(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105722849 B
(45)授权公告日 2019.01.29

(21)申请号 201480047068.3

(22)申请日 2014.08.28

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 105722849 A

(43)申请公布日 2016.06.29

(30)优先权数据
1350991-4 2013.08.28 SE

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2016.02.25

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2014/068252 2014.08.28

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2015/028548 EN 2015.03.05

(73)专利权人 阿登诺维尔制药公司
地址 瑞典赫尔辛堡

(72)发明人 尼克拉斯·阿恩贝里
雷米·卡拉瓦略
米卡尔·埃洛夫松

(74)专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公司 11021
代理人 牛海军

(51)Int.Cl.
C07H 15/26(2006.01)
A61K 31/7056(2006.01)
A61P 31/12(2006.01)

(56)对比文件
WO 2007/011696 A2,2007.01.25,
Lisa Moni,等.Immobilization of calix[4]arene-based glycoclusters on TiO2 nanoparticles via click Cu(I)-catalyzed azide-alkyne coupling.《Chemical Communications》.2009,第46卷(第3期),第477页方案4.
Sara Spjut,等.A Potent Trivalent Sialic Acid Inhibitor of Adenovirus Type 37 Infection of Human Corneal Cells.《Angewandte Chemie》.2011,第59卷(第29期),第6520页方案1,第6521页最后一段.
Johansson,等.Multivalent sialic acid conjugates inhibit adenovirus type 37 from binding to and infecting human corneal epithelial cells.《Antiviral Research》.2007,第73卷(第2期),92-100.
Alberto Marra,等.Synthesis of sialoclusters appended to calix[4]arene platforms via multiple azide-alkyne cycloaddition. New inhibitors of hemagglutination and cytopathic effect mediated by BK and influenza A viruses.《Organic & Biomolecular Chemistry》.2008,第6卷(第8期),第1400页方案3.
Ilona Papp,等.Inhibition of Influenza Virus Activity by Multivalent Glycoarchitectures with Matched Sizes.《Chembiochem》.2011,第12卷(第6期),第889页图1.
Johansson,等.Multivalent HSA conjugates of 3″-sialyllactose are potent inhibitors of adenoviral cell attachment and infection.《Chembiochem》.2005,第6卷(第2期),358-364.

审查员 刘冬

权利要求书2页 说明书26页 附图6页

CN 105722849 B

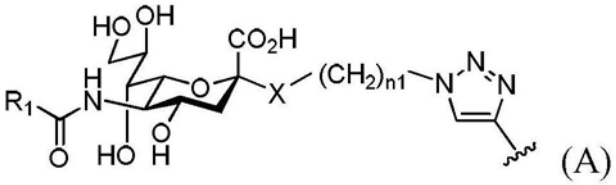
(54)发明名称

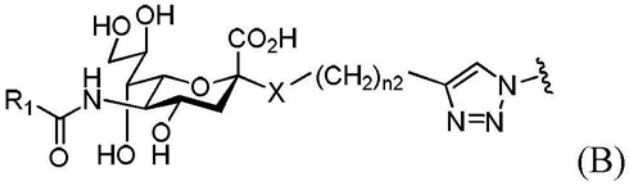
多价唾液酸衍生物

(57)摘要

本文公开了三价或四价唾液酸衍生物,其包含经由连接体连接有3或4个唾液酸残基的核心部分。这样的衍生物抑制腺病毒与人细胞的结合,由此通过施用所述三价或四价唾液酸衍生物可以治疗或预防感染如流行性角膜结膜炎。

1.一种三价或四价唾液酸衍生物,所述衍生物包含连接有3或4个根据式A或B的基团的核心部分,


(A)


(B)

其中

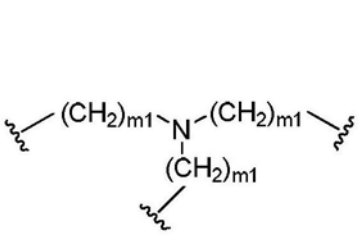
"X"是O(氧)或S(硫);

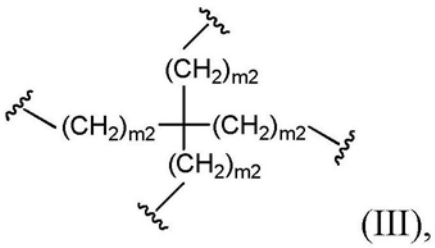
R1是甲基;

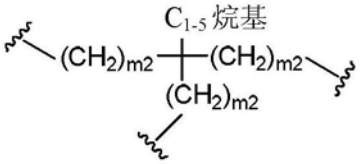
整数"n1"为2至3;

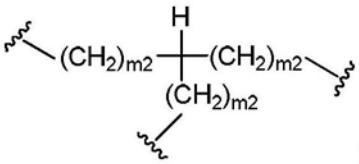
整数"n2"为1、2或3;并且

波形线指示与所述核心部分连接的点;其中所述核心部分是根据式II至V中任一个的部分,


(II),


(III),


(IV) 和


(V)

其中

如果连接至所述部分II的基团是根据式A的基团,则式II中的整数"m1"为1至8;

如果连接至所述部分II的基团是根据式B的基团,则式II中的整数"m1"为2至8;

整数"m2"为1至3;并且

波形线指示与根据式A或B的基团连接的点;

所述衍生物为下列形式:游离碱、以其非带电质子化形式的酸、两性离子或药用加成盐。

2.根据权利要求1所述的唾液酸衍生物,其中"X"是O(氧)。

3.根据权利要求1所述的唾液酸衍生物,其中所述基团是根据式A的基团。

4.根据权利要求1所述的唾液酸衍生物,其中所述基团是根据式B的基团。

5.根据权利要求1所述的唾液酸衍生物，其中以其游离形式的所述衍生物的分子量为1,500Da以下。

6.根据权利要求1所述的唾液酸衍生物，其中所述核心部分是根据式(II)的部分。

7.根据权利要求6所述的唾液酸衍生物，其中所述基团是根据式A的基团。

8.根据权利要求6所述的唾液酸衍生物，其中所述基团是根据式B的基团。

9.根据权利要求1所述的唾液酸衍生物，其中所述唾液酸衍生物选自由以下各项组成的组：

三((2-O-(5-N-乙酰氨基-3,5-二脱氧-D-甘油基-α-D-半乳-2-尤罗吡喃索尼克酸)-2-氧代乙基-1H-1,2,3-三唑-4-基)甲基)胺；

三((3-O-(5-N-乙酰氨基-3,5-二脱氧-D-甘油基-α-D-半乳-2-尤罗吡喃索尼克酸)-3-氧代丙基-1H-1,2,3-三唑-4-基)甲基)胺；

三((2-O-(5-N-丙酰氨基-3,5-二脱氧-D-甘油基-α-D-半乳-2-尤罗吡喃索尼克酸)-2-氧代乙基-1H-1,2,3-三唑-4-基)甲基)胺;和

三((3-O-(5-N-丙酰氨基-3,5-二脱氧-D-甘油基-α-D-半乳-2-尤罗吡喃索尼克酸)-3-氧代丙基-1H-1,2,3-三唑-4-基)甲基)胺。

10.根据权利要求1所述的唾液酸衍生物，其中所述唾液酸衍生物作为纯立体异构体或以包含所述化合物的端基异构体混合物存在，在所述端基异构体混合物中α-端基异构体占优势。

11.一种用于对眼给药的药物组合物，所述药物组合物包含根据权利要求1至10中任一项的唾液酸衍生物和至少一种药用赋形剂。

12.根据权利要求11所述的药物组合物，其中所述组合物是包含0.001至10mM的根据权利要求1至9中任一项的唾液酸衍生物的含水组合物，所述含水组合物具有至少90重量%的水含量。

13.根据权利要求12所述的药物组合物，其中所述含水组合物包含试剂以提供等渗溶液。

14.根据权利要求13所述的药物组合物，其中所述含水组合物包含NaCl以提供等渗溶液。

15.根据权利要求12所述的药物组合物，其中所述含水组合物被缓冲。

16.根据权利要求15所述的药物组合物，其中所述含水组合物具有约6.5至8的pH。

17.根据权利要求1至10中任一项的唾液酸衍生物或根据权利要求11或16中任一项的药物组合物的用于制备药物的用途。

18.根据权利要求1至10中任一项的唾液酸衍生物或根据权利要求11或17中任一项的药物组合物的用于制备用于治疗和/或预防由病毒引起的眼部感染的药物的用途，所述病毒结合至在要被所述病毒感染的细胞的细胞表面上存在的末端唾液酸残基。

19.根据权利要求18的用途，其中所述感染由选自由以下各项组成的组中的病毒引起：HAdV-8、HAdV-19、HAdV-37、HAdV-53、HAdV-54和HAdV-56。

20.根据权利要求18或19的用途，其中所述感染是流行性角膜结膜炎。

多价唾液酸衍生物

发明领域

[0001] 本发明涉及新型多价唾液酸衍生物、包含这样的衍生物的药物组合物以及通过使用这样的化合物来治疗或预防由病毒引起的流行性角膜结膜炎(EKC)和其他眼部疾病的方法,所述病毒结合至在细胞表面上存在的末端唾液酸残基。

[0002] 背景

[0003] 人腺病毒(HAdV:s),其属于哺乳动物腺病毒属(乳腺腺病毒属(Mastadenovirus)),是通常遇到的传染剂。在人中,腺病毒与多种临床症状,包括眼部疾病,如结膜炎和流行性角膜结膜炎(EKC)相关联。

[0004] 迄今,不幸地还没有可用于治疗腺病毒感染的特异性抗病毒药物。腺病毒是专性细胞内寄生物,由此表明它们完全依赖于细胞的复制机构。因此极难实现通过抗病毒化合物对腺病毒复制的选择性抑制,因为宿主细胞的一些基本功能也会发生改变。然而,在当今的抗病毒药物研究中的一种方法在于阻断病毒的细胞受体使得它们避免与细胞连接和渗透。没有已注册的用于治疗流行性角膜结膜炎(EKC)的基于这样的阻断的药物。

[0005] 腺病毒在自然中普遍存在,并且因此新的血清型仍然正在被发现。因此,在首次HAdV:s分离后的约60年,已经鉴别了超过50个的被分成七个种(A-G)的新的血清型。

[0006] EKC是一种严重且高度传染性的眼部感染,每年数百万的个体被感染。在负责EKC腺病毒的血清型之中,HAdV-8、HAdV-19和HAdV-37保持为主要的病原体,但近来还有HAdV-53、HAdV-54和HAdV-56已作为新型引起EKC的类型出现。相关症状是角膜炎(keratitis)、结膜炎、水肿(edema)、疼痛(pain)、流泪(lacrimation)、形成假膜(formation of pseudomembranes)和视力降低(decreased vision)。由于这些病毒通过接触(例如手与眼接触)传播,所以EKC在人口稠密地区和卫生预防措施不足的内科病房中时常发生。感染通常持续多达两周;然而,一些患者持续遭受视力受损达数月、数年或甚至永久地。

[0007] 病毒生命周期通过腺病毒经由它们的同源三聚体纤维旋钮(fiber knobs)与位于角膜和/或结膜中的表皮细胞上的含唾液酸的聚糖的结合引发。位于从腺病毒病毒粒子突出的12个纤维每一个的最远端部分处的纤维旋钮保留糖识别结构域。最近,具有对应于GD1a神经节苷脂中的聚糖的糖蛋白被证实为用于通过引起EKC的腺病毒感染眼部细胞的功能受体。HAdV-37-GD1a复合物的晶体结构显示位于GD1a聚糖的两个分支每一个上的末端唾液酸残基被容纳到在HAdV-37纤维旋钮顶部上的三个糖识别位点中的两个中。

[0008] 因此,利用天然或合成的唾液酸衍生物对腺病毒的抑制可以防止病毒粒子附着至、渗透入并感染新的细胞(尤其参见WO 01/037846)。作为结果,感染将变得有限。重要地并且尤其在EKC的情况下,基于糖的药物的差的药理学特性(包括快速血清清除和差的细胞摄入)可以通过使用局部施用模式(例如霜剂、软膏、滴眼液)避开。

[0009] WO 01/037846公开了腺病毒感染并且特别是眼部腺病毒感染,例如角结膜炎(kerato-conjunctivitis)可以通过以治疗有效量施用干扰所述病毒和唾液酸受体之间的相互作用的物质如唾液酸而被治疗或减轻。不幸地,糖和蛋白之间的弱相互作用限制了糖作为药物的用途。

[0010] 通过使用具有连接至人血清白蛋白的若干唾液酸衍生物(SA-HSA)的糖缀合物,已经进行克服所述限制的尝试。然而,这样的多价糖缀合物由于若干原因而不适合作为药物。SA-HSA的精确结构和组成在不同分子之间将变化。因此,SA-HSA代表很难在结构上定义的一类结构。此外,即使以同一方式生产,SA-HSA衍生物的组成在不同批次之间也将变化。从安全性和监管角度看,这是重大缺陷。另外,使用蛋白,即HSA(其来源于人血浆)是一个主要缺点。HSA的起源使其难于生产更大量的基于HSA的药物。此外,在来源于人血浆的HSA中可能不会排除被传染剂如病毒或朊病毒的污染。因此,基于HSA的产品不适合作为药剂,并且多价替代物将会是高度期望的。

[0011] 在WO 2011/003876中,公开了在水溶液中形成多价聚集体的新型两亲性唾液酸衍生物。所述聚集体被公开为克服与SA-HSA相关的缺陷,从而可用于治疗EKC。这样的衍生物的进一步方面已由Aplander等在J.Med.Chem.2011,54,6670中公开。

[0012] 此外,人角膜上皮(HCE)细胞的HAdV-37感染的共价结合的多价有效的基于唾液酸的抑制剂已在论文中报道(参见Spjut等Angew.Chem.Int.Ed.2011,50,6519;Johansson等Chembiochem 2005,6,358和Johansson等Antivir.Res.2007,73,92)。为了避免一价唾液酸衍生物的相对低效力,作者利用了在HAdV-37纤维旋钮处的三聚体结合位点。如由Spjut等公开的,相比于一价唾液酸化合物,可以同时结合至每个结的多于一个糖识别结构域的三价和四价唾液酸衍生物的使用显著地提供了抑制效力。

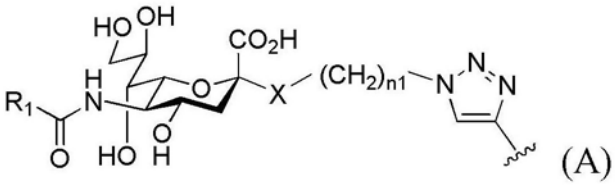
[0013] 例如,标示为ME0322的化合物,其是其中方形酸被用来将唾液酸连接至中央核心单元的合成三价唾液酸衍生物,被报道为比天然唾液酸单糖更有效四个数量级。此外,在防止病毒与纤维旋钮的结合方面,ME0322与17-价唾液酸-HSA缀合物一样有效。令人感兴趣地,在抑制人角膜上皮(HCE)细胞被HAdV-37感染方面,发现ME0322比该HSA-缀合物远远更有效。

[0014] 尽管所述化合物确实显示令人感兴趣的性质,但是在防止HAdV-37病毒粒子与人角膜上皮(HCE)细胞附着方面,提供具有甚至进一步提供的效力的多价唾液酸衍生物将仍然是有用的。

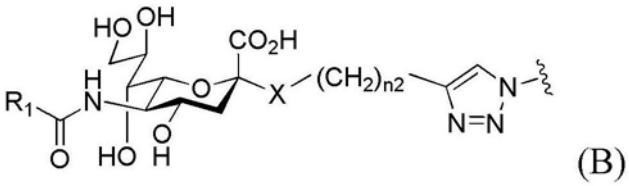
[0015] 因此,在本领域仍然需要在防止HAdV-37病毒粒子与人角膜上皮(HCE)细胞附着方面表现出高效力的低分子量、多价唾液酸衍生物。这样的衍生物在治疗和预防EKC方面将是有用的。

[0016] 概述

[0017] 因此,本发明通过单个地或以任意组合提供三价或四价唾液酸衍生物来试图减轻、缓解、消除或规避一个或多个上述的本领域缺陷和缺点,所述衍生物包含附着有3或4个根据式A或B的基团的核心部分(core moiety),

[0018] 

(A)



(B)

[0019] 其中

[0020] “X”是O(氧)、NH或S(硫)；

[0021] R1是C1-3烷基、苯基、OC1-2烷基、CF3或NHC1-2烷基；

[0022] 整数“n1”为2至8；

[0023] 整数“n2”为1至8；并且

[0024] 波形线指示与所述核心部分连接的点；

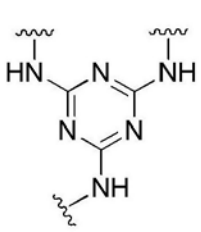
[0025] 所述衍生物为下列形式：游离碱、以其非带电质子化形式的酸、两性离子、药用加成盐、溶剂化物、或其盐的溶剂化物。

[0026] 根据本发明的方面：

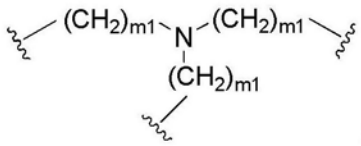
[0027] “X”可以是O(氧)；R1可以是甲基，整数“n1”可以为2至3；所述基团可以是根据式A的基团；和/或以其游离形式的所述衍生物的分子量为1,500Da以下；或

[0028] “X”可以是O(氧)；R1可以是甲基，整数“n2”可以为1、2或3；所述基团可以是根据式B的基团；和/或以其游离形式的所述衍生物的分子量为1,500Da以下。

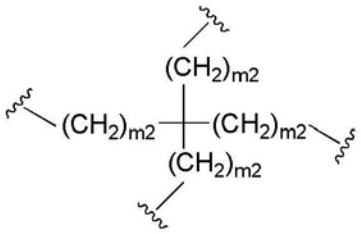
[0029] 此外，所述核心部分可以是根据式I至V中的任一个的部分：

[0030] 

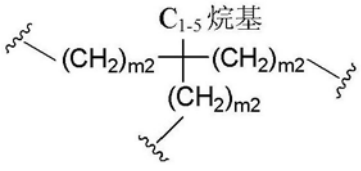
(I),



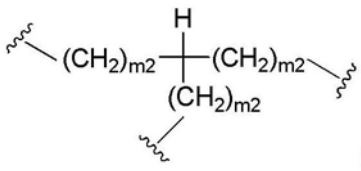
(II),



(III),

[0031] 

(IV) 和



(V)

[0032] 其中

[0033] 连接至部分I的基团是根据式A的基团；

[0034] 如果连接至部分II的基团是根据式A的基团，则式II中的整数“m1”为1至8；

[0035] 如果连接至部分II的基团是根据式B的基团，则式II中的整数“m1”为2至8；

[0036] 整数“m2”为1至8；并且

[0037] 波形线指示与根据式A或B的基团连接的点。

[0038] 根据另一方面，提供了一种用于对眼给药的药物组合物，所述药物组合物包含本文上述类型的唾液酸衍生物和至少一种药用赋形剂。药物组合物可以是包含0.001至10mM，如0.01至1mM的唾液酸衍生物的含水组合物。这样的含水组合物的水含量可以是至少90重量％。此外，这样的含水组合物可以包含试剂如甘油，以提供等渗溶液。

[0039] 根据另一方面，本文上述的唾液酸衍生物或包含这样的衍生物的药物组合物用于治疗。

[0040] 根据另一方面，本文上述的唾液酸衍生物或包含这样的衍生物的药物组合物用于治疗和/或预防由病毒引起的眼部感染，所述病毒结合至在要被所述病毒感染的细胞的细胞表面上存在的末端唾液酸残基。感染可以是由选自由以下各项组成的组中的病毒引起的感染：HAdV-8，HAdV-19，HAdV-37，HAdV-53，HAdV-54和HAdV-56。此外，感染可以是流行性角膜结膜炎。

[0041] 此外，本发明的多个实施方案的有利特征在从属权利要求中和以下的详述范围内限定。

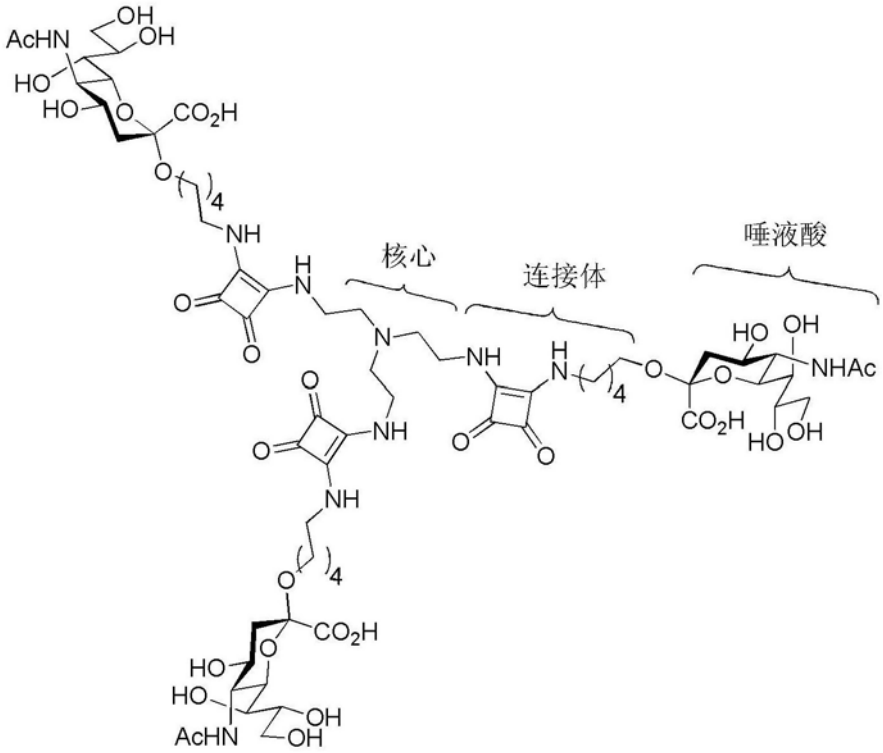
[0042] 优选实施方案的详述

[0043] 如本文中使用的，术语“加成盐”意图指通过添加药用酸如有机或无机酸或者药用碱而形成的盐。有机酸可以是但不限于乙酸、丙酸、甲磺酸、苯磺酸、乳酸、苹果酸、柠檬酸、酒石酸、琥珀酸或马来酸。无机酸可以是但不限于盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸或磷酸。碱可以是但不限于氨和碱金属或碱土金属的氢氧化物。术语“加成盐”还包括水合物和溶剂加成形式如水合物和醇化物。

[0044] 如本文中使用的，单独或者作为后缀或前缀使用的"烷基"意图包括具有规定数量的碳原子的支链和直链饱和脂肪族烃基。例如，"C1-6烷基"表示具有1、2、3、4、5或6个碳原子的烷基。

[0045] 化合物

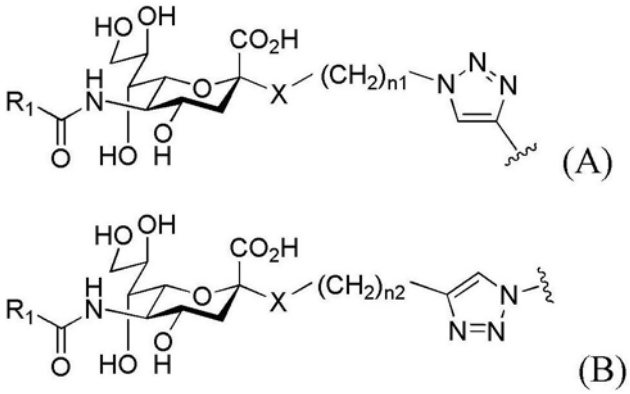
[0046] 标示为ME0322(见下文)的三价唾液酸衍生物，在本领域已知抑制HAdV-37与人角膜上皮细胞的结合，具有三个主要元件：核心部分、唾液酸残基和连接该核心部分和该唾液酸残基的连接体(linker)。在连接体中，存在基于方形酸的偶联残基(coupling residue)。该三价唾液酸衍生物ME0322以对于允许同时与纤维旋钮的所有三个唾液酸结合位点相互作用提供足够的柔性的方式进行设计。貌似地，HAdV-37纤维头部和ME0322的复合物的解析晶体结构证实该化合物确实能够同时结合至所有三个唾液酸结合位点，由此证实通过所述连接体提供的柔性是足够的。

[0047] 

[0048] ME0322

[0049] 据推测，用另一个偶联残基替代方形酸残基，提供用于建立与在HAdV-37纤维旋钮处的糖识别位点的另外接触的方式，将可能地甚至进一步增大结合亲和力。令人惊讶地，本发明的发明人还证实，用三唑酸偶联残基替代如在ME0322中存在的方形酸偶联残基确实导致这样的多价唾液酸衍生物，该衍生物对于防止HAdV-37与人角膜上皮细胞的结合具有增大的效力。

[0050] 因此，一个实施方案涉及一种三价或四价唾液酸衍生物，所述衍生物包含连接有3或4个根据式A或B的基团的核心部分：

[0051] 

[0052] 其中

[0053] “X”是O(氧)、NH或S(硫)；

[0054] R1是C1-3烷基、苯基、OC1-2烷基、CF3或NHC1-2烷基；

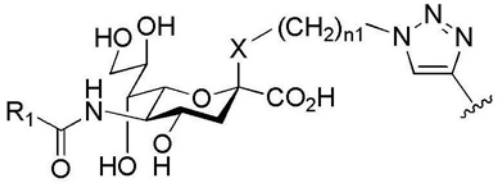
[0055] 整数“n1”为2至8；

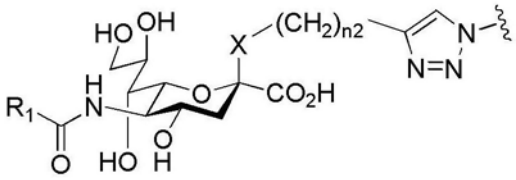
[0056] 整数“n2”为1至8；并且

[0057] 波形线指示与核心部分连接的点。

[0058] 这样的化合物可以作为游离碱、作为以其非带电质子化形式的酸、作为药用加成盐、作为溶剂化物或作为药用加成盐的溶剂化物存在。由于所述化合物包含碱性三唑残基以及酸性羧酸部分，所以它们也可以作为两性离子存在。此外，所述化合物可以作为纯立体异构体存在，或者以包含所述化合物的外消旋物、非对映异构体、scalemic或端基异构体混合物存在。优选地，所述化合物作为纯立体异构体或作为端基异构体混合物存在。

[0059] 如果以端基异构体混合物存在，则如果α-端基异构体占优势是优选的。因此，如果75％以上，如多于90％、95％、99％或甚至多于99,9％的化合物作为α-端基异构体存在，则是优选的。相应的β-端基异构体在以下示出。

[0060] 



[0061] 尽管N-和S-糖苷也是感兴趣的，但是优选O-糖苷。根据一个实施方案，式A和B中的“X”是“O”(氧)。

[0062] 对于之前的与本发明衍生物优点相关的HSA衍生物，之前已经显示(Johansson等J.Med.Chem.2009,52,366)，在对于HAdV-37纤维旋钮的糖识别位点具有亲和力的化合物中R1不限于甲基。然而，在本文公开的三价或四价唾液酸衍生物中的R1不限于甲基，如果R1是甲基则是优选的。

[0063] 在本文公开的三价或四价唾液酸衍生物中，唾液酸残基经由亚烷基连接至三唑残基。尽管亚烷基是优选的，但是也可以设想用所说的短PEG-连接体或包含环烷基部分如环丙基的连接体替代该亚烷基。亚烷基可以为各种长度，即用于包含根据式A的基团的三价或四价唾液酸衍生物的亚乙基至亚辛基以及用于包含根据式B的基团的三价或四价唾液酸衍生物的亚甲基至亚辛基。然而，如果亚烷基是亚乙基或亚丙基则是优选的。因此，如果在包含根据式A的基团的三价或四价唾液酸衍生物中的整数“n1”为2或3则是优选的。类似地，如果在包含根据式B的基团的三价或四价唾液酸衍生物中的整数“n2”为1、2或3则是优选的。

[0064] 本文公开的三价或四价唾液酸衍生物可以通过以下方式获得，即将包含叠氮基的唾液酸残基与包含乙炔基的核心部分在铜(cupper)(I)催化的叠氮化物-炔Huisgen环加成(参见下文进一步的实验细节)中进行偶联。类似地，包含乙炔基的唾液酸残基可以在铜(cupper)(I)存在下与包含叠氮基的核心部分偶联。根据一个实施方案，本文公开的三价或四价唾液酸衍生物包含根据式A的基团。根据另一个实施方案，本文公开的三价或四价唾液酸衍生物包含根据式B的基团。貌似地，至少在某些连接体长度的情况下，包含根据式B的基团的化合物可以比包含根据式A的基团的化合物稍微更有效。

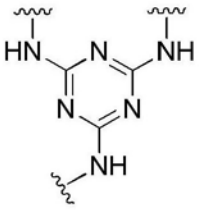
[0065] 尽管在获得对于在HAdV-37纤维旋钮处的糖识别位点具有增大的亲和力的三价或四价唾液酸衍生物中，发现三丙炔基胺和三(2-叠氮基乙基)胺分别可用作核心部分，但是本发明绝不仅限于这种类型的三价核心部分。包含三或四个乙炔基或叠氮基的其他小分

子、结构上良好限定的化合物也可以在铜(cupper)(I)存在下与唾液酸残基偶联以获得三价或四价唾液酸衍生物。

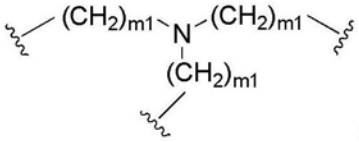
[0066] 根据一个实施方案，以其游离形式的三价或四价唾液酸衍生物的分子量为2,500Da以下，如2,000以下或1,500Da以下。由于该纤维旋钮的三个唾液酸结合位点彼此相当靠近(即，大约10 Å)地定位，所以如果所述三价或四价唾液酸衍生物的唾液酸残基不是过于间隔开则是优选的。此外，过于柔性的核心部分或唾液酸残基之间的过大距离会负面地影响所述衍生物与所述纤维旋钮的结合。小且更加刚性的衍生物也将导致在结合纤维旋钮蛋白时较少的熵损失并因此有助于提高效力。

[0067] 如已解释的，核心部分可以为各种类型。根据一个实施方案，核心部分是根据式I至V中任一个的部分：

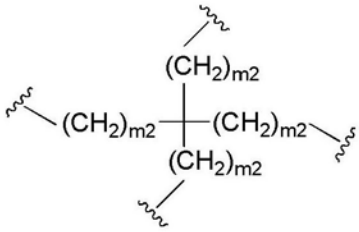
[0068]



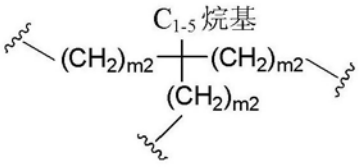
(I),



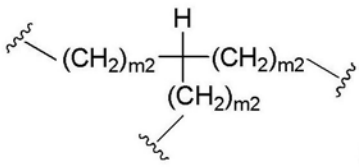
(II),



(III),



(IV),



(V)

[0069] 其中

[0070] 连接至部分I的根据式A或B的基团是根据式A的基团；

[0071] 如果连接至部分II的根据式A或B的基团是根据式A的基团，则式II中的整数“m1”为1至8；

[0072] 如果连接至部分II的根据式A或B的基团是根据式B的基团，则式II中的整数“m1”为2至8；

[0073] 整数“m2”为1至8；并且

[0074] 波形线指示与根据式A或B的基团连接的点。

[0075] 尽管核心部分的确切性质对于结合亲和力不很重要，但是无论如何已经发现，如果核心部分是根据式II的部分则是优选的。此外，优选地，整数“m1”为1至3并且整数“m2”为1至3。此外，根据一个实施方案，连接至部分II的根据式A或B的基团是根据式A的基团。根据另一个实施方案，它们是根据式B的基团。

[0076] 根据一个实施方案，本文公开的三价或四价唾液酸衍生物包含根据式A的基团并且选自由以下各项组成的组：

[0077] 三((1-(2-O-(5-N-乙酰氨基-3,5-二脱氧-D-甘油基-α-D-半乳-2-尤罗吡喃索尼克酸(nonulopyranosylonic acid)))-2-氧代乙基-1H-1,2,3-三唑-4-基)甲基)胺；

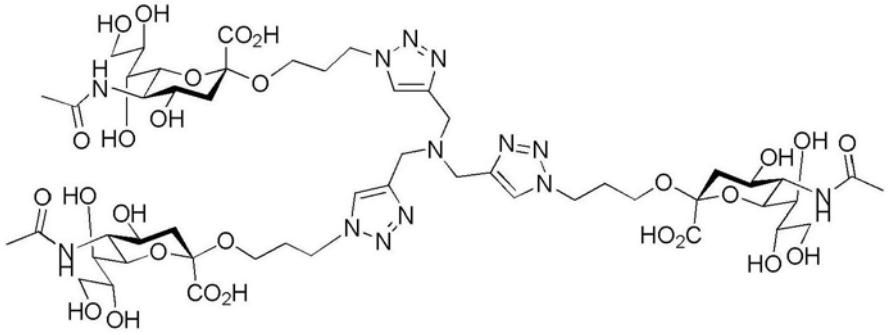
[0078] 三((1-(2-O-(5-N-乙酰氨基-3,5-二脱氧-D-甘油基-α-D-半乳-2-尤罗吡喃索尼

克酸))-3-氧代丙基-1H-1,2,3-三唑-4-基)甲基)胺;

[0079] 三((1-(2-O-(5-N-丙酰氨基-3,5-二脱氧-D-甘油基-α-D-半乳-2-尤罗吡喃索尼克酸))-2-氧代乙基-1H-1,2,3-三唑-4-基)甲基)胺;和

[0080] 三((1-(2-O-(5-N-丙酰氨基-3,5-二脱氧-D-甘油基-α-D-半乳-2-尤罗吡喃索尼克酸))-3-氧代丙基-1H-1,2,3-三唑-4-基)甲基)胺

[0081] 根据这样的实施方案,如果三价或四价唾液酸衍生物是三((1-(2-O-(5-N-乙酰氨基-3,5-二脱氧-D-甘油基-α-D-半乳-2-尤罗吡喃索尼克酸))-3-氧代丙基-1H-1,2,3-三唑-4-基)甲基)胺则是优选的,即

[0082] 

[0083] 根据另一个实施方案,本文公开的三价或四价唾液酸衍生物包含根据式B的基团并且选自由以下各项组成的组:

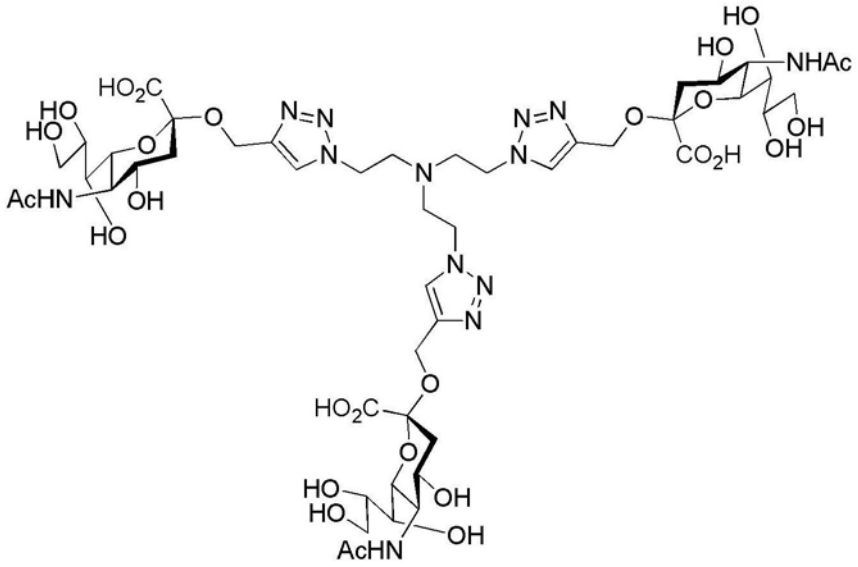
[0084] 三((4-(2-O-(5-N-乙酰氨基-3,5-二脱氧-D-甘油基-α-D-半乳-2-尤罗吡喃索尼克酸))-2-氧代甲基-1H-1,2,3-三唑-1-基)乙基)胺;

[0085] 三((4-(2-O-(5-N-丙酰氨基-3,5-二脱氧-D-甘油基-α-D-半乳-2-尤罗吡喃索尼克酸))-2-氧代甲基-1H-1,2,3-三唑-1-基)乙基)胺;

[0086] 三((4-(2-O-(5-N-乙酰氨基-3,5-二脱氧-D-甘油基-α-D-半乳-2-尤罗吡喃索尼克酸))-2-氧代乙基-1H-1,2,3-三唑-1-基)乙基)胺;和

[0087] 三((4-(2-O-(5-N-丙酰氨基-3,5-二脱氧-D-甘油基-α-D-半乳-2-尤罗吡喃索尼克酸))-2-氧代乙基-1H-1,2,3-三唑-1-基)乙基)胺。

[0088] 根据这样的实施方案,如果三价或四价唾液酸衍生物是三((4-(2-O-(5-N-乙酰氨基-3,5-二脱氧-D-甘油基-α-D-半乳-2-尤罗吡喃索尼克酸))-2-氧代甲基-1H-1,2,3-三唑-1-基)乙基)胺则是优选的,即

[0089] 

[0090] 药物组合物

[0091] 本发明的另一个实施方案涉及一种药物组合物，例如用于治疗和/或预防EKC的药物，其包含本文公开的三价或四价唾液酸衍生物。这样的药物组合物还可以包含药用赋形剂，如载体、稀释剂和/或稳定剂。取决于适用的规则，药物组合物可以归类为药物或者归类为医学装置，用于治疗或预防眼中的感染。在本文中组合物被称为药物组合物的仅有事实不应解释为排除将所述组合物注册为医学装置。三价或四价唾液酸衍生物的病毒结合特性意味着它也可以例如用来防止隐形眼镜如以透镜溶液的形式的污染。

[0092] 在此上下文中，"药用"是指在所采用的剂量和浓度下不会在所施用的受试者中引起任何不希望的作用的赋形剂。这样的药用赋形剂在本领域是熟知的。

[0093] 根据一个实施方案，本文公开的这样的药物组合物是适用于对眼给药的药物组合物。在没有限制的情况下，适用于对眼给药的药物组合物的典型实例包括滴眼液、软膏、喷雾剂、敷料剂和凝胶剂。

[0094] 适用于对眼给药的药物组合物可以是含水组合物。这样的含水组合物可以具有90重量％以上水，如90至99.9、95至99或95至98重量％水的水含量。此外，包含本文公开的三价或四价唾液酸衍生物的含水组合物可以包含0.001至10mM，如0.01至1mM的所述三价或四价唾液酸衍生物。

[0095] 此外，含水组合物可以包含试剂以提供等渗溶液。因此，含水组合物可以包含选自由以下各项组成的组中的试剂：氯化钠，甘油，聚乙二醇，糖类，如单糖，例如葡萄糖和甘露糖醇，以及二糖，如蔗糖。

[0096] 根据一个实施方案，本文公开的药物组合物是包含电解质如氯化钠的含水组合物。优选地，电解质的含量应接近于等渗浓度，如对于氯化钠为约0.9重量％。

[0097] 根据另一个实施方案，本文公开的药物组合物是包含甘油的含水组合物。甘油的含量可以为2至3重量％，如2.3至2.3或2.5至2.7重量％。优选地，所述含量应接近于等渗浓度，如约2.6重量％。

[0098] 此外，可能感兴趣的是调节药物组合物的pH以提供具有接近生理pH的pH的组合物。因此，根据一个实施方案的药物组合物是具有约6.5至8的pH的含水药物组合物。优选地，所述pH更接近于生理pH，如约7.2至7.8。

[0099] 由于本文公开的三价或四价唾液酸衍生物包含酸性羧酸部分以及碱性部分(包括三唑部分),所以所述药物组合物可以包含药用酸和/或碱以将pH调节至所需水平。而且,药物组合物可以被缓冲(buffered)。被缓冲的药物组合物典型地包含缓冲物种,如HCO_3^-/CO_3^{2-}或$H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$。此外,被缓冲的药物组合物可以是被硼酸盐缓冲的。

[0100] 根据另一个实施方案,药物组合物的pH稍微低于生理学的,如约5至7。具有酸性pH(即低于7)的组合物具有较不易感微生物的生长的优势。此外,微生物的生长可以通过向药物组合物中添加防腐剂而被阻止。根据一个实施方案,本文公开的药物组合物因此确实包含防腐剂。这样的防腐剂的实例是苯扎氯铵、苯甲酸、丁基羟基茴香醚(butylated hydroxyanisol)、对羟基苯甲酸酯如对羟基苯甲酸丁酯、对羟基苯甲酸丙酯、对羟基苯甲酸乙酯、对羟基苯甲酸甲酯及其混合物、苯氧乙醇、苯基乙醇或山梨酸。包含防腐剂的药物组合物可以更适用于储存。此外,本文公开的药物组合物可以被灭菌,如通过热灭菌或通过无菌过滤。

[0101] 本文公开的药物组合物还可以进一步包含其他药用赋形剂,如抗氧化剂、另外的等渗剂(isotonicity agent)、着色剂等。

[0102] 在涉及含水药物组合物的实施方案中,所述组合物可以包含悬浮剂和稳定剂,如非离子表面活性剂、亲水聚合物等。

[0103] 根据一个实施方案,本文公开的药物组合物可以包含增稠剂。典型地,要被增稠的药物组合物是含水的。增稠剂可以被采用以生成增稠的溶液、凝胶、糖浆、霜剂或软膏。为了形成增稠的溶液或凝胶,可以采用形成水凝胶的材料。这样的形成水凝胶的材料可以选自由合成聚合物、半合成聚合物和天然树胶组成的组。

[0104] 合成聚合物的实例包括聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、聚丙烯酸、聚乙二醇、泊洛沙姆(poloxamer)嵌段共聚物。半合成聚合物的十六包括纤维素醚,如羧甲基纤维素、羟乙基纤维素、羟丙基纤维素、甲基纤维素、羟丙甲基纤维素和乙基羟乙基纤维素。天然树胶的实例包括阿拉伯树胶、藻酸盐(alginate)、角叉菜胶(carragenan)、壳聚糖、果胶、淀粉、黄原胶。

[0105] 通过采用材料如透明质酸及其衍生物、卡波姆(carbomer)和聚卡波非(polycarbophil)类型的交联聚丙烯酸以及易于形成凝胶的聚合物(已知它们强烈粘附至粘膜),可以使得增稠的溶液或凝胶是粘膜粘附性的。

[0106] 根据一个实施方案,本文公开的药物组合物可以包含泊洛沙姆类型的嵌段共聚物。有利地使用泊洛沙姆类型的嵌段共聚物,如包含聚乙二醇和聚丙二醇嵌段的聚合物,因为分散在水中的某些泊洛沙姆是热可逆的。热可逆泊洛沙姆的实例是泊洛沙姆188和泊洛沙姆407。

[0107] 分散在水中的热可逆泊洛沙姆具有低粘度但在升高的温度下表现出显著的粘度增加,导致在体温下的凝胶形成。由此施用至相对暖和角膜的药物制剂的接触时间可以被延长。因此,本发明的一个实施方案涉及一种药物组合物,如本文公开的,其是热可逆的。

[0108] 根据一个实施方案,本文公开的药物组合物可以包含另外的抗病毒化合物。这样的化合物的实例包括N-氯牛磺酸(N-chlorotaurin)和聚维酮碘(Povidone-iodine)(PVP-I)。

[0109] N-氯牛磺酸(Cl-HN-CH2-CH2-SO3H)是内源性抗微生物剂。其是在氧化猝发期间由

粒细胞和单核细胞产生的温和活性氯化合物。由于其非特异性反应机制，即氨基、含硫(thio)和芳族化合物的氧化，其具有类似于消毒剂的广谱杀微生物活性。N-氯牛磺酸的钠盐溶液(Cl-HN-CH2-CH2-SO3Na)已被证实在体外杀灭细菌和真菌。另外，已经显示杀病毒作用。聚维酮碘是聚乙烯吡咯烷酮(聚维酮，PVP)和单质碘的稳定化学复合物。

[0110] 根据一个实施方案，本文公开的药物组合物可以包含另外的抗病毒化合物，其中所述抗病毒化合物是可用于局部地治疗由疱疹引起的感染的化合物。这样的化合物的实例包括鸟苷类似物阿昔洛韦(aciclovir)、万乃洛韦(valaciclovir)、喷昔洛韦(penciclovir)和泛昔洛韦(famciclovir)，以及膦甲酸钠(foscarnet)(膦甲酸钠六水合物)。

[0111] 根据一个实施方案，本文公开的药物组合物可以包含局部麻醉剂。因为EKC可以是非常痛苦的疾病，所以可以有利地包括局部麻醉剂以提供疼痛缓解。此外，尽管给药本身可能是痛苦的，但是这样的疼痛缓解可以具有鼓励患者继续治疗的优势。另外，具有快速发作的局部麻醉剂的使用可以使得患者有可能实际地张开眼以便允许将所述药物组合物直接地进一步施用至角膜。可用的局部麻醉剂的实例包括利多卡因(lidocaine)、丙胺卡因(prilocaine)和罗哌卡因(ropivacaine)。

[0112] 治疗

[0113] 根据另一个实施方案，本文公开的三价或四价唾液酸衍生物或者药物组合物可以用于治疗方法。

[0114] 眼部感染的治疗

[0115] 如上文已经公开的，发现本文公开的三价或四价唾液酸衍生物抑制HAdV-37与人角膜细胞的结合。

[0116] 因此，本发明的一个实施方案涉及本文公开的三价或四价唾液酸衍生物或药物组合物，其用于治疗和/或预防由病毒引起的眼部感染，所述病毒结合至在要被所述病毒感染的细胞的细胞表面上存在的末端唾液酸残基。

[0117] 类似地，本发明的一个实施方案涉及本文公开的三价或四价唾液酸衍生物或药物组合物用于制备药物的用途，所述药物用于治疗和/或预防由病毒引起的眼部感染，所述病毒结合至在要被所述病毒感染的细胞的细胞表面上存在的末端唾液酸残基。

[0118] 又一个实施方案涉及一种预防和/或治疗由病毒(所述病毒结合至在要被所述病毒感染的细胞的细胞表面上存在的末端唾液酸残基)引起的眼部感染如EKC的方法，包括向需要这样的预防和/或治疗的哺乳动物(包括人)施用治疗有效量的本文公开的三价或四价唾液酸衍生物或包含治疗有效量的本文公开的三价或四价唾液酸衍生物的药物组合物。优选地，所述三价或四价唾液酸衍生物或药物组合物以这样的方法对眼给药。

[0119] 结合至在细胞表面上存在的末端唾液酸残基并由此允许感染所述细胞以引起感染如眼部感染的病毒的实例包括HAdV-8、HAdV-19、HAdV-37、HAdV-53、HAdV-54和HAdV-56。通过结合至在细胞表面上存在的末端唾液酸残基引起眼部感染的腺病毒的实例包括HAdV-8、HAdV-19和HAdV-37，一个典型的实例是HAdV-37。

[0120] 根据一个实施方案，要通过使用本发明的三价或四价唾液酸衍生物或组合物来治疗和/或预防的眼部感染是流行性角膜结膜炎(EKC)。

[0121] 根据本文的实施方案的药物组合物可以以药学有效剂量施用至患者。"药学有效

剂量"是指关于对其给药的病症足以产生所需效果的剂量。精确剂量可能取决于三价或四价唾液酸衍生物的活性、施用方式、所述病症和/或疾病的性质和严重度以及总体状况如患者的年龄和体重。

[0122] 根据一个实施方案，本文公开的药物组合物每天施用一次或几次。典型地，这样的药物组合物将每天施用三次，尽管其他剂量方案也可以使用。

[0123] 但在本文中使用时，"预防(prevent/preventing)"不应被解释为是指在使用根据本文公开的实施方案的化合物或药物组合物来实现预防之后，病症和/或疾病永远不会再出现。此外，该术语也不应解释为在是指在这样的使用来预防病症之后，所述病症不可能出现，至少在一定程度上。确切地，"预防(prevent/preventing)"意图是指尽管有这样的使用，如果出现，要预防的病症将比没有这样的使用的严重度低。

[0124] 根据一个实施方案，治疗确实还涵盖预治疗(pre-treatment)，即预防性治疗)。

[0125] 一般说明

[0126] 尽管本发明已参考具体例示性实施方案在以上进行了描述，但是本发明不意图局限于本文提出的具体形式。以上提及的实施方案的任何组合应被理解为在本发明的范围内。确切地，本发明仅受所附权利要求限制并且不同于以上具体实施方案的实施方案同等地可能在这些所附权利要求的范围内。

[0127] 在权利要求中，术语"包括/包含(comprises/comprising)"不排除存在其他物种或步骤。另外，尽管个体特征可能包括在不同权利要求中，但是这些特征可以有可能有利地进行组合，并且包括在不同权利要求中并不暗示特征的组合不是可行的和/或有利的。另外，单数指代不排除复数。术语"一个"、"一种"、"第一"、"第二"等不排除复数。短语"至少一个"或"一个以上"是指1或大于1的数量，如至1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。

[0128] 实验

[0129] 以下实施例仅为示例并且绝不应该解释为限制本发明的范围。确切地，本发明仅受所附权利要求限制。

[0130] 附图简述

[0131] 图1a、2a和2b：一组三价唾液酸衍生物对HCE细胞的HAdV-37结合和感染的作用-在以不同浓度的抑制剂存在下的病毒粒子结合(数据表示为对照的％，所述对照是在没有抑制剂下获得的值)。

[0132] 图1b、3a和3b：一组三价唾液酸衍生物对HCE细胞的HAdV-37结合和感染的作用-在不同浓度的抑制剂下的感染(数据表示为对照的％，所述对照是在没有抑制剂下获得的值)。

[0133] 通用化学程序

[0134] ^{1}H NMR和^{13}C NMR谱图利用Bruker DRX-400光谱仪分别在400MHz和100MHz记录。NMR实验在298K在$CDCl_3$(残留溶剂峰＝7.26ppm(δH))，CD_3OD(残留溶剂峰＝3.31ppm(δH)和49.00ppm(δC))和D_2O(残留溶剂峰＝4.79ppm(δH))中进行。

[0135] LCMS利用装配有Xterra C18柱(50×19mm，5μm，125 Å)的Waters LC系统进行，用在水中的线性梯度的CH_3CN洗脱，它们二者含有甲酸(0.2％)。使用1.5mL/min的流速并且在214nm进行检测。使用正负电喷电离在Water micromass ZQ 2000上获得质谱。

[0136] 半制备型HPLC分离在Gilson系统HPLC上进行，使用Nucleodur C-18柱HTEC 5μm

(VP 250/21),流速为20mL/min,在214nm进行检测并且洗脱系统为:A.0.005%CF_3COOH水溶液,和B.在CH_3CN中的0.005%CF_3COOH。

[0137] 柱色谱法在硅胶(Merck,60 Å,70-230目ASTM)上进行。薄层色谱法(TLC)在硅胶$60F_{254}$(Merck)上进行,在UV光下检测和/或利用在EtOH中的5%H_2SO_4和热显影。

[0138] 旋光度利用Perkin-Elmer 343偏光计在20℃测量。除了CH_3CN和MeOH使用分子筛3Å干燥之外,有机溶剂使用Glass Contour Solvent Systems(SG Water USA)干燥。

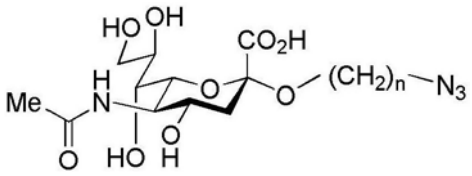
[0139] 所有商业试剂按来样使用。

[0140] 标示为ME0322的化合物根据公开的程序合成(参见Spjut等Angew.Chem.Int.Ed.2011,50,6519)。根据HPLC UV-跟踪,所有目标化合物为≥95%纯的。使用GraphPad Prism(GraphPad Software,Inc,La Jolla,CA)计算统计数字。

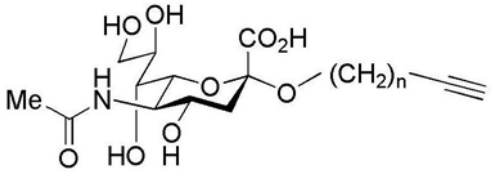
[0141] 合成程序

[0142] 通用

[0143] 本发明的化合物可以通过对唾液酸提供连接体(典型地,亚烷基连接体)获得,所述连接体具有反应性端基,即叠氮基(参见以下左侧示出的化合物)或乙炔基(参见以下右侧示出的化合物)。

[0144] 

[0145] “叠氮化物”

[0146] 

[0147] “乙炔”

[0148] 通过使提供有反应性端基的唾液酸与具有3或4个反应性基团(即叠氮化物或乙炔部分)的核心部分在叠氮化物-炔Huisgen环加成中,典型地在充当催化剂的铜(cupper)(I)存在下进行反应,可以获得本发明的化合物。如技术人员易于理解的,可以有利地或甚至必要地在合成的不同阶段保护各种基团。技术人员熟悉要使用什么基团。

[0149] 实施例1

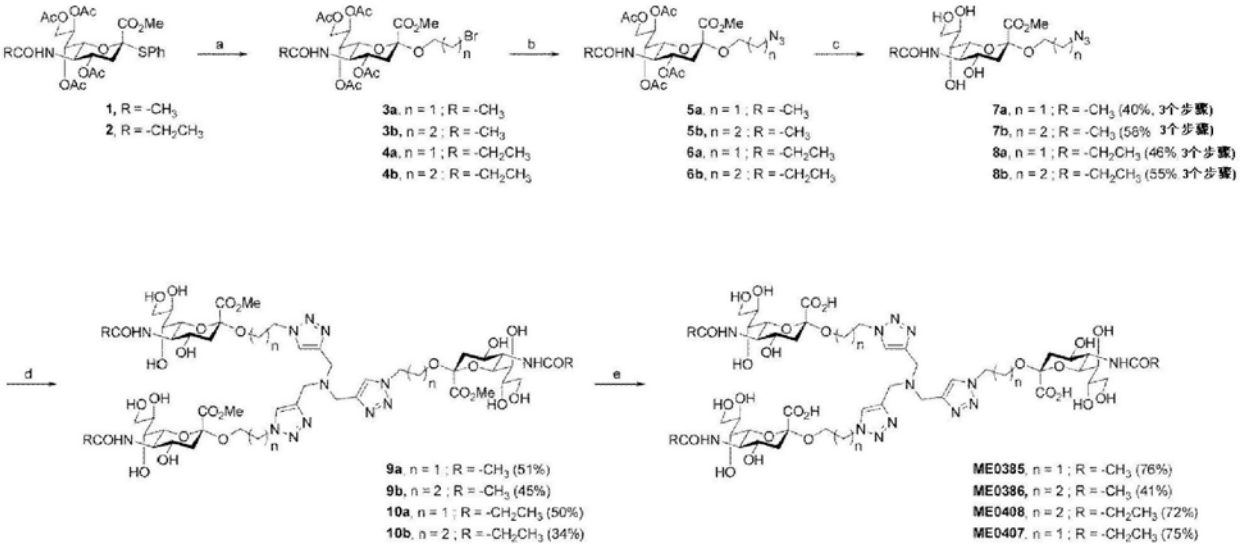
[0150] 使用三炔丙基胺作为核心部分

[0151] 到未改性的N-酰基三价唾液酸,如三((1-(2-O-(5-N-乙酰氨基-3,5-二脱氧-D-甘油基-α-D-半乳-2-尤罗吡喃索尼克酸))-2-氧代乙基-1H-1,2,3-三唑-4-基)甲基)胺(ME0385)和三((1-(2-O-(5-N-乙酰氨基-3,5-二脱氧-D-甘油基-α-D-半乳-2-尤罗吡喃索尼克酸))-3-氧代丙基-1H-1,2,3-三唑-4-基)甲基)胺(ME0386)的路线证实为简单且可以从商购获得的化学品在八个步骤中实现或者从关键中间体1在五个步骤中实现(方案1)。唾液酸噻吩基衍生物1(易于制备自商业唾液酸)的合成根据公开的程序进行(Marra等Carbohydr.Res.1989,187,35)。然后唾液苷(sialoside)3a和3b通过用化合物1糖基化相应的醇(分别为2-溴乙醇和3-溴丙-1-醇)以良好转化率获得。使用其他溴醇将对构造嵌段提

供具有其他长度的连接体。反应得到端基异构体的不可分离混合物连同在此阶段没有进一步纯化的所产生的消除产物。溴代衍生物3a和3b易于转化为它们的叠氮基类似物5a和5b。随后使用标准Zemplèn条件的O-脱酰作用在三个步骤后分别以40％和58％收率得到端基异构体纯的7a和7b。接着，化合物7a和7b在铜催化的叠氮化物-炔环加成反应(“click”反应)中与三炔丙基胺反应。由此，分别以51％和45％收率获得甲基酯9a和9b。随后的皂化分别以76％和41％收率提供最终目标化合物ME0385和ME0386。

[0152] 在铜催化的叠氮化物-炔环加成中使用不同于三炔丙基胺的其他乙炔衍生物将可获得其他类型的三价或四价唾液酸衍生物。

[0153]



[0154] 方案1.[a]ME0385和ME0386的合成

[0155] [a]试剂和条件：(a)i:分子筛3Å，2-溴乙醇或3-溴丙-1-醇，CH_3CN/CH_2Cl_2(3∶2)，室温，2h，ii:AgOTf，IBr，-73℃，4.5h，iii:DIPEA，-73℃，30min。(b)NaN_3，TBAI，DMSO，室温，6h。(c)i:NaOMe，MeOH，室温，3h，ii:H^+离子交换树脂。(d)三炔丙基胺，$CuSO_4$，抗坏血酸钠，THF/H_2O(1∶1)，50℃，3h，然后室温，18h。(e)i:LiOH，MeOH，室温，9h，ii:H^+离子交换树脂。

[0156] N-改性的三价唾液酸三((1-(2-O-(5-N-丙酰氨基-3,5-二脱氧-D-甘油基-α-D-半乳-2-尤罗吡喃索尼克酸))-2-氧代乙基-1H-1,2,3-三唑-4-基)甲基)胺ME0408和三((1-(2-O-(5-N-丙酰氨基-3,5-二脱氧-D-甘油基-α-D-半乳-2-尤罗吡喃索尼克酸))-3-氧代丙基-1H-1,2,3-三唑-4-基)甲基)胺ME0407可以从商购获得的唾液酸在13个步骤中制备或者从关键中间体2在五个步骤中制备(方案1)。化合物2的合成根据公开的程序进行(Johansson等J.Med.Chem.2009,52,3666)。接下来的步骤类似于之前对化合物ME0385和ME0386描述的合成路线类似。因此，相继的糖基化、叠氮化物形成和O-脱乙酰反应在三个步骤分别以46％和55％收率得到端基异构体纯的产物8a和8b。随后的“click”反应分别以50％和34％收率提供三价化合物10a和10b。最后，甲基酯10a和10b的皂化以良好收率得到目标产物ME0408和ME0407。

[0157] 用于糖基化反应的通用方法

[0158] 在室温和在氮气氛下，将糖基供体1或2(1.0当量)和新鲜粉碎的分子筛3Å(1.5g/mmol)溶解/悬浮在CH_3CN/CH_2Cl_2(3∶2;35mL/mmol)的混合物中。加入2-溴乙醇或3-溴丙-1-

醇(4.5当量)并将该混合物搅拌2h。反应被保护免于光并加入三氟甲磺酸银(2.0当量)在CH_3CN中的溶液。将混合物冷却至-73℃(-70℃＜t＜-75℃)并加入IBr(1.4当量,1M,在CH_2Cl_2中)。允许反应在-73℃进行4.5h。在完成之后,加入DIPEA(6.0当量)。将反应混合物在-73℃再搅拌30min,然后允许温热至室温。将混合物通过Celite®垫过滤,用CH_2Cl_2或CH_3CN洗涤并且将溶剂浓缩至干。

[0159] (2-溴乙氧基(5-N-乙酰氨基-4,7,8,9-四-O-乙酰基-3,5-二脱氧-D-甘油基-α-D-半乳-2-尤罗吡喃索尼克基(nonylopyranosyl)))-酸甲酯(3a)。化合物3a依照用于糖基化反应的通用方法合成。通过柱色谱法(梯度正庚烷/EtOAc)的纯化得到化合物3a和相应的反向端基异构体。化合物3a未经另外的纯化用于下一步骤。

[0160] (3-溴-丙基氧基(5-N-乙酰氨基-4,7,8,9-四-O-乙酰基-3,5-二脱氧-D-甘油基-α-D-半乳-2-尤罗吡喃索尼克基))-酸甲酯(3b)。化合物3b依照用于糖基化反应的通用方法合成。通过柱色谱法(梯度正庚烷/EtOAc)的纯化得到化合物3b和相应的反向端基异构体。化合物3b未经另外的纯化用于下一步骤。

[0161] (2-溴乙氧基(5-N-丙酰氨基-4,7,8,9-四-O-乙酰基-3,5-二脱氧-D-甘油基-α-D-半乳-2-尤罗吡喃索尼克基))-酸甲酯(4a)。化合物4a依照用于糖基化反应的通用方法合成。通过柱色谱法(甲苯/EtOH,10∶1)的纯化得到化合物4a和相应的反向端基异构体(390mg,95%;α/β(6∶1))。化合物4a未经另外的纯化用于下一步骤。

[0162] (3-溴-丙基氧基(5-N-丙酰氨基-4,7,8,9-四-O-乙酰基-3,5-二脱氧-D-甘油基-α-D-半乳-2-尤罗吡喃索尼克基))-酸甲酯(4b)。化合物4b依照用于糖基化反应的通用方法合成。通过柱色谱法(甲苯/EtOH,8∶1)的纯化得到化合物4b和相应的反向端基异构体(400mg,98%;α/β(22∶3))。化合物4b未经另外的纯化用于下一步骤。

[0163] 用于合成叠氮基衍生物的通用方法。

[0164] 向溶解在DMSO(40mL/mmol)中的溴代衍生物(1.0当量)中连续分批加入叠氮化钠(6.0当量)和TBAI(2.0当量)。允许反应在室温和氮气氛下进行6h。在完成之后,将混合物用CH_2Cl_2稀释,用水和盐水洗涤,用$MgSO_4$干燥,过滤并浓缩至干。

[0165] (2-叠氮基乙氧基(5-N-乙酰氨基-4,7,8,9-四-O-乙酰基-3,5-二脱氧-D-甘油基-α-D-半乳-2-尤罗吡喃索尼克基))-酸甲酯(5a)。化合物5a依照用于合成叠氮基衍生物的通用方法合成。通过柱色谱法(CH_2Cl_2/MeOH,95∶5)的纯化得到化合物5a和相应的反向端基异构体(α/β(5∶1))。化合物5a未经另外的纯化用于下一步骤。

[0166] (3-叠氮基-丙基氧基(5-N-乙酰氨基-4,7,8,9-四-O-乙酰基-3,5-二脱氧-D-甘油基-α-D-半乳-2-尤罗吡喃索尼克基))-酸甲酯(5b)。化合物5b依照用于合成叠氮基衍生物的通用方法合成。通过柱色谱法(CH_2Cl_2/MeOH,95∶5)的纯化得到化合物5b和相应的反向端基异构体(α/β(n.d.))。化合物5b未经另外的纯化用于下一步骤。

[0167] (2-叠氮基乙氧基(5-N-丙酰氨基-4,7,8,9-四-O-乙酰基-3,5-二脱氧-D-甘油基-α-D-半乳-2-尤罗吡喃索尼克基))-酸甲酯(6a)。化合物6a依照用于合成叠氮基衍生物的通用方法合成。通过柱色谱法(甲苯/CH_2Cl_2/MeOH,10∶2∶0.5)的纯化得到化合物6a和相应的反向端基异构体(366mg,定量;α/β(6∶1))。化合物6a未经另外的纯化用于下一步骤。

[0168] (3-叠氮基-丙基氧基(5-N-丙酰氨基-4,7,8,9-四-O-乙酰基-3,5-二脱氧-D-甘油基-α-D-半乳-2-尤罗吡喃索尼克基))-酸甲酯(6b)。化合物6b依照用于合成叠氮基衍生物

的通用方法合成。通过柱色谱法(甲苯/CH_2Cl_2/MeOH,8∶2∶0.5)的纯化得到化合物6b和相应的反向端基异构体(419mg,定量;α/β(22∶3))。化合物6b未经另外的纯化用于下一步骤。

[0169] 用于唾液苷的O-脱酰化的通用方法。

[0170] 向溶解在MeOH(70mL)中的全酰化(peracylated)唾液苷(1.0当量)中加入甲醇钠(3.9当量)。允许反应在室温和氮气氛下进行3h。在完成之后,通过逐滴加入冰冷的AcOH或Amberlyst®15中和该溶液。然后将溶剂浓缩至干。

[0171] (2-叠氮基乙氧基(5-N-乙酰氨基-3,5-二脱氧-D-甘油基-α-D-半乳-2-尤罗吡喃索尼克基))-酸甲酯(7a)。化合物7a依照用于唾液苷的O-脱酰化的通用方法合成。通过柱色谱法(EtOAc/EtOH/H_2O,4∶1∶0.1)的纯化得到化合物7a(256mg,46%收率,在三个步骤上)。

[0172] ^1H NMR(400MHz,CD_3OD):δ3.93-4.02(m,1H,-OCH_{2b}-),3.85(s,3H,OCH_3),3.80-3.84(m,2H,H-8,H-9_b),3.77(t,$J_{5,4}\approx J_{5,6}$=10.2Hz,1H,H-5),3.60-3.73(m,3H,H-4,H-9_a,-OCH_{2a}-),3.58(dd,$J_{6,5}$=10.7和$J_{6,7}$=1.8Hz,1H,H-6),3.51(dd,$J_{7,8}$=8.7和$J_{6,7}$=1.8Hz,1H,H-7),3.27-3.43(m,2H,-CH_2N_3),2.72(dd,$J_{3eq,3ax}$=12.8和$J_{3eq,4}$=4.6Hz,1H,H-3_{eq}),2.00(s,3H,$COCH_3$),1.77(dd,$J_{3eq,3ax}$=12.8和$J_{3ax,4}$=11.8Hz,1H,H-3_{ax})。

[0173] ^{13}C NMR(100MHz,CD_3OD):δ175.22,170.71,100.20,75.05,72.37,70.18,68.49,64.74,64.47,53.79,53.42,51.74,41.57,22.66。

[0174] ESI-MS m/z理论值$C_{14}H_{26}N_4O_9$(M+H)$^+$392.15和$C_{14}H_{25}N_4NaO_9$(M+Na)$^+$415.14;实验值分别为392.56和415.31。

[0175] (3-叠氮基-丙基氧基(5-N 乙酰氨基-3,5-二脱氧-D-甘油基-α-D-半乳-2-尤罗吡喃索尼克基))-酸甲酯(7b)。化合物7b依照用于唾液苷的O-脱酰化的通用方法合成。通过柱色谱法(EtOAc/EtOH/H_2O,4∶1∶0.1)的纯化得到化合物7b(289mg,55%收率,在三个步骤上)。

[0176] ^1H NMR(400MHz,CD_3OD):δ3.80-3.92(m,6H,-OCH_{2b}-,H-9_b,H-8,OCH_3),3.77(t,$J_{5,4}\approx J_{5,6}$=10.2Hz,1H,H-5),3.61-3.69(m,2H,H-9_a,H-4),3.59(dd,$J_{6,5}$=10.3和$J_{6,7}$=2.0Hz,1H,H-6),3.51(dd,$J_{7,8}$=9.2和$J_{6,7}$=1.9Hz,1H,H-7),3.43-3.50(m,1H,OCH_{2a}-),3.38(t,J=6.6Hz,2H,-CH_2N_3),2.68(dd,$J_{3eq,3ax}$=12.8和$J_{3eq,4}$=4.7Hz,1H,H-3_{eq}),2.00(s,3H,$COCH_3$),1.75-1.85(m,2H,-CH_2-),1.74(dd,$J_{3eq,3ax}$=12.8和$J_{3ax,4}$=11.8Hz,1H,H-3_{ax})。

[0177] ^{13}C NMR(100MHz,CD_3OD):δ175.22,171.06,100.21,74.97,72.45,70.20,68.52,64.71,62.09,53.83,53.38,48.98,41.69,30.14,22.65。

[0178] ESI-MSm/z理论值$C_{15}H_{26}N_4O_9$(M+H)$^+$407.17和$C_{15}H_{25}N_4NaO_9$(M+Na)$^+$429.16;实验值分别为406.87和428.56。

[0179] (2-叠氮基乙氧基(5-N-丙酰氨基-3,5-二脱氧-D-甘油基-α-D-半乳-2-尤罗吡喃索尼克基))-酸甲酯(8a)。化合物8a依照用于唾液苷的O-脱酰化的通用方法合成。通过柱色谱法(甲苯/CH_2Cl_2/MeOH,3.5∶6∶0.5至3∶6∶1)的纯化得到化合物8a(120mg,46%收率,在三个步骤上)。

[0180] ^1H NMR(400MHz,CD_3OD):δ3.94-4.00(m,1H,-OCH_{2b}-),3.85(s,3H,OCH_3),3.80-3.84(m,2H,H-8,H-9_b),3.77(t,$J_{5,4}\approx J_{5,6}$=10.4Hz,1H,H-5),3.67-3.72(ddd,$J_{4,3ax}$=11.6,$J_{5,4}$=10.4,$J_{4,3eq}$=4.6Hz,1H,H-4),3.60-3.66(m,2H,H-9_a,-OCH_{2a}-),3.57(dd,$J_{6,5}$=10.2和

$J_{6,7}$=1.6Hz,1H,H-6),3.49(dd,$J_{7,8}$=8.9和$J_{6,7}$=1.6Hz,1H,H-7),3.32-3.35(m,1H,-$CH_{2b}N_3$),2.72(dd,$J_{3eq,3ax}$=12.8和$J_{3eq,4}$=4.6Hz,1H,H-3_{eq}),2.27(q,J=7.6Hz,2H,-$COCH_2$-),1.76(dd,$J_{3eq,3ax}$=12.8和$J_{3ax,4}$=11.6Hz,1H,H-3_{ax}),1.14(t,J=7.6Hz,3H,-$COCH_2$)。

[0181] ^{13}C NMR(100MHz,CD_3OD):δ179.01,170.73,100.19,75.09,72.36,70.17,68.40,64.72,64.47,53.64,53.43,51.73,41.64,30.16,10.28。

[0182] ESI-MS m/z理论值$C_{15}H_{27}N_4O_9$(M+H)$^+$407.18和$C_{15}H_{26}N_4NaO_9$(M+Na)$^+$429.16;实验值分别为407.09和429.02。

[0183] (3-叠氮基-丙基氧基(5-N-丙酰氨基-3,5-二脱氧-1)-甘油基-α-D-半乳-2-尤罗吡喃索尼克基))-酸甲酯(8b)。化合物8b依照用于唾液苷的O-脱酰化的通用方法合成。通过柱色谱法(甲苯/CH_2Cl_2/MeOH,3.5:6:0.5至3:6:1)的纯化得到化合物8b(157mg,55%收率,在三个步骤上)。

[0184] ^{1}H NMR(400MHz,CD_3OD):δ3.80-3.89(m,3H,-OCH_{2b}-,H-9_b,H-8),3.84(s,3H,OCH_3),3.76(t,$J_{5,4}\approx J_{5,6}$=10.2Hz,1H,H-5),3.60-3.69(m,2H,H-9_a,H-4),3.58(dd,$J_{6,5}$=10.2和$J_{6,7}$=1.6Hz,1H,H-6),3.49(dd,$J_{7,8}$=8.9和$J_{6,7}$=1.6Hz,1H,H-7),3.43-3.50(m,1H,OCH_{2a}-),3.38(t,J=6.6Hz,2H,-CH_2N_3),2.68(dd,$J_{3eq,3ax}$=12.8和$J_{3eq,4}$=4.6Hz,1H,H-3_{eq}),2.27(q,J=7.6Hz,2H,-$COCH_2$-),1.75-1.83(m,2H,-CH_2-),1.74(dd,$J_{3eq,3ax}$=12.8和$J_{3ax,4}$=11.8Hz,1H,H-3_{ax}),1.13(t,J=7.6Hz,3H,$COCH_2CH_3$)。

[0185] ^{13}C NMR(100MHz,CD_3OD):δ178.99,171.08,100.20,75.01,72.43,70.18,68.42,64.69,62.07,53.68,53.39,48.78,41.76,30.16,30.13,10.28。

[0186] ESI-MS m/z理论值$C_{16}H_{29}N_4O_9$(M+H)$^+$421.19和$C_{16}H_{28}N_4NaO_9$(M+Na)$^+$443.18;实验值分别为420.99和442.93。

[0187] 用于合成三价唾液酸的通用方法。

[0188] 向溶解在THF/H_2O(1:1,81mL/mmol)中的叠氮基衍生物(3.7当量)中连续加入三炔丙基胺(1.0当量)、$CuSO_4$(0.9当量)和抗坏血酸钠(0.9当量)。允许反应在50℃进行3h并且在室温再进行18h。在起始叠氮化物完全消耗之后,在真空下蒸发THF并且将粗产物冷冻干燥。将粗制固体溶解在DMSO中并通过HPLC(A:aq.0.005%CF_3COOH,在H_2O中,B:aq.0.005%CF_3COOH,在CH_3CN中,有机相梯度7%至25%)纯化。将收集的含有化合物的馏分冷冻干燥,得到纯的产物。

[0189] 三((1-(2-O-(((5-N-乙酰氨基-3,5-二脱氧-D-甘油基-α-D-半乳-2-尤罗吡喃索尼克基)-酸甲酯))-2-氧代乙基-1H-1,2,3-三唑-4-基)甲基)胺(9a)。化合物9a依照用于合成三价唾液酸的通用方法合成(40mg,51%收率)。

[0190] ^{1}H NMR(400MHz,CD_3OD):δ8.08(s,3H,3ArCH),8.01(d,$J_{5,NH}$=8.4Hz,3H,3NH),4.60(t,J=5.0Hz,6H,3-CH_2-ArN),4.15-4.27(m,3H,3-OCH_{2b}),3.70-3.97(m,27H,3-OCH_{2a},3H-9_b,-N(CH_2)$_3$,3H-8,3H-5,3-OCH_3),3.55-3.67(m,9H,3H-4,3H-9_b,3H-6),3.48(dd,$J_{7,8}$=8.8和$J_{6,7}$=1.4Hz,3H,H-7),2.58(dd,$J_{3eq,3ax}$=12.8和$J_{3eq,4}$=4.7Hz,3H,3H-3_{eq}),1.99(s,9H,3-$COCH_3$),1.71(dd,$J_{3eq,3ax}$=12.8和$J_{3ax,4}$=11.7Hz,3H,3H-3_{ax})。

[0191] ^{13}C NMR(100MHz,CD_3OD):δ175.12,170.47,144.25,126.94,100.28,75.07,72.25,

70.16,68.40,64.84,63.91,53.68,53.55,51.47,48.73,41.44,22.70。

[0192] ESI-MS m/z理论值$C_{51}H_{82}N_{13}O_{27}$(M+H)$^+$1308.54;实验值为1309.47。

[0193] 三((1-(2-O-((5-N-乙酰氨基-3,5-二脱氧-D-甘油基-α-D-半乳-2-尤罗吡喃索尼克基)-酸甲酯))-3-氧代丙基-1H-1,2,3-三唑-4,1-基)甲基)胺(9b)。化合物9b依照用于合成三价唾液酸的通用方法合成(60mg,45%收率)。

[0194] ^{1}H NMR(400MHz,CD_3OD):δ8.01(s,3H,3ArCH),4.50(t,J=6.6Hz,6H,3-CH_2-ArN),3.70-3.88(m,27H,3-OCH_{2b}-,3H-9_b,3-OCH_3,-N(CH_2)$_3$,3H-8,3H-5),3.54-3.69(m,9H,3H-4,3H-9_b,3H-6),3.49(dd,$J_{7,8}$=9.0和$J_{6,7}$=1.3Hz,3H,3H-7),3.35-3.43(m,3H,3-OCH_{2a}),2.68(dd,$J_{3eq,3ax}$=12.8和$J_{3eq,4}$=4.7Hz,3H,3H-3_{eq}),2.09-2.20(m,6H,3-CH_2-),2.00(s,9H,3-$COCH_3$),1.74(dd,$J_{3eq,3ax}$=12.7和$J_{3ax,4}$=11.8Hz,3H,3H-3_{ax})。

[0195] ^{13}C NMR(100MHz,CD_3OD):δ175.20,170.86,145.26,125.97,100.12,74.92,72.43,70.19,68.50,64.77,61.77,53.80,53.54,48.48,48.10,41.65,31.29,22.72。

[0196] ESI-MS m/z理论值$C_{54}H_{88}N_{13}O_{27}$(M+H)$^+$1350.58;实验值为1350.21。

[0197] 三((1-(2-O-((5-N-丙酰氨基-3,5-二脱氧-D-甘油基-α-D-半乳-2-尤罗吡喃索尼克基)-酸甲酯))-2-氧代乙基-1H-1,2,3-三唑-4-基)甲基)胺(10a)。化合物10a依照用于合成三价唾液酸的通用方法合成(60mg,50%收率)。

[0198] ^{1}H NMR(400MHz,CD_3OD):δ8.04(s,3H,3ArCH),4.50(t,J=5.1Hz,6H,3-CH_2-ArN),4.16-4.23(m,3H,3-OCH_{2b}),3.86-3.92(m,3H,3-OCH_{2a}),3.74-3.84(m,15H,3H-9_b,-N(CH_2)$_3$,3H-8,3H-5),3.72(s,9H,3-OCH_3),3.59-3.67(m,6H,3H-4,3H-9_b),3.57(dd,$J_{6,5}$=10.4和$J_{6,7}$=1.3Hz,3H,3H-6),3.47(dd,$J_{7,8}$=8.9和$J_{6,7}$=1.3Hz,3H,H-7),2.58(dd,$J_{3eq,3ax}$=12.4和$J_{3eq,4}$=4.6Hz,3H,3H-3_{eq}),2.25(q,J=7.6Hz,6H,3-$COCH_2$-),1.74(看起来为t,$J_{3eq,3ax}$≈$J_{3ax,4}$=12.4Hz,3H,3H-3_{ax}),1.12(t,J=7.6Hz,9H,3-$COCH_2CH_3$)。

[0199] ^{13}C NMR(100MHz,CD_3OD):δ178.88,170.43,145.08,126.66,100.23,75.04,72.15,69.97,68.29,64.73,63.95,53.60,53.45,51.43,49.07,41.52,31.15,10.36。

[0200] ESI-MS m/z理论值$C_{54}H_{88}N_{13}O_{27}$(M+H)$^+$1350.59;实验值为1351.56。

[0201] 三((1-(2-O-((5-N-丙酰氨基-3,5-二脱氧-D-甘油基-α-D-半乳-2-尤罗吡喃索尼克基)-酸甲酯))-3-氧代丙基-1H-1,2,3-三唑-4-基)甲基)胺(10b)。化合物10b依照用于合成三价唾液酸的通用方法合成(45mg,34%收率)。

[0202] ^{1}H NMR(400MHz,CD_3OD):δ8.03(s,3H,3ArCH),7.89(d,$J_{5,NH}$=8.5Hz,3H,3NH),4.50(t,J=6.5Hz,6H,3-CH_2-ArN),3.73-3.86(m,18H,3-OCH_{2b}-,3H-9_b,-N(CH_2)$_3$,3H-8,3H-5),3.81(s,9H,3-OCH_3),3.58-3.70(m,6H,3H-4,3H-9_b),3.56(dd,$J_{6,5}$=10.4和$J_{6,7}$=1.3Hz,3H,3H-6),3.47(dd,$J_{7,8}$=8.9和$J_{6,7}$=1.3Hz,3H,3H-7),3.35-3.43(m,3H,3-OCH_{2a}),2.68(dd,$J_{3eq,3ax}$=12.4和$J_{3eq,4}$=4.6Hz,3H,3H-3_{eq}),2.27(q,J=7.6Hz,6H,3-$COCH_2$-),2.10-2.20(m,6H,3-CH_2-),1.74(看起来为t,$J_{3eq,3ax}$≈$J_{3ax,4}$=12.4Hz,3H,3H-3_{ax}),1.13(t,J=7.6Hz,9H,3-$COCH_2\underline{CH_3}$)。

[0203] ^{13}C NMR(100MHz,CD_3OD):δ178.92,170.88,143.82,126.16,100.12,75.01,72.44,70.22,68.44,64.72,61.73,53.67,53.52,49.28,49.07,41.75,31.28,30.17,10.32。

[0204] ESI-MS m/z理论值$C_{57}H_{94}N_{13}O_{27}$(M+H)$^+$1392.64和$C_{57}H_{93}N_{13}NaO_{27}$(M+Na)$^+$1414.62;实

验值分别为1392.50和1414.47。

[0205] 用于皂化甲基酯的通用方法。

[0206] 向溶解在MeOH(135mL/mmol)中的三价甲基酯衍生物(1.0当量)中加入LiOH的水溶液(1M,9.0当量)。允许混合物在室温进行9h。在完成之后,反应混合物用Dowex 50W8(H^+)中和。在除去Dowex树脂之后,将溶剂在真空下蒸发并将溶解在水中的粗产物在C-18塞上用H_2O洗脱。将含化合物的馏分冷冻干燥,得到纯的三价唾液酸衍生物。

[0207] 三((1-(2-O-(5-N-乙酰氨基-3,5-二脱氧-D-甘油基-α-D-半乳-2-尤罗吡喃索尼克酸))-2-氧代乙基-1H-1,2,3-三唑-4-基)甲基)胺(ME0385)。ME0385依照用于皂化甲基酯的通用方法合成(22mg,76%收率)。$[\alpha]_D^{20}$-[α]15.77(c 4.8mg/mL,H_2O)。

[0208] ^1H NMR(400MHz,D_2O):δ8.40(s,3H,3ArCH),4.72(t,J=5.2Hz,6H,3-CH_2-ArN),4.60(bs,6H,-N(CH_2)$_3$),4.14-4.27(m,3H,3-OCH_{2b}),3.93-4.02(m,3H,3-OCH_{2a}),3.85(dd,$J_{9a,9b}$=11.7和$J_{9b,8}$=2.3Hz 3H,3H-9_b),3.73-3.82(m,6H,3H-8,3H-5),3.59-3.72(m,9H,3H-4,3H-6,3H-9_a),3.56(dd,$J_{7,8}$=9.3和$J_{6,7}$=1.7Hz,3H,H-7),2.66(dd,$J_{3eq,3ax}$=12.5和$J_{3eq,4}$=4.6Hz,3H,3H-3_{eq}),2.04(s,9H,3-$COCH_3$),1.67(看起来为t,$J_{3eq,3ax}\approx J_{3ax,4}$=12.0Hz,3H,3H-$3_{ax}$)。

[0209] ^{13}C NMR(100MHz,D_2O):δ175.05,172.55,135.87,128.64,100.05,72.72,71.42,68.10,67.88,62.68,62.58,51.73,50.57,46.49,39.64,22.0。

[0210] ESI-MSm/z理论值$C_{48}H_{76}N_{13}O_{27}$(M+H)$^+$1266.49;实验值为1266.29。

[0211] 三((1-(2-O-(5-N-乙酰氨基-3,5-二脱氧-D-甘油基-α-D-半乳-2-尤罗吡喃索尼克酸))-3-氧代丙基-1H-1,2,3-三唑-4-基)甲基)胺(ME0386)。ME0386依照用于皂化甲基酯的通用方法合成(27mg,75%收率)。$[\alpha]_D^{20}$-3.83(c 3.9mg/mL,H_2O)。

[0212] ^1H NMR(400MHz,D_2O):δ8.02(s,3H,3ArCH),4.45-4.64(m,6H,3-CH_2-ArN),3.92(bs,6H,N(CH_2)$_3$),3.56-3.87(m,24H,3H-9_b,3-OCH_2-,3H-8,3H-5,3H-4,3H-6,3H-9_a),3.46-3.54(m,3H,3H-7),2.73(dd,$J_{3eq,3ax}$=12.5和$J_{3eq,4}$=4.7Hz,3H,3H-3_{eq}),2.15-2.25(m,6H,3-CH_2-),2.05(s,9H,$COCH_3$),1.63(看起来为t,$J_{3eq,3ax}\approx J_{3ax,4}$=12.1Hz,3H,3H-$3_{ax}$)。

[0213] ^{13}C NMR(100MHz,D_2O):δ175.05,173.52,142.34,125.79,100.48,72.56,71.71,68.28,68.16,62.51,61.22,51.89,47.54,47.30,40.29,29.64,22.02。

[0214] ESI-MSm/z理论值$C_{51}H_{82}N_{13}O_{27}$(M+H)$^+$1308.54;实验值为1308.51。

[0215] 三((1-(2-O-(5-N-丙酰氨基-3,5-二脱氧-D-甘油基-α-D-半乳-2-尤罗吡喃索尼克酸))-2-氧代乙基-1H-1,2,3-三唑-4-基)甲基)胺(ME0408)。ME0408依照用于皂化甲基酯的通用方法合成(19mg,72%收率)。$[\alpha]_D^{20}$-[α]14.34(c 4.6mg/mL,H_2O)。

[0216] ^1H NMR(400MHz,D_2O):δ8.17(s,3H,3ArCH),4.64(bs,6H,3-CH_2-ArN),4.07-4.20(m,9H,3-OCH_{2b},-N(CH_2)$_3$),3.87-3.93(m,3H,3-OCH_{2a}),3.82(dd,$J_{9a,9b}$=11.7和$J_{9b,8}$=2.4Hz 3H,3H-9_b),3.75(ddd,$J_{8,7}$=8.9,$J_{8,9a}$=5.6Hz,$J_{9b,8}$=2.4Hz 3H,3H-8),3.72(t,$J_{5,6}\approx J_{5,4}$=10.1Hz,3H,3H-5),3.63-3.69(m,3H,3H-4),3.56-3.63(m,6H,3H-6,3H-9_a),3.51(dd,$J_{7,8}$=8.9和$J_{6,7}$=1.6Hz,3H,H-7),2.66(dd,$J_{3eq,3ax}$=12.3和$J_{3eq,4}$=4.6Hz,3H,3H-3_{eq}),2.28(q,J=7.6Hz,6H,3-$COCH_2$-),1.74(看起来为t,$J_{3eq,3ax}\approx J_{3ax,4}$=12.3Hz,3H,3H-$3_{ax}$),1.10(t,J=7.6Hz,9H,3-$COCH_2CH_3$)。

[0217] ^{13}C NMR(100MHz,D_2O):δ179.90,174.12,127.82,101.35,73.50,72.50,69.00,68.91,63.74,63.40,52.51,51.39,49.84,40.87,30.05,10.36。

[0218] ESI-MSm/z理论值$C_{51}H_{82}N_{13}O_{27}$(M+H)$^+$1308.54;实验值为1308.44。

[0219] 三((1-(2-O-(5-N-丙酰氨基-3,5-二脱氧-D-甘油基-α-D-半乳-2尤罗吡喃索尼克酸)-3-氧代丙基-1H-1,2,3-三唑-4-基)甲基)胺(ME0407)。ME0407依照用于皂化甲基酯的通用方法合成(27mg,75%收率)。$[\alpha]_D^{20}$-0.76(c 4.8mg/mL,H_2O)。

[0220] ^1H NMR(400MHz,D_2O):δ8.31(s,3H,3ArCH),4.53-4.63(m,12H,3-CH_2-ArN,N(CH_2)$_3$),3.82(dd,$J_{9b,9a}$=11.8和$J_{9b,8}$=2.4Hz,3H,H-9_b),3.74-3.83(m,12H,3-OCH_{2b}-,3H-8,3H-5),3.67-3.73(m,3H,3H-4),3.67(dd,$J_{6,5}$=10.4和$J_{6,7}$=1.5Hz,3H,3H-6),3.60(dd,$J_{9a,9b}$=11.8和$J_{9a,8}$=5.9Hz,3H,3H-9_a),3.53(dd,$J_{7,8}$=8.9和$J_{6,7}$=1.5Hz,3H,3H-7),3.42-3.50(m,3H,3-OCH_{2a}),2.69(dd,$J_{3eq,3ax}$=12.4和$J_{3eq,4}$=4.5Hz,3H,3H-3_{eq}),2.29(q,J=7.6Hz,6H,3-$COCH_2$-),2.15-2.25(m,6H,3-CH_2-),1.65(看起来为t,$J_{3eq,3ax}\approx J_{3ax,4}$=12.4Hz,3H,3H-$3_{ax}$),1.11(t,J=7.6Hz,9H,3-$COCH_2\underline{CH_3}$)。

[0221] ^{13}C NMR(100MHz,D_2O):δ178.87,173.77,136.66,128.98,100.86,73.47,72.34,69.04,68.66,63.47,61.82,52.52,48.52,47.57,40.83,30.17,30.01,10.30。

[0222] ESI-MS m/z理论值$C_{54}H_{88}N_{13}O_{27}$(M+H)$^+$1350.59;实验值为1350.28。

[0223] 实施例2

[0224] 使用三(2-叠氮基乙基)胺作为核心部分

[0225] 到N-酰基三价唾液酸,如三((4-(2-O-(5-N-乙酰氨基-3,5-二脱氧-D-甘油基-α-D-半乳-2-尤罗吡喃索尼克酸))-2-氧代乙基-1H-1,2,3-三唑-1-基)乙基)胺(ME0461)和三((4-(2-O-(5-N-乙酰氨基-3,5-二脱氧-D-甘油基-α-D-半乳-2-尤罗吡喃索尼克酸))-2-氧代甲基-1H-1,2,3-三唑-1-基)乙基)胺(ME0462)的路线证实为简单并且可以从商购获得的化学品在七个步骤中实现或者从关键中间体1在四个步骤中实现(方案2)。唾液酸噻吩基衍生物1(易于制备自商业唾液酸)的合成根据公开的程序进行(Marra等Carbohydr.Res.1989,187,35)。唾液苷11a和11b通过用化合物1糖基化相应的醇(分别为炔丙醇和3-丁炔-1-醇)而以适中转化率获得。使用其他炔醇将为构造嵌段提供具有其他长度的连接体。所述反应得到端基异构体的不可分离混合物连同所产生的在此阶段没有进一步纯化的消除产物。

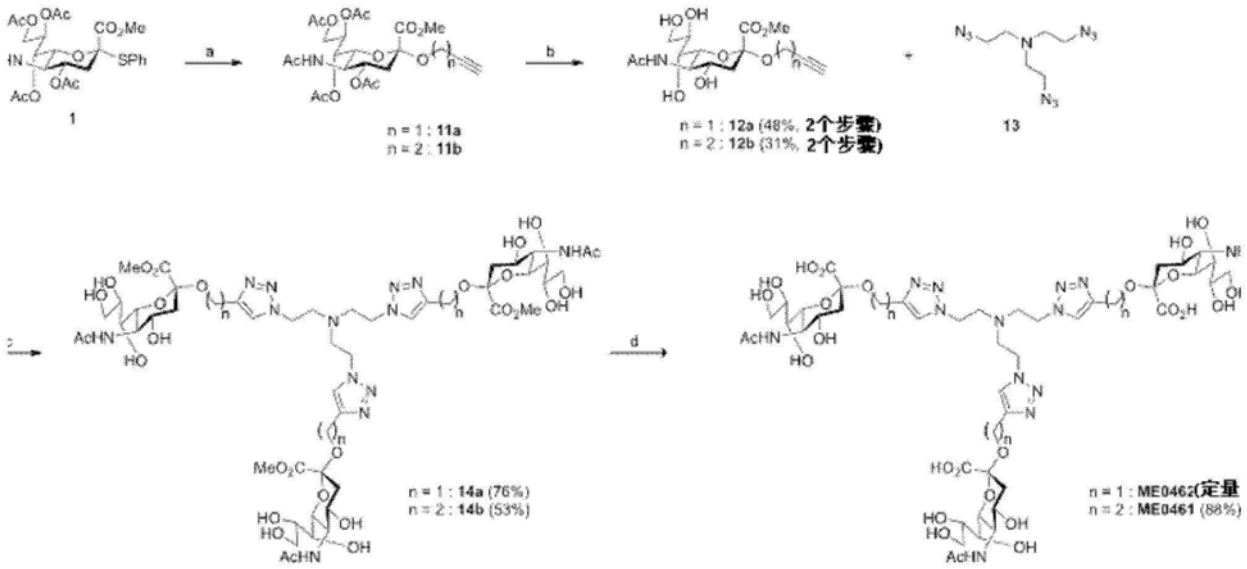
[0226] 随后使用标准Zemplèn条件的O-脱酰化在两个步骤上分别以48%和31%收率得到端基异构体纯的12a和12b。

[0227] 然后,将化合物12a和12b在铜催化的叠氮化物-炔环加成反应("click"反应)中与三(2-叠氮基乙基)胺(13)反应。

[0228] 三叠氮基衍生物13从商购获得的三乙醇胺在两个步骤中合成。首先,根据公开的程序将三乙醇胺转化为三(2-氯乙基)胺(M.Sun等J.Am.Chem.Soc.2012,134(51),20581)。然后,该氯代衍生物容易地转化为其叠氮基类似物13(注意:13是高度爆炸性的,因此总是将其储存在溶液和黑暗中很重要)。甲基酯14a和14b分别以76%和53%收率获得。

[0229] 随后的皂化分别以定量和88%收率提供最终的目标化合物ME0462和ME0461。

[0230]



[0231] 方案2.[a]ME0462和ME0461的合成

[0232] [a]试剂和条件：(a)i:分子筛3Å,3-丁炔-1醇或炔丙醇，CH_3CN/CH_2Cl_2(3∶2)，室温，2h，ii:AgOTf，IBr，-73℃，4.5h，iii:DIPEA，-73℃，30min。(b)i:NaOMe，MeOH，室温，3h，ii:H^+离子交换树脂。(c)$CuSO_4$，抗坏血酸钠，THF/H_2O(1∶1)，50℃，3h，然后室温，18h。(d)i:LiOH，MeOH，室温，9h，ii:H^+离子交换树脂。

[0233] 用于糖基化反应的通用方法。

[0234] 在室温和在氮气氛下将糖基供体1(1.0当量)和新鲜粉碎的分子筛3Å(1.5g/mmol)溶解/悬浮在CH_3CN/CH_2Cl_2(3∶2;35mL/mmol)的混合物中。加入3-丁炔-1-醇或炔丙醇(4.5当量)，并将混合物搅拌2h。反应被保护免于光并加入三氟甲磺酸银(2.0当量)在CH_3CN中的溶液。将混合物冷却至-73℃(-70℃＜t＜-75℃)并加入IBr(1.4当量，1M，在CH_2Cl_2中)。允许反应在-73℃进行4.5h。在完成之后，加入DIPEA(6.0当量)。将反应混合物在-73℃再搅拌30min，然后允许温热至室温。将混合物通过Celite®垫过滤，用CH_2Cl_2或CH_3CN洗涤并将溶剂浓缩至干。

[0235] 2-(丙-2-炔基氧基(5-N-乙酰氨基-4,7,8,9-四-O-乙酰基-3,5-二脱氧-D-甘油基-α-D-半乳-2-尤罗吡喃索尼克基))-酸甲酯(11a)。化合物11a依照用于糖基化反应的通用方法合成。通过柱色谱法(梯度正庚烷/EtOAc)的纯化得到化合物11a和相应的反向端基异构体。化合物11a未经另外的纯化用于下一步骤。

[0236] 2-(丁-3-炔基氧基(5-N-乙酰氨基-4,7,8,9-四-O-乙酰基-3,5-二脱氧-D-甘油基-α-D-半乳-2-尤罗吡喃索尼克基))-酸甲酯(11b)。化合物11b依照用于糖基化反应的通用方法合成。通过柱色谱法(梯度正庚烷/EtOAc)的纯化得到化合物11b和相应的反向端基异构体。化合物11b未经另外的纯化用于下一步骤。

[0237] 用于唾液苷的O-脱酰化的通用方法。

[0238] 向溶解在MeOH(70mL)中的全酰化唾液苷(1.0当量)中加入甲醇钠(3.9当量)。允许反应在室温和在氮气氛下进行3h。在完成之后，通过逐滴加入冰冷的AcOH或者通过Amberlyst®15中和该溶液。然后将溶剂浓缩至干。

[0239] 2-(丙-2-炔基氧基(5-N-乙酰氨基-3,5-二脱氧-D-甘油基-α-D-半乳-2-尤罗吡喃索尼克基))-酸甲酯(12a)。化合物12a依照用于唾液苷的O-脱酰化的通用方法合成。通过HPLC(A:aq.0.005％HCOOH,在H_2O中,B:aq.0.005％HCOOH,在CH_3CN中,有机相梯度5％至20％)的纯化得到化合物12a(178mg,48％收率,在两个步骤上)。

[0240] ^1H NMR(400MHz,CD_3OD):δ4.40(dd,J＝4.3Hz,J＝15.9Hz,1H),4.33(dd,J＝4.3Hz,J＝15.9Hz,1H),3.81-3.91(m,5H),3.78(d,J＝10.3Hz,1H),3.63-3.72(m,2H),3.60(dd,J＝1.5Hz,J＝10.4Hz,1H),3.52(dd,J＝1.4Hz,J＝9.0Hz,1H),2.86(t,J＝2.4Hz,1H),2.72(dd,$J_{3eq,4}$＝4.6Hz,$J_{3eq,3ax}$＝12.7Hz,1H),2.01(s,3H),1.75(dd,$J_{3eq,3ax}$＝12.7Hz,$J_{3ax,4}$＝11.8Hz,1H)。

[0241] 2-(丁-3-炔基氧基(5-N-乙酰氨基-3,5-二脱氧-D-甘油基-α-D-半乳-2-尤罗吡喃索尼克基))-酸甲酯(12b)。化合物12b依照用于唾液苷的O-脱酰化的通用方法合成。通过柱色谱法(EtOAc/EtOH/H_2O,4:1:0.1)的纯化得到化合物12b(218mg,31％收率,在两个步骤上)。

[0242] ^1H NMR(360MHz,CD_3OD):δ3.72-3.95(m,7H),3.45-3.71(m,6H),2.69(dd,$J_{3eq,4}$＝4.6Hz,$J_{3eq,3ax}$＝12.8Hz,1H),2.35-2.45(m,2H),2.26(t,J＝2.7Hz,1H)2.00(s,3H),1.73(dd,$J_{3eq,3ax}$＝12.3Hz,$J_{3ax,4}$＝12.0Hz,1H)。

[0243] 三(2-叠氮基乙基)胺(13)

[0244] 在搅拌下,将在0.5mL的$CHCl_3$中的三乙醇胺(0.298g,2.0mmol)的溶液缓慢加入到亚硫酰氯(0.52mL,7.0mmol)在0.8mL的$CHCl_3$的溶液中。在添加后,将反应混合物加热至回流温度达4小时。在冷却至室温之后,将白色固体产物过滤并用二氯甲烷洗涤(1.0mL×2),在真空干燥过夜后,以0.395g(82％)收率得到三(2-氯乙基)胺盐酸盐。接着,将三(2-氯乙基)胺盐酸盐(0.198g,0.82mmol)和叠氮化钠(0.320g,4.92mmol)加入到DMSO(7.0mL)中并将所得的混合物在92℃搅拌22小时。在冷却之后,将混合物倒入到蒸馏水(40.0mL)中并且将溶于用Na_2CO_3(10％aq.)碱化至pH＝10,用二氯甲烷(15.0mL×3)萃取。有机相用水(20.0mL)洗涤然后用Na_2SO_4干燥。将二氯甲烷浓缩至1mL,然后加入15.0mL的THF,再次浓缩至1.0mL,加入15.0mL的THF并浓缩至1.8mL。此含有0.8mmol的三(2-叠氮基乙基)胺的THF溶液可以用于下一步骤。(注意:13是高度爆炸性的,因此总是将其储存在溶液和黑暗中很重要)。

[0245] ^1H NMR(400MHz,$CDCl_3$):δ3.33(t,J＝6.2Hz,6H),2.76(t,J＝6.2Hz,6H)。

[0246] ESI-MS m/z理论值$C_6H_{13}N_{10}(M+H)^+$225.13;实验值为225.33。

[0247] 参见M.Sun,C-Y.Hong,C-Y.Pan,Journal of the American Chemical society 2012,134(51),20581-20584。

[0248] 三((4-(2-O-((5-N-乙酰氨基-3,5-二脱氧-D-甘油基-α-D-半乳-2-尤罗吡喃索尼克基)-酸甲酯))-2-氧代甲基-1H-1,2,3-三唑-1-基)乙基)胺(14a)

[0249] 向在水(1.7mL)和THF(1.7mL)的1:1混合物中的三(2-叠氮基乙基)胺(0.075mL,0.033mmol)的溶液中加入2-(丙-2-炔基氧基(5-N-乙酰氨基-3,5-二脱氧-D-甘油基-α-D-半乳-2-尤罗吡喃索尼克基))-酸甲酯(0.0538g,0.149mmol)、抗坏血酸钠(5.9mg,0.030mmol)和硫酸铜(II)(4.8mg,0.030mmol)同时搅拌。将该混合物首先在50℃加热3.5小时并在室温持续另外的18小时。在减压下蒸发THF之后,将残留物用蒸馏水稀释至2.6mL,然

后用制备型HPLC(A:aq.0.005%HCOOH,在H_2O中,B:0.005%HCOOH,在CH_3CN中,有机相梯度5%至20%/30min.)纯化,在冻干后以76%收率得到白色产物。

[0250] ^1H NMR(400MHz,$CDCl_3$):δ7.78(s,3H),4.92(d,J=12.6Hz,3H),4.64(d,J=12.1Hz,3H),4.30(t,J=6.2Hz,6H),3.79-3.93(m,18H),3.60-3.74(m,9H),3.47-3.58(m,3H),3.03(t,J=5.9Hz,6H),2.67(dd,$J_{3eq,4}$=4.6Hz,$J_{3eq,3ax}$=12.8Hz,3H),2.00(s,9H),1.74(t,$J_{3eq,3ax}$=12.3Hz,3H)。

[0251] ^{13}C NMR(100MHz,CD_3OD):δ175.05,170.75,145.52,126.09,100.06,74.98,72.26,70.33,68.53,64.93,58.51,55.09,53.71,53.59,41.65,22.75。

[0252] ESI-MS m/z理论值$C_{51}H_{82}N_{13}O_{27}(M+H)^+$1308.54;实验值为1309.13。

[0253] 三((4-(2-O-((5-N-乙酰氨基-3,5-二脱氧-D-甘油基-α-D-半乳-2-尤罗吡喃索尼克基)-酸甲酯))-2-氧代乙基-1H-1,2,3-三唑-1-基)乙基)胺(14b)

[0254] 向在水(2.5mL)和THF(2.5mL)的1:1混合物中的三(2-叠氮基乙基)胺(0.113mL,0.05mmol)的溶液中加入2-(丁-3-炔基氧基(5-N-乙酰氨基-3,5-二脱氧-D-甘油基-α-D-半乳-2-尤罗吡喃索尼克基))-酸甲酯(0.0845g,0.225mmol)、抗坏血酸钠(8.9mg,0.0449mmol)和硫酸铜(II)(7.2mg,0.0451mmol)同时搅拌。将该混合物首先在50℃加热3.5小时并且在室温持续另外的18小时。在减压下蒸发THF之后,将残留物用蒸馏水稀释至3.0mL,然后用制备型HPLC(A:aq.0.005%HCOOH,在H_2O中,B:0.005%HCOOH,在CH_3CN中,有机相梯度5%至20%/30min.)纯化,在冻干之后得到35.9mg(53.2%)白色产物。

[0255] ^1H NMR(400MHz,CD_3OD):δ8.02(d,J=8.5Hz,3H),7.66(s,3H),4.30(t,J=5.9Hz,6H),4.06(dt,J=9.3Hz,J=6.5Hz,3H),3.74-3.87(m,18H),3.57-3.72(m,12H),3.50(dd,J=1.2Hz,J=8.7Hz,3H),3.04(t,J=5.7Hz,6H),2.93(t,J=6.1Hz,6H),2.65(dd,$J_{3eq,4}$=4.6Hz,$J_{3eq,3ax}$=12.7Hz,3H),2.00(s,9H),1.72(t,$J_{3eq,3ax}$=12.3Hz,3H)。

[0256] ^{13}C NMR(100MHz,CD_3OD):δ175.16,170.90,146.05,124.81,100.22,74.94,72.44,70.25,68.52,64.86,64.05,54.85,53.80,53.48,41.74,27.27,22.72。

[0257] ESI-MS m/z理论值$C_{54}H_{88}N_{13}O_{27}(M+H)^+$1350.59;实验值为1351.70。

[0258] 三((4-(2-O-(5-N-乙酰氨基-3,5-二脱氧-D-甘油基-α-D-半乳-2-尤罗吡喃索尼克酸))-2-氧代甲基-1H-1,2,3-三唑-1-基)乙基)胺(ME0462)

[0259] 将以上获得的甲基酯(14a)溶解在MeOH(1.9mL)和LiOH(0.15mL,1.0M)溶液中。将该混合物在室温搅拌44小时,接着进行LCMS,用amberlite IR120中和至pH=7.0,浓缩并冻干,得到20.2mg白色产物。$[\alpha]_D^{20}$-11.7(c 1.0mg/mL,H_2O)。

[0260] ^1H NMR(400MHz,D_2O):δ7.84(s,3H),4.85(d,J=12.0Hz,3H),4.61(d,J=12.0Hz,3H),4.35(t,J=6.0Hz,6H),3.77-3.94(m,9H),3.49-3.76(m,12H),3.04(t,J=6.0Hz,6H),2.73(dd,$J_{3eq,4}$=4.5Hz,$J_{3eq,3ax}$=12.4Hz,3H),2.03(s,9H),1.66(t,$J_{3eq,3ax}$=12.3Hz,3H)。

[0261] ^{13}C NMR(100MHz,D_2O):δ174.99,173.20,143.93,125.23,100.66,72.64,71.61,68.25,68.21,62.58,57.31,52.67,51.81,48.17,40.23,22.00。

[0262] ESI-MS m/z理论值$C_{48}H_{76}N_{13}O_{27}(M+H)^+$1266.50;实验值为1267.10。

[0263] 三((4-(2-O-(5-N-乙酰氨基-3,5-二脱氧-D-甘油基-α-D-半乳-2-尤罗吡喃索尼克酸))-2-氧代乙基-1H-1,2,3-三唑-1-基)乙基)胺(ME0461)

[0264] 将甲基酯(25.8mg,14b)溶解在MeOH(2.5mL)和LiOH(0.17mL,1.0M)溶液中。将该混

合物在室温搅拌72小时，接着进行LCMS，用amberlite IR120中和，浓缩并冻干，得到22.0mg(88.0%)白色产物。$[\alpha]_D^{20}$-5.3(c 1.0mg/mL,MeOH)。

[0265] ^{1}H NMR(400MHz,D_2O)：δ7.68(s,3H)，4.47(t,J＝5.3Hz,6H)，3.96-4.10(m,3H)，3.66-3.87(m,18H)，3.59-3.66(m,3H)，3.52-3.58(m,3H)，3.30(t,J＝5.3Hz,6H)，2.99(t,J＝5.8Hz,6H)，2.63(dd,$J_{3eq,4}$＝4.4Hz,$J_{3eq,3ax}$＝12.7Hz,3H)，2.03(s,9H)，1.67(t,$J_{3eq,3ax}$＝12.5Hz,3H)。

[0266] ^{13}C NMR(100MHz,D_2O)：δ175.01,173.49,144.82,124.00,100.60,72.54,71.68,68.27,68.16,63.21,62.55,52.48,51.85,48.02,40.20,25.67,22.00。

[0267] ESI-MS m/z理论值$C_{51}H_{82}N_{13}O_{27}(M+H)^+$1308.54;实验值为1309.29。

[0268] 生物学评价

[0269] 细胞结合测定

[0270] 为了考擦新合成的化合物(ME0385、ME0386、ME0407、ME0408、ME0461和ME0462)阻止HAdV-37病毒粒子与HCE细胞的附着的效力，进行基于^{35}S-标记的病毒粒子的细胞结合测定。基于之前的研究，ME0322、唾液酸和GD1a聚糖用作参考化合物(Nilsson等N.Nat.Med.2011,17,105和Spjut等Angew.Chem.Int.Ed.2011,50,6519)。这些测定基本上如之前描述的(Arnberg等J.Virol.2000,74,42和Arnberg等J.Virol.2000,74,7691)进行(对于进一步的细节，见下文)。

[0271] 简言之，将^{35}S-标记的HAdV-37病毒粒子在有或没有处于不同浓度的三价唾液酸衍生物、GD1a聚糖和唾液酸的情况下进行预温育。将混合物用HCE细胞温育，然后洗掉未结合的病毒粒子。最后，使用闪烁计数器计数细胞相关的放射性。

[0272] 在图1a和2a中显示的结果是高度明显的，并且因此HAdV-37病毒粒子与HCE细胞的附着在新设计的三价唾液酸存在下被显著阻止。事实上，评价了该组新化合物并且发现比一价唾液酸(IC_{50}＝1.2mM)更有效四个数量级。而且，这些新的三价化合物比二价GD1a聚糖(IC_{50}＝91μM)显著更有效。

[0273] 如可以看出的，ME0385、ME0386和ME0461在防止HAdV-37病毒粒子免于HCE细胞附着中是有效的，IC_{50}值分别为107nM、40nM和376nM。最初的主导化合物(ME0322，IC_{50}＝3.2μM)证实为效力更低。因此，可以推断，本发明的化合物优于本领域之前已知的那些化合物。进一步发现(参见图2b)，类似物ME0462(IC50＝1.4nM)甚至比ME0385、ME0386和ME0461更有效。

[0274] 最后，IC_{50}值分别为23.4μM和4.5μM的N-酰基改性的衍生物ME0407和ME0408完成了该系列。不幸地，增大在N-酰基部分处的配体的亲油性，分别相比于ME0385和ME386没有增加效力，这得到之前的研究支持(Johansson等J.Med.Chem.2009,52,3666)。

[0275] 实验细节-细胞结合测定

[0276] 将S-标记的HAdV-37病毒粒子($5x10^8$/孔)在结合缓冲液(50μL;BB：含有1％BSA的达尔伯克改良伊格尔培养基(Dulbecco's modified eagle's medium)(Roche AB,Stockholm,Sweden)和HEPES(20mM,EuroClone,Milan,Italy)，pH 7.5)中，在有或没有处于不同浓度的三价唾液酸衍生物、GD1a聚糖或唾液酸(参见图1a)的情况下，在96-孔微板中在+4℃预温育1h。然后将这些混合物添加至在96-孔微板中预成团(prepelleted)的HCE细胞($1x10^5$/孔)。在再悬浮之后，将混合物在+4℃温育1h。最后，用BB洗掉未结合的病毒粒子，并

通过使用Wallac 1409闪烁计数器计数细胞相关的放射性。

[0277] 感染测定

[0278] 为了证实来自细胞结合测定的结果和进一步评价我们的这组化合物，进行感染实验(图1b、3a和3b)。所述测定基本上如之前描述的((Arnberg等J.Virol.2000,74,42和Arnberg等J.Virol.2000,74,7691))进行(对于进一步的细节，见下文)。

[0279] 简言之，将未标记的病毒粒子在有或没有处于不同浓度的三价唾液酸衍生物、GD1a聚糖或唾液酸的情况下进行预温育。然后将这些混合物添加至HCE细胞并在+4℃进行温育。洗掉未结合的病毒粒子，将所得到的混合物在+37℃进行温育，然后获得同步感染(所有病毒粒子同时进入细胞)。在感染44h之后，将细胞进行漂洗，固定，在进行清洗和染色之前用兔多克隆抗-HAdV-37抗体温育。最后，将细胞进行清洗并通过免疫荧光显微镜进行检查。

[0280] 因此，来自细胞结合测定的趋势(图1a、2a和2b)在感染实验(图1b、3a和3b)中得到证实。化合物ME0386和ME0385比ME0322更有效地防止HCE细胞被HAdV-37病毒粒子感染，其中IC50值分别为118nM和166nM。之前估算为380nM的ME0322的半最大抑制浓度在本文中计算为228nM。而且，ME0461和ME0462比ME0322更有效地防止HCE细胞被HAdV-37病毒粒子感染。此外，同样在感染测定中(参见图3b)，类似物ME0462(IC50＝2.1nM)是最有效的化合物。

[0281] 实验细节-感染测定

[0282] 将在48-孔板中的$7x10^7$未标记的病毒粒子/孔在无血清生长培养基(200μL)中，在有或没有处于不同浓度(参见图2B)的三价唾液酸衍生物、GD1a聚糖或唾液酸的情况下，在+4℃进行预温育。在1h之后，将混合物转移至含有$1x10^5$粘附性HCE细胞/孔的新的48-孔板并在+4℃温育。在1h之后，用无血清生长培养基洗掉未结合的病毒粒子，并将所得到的混合物用含有1％胎牛血清(FBS)的生长培养基在+37℃温育。在感染44h之后，将细胞在PBS中漂洗，用冷的(-20℃)99％甲醇固定10min并用在PBS(pH 7.4)中1∶200稀释的兔多克隆抗-HAdV-37抗体在室温温育。在1h之后，将细胞在PBS中清洗并用在PBS中1∶100稀释的FITC-标记的猪抗-兔lgG抗体(Dako-cytomation,Glostrup,Denmark)在室温下温育。最后，将细胞在PBS中清洗并且在免疫荧光显微镜(Axiovert 25,Carl Zeiss,Germany;10x放大)下检测。

[0283] 表面等离子体共振(SPR)

[0284] 最后，在表面等离子体共振(SPR)实验中考察ME0385、ME0386和ME0322并且测定它们各自对于固定的HAdV-37纤维旋钮的结合亲和力(Kd)(对于进一步的细节，见下文)。SPR数据很好证实了来自细胞结合和细胞感染测定二者的趋势，并且证实这三种化合物与HAdV-37纤维旋钮以一一结合模式相互作用。因此，ME0386(Kd＝69μM)被证实为与HAdV-37纤维旋钮最佳相互作用，接着是ME0385和ME0322(分别地，Kd＝76μM和Kd＝126μM)。还值得注意的是，HAdV-37纤维旋钮构造对Kd值的影响。类似于结合和感染测定，ME0462具有最高的结合亲和力(Kd＝9.5μM)。

[0285] 实验细节-表面等离子体共振(Surface Plasmon Resonance)

[0286] 使用表面等离子体共振BIAcore T100仪器进行动力学测量。将HAdV-37旋钮蛋白使用胺偶联试剂盒(GE Healthcare)共价偶联至CM5传感芯片(sensorchip)，至14-15ng/mm^2(～15000RU)的浓度。三价唾液酸缀合物ME0322、ME0385和ME0386与固定的旋钮的结合

在10mM HEPES、0.15M NaCl和0.05％P20 pH 7.4(1x HBS-EP+,GE Healthcare)中进行。使用的三价唾液酸的浓度为400、200、100、50(两次)、25、12.5(两次)、6,25、3,125、1,56和0.78μM。使用Biacore T100评价软件计算结合亲和力(Kd)。

[0287] 总之,已经发现本发明的化合物如ME0385、ME0386、ME0461和ME0462相比于现有的化合物如ME0322,在预防由病毒如HAdV-37引起的眼部感染方面显示出优异的效力,所述病毒结合至在要被所述病毒感染的细胞的细胞表面上存在的末端唾液酸残基。因此认为本发明的化合物高度可用于治疗流行性角膜结膜炎。

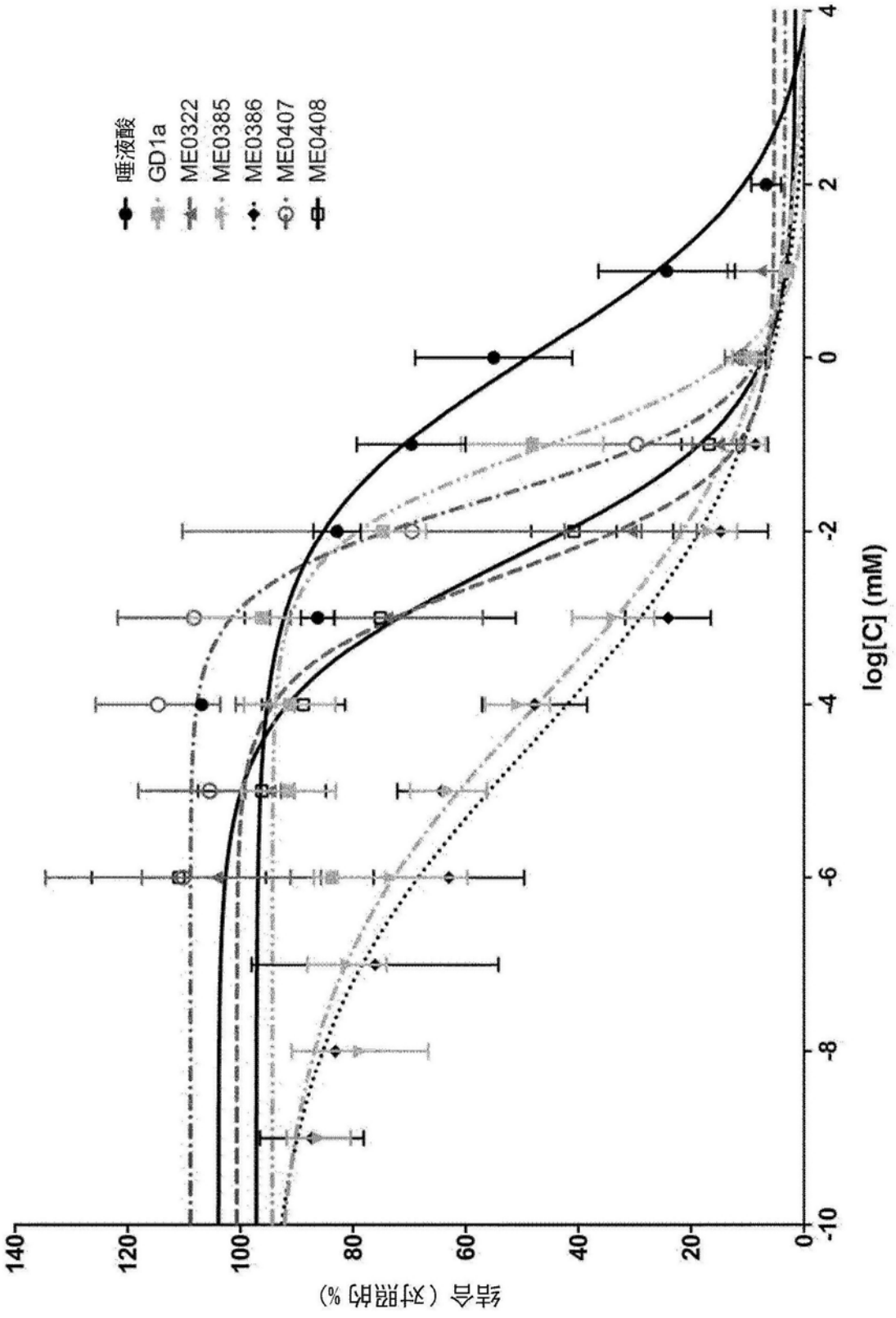

唾液酸
GD1a
ME0322
ME0385
ME0386
ME0407
ME0408
结合（对照的%）
log[C] (mM)
140
120
100
80
60
40
20
0
-10
-8
-6
-4
-2
0
2
4

图1a

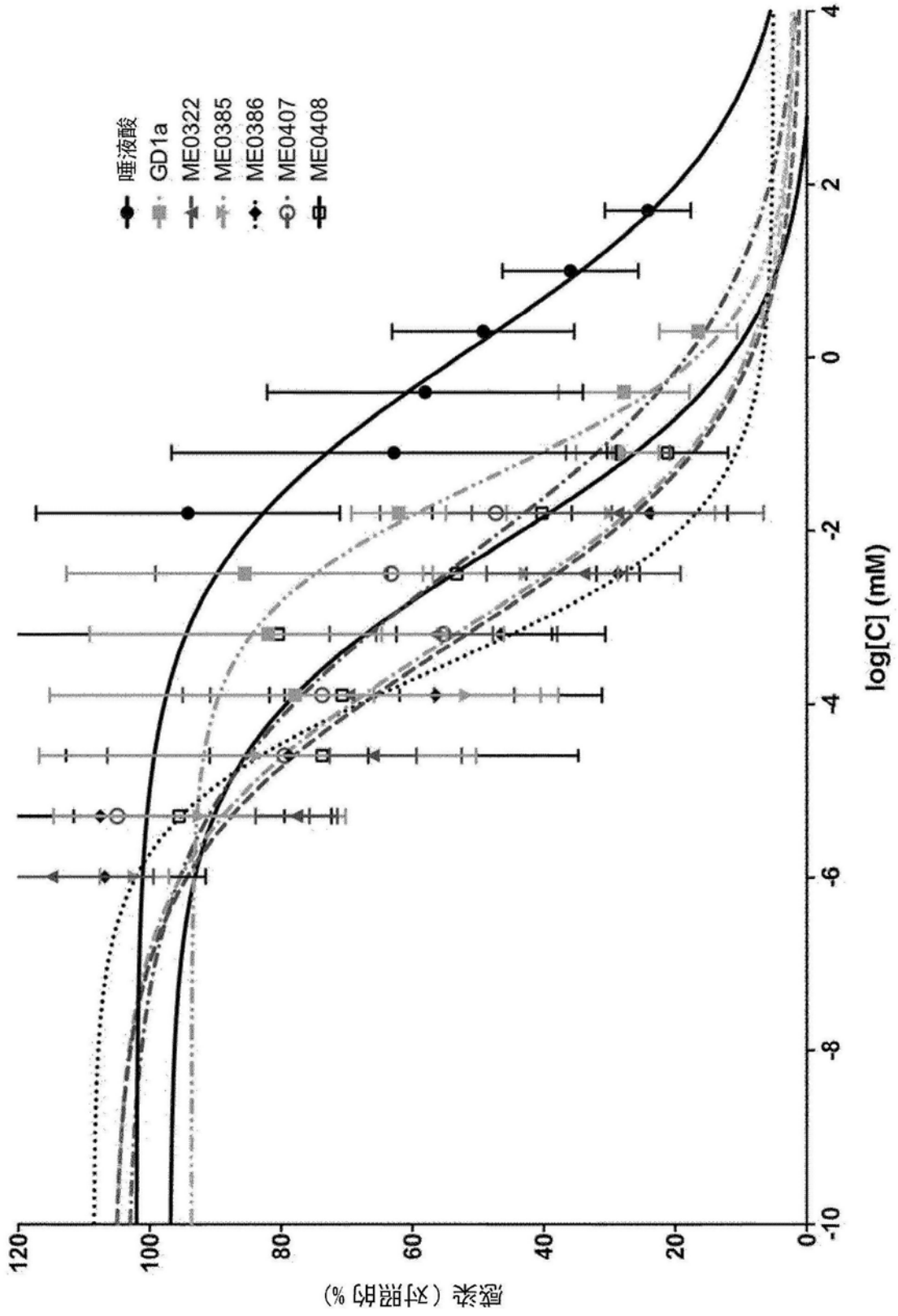

唾液酸
GD1a
ME0322
ME0385
ME0386
ME0407
ME0408
感染（对照的%）
120
100
80
60
40
20
0
-10
-8
-6
-4
-2
0
2
4
log[C] (mM)

图1b

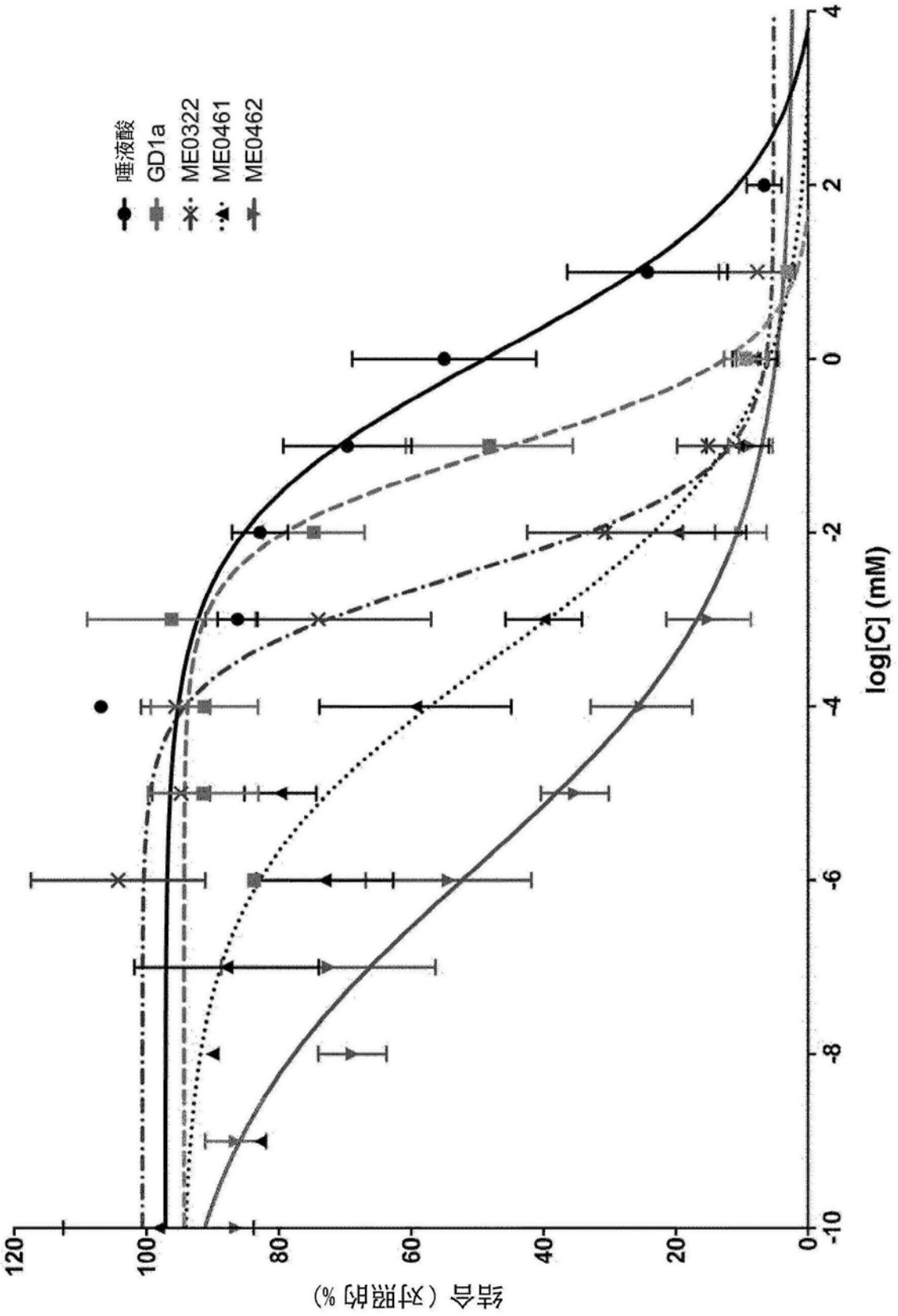

唾液酸
GD1a
ME0322
ME0461
ME0462
结合（对照的%）
120
100
80
60
40
20
0
4
2
0
-2
-4
-6
-8
-10
log[C] (mM)

图2a

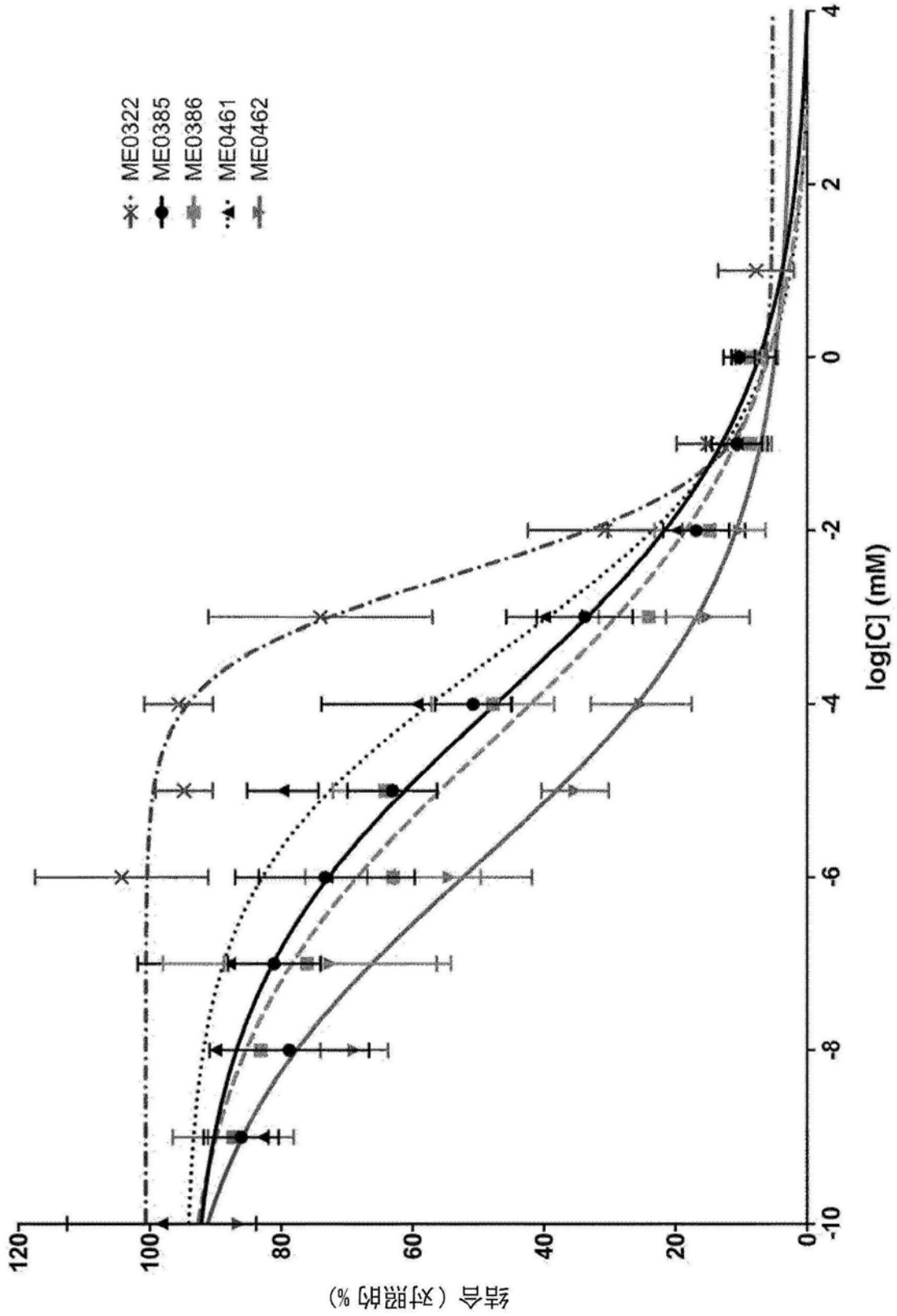

ME0322
ME0385
ME0386
ME0461
ME0462
结合（对照的%）
120
100
80
60
40
20
0
-10
-8
-6
-4
-2
0
2
4
log[C] (mM)

图2b

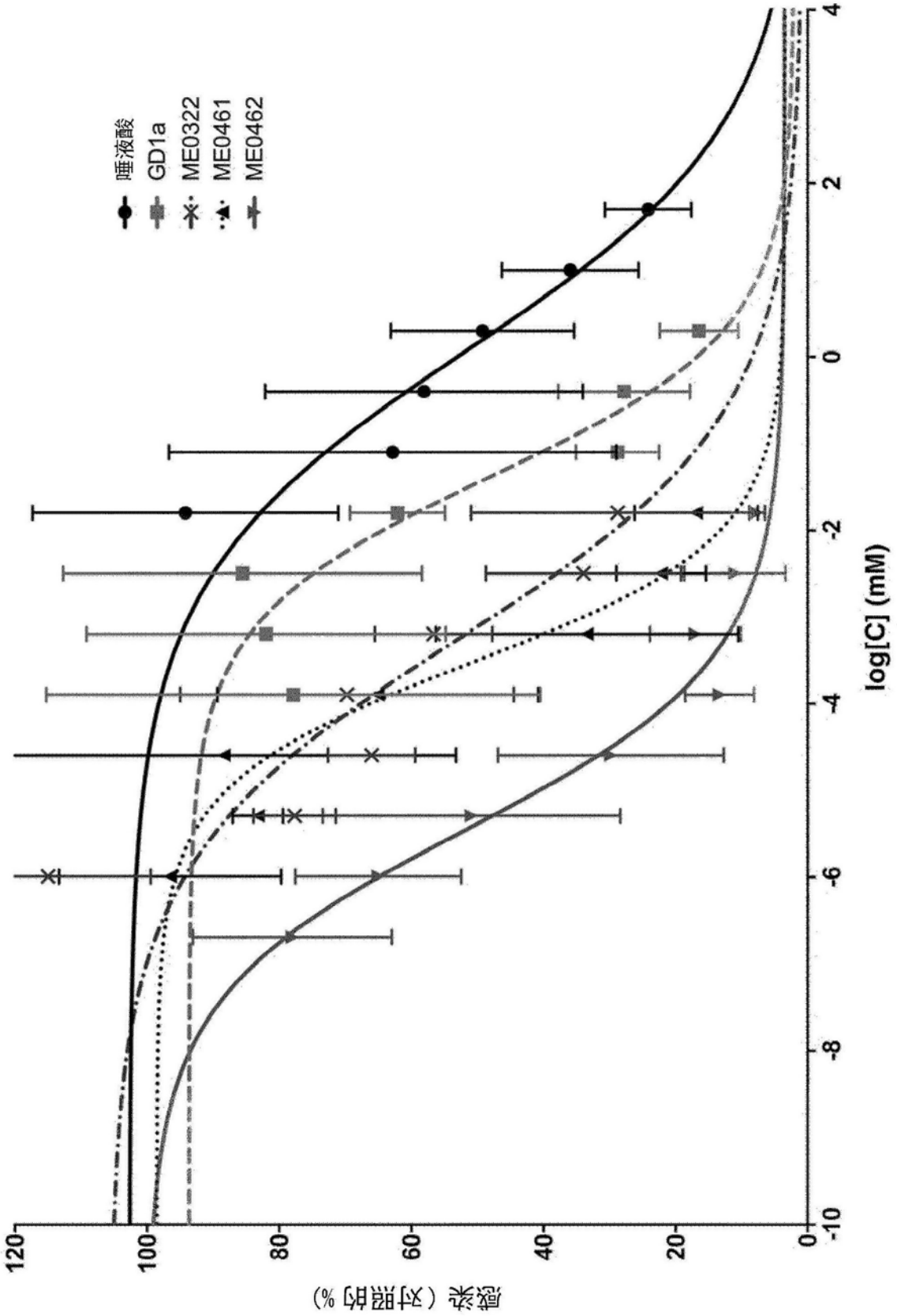

唾液酸
GD1a
ME0322
ME0461
ME0462
感染（对照的%）
120
100
80
60
40
20
0
-10
-8
-6
-4
-2
0
2
4
log[C] (mM)

图3a

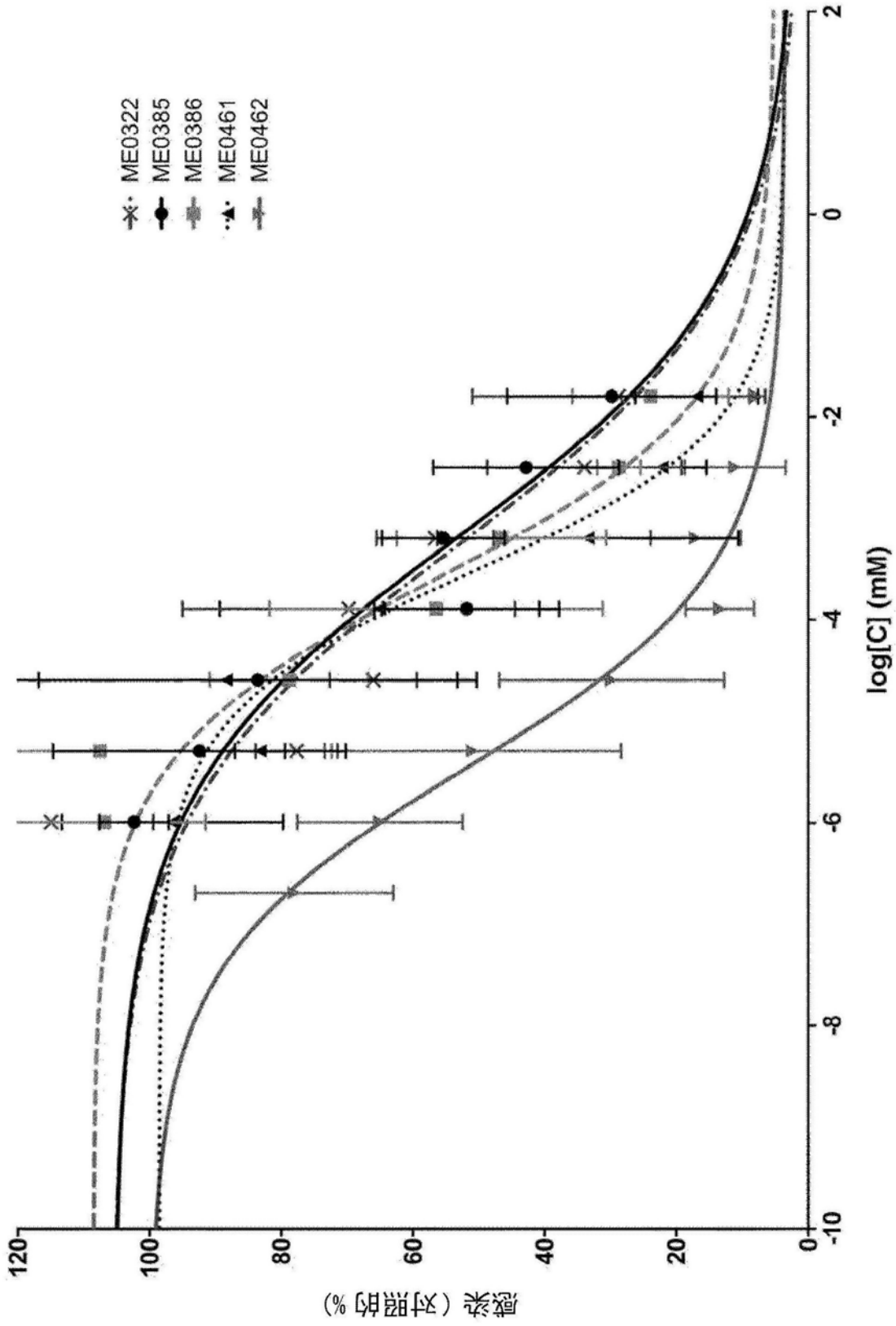

ME0322
ME0385
ME0386
ME0461
ME0462
感染（对照的%）
120
100
80
60
40
20
0
-10
-8
-6
-4
-2
0
2
log[C] (mM)

图3b