H,t,J＝7.5Hz,$N(CH_2CH_3)_3$),0.80(9H,s,$OCH_2C(CH_3)_3$)。

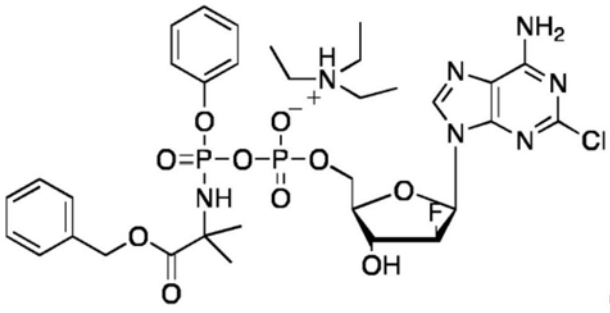
[0265] $^{13}C$ NMR(125MHz,$CD_3OD$):$\delta_C$ 175.10(d,$^3J_{C-P}$＝6.4Hz,C＝O,酯),173.56(d,$^3J_{C-P}$＝6.4Hz,C＝O,酯),156.72(C-6),154.16(C-2),153.42(d,$^2J_{C-P}$＝3.8Hz,C-Ar),150.90(d,$^2J_{C-P}$＝5.8Hz,C-Ar),150.26(C-4),142.68(C-8),129.26,128.73,124.65,124.60,122.40(CH-Ar),120.38,120.15(2x d,$^3J_{C-P}$＝4.6Hz,CH-Ar),117.15(C-5),94.99(d,$^1J_{C-F}$＝191.4Hz,C-2'),82.92(d,$^3J_{C-F}$＝8.25Hz,C-4'),82.78(d,$^2J_{C-F}$＝8.5Hz,C-1'),73.96,73.66($OCH_2C(CH_3)_3$),73.61(d,$^2J_{C-F}$＝24.5Hz,C-3'),65.05(C-5'),50.59,50.29($NHCHCH_3$),46.26($N(CH_2CH_3)_3$),30.91($OCH_2C(CH_3)_3$),25.36($OCH_2C(CH_3)_3$),19.75,19.63(2×d,$^3J_{C-P}$＝5.4Hz,$NHCHCH_3$),7.84($N(CH_2CH_3)_3$)。

[0266] $C_{24}H_{32}ClFN_6O_{10}P_2$质量求定值m/z 680.94;实测值MS($ES^-$)m/z:679.19($[M-H]^-$)。

[0267] 反相HPLC,用0.1M TEAB/AcCN在30min内从90/10至0/100洗脱,F＝1mL/min,λ＝254nm,两个非对映异构体的一个峰具有$t_R$＝15.83min。

[0268] 实施例10:2-氯-9-(2'-脱氧-2'-氟-β-D-阿拉伯呋喃糖基)腺嘌呤-5'-O-[苯基

(苄氧基-二甲基甘氨酰基)]二磷酸三乙基铵盐。

[0269] 

(10)

[0270] 由2-氯-9-(2'-脱氧-2'-氟-β-D-阿拉伯呋喃糖基)腺嘌呤-5'-一磷酸TEA盐(0.96g,1.64mmol)、苯基(苄氧基-二甲基甘氨酰基)氯磷酸酯(0.60g,1.64mmol)和TEA(0.66mL,4.75mmol),根据一般程序制备为白色固体(0.085g,6%)。

[0271] $^{31}$P NMR(202MHz,$CD_3OD$):$\delta_P$-9.79(d,J=22.6Hz),-9.82(d,J=22.6Hz),-12.17(d,J=21.20Hz),-12.20(d,J=21.0Hz)。

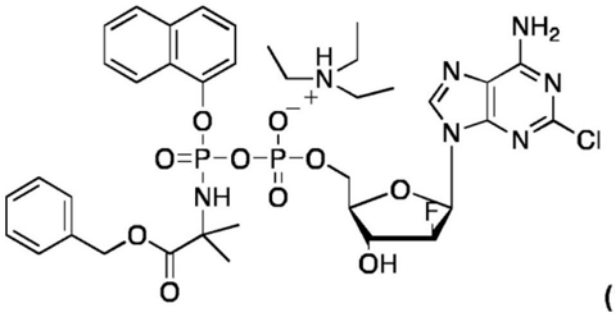
[0272] $^{1}$H NMR(500MHz,$CD_3OD$):$\delta_H$ 8.29(0.5H,s,H-8),8.27(0.5H,s,H-8),7.36-7.26(9H,m,H-Ar),7.16-7.13(1H,m,H-Ar),6.43(0.5H,d,J=1.5Hz,H-1'),6.39(0.5H,d,J=1.5Hz,H-1'),5.20-5.17(0.5H,m,H-2'),5.15-5.13(2H,m,$OCH_2Ph$),5.11-5.07(0.5H,m,H-2'),4.60-4.52(1H,m,H-3'),4.26-4.23(2H,m,H-5'),4.15-4.11(1H,m,H-4'),3.05(6H,q,J=7.0Hz,$N(CH_2CH_3)_3$),1.54(6H,s,$NHC(CH_3)_2$),1.31(9H,t,J=7.5Hz,$N(CH_2CH_3)_3$)。

[0273] $^{13}$C NMR(125MHz,$CD_3OD$):$\delta_C$ 174.96(d,$^3J_{C-P}$=6.6Hz,C=O,酯),156.69(C-6),154.13(C-2),151.06(d,$^2J_{C-P}$=7.3Hz,C-Ar),150.22(C-4),140.21(C-8),136.04(C-Ar),129.15.128.12.127.76,127.68,124.48,120.47,120.43(CH-Ar),117.12(C-5),95.49(d,$^1J_{C-F}$=192.5Hz,C-2'),82.84(d,$^3J_{C-F}$=3.6Hz,C-4'),82.68(d,$^2J_{C-F}$=11.5Hz,C-1'),73.59(d,$^2J_{C-F}$=11.5Hz,C-3'),73.41(d,$^2J_{C-F}$=10.5Hz,C-3'),66.74($OCH_2Ph$),64.90(C-5'),48.47($NHC(CH_3)_2$),46.35($N(CH_2CH_3)_3$),26.14,26.12($NHC(CH_3)_2$,9.85($N(CH_2CH_3)_3$)。

[0274] $C_{27}H_{30}ClFN_6O_{10}P_2$质量求定值m/z 714.96;实测值为MS(ES$^-$)m/z:713.13([M-H]$^-$)。

[0275] 反相HPLC,用0.1M TEAB/AcCN在30min内从90/10至0/100洗脱,F=1mL/min,λ=254nm,两个非对映异构体的一个峰具有$t_R$=14.51min。

[0276] 实施例11:2-氯-9-(2'-脱氧-2'-氟-β-D-阿拉伯呋喃糖基)腺嘌呤-5'-O-[1-萘基(苄氧基-二甲基甘氨酰基)]二磷酸三乙基铵盐。

[0277] 

(11)

[0278] 由2-氯-9-(2'-脱氧-2'-氟-β-D-阿拉伯呋喃糖基)腺嘌呤-5'-一磷酸TEA盐(0.96g,1.64mmol)、1-萘基(苄氧基-二甲基甘氨酰基)氯磷酸酯(0.68g,1.64mmol)和TEA(0.66mL,4.75mmol),根据一般程序制备为白色固体,其通过制备型HPLC进一步再纯化

(0.14g,10%)。

[0279] $^{31}$P NMR(202MHz,$CD_3OD$):$\delta_P$-9.79(d,J=22.6Hz),-9.82(d,J=22.6Hz),-12.17(d,J=21.20Hz),-12.20(d,J=21.0Hz)。

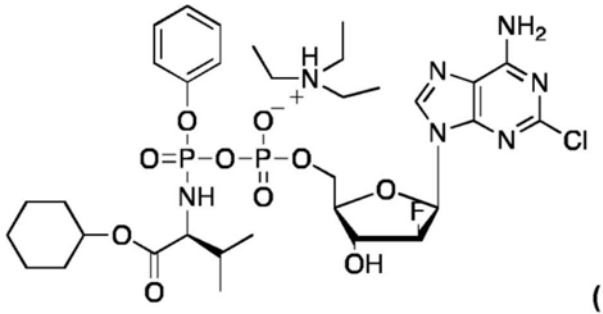
[0280] $^{1}$H NMR(500MHz,$CD_3OD$):$\delta_H$ 8.38-8.34(2H,m,H-Ar),8.24(0.5H,d,$^{5}J_{H-F}$=2.0Hz,H-8),8.22(0.5H,d,$^{5}J_{H-F}$=2.0Hz,H-8),7.85-7.83(2H,m,H-Ar),7.65-7.60(3H,m,H-Ar),7.48-7.44(3H,m,H-Ar),7.38-7.29(2H,m,H-Ar),6.39(0.5H,t,J=1.5Hz,H-1'),6.36(0.5H,t,J=1.5Hz,H-1'),5.17-5.15(0.5H,m,H-2'),5.14-5.07(2H,m,$OCH_2Ph$),5.05-5.02(0.5H,m,H-2'),4.57-4.50(1H,m,H-3'),4.27-4.24(2H,m,H-5'),4.15-4.10(1H,m,H-4'),3.05(6H,q,J=7.0Hz,$N(CH_2CH_3)_3$),1.90(6H,s,$NHC(CH_3)_2$),1.31(9H,t,J=7.5Hz,$N(CH_2CH_3)_3$)。

[0281] $^{13}$C NMR(125MHz,$CD_3OD$):$\delta_C$ 176.53,174.95(2×d,$^{3}J_{C-P}$=6.7Hz,C=O,酯),156.64(C-6),154.08(C-2),150.16,149.36(2x d,$^{3}J_{C-P}$=7.0Hz,C-Ar),146.91,146.85(C-4),142.89(C-8),136.23,135.99,134.79(C-Ar),128.07,127.70,127.65,127.61,127.16,126.99,126.18,125.83,125.59,125.43,125.06,124.76,124.20,122.57,122.25,122.20,121.44(CH-Ar),117.07(C-5),115.9(d,$^{4}J_{C-P}$=3.2Hz,CH-Ar),113.15(d,$^{4}J_{C-P}$=3.2Hz,CH-Ar),94.98,94.95(2x d,$^{1}J_{C-F}$=191.5Hz,C-2'),82.80(d,$^{3}J_{C-F}$=3.8Hz C-4'),82.68(d,$^{2}J_{C-F}$=24.5Hz C-1'),73.57,73.45(2x d,$^{2}J_{C-F}$=24.5Hz,C-3'),66.69,66.37($OCH_2Ph$),64.94(C-5'),56.95,55.87($NHC(CH_3)_2$),46.28($N(CH_2CH_3)_3$),26.10(d,$^{3}J_{C-P}$=4.1Hz,$NHC(CH_3)_2$),7.86($N(CH_2CH_3)_3$)。

[0282] $C_{31}H_{32}ClFN_6O_{10}P_2$质量求定值m/z 764.13;实测值MS(ES$^-$)m/z:763.15([M-H]$^-$)。

[0283] 反相HPLC,用0.1M TEAB/AcCN在30min内从90/10至0/100洗脱,F=1mL/min,λ=254nm,两个非对映异构体的一个峰具有$t_R$=14.85min。

[0284] 实施例12:2-氯-9-(2'-脱氧-2'-氟-β-D-阿拉伯呋喃糖基)腺嘌呤-5'-O-[苯基(环己氧基-L-缬氨酰基)]二磷酸三乙基铵盐。

[0285] 

(12)

[0286] 由2-氯-9-(2'-脱氧-2'-氟-β-D-阿拉伯呋喃糖基)腺嘌呤-5'-一磷酸TEA盐(0.96g,1.64mmol)、苯基(环己氧基-L-缬氨酰基)氯磷酸酯(0.61g,1.64mmol)和TEA(0.66mL,4.75mmol),根据一般程序制备为白色固体(0.19g,14%)。

[0287] $^{31}$P NMR(202MHz,$CD_3OD$):$\delta_P$-6.74(d,J=21.2Hz),-6.78(d,J=21.0Hz),-12.0(d,J=21.4Hz)。

[0288] $^{1}$H NMR(500MHz,$CD_3OD$):$\delta_H$ 8.18(0.5H,d,$^{5}J_{H-F}$=1.0Hz,H-8),8.17(0.5H,d,$^{5}J_{H-F}$=1.0Hz,H-8),7.22-7.15(4H,m,H-Ar),7.01-6.98(1H,m,H-Ar),6.34(0.5H,t,J=1.5Hz,H-1'),6.30(0.5H,t,J=1.5Hz,H-1'),5.08-5.06(0.5H,m,H-2'),4.97-4.96(0.5H,m,H-2'),

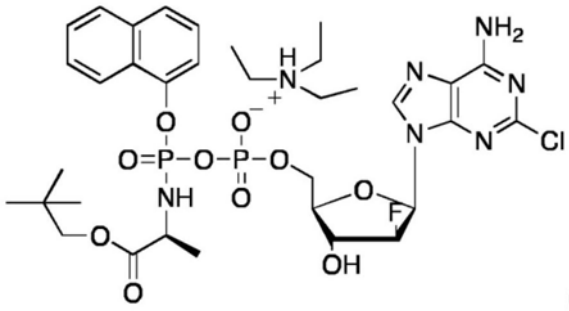
4.62-4.54(1H,m,OCH),4.46(0.5H,明显的t,J＝2.0Hz,H-3')，4.43(0.5H,明显的t,J＝2.0Hz,H-3')，4.15-4.12(2H,m,H-5')，4.06-4.02(1H,m,H-4')，3.68(0.5H,明显的dd,J＝10.0Hz,J＝5.5Hz,NHCHCH$(CH_3)_2$)，3.64(0.5H,明显的dd,J＝10.0Hz,J＝5.5Hz,NHCHCH$(CH_3)_2$)，3.05(6H,q,J＝7.0Hz,N$(CH_2CH_3)_3$)，1.91-1.80(1H,m,NHCHCH$(CH_3)_2$)，1.67-1.58(5H,m,$CH_2$)，1.39-1.37(1H,m,$CH_2$)，1.36-1.31(3H,m,$CH_2$)，1.31(9H,t,J＝7.5Hz,N$(CH_2CH_3)_3$)，0.86-0.78(6H,m,NHCHCH$(CH_3)_2$)。

[0289] $^{13}C$ NMR(125MHz,$CD_3OD$):$\delta_C$ 171.98,171.95(2×d,$^3J_{C-P}$＝4.5Hz,C＝O,酯)，156.69(C-6)，154.14(C-2)，151.02(d,$^2J_{C-P}$＝3.8Hz,C-Ar)，150.23(C-4)，142.25(C-8)，129.16,128.60,124.56,124.47,120.44(CH-Ar)，117.13(C-5)，94.96(d,$^1J_{C-F}$＝191.4Hz,C-2')，82.90(d,$^3J_{C-F}$＝3.8Hz C-4')，82.81(d,$^2J_{C-F}$＝32.5Hz C-1')，73.59,(d,$^2J_{C-F}$＝24.5Hz,C-3')，73.42(d,$^2J_{C-F}$＝16.8Hz,C-3')，62.88(d,$^2J_{C-P}$＝7.5Hz,C-C-5')，60.45,60.20(NHCHCH$(CH_3)_2$)，46.42(N$(CH_2CH_3)_3$)，32.56,32.09(NHCHCH$(CH_3)_2$)，31.14($CH_2$)，25.00($CH_2$)，23.25($CH_2$)，17.79,16.76(NHCHCH$CH_3$)，7.82(N$(CH_2CH_3)_3$)。

[0290] $C_{27}H_{36}ClFN_6O_{10}P_2$质量求定值m/z 720.16;实测值MS(ES$^-$)m/z:719.17($[M-H]^-$)。

[0291] 反相HPLC,用0.1M TEAB/AcCN在30min内从90/10至0/100洗脱,F＝1mL/min,λ＝254nm,两个非对映异构体的一个峰具有$t_R$＝15.73min。

[0292] 实施例13:2-氯-9-(2'-脱氧-2'-氟-β-D-阿拉伯呋喃糖基)腺嘌呤-5'-O-[1-萘基(新戊氧基-L-丙氨酰基)]二磷酸三乙基铵盐。

[0293] 

(13)

[0294] 由2-氯-9-(2'-脱氧-2'-氟-β-D-阿拉伯呋喃糖基)腺嘌呤-5'-一磷酸TEA盐(0.57g,0.97mmol)、1-萘基(新戊氧基-L-丙氨酰基)氯磷酸酯(0.37g,0.97mmol)和TEA(0.39mL,2.86mmol),根据一般程序制备为白色固体(0.13g,16%)。

[0295] $^{31}P$ NMR(202MHz,$CD_3OD$):$\delta_P$-7.41(d,J＝23.5Hz)，-7.82(d,J＝22.5Hz)，-11.82(d,J＝22.69Hz)，-11.95(d,J＝21.80Hz)。

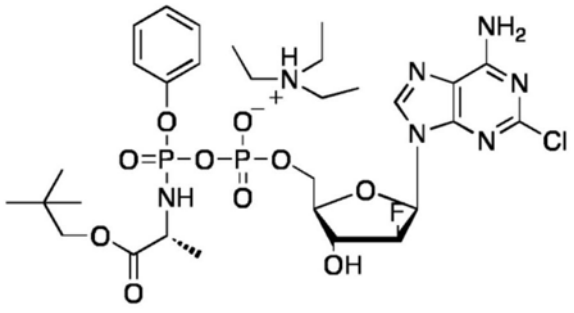
[0296] $^1H$ NMR(500MHz,$CD_3OD$):$\delta_H$ 8.36-8.25(2H,m,H-Ar)，7.85-7.79(2H,m,H-Ar)，7.68-7.65(2H,m,H-8)，7.58-7.36(2H,m,H-Ar)，(6H,m,H-Ar)，6.4(1H,dd J＝16.68Hz,4.1Hz,H-1')，5.19-5.05(1H,m,H-2')，4.58-4.53(1H m,H-3')，4.29-4.25(2H,m,H-5')，4.17-4.14(1.5H,m,H-4'和NHCHC$H_3$)，4.06-4.01(0.5H,m,NHC$HCH_3$)，3.75-3.66(2H,m,$OCH_2C(CH_3)_3$)，3.14(6H,q,J＝7.0Hz,N$(CH_2CH_3)_3$)，1.31-1.26(12H,m,NHCHC$H_3$,N$(CH_2CH_3)_3$)。

[0297] $C_{28}H_{34}ClFN_6O_{10}P_2$质量求定值m/z 730.15;实测值MS(ES$^-$)m/z:729.09($[M-H]^-$)。

[0298] 反相HPLC,用0.1M TEAB(pH 7.2)/AcCN在30min内从90/10至0/100洗脱,F＝1mL/min,λ＝254nm,两个非对映异构体的一个峰具有$t_R$＝14.63min。

[0299] 实施例14:2-氯-9-(2'-脱氧-2'-氟-β-D-阿拉伯呋喃糖基)腺嘌呤-5'-O-[苯基

(新戊氧基-D-丙氨酰基)]二磷酸三乙基铵盐。

[0300] 

(14)

[0301] 由2-氯-9-(2'-脱氧-2'-氟-β-D-阿拉伯呋喃糖基)腺嘌呤-5'-一磷酸TEA盐(0.86g,1.48mmol)、苯基(新戊氧基-D-丙氨酰基)氯磷酸酯(0.49g,1.48mmol)和TEA(0.59mL,4.25mmol),根据一般程序制备为白色固体(0.16g,14%)。

[0302] $^{31}$P NMR(202MHz,$CD_3OD$):$\delta_P$-7.68(d,J=21.0Hz),-7.91(d,J=21.0Hz),-12.04(d,J=20.08Hz),-12.14(d,J=20.08Hz)。

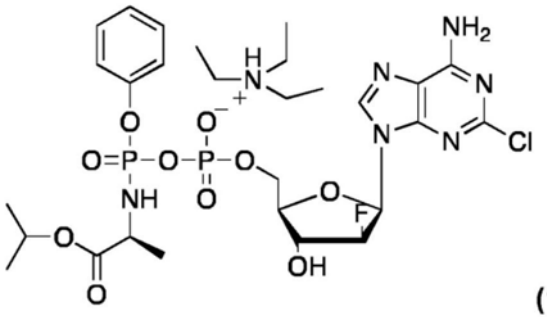
[0303] $^{1}$H NMR(500MHz,$CD_3OD$):$\delta_H$ 8.30(0.5H,d,$J_{H-F}$=2.0Hz,H-8),8.29(0.5H,d,$J_{H-F}$=2.0Hz,H-8),7.35-7.27(4H,m,H-Ar),7.18-7.14(1H,m,H-Ar),6.45(0.5H,t,J=3.5Hz,H-1'),6.42(0.5H,t,J=3.5Hz,H-1'),5.20(0.5H,明显的t,J=3.5Hz,H-2'),5.09(0.5H,明显的t,J=3.5Hz,H-2'),4.61-4.54(1H,m,H-3'),4.27-4.23(2H,m,H-5'),4.17-4.10(2H,m,$NHCHCH_3$,H-4'),3.80-3.72(2H,m,$OCH_2C(CH_3)_3$),3.33(6H,q,J=7.0Hz,$N(CH_2CH_3)_3$),1.42(1.5H,dd,J=7.0Hz,J=0.5Hz,$NHCHCH_3$),1.36(1.5H,dd,J=7.0Hz,J=0.5Hz,$NHCHCH_3$),1.31(9H,t,J=7.5Hz,$N(CH_2CH_3)_3$),0.80(9H,s,$OCH_2C(CH_3)_3$)。

[0304] $^{13}$C NMR(125MHz,$CD_3OD$):$\delta_C$ 173.56,173.48(明显的t,$^{3}J_{C-P}$=7.6Hz,C=O,酯),156.70(C-6),154.13(C-2),150.89(明显的t,$^{2}J_{C-P}$=6.6Hz,C-Ar),150.24(C-4),142.68(C-8),129.22,128.67,124.65,124.60,122.34(CH-Ar),120.38,120.36(2x d,$^{3}J_{C-P}$=4.6Hz,CH-Ar),117.14(C-5),95.0,94.99(2x d,$^{1}J_{C-F}$=191.6Hz,C-2'),82.76(d,$^{3}J_{C-F}$=8.25Hz,C-4'),82.68(d,$^{2}J_{C-F}$=8.5Hz,C-1'),73.95,73.92($OCH_2C(CH_3)_3$),73.58,73.50(2x d,$^{2}J_{C-F}$=24.5Hz,C-3'),64.98,64.86(2x d,$^{2}J_{C-P}$=4.6Hz,C-5'),50.36,50.27(2x d,$^{3}J_{C-P}$=2.4Hz,$NHCHCH_3$),46.36($N(CH_2CH_3)_3$),30.92,30.89($OCH_2C(CH_3)_3$),25.35,25.33($OCH_2C(CH_3)_3$),19.75,19.61(2×d,$^{3}J_{C-P}$=5.6Hz,$NHCHCH_3$),7.82($N(CH_2CH_3)_3$)。

[0305] $C_{24}H_{32}ClFN_6O_{10}P_2$质量求定值m/z 680.94;实测值MS($ES^-$)m/z:679.19($[M-H]^-$)。

[0306] 反相HPLC,用0.1M TEAB/AcCN在30min内从90/10至0/100洗脱,F=1mL/min,λ=254nm,两个非对映异构体的一个峰具有$t_R$=14.23min。

[0307] 实施例15:2-氯-9-(2'-脱氧-2'-氟-β-D-阿拉伯呋喃糖基)腺嘌呤-5'-O-[1-苯基(异丙氧基-L-丙氨酰基)]二磷酸三乙基铵盐。

[0308] 

(15)

[0309] 由2-氯-9-(2'-脱氧-2'-氟-β-D-阿拉伯呋喃糖基)腺嘌呤-5'-一磷酸TEA盐(0.86g,1.48mmol)、苯基(异丙氧基-L-丙氨酰基)氯磷酸酯(0.45g,1.48mmol)和TEA(0.59mL,4.25mmol),根据一般程序制备为白色固体(0.126g,11%)。

[0310] $^{31}$P NMR(202MHz,$CD_3OD$):$\delta_P$-7.62(d,J=21.0Hz),-7.85(d,J=21.0Hz),-12.14(明显的t,J=20.2Hz)。

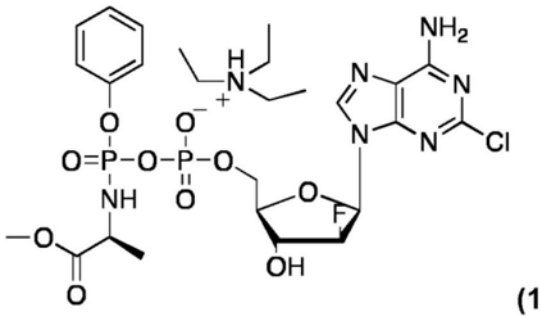
[0311] $^{1}$H NMR(500MHz,$CD_3OD$):$\delta_H$ 8.30(1H,d,$^{5}J_{H-F}$=2.0Hz,H-8),7.35-7.27(4H,m,H-Ar),7.18-7.14(1H,m,H-Ar),6.45(0.5H,t,J=3.5Hz,H-1'),6.42(0.5H,t,J=3.5Hz,H-1'),5.22(0.5H,q,J=3.5Hz,H-2'),5.13(0.5H,q,J=3.5Hz,H-2'),4.96-4.94(1H,m,$OCH(CH_3)_2$),4.61-4.58(0.5H,m,H-3'),4.57-4.55(0.5H,m,H-3'),4.29-4.25(2H,m,H-5'),4.19-4.15(1H,m,$NHCHCH_3$),4.07-4.00(1H,m,H-4'),3.33(6H,q,J=7.0Hz,$N(CH_2CH_3)_3$),1.38(1H,d,J=7.5Hz,$NHCHCH_3$),1.33(2H,dd,J=7.5Hz,$NHCHCH_3$),1.31(9H,t,J=7.5Hz,$N(CH_2CH_3)_3$),1.20(6H,明显的t,J=6.0Hz,$OCH(CH_3)_2$)。

[0312] $^{13}$C NMR(125MHz,$CD_3OD$):$\delta_C$ 173.10(d,$^{3}J_{C-P}$=7.1Hz,C=O,酯),173.02(C=O,酯),156.73(C-6),154.16(C-2),150.92,150.86(2x d,$^{2}J_{C-P}$=5.2Hz,C-Ar),150.24(C-4),142.55(C-8),129.26,124.64,124.62(CH-Ar),120.34(d,$^{3}J_{C-P}$=4.5Hz,CH-Ar),117.16(C-5),95.00(d,$^{1}J_{C-F}$=191.5Hz,C-2'),82.90(d,$^{3}J_{C-F}$=6.5Hz C-4'),82.80,82.76(2x d,$^{2}J_{C-F}$=10.5Hz C-1'),73.60,73.59(2x d,$^{2}J_{C-F}$=24.5Hz C-3'),68.71($OCH(CH_3)_2$),65.08(d,$^{2}J_{C-P}$=4.2Hz,C-5'),50.39,50.34(2x d,$^{2}J_{C-P}$=1.8Hz,$NHCHCH_3$),46.23($N(CH_2CH_3)_3$),20.61,20.54($OCH(CH_3)_2$),19.60,19.47(2×d,$^{3}J_{C-P}$=6.0Hz,$NHCHCH_3$),7.86($N(CH_2CH_3)_3$)。

[0313] $C_{22}H_{28}ClFN_6O_{10}P_2$质量求定值m/z 652.10;实测值MS($ES^-$)m/z:651.13($[M-H]^-$)。

[0314] 反相HPLC,用0.1M TEAB/AcCN在30min内从90/10至0/100洗脱,F=1mL/min,λ=254nm,两个非对映异构体的一个峰具有$t_R$=12.32min。

[0315] 实施例16:2-氯-9-(2'-脱氧-2'-氟-β-D-阿拉伯呋喃糖基)腺嘌呤-5'-O-[1-苯基(甲氧基-L-丙氨酰基)]二磷酸三乙基铵盐。

[0316] 

(16)

[0317] 由2-氯-9-(2'-脱氧-2'-氟-β-D-阿拉伯呋喃糖基)腺嘌呤-5'-一磷酸TEA盐

(0.86g,1.48mmol)、苯基(甲氧基-L-丙氨酰基)氯磷酸酯(0.41g,1.48mmol)和TEA(0.59mL,4.25mmol),根据一般程序制备为白色固体(0.182g,17%)。

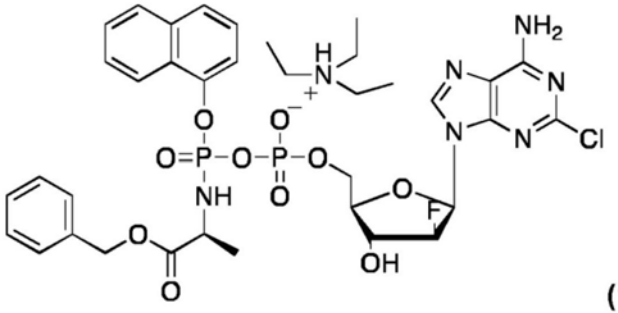
[0318] $^{31}$P NMR(202MHz,$CD_3OD$):$\delta_P$-7.73(d,J=20.7Hz),-7.84(d,J=20.8Hz),-12.04(d,J=21.0Hz),-12.11(d,J=20.8Hz)。

[0319] $^{1}$H NMR(500MHz,$CD_3OD$):$\delta_H$ 8.31(0.5H,d,$J_{H-F}$=2.5Hz,H-8),8.30(0.5H,d,$J_{H-F}$=2.0Hz,H-8),7.35-7.27(4H,m,H-Ar),7.18-7.14(1H,m,H-Ar),6.44(0.5H,dd,$J_{H-F}$=16.4Hz,J=3.9Hz,H-1'),6.42(0.5H,dd,$J_{H-F}$=16.4Hz,J=3.7Hz,H-1'),5.20-5.09(1H,m,H-2'),4.68-4.52(1H,m,H-3'),4.28-4.24(2H,m,H-5'),4.18-4.15(1H,m,H-4'),4.12-4.07(1H,m,$NHCHCH_3$),3.66(1.5H,s,$OCH_3$),3.65(1.5H,s,$OCH_3$),3.78(6H,q,J=7.0Hz,$N(CH_2CH_3)_3$),1.37(1.5H,dd,J=7.0Hz,J=0.5Hz,$NHCHCH_3$),1.32(1.5H,dd,J=7.0Hz,J=0.5Hz,$NHCHCH_3$),1.14(9H,t,J=7.5Hz,$N(CH_2CH_3)_3$)。

[0320] $C_{20}H_{24}ClFN_6O_{10}P_2$质量求定值m/z 724.07;实测值MS($ES^-$)m/z:723.01($[M-H]^-$)。

[0321] 反相HPLC,用0.1M TEAB/AcCN在30min内从90/10至0/100洗脱,F=1mL/min,λ=254nm,两个非对映异构体的一个峰具有$t_R$=12.24min。

[0322] 实施例17:2-氯-9-(2'-脱氧-2'-氟-β-D-阿拉伯呋喃糖基)腺嘌呤-5'-O-[1-1-萘基(苄氧基-L-丙氨酰基)]二磷酸三乙基铵盐。

[0323] 

(17)

[0324] 由2-氯-9-(2'-脱氧-2'-氟-β-D-阿拉伯呋喃糖基)腺嘌呤-5'-一磷酸TEA盐(0.86g,1.48mmol)、1-萘基(苄氧基-L-丙氨酰基)氯磷酸酯(0.59g,1.48mmol)和TEA(0.59mL,4.25mmol),根据一般程序制备为白色固体(0.226g,18%)。

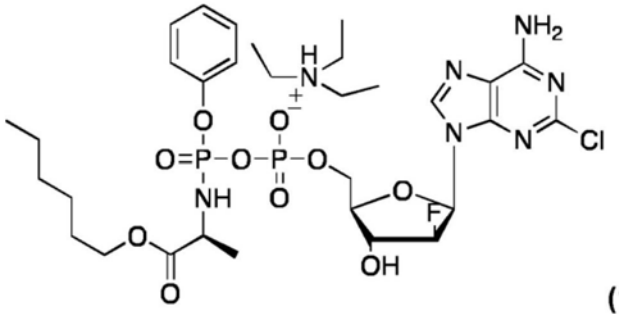
[0325] $^{31}$P NMR(202MHz,$CD_3OD$):$\delta_P$-7.26(d,J=20.2Hz),-7.61(d,J=20.2Hz),-12.07(d,J=20.40Hz),-12.27(d,J=20.40Hz)。

[0326] $^{1}$H NMR(500MHz,$CD_3OD$):$\delta_H$ 8.19-8.17(2H,m,H-Ar),8.13(0.5H,d,$J_{H-F}$=2.0Hz,H-8),8.12(0.5H,d,$J_{H-F}$=2.0Hz,H-8),7.72-7.68(2H,m,H-Ar),7.54-7.52(1H,明显的d,J=9.5Hz,H-Ar),7.44-7.40(4H,m,H-Ar),7.37-7.35(1H,m,H-Ar),6.28(0.5H,t,J=4.0Hz,H-1'),6.25(0.5H,t,J=4.0Hz,H-1'),5.06-5.02(0.5H,m,H-2'),4.95-4.93(0.5H,m,H-2'),4.89-4.80(2H,$OCH_2Ph$),4.43-4.43(0.5H,m,H-3'),4.41-4.40(0.5H,m,H-3'),4.15-4.12(2H,m,H-5'),4.09-4.06(1H,m,$NHCHCH_3$),4.03-4.01(1H,m,H-4'),3.33(6H,q,J=7.0Hz,$N(CH_2CH_3)_3$),1.23(1.5H,dd,J=7.0Hz,J=0.5Hz,$NHCHCH_3$),1.20(1.5H,dd,J=7.0Hz,J=0.5Hz,$NHCHCH_3$),1.31(9H,t,J=7.5Hz,$N(CH_2CH_3)_3$)。

[0327] $C_{30}H_{30}ClFN_6O_{10}P_2$质量求定值m/z 750.99;实测值MS($ES^-$)m/z:749.19($[M-H]^-$)。

[0328] 反相HPLC,用0.1M TEAB/AcCN在30min内从90/10至0/100洗脱,F=1mL/min,λ=254nm,$t_R$=14.69min、14.81min。

[0329] 实施例18:2-氯-9-(2'-脱氧-2'-氟-β-D-阿拉伯呋喃糖基)腺嘌呤-5'-O-[1-苯基(己氧基-L-丙氨酰基)]二磷酸三乙基铵盐。

[0330] 

(18)

[0331] 由2-氯-9-(2'-脱氧-2'-氟-β-D-阿拉伯呋喃糖基)腺嘌呤-5'-一磷酸TEA盐(0.86g,1.48mmol)、1-苯基(己氧基-L-丙氨酰基)氯磷酸酯(0.51g,1.48mmol)和TEA(0.59mL,4.25mmol),根据一般程序制备为白色固体(0.235g,20%)。

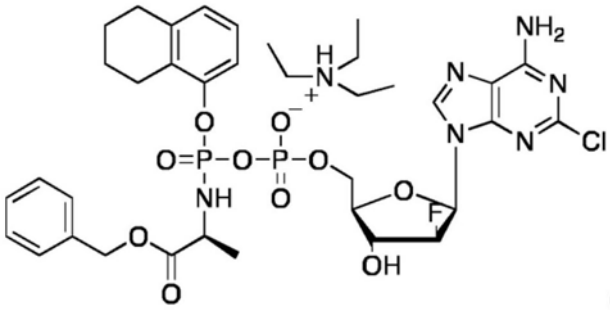
[0332] $^{31}$P NMR(202MHz,$CD_3OD$):$\delta_P$-7.55(d,J=23.00Hz),-7.77(d,J=19.40Hz),-12.09(d,J=19.40Hz),-12.19(d,J=20.10Hz)。

[0333] $^{1}$H NMR(500MHz,$CD_3OD$):$\delta_H$ 8.18(0.5H,d,$J_{H-F}$=2.0Hz,H-8),8.17(0.5H,d,$J_{H-F}$=2.0Hz,H-8),7.23-7.11(4H,m,H-Ar),7.08-7.03(1H,m,H-Ar),6.33(0.5H,dd,J=4.0,1.5Hz,H-1'),6.29(0.5H,dd,J=4.0Hz,J=1.5Hz,H-1'),5.08-5.06(0.5H,m,H-2'),4.98-4.96(0.5H,m,H-2'),4.47-4.45(0.5H,m,H-3'),4.44-4.42(0.5H,m,H-3'),4.15-4.11(2H,m,H-5'),4.06-4.03(1H,m,$NHCHCH_3$),3.97-3.90(5H,m,H-4',2x $CH_2$,$OCH_2(CH_2)_4CH_3$),3.84-3.78(1H,m,$OCH_2(CH_2)_4CH_3$),3.33(6H,q,J=7.0Hz,$N(CH_2CH_3)_3$,1.50-1.43(4H,m,2x $CH_2$,$OCH_2(CH_2)_4CH_3$),1.31-1.22(6H,m,$CH_2$,$OCH_2(CH_2)_4CH_3$,$NHCHCH_3$),1.31(9H,t,J=7.5Hz,$N(CH_2CH_3)_3$),0.81-0.76(3H,m,$OCH_2(CH_2)_4CH_3$)。

[0334] $C_{25}H_{34}ClFN_6O_{10}P_2$质量求定值m/z 694.97;实测值MS($ES^-$)m/z:693.14($[M-H]^-$)。

[0335] 反相HPLC,用0.1M TEAB/AcCN在30min内从90/10至0/100洗脱,F=1mL/min,λ=254nm,$t_R$=15.13min和15.21min。

[0336] 实施例19:2-氯-9-(2'-脱氧-2'-氟-β-D-阿拉伯呋喃糖基)腺嘌呤-5'-O-[1-5,6,7,8-四氢-1-萘基(苄氧基-L-丙氨酰基)]二磷酸三乙基铵盐。

[0337] 

(19)

[0338] 由2-氯-9-(2'-脱氧-2'-氟-β-D-阿拉伯呋喃糖基)腺嘌呤-5'-一磷酸TEA盐(0.86g,1.48mmol)、5,6,7,8-四氢-1-萘基(苄氧基-L-丙氨酰基)氯磷酸酯(0.603g,1.48mmol)和TEA(0.59mL,4.25mmol),根据一般程序制备为白色固体(0.19g,15%)。

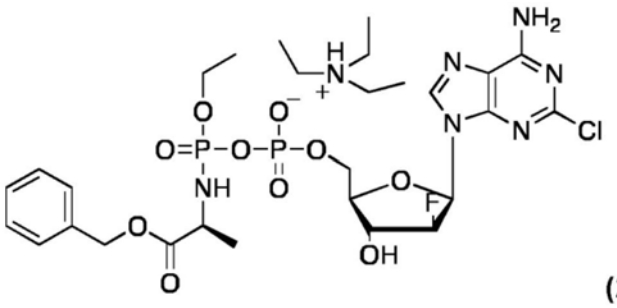
[0339] $^{31}$P NMR(202MHz,$CD_3OD$):$\delta_P$-7.06(d,J=24.0Hz),-7.55(d,J=21.2Hz),-11.24(d,J=21.2Hz),-11.38(d,J=24.0Hz)。

[0340] $^{1}$H NMR(500MHz,$CD_3OD$):$\delta_H$ 8.27(0.5H,d,$J_{H-F}$=2.0Hz,H-8),8.25(0.5H,d,$J_{H-F}$=2.0Hz,H-8),7.33-7.30(3H,m,H-Ar),7.22-7.18(2H,m,H-Ar),7.00-6.93(2H,m,H-Ar),6.84(1H,明显的t,J=6.5Hz,H-Ar),6.72(1H,明显的d,J=7.5Hz,H-Ar),6.43(0.5H,dd,J=4.0Hz,J=2.0Hz,H-1'),6.39(0.5H,dd,J=4.0Hz,J=2.0Hz,H-1'),5.19-5.16(0.5H,m,H-2'),5.09-5.06(0.5H,m,H-2'),5.06-5.03(2H,m,$OCH_2Ph$),4.56-4.49(1H,m,H-3'),4.27-4.10(3H,m,H-5',H-4'),4.02-3.97(1H,m,$NHCHCH_3$),3.33(6H,q,J=7.0Hz,$N(CH_2CH_3)_3$),2.73(4H,bt,2x $CH_2$),1.75-1.72(4,m,2x $CH_2$),1.42(1.5H,d,J=7.5Hz,$NHCHCH_3$),1.38(1.5H,dd,J=7.0Hz,$NHCHCH_3$),1.31(9H,t,J=7.5Hz,$N(CH_2CH_3)_3$)。

[0341] $C_{30}H_{34}ClFN_6O_{10}P_2$质量求定值m/z 754.15;实测值MS($ES^-$)m/z:753.23($[M-H]^-$)。

[0342] 反相HPLC,用0.1M TEAB/AcCN在30min内从90/10至0/100洗脱,F=1mL/min,λ=254nm,$t_R$=15.32min和15.44min。

[0343] 实施例20:2-氯-9-(2'-脱氧-2'-氟-β-D-阿拉伯呋喃糖基)腺嘌呤-5'-O-[1-乙基(苄氧基-L-丙氨酰基)]二磷酸三乙基铵盐。

[0344] 

(20)

[0345] 由2-氯-9-(2'-脱氧-2'-氟-β-D-阿拉伯呋喃糖基)腺嘌呤-5'-一磷酸TEA盐(0.86g,1.48mmol)、乙基(苄氧基-L-丙氨酰基)氯磷酸酯(0.45g,1.48mmol)和TEA(0.59mL,4.25mmol),根据一般程序制备为白色固体(0.218g,20%)。

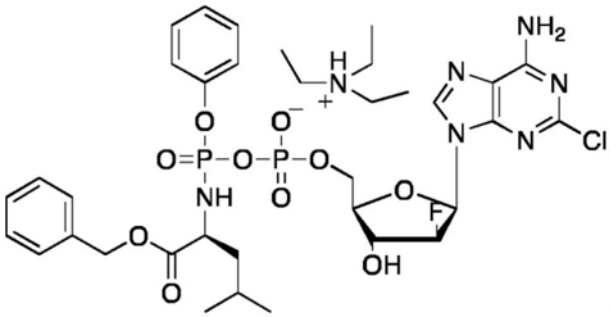
[0346] $^{31}$P NMR(202MHz,$CD_3OD$):$\delta_P$-2.73(d,J=20.2Hz),-3.04(d,J=20.4Hz),-11.96(d,J=20.2Hz),-12.07(d,J=20.04Hz)。

[0347] $^{1}$H NMR(500MHz,$CD_3OD$):$\delta_H$ 8.32(0.5H,d,$J_{H-F}$=2.0Hz,H-8),8.31(0.5H,d,$J_{H-F}$=2.0Hz,H-8),7.37-7.27(5H,m,H-Ar),6.46(0.5H,dd,J=4.0Hz,J=2.0Hz,H-1'),6.43(0.5H,dd,J=4.0Hz,J=2.0Hz,H-1'),5.24-5.22(0.5H,m,H-2'),5.20-5.14(2H,m,$OCH_2Ph$),5.13-5.11(0.5H,m,H-2'),4.62-4.60(0.5H,m,H-3'),4.59-4.57(0.5H,m,H-3'),4.29-4.26(2H,m,H-5'),4.19-4.17(2H,m,$NHCHCH_3$),4.12-4.04(3H,m,H-4',$OCH_2CH_3$),2.86(6H,q,J=7.0Hz,$N(CH_2CH_3)_3$),1.43(1.5H,dd,J=7.0Hz,J=0.5Hz,$NHCHCH_3$),1.42(1.5H,dd,J=7.0Hz,J=0.5Hz,$NHCHCH_3$),1.27-1.23(3H,m,$OCH_2CH_3$),1.19(9H,t,J=7.5Hz,$N(CH_2CH_3)_3$)。

[0348] $C_{22}H_{28}ClFN_6O_{10}P_2$质量求定值m/z 652.89;实测值MS($ES^-$)m/z:651.15($[M-H]^-$)。

[0349] 反相HPLC,用0.1M TEAB/AcCN在30min内从90/10至0/100洗脱,F=1mL/min,λ=254nm,两个非对映异构体的一个峰具有$t_R$=14.12min。

[0350] 实施例21:2-氯-9-(2'-脱氧-2'-氟-β-D-阿拉伯呋喃糖基)腺嘌呤-5'-O-[1-苯基(苄氧基-L-亮氨酰基)]二磷酸三乙基铵盐。

[0351] 

(21)

[0352] 由2-氯-9-(2'-脱氧-2'-氟-β-D-阿拉伯呋喃糖基)腺嘌呤-5'-一磷酸TEA盐(0.86g,1.48mmol)、苯基(苄氧基-L-亮氨酰基)氯磷酸酯(0.58g,1.48mmol)和TEA(0.59mL,4.25mmol),根据一般程序制备为白色固体(0.30g,24%)。

[0353] $^{31}$P NMR(202MHz,$CD_3OD$):$\delta_P$-7.28(d,J=21.4Hz),-7.57(d,J=21.6Hz),-12.18(d,J=21.6Hz)。

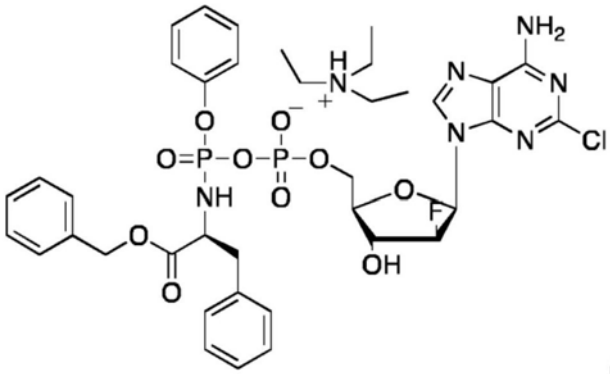
[0354] $^{1}$H NMR(500MHz,$CD_3OD$):$\delta_H$ 8.18(1H,s,H-8),7.19-7.10(8H,m,H-Ar),7.06-6.99(2H,m,H-Ar),6.32(0.5H,t,J=3.5Hz,H-1'),6.29(0.5H,t,J=3.5Hz,H-1'),5.10-5.08(0.5H,m,H-2'),4.97-4.88(2.5H,m,H-2',$OCH_2Ph$),4.46(0.5H,明显的t,J=3.5Hz,H-3'),4.43(0.5H,明显的t,J=3.5Hz,H-3'),4.17-4.13(2H,m,H-5'),4.06-4.04(1H,m,H-4'),3.94-3.88(1H,m,$NHCHCH_2CH(CH_3)_2$),3.33(6H,q,J=7.0Hz,$N(CH_2CH_3)_3$),1.13(9H,t,J=7.5Hz,$N(CH_2CH_3)_3$),1.43-1.37(3H,m,$NHCHCH_2CH(CH_3)_2$),0.75-0.72(3H,m,$NHCHCH_2CH(CH_3)_2$),0.65-0.64(3H,明显的dd,J=14.0Hz,J=6.0Hz,$NHCHCH_2CH(CH_3)_2$)。

[0355] $^{13}$C NMR(125MHz,$CD_3OD$):$\delta_C$ 173.43,173.22(2×d,$^3J_{C-P}$=3.5Hz,C=O,酯),156.78,156.72(C-6),154.16(C-2),150.92(d,$^2J_{C-P}$=7.0Hz,C-Ar),150.24(C-4),135.84,84,135.81(C-8),129.26,128.74,128.26,128.13,127.95,127.90,127.88,127.83,124.68,124.57,122.30(CH-Ar),120.44(d,$^3J_{C-P}$=4.6Hz,CH-Ar),120.27(d,$^3J_{C-P}$=5.2Hz,CH-Ar),119.98,119.94(CH-Ar),117.17(C-5),95.00(d,$^1J_{C-F}$=191.6Hz,C-2'),82.90(d,$^3J_{C-F}$=4.1Hz C-4'),82.74(d,$^2J_{C-F}$=11.0Hz C-1'),73.63,73.58(2x d,$^2J_{C-F}$=24.5Hz,C-3'),66.43,66.05($OCH_2Ph$),65.10(d,$^2J_{C-P}$=5.5Hz,C-5'),53.70(NHCH),53.31(d,$^2J_{C-P}$=5.5Hz,NHCH),46.21($N(CH_2CH_3)_3$),43.20,43.00(2x d,$^3J_{C-P}$=7.0Hz,$NHCHCH_2$),24.13,24.08($NHCHCH_2CH(CH_3)_2$),21.66,21.45,21.07,20.99($NHCHCH_2CH(CH_3)_2$),7.83($N(CH_2CH_3)_3$)。

[0356] $C_{29}H_{34}ClFN_6O_{10}P_2$质量求定值m/z 742.15;实测值MS($ES^-$)m/z:741.18($[M-H]^-$)。

[0357] 反相HPLC,用0.1M TEAB/AcCN在30min内从90/10至0/100洗脱,F=1mL/min,λ=254nm,两个非对映异构体的一个峰具有$t_R$=14.91min。

[0358] 实施例22:2-氯-9-(2'-脱氧-2'-氟-β-D-阿拉伯呋喃糖基)腺嘌呤-5'-O-[1-苯基(苄氧基-L-苯丙氨酰基)]二磷酸三乙基铵盐。

[0359] 

(22)

[0360] 由2-氯-9-(2'-脱氧-2'-氟-β-D-阿拉伯呋喃糖基)腺嘌呤-5'-一磷酸TEA盐(0.86g,1.48mmol)、苯基(苄氧基-L-苯丙氨酰基)氯磷酸酯(0.63g,1.48mmol)和TEA(0.59mL,4.25mmol),根据一般程序制备为白色固体(0.185g,14%)。

[0361] $^{31}$P NMR(202MHz,$CD_3OD$):$\delta_P$-7.88(d,J=20.6Hz),-7.98(d,J=20.0Hz),-12.00(d,J=21.21Hz)。

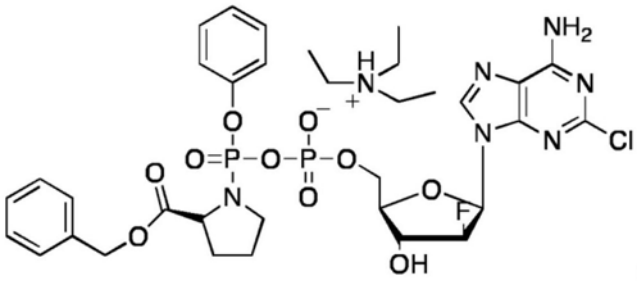
[0362] $^{1}$H NMR(500MHz,$CD_3OD$):$\delta_H$ 8.17(0.5H,d,$^{5}J_{H-F}$=2.5Hz,H-8),8.14(0.5H,d,$^{5}J_{H-F}$=2.5Hz,H-8),7.18-7.08(10,m,H-Ar),6.97-6.87(5H,m,H-Ar),6.30(0.5H,dd,J=4.0Hz,J=1.5Hz,H-1'),6.27(0.5H,dd,J=4.0Hz,J=1.5Hz,H-1'),5.08-5.05(0.5H,m,H-2'),4.97-4.95(0.5H,m,H-2'),4.86-4.77(4H,m $OCH_2Ph$,$NHCHCH_2Ph$),4.46-4.44(0.5H,m,H-3'),4.43-4.41(0.5H,m,H-3'),4.25-4.17(1H,m,$NHCHCH_2Ph$),4.16-4.12(2H,m,H-5'),4.10-4.05(1H,m,H-4'),3.33(6H,q,J=7.0Hz,$N(CH_2CH_3)_3$),1.31(9H,t,J=7.5Hz,$N(CH_2CH_3)_3$)。

[0363] $^{13}$C NMR(125MHz,$CD_3OD$):$\delta_C$ 173.46(d,$^{3}J_{C-P}$=4.6Hz,C=0,酯),172.05(d,$^{3}J_{C-P}$=4.5Hz,C=0,酯),156.68(C-6),154.13(C-2),153.36(d,$^{2}J_{C-P}$=7.1Hz,C-Ar),150.85,150.83(C-4),150.23(C-Ar),136.73,136.11(d,$^{2}J_{C-P}$=4.7Hz,C-Ar),135.69(C-8),135.52,135.50(C-Ar),129.20(d,$^{3}J_{C-P}$=3.1Hz,CH-Ar),128.74,128.09,128.05(d,$^{3}J_{C-P}$=2.8Hz,CH-Ar),127.90,127.84,127.78,126.44,126.25,124.59,122.40,120.38,120.34,120.30,120.26,120.15,120.11(CH-Ar),117.15(C-5),95.01(d,$^{1}J_{C-F}$=191.0Hz,C-2'),95.00(d,$^{1}J_{C-F}$=191.0Hz,C-2'),82.84(d,$^{3}J_{C-F}$=3.8Hz C-4'),82.68(d,$^{2}J_{C-F}$=32.5Hz C-1'),73.58(d,$^{2}J_{C-F}$=24.5Hz C-3'),66.45,66.44($OCH_2Ph$),66.11($OCH_2Ph$),65.04(d,$^{2}J_{C-P}$=4.8Hz,C-5'),56.44($NHCHCH_2Ph$),56.19($NHCHCH_2Ph$),46.21($N(CH_2CH_3)_3$),40.79,40.74($CH_2Ph$),9.85($N(CH_2CH_3)_3$)。

[0364] $C_{32}H_{32}ClFN_6O_{10}P_2$质量求定值m/z 776.13;实测值MS($ES^-$)m/z:775.17($[M-H]^-$)。

[0365] 反相HPLC,用0.1M TEAB/AcCN在30min内从90/10至0/100洗脱,F=1mL/min,λ=254nm,两个非对映异构体的一个峰具有$t_R$=24.28min。

[0366] 实施例23:2-氯-9-(2'-脱氧-2'-氟-β-D-阿拉伯呋喃糖基)腺嘌呤-5'-O-[1-苯基(苄氧基-L-脯氨酰基)]二磷酸三乙基铵盐。

[0367] 

(23)

[0368] 由2-氯-9-(2'-脱氧-2'-氟-β-D-阿拉伯呋喃糖基)腺嘌呤-5'-一磷酸TEA盐(0.86g,1.48mmol)、苯基(苄氧基-L-脯氨酰基)氯磷酸酯(0.55g,1.48mmol)和TEA(0.59mL,4.25mmol),根据一般程序制备为白色固体(0.17g,14%)。

[0369] $^{31}$P NMR(202MHz,$CD_3OD$):$\delta_P$-9.05(d,J=17.6Hz),-9.72(d,J=21.6Hz),-11.75(d,J=17.6Hz),-12.12(d,J=21.6Hz)。

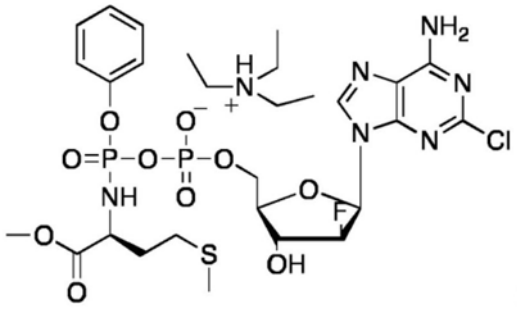
[0370] $^{1}$H NMR(500MHz,$CD_3OD$):$\delta_H$ 8.17(0.5H,d,$J_{H-F}$=2.5Hz,H-8),8.16(0.5H,d,$J_{H-F}$=2.5Hz,H-8),7.21-7.15(8H,m,H-Ar),7.11-7.09(1H,m,H-Ar),7.04-7.00(1H,m,H-Ar),6.32(0.5H,d,J=4.0Hz,H-1'),6.31(0.5H,d,J=4.0Hz,H-1'),5.08-5.06(0.5H,m,H-2'),5.01-4.99(0.5H,m,H-2'),4.98-4.91(2H,m,$OCH_2Ph$),4.48-4.45(1H,m,NCH),4.43-4.41(0.5H,m,H-3'),4.34-4.30(0.5H,m,H-3'),4.16-4.09(2H,m,H-5'),4.05-4.00(1H,m,H-4'),3.46-3.38(2H,m,$NCH_2$),2.21-2.05(1H,m,$NCH_2CH_2$中的一个H),1.85-1.76(3H,m,1x H,$NCH_2CH_2$,2x H,$NCH_2CH_2CH_2$),3.33(6H,q,J=7.0Hz,$N(CH_2CH_3)_3$,1.31(9H,t,J=7.5Hz,$N(CH_2CH_3)_3$)。

[0371] $^{13}$C NMR(125MHz,$CD_3OD$):$\delta_C$ 173.60,173.31(C=O,酯),156.69(C-6),154.14(C-2),150.78(d,$^2J_{C-P}$=3.8Hz,C-Ar),150.22(C-4),136.37(C-8),136.03,135.96(C-Ar),129.29,129.23,128.13,127.80,127.76,127.67,124.57(CH-Ar),120.15(d,$^3J_{C-P}$=5.2Hz,CH-Ar),119.96(d,$^3J_{C-P}$=5.2Hz,CH-Ar),117.14(C-5),95.02(d,$^1J_{C-F}$=191.7Hz,C-2'),94.99(d,$^1J_{C-F}$=191.7Hz,C-2'),82.85(d,$^3J_{C-F}$=5.6Hz C-4'),82.71(d,$^2J_{C-F}$=32.5Hz,C-1'),73.59(d,$^2J_{C-F}$=24.5Hz,C-3'),73.55(d,$^2J_{C-F}$=24.5Hz,C-3'),66.32,66.25($OCH_2Ph$),65.02(d,$^2J_{C-P}$=4.0Hz,C-5'),64.90(d,$^2J_{C-P}$=4.0Hz,C-5'),60.72($^2J_{C-P}$=7.75Hz,NCH),60.35($^2J_{C-P}$=7.75Hz,NCH),46.31($N(CH_2CH_3)_3$),30.99($^2J_{C-P}$=11.0Hz,$NCH_2$),30.89($^2J_{C-P}$=11.0Hz,$NCH_2$),24.84($^3J_{C-P}$=9.0Hz,$NCH_2CH_2$),24.40($^3J_{C-P}$=9.0Hz,$NCHCH_2$),7.85($N(CH_2CH_3)_3$)。

[0372] $C_{28}H_{30}ClFN_6O_{10}P_2$质量求定值m/z 726.97;实测值MS($ES^-$)m/z:725.67($[M-H]^-$)。

[0373] 反相HPLC,用0.1M TEAB/AcCN在30min内从90/10至0/100洗脱,F=1mL/min,λ=254nm,两个非对映异构体的一个峰具有$t_R$=15.39min。

[0374] 实施例24:2-氯-9-(2'-脱氧-2'-氟-β-D-阿拉伯呋喃糖基)腺嘌呤-5'-O-[1-苯基(甲氧基-L-蛋氨酰基)]二磷酸三乙基铵盐。

[0375] 

(24)

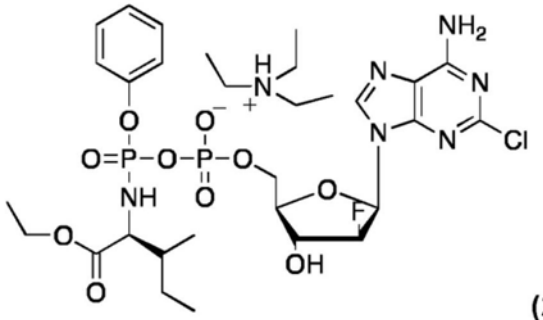
[0376] 由2-氯-9-(2'-脱氧-2'-氟-β-D-阿拉伯呋喃糖基)腺嘌呤-5'-一磷酸TEA盐(0.86g,1.48mmol)、苯基(甲氧基-L-蛋氨酰基)氯磷酸酯(0.49g,1.48mmol)和TEA(0.59mL,4.25mmol),根据一般程序制备为白色固体(0.25g,22%)。

[0377] $^{31}$P NMR(202MHz,$CD_3OD$):$\delta_P$-7.41(d,J=21.33Hz),-7.69(d,J=21.6Hz),-12.29(d,J=20.6Hz)。

[0378] $^{1}$H NMR(500MHz,$CD_3OD$):$\delta_H$ 8.19(0.5H,d,$J_{H-F}$=2.1Hz,H-8),8.18(0.5H,d,$J_{H-F}$=2.0Hz,H-8),7.21-7.16(4H,m,H-Ar),7.09-7.02(1H,m,H-Ar),6.32(0.5H,dd,$J_{H-F}$=16.6Hz,J=4.3Hz,H-1'),6.31(0.5H,dd,$J_{H-F}$=16.6Hz,J=4.2Hz,H-1'),5.02(0.5H,dd $J_{H-F}$=51.9Hz,$J_{H-F}$=2.2Hz,H-2')5.00(0.5H,dd,$J_{H-F}$=51.9Hz,$J_{H-H}$=2.2Hz,H-2'),4.48-4.43(1H,m,H-3'),4.17-4.13(2H,m,H-5'),4.08-4.00(m,2H,NHCHCH$_3$,H-4'),3.56,3.43(3H,2s,OCH$_3$),2.80(6H,q,J=7.0Hz,N($CH_2CH_3$)$_3$,2.42-2.39(1H,m,$CH_3SCH_2CH_{2a}$),2.28-2.24(1H,m,$CH_3SCH_2CH_{2b}$),1.90,1.86(3H,2x s,$SCH_3$),1.90-1.71(2H,m,$CH_3SCH_2CH_{2a}$)。$C_{22}H_{28}ClFN_6O_{10}P_2S$质量求定值684.96;实测值MS(ES-)m/z:683([M-H]$^-$)。

[0379] 反相HPLC,用0.1M TEAB/AcCN在30min内从90/10至0/100洗脱,F=1mL/min,λ=254nm,两个非对映异构体的一个峰具有$t_R$=12.28min。

[0380] 实施例25:2-氯-9-(2'-脱氧-2'-氟-β-D-阿拉伯呋喃糖基)腺嘌呤-5'-O-[1-苯基(乙氧基-L-异亮氨酰基)]二磷酸三乙基铵盐。

[0381] 

(25)

[0382] 由2-氯-9-(2'-脱氧-2'-氟-β-D-阿拉伯呋喃糖基)腺嘌呤-5'-一磷酸TEA盐(0.86g,1.48mmol)、苯基(乙氧基-L-异亮氨酰基)氯磷酸酯(0.49g,1.48mmol)和TEA(0.59mL,4.25mmol),根据一般程序制备为白色固体(0.26g,23%)。

[0383] $^{31}$P NMR(202MHz,$CD_3OD$):$\delta_P$-6.84(d,J=21.5Hz),-6.99(d,J=22.3Hz),-12.00(d,J=21.6Hz)。

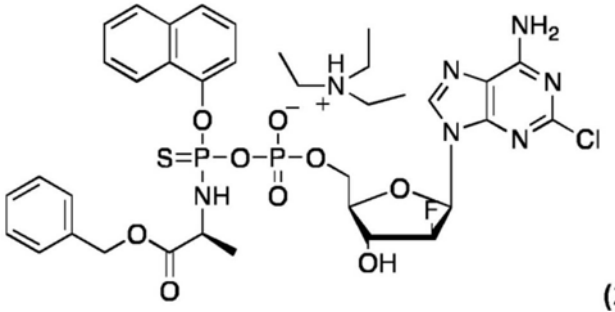
[0384] $^{1}$H NMR(500MHz,$CD_3OD$):$\delta_H$ 8.30,(0.5H,d,$J_{H-F}$=2.4Hz,H-8),8.29(0.5H,d,$J_{H-F}$=2.3Hz,H-8),7.35-7.23(4H,m,H-Ar),7.19-7.13(1H,m,H-Ar),6.44(0.5H,dd,$J_{H-F}$=16.7Hz,J=3.9Hz,H-1'),6.43(0.5H,dd,$J_{H-F}$=16.7Hz,$J_{H-H}$=4.2Hz,H-1'),5.21-5.08(1H,

m,H-2'),4.59-4.54(1H,m,H-3'),4.28-4.25(2H,m,$OCH_2CH_3$),4.18-4.07(3H,m,H-5'$_a$,H-4',$NHCHCH_3$),3.83(0.5H,dd,J=9.8Hz,J=5.7Hz,H-5'$_b$,),3.82(0.5H,dd,J=9.8Hz,J=5.7Hz,$H_b$-5'),3.33(6H,q,J=7.0Hz,$N(CH_2CH_3)_3$,1.77-1.68(1H,m,$CHCH_3$),1.55-1.42(1H,m,$CHCH_{2a}$),1.15-1.09(1H,m,$CHCH_{2b}$),1.27-1.20(12H,m,$N(CH_2CH_3)_3$,$OCH_2CH_3$),0.91-0.82(6H,$CHCH_3$,$CH_2CH_3$)。

[0385] $C_{24}H_{32}ClFN_6O_{10}P_2$质量求定值680.14;实测值MS(ES-)m/z:680.18($[M-H]^-$)。

[0386] 反相HPLC,用0.1M TEAB/AcCN在30min内从90/10至0/100洗脱,F=1mL/min,λ=254nm,两个非对映异构体的一个峰具有$t_R$=13.57min。

[0387] 实施例26:2-氯-9-(2'-脱氧-2'-氟-β-D-阿拉伯呋喃糖基)腺嘌呤-5'-O-[1-萘基(苄氧基-L-丙氨酰基)]硫代磷酸-磷酸三乙基铵盐。

[0388] 

(26)

[0389] 由2-氯-9-(2'-脱氧-2'-氟-β-D-阿拉伯呋喃糖基)腺嘌呤-5'-一磷酸TEA盐(0.86g,1.48mmol)、1-萘基(苄氧基-L-丙氨酰基)氯硫代磷酸酯(1-naphthyl(benzoxy-L-alaninyl)phosphorothiolchloridate)(0.62g,1.48mmol)和TEA(0.59mL,4.25mmol),根据一般程序制备为白色固体(0.054g,4%)。

[0390] $^{31}P$ NMR(202MHz,$CD_3OD$):$\delta_P$ 55.05(d,J=28.5Hz),53.71(d,J=28.5Hz),-12.24(宽的d,J=28.7Hz)。

[0391] $^1H$ NMR(500MHz,$CD_3OD$):$\delta_H$ 8.37-8.34(1H,m,H-Ar),8.28(0.5H,d,$J_{H-F}$=2.0Hz,H-8),8.26(0.5H,d,$J_{H-F}$=2.0Hz,H-8),7.85-7.82(1H,m,H-Ar),7.66-7.64(2H,m,H-Ar),7.50-7.43(2H,m,H-Ar),7.38-7.19(5H,m,H-Ar),6.42(0.5H,t,J=4.0Hz,H-1'),6.39(0.5H,t,J=4.0Hz,H-1'),5.19-5.16(1H,m,H-2'),5.11-5.02(2H,m,$OCH_2Ph$),4.60-4.57(0.5H,m,H-3'),4.56-4.54(0.5H,m,H-3'),4.44-4.28(3H,m,H-5',$NHCHCH_3$),4.20-4.17(1H,m,H-4'),3.33(6H,q,J=7.0Hz,$N(CH_2CH_3)_3$),1.47-1.41(3H,m,$NHCHCH_3$),1.31(9H,t,J=7.5Hz,$N(CH_2CH_3)_3$)。

[0392] $C_{30}H_{30}ClFN_6O_9P_2S$质量求定值m/z 767.06;实测值MS($ES^-$)m/z 766.12($[M-H]^-$)。

[0393] 反相HPLC,用0.1M TEAB/AcCN在30min内从90/10至0/100洗脱,F=1mL/min,λ=254nm,两个非对映异构体的一个峰具有$t_R$=16.39min。

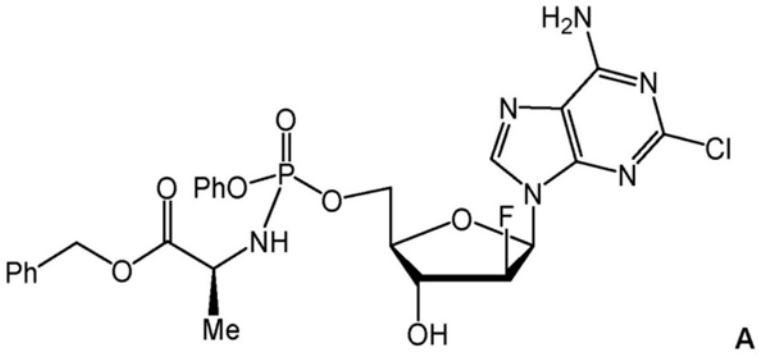
[0394] 实施例27-体外细胞毒性分析

[0395] 本发明的化合物的子集使用以下测定来测定其在一系列不同的实体瘤和血液恶性肿瘤中的细胞毒性活性。

[0396] 实体瘤和血液恶性肿瘤测定。

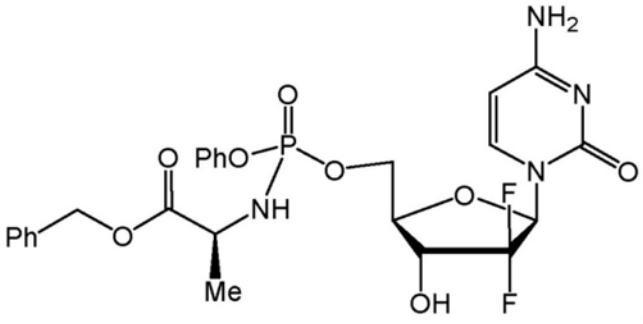
[0397] 使用CellTiterGlo(CTG,Promega-G7573)测定进行体外活力测定,以评估化合物在72h内对所选择的细胞系的细胞活力的效果。测试一式两份地进行,其中在96孔板中在～

72h内在9个点、3.16倍滴定度处理化合物。化合物起始浓度是198μM。在96孔板中使用CellTiterGlo进行细胞活力测定。化合物处理72h，标准生长条件，一式两份。在解冻100％的情况下将化合物溶解至40mM。将化合物在解冻的DMSO中以3.16倍连续稀释，并且在溶解在介质(2μL+200μL)之前加温至37℃。在将化合物溶解在介质中之后，将包含化合物的介质在培养箱中加温至37℃，并且然后将介质中的化合物一式两份地添加至细胞板(50μL+50μL)。化合物的最终浓度是从198μM至19.8nM。再次检查并记录所有化合物溶解度，然后将板立即转移至$CO_2$组织培养箱并且孵育持续3天。DMSO最终浓度是0.5％。在每种情况下，亲本核苷作为比较物被测试，正如示例性ProTide那样。所测试的ProTide类别的药物如下：



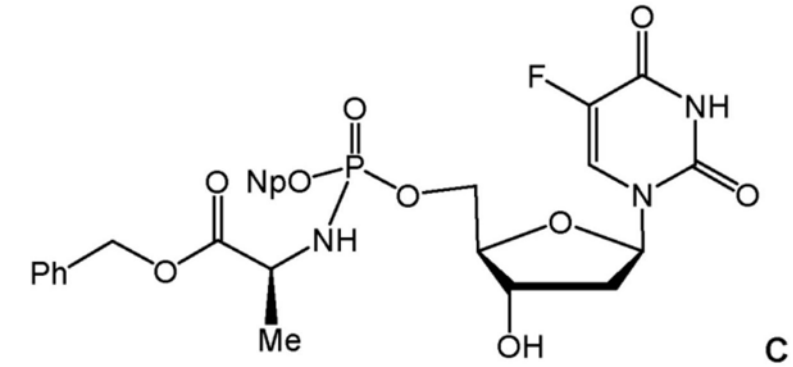

A

[0398]

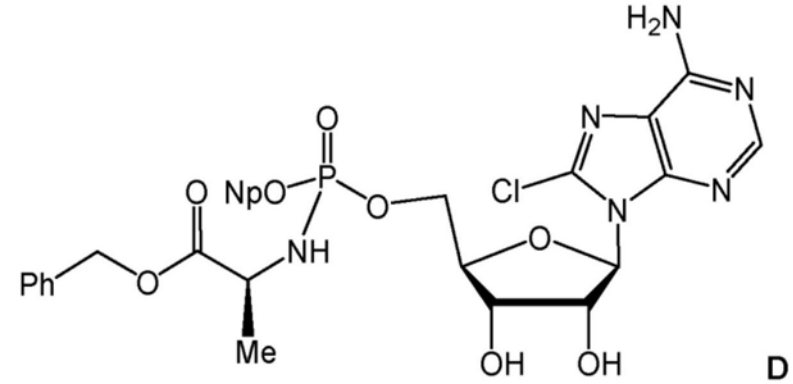



B

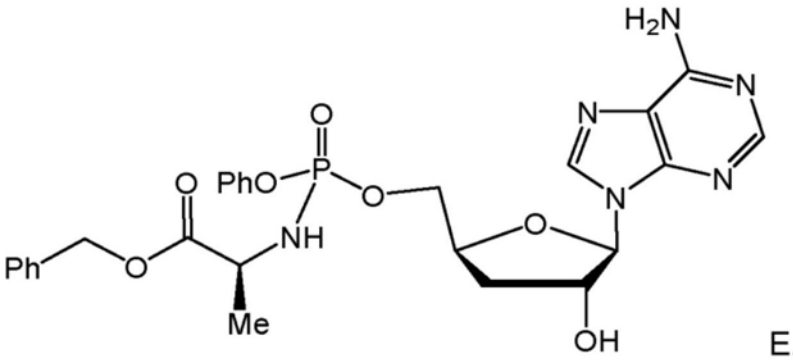
[0399]




C




D




E。

[0400] 测试以下细胞系,并且在下表1中提到:表1

[0401]

| 细胞系 | 恶性肿瘤 | 细胞系 | 恶性肿瘤 |
|---|---|---|---|
| MOLT-4 | 急性 T 成淋巴细胞白血病 | MCF-7 | 乳腺癌 |
| CCRF-CEM | 急性成淋巴细胞白血病 | HL-60 | 早幼粒细胞白血病 |
| RL | 非霍奇金淋巴瘤 | MV4-11 | 双表型 B 粒单核细胞白血病 |
| RPMI-8226 | 人类多发性骨髓瘤 | HepG2 | 肝细胞癌 |
| K562 | 慢性骨髓性白血病 | HT29 | 结肠癌 |
| OVCAR-3 | 卵巢癌 | Mia-Pa-Ca-2 | 胰腺癌 |

[0402]

| | | | |
|---|---|---|---|
| KG-1 | 急性骨髓性白血病 | | |

[0403] 此筛选的结果在表2、表3和表4中呈现。

[0404] 在表3中，A代表不超过0.2μm的$EC_{50}$；B代表大于0.2μm但不超过2μm的$EC_{50}$；C代表大于2μm但不超过5μm的$EC_{50}$；D代表大于5μm但不超过10μm的$EC_{50}$；并且E代表大于10μm的$EC_{50}$。无条目意味着针对指示的细胞系没有进行指示的化合物的筛选。

[0405] 在表4中，A代表不超过0.2μm的$EC_{50}$；B代表大于0.2μm但不超过1μm的$EC_{50}$；C代表大于1μm但不超过5μm的$EC_{50}$；D代表大于5μm但不超过10μm的$EC_{50}$；并且E代表大于10μm的$EC_{50}$。粗体字母代表比示例性ProTide A的$EC_{50}$小的$EC_{50}$。

[0406] 在表2、表3和表4中，'Ab $EC_{50}$'指的是绝对$EC_{50}$，并且'最高抑制率(Top inhibit)'指的是在所测试的最高浓度实现的抑制百分比。

[0407] 表2

[0408]

| | Mia-Pa-Ca-2 | | HT29 | | HepG2 | | OVCAR 3 | | MCF-7 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 化合物 | Ab $EC_{50}$ (μM) | 最高抑制率 (%) | Ab $EC_{50}$ (μM) | 最高抑制率 (%) | Ab $EC_{50}$ (μM) | 最高抑制率 (%) | Ab $EC_{50}$ (μM) | 最高抑制率 (%) | Ab $EC_{50}$ (μM) | 最高抑制率 (%) |
| 吉西他滨 | 0.03 | 79 | 0.22 | 65 | 28.0 | 54 | >198 | 44 | 0.011 | 53 |
| **8** | 0.07 | 79 | 0.48 | 62 | 83.13 | 52 | >198 | 48.5 | 0.07 | 52 |
| **B** | 0.53 | 82 | 8.55 | 62 | 21.33 | 57 | >198 | 33.5 | 2.71 | 54 |
| **FUDR** | 0.35 | 90 | 0.22 | 82 | 84.02 | 61 | 2.32 | 66 | 7.23 | 73 |
| **4** | 0.11 | 67 | 0.25 | 77 | >198 | 48 | 2.81 | 67.5 | 15.80 | 66 |
| **C** | 1.01 | 89 | 1.91 | 81 | 70.60 | 65 | - | - | 27.25 | 89 |
| **8-Cl-**腺苷 | 0.42 | 85 | 1.96 | 73 | - | - | - | - | 1.83 | 85.7 |
| **5** | 0.43 | 87.6 | 1.41 | 76.5 | - | - | - | - | 1.69 | 88 |
| **D** | 1.97 | 99.7 | 3.82 | 94 | - | - | - | - | 4.30 | 99.6 |
| 虫草素 | 84.73 | 88 | 32.74 | 87 | - | - | - | - | - | - |
| **7** | 3.32 | 98.90 | 7.79 | 79 | - | - | - | - | - | - |
| **6** | 40.89 | 95.7 | 24.34 | 82 | - | - | - | - | - | - |
| **E** | 7.92 | 98 | 10.75 | 97 | - | - | - | - | - | - |

[0409] 表2(续)

[0410]

| | CCRF-CEM | | MOLT-4 | | K562 | | HL-60 | | RL | | RPMI-8226 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 化合物 | Ab $EC_{50}$ (μM) | 最高抑制率 (%) | Ab $EC_{50}$ (μM) | 最高抑制率 (%) | Ab $EC_{50}$ (μM) | 最高抑制率 (%) | Ab $EC_{50}$ (μM) | 最高抑制率 (%) | Ab $EC_{50}$ (μM) | 最高抑制率 (%) | Ab $EC_{50}$ (μM) | 最高抑制率 (%) |
| 吉西他滨 | 0.02 | 101 | 0.004 | 88 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 8 | 0.04 | 99.9 | 0.009 | 84 | >198 | 29 | 0.08 | 98 | 0.20 | 66.5 | - | - |
| B | - | - | 0.24 | 76.4 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| FUDR | 0.04 | 91.9 | - | - | - | - | - | - | - | - | 0.11 | 99 |
| 4 | 0.03 | 97.1 | - | - | - | - | - | - | - | - | 0.05 | 95 |
| C | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 8-Cl-腺苷 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 5 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| D | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 虫草素 | - | - | 100.65 | 76.5 | 117.51 | 94 | 117.58 | 56 | >198 | 16.6 | >198 | 17 |
| 7 | - | - | 25.30 | 90 | 9.16 | 94 | 6.97 | 100 | 11.10 | 93 | 1.60 | 98 |
| 6 | - | - | 14.19 | 95 | 52.28 | 81 | 62.50 | 80 | 88.81 | 72 | - | - |
| E | - | - | 5.23 | 96 | 10.95 | 87 | 31.13 | 97 | 18.29 | 90.5 | 19.89 | 97.8 |

[0411] 表3

[0412]

| | HT29 | | HepG2 | | OVCAR 3 | | MCF-7 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 化合物 | Ab $EC_{50}$ (μM) | 最高抑制率 (%) | Ab $EC_{50}$ (μM) | 最高抑制率 (%) | Ab $EC_{50}$ (μM) | 最高抑制率 (%) | Ab $EC_{50}$ (μM) | 最高抑制率 (%) |
| 氯法拉滨 | B | 64 | C | 64 | E | 48 | B | 55 |
| 1 | B | 66 | - | - | E | - | B | 59 |
| 2 | B | 62 | - | - | E | 48 | B | 54 |
| 3 | B | 61 | C | 53 | E | 49 | C | 59 |
| A | C | 94 | - | - | - | - | D | 99.6 |

[0413] 表3(续)

[0414]

| | CCRF-CEM | | MOLT-4 | | K562 | | HL-60 | | RL | | RPMI-8226 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 化合物 | Ab $EC_{50}$ (μM) | 最高抑制率 (%) | Ab $EC_{50}$ (μM) | 最高抑制率 (%) | Ab $EC_{50}$ (μM) | 最高抑制率 (%) | Ab $EC_{50}$ (μM) | 最高抑制率 (%) | Ab $EC_{50}$ (μM) | 最高抑制率 (%) | Ab $EC_{50}$ (μM) | 最高抑制率 (%) |
| **氯法拉滨** | A | 98.7 | A | 84.1 | E | 23 | A | 97 | B | 77 | D | 89 |
| **1** | A | 98.7 | A | 82.7 | E | 24 | A | 97 | B | 70 | D | 91 |
| **2** | A | 98.7 | A | 98 | E | 29 | A | 98 | B | 65 | D | 92 |
| **3** | A | 99.6 | A | 96 | E | 24 | A | 97 | B | 63 | D | 91.6 |
| **A** | A | 99.4 | B | 93 | E | 32 | B | 97 | C | 99.8 | C | 97 |

[0415] 表4

[0416]

| | HT29 | | HepG2 | | MCF-7 | | MOLT-4 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 化合物 | Ab $EC_{50}$ (μM) | 最高抑制率 % | Ab $EC_{50}$ (μM) | 最高抑制率% | Ab $EC_{50}$ (μM) | 最高抑制率% | Ab $EC_{50}$ (μM) | 最高抑制率 % |
| **氯法拉滨** | B | 68 | C | 57 | B | 54 | A | 94 |
| **A** | C | 86 | D | 99 | D | 99 | B | 100 |
| **9** | **B** | 70 | **B** | 53 | - | 45 | **A** | 92 |
| **10** | **B** | 70 | **C** | 55 | E | 51 | **A** | 93 |
| **11** | **B** | 69 | **C** | 58 | E | 57 | **A** | 91 |
| **12** | **0.37** | 71 | **0.29** | 54 | - | 44 | **0.04** | 91 |
| **13** | **B** | 68 | - | 49 | - | 49 | **A** | 89 |
| **14** | **B** | 71 | **B** | 52 | - | 48 | **A** | 95 |
| **15** | **0.33** | 69 | **0.37** | 51 | - | 47 | **0.03** | 90 |
| **16** | **B** | 71 | **B** | 53 | - | 47 | **A** | 97 |
| **17** | **B** | 69 | **B** | 52 | - | 46 | **A** | 88 |
| **18** | **B** | 66 | **B** | 53 | - | 44 | **A** | 88 |
| **19** | **B** | 68 | **B** | 51 | - | 47 | **A** | 90 |
| **20** | **B** | 69 | **B** | 54 | - | 48 | **A** | 89 |
| **21** | **B** | 69 | **B** | 53 | - | 49 | **A** | 90 |
| **22** | **B** | 69 | - | 47 | - | 50 | **A** | 89 |
| **23** | **B** | 68 | **C** | 51 | - | 48 | **A** | 89 |
| **24** | **B** | 70 | **C** | 54 | - | 49 | **A** | 88 |
| **25** | **B** | 67 | - | 49 | - | 43 | **A** | 86 |
| **26** | **B** | 64 | - | 49 | - | 44 | **A** | 84 |

[0417] 表4(续)

[0418]

| | OVCAR 3 | | CCRF-CEM | | K 562 | | HL-60 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 化合物 | Ab $EC_{50}$ (μM) | 最高抑制率% | Ab $EC_{50}$ (μM) | 最高抑制率% | Ab $EC_{50}$ (μM) | 最高抑制率% | Ab $EC_{50}$ (μM) | 最高抑制率% |
| **氯法拉滨** | E | 42 | A | 99 | E | 32 | A | 97 |
| **A** | E | 94 | A | 99 | E | 85 | B | 97 |
| **9** | E | 43 | **A** | 99 | E | 40 | **A** | 96 |
| **10** | E | 42 | **A** | 99 | E | 37 | **A** | 96 |
| **11** | **E** | 70 | **A** | 99 | E | 50 | **A** | 96 |
| **12** | >198 | 41 | **<0.02** | 99 | >198 | 40 | **0.07** | 96 |
| **13** | **E** | 80 | **A** | 99 | E | 44 | **A** | 96 |
| **14** | E | 43 | **A** | 99 | E | 36 | **A** | 96 |
| **15** | >198 | 41 | **<0.02** | 99 | >198 | 36 | **0.06** | 96 |
| **16** | E | 44 | **A** | 99 | E | 33 | **A** | 96 |
| **17** | E | 47 | **A** | 99 | E | 37 | **A** | 96 |
| **18** | E | 47 | **A** | 99 | E | 40 | **A** | 96 |
| **19** | E | 51 | **A** | 99 | E | 37 | **A** | 95 |
| **20** | E | 49 | **A** | 99 | E | 35 | **A** | 96 |
| **21** | E | 47 | **A** | 99 | E | 32 | **A** | 96 |
| **22** | **E** | 73 | **A** | 99 | E | 62 | **A** | 95 |
| **23** | **E** | 63 | **A** | 99 | E | 35 | **A** | 96 |
| **24** | **E** | 67 | **A** | 99 | E | 49 | **A** | 95 |
| **25** | E | 24 | **A** | 99 | E | 33 | **A** | 95 |
| **26** | **E** | 62 | **A** | 99 | E | 69 | **A** | 95 |

[0419] 表4(续)

[0420]

| 化合物 | KG-1 | | RL | | RPMI-8226 | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Ab $EC_{50}$ (μM) | 最高抑制率 % | Ab $EC_{50}$ (μM) | 最高抑制率% | Ab $EC_{50}$ (μM) | 最高抑制率% |
| 氯法拉滨 | A | 93 | B | 61 | E | 80 |
| **A** | B | 93 | C | 90 | C | 94 |
| **9** | **A** | 92 | **B** | 53 | E | 81 |
| **10** | **A** | 92 | - | 48 | E | 80 |
| **11** | **A** | 92 | - | 47 | E | 81 |
| **12** | **0.14** | 91 | - | 47 | 39.55 | 79 |
| **13** | **A** | 93 | - | 48 | E | 88 |
| **14** | **A** | 93 | - | 49 | E | 78 |
| **15** | **0.09** | 92 | - | 49 | 30.28 | 80 |
| **16** | **A** | 93 | - | 49 | E | 84 |
| **17** | **A** | 92 | - | 48 | E | 82 |
| **18** | **A** | 91 | - | 48 | E | 84 |
| **19** | **A** | 92 | **B** | 57 | E | 79 |
| **20** | **A** | 92 | **B** | 69 | E | 80 |
| **21** | **A** | 92 | **C** | 70 | E | 81 |
| **22** | **A** | 92 | - | 42 | **C** | 86 |
| **23** | **A** | 93 | - | 39 | E | 85 |
| **24** | **A** | 91 | - | 39 | E | 86 |
| **25** | **A** | 91 | - | 44 | **C** | 83 |
| **26** | **A** | 91 | E | 56 | **C** | 93 |

[0421] 如从表3和表4中可以看出的，本发明的某些化合物针对一系列不同的癌细胞系比ProTideA是更活性的。

[0422] 实施例28-代谢稳定性

[0423] 根据公布的程序(Kuhnz,W.;Gieschen,H.Drug Metab.Dispos.1998,26,1120-1127)进行测定。

[0424] 将汇集的冷冻保存的肝细胞解冻，洗涤，并且重新悬浮在Krebs-Henseleit缓冲液(pH 7.3)中。反应通过将测试化合物(1μM最终浓度)添加至细胞悬浮液中来引发，并且在37℃/5%$CO_2$在平底96孔板上以100μL的最终体积分别孵育持续0min和120min。通过将100μL的乙腈添加至孵育混合物中来停止反应。然后将样品在板振荡仪上轻柔地且简单地混合，完全转移至0.8mL V形底96孔板，并且在室温以2500×g离心持续15min。将每种上清液(150μL)转移至干净的集群管(cluster tube)，随后是在Thermo电子三重四极杆系统上的HPLC-MS/MS分析。

[0425] 为了比较，亲本核苷和相应的ProTide在相同的测定中进行测试。

[0426] 结果在表5和表6中示出。

[0427] 表5

[0428]

| 化合物 | 人类肝细胞<br>平均半衰期(min.) |
|---|---|
| D<br>5<br>8-Cl-腺苷 | 53<br>18<br>>120 |
| B<br>8<br>吉西他滨 | 139<br>27<br>- |
| C<br>4<br>FUDR | 24<br>15<br>69 |
| E<br>7<br>虫草素 | 90<br>27<br>48 |

[0429] 表6

[0430]

| 化合物 | 人类肝细胞<br>平均半衰期(min.) |
|---|---|
| A<br>1<br>2<br>3<br>氯法拉滨 | 24<br>在 20 至 100 的范围内<br>在 20 至 100 的范围内<br>在 20 至 100 的范围内<br>>120 |

[0431] 实施例29-在急性髓样白血病(AML)的KG1a细胞系模型中对氯法拉滨和所选择的氯法拉滨二磷酸氨基磷酸酯的评估

[0432] 概述

[0433] 选择氯法拉滨和实施例1和实施例2用于分析,以确定:(1)当与亲本化合物相比时,本发明的化合物是否具有增加的效力,以及(2)本发明的化合物是否优先地靶向白血病干细胞(LSC)。为了确定这一点,采用了急性髓样白血病细胞系KG1a,因为其显现出具有不同的免疫表型($Lin^-/CD34^+/CD38^-/CD123^+$)的最小干细胞样隔室(compartment)。化合物在扩大的剂量范围内被评估。此外,在整个剂量范围内评估化合物对干细胞隔室的效果。氯法拉滨平均$LD_{50}$(灭杀细胞的50%所需的药物的浓度)是$1.69\times10^{-8}$M。实施例1示出类似的平均$LD_{50}$值($1.37\times10^{-8}$M),而实施例2示出显著增加的平均$LD_{50}$值(分别地$4.38\times10^{-8}$M和$7.10\times10^{-8}$M)。

[0434] 在常氧条件下,LSC($Lin^-/CD34^+/CD38^-/CD123^+$)隔室构成总细胞系的~3.5%。然而,在低氧条件(1%氧和5%氧)下,LSC的比例示出时间依赖性增加(多达23.7%)。此外,当细胞系被转移回到常氧条件时,这被逆转。在1%氧和5%氧之间的培养物中的LSC的级分不存在显著差异。当考虑化合物在常氧条件和低氧条件(5%氧)下的相对效力时,氯法拉滨在

低氧条件下示出平均$LD_{50}$的显著增加(1.69×$10^{-8}$M至5.31×$10^{-8}$M;P＝0.01)。相比之下,实施例1没有示出平均$LD_{50}$值的显著差异。

[0435] 目的

[0436] 1.为了产生一系列所选择的化合物及其各自的亲本核苷在KG1a细胞中的完整的细胞毒性剂量-响应曲线

[0437] 2.为了确定测试的化合物在所使用的整个浓度范围内对LSC隔室的效果

[0438] 3.为了比较测试的化合物在低氧条件(1％氧和5％氧)下的效果

[0439] 4.为了研究LSC和大块肿瘤细胞中的γH2A.X病灶在低氧条件下用氯法拉滨和所测试的化合物治疗后的持久性

[0440] 材料和方法

[0441] KG1a细胞培养条件

[0442] 将急性髓样白血病(AML)KG1a细胞系保持在补充有100单位/mL青霉素、100μg/mL链霉素和20％胎牛血清的RPMI培养基(Invitrogen,Paisley,UK)中。随后将细胞等分($10^5$个细胞/100μL)到96孔板中,并且在氯法拉滨或本发明的氯法拉滨二磷酸氨基磷酸酯(1×$10^{-10}$M-1×$10^{-6}$M)的存在下,在加湿的常氧气氛(20％氧)或低氧气氛(1％氧或5％氧)中在37℃孵育持续48h。此外,进行药物不被添加至的对照培养物。随后,细胞通过离心收获,并且使用Annexin V测定通过流式细胞术来分析。

[0443] 体外细胞凋亡的测量

[0444] 通过离心收获培养的细胞,并且然后重新悬浮在195μL的富含钙的缓冲液(calcium-rich buffer)中。随后,将5μL的Annexin V(Caltag Medsystems,Botolph Claydon,Uk)添加至细胞悬浮液,并且在洗涤之前,将细胞在黑暗中孵育持续10min。最终将细胞与10μL的碘化丙啶一起重新悬浮在190μL的富含钙的缓冲液中。细胞凋亡通过双色免疫荧光流式细胞术来评估,如先前描述的。随后,计算每个核苷类似物和二磷酸氨基磷酸酯的$LD_{50}$值(灭杀培养物中细胞的50％所需的剂量)。

[0445] 白血病干细胞隔室的免疫表型鉴定

[0446] 在每个核苷类似物及其各自的二磷酸氨基磷酸酯的宽的浓度范围的存在下,将KG1a细胞培养持续48h。然后,收获细胞并且用抗谱系抗体(PE-cy7)、抗CD34(FITC)、抗CD38(PE)和抗CD123(PERCP cy5)的混合物(cocktail)来标记。随后鉴定表达白血病干细胞(LSC)表型的亚群,并且将其表示为留在培养物中的所有存活细胞的百分比。然后,在剂量-响应图上标绘剩余的干细胞的百分比,并且将二磷酸氨基磷酸酯的效果与亲本核苷比较。

[0447] 细胞分选

[0448] KG1a细胞在低氧条件下生长持续7天,以便产生$10^7$个细胞并且增加表达LSC表型的细胞的百分比。随后,使用FACS Melody细胞分选仪(Becton Dickenson)通过高速细胞分选来纯化$Lin^-/CD34^+/CD38^-/CD123^+$LSC和$Lin^-/CD34^+/CD38^+/CD123^+$‘大块’肿瘤细胞,并且在添加氯法拉滨或氯法拉滨二磷酸氨基磷酸酯之前放回到低氧细胞培养条件中。

[0449] γH2A.X磷酸化测定

[0450] 组蛋白变体γH2A.X的磷酸化作为双链DNA断裂的迅速响应而发生。γH2A.X磷酸化测定试剂盒(流式细胞术)是被格式化用于磷酸化组蛋白γH2A.X(Merck,UK)的水平的流式细胞术检测的基于细胞的测定。在氯法拉滨或氯法拉滨二磷酸氨基磷酸酯的存在下,将

LSC细胞和‘大块肿瘤’细胞在96孔板中培养。在暴露于药物的2h之后，通过离心收获细胞，并且然后固定并透性化以准备用于染色和检测。在丝氨酸139处磷酸化的组蛋白γH2A.X通过缀合至APC的抗磷酸化-组蛋白γH2A.X的添加来检测。然后细胞在流式细胞仪上运行，以定量对于磷酸化组蛋白γH2A.X阳性的细胞染色的数目。

[0451] 统计学分析

[0452] 在这些实验中获得的数据使用单因素ANOVA来评估。使用omnibus K2检验，将所有数据证实为高斯或高斯近似值。$LD_{50}$值由非线性回归和S形剂量-响应曲线的最佳拟合分析的线来计算。所有的统计学分析使用Graphpad Prism 6.0软件(Graphpad Software Inc., San Diego,CA)进行。

[0453] 结果

[0454] 体外细胞毒性测定

[0455] 使用Annexin V/碘化丙啶测定评估KG1a细胞的体外药物敏感性。所测试的每个化合物的S形剂量-响应曲线在图1A-图1C中示出。结果总结在表7中。

[0456] 表7

[0457]

| 化合物 | 平均$LD_{50}$(nM) |
|---|---|
| 氯法拉滨 | 16.9 |
| 实施例1 | 13.7 |
| 实施例2 | 71.0 |

[0458] 氯法拉滨和本发明的化合物示出纳摩尔范围的效力;氯法拉滨和实施例1具有类似的$LD_{50}$值，其中实施例1是略微更有效的。

[0459] 表达LSC表型的KG1a细胞的级分通过低氧来调节

[0460] KG1a细胞在常氧条件和低氧条件下生长，并且LSC表型随着时间被监测。在常氧条件下，将LSC表型以细胞的约3.5％稳定地保持在培养物中。相比之下，在低氧条件下，细胞在表达LSC表型的培养物中的级分以时间依赖性方式增加(图3A)。当细胞然后被转移回到常氧培养条件中时，表达LSC表型的细胞的级分再次以时间依赖性方式返回至～3.5％(图3B)。

[0461] 氯法拉滨和本发明的化合物在常氧条件和低氧条件下的比较

[0462] 鉴于在低氧条件下观察到的LSC表型的增加，氯法拉滨和化合物的相对效力在常氧条件和低氧条件(5％$O_2$)下培养的KG1a细胞中被评估。图4示出氯法拉滨和本发明的化合物的重叠的S形剂量-响应曲线。结果总结在表8中：

[0463]

| **化合物** | **常氧平均 $LD_{50}$ (nM)** | **低氧平均 $LD_{50}$ (nM)** | **常氧/低氧比率** |
|---|---|---|---|
| 氯法拉滨 | 16.9 | 53.1 | 31.8 |
| 实施例 1 | 13.7 | 16.3 | 84.0 |
| 实施例 2 | 71.0 | 95.0 | 74.7 |

[0464] 如可以看出的，氯法拉滨当在低氧条件下培养的细胞上使用时示出显著的效力降低。当实施例1和实施例2在相同的低氧条件下使用时，没有观察到效力的这种降低。

[0465] 氯法拉滨在低氧条件下在LSC中比在大块肿瘤细胞中诱导显著较少的DNA损伤

[0466] 为了理解为什么经氯法拉滨治疗的细胞在低氧条件下对药物的效果较不敏感，细胞在低氧条件下生长，并且然后使用高速细胞分选纯化LSC和大块肿瘤级分。然后将纯化的细胞暴露于药物持续2小时，并且使用γH2A.X磷酸化测定来定量DNA损伤的量。图5示出在用氯法拉滨治疗后，LSC中DNA损伤的水平显著地低于大块肿瘤细胞。相比之下，实施例1和实施例2在LSC和大块肿瘤细胞两者中均诱导类似水平的DNA损伤。

[0467] 1.在干细胞靶向(stem cell targeting)方面，所测试的所有化合物在高于$10^{-8}$M的浓度示出干细胞靶向的证据。实施例1针对$Lin^-/CD34^+/CD38^-/CD123^+$LSC示出朝向增加的选择性的趋势。

[0468] 2.LSC表型被示出在低氧条件下是可诱导的，并且当细胞被再引入至常氧培养条件时，这被逆转。LSC级分的变化的动态表明表型的可塑性，而不是固定的LSC亚群的选择性扩张/收缩。

[0469] 3.氯法拉滨当在低氧条件下培养的细胞上使用时，示出显著的效力降低。当实施例1和实施例2在相同的低氧条件下使用时，没有观察到效力的这种降低。许多癌症在人体内以低氧状态存在。

[0470] 4.对于在低氧条件下降低的氯法拉滨效力的一种解释是，在这些条件下，存在LSC级分的显著扩张，并且在短期暴露于氯法拉滨后，LSC示出明显降低的DNA损伤，如通过γH2A.X的磷酸化测量的。相比之下，实施例1和实施例2在相同的条件下在大块肿瘤细胞和LSC中诱导类似水平的DNA损伤。

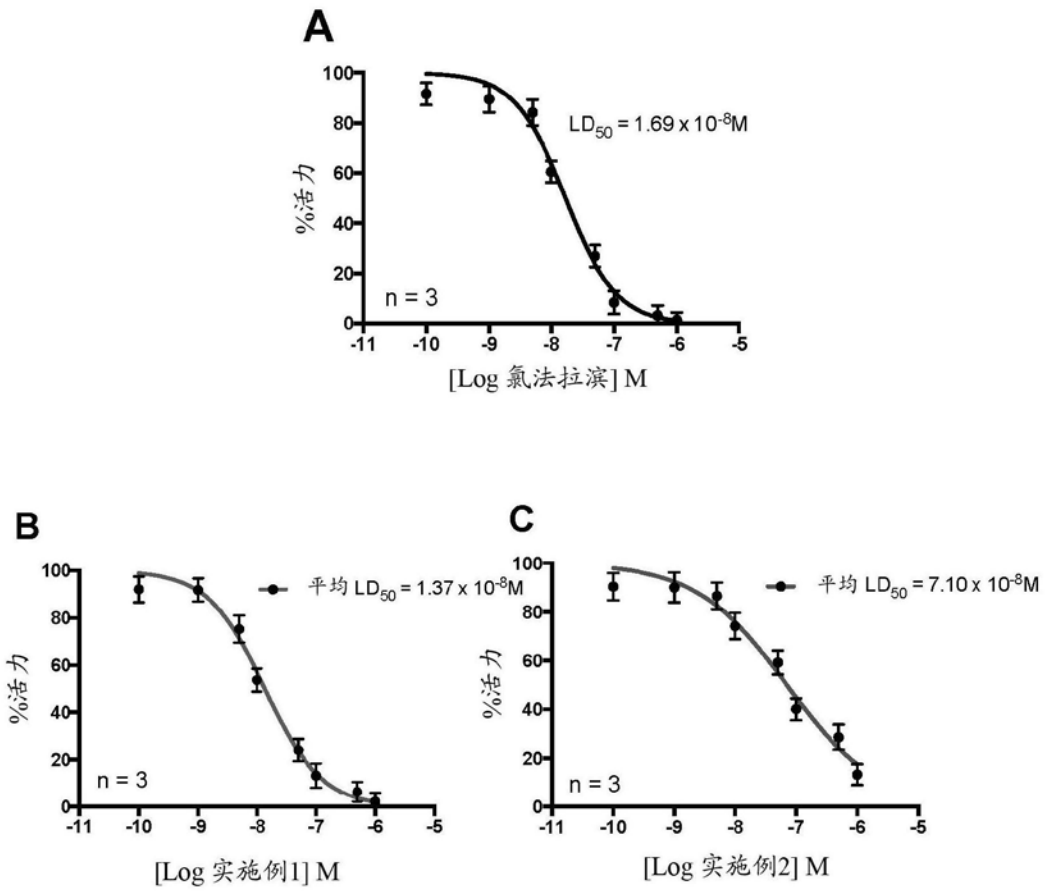

A
100
80
60
40
20
0
%活力
LD50 = 1.69 x 10-8M
n = 3
-11 -10 -9 -8 -7 -6 -5
[Log 氯法拉滨] M
B
100
80
60
40
20
0
%活力
平均 LD50 = 1.37 x 10-8M
n = 3
-11 -10 -9 -8 -7 -6 -5
[Log 实施例1] M
C
100
80
60
40
20
0
%活力
平均 LD50 = 7.10 x 10-8M
n = 3
-11 -10 -9 -8 -7 -6 -5
[Log 实施例2] M

图1

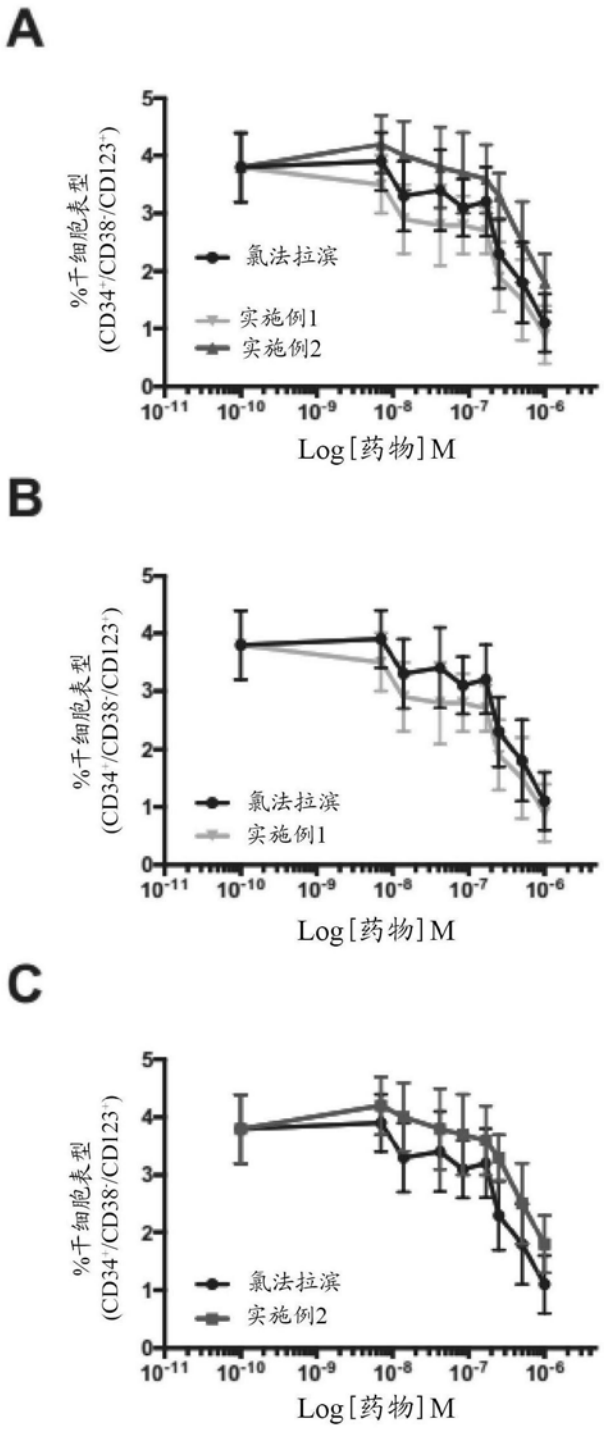

A
%千细胞表型
(CD34+/CD38-/CD123+)
氯法拉滨
实施例1
实施例2
Log[药物]M
B
%千细胞表型
(CD34+/CD38-/CD123+)
氯法拉滨
实施例1
Log[药物]M
C
%千细胞表型
(CD34+/CD38-/CD123+)
氯法拉滨
实施例2
Log[药物]M

图2

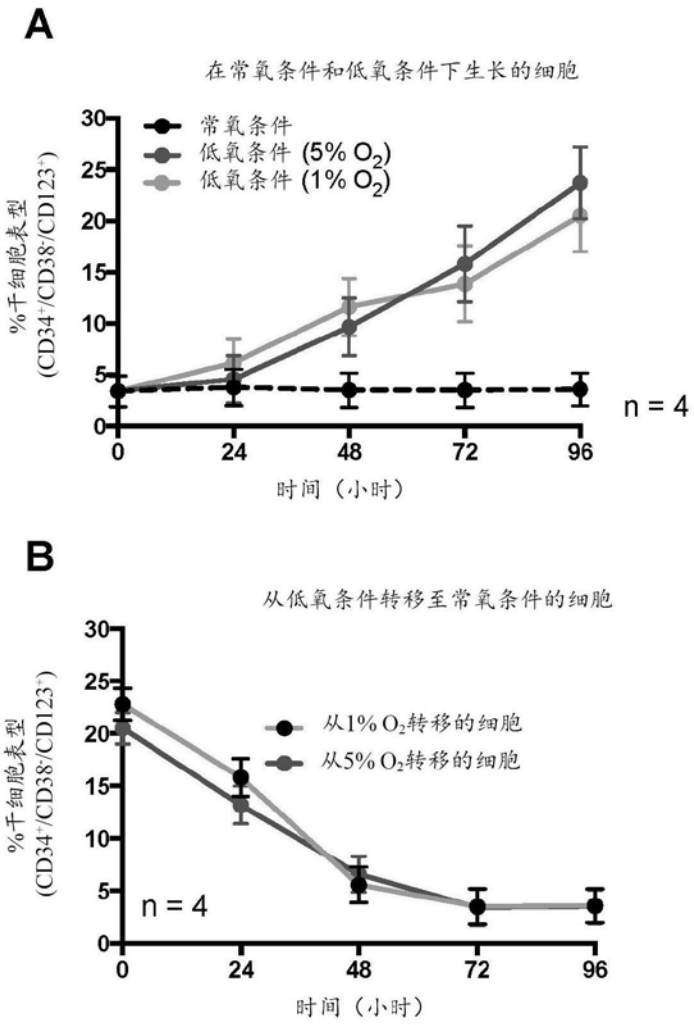

A
在常氧条件和低氧条件下生长的细胞
常氧条件
低氧条件 (5% O2)
低氧条件 (1% O2)
%干细胞表型
(CD34+/CD38-/CD123+)
n = 4
时间（小时）
B
从低氧条件转移至常氧条件的细胞
从1% O2转移的细胞
从5% O2转移的细胞
%干细胞表型
(CD34+/CD38-/CD123+)
n = 4
时间（小时）

图3

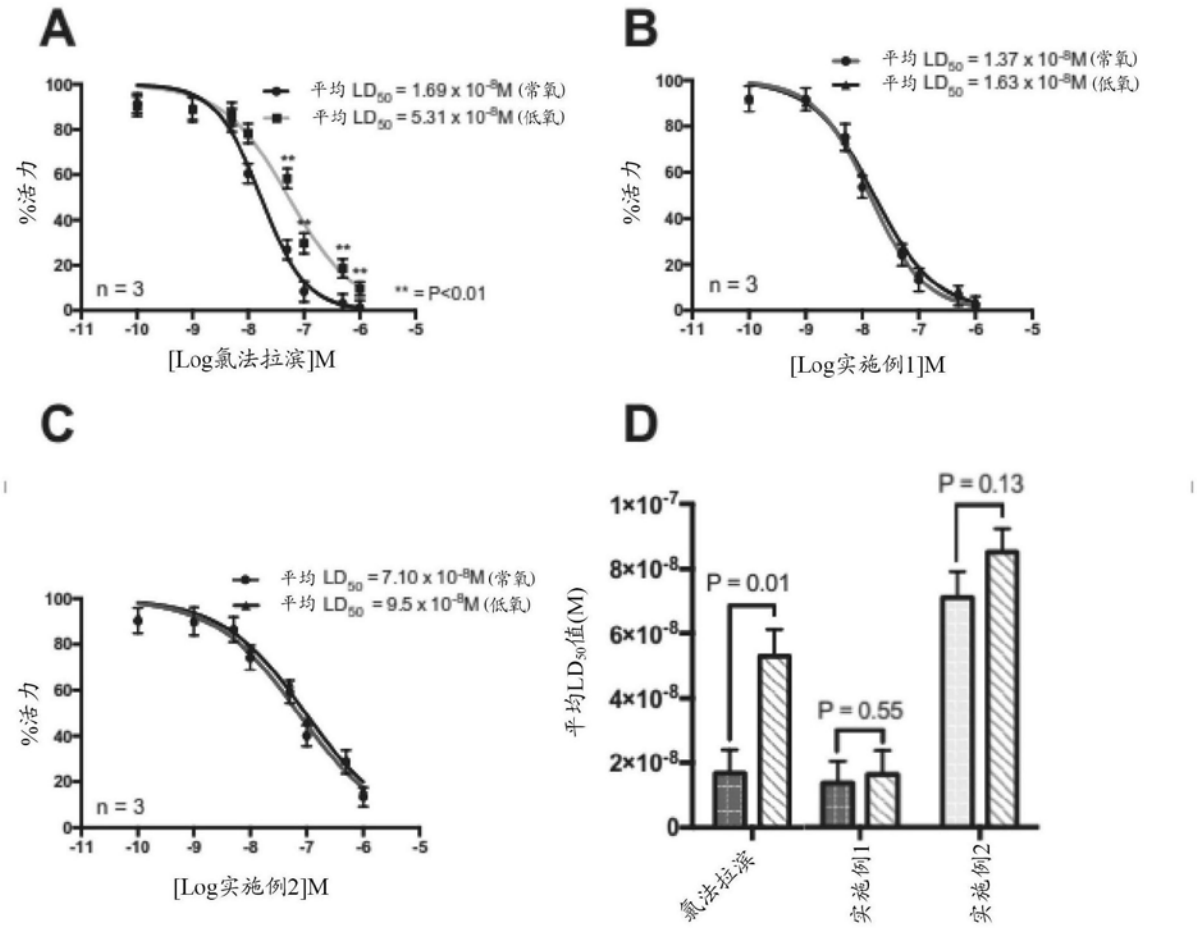

A
平均 LD50 = 1.69 x 10-8M (常氧)
平均 LD50 = 5.31 x 10-8M (低氧)
%活力
n = 3
** = P<0.01
[Log氯法拉滨]M
B
平均 LD50 = 1.37 x 10-8M (常氧)
平均 LD50 = 1.63 x 10-8M (低氧)
%活力
n = 3
[Log实施例1]M
C
平均 LD50 = 7.10 x 10-8M (常氧)
平均 LD50 = 9.5 x 10-8M (低氧)
%活力
n = 3
[Log实施例2]M
D
平均LD50值(M)
P = 0.01
P = 0.55
P = 0.13
氯法拉滨
实施例1
实施例2

图4

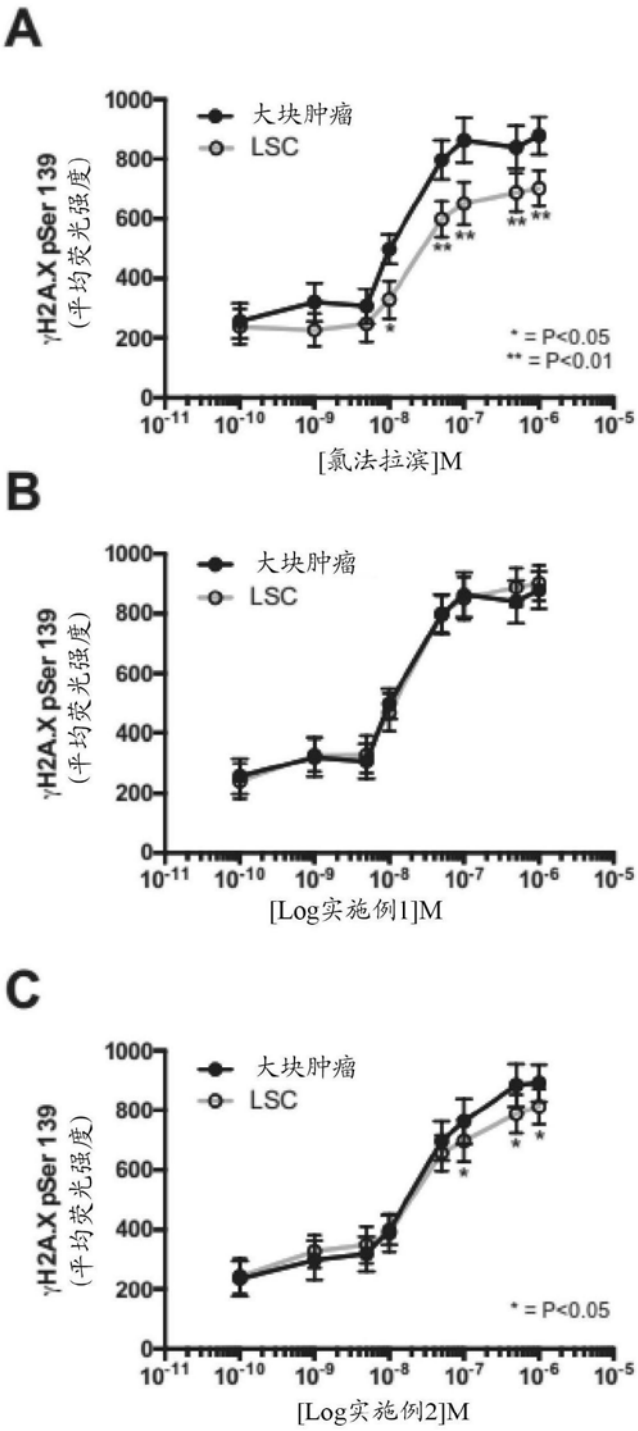

A
大块肿瘤
LSC
γH2A.X pSer 139
(平均荧光强度)
1000
800
600
400
200
0
* = P<0.05
** = P<0.01
10-11 10-10 10-9 10-8 10-7 10-6 10-5
[氯法拉滨]M
B
大块肿瘤
LSC
γH2A.X pSer 139
(平均荧光强度)
[Log实施例1]M
C
大块肿瘤
LSC
γH2A.X pSer 139
(平均荧光强度)
* = P<0.05
[Log实施例2]M

图5