

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C07H 19/10

C07H 19/20 A61K 31/70

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 99810072.2

[43] 公开日 2001 年 9 月 26 日

[11] 公开号 CN 1314909A

[22] 申请日 1999.6.29 [21] 申请号 99810072.2

[30] 优先权

[32] 1998.6.30 [33] US [31] 09/107716

[86] 国际申请 PCT/US99/14774 1999.6.29

[87] 国际公布 WO00/00501 英 2000.1.6

[85] 进入国家阶段日期 2001.2.26

[71] 申请人 帕克·休斯研究所

地址 美国明尼苏达州

[72] 发明人 F·M·乌昆

R·维格

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

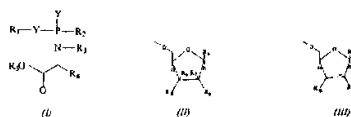
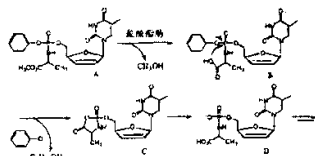
代理人 谭明胜

权利要求书 6 页 说明书 28 页 附图页数 7 页

[54] 发明名称 具有抗 HIV 活性的 d4T 的磷酸芳基酯衍生物

[57] 摘要

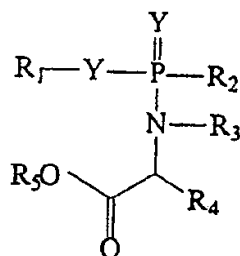
式(I)的核苷磷酸芳基酯衍生物具有有效的抗 HIV 活性而没有不良水平的细胞毒性。核苷磷酸芳基酯衍生物的实例包括在芳基上具有对-溴基取代的 d4T 磷酸芳基酯衍生物。具体地讲,这些衍生物是 HIV 逆转录酶的有效抑制剂。在本发明的一个优选方面,可以用氨基酸残基进一步取代磷酸芳基酯基团中的磷,所述的氨基酸残基可以被酯化或取代,如甲氧基丙氨酸基。在所述的通式中 Y 为氧或硫; R₁ 为未取代的芳基或一个吸电子基取代的芳基; R₂ 为式(II 或 III)的核苷。



ISSN 1008-4274

权 利 要 求 书

1. 一种抑制在 HIV 感染细胞中的 HIV 逆转录酶的方法, 该方法包括给予感染细胞有效抑制剂量的下式化合物:



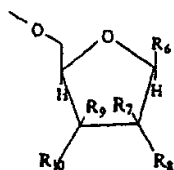
(I)

5 其中

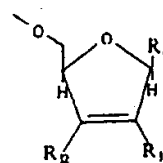
Y 为氧或硫;

R₁ 为未取代的芳基或一个吸电子基取代的芳基;

R₂ 为式 II 或 III 的核苷:



(II)



(III)

其中

10

R₆ 为嘌呤或嘧啶;

R₇、R₈、R₉、R₁₀、R₁₁ 和 R₁₂ 独立为氢、羟基、卤素、叠氮基、-NO₂、-NR₁₃R₁₄ 或 -N(OR₁₅)R₁₆, 其中 R₁₃、R₁₄、R₁₅ 和 R₁₆ 独立为氢、酰基、烷基或环烷基;

R₃ 为氢、酰基、烷基或环烷基;

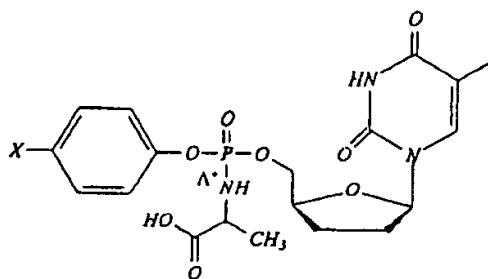
15 R₄ 为氨基酸的侧链; 或 R₃ 和 R₄ 可以结合形成脯氨酸或羟基脯氨酸侧链; 而

R₅ 为氢、烷基、环烷基或芳基。

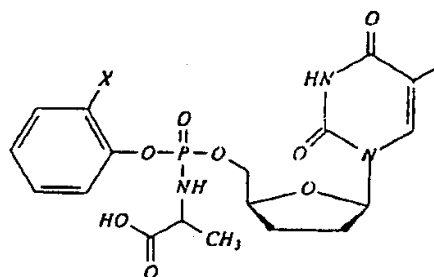
2. 权利要求 1 的方法, 其中 Y 为氧。

3. 权利要求 1 的方法, 其中 R₁ 为溴苯基。

4. 权利要求 1 的方法, 其中 R_6 为胸腺嘧啶、胞嘧啶或尿嘧啶。
 5. 权利要求 1 的方法, 其中 R_4 为丙氨酸或色氨酸的侧链。
 6. 一种用于抑制在感染 HIV 的细胞中的 HIV 逆转录酶的方法, 该方法包括给予感染的细胞抑制量的式 IV 或 V 化合物:

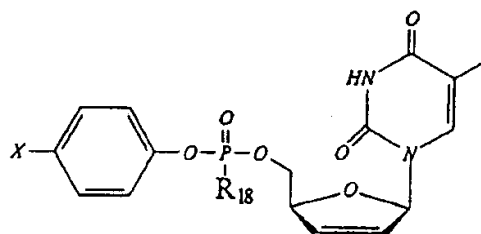


(IV)



(V)

- 5 其中 X 为一个吸电子基团。
 7. 权利要求 6 的方法, 其中 X 为卤基或 NO_2 。
 8. 权利要求 7 的方法, 其中 X 为溴基。
 9. 权利要求 8 的方法, 其中溴基为对位取代。
 10. 一种抑制在感染 HIV 的细胞中的 HIV 逆转录酶的方法, 该方法包括给予感染的细胞抑制量的下式化合物:



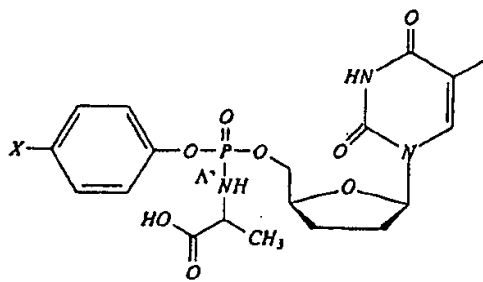
(VI)

其中

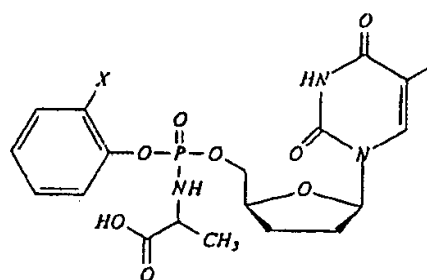
X 为一个吸电子基团; 而

R_{18} 为一个氨基酸残基。

11. 权利要求 10 的方法, 其中 R_{18} 为 $-\text{NHCH}(\text{CH}_3)\text{COOCH}_3$ 。
 12. 一种抑制 HIV 在宿主细胞中复制的方法, 该方法包括使所述宿主细胞接触抑制量的式 IV 或 V 化合物:



(IV)



(V)

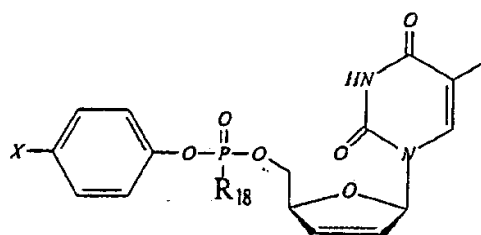
其中 X 为一个吸电子基团。

13. 权利要求 12 的方法，其中 X 为卤基或 NO₂。

14. 权利要求 13 的方法，其中 X 为溴基。

15. 权利要求 14 的方法，其中溴基为对位取代。

5 16. 一种抑制 HIV 在宿主细胞中复制的方法，该方法包括给予所述细胞抑制量的下式化合物：



(VI)

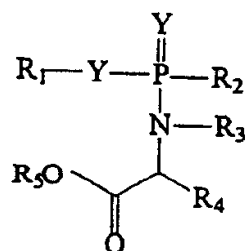
其中

X 为一个吸电子基团；而

R₂ 为一个氨基酸残基。

10 17. 权利要求 16 的方法，其中 R₁₈ 为 -NHCH(CH₃)COOCH₃。

18. 一种抑制 HIV 在宿主细胞中复制的组合物，该组合物包括有效量的下式化合物和药学上可接受的载体，所述剂量能有效抑制 HIV 在宿主细胞中复制：



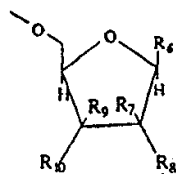
(I)

其中

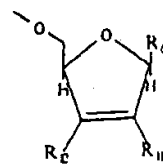
Y 为氧或硫;

R₁ 为未取代的芳基或一个吸电子基取代的芳基;

R₂ 为式 II 或 III 的核苷:



(II)



(III)

5 其中

R₆ 为嘌呤或嘧啶;

R₇、R₈、R₉、R₁₀、R₁₁ 和 R₁₂ 独立为氢、羟基、卤素、叠氮基、-NO₂、-NR₁₃R₁₄ 或 -N(OR₁₅)R₁₆, 其中 R₁₃、R₁₄、

R₁₅ 和 R₁₆ 独立为氢、酰基、烷基或环烷基;

10 R₃ 为氢、酰基、烷基或环烷基;

R₄ 为氨基酸的侧链; 或 R₃ 和 R₄ 可以结合形成脯氨酸或羟基脯氨酸侧链; 而

R₅ 为氢、烷基、环烷基或芳基。

19. 权利要求 18 的组合物, 其中 Y 为氧。

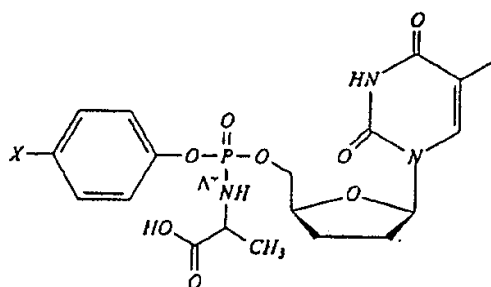
15 20. 权利要求 18 的组合物, 其中 R₁ 为溴苯基。

21. 权利要求 18 的组合物, 其中 R₆ 为胸腺嘧啶、胞嘧啶或尿嘧啶。

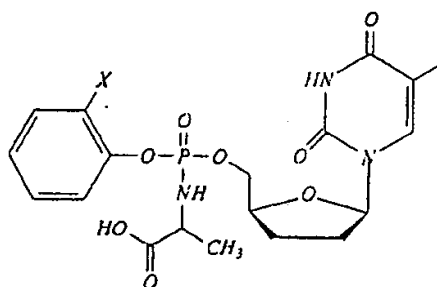
22. 权利要求 18 的组合物, 其中 R₄ 为丙氨酸或色氨酸侧链。

23. 一种抑制 HIV 在宿主细胞中复制的组合物, 该组合物包括有

效剂量的式 IV 或 V 化合物和药学上可接受的载体, 所述剂量能有效抑制 HIV 在宿主细胞中复制:



(IV)

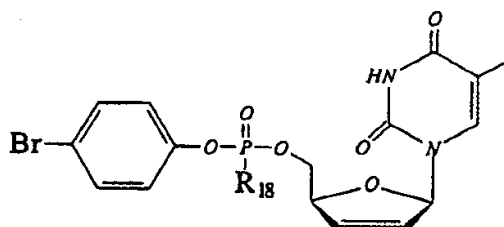


(V)

其中 X 为一个吸电子基团。

24. 权利要求 23 的组合物, 其中 X 为卤基或 NO₂.
25. 权利要求 24 的组合物, 其中 X 为溴基.
26. 权利要求 25 的组合物, 其中溴基为对位取代.

27. 一种抑制 HIV 在宿主细胞中复制的组合物, 该组合物包括有效剂量的下式化合物和药学上可接受的载体, 所述剂量能有效抑制 HIV 在宿主细胞中复制:

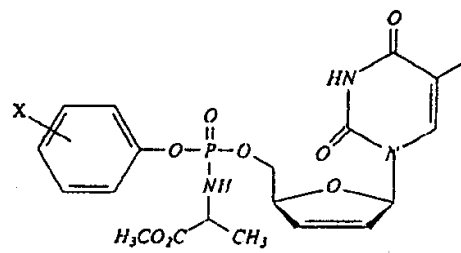


(VII)

- 10 其中 R₁₈ 为一个氨基酸残基.

28. 权利要求 27 的组合物, 其中 R₁₈ 为 -NHCH(CH₃)COOCH₃.

29. 一种用于抑制 HIV 在宿主细胞中复制的组合物, 该组合物包括有效剂量的下式化合物和药学上可接受的载体, 所述剂量能有效抑制 HIV 在宿主细胞中复制:



(VIII)

其中 X 为对位或邻位取代的吸电子基团。

30. 权利要求 29 的组合物，其中 X 为卤基或 NO₂。

说明书

具有抗 HIV 活性的 d4T 的磷酸芳基酯衍生物

5

发明领域

本发明涉及磷酸芳基酯核苷衍生物，特别是 2',3'-二氢-2',3'-二脱氧胸腺嘧啶核苷(此后称“d4T”)的磷酸芳基酯衍生物，该物质对人类免疫缺损病毒(HIV)具有有效的活性，例如作为 HIV 逆转录酶的抑制剂。

10

发明背景

AIDS 的传播及控制该病毒的不断努力是最好的证明。一种控制 HIV 的方法就是抑制它的逆转录酶的活性(RT)。因此，需要新的、有效的及选择性的 HIV RT 抑制剂作为有用的治疗药物。已知有效的 HIV RT 抑制剂包括 2',3'-二脱氧核苷的 5'-三磷酸酯(“ddN”)的类似物。这些活性 RT 抑制剂是通过核苷激酶和核苷酸激酶的作用在细胞内产生。因此，认为在抗 HIV 试剂的研究中 ddN 化合物如 AZT 和 d4T 是非常有希望的。

15

20

3'-叠氨基-3'-脱氧胸腺嘧啶核苷(叠氮胸腺嘧啶核苷，AZT)转化为它的生物活性代谢物 AZT 三磷酸酯的限速步骤是其单磷酸酯衍生物转化为二磷酸酯衍生物，而据报告，在细胞内产生生物活性的 2',3'-二脱氢-2',3'-二脱氢胸腺嘧啶核苷(d4T)的代谢物 d4T-三磷酸酯的限速步骤是该核苷转化为其单磷酸酯衍生物(Balzarini 等, 1989, *J. Biol. Chem.* 264: 6127; McGuigan 等, 1996, *J. Med. Chem.* 39:1748)。在先有技术中提出的该机制见图 1。

25

为了克服 ddN 类似物对细胞内核苷激酶激活的依赖，McGuigan 等制备了 AZT(McGuigan 等, 1993, *J. Med. Chem.* 36:1048; McGuigan 等, 1992, *Antiviral Res.* 17:311)和 d4T(McGuigan 等, 1996, *J. Med. Chem.*

39:1748; McGuigan 等, 1996, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 6:1183)的磷酸芳基甲氧基丙氨酸酯衍生物。结果显示这类化合物经过细胞内水解产生单磷酸酯衍生物, 所述衍生物在不依赖胸腺嘧啶核苷激酶(TK)的模式下通过胸苷酸激酶的作用进一步磷酸化得到生物活性的三磷酸酯衍生物。可是, 到目前为止所有通过各种芳基部分的取代进一步提高 d4T 的磷酸芳基酯衍生物效力而不伴随增加它们的细胞毒性的尝试全部失败(McGuigan 等, 1996, *J. Med. Chem.* 39:1748)。

本发明发现, 核苷的磷酸芳基酯衍生物的芳基部分上具有吸电子部分的取代基, 如对位溴取代基时, 由于该取代基的吸电子性质可提高 d4T 的核苷衍生物的承受水解能力。取代的磷酸苯基酯核苷衍生物呈现出有效的和特殊的抗病毒活性。

发明概述

本发明涉及磷酸芳基酯核苷衍生物, 特别是 2',3'-二脱氢-2',3'-二脱氧胸腺嘧啶核苷(此后称“d4T”)的磷酸芳基酯衍生物, 该衍生物对 HIV 具有有效的活性, 例如作为 HIV 逆转录酶的抑制剂。出乎意料地发现 d4T 的磷酸芳基酯衍生物, 例如具有一个吸电子取代如在芳基上有一个对-溴基取代的衍生物, 作为一种抗 HIV 药物其效力明显增强, 而没有不良水平的细胞毒性。详细地说, 这些衍生物是 HIV 逆转录酶的有效抑制剂。在本发明的一个优选方面, 可以用氨基酸残基进一步取代磷酸芳基酯基团中的磷, 所述的氨基酸残基可以酯化或取代, 如甲氧基丙氨酸基。

例如, 对-溴基取代的 d4T 的磷酸苯基甲氧基丙氨酸酯衍生物作为一种有效抗 HIV 剂有效地抑制 HIV 在外周血单核细胞(PBMNC)以及 TK-缺陷型 CEM T-细胞中的复制而没有可检测到的细胞毒性。另外, 这种新的 d4T 衍生物 d4T-5'-(磷酸对-溴苯基甲氧基丙氨酸酯)对 RTMDR-1 即一种对 AZT 和 NNI-耐受的 HIV-1 菌株, 具有有效的抗病毒活性, 而对 HIV-2 具有中等活性。同样, 相应的对溴取代的磷

酸苯基甲氧基丙氨酸基酯 AZT 衍生物在 PBMNC 及 TK 缺陷型 CEM T-细胞中显示有效的抗-HIV 活性, 但是对 AZT-和 NNI-抗性 RTMDR-1 或 HIV-2 无效。与这些 d4T 和 AZT 衍生物对比, 相应的 3dT 衍生物-3dT-5'-(磷酸对-溴苯基甲氧基丙氨酸基酯)呈现出超过 3dT 的改良活性, 但在 PBMNC 或 TK-缺陷型 CEM T-细胞中不象 d4T 和 AZT 衍生物一样有效。据我们所知, 这是第一次报告以前未受注意的结构活性关系, 该关系决定了 d4T 和 AZT 的磷酸苯基酯衍生物的药效。

先导化合物 d4T-5'-(磷酸对-溴苯基甲氧基丙氨酸基酯)和 AZT-5'-(磷酸对-溴苯基甲氧基丙氨酸基酯)为有效的 HIV 治疗策略设计提供基础, 该策略能够抑制 HIV 的复制, 特别是抑制其在 TK-缺陷型细胞中的复制。

附图简述

图 1 是现有技术提出的 d4T 磷酸芳基酯衍生物新陈代谢途径示意图。

图 2A 和 2B 图示可提高取代苯环水解的吸电子假说。

图 2C 为洗脱分布图, 图示每一个受试化合物水解产生 A-d4T: 化合物 2, 其中 X=H(空心方形); 化合物 3, 其中 X=OCH₃(实心方形); 和化合物 4, 其中 X=Br(实心圆形)。

图 2D 为洗脱分布图, 图示受试化合物对猪的肝脏酯酶引起的酶促水解的敏感性。

图 3 为洗脱分布图, 说明化合物 2-4 在 TK-缺陷型 CEM 细胞中的细胞内水解。在与化合物 4 孵育的 CEM 细胞的溶胞产物等份试样中只可检测到对应于 A-d4T-MP 的 680 pmol 的代谢产物峰。

图 4A-4F 图示化合物 6c (图 4A)和化合物 7c (图 4B)的化学结构; 在 PBMNC 或 TK-缺陷型 CEM T-细胞中化合物 6c (图 4C)和化合物 7c (图 4D)对 HTLVIIIB 的抗-HIV 活性; 及化合物 6c (图 4E)和化合物 7c (图 4F)对 HIV-1(HTLVIIIB)、HIV-2 和 RTMDR-1 的抗病毒活性。用抑制

HIV 复制的 % 表示抗病毒活性, 根据感染细胞中 RT 的活性进行测量。

图 5A 和 5B 是示意图, 图示在苯环上的共振效应(电子非定域作用), 因此预料苯环上的对位取代基和邻位取代基具有相同的电子效应。

5

发明详述

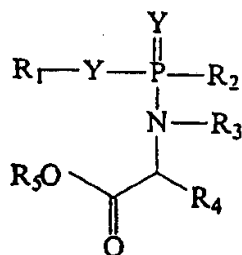
我们出乎预料地发现, 核苷的某些取代的磷酸芳基酯衍生物具有增加的抗 HIV 活性而同时保持低水平的细胞毒性。因此, 这些衍生物特别适用于作为抗病毒组合物的活性剂以及作为治疗病毒感染如 HIV 感染的方法的活性剂。

10

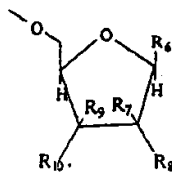
本发明的化合物

正如下在以下实施例中更充分地讨论的一样, 本发明化合物为具有有效的抗病毒活性的核苷磷酸芳基酯衍生物, 详细地说是 d4T 和 AZT 的衍生物。适宜用于本发明组合物和本发明方法的核苷衍生物为下式化合物或其药学上可接受的盐:

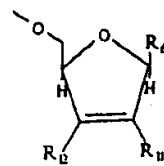
15



其中 Y 为氧或硫, 优选氧; R₁ 为未取代的芳基或吸电子基团取代的芳基; R₂ 为式 II 或 III 的核苷:



(II)



(III)

其中 R_6 为嘌呤或嘧啶，优选嘧啶；而 R_7 、 R_8 、 R_9 、 R_{10} 、 R_{11} 和 R_{12} 独立为氢、羟基、卤基、叠氮基、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{NR}_{13}\text{R}_{14}$ 或 $-\text{N}(\text{OR}_{15})\text{R}_{16}$ ，其中 R_{13} 、 R_{14} 、 R_{15} 和 R_{16} 独立为氢、酰基、烷基或环烷基；

R_3 为氢、酰基、烷基或环烷基； R_4 为氨基酸的侧链；或 R_3 和 R_4 可以结合形成脯氨酸或羟基脯氨酸的侧链；而 R_5 为氢、烷基、环烷基或芳基。

术语“芳基”包括芳香烃基如苯基，包括稠合的芳香环如萘基。这类基团在芳香环上可以不被取代或被一个吸电子基团取代，如卤基（溴、氯、氟、碘基）、 NO_2 或酰基。一个吸电子基团取代的芳基优选为溴苯基，更优选 4-溴苯基。

术语“酰基”包括式 $\text{R}_{17}\text{C}(\text{O})-$ 的取代基，其中 R_{17} 为氢、烷基或环烷基。

术语“烷基”包括含有 1 到 6 个碳原子的直链或支链饱和脂肪族烃链，如甲基、乙基、丙基、异丙基(1-甲基乙基)、丁基、叔丁基(1,1-二甲基乙基)等等。这类基团可以不被取代或被羟基、卤基、叠氮基、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{NR}_{13}\text{R}_{14}$ 或 $-\text{N}(\text{OR}_{15})\text{R}_{16}$ 取代，其中 R_{13} 、 R_{14} 、 R_{15} 和 R_{16} 如前定义。

术语“环烷基”包括含有 3 到 7 个碳原子的饱和脂肪族烃环，如环丙基、环丁基、环戊基、环己基等。这类基团可以不被取代或被羟基、卤基、叠氮基、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{NR}_{13}\text{R}_{14}$ 或 $-\text{N}(\text{OR}_{15})\text{R}_{16}$ 取代，其中 R_{13} 、 R_{14} 、 R_{15} 和 R_{16} 如前定义。

术语“嘌呤”包括腺嘌呤和鸟嘌呤。

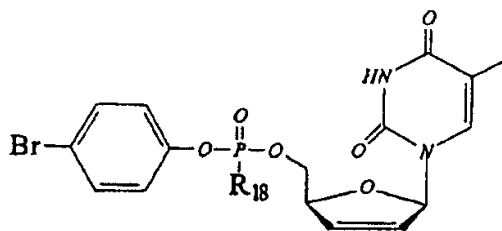
术语“嘧啶”包括尿嘧啶、胸腺嘧啶和胞嘧啶。所述嘧啶优选为

胸腺嘧啶。

术语“氨基酸的侧链”指变化的氨基酸基团，包括例如甘氨酸、丙氨酸、精氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、半胱氨酸、胱氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、羟赖氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸、蛋氨酸、苯丙氨酸、丝氨酸、苏氨酸、色氨酸、酪氨酸、缬氨酸等的侧链。所述氨基酸侧链优选为丙氨酸或色氨酸侧链。

通常，含有吸电子取代基的化合物，例如在图 5A 和 5B 中所示的邻位或对位被卤素或 NO_2 取代，可以更有效地水解提供活性抑制剂化合物。优选卤素取代，而最优选对-溴基取代。

为了全面阐述本发明的组合物和方法，描述 d4T 衍生物。d4T 衍生物含有磷酸芳基酯取代，其中的芳基含有一个吸电子取代，如邻位或对位卤素(Br、Cl、F、I)取代基或 NO_2 取代基。下面显示了一个实例，其中 R_{18} 为一个可以酯化或取代的氨基酸残基如 $-\text{NHCH}(\text{CH}_3)\text{COOCH}_3$ 或其药学上可接受的盐或酯。



d4T 衍生物的合成:

为了阐述本发明化合物的合成，描述了 d4T 衍生物的合成。可按照如下方法制备 d4T 衍生物。用在 Mansuri 等, 1989, *J. Med. Chem.* 32, 461 中讨论的方法由胸腺嘧啶核苷制备 d4T, 该文献公开内容通过引用结合到本文中。通过在 McGuigan 等, 1992, *Antiviral Res.* 17:311 中讨论的方法可以制备适当取代的氯代磷酸(phosphorochloridate)取代芳基酯, 该文献公开内容通过引用结合到本文中。将氯代磷酸酯加入到 d4T 的含有 N-甲基咪唑的无水四氢呋喃溶液中以便形成需要的产物。

采用适宜的组合物形式将 d4T 衍生物给予患者，该组合物含有作

为活性剂的 d4T 或 AZT 的衍生物以及药学上可接受的载体、佐剂或稀释剂。如果需要可以使用缓释剂型。将该组合物按照适宜的抗病毒剂量给予需要抗病毒的患者，例如，所述剂量有效地抑制 HIV 逆转录酶和/或抑制 HIV 在宿主细胞的复制。按照适宜的剂量方案给药。

5

实施例

用下列实施例进一步解释本发明，不应该认为这些实施例限定本发明。

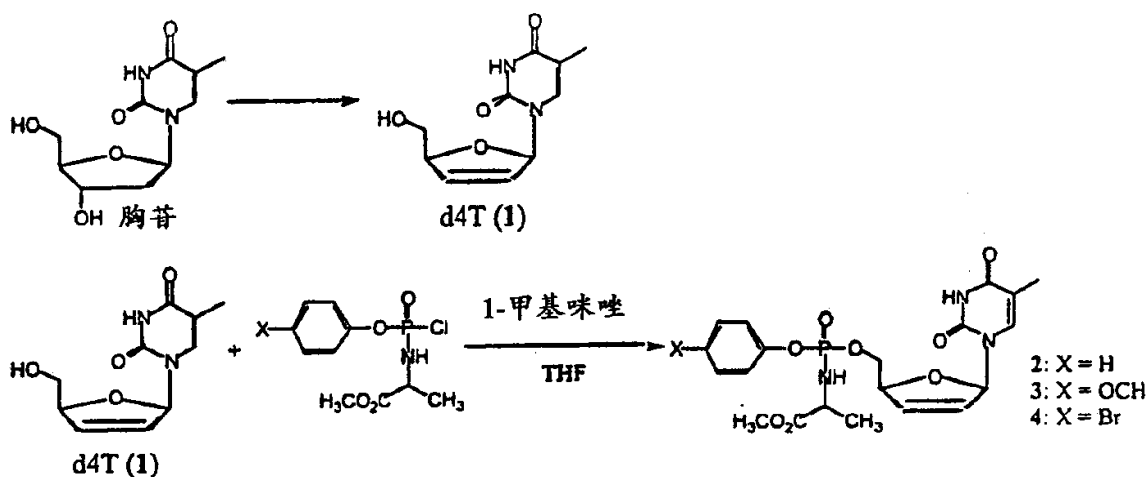
10

实施例 1

d4T 衍生物的合成及鉴定

按照 Mansuri, 等, 1989, *J. Med. Chem.* 32, 461 的方法，用胸腺嘧啶核苷制备 d4T 1。按照 McGuigan 等, 1992, *Antiviral Res.*, 17:311 报道的方法制备适当取代的氯代磷酸苯基甲氧基丙氨酸基酯。按照在下面方案 1 中概述合成化合物 2-4。

15



方案 1. 将氯代磷酸苯基甲氧基丙氨酸基酯加入到 d4T 和 1-甲基咪唑的无水四氢呋喃(THF)溶液中并在室温下搅拌该混合物 5-6 小时。处理反应混合物以良好产率提供所需要的衍生物。采用柱色谱法得到纯净的化合物。

20

通过 HPLC 测量合成化合物的物理数据, HPLC 的进行条件为 C18 4x250 mm LiChrospher 柱, 用 70:30 水/乙腈作为洗脱剂, 流速为 1 ml/

分钟。通过 HPLC 下列化合物的纯度超过 96%。由于非对映异构体用星号标记的 ^{13}C NMR 峰是分裂的。

化合物 2: 产率 81%; IR (Neat): 3222, 2985, 2954, 1743, 1693, 1593, 1491, 1456, 1213, 1153, 1039, 931, 769 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3) δ 9.30 (br s, 1H), 7.30-7.10 (m, 6H), 6.85-6.82 (m, 1H), 6.36-6.26 (m, 1H), 5.91-5.85 (m, 1H), 5.00 (br m, 1H), 4.19-3.68 (m, 4H), 3.72, 3.71 (s, 3H), 1.83, 1.80 (d, 3H), 1.38-1.25 (m, 3H); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 173.9, 163.7, 150.7, 149.7, 135.7*, 133.2*, 129.6*, 127.3*, 125.0*, 120.0, 111.1, 89.6*, 84.5*, 66.9*, 52.5*, 50.0*, 20.9 和 12.3; ^{31}P NMR (CDCl_3) δ 2.66, 3.20; MALDI-TOF 质谱 m/e 487.9 (M+Na); HPLC 保留时间: 5.54 及 5.85 分钟。

化合物 3: 产率 92%; IR (Neat): 3223, 3072, 2999, 2953, 2837, 1743, 1693, 1506, 1443, 1207, 1153, 1111, 1034, 937, 837 和 756 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3) δ 9.40 (br s, 1H), 7.30-7.00 (m, 5H), 6.83-6.81 (m, 1H), 6.37-6.27 (m, 1H), 5.91-5.86 (m, 1H), 5.00 (br m, 1H), 4.40-4.30 (m, 2H), 4.20-4.10 (m, 2H), 3.95-3.93 (s, 3H), 3.82-3.80 (s, 3H), 1.85-1.81 (s, 3H), 和 1.39-1.29 (m, 3H); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 174.0, 163.9, 156.6, 150.8, 143.5, 135.8*, 133.3*, 127.4*, 121.2*, 114.5, 111.2, 89.7*, 84.5, 66.9*, 55.5, 52.5, 50.6*, 20.9 和 12.3; ^{31}P NMR (CDCl_3) δ 3.82, 3.20; MALDI-TOF 质谱 m/e 518.2 (M+Na); HPLC 保留时间: 5.83 及 6.26 分钟。

化合物 4: 产率 83%; IR (Neat): 3203, 3070, 2954, 2887, 2248, 1743, 1693, 1485, 1221, 1153, 1038, 912, 835, 733 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3) δ 9.60-9.58 (br s, 1H), 7.45-7.42 (m, 2H), 7.30-7.09 (m, 4H), 6.37-6.27 (m, 1H), 5.93-5.88 (m, 1H), 5.04-5.01 (br m, 1H), 4.35-4.33 (m, 2H), 4.27-3.98 (m, 2H), 3.71-3.70 (s, 3H), 1.85-1.81 (s, 3H), 1.37-1.31 (m, 3H); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 173.7, 163.8, 150.8, 149.7*, 135.6*, 133.1*, 127.4*, 121.9*, 118.0, 111.2*, 89.7*, 84.4*, 67.8*, 52.5, 50.0*, 20.7 和 12.3; ^{31}P NMR (CDCl_3) δ 3.41, 2.78; MALDI-TOF 质谱 m/e 567.1 (M+Na); HPLC 保留时间: 12.04 及 12.72 分钟。

实施例 2

化合物 2-4 对水解的敏感性

图 2A 和 2B 图示在代谢产物前体 B(见图 1)的苯环上的对位取代基的电子效应。为了评估化合物对水解的敏感性, 将化合物 2-4 溶解于甲醇中, 然后用 0.002 N NaOH 处理。保持浓度恒定并且用 HPLC 监测水解产物 A-d4T-MP 的产生。用 Lichrospher 柱进行 HPLC 层析。在等度条件下用 70: 30 水/乙腈的混合溶剂对柱进行洗脱并且洗脱分布图见图 2C。

在猪的肝脏酯酶系统下试验化合物的水解。数据在图 2C 中显示。在 37℃ 下, 将化合物 2 和 4(在 Tris-HCl 中 1 mM)与 100U 的猪肝脏酯酶(Sigma)的 Tris-HCl 缓冲液(pH 7.4)孵育 2 小时。通过加入丙酮并冷却该反应混合物使反应停止。在 15,000 x g 下离心后, 用一种可以检测到 50 pmol 代谢产物的定量分析 HPLC 方法检测 0.1 ml 等份反应混合物中存在的活性代谢产物。0.1 ml 等份的化合物 4 的反应产物含有 1.4 nmol 的 A-d4T-MP, 而在化合物 2 的反应产物中未检测到该代谢产物。

正如图 2A 和 2B 所示, 在苯基部分的对位上的吸电子取代基的存在很可能增加了代谢产物前体 B 中苯氧基团的水解速率(图 2A 和 2B), 前体 B 是在 d4T 的磷酸苯基酯衍生物的代谢路径的第一步(图 1, A 至 B)依赖于羧酸酯酶产生。苯环对位上的单一溴取代基不会影响羧酸酯酶对该化合物的识别和水解(图 1 中的 A 至 B 步骤)。由吸电子的对位溴取代基引起的电子效应会增加苯氧基团 C 的水解产生 D 并随后产生 E 即关键代谢产物 A-d4T-MP 的前体。为了试验所述水解, 通过测量丙氨酸基-d4T-单磷酸酯(A-d4T-MP)的产生, 我们比较了未取代的化合物 2、对-甲氧基(OCH₃)取代的化合物 3 及对-溴基取代的化合物 4(=d4T-5'-[磷酸对-溴苯基甲氧基丙氨酸基酯]或 d4T-pBPMAP)在用 0.002 N NaOH 处理后化学水解的速率。

正如图 2C 所示, 具有对-溴取代基的化合物 4 比未取代的化合物 2 呈现出更快的水解速率, 而在对位具有供电子取代基-OCH₃ 的化合

物 3 较这两种化合物中的任何一种具有较慢的水解比率。类似地, 先导化合物 4 对由猪的肝脏酯酶引起的酶促水解较化合物 2 更敏感(图 2D)。

5

实施例 3

化合物 2-4 在 T-缺陷型 CEM 细胞中的细胞内代谢

10

为了分析化合物 2-4 在 T-缺陷型 CEM 细胞中的细胞内代谢, 将 1×10^6 CEM 细胞与化合物 2-4(100 μM) 孵育 3 小时, 随后用 HPLC 检查部分水解的磷酸二酯代谢产物、丙氨酸基 d4T 单磷酸酯。值得注意的是, 在用化合物 4 处理的 CEM 细胞内所述代谢产物的量是明显高于用化合物 2 或 3 处理的 CEM 细胞内的所述代谢产物的量(680 $\text{pmol}/10^6$ 细胞与 $<50 \text{ pmol}/10^6$ 细胞; 图 3)。

15

20

25

在 RPMI、10%胎牛血清及 1%青霉素/链霉素组成的培养基中培养 CEM 细胞。在 37°C 下, 按照 10^6 细胞/ml 的密度将 1×10^6 细胞与 100 μM 的这些化合物孵育 3 小时。孵育后, 用冰冷却的 PBS 洗涤细胞两次并加入 0.5ml 60%甲醇提取。将细胞的溶胞产物在 -20°C 下保存过夜, 然后在 15,000 $\times g$ 下离心溶胞产物 10 分钟以去除细胞碎屑。将每份 100 μL 的这些溶胞产物直接注射入 HPLC。该 HPLC 系统由一个具有四级泵的 Hewlett Packard (HP) 1100 系列、一个自动进样器、一个电子脱气器、一个二极管阵列检测器及一台具有用于数据分析的 chemstation 软件程序的计算机组成。将所述样品在 250 $\times$ 4.6mm Sulpelco LC-DB C18 柱上洗脱。利用溶剂梯度解析代谢产物与母体化合物, 它含有甲醇和 10 mM 磷酸铵的混合物(pH 3.7)。以 1 ml/分钟的流速进行梯度洗脱, 前 10 分钟用 5 到 35%的甲醇洗脱, 继续用 35%的甲醇洗脱 5 分钟, 最后用 35 到 100%的甲醇线性梯度再洗脱 20 分钟。检测波长为 270 nm。仅仅在与化合物 4 孵育的 CEM 细胞溶胞产物的等份中检测到一个保留时间为 8.7 分钟的代谢产物峰, 该峰对应于 680 pmol 的 A-d4T-MP。

因为其提高的水解敏感性, 假设化合物 4 与其它化合物相比是一

个更有效的抗 HIV 试剂。在外周血单核细胞和 TK-缺陷型 CEM T-细胞中, 用前述的方法(Zarling 等, 1990 *Nature* 347: 92; Erice 等, 1993 *Antimicrob. Agents Chemother.* 37: 835; Uckun 等, 1998 *Antimicrob. Agents Chemother.* 42: 383)测试化合物 2-4 以及母体化合物 d4T (1)抑制 HIV 复制的能力。通过比较受试物质处理的感染细胞的 p24 及 RT 活性值和未处理感染细胞的 p24 及 RT 活性值计算抑制病毒复制的百分率。同时, 用细胞增殖的微量培养四唑鉴定法(MTA), 正如在以上 Zarling、Enrice 和 Uckum 的文章中描述的一样, 检测所述化合物的细胞毒性。

表 1 显示抑制 HIV-1 复制的相似的 IC_{50} 值, 提供了当在受 HIV-1 感染的外周血单核细胞中试验时, d4T 磷酸芳基酯衍生物并不比该母体化合物 d4T 更加有效的证据。与以前的报道一致, 实际上在 TK-缺陷型 CEM 细胞中 d4T 抑制 HIV-1 复制的能力降低。反之, d4T 抑制产生 p24 的 IC_{50} 值在外周血单核细胞中为 18 nM, 在 TK-缺陷型 CEM 细胞中为 556 nM。类似地, 抑制 RT 活性的 IC_{50} 值从 40 nM 增加到 2355 nM (表 1)。尽管所有的 3 种磷酸芳基酯衍生物在 TK-缺陷型 CEM 细胞中皆比 d4T 有效, 在芳基部分有一个对-溴取代基的化合物 4(d4T-5'-[磷酸对-溴苯基甲氧基丙氨酸基酯])在抑制 p24 产生上比 d4T 强 12.6 倍 (IC_{50} 值: 44 nM 对 556 nM)并且在抑制 RT 活性上比 d4T 强 41.3 倍 (IC_{50} 值: 57 nM 对 2355 nM) (表 1)。

表 1

化合物	X	PBMNC			CEM		
		IC_{50} [p24]	IC_{50} [RT]	IC_{50} [MTA]	IC_{50} [p24]	IC_{50} [RT]	IC_{50} [MTA]
1 (=d4T)		0.018	0.040	>10	0.556	2.355	>10
2	H	ND	ND	>10	0.145	0.133	>10
3	-OCH ₃	0.033	0.033	>10	0.106	0.320	>10
4	Br	0.022	0.042	>10	0.044	0.057	>10

通过 MTA 测定, 所有的受试化合物在浓度高达 10,000 nM 时对外周血单核细胞或 CEM 细胞没有任何一个呈现可检测到的细胞毒性。有趣的是, 在芳基部分具有对-甲氧基取代基的化合物 3 在抑制 HIV 感染的 TK-缺陷型 CEM 细胞的 RT 活性方面较化合物 4 低 5.6 倍 (IC₅₀ 值: 320 nM 对 57 nM), 虽然这两个化合物在外周血单核细胞中呈现相似的活性(IC₅₀ 值: 33 nM 对 42 nM)。因此, 对位-取代基一致表现出影响 d4T 的磷酸芳基酯衍生物在 TK-缺陷型细胞中的抗 HIV 活性。据我们所知, 这是第一次论证通过在芳基部分引入单一对-溴取代基实际上可以提高 d4T 的磷酸芳基酯衍生物的药效以及选择性指数。从前未知的由 d4T 的磷酸酯衍生物的芳基部分决定的结构-活性关系为可能更有效的 d4T 类似物的设计提供了基础。

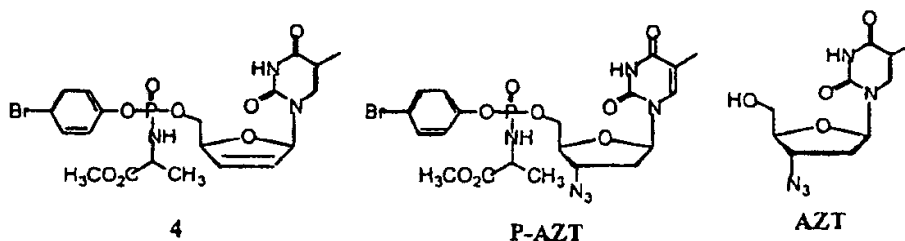
实施例 4

化合物 4 和 AZT 在 MDR 细胞中的活性

将化合物 4(d4T-5'-[磷酸对-溴苯基甲氧基丙氨酸基酯])抗 HIV-MDR 细胞的活性与 AZT-5'-[磷酸对-溴苯基甲氧基丙氨酸基酯](P-AZT) 及 AZT 进行比较。使用实施例 4 所述的孵育和分析方法。

正如表 2 所示, P-AZT 和 AZT 具有相似的活性, IC₅₀ 值分别为 1.5 和 2.0 nM。化合物 4 的活性(0.02 nM)比 AZT (2.0 nM)更有效 100 倍。

表 2

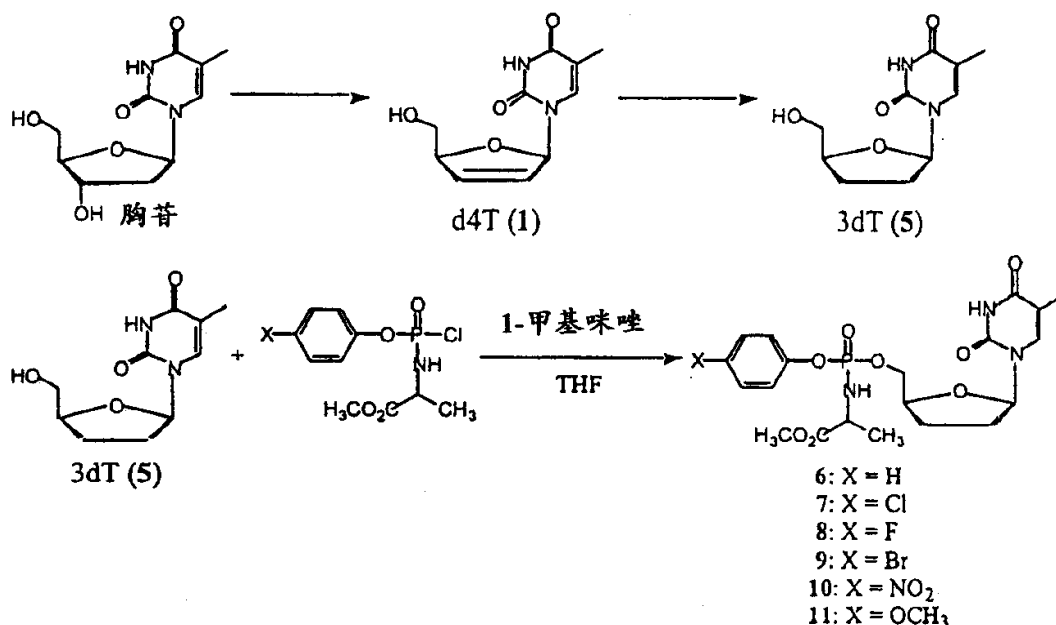


	HIV-2	HIV-MDR
化合物	IC ₅₀ [RT]	IC ₅₀ [RT]
4	0.4	0.02
P-AZT	3.9	1.5
AZT	2.4	2.0

实施例 5

3dT 磷酸芳基酯衍生物的合成

通过进一步比较, 研究在 3'-脱氧胸腺嘧啶核苷(3dT)的磷酸芳基酯衍生物的芳基部分的各种取代基对抗 HIV 活性的影响。正如方案 2 所示, 由 d4T 1 制备 3dT 5, 用文献方法(Mansuri 等, 1989 *J. Med. Chem.* 32: 461-466)从胸腺嘧啶核苷制备 d4T 1。在乙醇中, 在 H₂ 及催化量的 5% Pd/C 的存在下进行 1 的氢化作用得到 3dT 5, 收率为 85%。还按照 McGuigan 等, 1992 *Antiviral Res* 17: 311-321 报道的方法制备适当取代的氯代磷酸苯基甲氧基丙氨酸基酯, 并按照在方案 2 中描述的方法合成化合物 6-11。



方案 2. 将适当取代的氯代磷酸苯基甲氧基丙氨酸基酯加入到 3dT 和 1-甲基咪唑的无水四氢呋喃(THF)的混合物中。在室温下搅拌该反应混合物 12 小时并且除去溶剂。将产生的树脂状物重新溶解于氯仿中并用

1M HCl、饱和的碳酸氢钠溶液(NO_2 衍生物情况例外)及水洗涤。有机相用 MgSO_4 干燥并且在真空下除去溶剂。用以 5% 甲醇的氯仿溶液洗脱的硅胶快速柱层析纯化该粗产物, 以好的收率得到纯净的化合物 6-11。

5 测定了所述合成化合物的物理数据。HPLC 的进行条件为 C18 4x250 mm LiChrospher 柱, 用 70:30 水/乙腈作为洗脱剂, 流速为 1 ml/分钟。由于 HPLC, 下列化合物的纯度超过 96%。由于非对映异构体用星号标记的 ^{13}C NMR 峰是分裂的。

10 化合物 5: 产率 85%; ^1H NMR (CDCl_3) δ 11.1 (br s, 1H), 7.82 (s, 1H), 5.97-5.94 (m, 1H), 5.10 (br s, 1H), 4.05-3.95 (m, 1H), 3.72-3.52 (m, 2H), 2.30-1.86 (m, 4H), 1.77 (s, 3H); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 163.9, 150.4, 136.4, 108.7, 84.8, 81.4, 62.2, 31.8, 25.1 和 12.5。

15 化合物 6: 产率 96%; IR (neat): 3211, 2955, 2821, 1689, 1491, 1265, 1211, 1153, 1043, 和 933 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3) δ 10.1 (br s, 1H), 7.47 (s, 1H), 7.32-7.12 (m, 5H), 6.14-6.08 (m, 1H), 4.41-4.21 (m, 4H), 4.05-4.00 (m, 1H), 3.70, 3.69 (s, 3H), 2.37-2.32 (m, 1H), 2.05-1.89 (m, 7H), 1.38-1.35 (dd, 3H); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 173.6*, 163.8, 150.3, 150.1*, 135.2, 129.4*, 124.7, 119.8*, 110.5*, 85.7*, 78.3*, 67.2*, 52.3, 50.1*, 31.6*, 25.4*, 20.7* 和 12.4*; ^{31}P NMR (CDCl_3) δ 2.82 & 3.11; MS(MALDI-TOF): 490.4 (M+Na); HPLC 保留时间= 6.86, 7.35 分钟。

20

化合物 7: 产率 96%; IR (neat): 3217, 2954, 2821, 1743, 1689, 1489, 1265, 1217, 1153, 1092, 1012, 926 和 837 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3) δ 9.40 (br s, 1H), 7.43-7.41 (m, 1H), 7.30-7.14 (m, 4H), 6.13-6.07 (m, 1H), 4.39-4.00 (m, 5H), 3.71, 3.70 (s, 3H), 2.38-2.36 (m, 2H), 2.09-1.89 (m, 5H), 1.39-1.36 (dd, 3H); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 173.6*, 163.7, 150.2, 148.8*, 135.3, 129.5-129.0, 121.5-121.3, 116.3, 110.6, 86.0*, 78.4*, 67.7*, 52.6*, 50.2*, 31.8*, 25.4*, 20.9* 和 12.5; ^{31}P NMR (CDCl_3) δ 2.87 & 3.09; MS(MALDI-TOF): 524.9 (M+Na); HPLC 保留时间= 14.05, 14.89 分钟。

25

化合物 8: 粘稠的油状物, 产率 96%; λ_{max} : 223 (ϵ 3338) 和 269 (ϵ

4695)nm; IR (neat): 3211, 2955, 1743, 1693, 1500, 1569, 1265, 1197, 1153, 1045, 923 和 843 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3) δ 9.40 (br s, 1H), 7.45-7.43 (d, 1H), 7.19-7.01 (m, 4H), 6.14-6.06 (m, 1H), 4.39-3.97 (m, 5H), 3.71, 3.70 (s, 3H), 2.38-1.89 (m, 7H), 1.39-1.35 (t, 3H); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 173.6*, 163.7, 150.2, 150.1*, 135.3, 121.5*, 116.3*, 110.6*, 85.9*, 78.4*, 67.7*, 52.6, 50.2*, 31.8*, 25.6*, 20.9* 和 12.5; ^{31}P NMR (CDCl_3) δ 3.13 和 3.37; MS(MALDI-TOF): 508.2 (M+Na); HPLC 保留时间= 8.38, 8.80 分钟。

化合物 9: 产率 83%; IR (neat): 3211, 2954, 1743, 1689, 1485, 1265, 1217, 1153, 1010, 923 和 833 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3) δ 9.82 (br s, 1H), 7.45-7.41 (m, 3H), 7.15-7.11 (m, 2H), 6.14-6.06 (m, 1H), 4.39-4.00 (m, 5H), 3.71, 3.70 (s, 3H), 2.38-1.89 (m, 7H), 1.39-1.35 (dd, 3H); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 173.6*, 163.8, 150.3, 148.5*, 135.2, 132.6*, 121.8*, 117.7, 110.6*, 85.9*, 78.3*, 67.2*, 52.5, 50.2*, 31.6*, 25.6*, 20.8* 和 12.5; ^{31}P NMR (CDCl_3) δ 2.83 和 3.05; MS(MALDI-TOF): 570.0 (M+2+Na); HPLC 保留时间= 15.50, 16.57 分钟。

化合物 10: 产率 87%; IR (neat): 3203, 2955, 1743, 1684, 1593, 1522, 1348, 1265, 1153, 1101, 920 和 860 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3) δ 9.51 (br s, 1H), 8.24-8.21 (m, 2H), 7.42-7.37 (m, 3H), 6.13-6.08 (m, 1H), 4.39-4.03 (m, 5H), 3.72, 3.71 (s, 3H), 2.38-1.89 (m, 7H), 1.41-1.38 (dd, 3H); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 173.4*, 163.7, 155.2*, 150.2*, 144.4, 135.3, 125.9-125.4, 120.6*, 115.4, 110.6*, 86.1*, 78.4*, 68.1*, 52.7, 50.2*, 31.7*, 25.8*, 20.9* 和 12.5; ^{31}P NMR (CDCl_3) δ 2.60 和 2.81; MS(MALDI-TOF): 535.0 (M+Na); HPLC 保留时间= 8.12, 10.14 分钟。

化合物 11: 产率 100%; IR (neat): 3209, 2954, 1743, 1506, 1468, 1265, 1207, 1153, 1036, 937 和 835 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3) δ 9.89 (br s, 1H), 7.49-7.47 (m, 1H), 7.16-7.11 (m, 2H), 6.84-6.80 (m, 2H), 6.15-6.09 (m, 1H), 4.39-4.02 (m, 5H), 3.77, 3.76 (s, 3H), 3.74, 3.73 (s, 3H), 2.38-1.89 (m, 7H), 1.38-1.33 (t, 3H); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 173.7*, 163.9, 156.3, 150.3, 143.7*, 135.2, 120.7*, 114.3*, 110.5, 85.7*, 78.4*, 67.3*, 55.4, 52.4,

50.1*, 31.8*, 25.4*, 20.8*和 12.4*; ^{31}P NMR (CDCl_3) δ 3.27 和 3.52; MS(MALDI-TOF): 521.3 ($\text{M}+1+\text{Na}$); HPLC 保留时间=7.15, 7.66 分钟。

实施例 6

3dT 化合物 6-11 的抗病毒活性

用以前描述的方法(Zarling 等, 1990; Erice 等, 1993; Uckun 等, 1998, 同上)以与 d4T 并行比较的方式测试化合物 6-11 以及母体化合物 3dT 在外周血单核细胞及 TK-缺陷型 CEM T-细胞中抑制 HIV-1 复制的能力。

在外周血单核细胞及 TK-缺陷型 CEM T-细胞中 3dT 以及它的衍生物的活性较 d4T 低(表 3)。值得注意的是, 在外周血单核细胞中化合物 6-11 的 $\text{IC}_{50}[\text{RT}]$ 值高于 3dT 的 $\text{IC}_{50}[\text{RT}]$ 值(1.2-3.1 对 0.7, 表 3), 暗示这些前体药物是足够稳定的, 在它们的新陈代谢中不依赖 TK 的步骤, 或许它们的酶促水解, 可能是产生活性物的限速步骤。相比之下, 报道 d4T 的磷酸芳基酯衍生物较 d4T 更有效, 暗示依赖 TK 产生 d4T 单磷酸酯是其代谢激活的限速步骤(McGuigan 等, 1996a)。按照关于 d4T 和 AZT 的磷酸芳基酯衍生物的生物活性的文献报道结果(McGuigan 等, 1993, 1996a), 3dT 的磷酸芳基酯衍生物在 TK-缺陷型细胞中抑制 HIV-1 复制较其母体化合物 3dT 更有效, 虽然仍具有高微摩尔 $\text{IC}_{50}[\text{RT}]$ 值(表 3)。

因为化合物 6-11 的活性在 TK-缺陷型 CEM T-细胞中较在外周血单核细胞(PBMNC)中低, 所以推测在缺少 TK 时这些前体药物产生的 3dT 单磷酸酯转化为其活性的三磷酸酯是以较低的速率进行。比较起来, 在正常细胞和 TK-缺陷型细胞中 d4T 的磷酸芳基酯衍生物呈现出相似的活性(McGuigan 等, 1996 *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 6: 1183-1186)。

3'-脱氧胸腺嘧啶核苷的磷酸芳基酯衍生物(6-11)在正常外周血单核细胞(PBMNC)和 TK-缺陷型 CEM T-细胞中的抗 HIV 活性。所有的

数据用 μM 表示并且代表抑制病毒复制的浓度, 通过 RT 活性分析测量, 用 $50\%(\text{IC}_{50}[\text{RT}])^9$ 或 50% 细胞毒性浓度表示, 通过 MTA($\text{IC}_{50}[\text{MTA}]$) 测量(Mansuri 等, 1989 *J. Med. Chem.* 32: 461).

表 3

化合物	X	PBMNC		CEM	
		IC_{50} [RT]	IC_{50} [MTA]	IC_{50} [RT]	IC_{50} [MTA]
6	H	2.1	>100	7.5	>100
7	Cl	2.1	>100	21.9	>100
8	F	3.1	>100	32.7	>100
9	Br	1.2	>100	22.8	>100
10	NO	2.0	>100	22.6	>100
11	OMe	1.3	>100	19.7	>100
3dT	-	0.7	>100	91.2	>100
d4T	-	0.004	>100	2.335	>100

5

正如图 5A 和 5B 所示, 苯环上对位取代基的电子效应可能会影响在图 1 描述的 3dT 的磷酸芳基酯衍生物的新陈代谢途径中 B 水解转化为 D。预期在化合物 7-10(图 2A 和 2B)中苯基部分的对位吸电子取代基的存在将增加取代的苯氧基团水解的速率。可是, 这些化合物并不比没有对位取代的化合物 6 或具有供电子对位取代基的化合物 11 更有效, 因此提示假设在它们的新陈代谢(在图 1 中 A 到 B)中依赖于羧酸酯酶的第一步水解对于活性 3dT 代谢产物的产生起到一个关键的及限速的作用。因此, 按照对于核苷类似物的磷酸芳基甲氧基丙氨酸酯衍生物提出的新陈代谢途径, 化合物 7-10 可用作推测引起其水解的羧酸酯酶相对较少的底物(McIntee 等, 1997 *J. Med. Chem.* 40: 3323-3331)。

10

15

实施例 7

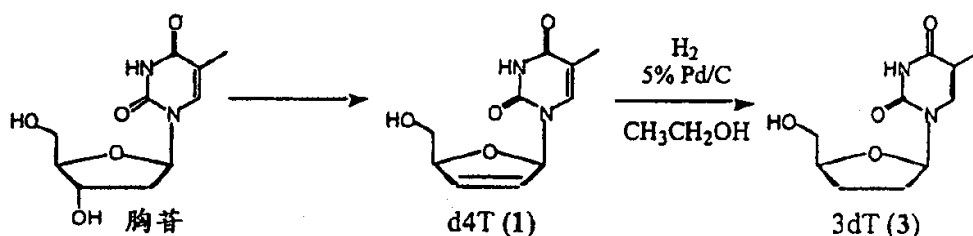
d4T、AZT 和 3dT 衍生物的抗 HIV 活性

正如方案 1 所示, 用文献方法(Mansuri 等, 1989, 同上)从胸腺嘧啶核苷制备 d4T 1. 在 H_2 及催化量的 5% Pd/C 的存在下在乙醇中进行 1 的氢化作用, 以 85% 的收率得到 3dT 3(方案 1).

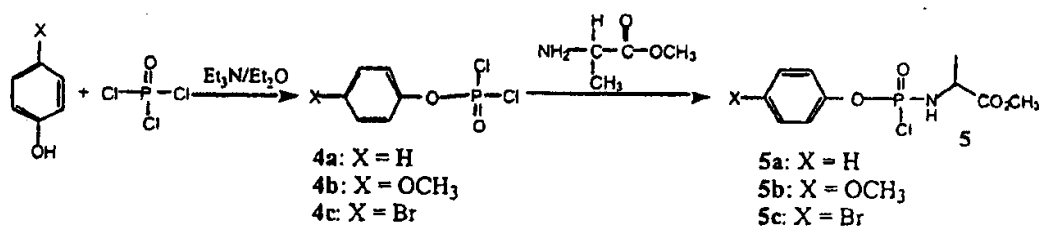
用文献方法(Chu 等, 美国专利第 4,841,039 号)从胸腺嘧啶核苷制备 AZT 2. 用商业渠道可获得的苯酚通过两步程序(方案 2)制备在其苯氧基部分具有不同取代基的 ddN 磷酸化剂 5a、5b 和 5c (McGuigan 等 1992, 同上), 从前报道过化合物 4a、4b、5a、5b、7a 和 7b. 化合物 4c 和 5c 为新化合物并且在下面报道它们的合成方法及特征数据.

正如方案 3 所示, 按照下列文献条件进行 d4T 1、AZT 2 和 3dT 3 的磷酸苯基甲氧基丙氨酸基酯衍生物的合成(McGuigan 等, 1992). 常规的合成方法如下: 将适当取代的氯代磷酸苯基甲氧基丙氨酸基酯 5 加入到需要的 ddN (1、2 或 3) 和 1-甲基咪唑的无水四氢呋喃(THF)混合物中. 在室温下搅拌该反应混合物 12 小时, 然后除去溶剂. 将得到的树脂状物重新溶解于氯仿中并用 1M HCl、饱和的碳酸氢钠溶液及水洗涤. 有机相用 $MgSO_4$ 干燥并且在真空下除去溶剂. 用甲醇和氯仿的混合溶剂作为洗脱剂的硅胶快速柱层析纯化该粗产物, 以好的收率得到需要的纯净化合物.

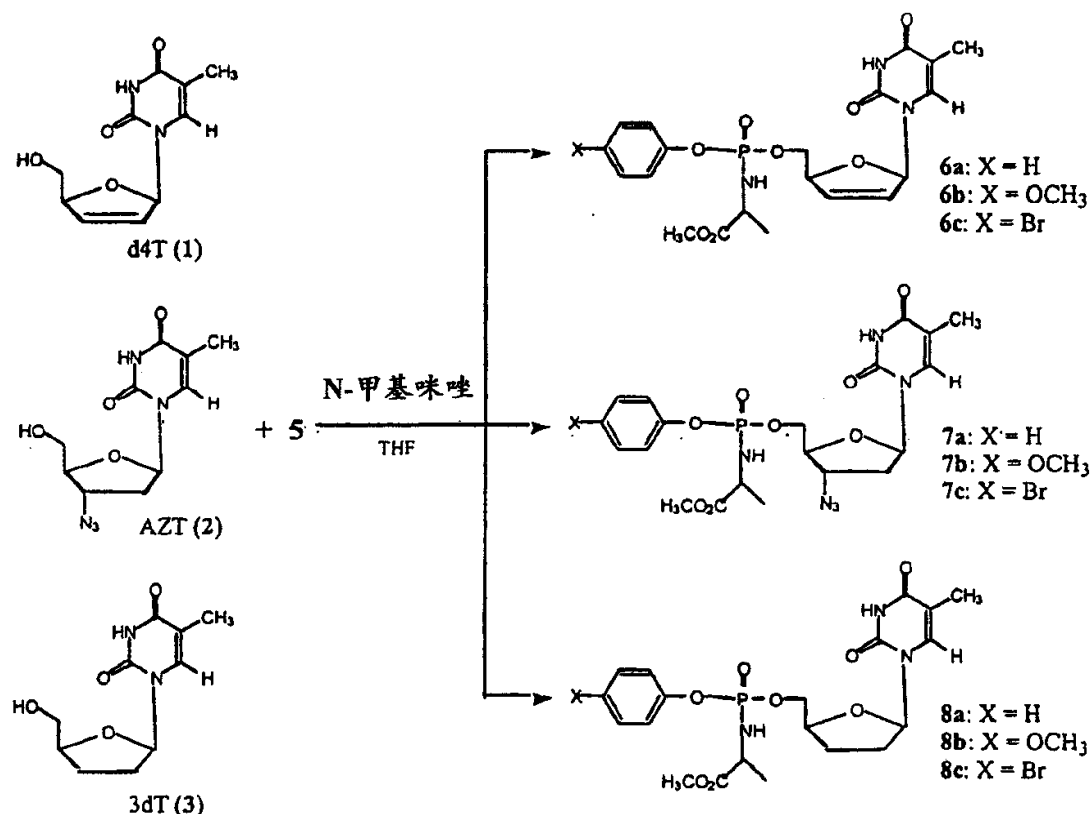
方案 1. d4T 和 3dT 的合成.



方案 2. 氯代磷酸苯基甲氧基丙氨酸酯的合成.



方案 3. ddN 的磷酸苯基甲氧基丙氨酸酯衍生物的合成.



- 5 磷酸二氯对-溴苯基酯 4c. 按照 McGuigan 等, 1993, 同上, 描述的方法, 在 0℃、氮气氛围下, 在 3 小时内将对-溴苯酚(13.20 g; 76.30 mmol)和蒸馏的三乙胺(10.65 ml)的无水 Et₂O(165 ml)溶液滴加到剧烈搅拌的的磷酸二氯(8.5 ml; 91.2 mmol)的无水 Et₂O(83 ml)溶液中. 随后将产生的混合物逐渐加温到室温, 在室温下搅拌过夜, 然后加热至回流两小时.
- 10 将反应混合物冷却至室温并在吸气器压力下过滤. 用无水 Et₂O(2x50 ml)洗涤沉淀. 将合并的 Et₂O 层在旋转蒸发器中蒸发至干得到粗产品 4c, 一种浅黄色的油状物, 然后将该油状物进行真空蒸馏得到纯净的 4c

(14.05 g; 63.5%的产率), 一种无色的粘稠油状物(bp. 110-115°C /2 mm Hg). IR (Neat): 3095, 1481, 1303, 1187, 948, 829 cm^{-1} ; ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.50 (2H, d, $J=9.0$ Hz), 7.15 (2H, d, $J=9.0$ Hz). GC/MS (m/e) 290 (M^+), 254 (M^+-Cl), 173 (M^+-POCl_2 , ^{81}Br), 171 (M^+-POCl_2 , ^{79}Br), 156 ($\text{M}^+-\text{PO}_2\text{Cl}_2$, ^{81}Br), 154 ($\text{M}^+-\text{PO}_2\text{Cl}_2$, ^{79}Br).

氯代磷酸对-溴苯基甲氧基丙氨酸酯 5c. 按照 McGuigan 等, 同上, 描述的方法, 在-70°C、氮环境下, 在3小时内中将蒸馏三乙胺(8.80 ml; 63.14 mmol)的无水 CH_2Cl_2 (180 ml)溶液经过一个附加漏斗滴加到剧烈搅拌的磷酸二氯对-溴苯基酯 4c (8.69 g; 29.97 mmol)和 L-丙氨酸甲酯盐酸盐(4.19 g; 30.02 mmol)的无水 CH_2Cl_2 (250 ml)溶液中。随后将产生的混合物逐渐加温到室温并在室温下搅拌过夜。在旋转蒸发器中除去溶剂。加入无水 Et_2O (300 ml)溶解该残余物并在吸气器压力下过滤以便移去白色固体。用无水 Et_2O (2x60 ml)冲洗白色固体。合并 Et_2O 层并蒸发至干, 得到定量收率的 5c (10.7 g), 一种浅粉黄色的粘稠油状物。不用进一步纯化可将该产品直接用于下一步反应。IR (Neat): 3212, 2989, 2952, 1747, 1483, 1270, 1209, 1147, 927, 831, 757 cm^{-1} ; ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 8.70 (1H, br, Ala-NH), 7.48 (2H, d, $J=9.0$ Hz, 芳基 H), 7.16 (2H, d, $J=9.0$ Hz, 芳基 H), 3.79 和 3.77 (3H, s&s, $-\text{OCH}_3$), 1.51 和 1.40 (3H, d&d, Ala- CH_3). MS (CI, m/e) 357.9 (M^+ , ^{81}Br), 355.9 (M^+ , ^{79}Br), 322.0 (M^+-Cl , ^{81}Br), 320.0 (M^+-Cl , ^{79}Br), 297.9 ($\text{M}^+-\text{COOCH}_3$, ^{81}Br), 295.9 ($\text{M}^+-\text{COOCH}_3$, ^{79}Br), 184.0 ($\text{M}^+-\text{BrC}_6\text{H}_4\text{O}$).

AZT 1、d4T 2 和 3dT 3 的磷酸苯基甲氧基丙氨酸酯衍生物的特征数据: HPLC 的进行条件为 C18 4x250 mm LiChrospher 柱, 用 70:30 水/乙腈作为洗脱剂, 流速为 1 ml/分钟。由于 HPLC, 下列化合物的纯度超过 96%。由于磷的立构中心引起的非对映异构体, 用星型符号标记的 ^{13}C NMR 峰是分裂的。

- 化合物 6a: 产率 81%; IR (Neat): 3222, 2985, 2954, 1743, 1693, 1593, 1491, 1456, 1213, 1153, 1039, 931, 769 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3) δ 9.30 (br s, 1H), 7.30-7.10 (m, 6H), 6.85-6.82 (m, 1H), 6.36-6.26 (m, 1H), 5.91-5.85 (m, 1H), 5.00 (br m, 1H), 4.19-3.68 (m, 4H), 3.72, 3.71 (s, 3H), 1.83, 1.80 (d, 3H), 1.38-1.25 (m, 3H); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 173.9, 163.7, 150.7, 149.7, 135.7*, 133.2*, 129.6*, 127.3*, 125.0*, 120.0, 111.1, 89.6*, 84.5*, 66.9*, 52.5*, 50.0*, 20.9 和 12.3; ^{31}P NMR (CDCl_3) δ 2.66, 3.20; MALDI-TOF 质谱 m/e: 487.9 (M+Na); HPLC 保留时间: 5.54 和 5.85 分钟。
- 10 化合物 6b: 产率 92%; IR (Neat): 3223, 3072, 2999, 2953, 2837, 1743, 1693, 1506, 1443, 1207, 1153, 1111, 1034, 937, 837 和 756 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3) δ 9.40 (br s, 1H), 7.30-7.00 (m, 5H), 6.83-6.81 (m, 1H), 6.37-6.27 (m, 1H), 5.91-5.86 (m, 1H), 5.00 (br m, 1H), 4.40-4.30 (m, 2H), 4.20-4.10 (m, 2H), 3.95-3.93 (s, 3H), 3.82-3.80 (s, 3H), 1.85-1.81 (s, 3H) 和 1.39-1.29 (m, 3H); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 174.0, 163.9, 156.6, 150.8, 143.5, 135.8*, 133.3*, 127.4*, 121.2*, 114.5, 111.2, 89.7*, 84.5, 66.9*, 55.5, 52.5, 50.6*, 20.9 和 12.3; ^{31}P NMR (CDCl_3) δ 3.82, 3.20; MALDI-TOF 质谱 m/e: 518.2 (M+Na); HPLC 保留时间: 5.83 和 6.26 分钟。
- 15 20 化合物 6c: 产率 83%; IR (Neat): 3203, 3070, 2954, 2887, 2248, 1743, 1693, 1485, 1221, 1153, 1038, 912, 835, 733 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3) δ 9.60-9.58 (br s, 1H), 7.45-7.42 (m, 2H), 7.30-7.09 (m, 4H), 6.37-6.27 (m, 1H), 5.93-5.88 (m, 1H), 5.04-5.01 (br m, 1H), 4.35-4.33 (m, 2H), 4.27-3.98 (m, 2H), 3.71-3.70 (s, 3H), 1.85-1.81 (s, 3H), 1.37-1.31 (m, 3H); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 173.7, 163.8, 150.8, 149.7*, 135.6*, 133.1*, 127.4*, 121.9*, 118.0, 111.2*, 89.7*, 84.4*, 67.8*, 52.5, 50.0*, 20.7 和 12.3; ^{31}P NMR (CDCl_3) δ 3.41, 2.78; MALDI-TOF 质谱 m/e: 567.1 (M+Na); HPLC 保留时间: 12.04 和 12.72 分钟。
- 25

化合物 7c: 产率 95%; IR (Neat): 3205.7, 3066.3, 2954.5, 2109.8, 1745.3, 1691.3, 1484.9, 1270.9, 1153.2, 1010.5 和 926.1 cm^{-1} ; ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 8.69 (1H, br, 3-NH), 7.45 (2H, d, $J=9.0\text{Hz}$, 芳基 H), 7.34 和 7.32 (1H, s&s, 乙烯基 H), 7.11 (2H, d, $J=9.0\text{Hz}$, 芳基 H), 6.18 & 6.13 (1H, t&t, $J=6.6\&6.6\text{Hz}$, C-1'位 H), 4.44-3.77 (6H, m, C-3', 4'和 5' H, Ala-NH 和 Ala-CH), 3.73&3.72 (3H, s&s, $-\text{COOCH}_3$), 2.51-2.20 (2H, m, C-2'位 H), 2.18 (3H, s, C-5 位- CH_3), 1.39&1.36 (3H, d&d, Ala- CH_3); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 173.6, 163.6, 150.1, 149.2, 149.1, 135.2, 132.4, 121.6, 117.8, 111.1, 85.0, 84.7, 81.9, 81.8, 65.5, 60.1, 59.9, 52.4, 50.0, 49.9, 36.9, 20.6, 20.5, 12.2. MS (CI, m/e): 589.1 (M^+ , ^{81}Br)和 587.1 (M^+ , ^{79}Br).

化合物 8a: 产率 96%; IR (Neat): 3211, 2955, 2821, 1689, 1491, 1265, 1211, 1153, 1043 和 933 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3) δ 10.1 (br s, 1H), 7.47 (s, 1H), 7.32-7.12 (m, 5H), 6.14-6.08 (m, 1H), 4.41-4.21 (m, 4H), 4.05-4.00 (m, 1H), 3.70, 3.69 (s, 3H), 2.37-2.32 (m, 1H), 2.05-1.89 (m, 7H), 1.38-1.35 (dd, 3H); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 173.6*, 163.8, 150.3, 150.1*, 135.2, 129.4*, 124.7, 119.8*, 110.5*, 85.7*, 78.3*, 67.2*, 52.3, 50.1*, 31.6*, 25.4*, 20.7*和 12.4*; ^{31}P NMR (CDCl_3) δ 2.82 & 3.11; MS (MALDI-TOF): 490.4 ($\text{M}+\text{Na}$); HPLC 保留时间=6.86, 7.35 分钟.

化合物 8b: 产率 100%; IR (Neat): 3209, 2954, 1743, 1506, 1468, 1265, 1207, 1153, 1036, 937 和 835 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3) δ 9.89 (br s, 1H), 7.49-7.47 (m, 1H), 7.16-7.11 (m, 2H), 6.84-6.80 (m, 2H), 6.15-6.09 (m, 1H), 4.39-4.02 (m, 5H), 3.77, 3.76 (s, 3H), 3.74, 3.73 (s, 3H), 2.38-1.89 (m, 7H), 1.38-1.33 (t, 3H); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 173.7*, 163.9, 156.3, 150.3, 143.7*, 135.2, 120.7*, 114.3*, 110.5, 85.7*, 78.4*, 67.3*, 55.4, 52.4, 50.1*, 31.8*, 25.4*, 20.8*和 12.4*; ^{31}P NMR (CDCl_3) δ 3.27, 3.52; MS (MALDI-TOF): 521.3 ($\text{M}+1+\text{Na}$); HPLC 保留时间=7.15, 7.66 分钟.

化合物 **8c**: 产率 83%; IR (Neat): 3211, 2954, 1743, 1689, 1485, 1265, 1217, 1153, 1010, 923 和 833 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3) δ 9.82 (br s, 1H), 7.45-7.41 (m, 3H), 7.15-7.11 (m, 2H), 6.14-6.06 (m, 1H), 4.39-4.00 (m, 5H), 3.71, 3.70 (s, 3H), 2.38-1.89 (m, 7H), 1.39-1.35 (dd, 3H); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 173.6*, 163.8, 150.3, 148.5*, 135.2, 132.6*, 121.8*, 117.7, 110.6*, 85.9*, 78.3*, 67.2*, 52.5, 50.2*, 31.6*, 25.6*, 20.8* 和 12.5; ^{31}P NMR (CDCl_3) δ 2.83, 3.05; MS (MALDI-TOF): 570.0 ($\text{M}+2+\text{Na}$); HPLC 保留时间=15.50, 16.57 分钟。

- 10 抗 HIV 活性和细胞毒性的细胞分析 用 AZT-敏感的 HIV-1 (病毒株: HTLVIII_B)、AZT-和 NNI-抗性 HIV-1 (病毒株: RTMDR-1)(由 Dr. Brendan Larder 惠赠, NIH AIDS Research and Reference Reagent Program, DIV. AIDS, NIAID, NIH; cat. # 2529)或 HIV-2 (病毒株: CBL-20)感染的外周血单核细胞(PBMNC)以及 HTLVIII_B 感染的 TK-缺陷型 CEM T-细胞, 通过测定抑制病毒复制达 50%所需要的化合物浓度评估抗 HIV 活性, 该测定是以逆转录酶的活性分析为基础($\text{IC}_{50}[\text{RT}]$)。通过比较受试物质处理的感染细胞的 RT 活性值和未处理的感染细胞(即病毒对照)的 RT 活性值计算抑制病毒复制的百分率。通过微量培养四唑鉴定法 (MTA), 采用 2,3-双(2-甲氧基-4-硝基-5-硫苯基)-5-[苯氨基-羰基]-2H-四唑氢氧化物(XTT), 检测所述化合物的 50%细胞毒性($\text{CC}_{50}[\text{MTA}]$) (Zarling 等, 1990; Erice 等, 1993, Uckun 等, 1998, 同上)。
- 15
- 20

d4T-5'-(磷酸对-溴苯基甲氧基丙氨酸基酯)和 AZT-5'-(磷酸对-溴苯基甲氧基丙氨酸基酯)作为有效的抗 HIV 剂的鉴定

- 25 当在 HIV-1 感染的 PBMNC 中试验时, d4T 磷酸苯基酯衍生物并不比其母体化合物 d4T 更有效。在 TK-缺陷型 CEM 细胞中 D4T 抑制 HIV-1 复制的能力明显下降。d4T 抑制 RT 活性的 IC_{50} 值在 PBNMC 中为 40 nM, 而在 TK-缺陷型 CEM 细胞中为 2400 nM (表 4 及图 4A-4F)。

尽管在 TK-缺陷型 CEM 细胞中所有三种磷酸苯基酯衍生物比 d4T 更有效,但是在苯基部分具有对-溴取代基的化合物 6c(d4T-5'-[磷酸对-溴苯基甲氧基丙氨酸基酯])在抑制 RT 活性方面比 d4T 强 60 倍(IC_{50} 值: 60 nM 对 2400 nM)(表 4)。

5 通过 MTA 测定,所有的化合物在浓度高达 10,000 nM 时对 PBMNC 或 CEM 细胞没有任何一个呈现可检测到的细胞毒性。有趣的是,在苯基部分具有对-甲氧基取代基的化合物 6b 在抑制 HIV 感染的 TK-缺陷型 CEM 细胞的 RT 活性方面较化合物 6c 低 5 倍(IC_{50} 值: 300 nM 对 60 nM),虽然这两个化合物在外周血单核细胞中呈现相似的活性(IC_{50} 值: 30 nM 对 40 nM)(表 4)。

10 测试化合物 7a、7b、7c 和它们的母体化合物 AZT 2 在 PBMNC 和 TK-缺陷型 CEM T-细胞中抑制 HIV 复制的能力(表 4)。通过比较受试物质处理的感染细胞的 RT 活性值和未处理的感染细胞的 RT 活性值计算抑制病毒复制的百分率。同时,用细胞增生的微量培养四唑分析法(MTA)检测所述化合物的细胞毒性。在 TK-缺陷型 CEM 细胞中 AZT 2 抑制 HIV-1 复制的能力显著下降。AZT 抑制 RT 活性的 IC_{50} 值在 PBMNC 中为 3 nM,在 TK-缺陷型 CEM 细胞中为 200 nM。不同于对应的 d4T 衍生物,当在 HIV-1 感染的 TK-缺陷型 CEM T-细胞中试验时, AZT 的未取代的和对位取代的磷酸苯基酯衍生物并不比母体化合物 AZT 更有效。可是, AZT 的磷酸对-溴取代的苯基酯衍生物即 AZT-5'-[磷酸对-溴苯基甲氧基丙氨酸基酯] 7c,在抑制 TK-缺陷型 CEM 细胞的 HIV 复制的有效性是 AZT 的 5 倍(IC_{50} [RT]值: 0.04 μ M 对 0.2 μ M)。通过 MTA 测定,在浓度高达 10,000 nM 时对 PBMNC 或 CEM 细胞没有任何一个化合物呈现可检测到的细胞毒性。

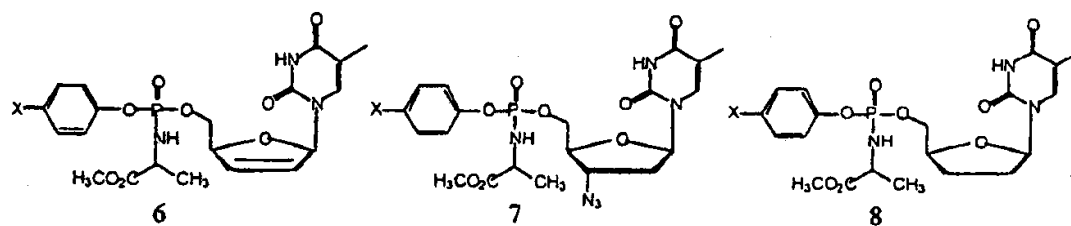
25 与 d4T 1 并行比较,测试化合物 8a-c 及其母体化合物 3dT 3 在 PBMNC 和 TK-缺陷型 CEM T-细胞中抑制 HIV-1 复制的能力。在外周血单核细胞及 TK-缺陷型 CEM T-细胞中 3dT 及其衍生物的活性较 d4T 低(表 4)。值得注意的是,在外周血单核细胞中,化合物 8a-c 的 IC_{50} [RT]

值高于 3dT 的 $IC_{50}[RT]$ 值(1.2-3.1 对 0.7, 表 4), 提示这些前体药物是足够稳定的并且在它们的代谢、或许其酶促水解中不依赖 TK 的步骤可能是产生活性物的限速步骤。按照关于 d4T 和 AZT 的磷酸苯基酯衍生物的生物活性的文献报道结果, 3dT 的磷酸苯基酯衍生物在 TK-缺陷型细胞中抑制 HIV-1 复制较其母体化合物 3dT 更有效, 虽然仍具有高微摩尔 $IC_{50}[RT]$ 值(表 4 及图 4A-4F)。因为化合物 8a-c 的活性在 TK-缺陷型 CEM T-细胞中较在 PBMNC 中低, 所以我们推测在缺少 TK 时这些前体药物产生的 3dT 单磷酸酯转化为其具有活性的三磷酸酯以非常低的速率进行。

10

表 4

d4T、AZT 和 3dT 的磷酸苯基甲氧基丙氨酸酯衍生物在正常的外周血单核细胞(PBMNC)和 TK-缺陷型 CEM T-细胞中的抗 HIV 活性



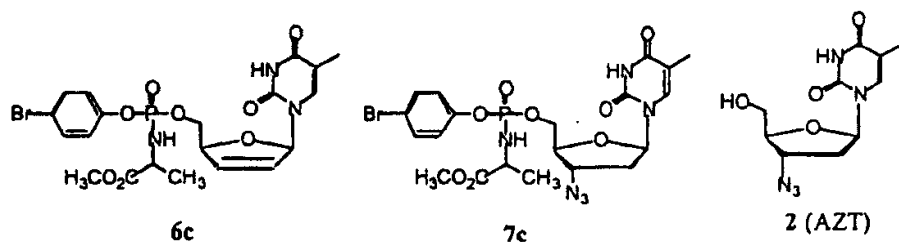
化合物	X	PBMNC		CEM	
		IC_{50} [RT]	IC_{50} [MTA]	IC_{50} [RT]	IC_{50} [MTA]
6a	H	N.D	N.D	0.1	>10
6b	OCH ₃	0.03	>10	0.3	>10
6c	Br	0.04	>10	0.06	>10
7a	H	N.D	N.D	1.7	>10
7b	OMe	0.1	>10	4.1	>10
7c	Br	0.004	>10	0.04	>10
8a	H	2.1	>10	7.5	>10
8b	OMe	1.3	>10	19.7	>10
8c	Br	1.2	>10	22.8	>10
1 (d4T)	-	0.04	>10	2.4	>10
2 (AZT)	-	0.003	>10	0.2	>10
3 (3dT)	-	0.7	>10	91.2	>10

先导化合物 d4T-5'-(磷酸对-溴苯基甲氧基丙氨酸基酯)和 AZT-5'-(磷酸对-溴苯基甲氧基丙氨酸基酯)抗 HIV-2 和 RTMDR-1 的活性

与 AZT 2 平行比较,测试化合物 6c 和 7c 对在 PBMNC 中的 RTMDR-1(一种 AZT 和 NNI 抗性 HIV-1 株) 和 HIV-2 的 HIV 复制的抑制能力(表 5)。新的 d4T 衍生物 6c 即 d4T-5'-(磷酸对-溴苯基甲氧基丙氨酸基酯), 对 RTMDR-1 具有有效的抗病毒活性并对 HIV-2 具有中度活性。可是, 对应的 AZT 的磷酸对-溴取代苯基甲氧基丙氨酸基酯衍生物 7c 和其母体化合物 AZT 2 并不能有效地抗 AZT 抗性 RTMDR-1 或抗 HIV-2。

表 5

先导化合物 6c 和 7c 在 HIV-2 和 RTMDR-1 细胞中的抗 HIV 活性



	HIV-2	RTMDR-1
化合物	IC ₅₀ [RT]	IC ₅₀ [RT]
6c	0.4	0.02
7c	3.9	1.5
2 (AZT)	2.4	2.0

所有的数据用 uM 表示并且代表抑制病毒复制 50%需要的浓度(IC₅₀[RT]), 通过 RT 活性分析进行测量。

在 TK-缺陷型 CEM 细胞中化合物 6a、6b 和 6c 都比它们的母体化合物 d4T 1 更有效, 而在 HIV-1 感染的 PBMNC 中这些 d4T 磷酸苯基酯衍生物(6a、6b 和 6c)并不比它们的母体化合物 d4T 1 更有效(表 4)。比较所有的 d4T 磷酸苯基甲氧基丙氨酸基酯衍生物, 在 TK-缺陷型 CEM 细胞中 d4T-5'-(磷酸对-溴苯基甲氧基丙氨酸基酯) 6c 是最有效的

抗 HIV 剂。所述观察结果可能归因于 6c 的苯基部分上的对-溴取代基，由于溴取代基的吸电子性质(图 2)使该取代基增加 6c 的磷进行水解的能力并且导致在 TK-缺陷型 CEM T-细胞中产生明显更高量的关键代谢产物 d4T 单磷酸酯(McIntee 等, 1997, *J. Med. Chem.* 40: 3233-3331)。

5 在 TK-缺陷型 CEM 细胞中 AZT 的磷酸苯基酯、磷酸甲氧基苯基酯和磷酸溴苯基酯衍生物的药效也具有与 d4T 衍生物的同样药效趋势，也就是 7c(溴苯基酯)>7a(苯基酯)>7b(甲氧基苯基酯)。可是，在这三种 AZT 磷酸苯基甲氧基丙氨酸基酯衍生物(7a、7b 和 7c)中，在 TK-缺陷型 CEM 细胞中只有 7c 具有比 AZT 高的药效(IC₅₀ 值: 40 nM 对 200
10 nM)。对于 3dT 磷酸苯基甲氧基丙氨酸基酯衍生物，预料在苯基部分的对位吸电子取代基的存在将增加化合物 8c 的取代的苯氧基团水解的速率(例如图 2 中的 B 到 C)。可是，8c 并不比没有对位取代的 8a 化合物或具有供电子对位取代基的 8b 化合物更有效，因此提出这样的假设：在它们的新陈代谢中依赖于羧酸酯酶的第一水解步骤(例如图 2 中的
15 A 到 B)对于活性 3dT 代谢产物的产生起到一个关键的及限速的作用。对于核苷类似物的磷酸苯基甲氧基丙氨酸基酯衍生物(图 2)，我们推测按照所提出的新陈代谢途径，化合物 8a、8b 和 8c 可能起作推定引起水解的羧酸酯的较差的底物。3dT 磷酸芳基酯衍生物的作用并不象关于前体药物型的非常相似的核苷类似物 d4T 的代谢和活性的公开
20 著作所预期的那样。令我们非常惊奇的是，在 HIV-1 感染的正常外周血单核细胞或 TK-缺陷型 CEM T-细胞系中 3dT 磷酸芳基酯衍生物并没有引起有希望的抗 HIV 活性。

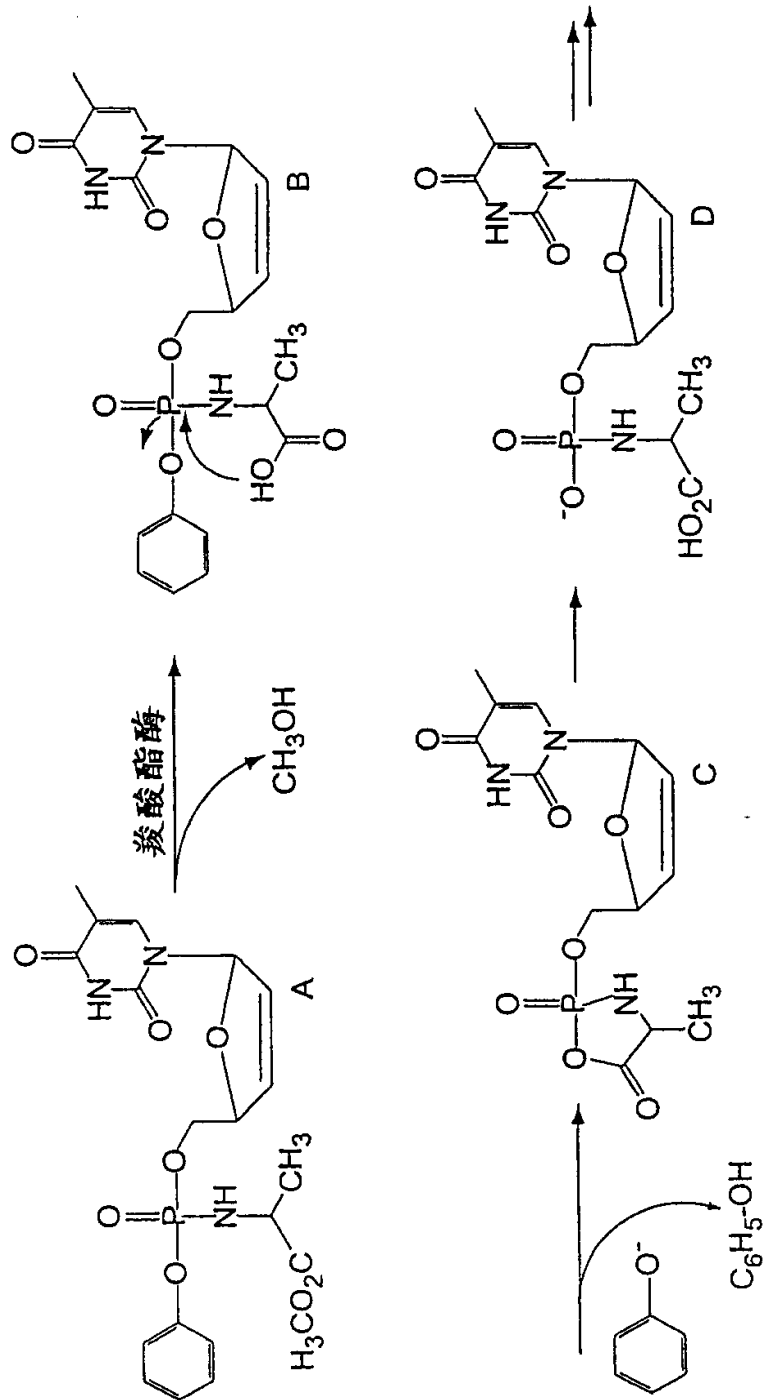
25 总之，认为 d4T-5'-(磷酸对-溴苯基甲氧基丙氨酸基酯) 6c 和 AZT-5'-(磷酸对-溴苯基甲氧基丙氨酸基酯) 7c 是抗 HIV 的活性剂，在 TK-缺陷型 CEM T-细胞中可有效地抑制 HIV 复制而没有任何可检测到的细胞毒性。另外，所述新的 d4T 衍生物 6c 对 RTMDR-1 即一种 AZT 及 NNI 抗性 HIV-1 株具有有效的抗病毒活性而对 HIV-2 具有中度活性。与这些 d4T 和 AZT 衍生物相比，相应的 3dT 衍生物即 3dT-5'-(磷

5 酸对-溴苯基甲氧基丙氨酸基酯)在 PBMNC 或 TK-缺陷型 CEM T-细胞中并没有显著的抗 HIV 活性。据我们所知, 这是首次综合报道从前未曾认识到的结构活性关系, 该关系决定 d4T 和 AZT 的磷酸苯基酯衍生物的效率。先导化合物 6c 和 7c 的进一步开发可以为设计有效的 HIV 治疗策略提供根据, 该策略能够在 TK-缺陷型细胞中抑制 HIV 复制。

尽管以上提供了本发明的详细说明, 但是本发明并不局限于此。可以修改在此描述的本发明, 包括变通的实施方案, 这对于本领域的技术人员而言是显而易见的。接下面的权利要求, 应该认为所有这类变通均在本发明的实质和范围内。

说明书附图

图 1



文献提出的 d4T 磷酸芳基酯衍生物的代谢途径.

图 2A

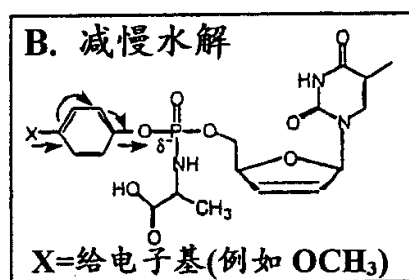
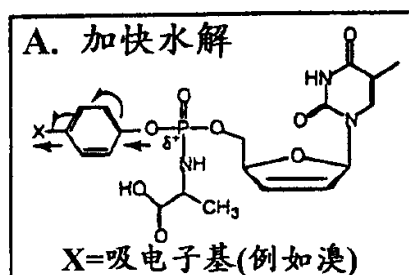


图 2B

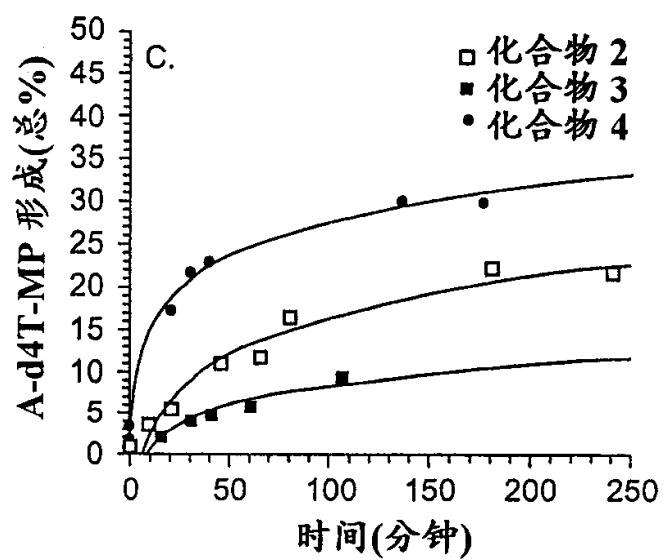


图 2C

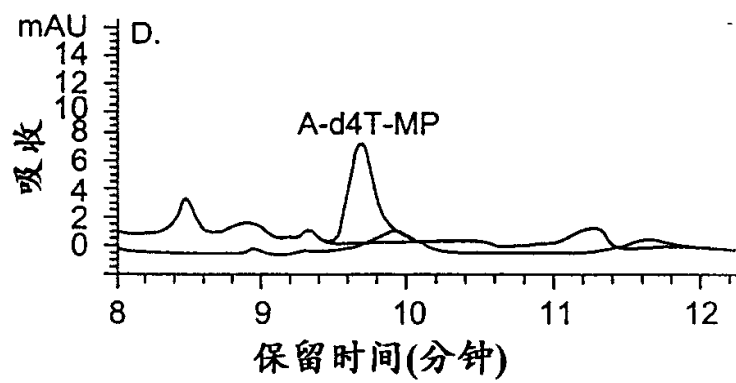


图 2D

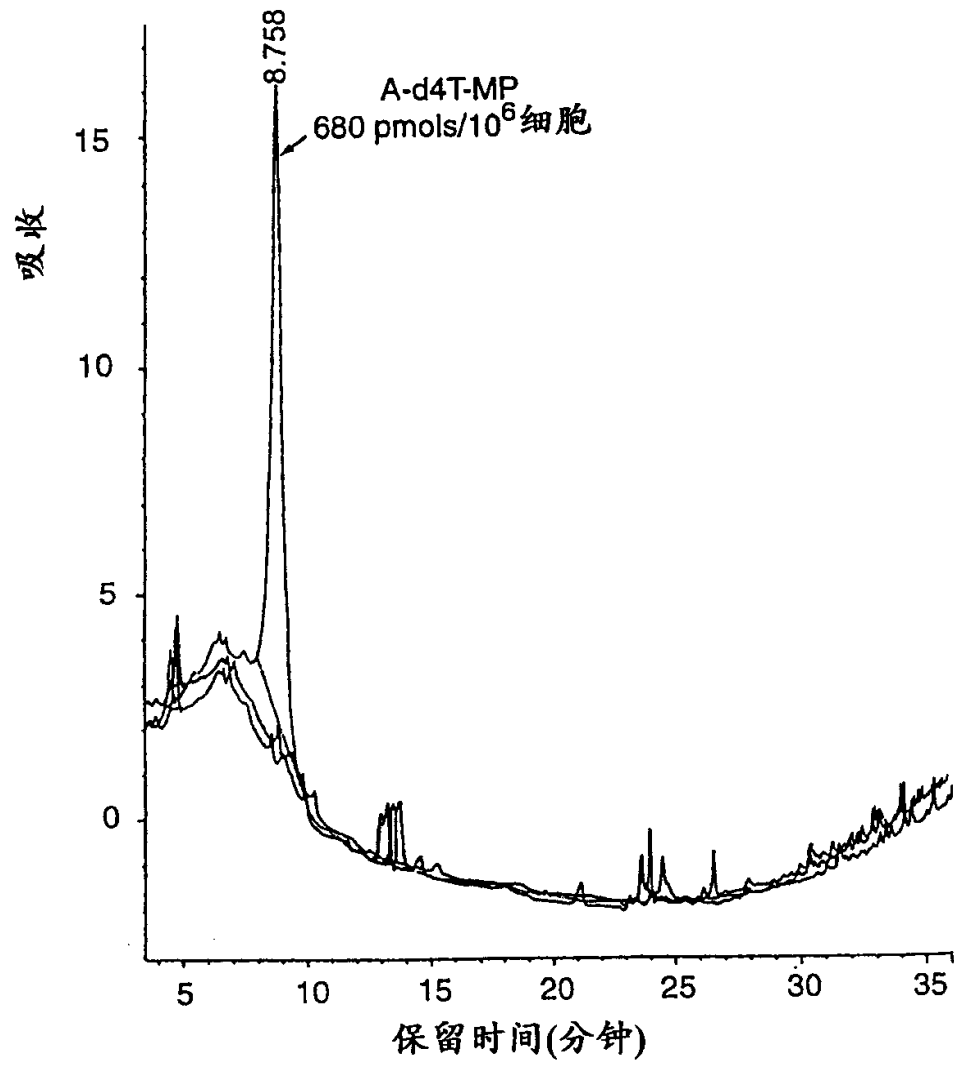


图 3

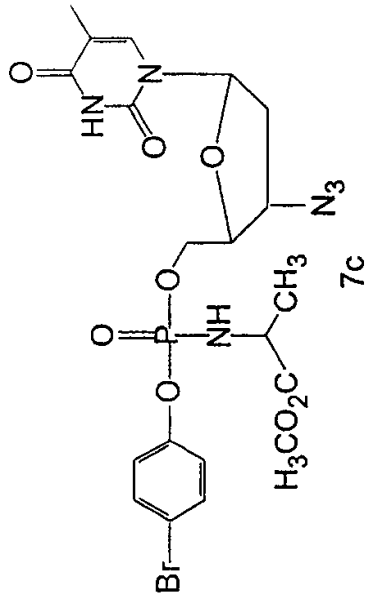


图 4B

图 4D

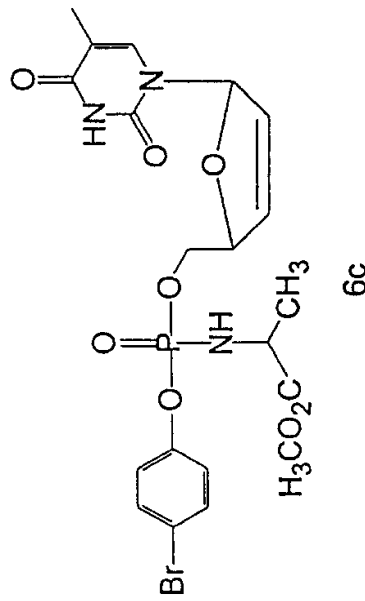
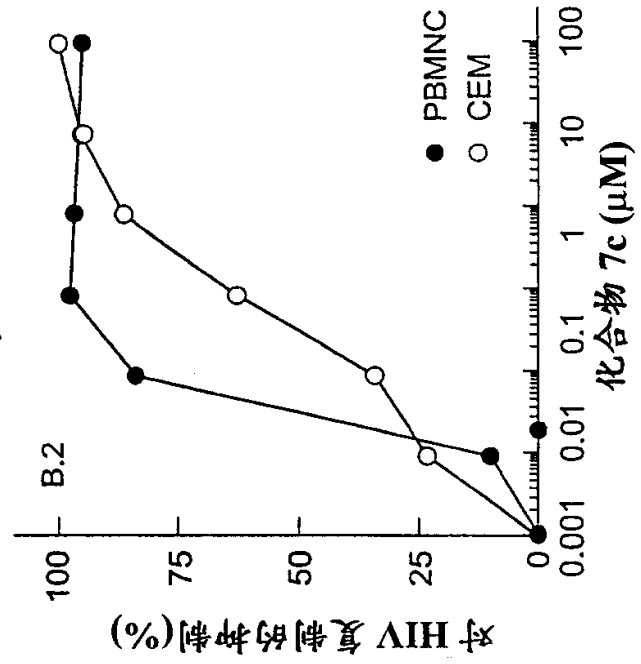
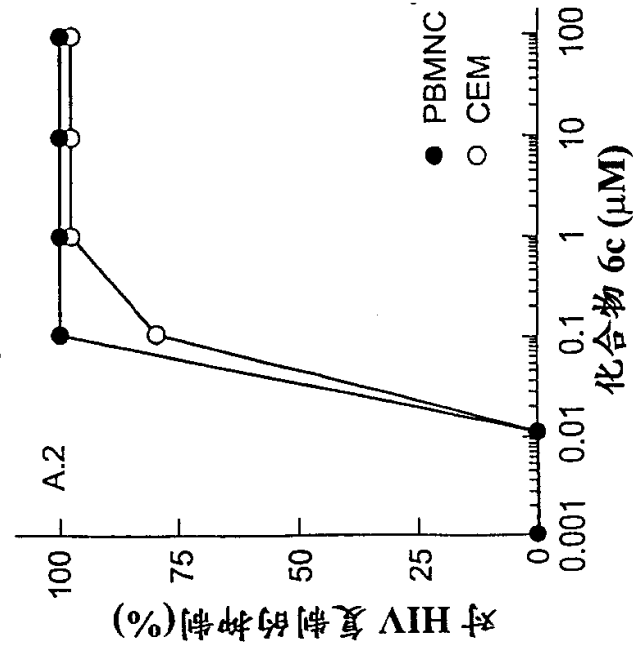


图 4A

图 4C



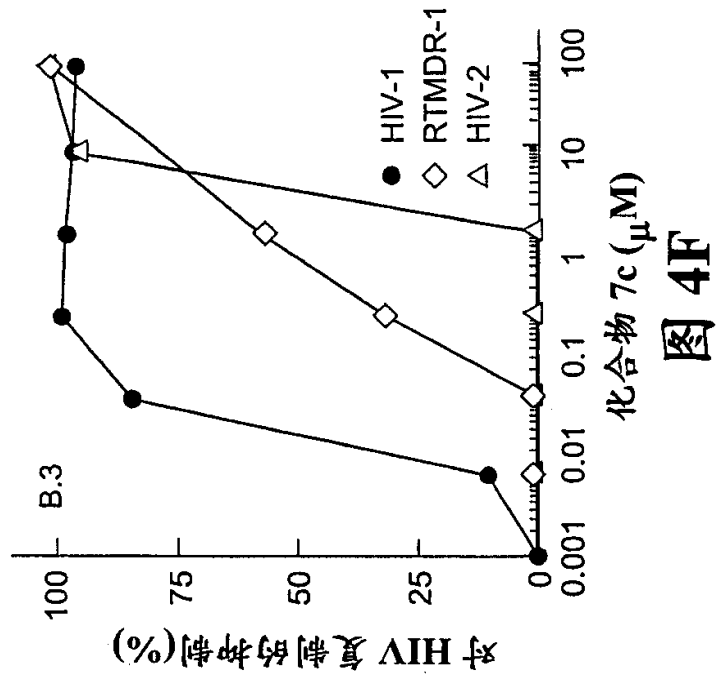


图 4F

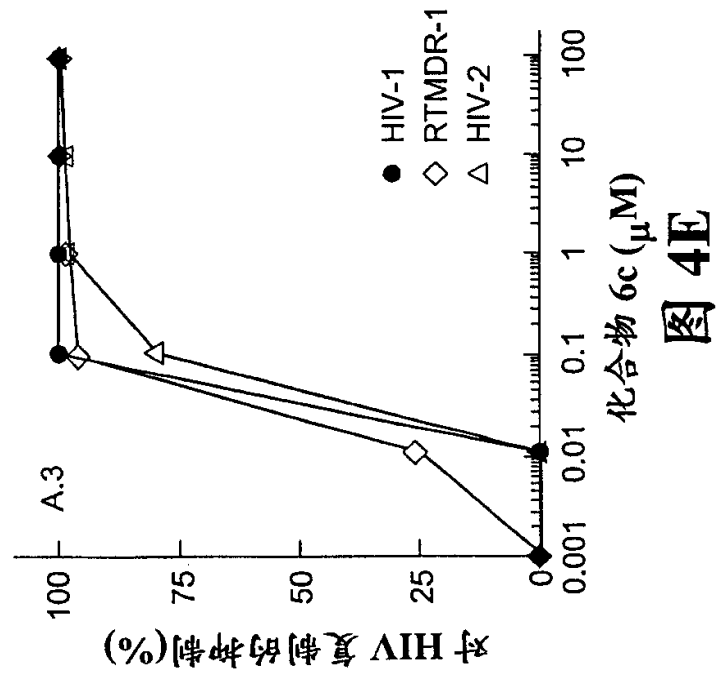


图 4E

图 5A

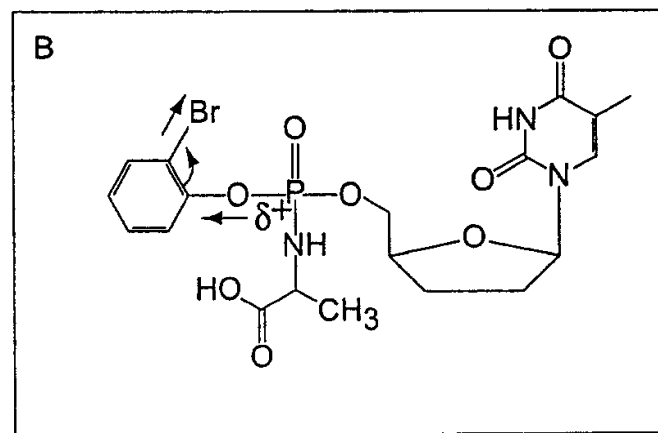
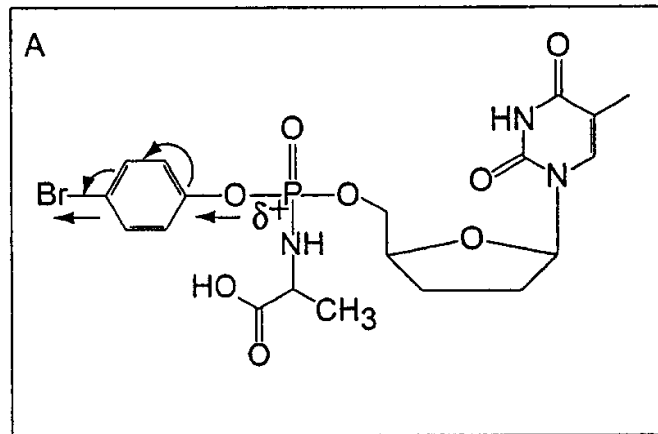


图 5B