

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 98803259.7

[51] Int. Cl.

C07H 21/00 (2006.01)

A61K 31/70 (2006.01)

A61P 11/00 (2006.01)

A61P 11/02 (2006.01)

A61P 27/02 (2006.01)

A61P 27/16 (2006.01)

[45] 授权公告日 2006 年 7 月 5 日

[11] 授权公告号 CN 1262556C

[22] 申请日 1998.2.6 [21] 申请号 98803259.7

[30] 优先权

[32] 1997. 2. 6 [33] US [31] 08/797,472

[32] 1997. 2. 10 [33] US [31] 08/798,508

[86] 国际申请 PCT/US1998/002702 1998.2.6

[87] 国际公布 WO1998/034942 英 1998.8.13

[85] 进入国家阶段日期 1999.9.10

[71] 专利权人 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 W·彭德格斯特 B·R·耶扎

J·L·赖德奥特 S·M·西迪基

审查员 王青华

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司

代理人 陈文青

权利要求书 1 页 说明书 24 页

[54] 发明名称

特定的二核苷酸和它们作为粘膜纤毛清除和
纤毛颤动频率调节剂的应用

[57] 摘要

本发明涉及特定新颖的二核苷酸及其制剂，它们是对 P2Y₂和/或 P2Y₄嘌呤受体具有极高的选择性的激动剂，可用于治疗慢性阻塞性肺病，如慢性支气管炎，PCD，囊性纤维变性，和预防由卧床不动引起的肺炎。此外，由于它们能清除残留的粘液分泌物并刺激纤毛颤动频率，本发明化合物也可用来治疗鼻窦炎、中耳炎和鼻泪管堵塞。它们也可用来治疗干眼病和视网膜脱落。

1. 一种化合物，它选自：
P¹-(胸苷 5' -)P⁴-(尿苷-5' -)四磷酸盐(UP₄T)，
5 P¹-(肌苷 5' -)P⁴-(尿苷-5' -)四磷酸盐(UP₄I)，
P¹-(4-硫代尿苷 5' -)P⁴-(尿苷-5' -)四磷酸盐(UP₄(4-SH-U))，
P¹-(胞嘧啶β-D-阿拉伯呋喃糖苷 5' -)P⁴-(尿苷 5' -)四磷酸盐(UP₄araC)，
P¹-(尿苷 5' -)-P⁴-(黄苷 5' -)四磷酸盐(UP₄X)，
P¹-(2' -脱氧尿苷 5' -)-P⁴-(尿苷 5' -)四磷酸盐(UP₄dU)，
10 P¹-(3' -叠氮基-3' -脱氧胸苷 5' -)P⁴-(尿苷 5' -)四磷酸盐(UP₄(AZT))，
P¹-(2' -脱氧鸟苷 5' -)P⁴-(尿苷 5' -)四磷酸盐(UP₄dG)，
P¹-(2' -脱氧肌苷 5' -)P⁴-(尿苷 5' -)四磷酸盐(UP₄dI)，和
P¹-(2' -脱氧胞苷 5' -)P⁴-(尿苷 5' -)四磷酸盐(UP₄dC)。
2. 一种药物组合物，包括如权利要求 1 所述的化合物或其药学上可接受
15 的盐，以及药学上可接受的载体。
3. 如权利要求 1 所述的化合物或权利要求 2 所述的药物组合物在制备治疗
哺乳动物慢性阻塞性肺病药物中的应用。
4. 如权利要求 1 所述的化合物或权利要求 2 所述的药物组合物在制备治
疗哺乳动物鼻炎、中耳炎或鼻泪管阻塞的药物中的应用。
- 20 5. 如权利要求 1 所述的化合物或权利要求 2 所述的药物组合物在制备治
疗哺乳动物干眼病的药物中的应用。
6. 如权利要求 1 所述的化合物或权利要求 2 所述的药物组合物在制备治
疗哺乳动物视网膜脱落的药物中的应用。
7. 如权利要求 1 所述的化合物或权利要求 2 所述的药物组合物在制备哺
25 乳动物引痰的药物中的应用。
8. 如权利要求 1 所述的化合物或权利要求 2 所述的药物组合物在制备使
哺乳动物易于咳出痰的药物中的应用。
9. 如权利要求 1 所述的化合物或权利要求 2 所述的药物组合物在制备治
疗囊性纤维变性的药物中的应用。
- 30 10. 如权利要求 6 或 9 所述的应用，其中所述的化合物是 P¹-(2' -脱氧胞
苷 5' -)P⁴-(尿苷 5' -)四磷酸盐。

特定的二核苷酸和它们作为粘膜纤毛清除和
纤毛颤动频率调节剂的应用

5

该申请是 1997 年 2 月 10 日提交的美国专利申请 08/798,508 的部分续展申请。

前言

技术背景

10 本发明涉及增加残留的粘液分泌物水化、刺激粘蛋白的产生和增加纤毛颤动频率以促进对剩余分泌物的清除的特定的二核苷酸。

发明背景

慢性阻塞性肺病(COPD)在美国有一千五百万病人,是死亡的第六大原因。其特征
15 特征在于粘液分泌物在肺部的残留。许多被诊断患有 COPD 的病人也有称为慢性支气管炎(CB)的疾病,每年 600,000 病人由于慢性支气管炎的急性发作而住院。囊性纤维变性和原发性纤毛运动障碍(PCD)是临床特点类似于 COPD 的肺病的例子。纤毛运动障碍不论是原发的或继发的,都会导致只能通过咳嗽清除的分泌物残留。

20 另一类特征在于残留粘液分泌物积聚的疾病是鼻窦炎,它是一种典型地与上呼吸道感染有关的鼻旁窦炎症。鼻窦炎是美国最常见的影响着估计为 3 千 1 百万人的保健方面的疾病。(A.Moss 和 V.Parsons, National Center for Health Statistics, 1986: 66-7. DHHS Publication No. (PHS) 86-1588 (1985)).

中耳炎(OM)主要是 3 岁以下的孩子中耳的病毒或细菌感染,上呼吸道感染常
25 促使其发生,通过鼻咽和咽鼓管扩散到中耳。每年约有 25,000,000-50,000,000 次就诊来诊断和治疗中耳炎。到三岁时,约 75 % 孩子至少发过一次急性中耳炎(J. Klein, Clin Infect Dis 19, 823-33(1994)). 用抗生素治疗后,中耳里积聚的液体还在,导致听力障碍并会延误潜在的语言和认知的发育。增加中耳分泌物的清除能力会降低或减少中耳炎的明显后遗症。

30 另外由残留分泌物导致的疾病是肺炎。由于各种原因而卧床的病人形成肺炎的危险性很大。尽管对其高度警戒并进行大量的介入治疗,每年仍有 400,000 以上的病人发生肺炎,具有明显的发病率和死亡率。

也有因治疗上的需要而增加泪腺系统排泪的情况。当泪腺排泪系统不能正常运行时, 结果是过量流泪(泪溢)、脓性粘液排出和复发性泪囊炎。目前对鼻泪管阻塞的治疗最广泛的是进行侵入性的手术, 研究者业已在找寻非侵入性的药物治疗方法。

5 通过类似于水化气道上皮机制的 $P2Y_2$ 和/或 $P2Y_4$ 嘌呤受体调节机制, 可经泪腺附属组织来刺激泪液分泌。干眼病是由于角膜前泪膜异常产生的指症, 其特征在于产生的泪液减少或泪膜蒸发增加, 并有其导致的眼表面疾病。目前, 干眼病的药物治疗主要局限于给予人工泪液(生理盐水)以使眼睛暂时再水化。但是, 减轻是暂时的, 需要经常给药。

10 通常情况下, 粘液分泌物通过粘膜纤毛清除(MCC)系统除去。MCC 依赖于三个步骤的整体行动: 1)杯状细胞和粘膜下层腺体的粘液分泌; 2)上皮细胞上纤毛的运动, 它驱使粘液穿过管腔表面; 和 3)离子经管腔上皮细胞输入和输出, 它们共同控制水流入粘液。

现已知诸如尿苷 5'-三磷酸盐(UTP)的核苷酸磷酸盐调节 MCC 系统的所有步
15 骤。首先, UTP 已显示能增加体外的杯状细胞分泌粘蛋白的速率和总量(M. Lethem 等, Am J Respir Cell Mol Biol 9,315-22(1993))。第二, UTP 已显示能在体外增加人气道上皮细胞纤毛颤动频率(D. Drutz 等, Drug Dev. Res. 37(3),185(1996))。第三, UTP 已显示在体外能增加 Cl^- 的分泌, 因此增加了来自气道上皮细胞的水分泌(S. Mason 等, Br. J. Pharmacol. 103,1649-56(1991))。另
20 外, II 型肺泡细胞能对 UTP 反应而释放表面活性剂(Gobran, Am. J. Physiol. 267, L625-L633(1994))使肺部功能保持最佳, 并有助于 MCC 最大化(M. Knowles 等, N.Engl. J. Med. 325,533-38(1991))。由于通过 $P2Y_2$ 受体对磷脂酶 C 的刺激, UTP 已显示能增加细胞内的 Ca^{++} (H. Brown 等, Mol. Pharmacol. 40,648-55(1991))。

UTP 对粘膜纤毛提升系统的所有步骤的调节导致正常志愿者的肺部粘膜纤
25 毛清除率增加 2.5 倍, 同时没有任何明显的副作用(K. Olivier 等, Am J. Respir. Crit. Care Med. 154,217-23(1996))。此外, UTP 能明显增强 PCD 患者的咳嗽清除(经咳嗽清除残留的分泌物)(P.Noone 等, Am. J. Respir. Crit. Care Med. 153, A530 (1996))。

应当注意到, 1996, 12, 19 公开的 PCT 申请 WO96/40059 揭示了二核苷
30 化合物用来治疗气道疾病。

由于 UTP 能增加剩余粘液分泌物清除能力, 申请人研究是否其它核苷磷酸盐能有相同的治疗作用(若不是更高的话)。本发明基于该研究基础。

前述的二核苷酸及其相应的参考文献列于表 I。

表 I
文献里的二核苷酸
(括号里的数字相应于下面的参考文献)

Np,N	Np,N'	Np,N	Np,N'	Np,N	Np,N'
Ap ₂ A (4,1)	Ap ₂ NAD (6)	Up ₂ U (1)	Ap ₂ T (20)	Up ₂ U (2,3)	Ap ₂ U (3)
Gp ₂ G (5,1)	Ap ₂ TAD (6)	Ap ₂ A (1,4,29)	m ⁷ Gp ₂ G (5)	Ap ₂ A (1,4,29)	Ap ₂ C (3)
m ⁷ Gp ₂ m ⁷ G (5)	Ap ₂ C-NAD (6)	Xp ₂ X (1)	m ^{2,7} Gp ₂ G (5)	Cp ₂ C (3)	Ap ₂ G (3)
	Ap ₂ C-PAD (6)	m ⁷ Gp ₂ m ⁷ G (5)	m ^{2,7} Gp ₂ G (5)	Gp ₂ G (1,5)	Gp ₂ U (3)
	Ap ₂ BAD (6)	Gp ₂ G (1)		Xp ₂ X (1)	Gp ₂ C (3)
	m ⁷ Gp ₂ G (5)			Dp ₂ D (15)	Up ₂ C (3)
	Up ₂ U (43)			eAp ₂ eA (7)	Ap ₂ T (20)
				m ⁷ Gp ₂ m ⁷ G (5)	m ⁷ Gp ₂ G (5)
					m ^{2,7} Gp ₂ G (5)
					m ^{2,2,7} Gp ₂ G (5)

Np,N	Np,N'	Np,N	Np,N'	Np,N
Ap ₂ A (4)	Ap ₂ T (20)	Ap ₂ A (4)	Ap ₂ T (20)	Ap ₂ A (4)

AppZppA	DppZppD	ApZppZpA	ApSpZpSpA
Z	Z	Z	Z
CH ₂ (8)	CH ₂ (15)	CH ₂ (8)	CHF (8)
CH ₂ CH ₂ (8)	CH ₂ CH ₂ (15)	CH ₂ CH ₂ (8)	CF ₂ (8)
CHF (8)	CHF (15)	CHF (8)	O (8)
CF ₂ (8)	CF ₂ (15)	CF ₂ (8)	
CHCl (8)	CHCl (15)	CHCl (8)	
CCl (8)	CCl (15)	CCl (8)	

- A = 腺嘌呤核苷

U = 尿嘌呤核苷

G = 鸟嘌呤核苷

T = 胸腺嘧啶脱氧核苷

X = 黄嘌呤核苷

TAD = Tiazofurin

BAD = 苯甲酰胺核苷

D = 2,6-二氨基嘌呤
- eA=亚乙烯基腺嘌呤核苷

m⁷G=7-甲基鸟嘌呤核苷

m^{2,7}G=2,7-二甲基鸟嘌呤核苷

m^{2,2,7}G=2,2,7-三甲基鸟嘌呤核苷

NAD = 烟酰胺核苷

C-NAD = C-烟酰胺核苷

C-PAD = C-吡啶酰胺核苷

N = 核苷

5

(1) M. A. G. Sillero 等, Eur. J. Biochem., 76,331(1977)
(2) C. G. Vallejo 等, Biochim. Biophys. Acta, 483,304(1976)
(3) H. Coste 等, J. Biol. Chem., 262,12096(1987)
(4) K.E. Ng 等, Nucleic Acid Res., 15,3573(1987)
(5) J. Stepinski 等, Nucleosides & Nucleotides, 14,717(1995)

10

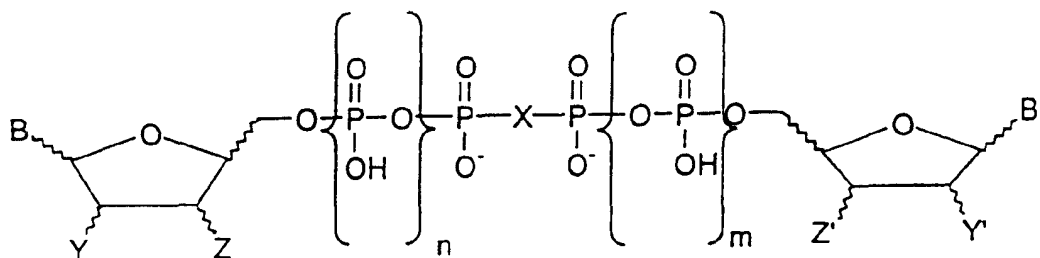
- (6) A. Zatorski 等, J. Med. Chem., 39,2422(1996)
- (7) P. Rotilan 等, FEBS, 280, 371(1991)
- (8) P. C.Zamecnik 等, Proc. Natl. Acad. Sci., 89,2370(1992)
- (9) J. Walker 等, Biochemistry,32,14009(1993)
- 5 (10) R. H. Hiderman 等, J. Biol. Chem., 266,6915(1991)
- (11)J. Luthje 等, Eur.J. Biochem., 173,241(1988)
- (12) R. H. Silverman 等, Microbiological Rev., 43,27(1979)
- (13) C.D. Lobaton 等, Eur. J. Biochem., 50,495(1975)
- (14) G. Lowe 等, Nucleosides & Nucleotides, 10,181(1991)
- 10 (15) G. M. Blackburn 等, Nucleosides & Nucleotides, 10,549(1991)
- (16) J. C. Baker 等, Mutation Res.,208,87(1988)
- (17) G. Klein 等, Biochemistry, 27,1897(1988)
- (18) E. Castro 等, Br. J. Pharmacol..100,360(1990)
- (19) D.R. Elmaleh 等, Proc. Natl. Acad. Sci., 81,918(1894)
- 15 (20) R. Bone 等, J. Biol. Chem., 261,16410(1986)
- (21) Fed. Amer. Soc. Exper. Bio., Abstr. 第 I 部分, 1878 号(1991)
- (22) M. T. Miras-Portugal 等, Ann. NY Acad Sci., 603,523(1990)
- (23) A. Guranowski 等, Biochemistry, 27,2959(1988)
- (24) F. Grummt 等, Plant Mol. Bio., 2,41(1983)
- 20 (25) A. G. McLennan 等, Nucleic Acid Res., 12,1609(1984)
- (26) P. Zamecnik 等, Analytical Biochem., 134,1(1983)
- (27) E. Rapaport 等, Proc. Natl. Acad. Sci., 78,838(1981)
- (28) T. Kimura 等, Biol. Pharm. Bull., 18,1556(1995)
- (29) E. Schulze-Lohoff 等, Hypertension, 26,899(1995)
- 25 (30) B. K. Kim 等, Proc. Natl. Acad. Sci., 89,11056(1992)
- (31) P. C. Zamecnik 等, Proc. Natl. Acad. Sci., 89,2370(1992)
- (32) H. Morii 等, Eur. J. Biochem., 205,979(1992)
- (33) E. Castro 等, Pflugers Arch., 426,524(1994)
- (34) H. Schluter 等, Nature, 367,186(1994)
- 30 (35) E. Castro 等, Br. J. Pharmacol., 206,833(1992)
- (36) T. Casillas 等, Biochemistry, 32,14203(1993)
- (37) J. Pintor 等, J. Neurochem., 64,670(1995)

- (38) E. Castro 等, J. Biol. Chem., 270,5098(1995)
 (39) V. A. Panchenko 等, Neuroscience, 70,353(1996)
 (40) E. Castro 等, Br. J. Pharmacol., 100,360(1990)
 (41) J. Pintor 等, Gen. Pharmac., 26,229(1995)
 5 (42) J. Pintor 等, Br. J. Pharmacol., 115,895(1995)
 (43) A. Kanavarioti 等, Tett. Lett., 32,6065(1991)

发明综述

- 本发明提供了新颖的式 I 化合物及其药物组合物。本发明也提供了在清除剩
 10 余粘膜分泌物和增加纤毛颤动频率方面有用的化合物。因此,本发明的较宽的技术方案涉及通式 I 化合物或其药学上可接受的醇或盐:

式 I



- 15 其中:

X 是氧、亚甲基、二氟亚甲基、酰亚氨基;

$n=0,1$ 或 2 ;

$m=0,1$ 或 2 ;

$n+m=0,1,2,3$ 或 4 ; 和

- 20 B 和 B' 各自独立地代表各自通过 9-或 1-位连接的嘌呤残基或嘧啶残基;

Z = OH 或 N_3 ;

Z' = OH 或 N_3 ;

Y = H 或 OH;

Y' = H 或 OH;

- 25 条件是当 Z 是 N_3 时, Y 是 H, 或当 Z' 是 N_3 时, Y' 是 H; 进一步的条件是表 I 化合物排除在外。

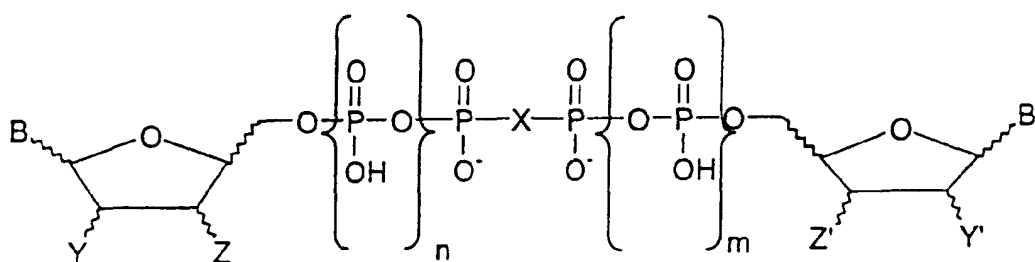
本发明的化合物是对 $P2Y_2$ 和/或 $P2Y_4$ 嘌呤受体选择性很高的激动剂, 这样,

它们可用来治疗慢性阻塞性肺病，如慢性支气管炎，PCD 和囊性纤维变性，也可用于治疗具有患肺炎危险的卧床病人。此外，由于本发明的化合物能清除剩余粘膜分泌物并刺激纤毛颤动频率，所以它们也可用于治疗鼻窦炎、中耳炎和鼻泪管阻塞。它们也可用来治疗干眼病、视网膜脱落和伤口愈合。另外，由于这些化合物的药理作用，它们被用于引痰过程。另外，人们推定，本发明化合物通过增加来自肺粘膜的分泌物的清除能增加运动员的成绩。

发明详述

本发明提供了新颖的式 I 化合物及其药物组合物。本发明也提供了用于清除剩余粘膜分泌物并增加纤毛颤动频率的化合物。因此，本发明较宽的技术方案涉及通式 I 的新颖化合物，及其药学上可接受的酯或盐：

式 I



15 其中：

X 是氧、亚甲基、二氟亚甲基、酰亚氨基；

$n=0,1$ 或 2 ；

$m=0,1$ 或 2 ；

$n+m=0,1,2,3$ 或 4 ；和

20 B 和 B' 各自独立地代表各自通过 9-或 1-位连接的嘌呤残基或嘧啶残基；

Z = OH 或 N_3 ；

Z' = OH 或 N_3 ；

Y = H 或 OH；

Y' = H 或 OH；

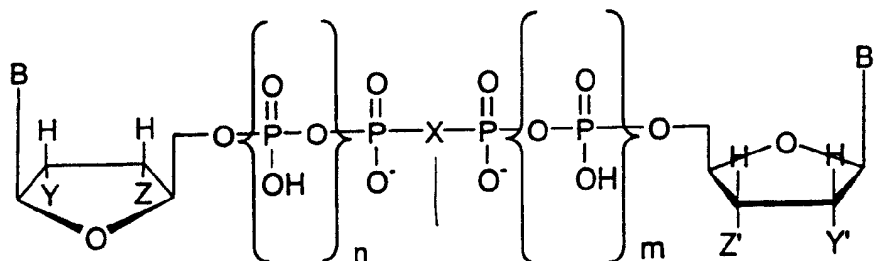
25 条件是当 Z 是 N_3 时，Y 是 H，或当 Z' 是 N_3 时，Y' 是 H；进一步的条件是表 I 化合物排除在外。

呋喃糖优选地为 β -构型。

呋喃糖最好为 β -D-构型。

式 I 优选的化合物是式 IA 化合物或药学上可接受的盐：

式 IA



5

其中：

$X = O$;

$n+m=1$ 或 2 ;

Z, Z', Y 和 $Y' = OH$;

10 B 和 B' 是尿嘧啶、胸腺嘧啶、胞嘧啶、鸟嘌呤、腺嘌呤、黄嘌呤、次黄嘌呤或如式 II 和式 III 中所定义的那样；

$X = O$;

$n+m=3$ 或 4 ;

15 Z, Z', Y 和 $Y' = OH$;

$B = \text{尿嘧啶}$;

B' 是尿嘧啶、胸腺嘧啶、胞嘧啶、鸟嘌呤、腺嘌呤、黄嘌呤、次黄嘌呤或如式 II 和式 III 中所定义的那样；或

20 $X = O$;

$n+m=1$ 或 2 ;

Z, Y 和 $Z' = OH$;

$Y' = H$;

$B = \text{尿嘧啶}$;

25 B' 是尿嘧啶、胸腺嘧啶、胞嘧啶、鸟嘌呤、腺嘌呤、黄嘌呤、次黄嘌呤或如式 II 和式 III 中所定义的那样；或

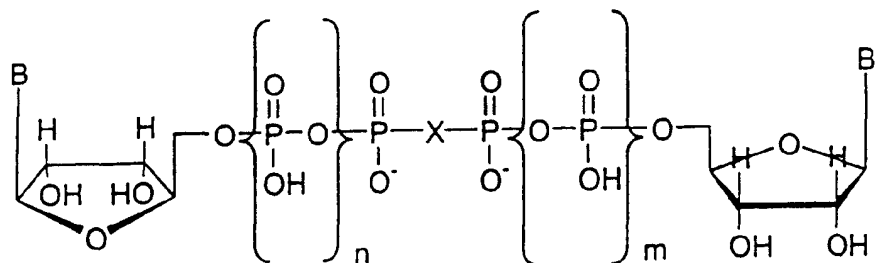
- 5 $X = O$;
 $n+m=0$, 1 或 2;
 Z 和 $Y = OH$;
 $Z' = N_3$;
 $Y' = H$;
 $B = \text{尿嘧啶}$;
 $B' = \text{胸腺嘧啶}$; 或

- 10 $X = O$;
 $n+m=0$, 1 或 2;
 Z 和 $Z' = N_3$;
 Y 和 $Y' = H$;
 B 和 B' 是胸腺嘧啶; 或

- 15 $X = CH_2$ 、 CF_2 或 NH ;
 n 和 $m=1$;
 Z 、 Z' 、 Y 和 $Y'=OH$;
 B 和 B' 是尿嘧啶、胸腺嘧啶、胞嘧啶、鸟嘌呤、腺嘌呤、黄嘌呤、次黄嘌呤
 或如式 II 和式 III 中所示的那样;

- 20 条件是表 I 化合物排除在外。
 另一组优选的式 I 化合物是式 IB 化合物或其药学上可接受的盐:

式 IB



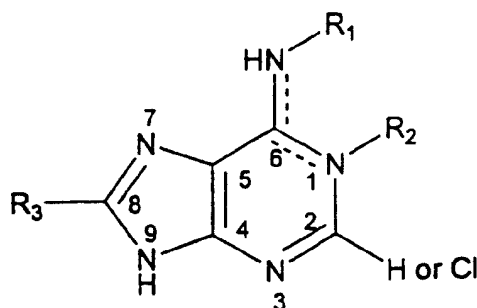
- 25 其中:
 X 是氧、亚甲基、二氟亚甲基或酰亚氨基;
 $n=0$ 或 1;

$m=0$ 或 1 ;

$n+m=0,1$ 或 2 ; 和

- B 和 B'各自独立地是如式 II 所示的嘌呤残基, 或如式 III 所示的嘧啶残基, 各自通过 9-或 1-位连接。当 B 和 B'是尿嘧啶, 在 N-1 位连接到核糖基部分时, 则 $m+n$ 可等于 3 或 4, 此时 X 为氧(参见实施例 5)。核糖基部分如图所示为 D-构型, 但也可 L-, 或 D-和 L-, D-构型是优选的。

式 II



- 其中 R_1 是氢, 如下所定义的烷基或芳基部分, 或是 ω -A(C_{1-6} 烷基)CONH(C_{1-6} 烷基)-, 其中 A 是氨基、巯基、羟基或羧基;

R_2 是 O(腺嘌呤 1-氧化物衍生物), 或没有(腺嘌呤衍生物); 或

- R_1 和 R_2 连接在一起形成 5-元稠合的咪唑环(1,N⁶-亚乙烯基腺嘌呤衍生物), 任选地在亚乙烯基部分的 4-或 5-位被如下定义的烷基、芳基或芳烷基部分所取代;

R_3 是如下所定义的烷基、芳基或芳烷基、烷氨基、芳氨基或芳烷基氨基(NHR'); 烷氧基、芳氧基或芳烷基氧基(OR'); 烷巯基、芳巯基或芳烷基巯基(SR'); 或 ω -A(C_{1-6} 烷基)CONH(C_{1-6} 烷基)B-, 其中 A 和 B 独立地是氨基、巯基、羟基或羧基; 或它们的药学上可接受的酯、酰胺或盐。

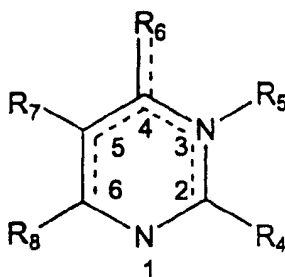
- 这样, 取代的腺嘌呤衍生物包括腺嘌呤 1-氧化物; 1, N⁶-(4-或 5-取代的亚乙烯基)腺嘌呤; 6-取代的腺嘌呤; 或 8-取代的氨基腺嘌呤, 其中 6-或 8-HNR' 基团里的 R'选自: 芳烷基(C_{1-6}), 芳基部分如下所述被任意地官能化; 烷基; 和带有下列官能团的烷基, 如: ([6-氨基己基]氨甲酰基甲基)-, 和 ω -酰基化的氨基(羟基、硫羟基和羧基)烷基(C_{2-10})和它们的 ω -酰基化的氨基(羟基、硫羟基和羧基), 衍生物, 其中酰基选自, 但不限于, 乙酰基、三氟乙酰基、苯甲酰基、取代的-苯甲酰基等, 或羧酸部分以其酯或酰胺衍生物形式存在, 如乙基酯或甲基酯或其甲基、乙基或苯甲酰胺基衍生物。 ω -氨基(羟基, 硫羟基)部分可用 C_{1-4} 烷基烷基

化。

同样，B 或 B'，或两者可为通式 III 的嘧啶，它们通过 1-位连接，或其药学上可接受的酯、酰胺或盐：

5

式 III



其中：

R₄是氢、羟基、巯基、氨基、氰基、芳烷氧基、C₁₋₆烷硫基、C₁₋₆烷氧基、C₁₋₆烷基氨基或二烷基氨基，烷基可任意地连接以形成杂环；

10 R₅是氢、酰基(如乙酰基或苯甲酰基)、C₁₋₆烷基、芳酰基、随意地如下官能团化、C₁₋₅链烷酰基、苯甲酰基或磺酸酯；

R₆是羟基、巯基、烷氧基、芳烷氧基、C₁₋₆烷硫基、氨基、C₁₋₅二取代氨基、三唑基、烷氨基或二烷基氨基，其中烷基可任意地连接以形成杂环，或连接到 N³上以形成随意取代的环；或

15 R₅和 R₆连接在一起，在亚乙烯基部分的 4-位或 5-位上任意被如下定义的烷基、芳基或芳烷基部分所取代的嘧啶环(3，N⁴-亚乙烯基胞嘧啶衍生物)的位置 3 和 4 位之间形成 5-元稠合咪唑环。

20 R₇是氢，羟基，氰基，硝基，烯基(其烯基部分任意与氧连接以形成环，所述的环在与氧相邻的碳上被烷基或芳基任意取代)取代炔基，卤素，取代烷基，全卤代甲基(如，CF₃)，C₂₋₆烷基，C₂₋₃链烯基或取代乙烯基(如，烯丙基氨基、溴乙烯基和丙烯酸乙酯或丙烯酸)，C₂₋₃炔基或取代炔基；或 R₆-R₇通过在 R₆处的 N 或 O 一起形成 5 或 6-元饱和或不饱和环，这类环可含本身含有官能团的取代基；条件是当 R₈是氨基或取代氨基时，R₇是氢；和

25 R₈是氢，氨基或取代氨基，烷氧基，芳基烷氧基，烷硫基，芳基烷硫基，甲酰氨基甲基，羧甲基，甲氧基，甲硫基，苯氧基或苯硫基。

在上述 II 和 III 的通式里，酰基有利地包括链烷酰基或芳酰基，可为直链或支链的烷基有利地含有 1-8 个碳原子，特别是 1-4 个碳原子，它们可任意地被一

个或多个合适的下述取代基所取代。芳基包括诸如芳氧基的芳基部分，优选的是被一个或多个如下所述的合适取代基所任意取代的苯基。上述链烯基和炔基有利地含 2-8 个碳原子，特别是 2-6 个碳原子，如乙烯基或乙炔基，它们可任意地被下述的一个或多个适当取代基所取代。

- 5 上述烷基、链烯基、炔基和芳基的合适取代基选自卤素、羟基、 C_{1-4} 烷氧基、 C_{1-4} 烷基、 C_{6-10} 芳基、 C_{7-12} 芳烷基、 C_{7-12} 芳基烷氧基、羧基、氰基、硝基、磺酰氨基、磺酸酯、磷酸酯、磺酸、氨基和取代氨基，其中氨基被 C_{1-4} 烷基单或双取代，当双取代时，烷基被随意地连接以形成杂环。

- 10 本发明化合物包括它们的药学上可接受的酯，如，但不限于乙酰基和苯甲酰基酯。可这样制备酯类：使所需的羟基化合物与合适的酸反应，用羰基二咪唑、二环己基碳化二亚胺或其它合适的缩合剂活化，或与酸酐或酰氯在有或没有碱性催化剂，如叔胺、季铵盐或无机碱时进行反应。

- 15 本发明化合物也包括它们非毒性药学上可接受的盐，如，但不限于碱金属盐，如钠或钾盐；碱土金属盐，如锰、镁或钙盐；或铵盐或四烷基铵盐，即 NX_4^+ (其中 X 是 C_{1-4})。药学上可接受的盐是保留了母体化合物所需的生物活性并没有不良毒性作用的盐。本发明也包括本文揭示化合物的酰化的前体药物(如酯类)。本技术领域人员会了解用来制备式 I、IA 和 IB 包含的化合物的非毒性的药学上可接受的盐和其酰化前体药物的各种合成方法。

- 20 本发明化合物是高选择性的 $P2Y_2$ 和/或 $P2Y_4$ 嘌呤受体的激动剂；这样它们可用来治疗哺乳动物，包括人体的慢性阻塞性肺病，如慢性支气管炎，PCD，囊性纤维变性以及预防由于卧床而发生的肺炎。此外，由于它们能清除剩余的粘膜分泌物并刺激纤毛颤动频率，本发明化合物也可用于治疗哺乳动物，包括人体的鼻窦炎、中耳炎和鼻泪管阻塞。另外本发明化合物治疗哺乳动物，包括人体的干眼病和视网膜脱落也是有用的。

- 25 虽然本发明化合物主要涉及治疗人体对象，但它们也可用于治疗兽医的其它哺乳动物对象，如狗和猫。

- 30 $P2Y_2$ 和其它 $P2Y$ 受体活性的肌醇磷酸盐试验显示了本发明化合物在药物上的用途。该广泛应用的试验如 E. Lazarowski 等在 Brit. J. Pharm. 116,1619-27(1995) 所述，依赖于测量肌醇磷酸盐的形成作为化合物活化通过 G-蛋白与磷脂酶 C 连接的受体的活性的量度。

通式 I、IA 或 IB 化合物可口服，局部外用给药，非胃肠道给药，通过吸入或喷雾给药，手术时给药，直肠给药或阴道给药，可使用含常规非毒性的药学上

可接受的载体、辅剂和赋形剂的剂型。本文使用的术语局部外用剂型包括膏药剂、凝胶剂、霜剂、软膏剂或滴鼻剂、滴耳剂或滴眼剂。本文术语非胃肠道给药包括皮下注射、静脉注射、肌肉注射、胸骨内注射或输液技术。另外，本文也提供了包括通式 I、IA 或 IB 的化合物和药学上可接受载体的药剂。通式 I、IA 或 IB 的一种或多种化合物可与一种或多种非毒性的药学上可接受的载体或稀释剂或辅剂，和必需的其它活性组分共同存在。一种载体为糖类，其中化合物可通过玻璃化密切地掺入基质，或只是简单地与载体(如，乳糖、蔗糖、海藻糖、甘露醇)或其它肺部或气道给药可接受的赋形剂混合。

通式 I、IA 或 IB 的一个或多个化合物可分开给药，或一起给药，或与诸如 DNase 或乙酰半胱氨酸的粘液溶解药分开或一起给药。

含通式 I、IA 或 IB 化合物的药物组合物可为适合口服使用的剂型，如片剂、锭剂、水性或油性悬浮液、可分散粉末或颗粒剂、乳剂、硬胶囊或软胶囊、或糖浆剂或酞剂。根据制备药物组合物的技术领域的任何公知方法来制备口服组合物，这类组合物可含有一种或多种选自甜味剂、调味剂、着色剂和防腐剂的物质，以得到优质可口的药剂。片剂含有活性组分及与之混合的非毒性的、药学上可接受的、适合用于制备片剂的赋形剂。这些赋形剂可为，如，惰性稀释剂，如碳酸钙、碳酸钠、乳糖、磷酸钙或磷酸钠；成粒剂和崩解剂，如，玉米淀粉或藻酸；粘合剂，如淀粉、明胶或阿拉伯胶；和润滑剂，如硬脂酸镁、硬脂酸或滑石粉。片剂可不包衣，或用已知技术进行包衣以延缓其在胃肠道里的崩解和吸收，从而在较长的时间里提供缓释作用。例如，可使用诸如甘油基单硬脂酸酯或甘油二硬脂酸酯的时间延缓材料。

口服制剂也可作为硬明胶胶囊，其中活性组分与惰性固体稀释剂，例如碳酸钙、磷酸钙或高岭土混合，或作为软明胶胶囊，其中活性组分与水或油介质，如花生油、液体石蜡或橄榄油混合。

水性悬浮液含有活性材料和与之混合的适合制备水性悬浮液的赋形剂。这类赋形剂是悬浮剂，如：羧甲基纤维素钠、甲基纤维素和藻酸钠。分散剂或湿润剂可为天然磷脂或丙炔化氧与脂肪酸的缩合产物，或环氧乙烷与长链脂肪醇的缩合产物，或环氧乙烷与衍生自脂肪酸和己糖醇的部分酯的缩合产物，或环氧乙烷与衍生自脂肪酸和己糖醇酐的部分酯的缩合产物。本技术领域人员知道许多特定的本说明书提及的赋形剂和湿润剂。水性悬浮液也可含有一种或多种防腐剂，如对-羟基苯甲酸乙酯或正丙酯，一种或多种着色剂，一种或多种调味剂和一种或多种甜味剂，如蔗糖或糖精。

适合通过加入水制备水性悬浮液的可分散粉末和颗粒剂包括活性组分和与之混合的分散剂或湿润剂，悬浮剂和一种或多种防腐剂。合适的分散剂或湿润剂和悬浮剂已在上面进行了例举。也可存在另外的赋形剂，如，甜味剂、调味剂和着色剂。

5 通式 I、IA 或 IB 可用无菌介质经非胃肠道给药。根据所用的赋形剂和浓度，药物可悬浮于或溶于赋形剂。有利的是，诸如局部麻醉药、防腐剂和缓冲剂的辅料可溶于赋形剂。无菌可注射的制剂可以是在非毒性非胃肠道可接受的稀释剂或溶剂里的无菌可注射的溶液或悬浮液。在这些可接受的赋形剂和溶剂中可被使用的是灭菌水、盐水溶液或 Ringer 溶液。

10 通式 I、IA 或 IB 化合物也可以栓剂形式对耳、直肠或阴道给药。可通过使药物与合适的非刺激性赋形剂混合来制备，所述的赋形剂在常温下是固体，但在体温下是液体，并因此熔融而释放药物。这类材料是可可脂和聚乙二醇。

通式 I、IA 或 IB 化合物溶液可通过手术时置入进行给药。

15 约 10^{-7} M 到约 10^{-1} M，优选的是 10^{-5} 到 10^{-1} M 级别的剂量水平用来治疗上述疾病。可与载体材料混合得到单位制剂的活性组分用量根据治疗对象和特定的给药方式而定。但是，应当明白，针对特定病人的特定剂量水平应当根据各种因素，包括使用的特定化合物的活性，年龄，体重，一般健康状况，性别，饮食、给药时间，给药途径和分泌速率，合并给药情况和进行治疗的特定疾病的严重程度而定。

20 可这样制备本发明包含的化合物：用缩合剂，如，但不限于，羰基二咪唑或二环己基碳化二亚胺使核苷单-、双-或三磷酸盐活化，并与第二分子的相同或不同的单-、双-或三磷酸盐反应以形成所需的二核苷酸多磷酸盐；或如上活化的核苷磷酸盐接着与非-核苷单-、双-或多磷酸盐部分，如，但不限于单磷酸盐或焦磷酸盐阴离子进行缩合反应，得到所需的二核苷酸多磷酸盐，该情况下的未分离的
25 中间体为单核苷酸多磷酸盐；或如上所活化的单-、双-或多磷酸盐部分，或为酰卤或有亲核取代反应性的其它衍生物的形式，可接着与核苷磷酸盐或多磷酸盐进行缩合，得到所需的二核苷酸多磷酸盐；或者可通过在嘌呤、嘧啶或糖环上的一个部分或多个部分进行取代或衍生化来修饰预先形成的二核苷酸多磷酸盐形成所需的二核苷酸多磷酸盐。用作起始材料的核苷磷酸盐可是市售的，或可通过本
30 技术领域公知的方法从相应的核苷制得。同样，若核苷购买不到，它们可通过对其它易得的核苷进行修饰来制备，或通过本技术领域周知的方法从杂环和糖前体合成得到。

下列注册商品名出现在下列实施例中:

DEAE 纤维素TM

PEI 柱TM (Aldrich)

AG-MP50 强阳离子交换TM (BioRad)

Dowex50(H⁺)树脂TM

DEAE SephadexTM

PRPX-100 柱TM (Hamilton)

Sephadex DEAE A25 柱TM

本技术领域人员可以知道,如下列实施例所示,可以改变起始物质并使用另外的步骤以产生本发明化合物。在一些情况下可能必须保护特定的反应性官能团以达到上述转变。总之,对这类保护基团的需要及连接和除去这类基团的条件对有机合成技术领域人员是显而易见的。

- 5 本发明通过下列实施例作进一步阐述,下列实施例并非用来限定本发明的范围或精神。

实施例 1

制备 P^1 , P^4 -二(尿苷 5'-) P^2 , P^3 -亚甲基四磷酸盐

- 10 加入三丁胺(24 微升, 0.1 毫摩尔)使亚甲基二磷酸(Aldrich,0.0088 克, 0.05 毫摩尔)溶于无水 DMF(0.5ml)。用无水 DMF(2 × 1 毫升)蒸发溶液至干两次,干燥的残留物溶于无水 DMF(0.5 毫升),加入类似干燥的尿苷 5'-单磷酰吗啉(monophosphomorpholidate)4-吗啉-N, N'-二环己基甲脒盐(Sigma,0.137 克, 0.2 毫摩尔)在无水 DMF(0.5 毫升)中的溶液。使反应混合物在 80-90 °C 下加热 7 小时;
- 15 然后通过减压蒸发除去溶剂。残留物溶于水(2 毫升),加于碳酸氢盐形式的 DEAE 纤维素柱(2.5 × 50cm 床体积)上。柱用水洗脱,然后用碳酸氢铵(0-0.33M, 900 毫升)梯度洗脱。然后监测洗脱进程,测定洗脱液在 254 纳米处的吸收;收集 0.23 和 0.26M 之间的洗脱组分,蒸发至干,通过用去离子水重复蒸发来脱盐。每 50 微升一份的残留物溶于水(300 微升)并通过半制备 HPLC 纯化(Alltech PEI 5 μ ,10
- 20 × 250mm, 梯度 0-0.66M 碳酸氢铵, 5.0ml/分钟, 20 分钟);每次洗脱在 8.7-9.0 分钟内的流出峰合并后,冻干得到标题化合物(0.007 毫摩尔, 14 % 得率,通过将其在 $\lambda_{\text{最大}}$ 263 处的吸收度与尿苷单磷酸盐的标准溶液比较进行定量)。在 Alltech PEI 柱上的色谱纯度为 96.5%, 梯度为 0-0.66M 的碳酸氢铵, 1.0ml/分钟, 20 分钟保留时间 13.03 分钟。 ^1H NMR 在 D_2O 中(δ ppm, 内标为四甲基甲硅烷):
- 25 2.39(t,J=21.5Hz,2H);4.12(m,6H);4.243(m,4H);
- 5.841(d,J=7.9Hz,2H);5.847(d,J=4.5Hz,2H);7.77(d,J=8.1Hz,2H)。 ^{31}P NMR 在 D_2O 中(δ ppm, 内标 H_3PO_4):-10.2 到 -10.7(复杂的 m,2P);7.8 到 8.4(复杂的 m,2P)。

实施例 2

- 30 P^1 , P^4 -二(尿苷-5'- P^2 , P^3 -二氟亚甲基四磷酸盐)

使二氟亚甲基二磷酸的三丁基铵盐(如 C. McKenna 等, J. Org. Chem. 46,4574-76(1981)和 D.Burton 等, J. Fluorine Chem. 15,263-66(1980 所述)(0.014

克, 0.025 毫摩尔)。如亚甲基磷酸所述转化生成, 溶于尿苷 5'-单磷酸吗啉 4-吗啉-N,N'-二环己基甲脒盐(Sigma, 0.034 克, 0.05 毫摩尔)在无水二甲亚砜(0.7 毫升)里的溶液, 并在 50 °C 下加热 9 天。冷却的反应混合物用水稀释并加于碳酸氢盐形式的 DEAE 纤维素柱(2.5 × 50cm 床体积)上。柱用水洗脱, 然后用碳酸氢铵(0-0.33M, 总体积 900 毫升)梯度洗脱。然后监测流出进程; 测定洗脱液在 254 纳米处的吸收; 收集 0.29 和 0.30M 之间的洗脱组分, 蒸发至干, 通过用去离子水重复蒸发来脱盐, 以得到标题化合物(0.0011 毫摩尔, 4.4%得率, 通过将其在 $\lambda_{\text{最大}}$ 263 处的吸收度与尿苷单磷酸盐的标准溶液比较进行定量)。在 Alltech PEI 柱上的色谱纯度为 88.5%(梯度为 0-0.66M 碳酸氢铵, 1.0ml/分钟, 20 分钟), 保留时间 12.03 分钟。¹H NMR 在 D₂O 中(δ ppm, 内标四甲基甲硅烷): 4.05-4.085(m, 6H); 4.18-4.20(m, 4H); 5.80(d, J=8.0Hz, 2H); 5.81(d, J=4.5Hz, 2H); 7.77(d, J=7.9Hz, 2H)。³¹P NMR 在 D₂O 中(δ ppm 内标 H₃PO₄): -10.63(dd, J=18.3, 11.3Hz, 2P); -5.83(tdd, J=75, 18.3, 11.3Hz, 2P)。¹⁹F NMR 在 D₂O 中: 73.406(t, J=75.5Hz)。

15

实施例 3

制备 P¹, P⁴-二(尿苷 5'-P², P³-酰亚氨基四磷酸盐)

将酰亚氨基二磷酸四钠(Sigma, 0.05 毫摩尔)溶于水(0.5ml)并加于三丁胺形式的 Biorad AG-MP50 强阳离子交换树脂(2 毫升床体积, 3meq)柱上。柱用水(~ 10 毫升)洗脱, 洗脱液通过与无水 DMF 蒸发冻干。在室温下用酰亚氨基 ad fg 磷酸四丁基 qpv (0.05 毫摩尔)在无水 DMF(1.0 毫升)中的溶液处理尿苷 5'-单磷酸吗啉 4-吗啉-N,N'-二环己基甲脒盐(Sigma, 0.068 克, 0.1 毫摩尔)达 20 天, 进行基本如上所述的分离得到标题化合物的铵盐(1.6%)。 ¹H NMR 在 D₂O 中(δ ppm, 内标四甲基甲硅烷): 4.07-4.09(m, 6H); 4.17-4.22(m, 4H); 5.79(d, J=8.1Hz, 2H); 5.80(d, J=4.8Hz, 2H); 7.78(d, J=8.2Hz, 2H)。 ³¹P NMR 在 D₂O 中(δ ppm, 内标 H₃PO₄): -10.82(m, 4p); 类似于在相同的条件下得到的 P¹, P⁴-二(腺苷 5'-四磷酸盐)(Sigma)的 P-P 耦合类型。

实施例 4

30 制备 P¹, P⁴-二(4-硫代尿苷 5'-四磷酸盐)

将 4-硫代尿苷单磷酸钠(Sigma, 25 毫克, 0.057 毫摩尔)溶于水(0.5 毫升), 加到三丁胺形式的 Biorad AG-MP50 强阳离子交换树脂柱上(2 毫升床体积, 3meq), 柱

用水洗脱(~ 10 毫升), 冻干洗脱液。将三丁铵盐溶于无水 DMF(0.5 毫升), 加入
羰基二咪唑(4.86 毫克, 0.03 毫摩尔)。在氮气下于室温使反应混合物放置 12 天。
在真空、室温下使反应混合物蒸发至干, 残留物溶于水(2 毫升), 加于碳酸氢盐
形式的 DEAE 纤维素柱(2.5 × 50cm 床体积)上。柱用水(~ 250 毫升)洗脱, 然后
5 用碳酸氢铵(0-0.33M, 总体积 900 毫升)梯度洗脱, 然后用 400 毫升以上的 0.33
到 0.5M 碳酸氢铵梯度洗脱。跟踪流出进程, 可监测洗脱液在 280 纳米处的吸收;
收集 0.336 和 0.339M 之间的洗脱组分, 蒸发至干, 通过用去离子水重复蒸发来脱
盐得到标题化合物(0.0045 毫摩尔, 18 % 得率, 通过将其在 $\lambda_{\text{最大}}$ 332nm 处的吸收
与 4-硫代尿苷二磷酸盐的标准溶液比较进行定量)。 ^1H NMR 在 D_2O 中(δ ppm,
10 内标四甲基甲硅烷): 4.09-4.11(m,6H); 4.18-4.24(m,4H); 5.76(d,J=4.5Hz,2H);
6.47(d,J=7.7Hz,2H); 7.67(d,J=8.2Hz,2H)。 ^{31}P NMR 在 D_2O 中(δ ppm, 内标
 H_3PO_4): -22.57 到-22.73(m,2p); -10.76 到-10.91(m,2P);类似于在相同的条件下得
到的 P^1 , P^4 -二(腺苷 5'-四磷酸盐)(Sigma)的 P-P 偶合类型。

15 实施例 5

制备 P^1 , P^5 -二(尿苷 5'-五磷酸盐)

向 100 毫升圆底烧瓶中加入尿苷 5'-二磷酸三丁基铵盐(1.81 毫摩尔, 10 毫升)
和羰基二咪唑(469 毫克, 2.90 毫摩尔)的 DMF 溶液, 使溶液在 N_2 下搅拌 2 小时。
向内加入尿苷 5'-三磷酸三丁基铵盐(1.81 毫摩尔, 10 毫升)的 DMF 溶液, 让溶液
20 在 60 °C 下搅拌 24 小时, 真空蒸发溶液, 通过柱色谱纯化两次(DEAE Sephadex;
 H_2O >0.5M NH_4HCO_3 梯度洗脱)。在 35 °C 下真空浓缩纯净流, 加入 H_2O , 再蒸发
共 0 次得到白色固体(200 毫克)。 ^1H NMR 在 D_2O 中(δ ppm, 内标四甲基硅烷):
4.0(m,br,6H),4.1(m,4H), 5.7(m,4H),7.7(d,J=8.1Hz,2H); ^{31}P NMR 在 D_2O 中(δ ppm,
内标 H_3PO_4): -22.3(m,3P), -10.6(d,J=42.9Hz,2P)。

25

实施例 6

制备 P^1 , P^4 -二(3, N^4 -亚乙烯基胞苷 5'-)四磷酸盐

向 P^1 , P^4 -二(胞苷 5'-)四磷酸盐(参照物 3, 表 I; 铵盐, 6 微摩尔, 在 0.66
毫升水中)加入碳酸氢钠(0.005 克, 60 微摩尔), 冻干溶液以除去氨。残留物溶于
30 水(0.2 毫升)和氯乙醛溶液(50 % 在水中, 0.30 毫升)的混合物, 使反应混合物在室
温下放置 6 天。冻干反应混合物, 胶状残留物在氧化氙(0.7 毫升)和二氯甲烷(1.5
毫升)之间分配。水溶液的 ^1H NMR 谱表明乙烯基化进行了约 50 %, 而 ^{31}P 谱表

明四磷酸盐链是完整的。将另外的氯乙醛溶液(0.25ml)加到 NMR 溶液里, 让混合物再放置 10 天。冻干溶液, 再用氧化氙冻干残留物以除去可交换的质子。如前所述, 残留物在氧化氙和二氯甲烷之间分配, 由 NMR 谱证明已完全转化为乙烯基衍生物。将氧化氙溶液加到碳酸氢盐形式的 DEAE 纤维素柱(2.5 × 50cm 床体积)上。柱用水(~ 250 毫升)洗脱, 然后用 1000 毫升以上的 0 到 0.5M 的碳酸氢铵梯度洗脱。跟踪流出进程, 监测洗脱液在 280 纳米处的吸收; 收集 0.29 和 0.32M 之间的洗脱流分, 蒸发至干, 通过用去离子水重复蒸发来脱盐得到标题化合物(1.584 微摩尔, 26.4 % 得率, 通过将其在 $\lambda_{\text{最大}}$ 273 处的吸收度与 3,N⁴-亚乙烯基胞苷 5'-单磷酸盐的标准溶液比较进行定量)。¹H NMR 在 D₂O 中(δ ppm, 内标四甲基甲硅烷): 4.123(m,6H); 4.258(m,4H); 5.986(s,2H); 6.92(d,J=8.1Hz,2H); 7.461(s,2H); 7.772(s,2H); 8.00(d,J=7.6Hz, 2H)。³¹P NMR 在 D₂O 中(δ ppm, 内标 H₃PO₄): -22.474(m,2P); -10.650(m,2P); 极为类似于在相同的条件下得到的 P¹, P⁴-二(腺苷 5'-四磷酸盐)(Sigma)的 P-P 偶合类型。

15 实施例 6(a)

P¹, P⁴-二(咪唑并[1,2-c]嘧啶-5(6H)-酮-2-(3-硝基)-苯基-6- β -D-核呋喃糖核苷 5'-)四磷酸盐, 四铵盐

将 P¹, P⁴-二(胞苷 5'-)四磷酸四铵盐(100 毫克, 0.117 毫摩尔)(参照物 3, 表 I)溶于水(10 毫升), 经 Dowex 50H⁺树脂柱(3 克, 用甲醇和水预洗)冲洗, 并用 50 毫升水洗脱。加入三丁胺(1 毫升)和二甲基甲酰胺(DMF)(5 毫升), 蒸发溶液得到油。将油溶于无水 DMF(10 毫升), 蒸发周期重复两次。最终的油溶于无水 DMF(10 毫升)和三丁胺(1.5 毫升)中, 再加入 α -溴-3'-硝基-乙酰苯(86 毫克, 0.351 毫摩尔)。在氮气下使反应混合物在 70 °C 下加热 20 小时, 此时再加入 α -溴-3'-硝基-乙酰苯(50 毫克, 0.205 毫摩尔)。再加热 18 小时后, 真空蒸去溶剂, 残留物经快速色谱纯化(DEAE Sephadex, 0>1.0M NH₄HCO₃)得到黄色固体(13.5mg): ¹H NMR(D₂O, TMS) δ 4.0-4.2(m,br,10H), 6.0(d,J=5.7Hz,2H), 6.4(d,J=8.1Hz,2H), 7.35(t,J=7.8Hz, 2H), 7.5(d,J=8.1Hz, 2H), 7.80(m,3H), 8.03(s,2H); ³¹P NMR (D₂O, H₃PO₄ std) δ -10.67(m,2P), -22.26(m,2P)。

30 实施例 7

P¹-(胸苷-5'-)P⁴-(尿苷-5'-)四磷酸盐(UP₄T)

使尿苷 5'-三磷酸(UTP)三钠盐(PtoBioSint, 5.86 克, 0.01 摩尔)在水(5 毫升)里

的溶液经过三丁胺形式的 BioRad AG-MP 50 强阳离子交换树脂柱(50 毫升床体积), 用蒸馏水(约 300 毫升)洗脱。向该溶液中加入三丁胺(5 毫升), 振摇悬浮液, 直至水溶部分的 pH 升到 8。分离各层, 将水性溶液蒸发到较少的体积, 然后冻干过夜。将残留物溶于无水二甲基甲酰胺(DMF, 20 毫升), 在 0.1mmHg 下蒸发溶剂。用无水丙酮溶解干燥的三丁胺盐, 使成 100 毫升, 得到储备溶液(0.1M UTP)。将二环己基碳化二亚胺(DCC)(Baker, 0.1 克, 0.5 毫摩尔)加到前述的 UTP 溶液的一份中(1.0ml, 0.1 毫摩尔), 使溶液在室温下搅拌 30 分钟。通过过滤除去沉淀下来的二环己基脲, 用醚(10 毫升)萃取反应混合物, 将残留物溶于无水氧化的二甲亚砜(DMSO-d₆, 0.3 毫升)。将这一尿苷 5'-环偏磷酸盐(UcTP)溶液加到胸苷 5'-单磷酸盐(TMP, 0.064 克, 0.2 毫摩尔)和三丁胺(0.2ml)在 DMSO-d₆(0.3 毫升)中的溶液, 在 50 °C 下放置 24 小时。高真空下使反应混合物蒸发过夜, 残留物溶于水(1.0 毫升), 过滤以除去残留的二环己基脲, 通过半制备性离子交换色谱分离(Hamilton PRP X-100 柱, 用等浓度的 1.0M 碳酸氢铵洗脱, 5 毫升/分钟, 30 分钟, 多次注射 100 微升)。二核苷四磷酸盐在 21 到 23 分钟之间洗脱出来; 通过将其在 $\lambda_{\text{最大}}$ 263nm 处的紫外吸收与 UMP 和 TMP 标准品比较对产物定量(11.1%得率, 以 UTP 为基)。¹H NMR (D₂O, 内标四甲基甲硅烷, δ ppm): 1.78(s, 3H); 2.19-2.22(m, 2H); 4.04-4.13(m, 6H), 4.22-4.27(m, 2H); 4.52(m, 被 D₂O 部分掩盖); 4.74(m, 被 D₂O 部分掩盖); 5.83(d, J=8.1Hz, 1H); 5.84(d, J=5.0Hz, 1H); 6.195(t, J=6.9Hz, 1H); 7.61(s, 1H); 7.82(d, J=8.1Hz, 1H)。 ³¹P NMR(D₂O, 内标 H₃PO₄, δ ppm) -22.71(m, 2P); -10.97(m, 2P)。

实施例 8

P¹-(肌苷 5'-)P⁴-(尿苷 5'-)四磷酸盐(UP₄I)

除了在蒸去溶剂前将反应混合物在 25 °C 下放置 5 周外, 其它基本按照如上所述尿苷 5'-环三偏磷酸盐(UcTP)和肌苷 5'-单磷酸盐的缩合。将残留物溶于水(1.0 毫升), 过滤, 通过在 Hamilton PRP X-100 柱的离子交换色谱, 用等浓度的 1.0M 碳酸氢铵洗脱, 5 毫升/分钟, 持续 30 分钟, 以每分 150 微升的一系列等分进样。蒸发 6-9 分钟之间洗脱的流分, 冻干过夜以除去缓冲剂。通过将其在 260nm 处的紫外吸收与 UMP 和 TMP 品比较对二核苷四磷酸盐定量(8%得率, HPLC(AUC)测得 96 % 纯度)。 ¹H NMR (D₂O, 内标四甲基甲硅烷, δ ppm): 4.13(m, 6H); 4.24-4.27(m, 2H); 4.47(m, 被 D₂O 部分掩盖); 5.78(d, J=7.9Hz, 1H); 5.83(d, J=4.7Hz, 1H); 6.003(d, J=5.7Hz, 1H); 7.79(d, J=7.9Hz, 1H); 8.10(s, 1H); 8.37(s, 1H)。 ³¹P NMR(D₂O,

内标 H_3PO_4 , δ ppm) -22.43(m,2P); -10.72(m,2P).

实施例 9

P^1 -(4-硫代尿苷 5'-)- P^4 -(尿苷 5'-)四磷酸盐($\text{UP}_4(4\text{-SH-U})$)

- 5 将 4-硫代尿苷单磷酸钠(25 毫克, 0.057 毫摩尔)溶于水(0.5 毫升), 加在三丁胺形式的 Biorad AG-MP50 强阳离子交换树脂(2 毫升床体积, 3 毫当量)柱上, 用水(~ 10 毫升)洗脱柱, 冻干洗脱液。将所得的 4-硫代-UMP 的三丁胺盐与尿苷 5'-环三偏磷酸盐(0.1 毫摩尔)缩合, 基本上如实施例 7 所述, 用二环己基碳化二亚胺(206 毫克)活化 UTP 来制备所述的尿苷 5'-环三偏磷酸盐(72 小时反应时间)。从反
- 10 应混合物蒸去 DMSO 后, 将残留物溶于水(~ 1 毫升), 在 Hamilton PRP X-100 柱上通过离子交换色谱, 用等浓度的 1.0M 碳酸氢铵洗脱, 5 毫升/分钟, 每份分离 200 μl 。在 328 纳米处监测。冻干在 15-25 分钟流出的流分, 得到标题化合物(9.7%得率, HPLC(AUC)测得为 99.7%纯度), 通过将其在 332nm 处的紫外吸收与 4-硫代-UMP 在相同波长下的吸收比较对其定量。 ^1H NMR (D_2O , 内标四甲基甲硅
- 15 烷, δ ppm): 4.04(m, 被 HOD 部分掩盖重叠);4.14(m, 被 HOD 部分重叠);5.72(m,3H);6.42(d,J=7.4Hz);7.55(d,J=7.6Hz);7.70(d,J=8.1Hz)。 ^{31}P NMR(D_2O , 内标 H_3PO_4 , δ ppm): -20.88(m,2P); -9.27(m,2P)。

- 除了用己烷代替醚从反应混合物里萃取过量 DCC 外, 实施例 10-12 基本按照实施例 7 所述从尿苷 5'-环三偏磷酸盐(0.1 毫摩尔)和相关的核苷 5'-单磷酸盐(0.2
- 20 毫摩尔)制备。

实施例 10

- P^1 -(胞嘧啶 β -D-阿拉伯呋喃糖苷 5'-)- P^4 -(尿苷 5'-)四磷酸盐, (UP_4araC)(20 毫克); ^1H NMR(D_2O), δ 4.30-3.95(m,10H), 5.99(d,J=6.7Hz,1H), 6.08(d,J=5.2Hz,1H),
- 25 7.82-7.77(m,2H); ^{31}P NMR(D_2O) δ -10.79(m,2P), -22.52(m,2P)。

实施例 11

- P^1 -(尿苷 5'-)- P^4 -(黄苷 5'-)四磷酸盐(UP_4X)(27.7 毫克); ^1H NMR (D_2O), δ 4.50-4.40(m,10H), 5.80-5.70(m,3H), 7.70(d,J=8.0Hz, 1H), 7.88(s,1H); ^{31}P
- 30 NMR(D_2O) δ -10.73(m,2P), -22.41(m,2P)。

实施例 12

P^1 -(2'-脱氧尿苷 5'-)- P^4 -(尿苷 5'-)-四磷酸盐(UP_4dU)(40.6 毫克); 1H NMR (D_2O), δ 2.20-2.15(m,2H), 4.45-3.95(m,9H), 5.80-5.74(m,3H), 6.12(t,J=6.7Hz,1H), 7.80-7.74(m,2H); ^{31}P NMR(D_2O) δ 2.9(m,2P), -8.9(m,2P).

5

实施例 13

P^1 -(3'-叠氮基-3'-脱氧胸苷 5'-)- P^4 -(尿苷 5'-)-四磷酸盐($UP_4(AZT)$)和

实施例 14, P^1, P^4 -二(3'-叠氮基-3'-脱氧胸苷 5'-)-四磷酸盐, $(AZT)_2P_4$

将 3'-叠氮基-3'-脱氧胸苷 5'-单磷酸($AZTMP$)钠盐(50 毫克, 0.135 毫摩尔)

10 溶于水(1 毫升), 加在三丁胺形式的 Biorad AG-MP50 强阳离子交换树脂柱上. 柱用水(~ 10 毫升)洗脱, 冻干洗脱液. 所得的三丁胺盐与尿苷 5'-环三偏磷酸盐(0.1 毫摩尔)缩合, 基本如实施例 7 所述通过用二环己基碳化二亚胺(206 毫克)活化 UTP 可制备所述的尿苷 5'-环三偏磷酸盐. 蒸发反应混合物后的残留物溶于水(1.0 毫升), 通过 0.45μ 的注射过滤器以除去少量固体, 滤液经 Hamilton PRP X-100 柱的
15 制备性 HPLC, 用 1.0M 碳酸氢铵(75 %)和甲醇(25 %)(4 毫升/分钟)的等浓度混合液洗脱. 冻干在 5-8 分钟之间洗脱的流分以得到 $UP_4(AZT)$ (7.9%), 通过将其在 264 纳米处的紫外吸收与 UMP 和 TMP 在相同波长处的吸收比较进行定量. 1H NMR (D_2O , 内标四甲基甲硅烷, δ ppm): 1.78(s,3H); 2.30-2.34(m,2H); 4.07-4.14(m,6H); 4.22-4.29(m,2H); 4.52(m,1H); 5.82(d,J=4.4Hz,1H); 5.84(d, J=8.1Hz,1H);
20 6.12(t,J=7Hz, 1H); 7.62(s,1H); 7.81(d, J=8.1Hz,1H). ^{31}P NMR(D_2O , δ ppm,内标 H_3PO_4) -22.51(m,2P), -11.06(m,1P); -10.81(m,1P).

收集和冻干同一反应混合物在 25-40 分钟之间洗脱出的流组分, 得到 P^1, P^4 -二(3'-叠氮基-3'-脱氧胸苷 5'-)-四磷酸盐(3 %),通过将其在 266 纳米处的紫外吸收与 TMP 在相同波长处的吸收比较进行定量. 1H NMR(D_2O , 内标四甲基甲硅烷,
25 δ ppm) : 1.80(s,6H); 2.31-2.35(m,4H); 4.09-4.11(m,6H); 4.46-4.47(m,2H); 6.12(t,J=7Hz,2H); 7.63(s,2H). ^{31}P NMR(D_2O , δ ppm, 内标 H_3PO_4) -22.47(m,2P), -11.35(m,2P).

实施例 14

30 P^1, P^6 -二(尿苷-5'-)-六磷酸盐(U_2P_6)

在相似的条件使尿苷环三偏磷酸盐与尿苷 5'-三磷酸盐反应形成二核苷六磷酸盐(6.97%). 1H NMR(D_2O , 内标四甲基甲硅烷, δ ppm): 4.06-4.19(m,6H);

4.21-4.26(m,4H); 5.78(d,J=8.2Hz,2H); 5.81(d,J=5.4Hz,2H); 7.78(d,J=8.1Hz,1H). ^{31}P NMR(D_2O , δ ppm, 内标 H_3PO_4) -22.41(m,4P); -10.89(m,2P).

实施例 15 和 16

- 5 2'(3')-苯甲酰基- P^1, P^4 -二(尿苷 5'-)四磷酸盐(实施例 15)和 P^1, P^4 -二(2'(3')-苯甲酰基尿苷 5'-)四磷酸盐(实施例 16)

10 在无水 DMF(1 毫升)里合并苯甲酸(61.7 毫克, 0.505 毫摩尔)和 1,1-羰基二咪唑(81.8 毫克, 0.505 毫摩尔), 在室温下搅拌 1 小时。加入在无水 DMF(2 毫升)里的 P^1, P^4 -二(尿苷 5'-)四磷酸盐(97 毫克, 0.102 毫摩尔), 使混合物在室温下搅拌 4 小时。将温度升高到 35 $^{\circ}\text{C}$, 继续搅拌 6 天。将反应混合物蒸发至干, 溶于水, 加到 Sephadex DEAE A25 柱(2.5 $\times$ 20 厘米), 用碳酸氢铵(0-0.3M, 400 毫升总体积)梯度洗脱, 然后用等浓度的碳酸氢铵(0.5M, 500 毫升)洗脱。收集两个流分, 蒸发至干, 然后重复用水共同蒸发以除去铵盐。较早洗脱出的物质被鉴定为单苯甲酰基酯: ^1H NMR (D_2O) δ : 4.0-4.23(m,9H), 5.35-5.45(m,1H), 5.65-5.85(m,3H), 5.98-6.02(m,1H), 7.32-7.95(m,7H); ^{31}P NMR (D_2O) δ : -10.70(m,2P), -22.28(m,2P); 较晚洗脱的物质被鉴定为二苯甲酰基酯: ^1H NMR (D_2O) δ : 4.05-4.40(m,8H), 5.30-6.05(m,6H), 7.2-7.95(m,12H); ^{31}P NMR(D_2O) δ -10.70(m,2P), -22.45(m,2P)。

- 20 实施例 17, 18, 19 和 20

P^1 -(2'-脱氧鸟苷 5'-) P^4 -(尿苷 5'-)四磷酸盐(UP_4dG)(实施例 17)

P^1 -(2'-脱氧腺苷 5'-) P^4 -(尿苷 5'-)四磷酸盐(UP_4dA)(实施例 18)

P^1 -(2'-脱氧肌苷 5'-) P^4 -(尿苷 5'-)四磷酸盐(UP_4dI)(实施例 19)

P^1 -(2'-脱氧胞苷 5'-) P^4 -(尿苷 5'-)四磷酸盐(UP_4dC)(实施例 20)

- 25 使在水(18 毫升)中的尿苷 5'-三磷酸盐(5.0 克)通过 Dowex 50 H^+ 柱, 将三丁胺(3.0g)加到洗脱液里。浓缩混合物得到油, 加无水 DMF 蒸发干燥, 再溶于无水 DMF(18 毫升)。加入二环己基碳化二亚胺(DCC, 3.5 克), 使溶液在室温下搅拌 30 分钟, 通过过滤除去沉淀。滤液中加入己烷(70 毫升), 分离下层, 再用己烷(70 毫升)洗涤以彻底除去 DCC。该尿苷 5'-环偏亚磷酸盐(UcTP)溶液用于下列实验:

30

实施例 17

P^1 -(2'-脱氧鸟苷 5'-)- P^4 -(尿苷 5'-)四磷酸盐(UP_4dG)

将 2'-脱氧鸟苷 5'-单磷酸盐(d-GMP, Sigma, 500 毫克)溶于 DMF(4.5ml), 加入三丁胺(1.0ml), 真空浓缩溶液至油状。加入尿苷 5'-环偏磷酸盐(UcTP, 如上述)溶液的三分之一, 使溶液在 40 °C 下加热 24 小时。溶液蒸发到油状, 溶于水(10 毫升), 加到以 0.25M 碳酸氢铵预平衡的碳酸氢盐形式的 Sephadex DEAE(350ml, 4.5 × 22cm)柱上。柱依次用 0.25, 0.30, 0.35, 0.40 和 0.50M 碳酸铵盐洗脱。洗脱液用 HPLC 监测(SynchroPak AX-300, 75% 0.5MKH₂PO₄, 25%MeCN 1.0ml/分钟, UV254nm), 浓缩含 UP₄dG 的流分得固体, 然后与水共蒸发 6-7 次, 得到二核苷酸铵盐的橙黄色固体(140 毫克, 用 HPLC(AUC)估计纯度为 94 %).

10 实施例 18

P¹-(2'-脱氧腺苷 5'-)-P⁴-(尿苷 5'-)-四磷酸盐(UP₄dA)

基本如上所述, 使 2'-脱氧腺苷 5'-单磷酸盐(d-AMP, Sigma, 500mg)与尿苷 5'-环偏磷酸盐反应, 得到 UP₄dA 的白色固体铵盐(140 毫克, 如上的 HPLC 纯度, 99 %).

15

实施例 19

P¹-(2'-脱氧肌苷 5'-)-P⁴-(尿苷 5'-)-四磷酸盐(UP₄dI)

如以上对 UTP 所述用 Dowex 50(H⁺)树脂将 2'-脱氧肌苷 5'-单磷酸盐(d-IMP, Sigma, 钠盐 1.0 克)转化为其游离酸形式。用三丁胺(2.0m.)将洗脱液中和, 将混合物真空浓缩到油状。所得的三丁胺盐通过与 MF 蒸发进行干燥, 将残留物溶于 DMF(4.5ml), 基本所述, 用尿苷 5'-环三偏酸盐处理得到 P¹-(2'-脱氧肌苷 5'-)-P⁴-(尿苷 5'-)-四磷酸盐。

25 实施例 20

P¹-(2'-脱氧胞苷 5'-)-P⁴-(尿苷 5'-)-四磷酸盐(UP₄dC)

基本处理 2'-脱氧胞苷 5'-单磷酸盐(d-CMP, Sigma, 500mg)得到 P¹-(2'-脱氧胞苷 5'-)-P⁴-(尿苷 5'-)-四磷酸盐的白色固体(130 毫克), HPLC 的估计纯度为 82 %.

实施例 21

30 通过肌醇磷酸盐试验药理活性

用 E. Lazarowski 等, Brit. J. Pharm. 116, 1619-27(1995)所述的肌醇磷酸盐试验对实施例 1-20 化合物试验它们激活 Y₁、P₂Y₂、P₂Y₄ 和 P₂Y₆ 受体活性的能

力。结果如下表 II 所示。

表 II
二核苷酸性总结
EC₅₀(微摩尔)

实施例	P2Y1	P2Y2	P2Y4	P2Y6
1	IA	弱	11.1(60%)	IA
2	IA	5.71	1.0(80%)	弱
3	3.67	0.63	1.19	2.56
4	IA	0.02	n/a	0.05(20%)
5	31.2(55%)	3.8(80%)	2.87	92.64
6	弱	0.46	19.8(75%)	IA
6a	nd	0.3	0.06	0.87
7	IA	0.11	0.2	0.88
8	IA	0.11	0.15	0.8
9	>100	0.37	4.16	1.79
10	IA	0.19	0.32(65%)	1.3
11	IA	0.13	0.38(75%)	3.39
12	IA	0.1	0.39	0.92
13	nd	0.2	0.13	0.54
14	nd	10.7	14.7	3.5
15	IA	0.64	3.72	9.71
16	IA	0.79	0.73	5.33

- 5
- IA

弱

(XX %)

nd
- 反应<2-倍基础值

EC₅₀>100 微摩尔

同一研究中阳性对照的反应百分数

没有测定

10 现已以完整、清楚和确切地使本技术领域的人员能实施的方式揭示本发明、其制备方法和使用方法。应当明白，前面描述了本发明优选的技术方案，其可修改而并不脱离所附的权利要求书所述的本发明的精神或范围，为了特别指出本发明的权利要求，以下列权利要求书来结束本说明书。