

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁶
A61K 31/70

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 97196639.7

[43]公开日 1999 年 8 月 18 日

[11]公开号 CN 1226169A

[22]申请日 97.7.23 [21]申请号 97196639.7
[30]优先权
[32]96.7.23 [33]US [31]08/685,216
[86]国际申请 PCT/US97/12938 97.7.23
[87]国际公布 WO98/03182 英 98.1.29
[85]进入国家阶段日期 99.1.22
[71]申请人 印斯拜尔药品股份有限公司
地址 美国北卡罗来纳州
[72]发明人 K·M·雅各布斯
H·J·莱顿

[74]专利代理机构 上海专利商标事务所
代理人 陈文青

权利要求书 4 页 说明书 13 页 附图页数 4 页

[54]发明名称 尿苷三磷酸及相关化合物在防治固定患者肺炎中的应用

[57]摘要

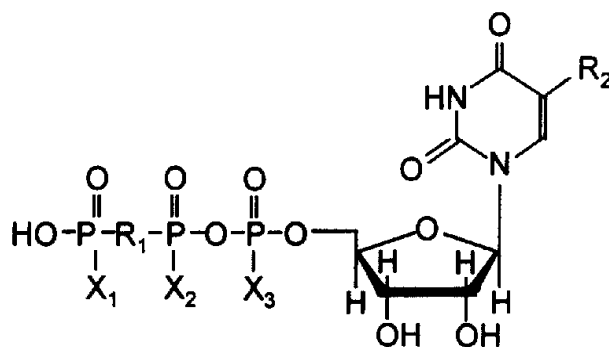
公开了一种促进卧床/固定患者或插管/机械换气患者的拥塞气道内粘液分泌物排出的方法。该方法包括对患者气道给予有效量的尿苷磷酸(如尿苷 5' - 三磷酸(UTP))、P1,P4 - 二(尿苷 - 5')四磷酸(UTP 的一个类似物)、或其任何类似物,使拥塞气道中流体排出(包括痰道),提高表面 腔上皮细胞上纤毛的纤毛运动频率,增加杯状细胞的粘液分泌,通过粘液分泌物水化,刺激气道中的纤毛运动频率,刺激表面活性剂的产生来加速滞留分泌物的清除。还公开了该化合物的药物制剂及其制备方法。其给药方法包括任何 液体悬浮液(包括滴鼻、滴眼或喷雾剂)、口服形式(液体或丸剂)、气雾剂 吸入、粉末形式、局部用、注射用、手术期间滴注用或栓剂形式。

ISSN 1008-4274

权 利 要 求 书

1. 一种防止或治疗需要这种治疗的卧床不起或固定患者体内的肺炎的方法，所述肺炎包括与换气器相关的肺炎，所述方法包括：

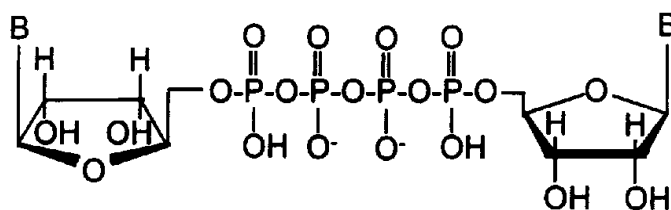
- 5 对患者给予在药物载体中的式 I、II、III 或 IV 的化合物或其药学上可接受的盐，所述化合物的量能有效地促进气道清除：



式 I

其中：

- 10 X_1 、 X_2 和 X_3 各自选自 OH 或 SH；
 R_1 选自 O、亚氨基、亚甲基或二卤代亚甲基；和
 R_2 选自 H 或 Br，

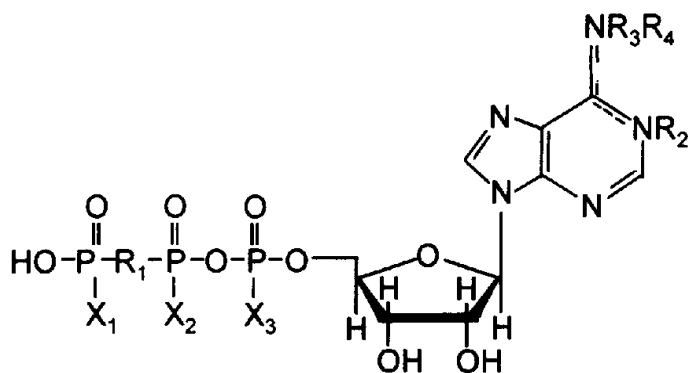


式 II

15

其中：

B 是尿嘧啶或腺嘌呤，如式 I 和 III 所示那样连接；



式 III

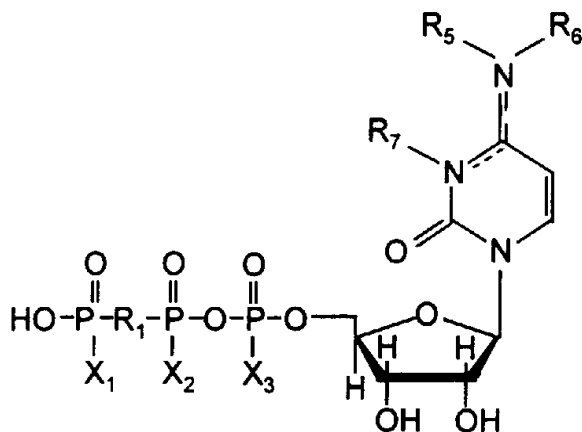
其中:

5 R_1 、 X_1 、 X_2 和 X_3 如式 I 所定;

R_3 和 R_4 是 H, 而 R_2 不存在, N-1 和 C-6 间有双键时, 是腺嘌呤, 或

R_3 和 R_4 是 H, 而 R_2 为氧, N-1 和 C-6 间有双键时, 是腺嘌呤 1-氧化物, 或

R_3 、 R_4 和 R_2 一起构成-CH=CH-, 形成一个从 N-6 到 N-1、N-6 和 C-6 间有双键的环, 是 1,N6-亚乙烯基腺苷;



式 IV

其中:

R_1 、 X_1 、 X_2 和 X_3 如式 I 所确定;

15 R_5 和 R_6 是 H, 而 R_7 不存在, N-3 和 C-4 间有双键时, 是胞苷, 或,

R_5 、 R_6 和 R_7 一起构成-CH=CH-, 形成从 N-3 到 N-4、N-4 和 C-4 间有双键的环, 是 3,N4-亚乙烯基胞苷。

2. 根据权利要求 1 所述的方法, 其中通过给予液体/液体悬浮液来输递所述化合物, 悬浮液包括用于所述患者眼部的所述化合物的滴眼, 或用于鼻咽气道、

鼻气管、气管内管、气管切口的所述化合物的滴鼻或喷雾剂，使有效量的所述化合物与所述患者的气道直接接触或经全身吸收和循环接触。

3. 根据权利要求 1 所述的方法，其中通过给予所述化合物口服形式来输递所述化合物，使治疗有效量的所述化合物经全身吸收和循环与所述患者的气道接
5 触。

4. 根据权利要求 1 所述的方法，其中通过对所述患者的鼻咽气道、鼻气管、气管内管或气管切口给予所述化合物的雾化气雾剂或悬浮液来输递所述化合物，使治疗有效量的所述化合物与所述患者的气道直接接触或经全身吸收和循环接触。

10 5. 根据权利要求 1 所述的方法，其中通过对所述患者的鼻、眼、外耳或鼻咽气道给予表面用形式的所述化合物来输递所述化合物，使治疗有效量的所述化合物与所述患者的气道接触。

6. 根据权利要求 1 所述的方法，其中通过给予注射用形式的所述化合物来输递所述化合物，使治疗有效量的所述化合物与所述患者的气道直接接触或经全身
15 吸收和循环接触。

7. 根据权利要求 1 所述的方法，其中通过给予栓剂形式的所述化合物来输递所述化合物，使治疗有效量的所述化合物经全身吸收和循环与所述患者的气道接触。

8. 根据权利要求 1 所述的方法，其中通过给予手术期间滴注凝胶、乳膏、粉
20 末、泡沫、晶体或液体悬浮液形式的活性化合物来输递所述化合物，使治疗有效量的所述化合物与气道直接接触或经全身吸收和循环接触。

9. 根据权利要求 1 所述的方法，其中通过给予干粉末气雾剂形式的所述化合物来输递所述化合物，使治疗有效量的所述化合物与所述患者的气道直接接触或经全身吸收和循环接触。

25 10. 根据权利要求 1 所述的方法，其中给予的所述化合物量应足以使所述患者气道表面上的化合物浓度能提高腔上皮细胞表面上纤毛的纤毛运动频率，增加杯状细胞的粘液分泌物，增加氯离子分泌以刺激表面活性剂的产生并加速滞留分泌物的清除。

11. 根据权利要求 1 所述的方法，其中给予的所述化合物的量应足以使所述
30 患者气道表面的浓度为 10^{-7} 到 10^{-1} 摩尔/升。

12. 根据权利要求 1 所述的方法，其中 X_2 和 X_3 是 OH。

13. 根据权利要求 1 所述的方法，其中 R_1 是氧。

14. 根据权利要求 1 所述的方法, 其中 R_2 是 H.

15. 根据权利要求 1 所述的方法, 其中所述式 I 化合物选自尿苷 5'-三磷酸、尿苷-5'-O-(3-硫代三磷酸)、5-溴-尿苷 5'-三磷酸及其药学上可接受的盐.

16. 根据权利要求 1 所述的方法, 其中所述式 II 化合物选自 P1,P4-二(尿苷-5')四磷酸 U_2P_4 和 P1,P4-二(腺苷-5')四磷酸 A_2P_4 及其取代的衍生物和药学上可接受的盐.

17. 根据权利要求 1 所述的方法, 其中所述式 III 化合物选自腺苷 5'-三磷酸、1,N6-亚乙烯基腺苷 5'-三磷酸、腺苷 1-氧化物 5'-三磷酸及其药学上可接受的盐.

18. 根据权利要求 1 所述的方法, 其中所述式 IV 化合物选自胞苷 5'-三磷酸 CTP、3,N4-亚乙烯基胞苷 5'-三磷酸及其药学上可接受的盐.

19. 一种防止或治疗鼻插管患者体内窦炎的方法, 所述方法包括:

对患者给予在药物载体中的式 I、II、III 或 IV 的化合物或其药学上可接受的盐, 所述化合物的量可有效地促进窦道的粘液纤毛清除.

20. 一种防止或治疗卧床静养或固定患者体内滞留的粘液分泌物的方法, 所述方法包括:

对患者给予在药物载体中的式 I、II、III 或 IV 的化合物或其药学上可接受的盐, 所述化合物的量可有效地促进气道的粘液纤毛清除.

21. 根据权利要求 20 所述的方法, 其中患者在侧向转动的治疗床中, 该床能使患者转动以进一步使粘液分泌物疏松.

说明书

尿苷三磷酸及相关化合物在防治固定患者肺炎中的应用

5 技术领域

本发明涉及一种除去或防治固定的或卧床不起的患者(包括那些呼吸依靠机械换气的患者)肺和支气管内滞留的粘液分泌物积累的方法。

发明背景

10 床上静养或固定会引起许多健康上的急性和慢性疾病。在护理不能移动或在床上静养的患者时,一个主要的方面是防治肺炎和其它呼吸道疾病。一旦肺炎在这些患者体内发作,那么发病率和死亡率会非常高。由于患者被固定,因此患者难以咳嗽并使分泌物流动。固定的患者包括限制在床上或轮椅上的那些患者。除了固定引起的并发症外,潜在的健康问题会使患者受感染的可能性增加,导致肺炎非常可能发作的因素或病征包括:清醒度(consciousness)变化(来自头部受伤、麻醉、药物过量或其它严重的疾病)、气管插管(经气管内、鼻管、或气管造口管)、机械换气和它的方法或治疗(包括主动脉内气囊泵、血-或超滤,慢性病征例如是癌症、渐进的神经肌肉疾病(多发性硬化、肌萎缩性脊髓侧索硬化等)、心脏疾病、糖尿病、急性神经性疾病(中风、癫痫发作、Guillain-Barre'综合征、脊髓受伤),以及伤口或外科的康复(卧床静养、牵引等)(p.502"Medical-Surgical Nursing: Assessment and Management of Clinical Problems", S. Lewis 和 I. collier, 2nd ed. 1987, McGraw-Hill, New York)。

机械换气用于多种肺病和并发症引起的不能呼吸或呼吸窘迫。据估计,在美国,每年有超过100000位患者需要机械换气(I. Kappstein等, Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 11(6), 504-8(1992))。潜在疾病的发病率和死亡率非常高,而再使用机械换气就更会增加危险。由机械换气导致的并发症包括:与换气器相关的肺炎(ventilator-associated pneumonia)(VAP)、气胸、肺栓、右主干支气管插管、意外除管、胃中物质的抽吸、败血症、流体过载/心力衰竭、低血压和死亡(B. de Boisblanc等, Chest 103, 1543-7(1993))。最常见的一种并发症是VAP,据保守地估计,每年有25%、超过12000人由于VAP而死亡(D. Craven等, Am. Rev. Respir. Dis. 133, 792-6(1986))。提高护士或其它护理人员的警惕性、进行侵入性监控、采用作用于血管的给药方法、经常性的全身检查,这些都会大大增加护理机械换气患者的费

用。据保守的估计，这些机械换气患者的总费用单单在美国每年就达约 15 亿美元(I. Kappstein,同上)。

由于几种正常的肺防御机能受到破坏或丧失，因此进行插管和机械换气的患者其肺炎及其它肺并发症的发作可能性比未插管患者高几倍(T. Inglis, J. Hosp. Infect. 30, 409-13(1995))。正常的防御机能包括：1)对空气进行过滤、温热和增湿；2)气管上方的会厌闭合；3)咳嗽反射；4)粘液纤毛升高系统(mucociliary escalator system)；5)免疫球蛋白 A 和 G；以及 6)肺泡巨噬细胞的活性。喉远端的气道通常是无菌的，但是在插管时，咳嗽反射受到破坏，会厌不能闭合，使得下气道受到污染。由于临床实践指南通常不提倡用气管内套来使气管内气道完全密封，因此会厌下会发生一些鼻咽分泌物的泄漏，从而增加了下气道受感染的可能性(P. Mahul 等, Intensive Care Med. 18, 20-5(1992))。

引起 VAP 的主要原因认为是移生胃分泌物抽吸通过不完全闭合的声门的缘故(P. Mahul 等, 同上)。下呼吸道的移生(colonization)(尤其是革兰阴性细菌)是 VAP 发作的早期阶段。另外，用抽吸导管通过气管内管来清除下气道分泌物以及其它换气系统的操作会大大增加住院感染(尤其是肺炎)的可能性。对于受插管的患者来说，远端气道的温热、增湿和过滤机能不起作用，而患者的潜在疾病(即营养不良、液体和/或电解质失衡以及感染)会使患者的预后更复杂。

在接受插管和机械换气的患者中，粘液纤毛传递速度显示出遭到破坏(F. Konrad 等, Intensive Care Med. 21, 482-89(1995); F. Konrad 等, Chest 105(1), 237-41(1994); F. Konrad 等, Chest 102(5), 1377-83(1992))。由于分泌物的移动和清除是一个重要的肺防御机能，因此，该功能被破坏，再加上导入人工气道、机械换气以及潜在病征，所有这些会严重地破坏肺宿主的防御机能。

能避免使用插管和机械换气或减少机械换气时间以减少并发症(如 VAP)发病率的试剂当然会在重病护理室起很大作用，该作用既与患者的健康有关，又与治疗费用有关。申请人已经发现，尿苷 5'-三磷酸(UTP)及相关的核苷酸化合物能调节人气道上皮细胞(粘液纤毛升高体的组成部分)的比活。将外来颗粒通过粘液纤毛升高系统运出肺依赖于下列共同作用：1)捕获外来颗粒的杯状细胞和粘膜下腺分泌出粘液；2)纤毛促使粘液排出肺部；和 3)维持气道表面液体的离子环境和粘度的上皮离子输送系统，以使纤毛有效运动(beat)。将胞外 UTP 施用于正常人鼻上皮细胞一级培养物顶表面会使 Cl⁻的分泌以依赖于浓度的方式增加(S. Mason 等, Br. J. Pharmacol. 103, 1649-56(1991); M. Knowles 等, N. Engl. J. Med. 325, 533-8(1991))。在培育的膀胱纤维变性(CF)患者的鼻上皮细胞中也发现有这种反应(R.

Benali 等, Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 10, 363-8(1994)). 这种 Cl⁻运输的增加与液体输送通过上皮的增加有关(C. Jiang 等, Science 262, 424-7(1993)). 除了对 Cl⁻和液体输送的这些作用外, UTP 还表现出使培育的正常成年人和 CF 患者人上皮细胞中纤毛运动频率增加(D. Drutz 等, Drug Dev Research 1996; 37(3):185 "Uridine 5' Triphosphate(UTP) Regulates Mucociliary Clearance Via Purinergic Receptor Activation", "Purines '96"会议, 1996 年 7 月 6 日至 9 日在意大利米兰召开)。由于磷脂酶 C 受 P₂Y₂ 受体的刺激, UTP 的这些作用与细胞内钙离子(Ca⁺⁺)的增加有关(H. Brown 等, Mol. Pharmacol. 40, 648-55(1991)). UTP 也表现出增加了人气道上皮外植体中杯状细胞(goblet cell)分泌粘蛋白的速度和总量(M. Lethem 等, am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 9, 315-22(1993)). 这些效果可从健康人以及 CF 患者的组织中观察到。

关于次级药效, 用 UTP(10-2M 和 10-1M 喷雾器)对麻醉的换气的狗进行气雾给药, 结果对吸气气道峰值压、肺动脉平均压、心率、心搏出量、胸主动脉压、心电图或动脉血液气体没有显著影响(S. Mason 等, Am. Rev. Respir. Dis. 147, a27(1993)). 为了测试静脉内给药的效果, 在 10 分钟内对麻醉的换气的狗静脉内灌输入各剂量的 UTP(0.1, 1, 3 和 5mmol/kg), 结果, 肺动脉平均压、心率、心搏出量或静脉平均压没有显著改变。

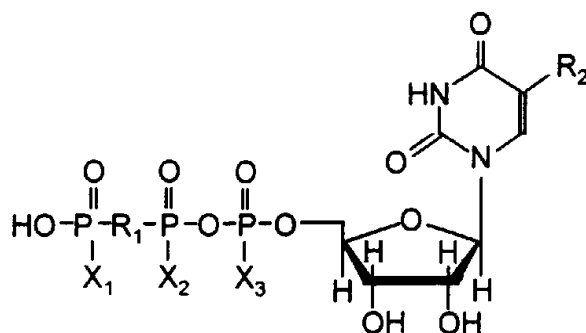
由于 UTP 表现出能使正常人的粘液纤毛清除(MCC)迅速提高 2.5 倍而没有明显的作用(D. Drutz, 同上), 因此认为机械换气的患者中 MCC 改善可防止分泌物堆积和粘液堵塞以及由此引起的感染和肺不张。通过使粘液分泌物水化和变稀, 可以使通过咳嗽或抽吸去除肺分泌物的效果加强。因此, UTP 提供了一种安全的辅助剂或β-肾上腺素能的激动剂的替换物, 来加强机械换气患者体内肺分泌物的排除。另外, MCC 的改善增强了患者的肺宿主防御机能, 从而预防了与换气器相关的肺炎(VAP)和其它肺并发症(如肺不张)。而且, 通过作用于 II 型肺泡细胞中的受体, UTP 可增强表面活性剂的产生, 从而有助于维持末端小气道有最优的气体交换和气道上皮功能。

申请人推测机械换气患者的 MCC 可通过对聚集液体的部位给予 UTP 及相关化合物和其它核苷磷酸来改善, 这些其它的核苷磷酸例如是: P₁,P₄-二(尿苷-5')四磷酸(U₂P₄)、腺苷 5'-三磷酸(ATP)、1,N₆-亚乙烯基腺苷 5'-三磷酸、腺苷 1-氧化物 5'-三磷酸、3, N₄-亚乙烯基胞苷、或 P₁,P₄-二(腺苷-5')四磷酸(A₂P₄)。UTP 和 U₂P₄ 是本发明较佳的实例。通过在插管前或插管后不久给予 UTP 或 U₂P₄, 就可避免 VAP 和其它与机械换气相关的并发症。本发明的方法也可用来治疗患

有呼吸窘迫需要插管的慢性支气管炎患者。最后，本发明的方法也可用来促进固定或卧床不起的患者体内滞留粘液分泌物的排出。

发明概述

- 5 本发明公开了一种防止或治疗需要这种治疗的患者体内的肺炎(包括与换气器相关的肺炎在内)的方法。本发明的方法也可用来促进固定或卧床不起的患者体内滞留粘液分泌物的排出和清除以预防肺炎。该方法包括对患者给予有效量的式 I 的化合物或其药学上可接受的盐，以使粘液分泌物水化并刺激气道通道腔上皮细胞中的纤毛运动频率：



10

式 I

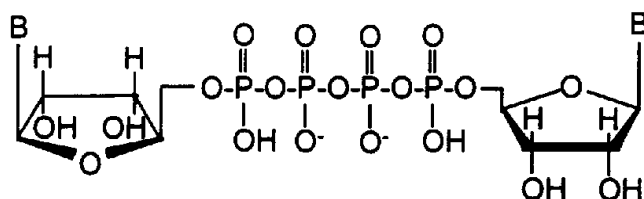
其中：

X_1 、 X_2 和 X_3 各自为 O-或 S-。较佳的， X_2 和 X_3 为 O-。

- 15 R_1 是 O、亚氨基、亚甲基或二卤代亚甲基(如二氯亚甲基、二氟亚甲基)。较佳的， R_1 是氧或二氟亚甲基。

R_2 是 H 或 Br。较佳的， R_2 是 H。式 I 的特别佳的化合物是尿苷 5'-三磷酸[UTP] 和尿苷 5'-O-(3-硫代三磷酸)[UTP γ S]。

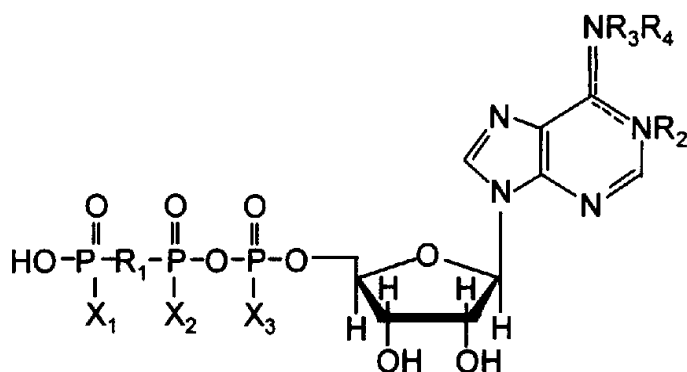
- 除了式 I 外，式 II 即 P1,P4-二(尿苷-5')四磷酸[U2P4]也是本发明较佳的实例。式 II 的另一个化合物是 P1,P4-二(腺苷-5')四磷酸[A₂P₄]。本发明的方法也包括用
- 20 式 III(腺苷 5'三磷酸[ATP]或 1,N6-亚乙烯基腺苷 5'-三磷酸或腺苷 1-氧化物 5'-三磷酸)或式 IV(3,N4-亚乙烯基胞苷 5'-三磷酸)的化合物给药。



式 II

其中:

B 是尿嘧啶或腺嘌呤, 如式 I 和 III 中那样连接.



式 III

5

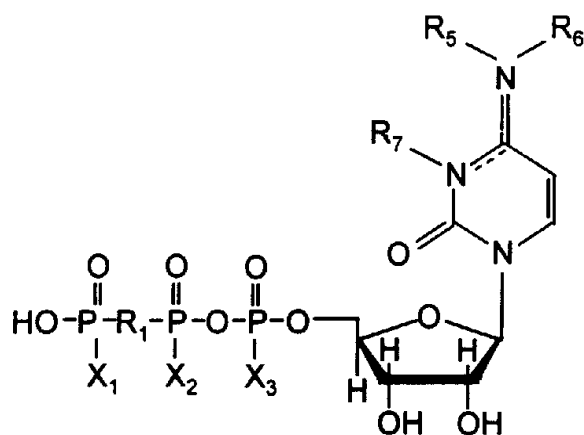
其中:

R_1 、 X_1 、 X_2 和 X_3 如式 I 所确定.

R_3 和 R_4 是 H, 而 R_2 不存在, N-1 和 C-6 间有双键(腺嘌呤), 或

R_3 和 R_4 是 H, 而 R_2 为氧, N-1 和 C-6 间有双键(腺嘌呤 1-氧化物), 或

10 R_3 、 R_4 和 R_2 一起构成 $-CH=CH-$, 形成一个从 N-6 到 N-1、N-6 和 C-6 间有双键的环(1,N6-亚乙烯基腺苷).



式 IV

其中:

15 R_1 、 X_1 、 X_2 和 X_3 如式 I 所确定.

R_5 和 R_6 是 H, 而 R_7 不存在, N-3 和 C-4 间有双键(胞苷), 或,

R_5 、 R_6 和 R_7 一起构成 $-CH=CH-$, 形成从 N-3 到 N-4、N-4 和 C-4 间有双键的环(3,N4-亚乙烯基胞苷).

本发明的第二方面是含有有效量的式 I、II、III 或 IV 的化合物的药物制剂，该制剂可在需要这些治疗的患者体内促进或增强分泌物的清除，水化粘液分泌物，刺激气道通道腔上皮细胞中的纤毛运动频率。

本发明的第三方面是刺激 II 型肺泡细胞的表面活性剂生产。

5 本发明的第四方面是用这里公开的活性化合物来生产药物，该药物能治疗性地水化粘液分泌物，刺激需要这种治疗的患者体内气道通道腔上皮细胞的纤毛运动频率。

附图简述

10 图 1 显示了实施例 2 描述的研究的结果，它表示 UTP 对气管粘液速度的影响。

图 2 显示了实施例 2 描述的研究的结果，它表示 U_2P_4 对气管粘液速度的影响。

15 图 3 显示了实施例 2 描述的研究的结果，它表示不同浓度的 UTP 和 U_2P_4 对 TMV 后剂量的直方图。

图 4 显示了实施例 3 描述的研究的结果，它表示 UTP 和 U_2P_4 在成年母羊中的粘液纤毛清除效果。

具体实施例详述

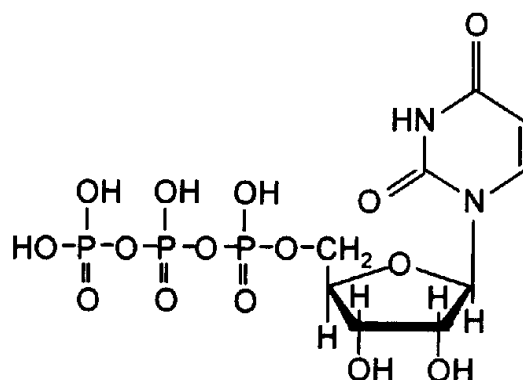
20 通过水化滞留的粘液分泌物，刺激纤毛运动频率和促进清除需要这些治疗的患者气道内粘液，本发明的方法可用来预防或治疗包括与换气器相关的肺炎(VAP)在内的肺炎。本发明的方法也可用来防治鼻插管患者体内的肺炎，改善粘液纤毛清除(MCC)，从而预防慢性固定的或卧床不起的患者体内的肺炎。本发明通过以下三个途径提高了粘液纤毛清除(MCC)：(1)提高腔上皮细胞表面的纤毛运动频率；(2)提高杯状细胞的粘蛋白分泌和(3)提高氯离子分泌，同时提高腔上皮细胞将水分泌入前纤毛液体层，因此降低了粘液的粘度。杯状细胞分泌的粘蛋白在纤毛顶部形成一层，并捕获外来颗粒(包括病毒和细菌)；粘蛋白层靠纤毛波浪形的运动来运输；纤毛的移动由纤毛周围的前纤毛液体层的水化来实现。另外，本发明的方法可与被公开来影响对 P_2Y_2 受体的激动剂活性的化合物一起使用，来刺激表面活性剂的产生。

30

上述式 I 化合物的例子包括：(a)尿苷 5'-三磷酸(UTP)；(b)尿苷 5'-O-(3-硫代三磷酸)(UTP γ S)；和(c)5-溴-尿苷 5'-三磷酸(5-BrUTP)。这些化合物是已知的，或

可用已知的方法制得，或者其变化对于该领域技术人员是明显的。例如，UTP 可用 Kenner 等, J. Chem. Soc. 1954, 2288 中描述的方法来制得。按照该熟知的方法，UTP 可通过使 2':3'-二-O-乙酰基-或 2':3'-O-异亚丙基(isopropylidene)尿苷-5' 苄基磷酸氯化物与三苄基焦磷酸的盐缩合，然后除去苄基和其它保护基团来合
5 成。UTP 也可通过在室温下用水性吡啶中过量 DCC 处理 UMP 和 85 % 正磷酸的混合物来制得。Hall 和 Khorana, J. Am. Chem. Soc. 76, 5056 (1954).

Merck Index, Monograph No. 9795(第 11 版, 1989)给出了 UTP 的化学结构:



S-2-羰乙基硫代磷酸盐可用来化学合成硫代磷酸盐化合物(如末端磷原子有
10 一个硫的 UTP γ S). S.Goody 和 F. Eckstein, J.Am. Chem. Soc. 93, 6252(1971).

简便起见，这里的式 I-IV 描述了天然存在的 D-构型的活性化合物，但是本
发明也包括 L 构型的化合物，以及 D-和 L-构型的化合物的混合物，除非另有特
指。天然存在的 D-构型是较佳的。

式 II 化合物的例子包括(P1,P4-二(腺苷-5'))四磷酸(A₂P₄)或 P1,P4-二(尿苷-5')
15 四磷酸(U₂P₄)). 这些化合物可根据已知的方法或其变化方法来制得。例如，A₂P₄
可通过用羰基二咪唑活化 ADP 来合成。E. Rapaport 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA
72(2), 838-42(1981). 用碳化二亚胺来处理腺苷-5'-一磷酸、腺苷-5'-二磷酸或腺苷
-5'-三磷酸得到二腺苷-5'-5'-多磷酸(包括 A₂P₄). K. Ng 和 L. E. Orgel, Nucleic Acids
Res. 15(8), 3572-80(1987). U₂P₄ 可通过尿苷 5'-磷酰吗啉(0.54mmol)与无水吡啶
20 (10ml)中的焦磷酸的三乙胺盐(0.35mmol)反应来制得。C. Vallejo 等, Biochem.
Biophys. Acta 438, 304-09(1976).

式 III 化合物的例子包括(a)腺苷 5'-三磷酸(ATP)和(b)1,N6-亚乙烯基腺苷 5'-
三磷酸. 上述式 IV 化合物的例子包括(a)胞苷 5'三磷酸和(b)3,N4-亚乙烯基胞苷 5'-
三磷酸. 这些化合物可根据已知的方法、或对于本领域技术人员来说明显的变化
25 方法来制得。例如，核苷三磷酸可通过咪唑磷酸(phosphorimidazolidate)(由一个核

苷酸和 1,1'-羰基二咪唑形成)与无机焦磷酸盐反应来制得。D. Hoard 和 D. Ott, J. Am. Chem. Soc. 87, 1785-1788(1965)。另一种常用的方法包括将 2',3'-异-亚丙基核苷酸加入搅拌的磷酸三烷酯和磷酰氯的冷的混合物中。该混合物被转变成相应的 5'-磷酸二氯化物。通过氯化物基团的迅速水解然后在 70 °C 下除去异亚丙基, 获得 5'核苷酸。M. Yoshikawa 等, Tetrahedron Lett. 5065-68(1967)和 Idem., Bull. Chem. Soc. (Jpn)42, 3505-08(1969)。

核苷-5'磷酰胺可用作制备核苷-5'多磷酸的改进方法。J. Moffatt 和 H. Khorana, J. Am. Chem. Soc. 83, 649-59(1961); 和 B. Fischer 等, J. Med. Chem. 36, 3937-46(1993)。

胞苷和腺苷的亚乙烯基衍生物可用已知的方法制得。例如, 采用氯乙醛和嘌呤核苷和胞嘧啶核苷的反应是众所周知的。氯乙醛在弱酸性水溶液中与 9-N-甲基腺嘌呤和 1-N-甲基胞嘧啶反应, 形成胞苷和腺苷的亚乙烯基衍生物。N. Kotchetkov 等, Tetrahedron Lett. 1993 (1971); J. Barrio 等, Biochem. Biophys. Res. Commun. 46, 597(1972); J. Secrist 等, Biochemistry 11, 3499(1972); J. Biemdt 等, Nucleic Acids Res. 5, 789(1978); K. Koyasuga-Mikado 等, Chem. Pharm. Bull. (Tokyo) 28, 932(1980)。

具有 α 、 β 、 γ 硫代亚磷酸基团的衍生物可根据下列方法或通过对该方法加以调整来制得: 2-氯-4H-1,3,2-苯并二噁磷酸-4-酮可用来亚磷酸化(phosphitylate)核苷的 5'羟基, 形成一个中间产物, 在随后的反应中, 该中间产物与焦磷酸盐在双取代过程中形成 P^2, P^3 -二氧化-P'-5'-核苷环三亚磷酸(triphophite)。用硫氧化, 形成核苷 5'-(1-硫代环三磷酸), 它水解成核苷 5'-O-(1-硫代三磷酸)的非对映异构混合物。或者, P^2, P^3 -二氧化-P'-5'-核苷环三亚磷酸可用碘/水氧化生成核苷 5'-三磷酸。该试剂也可用来合成核苷 2',3'-环磷酸硫代物。J. Ludwig 和 F. Eckstein, J. Org. Chem. 54, 631-35(1989)。

具有 α 、 β 和 γ 硫代亚磷酸基团的衍生物也可用 F. Eckstein 和 R. Goody 描述的方法(Biochemistry 15, 1685(1976))来制得。 [^{35}S]腺苷 5'-(0-1-硫代三磷酸)。使 [^{35}S]腺苷 5'磷酸硫代物(7500A₂₆₀ 单位, 0.5mmol)通过 Merck I 离子交换器(吡啶鎓形式)变成吡啶鎓盐。将溶液蒸干, 加入三-正-辛胺(0.22ml, 0.5mmol)和甲醇(约 10ml), 搅拌混合物直至获得澄清溶液。在蒸发后, 用油泵使残余物和干的二甲基甲酰胺一起蒸发(三次)。将残余物溶解在无水二噁烷(2ml)中, 加入二苯基磷酸氯化物(0.15ml, 0.75mmol)和三-正-丁胺(0.25ml, 1mmol)。在室温下搅拌混合物 3 小时, 蒸发除去溶剂, 在残余物中加入无水乙醚(10ml)和石油醚(30ml), 将混合物

在 0℃ 下放置 30 分钟。倾析除去醚，将剩余的物质溶解在无水二噁烷(1ml)中，将溶液蒸干。

通过加入三-正-丁胺(2.43ml, 10mmol)，并蒸干成三-正-丁铵盐，将十水焦磷酸四钠(2.33g, 5mmol)变成吡啶鎓盐。在用无水吡啶重复蒸发三次后，将物质溶解在无水吡啶(3ml)中，并加入上述活化的^[35S]腺苷 5'磷酸硫代物。

在室温下搅拌 2 小时后，加入乙醚(10ml)使产物沉淀。将沉淀溶解在水中，并在 DE-52 纤维素柱(37×2.5cm)上进行层析，采用 0.05M 和 0.5M 的二碳酸三乙铵各 1.5 升的线性梯度。产物用约 0.33M 的缓冲液洗脱，获得 1550A₂₆₀ 单位(0.1mmol, 20%)。为了进一步纯化，使该物质再次在 QAE-A 25 Sephadex 柱(1.5×2.5cm)上进行层析，采用 0.25M 和 0.5M 二碳酸三乙铵各 800ml 的线性梯度，获得 1200A₂₆₀ 单位(16%)。该物质不能被蛇毒磷酸二酯酶降解，但是能被碱性磷酸酶在 ATPβS 的条件下降解成 AMPS'。

^[35S]腺苷 5'-(O-1-硫代二磷酸)。该化合物的合成如^[35S]腺苷 5'-(O-1-硫代三磷酸那样进行，只是将磷酸盐而不是焦磷酸盐加入活化的^[35S]腺苷 5'-磷酸硫代物中，获得 1410A₂₆₀ 单位(0.94mol, 18%)。

腺苷 5'-(O-2-硫代三磷酸)(ATPβS)。使甲醇-水(1:1, v/v)中的腺苷 5'-(O-2-硫代二磷酸)(1.5mmol; Goody 和 Eckstein, 1971)通过 Merck I 型离子交换器(吡啶鎓形式)，使其变成吡啶鎓盐，用旋转式气化器将溶液蒸干。在残余物中加入三-正-辛胺(1.3ml, 约 3mmol)和甲醇(10ml)，搅拌混合物直至获得溶液(约 30 分钟)。在减压除去溶剂后，将残余物溶解在干的吡啶(10ml)中，并在用油泵的旋转式气化器上蒸干。重复该步骤三次。

以上述同样方式，采用 3mmol 三-正-辛胺将β-氰乙基磷酸盐(Ba²⁺盐, 854mg, 3mmol)转变成其单(三-正-辛铵)盐(mon(tri-*n*-octylammonium)salt)。通过重复地加入并蒸发干的二甲基甲酰胺(10ml)来干燥盐，然后将盐溶解在干的二噁烷(15ml)中，加入二苯基磷酸氯化物(0.9ml, 4.5mmol)和三-正-丁胺(0.45ml)，使溶液在室温下静置 3 小时。在减压除去二噁烷后，加入乙醚(30ml)，然后再加入石油醚(60ml, 60-80℃)，振荡几分钟，使混合物在冰上静置 15 分钟。倾析除去乙醚，将残余物溶解在干的二噁烷(5ml)中，然后减压蒸发除去二噁烷，在残余物中加入 ADP βS 三-正-辛铵盐(如上所述制得，溶解在干的六甲基磷酸三酰胺化物(4ml)和干的吡啶(4ml)的混合物中)。使获得的溶液在室温下放置 3 小时，然后减压除去吡啶。残余的混合物用 0.5N 氢氧化钠(100ml)在室温下处理 1 小时，然后加入 Merck I 离子交换器(吡啶鎓型)中，使溶液中和。将中和后的溶液上柱于 DE-52-纤维素柱(约

50×4cm), 然后用二碳酸三乙铵(0.1-0.35M, 2 X 2 升)进行线性梯度洗脱。产物在约 0.25M 处被洗脱, 获得 2750A₂₆₀ 单位(12 %); ³¹P NMR 谱可参见表 1。该物质被 ADP βS 稍稍污染。进一步获得 800A₂₆₀ 单位的产物, 该产物被 ADP βS 严重污染。通过在 DEAE-Sephadex A-25 上进行层析, 采用 4 °C 下二碳酸三乙铵(0.2-0.5M)的梯度, 可获得纯的 ADP βS。产物在 PEI 纤维素上的 TLC 方面与用丙酮酸激酶合成的 ATP βS 的行为相同。

R.Goody 和 F. Echstein, J. Am. Chem. soc. 93, 6252(1971)描述了用 S-2-羰基乙基硫代磷酸盐来合成核苷二磷酸和核苷三磷酸的末端磷原子有硫的硫代磷酸同系物。

其中 R1 是 CCl₂ 和 CF₂ 的式 I、III 或 IV 的化合物可用类似于 G. Blackburn 等, J. Chem. soc. Perkin Trans. I. 1119-25(1984)描述的方法来制备。

腺苷 5'-(β,γ-μ-二氟亚甲基)三磷酸, AMPPCF₂P(1c)。(a)吗啉-4-N,N'-二环己基羧铵(dicyclohexylcarboxamidinium)腺苷-5'-磷酸吗啉(390mg, 0.5mmol)溶解在无水、无胺的吡啶(5ml)中, 将溶液蒸干, 隔绝水分再重复该步骤两次。最终将其溶解在吡啶(3ml)中。同样, 使二氟亚甲基二磷酸的二(三-正-丁铵)盐(580mg, 1.0ml)从在吡啶溶液中反复蒸发(3×5ml)。最后合并两份吡啶溶液并蒸干。将残余物放在无水吡啶(4ml)中, 电磁搅拌隔绝水分 24 小时。然后蒸发溶液除去吡啶。将残余物溶解在去离子水(5ml)中, 上柱于 DEAE-Sephadex 柱(3×30cm), 用线性盐梯度(0--0.5M-LiCl)洗脱产物。合并含有类似物的级分并将在蒸干。将白色固体残余物溶解在少量无水甲醇(5ml)中, 加入丙酮(25ml)使核苷酸沉淀出来。离心收集沉淀的产物, 重复该过程 4 次。最后将白色颗粒重新溶解在甲醇(10ml)中, 蒸发至干, 获得白色粉末状四锂盐产物(164MG, 54 %), 熔点为 225-235 °C (分解)。

腺苷 5'-(β,γ-μ-二氯亚甲基)三磷酸, AMPPCCl₂P(1e)。使腺苷 5'-磷酸吗啉(phosphoromorpholidate)(390mg, 0.5mmol)与二氯-亚甲基二磷酸的二(三-正-丁铵)盐(613mg, 1mmol)缩合。使产物在 DEAE Sephadex 上层析, 采用线性梯度(LiCl, 0--0.5M, pH7.0, 2 升)。合并含有产物的级分, 蒸干, 通过重复地溶解在甲醇(5ml)中用丙酮(25ml)沉淀出来分离产物, 获得白色粉末(24mg, 75.7%), 熔点为 235-245 °C (分解)。

鸟苷 5'-(β,γ-μ-二氟亚甲基三磷酸)的制备 GMPPCF₂P(2b)--将吗啉-4-N,N'-二环己基-羧铵鸟苷-5'-磷酸吗啉(390mg, 0.5mmol)溶解在无水吡啶(5ml)和新蒸馏的 2-氯酚(chlorophenox)(4ml)的混合物中。在混合物中加入二(三-正-丁铵)二氟亚甲基二磷酸(580mg, 1mmol)。使溶液在隔绝水分和光下搅拌 4 天。然后, 加入水

(50ml), 用乙醚萃取溶液(3×50ml). 将水相蒸干, 将胶质残余物重新溶解在水(50ml)中, 上柱于 DEAE Sephadex 柱, 用线性盐梯度(LiCl, 0--0.5M, pH7.0)洗脱. 合并含有类似物的级分, 蒸干, 重复用丙酮使产物从甲醇中沉淀出来. 蒸干甲醇, 获得最后产物, 获得的主题混合物为白色粉末(136mg, 42.8%), 熔点为 245-255 °C (分解).

鸟苷 5'-(β,γ-μ-二氯亚甲基)三磷酸 GMPPCCl₂P (2d).--在类似于(2b)的反应中, 使吗啉-4-N,N'-二环己基羧铵鸟苷-5'-磷酸吗啉(144mg, 0.2mmol)与二氯-亚甲基二磷酸¹⁰的二(三-正-丁铵)盐(360mg, 0.6mmol)结合, 获得白色粉末产物(81mg, 62%)熔点为 240-260 °C (分解).

式 I、II、III 的化合物(其中 R₁ 为 CH₂)可用类似于 T. Myers 等, J. Am. Chem. Soc. 85, 3292-95(1963)中描述的方法来制得. 该方法证明了 5'-腺苷亚甲基二磷酸可通过氨基 5'-磷酸腺苷(adenosine 5'-phosphorimidate)与亚甲基二磷酸反应以及 AMP 与亚甲基二磷酸在过量二环己基碳化二亚胺存在下缩合反应来获得.

另外, UTP、ATP、CTP、A₂P₄、3,N⁴-亚乙烯基胞苷三磷酸、1,N⁶-亚乙烯基腺苷 5'-三磷酸、腺苷 1-氧化物 5'-三磷酸、ATPγS、ATPβS、ATPαS、AMPPCH₂P、AMPPNHP、N⁴-亚乙烯基胞苷和 1,N⁶-亚乙烯基腺苷可从商业上购得, 例如购自 Sigma, Chemical Company, PO Box 14058, St. Louis, MO 63178.

式 I-IV 的活性化合物本身或以其药学上可接受盐来给药, 这些盐类例如是碱金属(如钠或钾)盐、碱土金属盐、或铵盐和四烷基铵盐、NX₄ + (其中 X 是 C₁₋₄). 药学上可接受的盐应该保留亲代化合物所需的生物活性, 且不会提供不希望的毒性.

这里公开的化合物可通过各种合适的方式对肺、窦、耳或眼给药, 但是最好用包含活性化合物的液体/液体悬浮液来给药(鼻用喷雾剂颗粒(可以被主体吸入或经雾化通过机械换气系统来对患者给药), 或滴鼻液体制剂, 或滴眼液体制剂). 用来制备鼻用喷雾剂或鼻用粉末、滴鼻或滴眼滴剂、或液体雾化制剂的活性化合物的液体药物组合物, 它可用本领域技术人员已知的方法将活性化合物与合适的载体(如无菌无热原的水或无菌盐水)结合在一起来制得. 另外, 也可采用其它给药方法, 这些方法包括全身给药和口服形式(液体或丸剂)、粉末吸入、表面给药、注射、手术期间滴注凝胶、乳膏、粉末、泡沫、晶体或液体悬浮液或栓剂形式.

这里描述的方法也适于兽用.

实施例

实施例 1

治疗处于危险的患者患的与换气器相关的肺炎(VAP)

对患有急性神经损伤、需要插管和机械换气的成年患者给予尿苷 5'-三磷酸 (UTP)或 P1,P4 二(尿苷-5')-四磷酸(U2P4)。 UTP 用在线的喷雾器以气雾剂形式给药，每天 2-3 次，共 5 天。 UTP 的浓度在 10^{-7} 至 10^{-1} 摩尔/升范围内。在插管/机械换气的 12 小时内开始 UTP 治疗。每位患者的治疗时间为 5 天。

通过重要的体征的标准安全指标来测定 UTP 防治 VAP 的安全性，这些体征包括心率、呼吸频率、血压、心电图和实验室血液试验(如血的化学组成，全血计数，血液学)以及观察到的任何不良迹象。

通过 VAP 的症状减少(通过周期性物理检查)以及实验室和细菌学评价，测定 UTP 防止 VAP 的效果。另一种测定效果的方法是减少机械换气时总的天数，因为粘液纤毛清除会降低气道换气压和辅助换气的需求。

15

实施例 2

气管粘液的研究

用下列步骤来研究 UTP 和 U_2P_4 对气管粘液速度(TMV)影响作用：用 2 % 的利多卡因溶液来麻醉清醒的成年母羊的鼻通道。在产生局部麻醉后，插入改制的气管内插管(7.5mm)，使得套夹在声带下面(通过 X 射线透射检查确定)。吸入的空气被温热和增湿。气管内插管的套夹只是在给予测试化合物期间才膨胀，以使套夹造成的可能的 TMV 损伤达到最小。测试化合物通过喷雾来给药，在 10-12 分钟内给药 4ml。

通过 X 射线透射检查来测定 TMV。将 10-20 个不透 X 线的小盘(Teflon[®]/三氧化铋；直径为 1mm，厚 0.8mm，重 1.8mg)用一股压缩空气(3-4L/min)通过改装的空吸导管导入气管中。在便携式图象放大装置的录像带上记录单个小盘的速度。通过测定每个小盘在 1 分钟观察期内移动的距离来计算单个小盘的速度。报道的数值是单个小盘速度的平均值。给作为标准的母羊戴上颈圈，以校正 X 射线透射检查中固有的放大误差。

UTP 和 U_2P_4 对气管粘液速度均有明显的剂量相关效果。剂量在 4-400 μ mol 范围内。两种化合物均在 400 μ mol(4ml 10^{-1} M)剂量下达到最大效果。UTP 产生的最大效果为基线的 125 ± 7 % (平均值 $\pm$ 标准偏差，n=6)。 U_2P_4 产生的最大效果为基线的 144 ± 9 % (n=6)。两种化合物均在给药的 15 分钟后产生最大效果。最高剂量

说明书附图

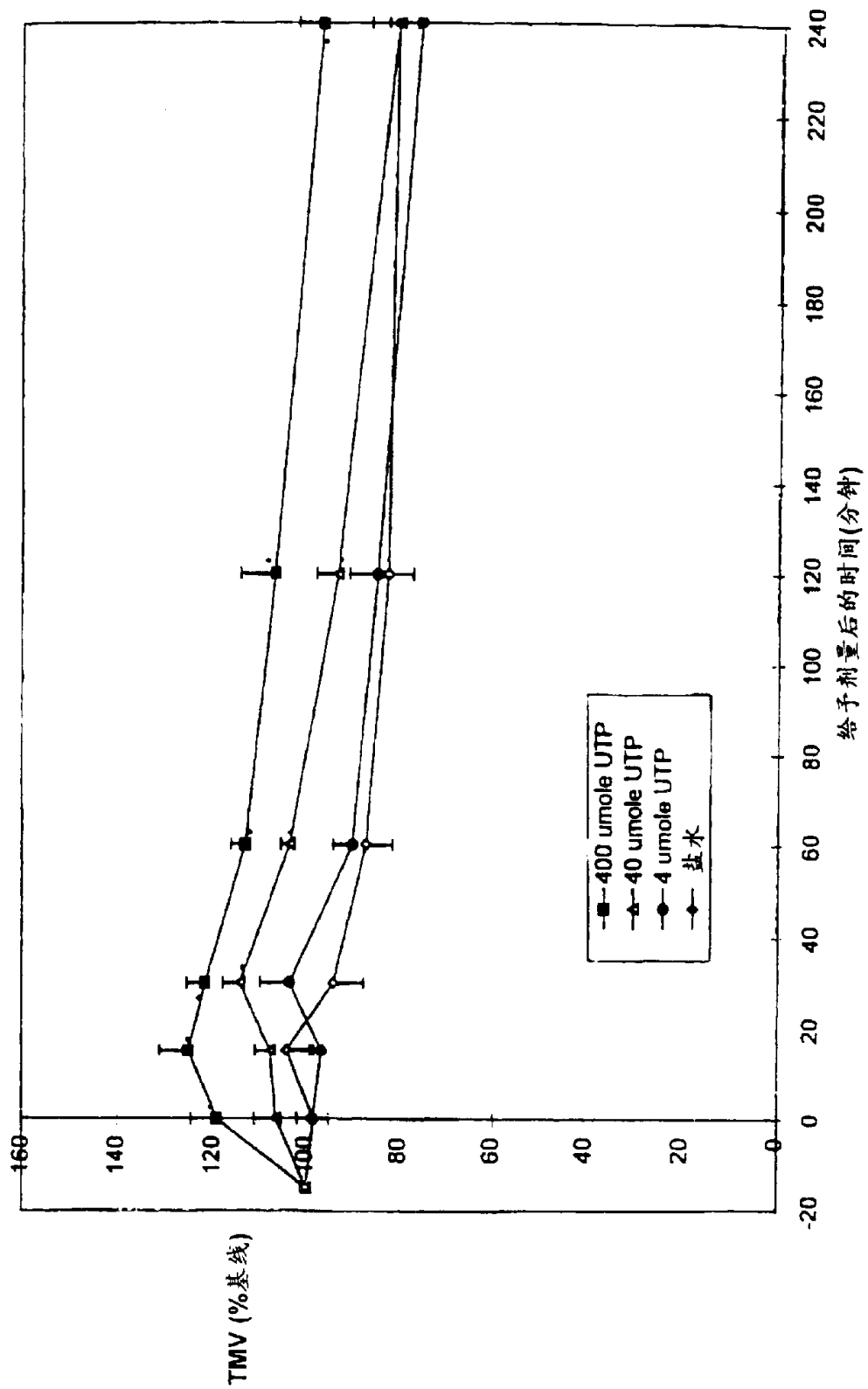


图 1

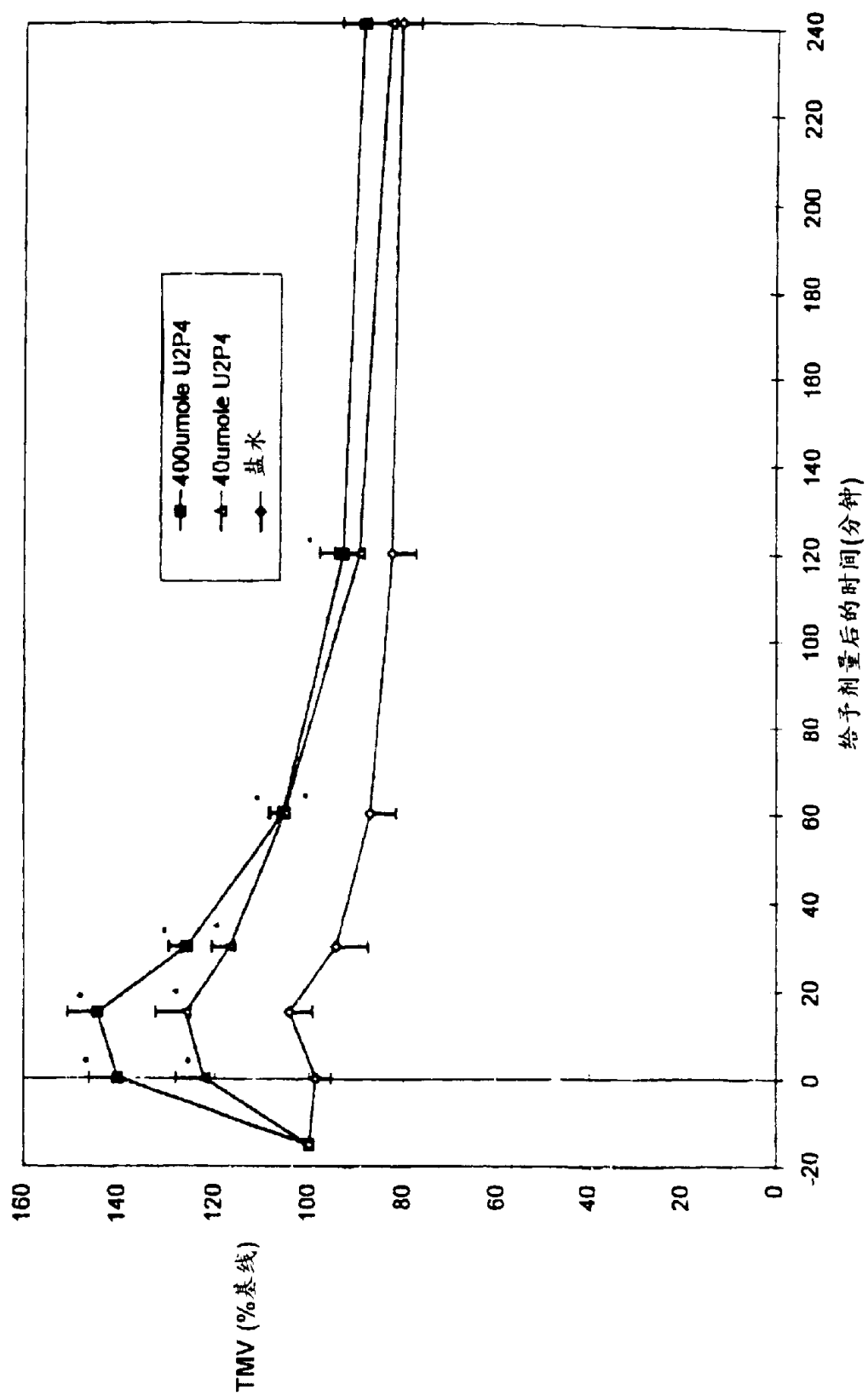
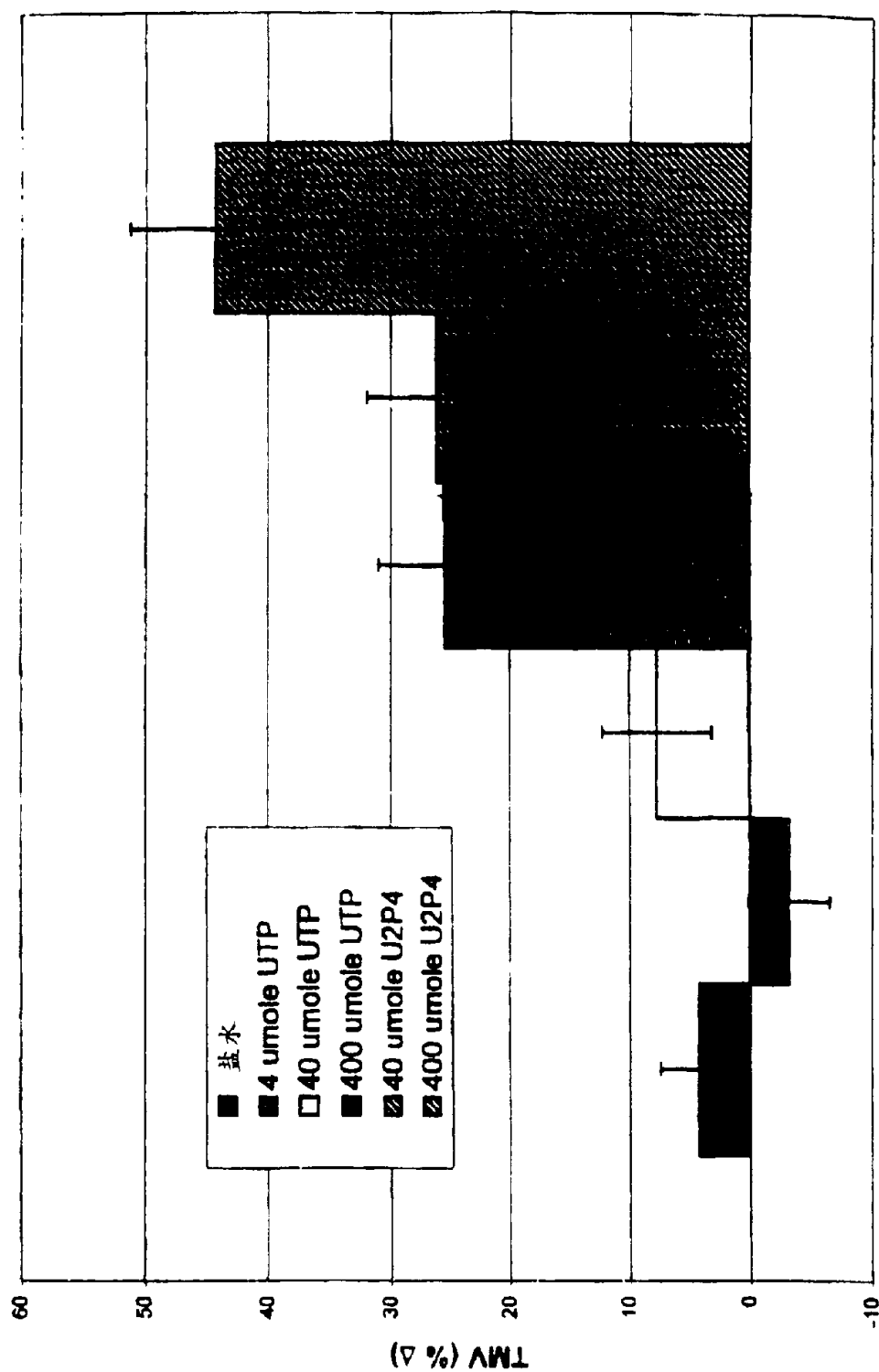


图 2



给予剂量后15分钟

图 3

母羊中粘液纤毛清除

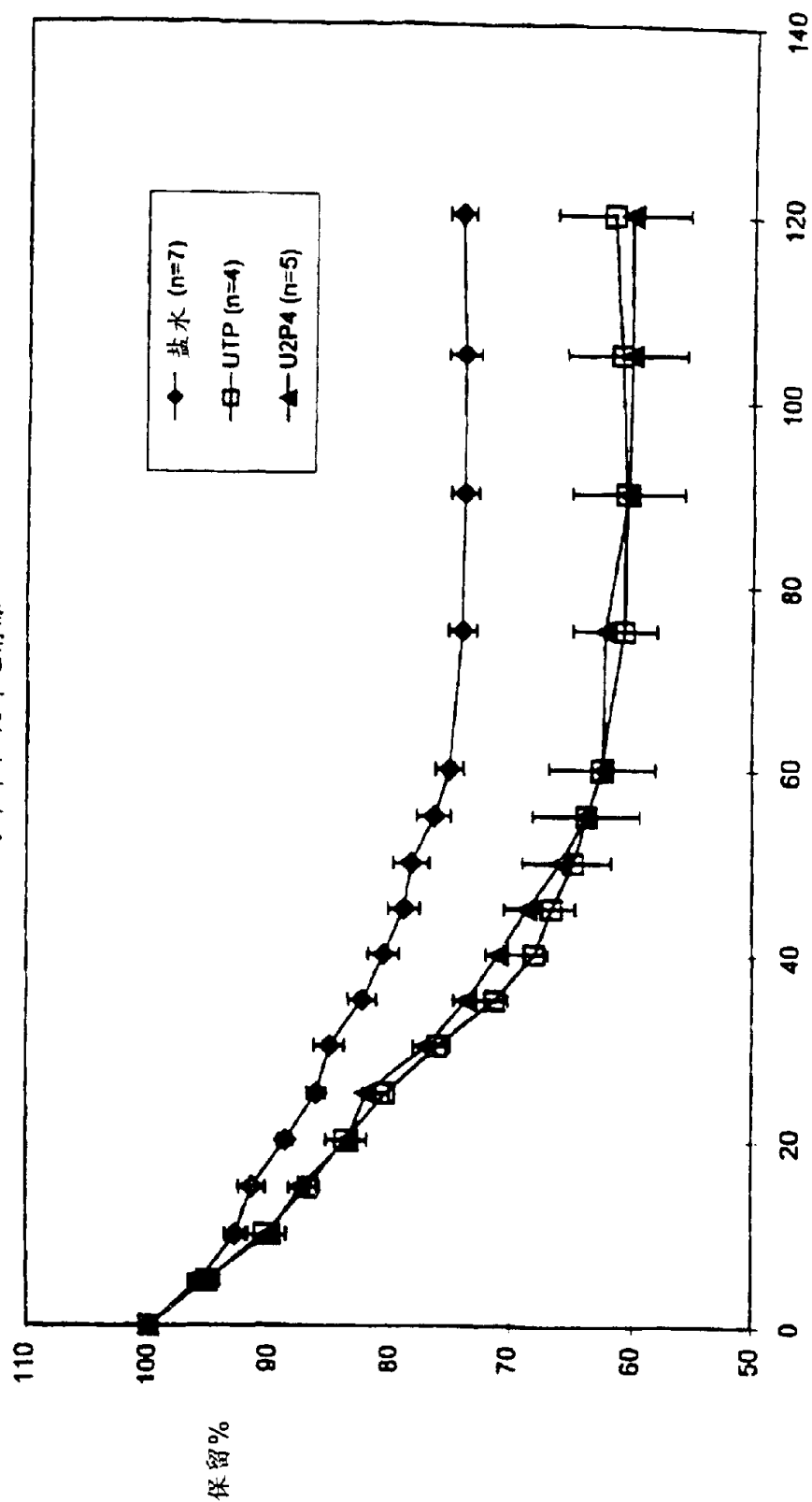


图 4