

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200780014290.3

[51] Int. Cl.

C07D 403/08 (2006.01)

C07D 473/00 (2006.01)

A61K 31/52 (2006.01)

[43] 公开日 2009 年 5 月 6 日

[11] 公开号 CN 101426785A

[22] 申请日 2007.4.19

[21] 申请号 200780014290.3

[30] 优先权

[32] 2006.4.21 [33] GB [31] 0607944.6

[86] 国际申请 PCT/EP2007/053847 2007.4.19

[87] 国际公布 WO2007/147659 英 2007.12.27

[85] 进入国家阶段日期 2008.10.21

[71] 申请人 诺瓦提斯公司

地址 瑞士巴塞尔

[72] 发明人 R·A·费尔赫斯特 R·J·泰勒

[74] 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

代理人 黄革生 林柏楠

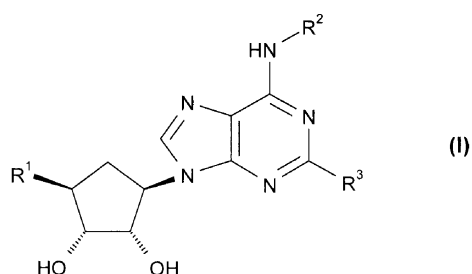
权利要求书 7 页 说明书 31 页

[54] 发明名称

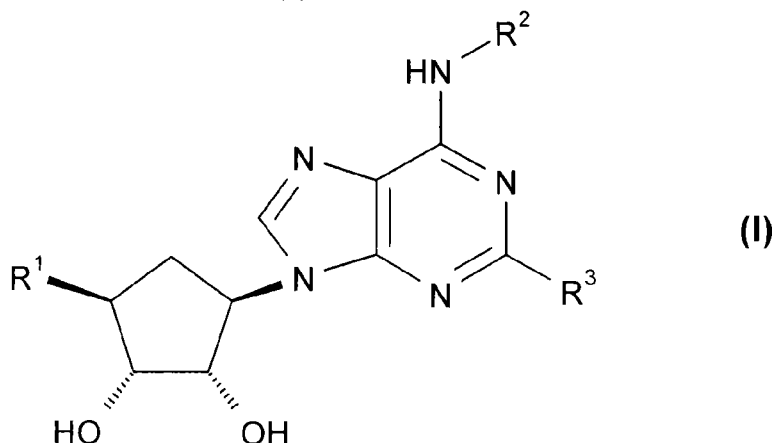
腺苷 A3 受体激动剂

[57] 摘要

式(I)的化合物及其制备以及它们作为药物的用途,其中 R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>和 R<sup>3</sup>如本文所定义。



## 1. 游离形式或盐形式的式(I)化合物

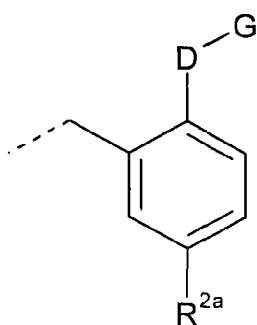


其中

$R^1$  表示含有 1-4 个环氮原子并任选地含有 1-4 个选自氧和硫的其它杂原子的 N-连接的 3-至 12-元杂环基团, 该基团任选地被下述取代基所取代: 氧代、 $C_1$ - $C_8$ -烷氧基、 $C_6$ - $C_{10}$ -芳基、 $R^{1a}$  或任选地被羟基取代的  $C_1$ - $C_8$ -烷基; 或者

$R^1$  是 -NH- $C_1$ - $C_8$ -烷基羰基、-NH- $C_3$ - $C_8$ -环烷基羰基、-NH-SO<sub>2</sub>- $C_1$ - $C_8$ -烷基、-NH- $C_7$ - $C_{14}$ -芳烷基羰基、-NH-C(=O)-3 到 12 元杂环基团、-NH-C(=O)- $C_6$ - $C_{10}$ -芳基或任选地被  $R^{1a}$  取代的 -NH-C(=O)-C(=O)-NH- $C_1$ - $C_8$ -烷基, 其中  $R^{1a}$  是包含至少一个选自氮、氧和硫的环杂原子的 3 到 12 元杂环基团, 所述 3 到 12 元杂环任选地被下述取代基所取代: 卤素、氰基、氧代、OH、羧基、氨基、硝基、 $C_1$ - $C_8$ -烷基、 $C_1$ - $C_8$ -烷基磺酰基、氨基羰基、 $C_1$ - $C_8$ -烷基羰基或任选地被氨基羰基取代的  $C_1$ - $C_8$ -烷氧基;

$R^2$  选自  $C_1$ - $C_8$ -烷基、*R*-和 *S*-1-苯基乙基、未取代的苄基基团和在一个或多个位置上被选自下述的基团所取代的苄基或苄基基团:  $C_1$ - $C_8$ -烷基、氨基、卤素、 $C_1$ - $C_8$ -卤代烷基、硝基、OH、乙酰氨基、 $C_1$ - $C_8$ -烷氧基和磺基, 或



$R^2$  是

其中

$R^{2a}$  是卤素、三氟甲基、氰基、 $C_1$ - $C_8$ -烷基、 $C_1$ - $C_8$ -烷氧基、乙烯基或乙炔基；

D 是氧、硫、NH、 $C_1$ - $C_8$ -烷氧基、 $C_1$ - $C_8$ -烷硫基或-CO-烷基氨基；且

G 是部分饱和、全饱和或全不饱和的 5-8 元环，其任选地具有 1-3 个独立地选自氧、硫和氮的杂原子，或者是由两个稠合的部分饱和、全饱和或全不饱和的 3-6 元环组成的二环，其独立地任选地具有 1-4 个独立地选自氮、硫和氧的杂原子；其中所述的 G 任选地被卤素、 $C_1$ - $C_8$ -烷基、三氟甲基、三氟甲氧基、硝基、氰基、 $C_3$ - $C_{10}$ -环烷基、羟基或  $C_1$ - $C_8$ -烷氧基独立地单-、二-或三-取代，或者

G 是氰基、 $C_1$ - $C_8$ -烷氧基羰基、 $C_3$ - $C_{10}$ -环烷氧基羰基、 $C(O)NR^4R^5$ 、 $C(S)NR^4R^5$ 、 $C(NH)NR^4NR^5$ 、 $C(N(C_1-C_3)烷基)NR^4R^5$  或  $C(N(C_3-C_{10})环烷基)NR^4R^5$ ；

$R^3$  选自 H、卤素、任选地被卤素或 OH 取代的  $C_1$ - $C_8$ -烷基、 $C_1$ - $C_8$ -烷氧基、氨基、 $C_1$ - $C_8$ -烷基氨基、 $C_2$ - $C_{10}$ -链烯类、任选地被  $C_1$ - $C_8$ -烷基取代的  $C_2$ - $C_{10}$ -炔类、任选地被  $C_1$ - $C_8$ -烷基或 OH 取代的芳基、巯基和  $C_1$ - $C_8$ -烷硫基；

$R^4$  是键、H、 $C_1$ - $C_{10}$ -烷基、羟基、 $C_1$ - $C_{10}$ -烷氧基、 $C_3$ - $C_{10}$ -环烷氧基，或任选地通过  $C_1$ - $C_8$ -烷基连接的部分饱和、全饱和或全不饱和的 5-8 元环，其任选地具有 1-3 个独立地选自氧、硫和氮的杂原子，或者是任选地通过  $C_1$ - $C_8$ -烷基连接的二环或具有任选地  $C_1$ - $C_8$ -桥的二环，所述二环或桥连的二环任选地具有 1-4 个独立地选自氮、硫和氧的杂原子，其中所述的  $C_1$ - $C_{10}$ -

烷基、C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-烷氧基、C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub>-环烷氧基或 R<sup>4</sup> 环任选地独立地被下述基团单-、二-或三-取代：卤素、C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-烷基、三氟甲基、硝基、氰基、C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub>-环烷基、OH 或 C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-烷氧基；

R<sup>5</sup> 是键、H、C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-烷基或 C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-环烷基，或

R<sup>4</sup> 和 R<sup>5</sup> 与它们所连接的氮一起形成全饱和或部分不饱和的 4-9 元环，所述的环任选地桥连，任选地具有 1-3 个独立地选自氧、硫和氮的杂原子，所述的环任选地独立地被下述基团单-或二-取代：氧代、羟基、C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-烷氧基、C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-烷基、氨基、单-N-或二-N,N-C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-烷基氨基羰基、单-N-或二-N,N-C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub>-环烷基氨基羰基、N-C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-烷基-N-C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub>-环烷基氨基羰基、单-N-或二-N,N-C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-烷基氨基、单-N-或二-N,N-C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub>-环烷基氨基、N-C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-烷基-N-C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub>-环烷基氨基、甲酰氨基、C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-烷基羰基氨基、C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub>-环烷基羰基氨基、C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-烷氧基羰基氨基、N-C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-烷氧基羰基-N-C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-烷基氨基、C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-氮磺酰基、C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-烷基磺酰基氨基、C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub>-环烷基磺酰基氨基，或部分饱和、全饱和或全不饱和的 5-8 元环，其任选地通过 C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-烷基连接，任选地具有 1-3 个独立地选自氧、硫和氮的杂原子，或者是由两个稠合的部分饱和、全饱和或全不饱和的 3-6 元环组成的二环，其独立地任选地通过 C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-烷基连接，任选地具有 1-4 个独立地选自氮、硫和氧的杂原子，并且任选地被下述基团单-或二-取代：卤素、三氟甲基、三氟甲氧基、C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-烷基或 C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-烷氧基。

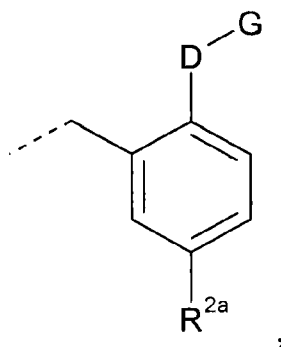
2. 如权利要求 1 所述的化合物，

其中

R<sup>1</sup> 表示 N-连接的 3 到 12 元杂环基团，其包含 1-4 个环氮原子并且任选地包含 1-4 个选自氧和硫的其它杂原子，或者

R<sup>1</sup> 是 -NH-C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-烷基羰基；

R<sup>2</sup> 是 C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-烷基或任选地被卤素取代的苄基，或者



$R^2$  是

其中

$R^{2a}$  是卤素、三氟甲基、氰基、 $C_1$ - $C_8$ -烷基、 $C_1$ - $C_8$ -烷氧基、乙烯基或乙炔基；

D 是氧、硫、NH、 $C_1$ - $C_8$ -烷氧基、 $C_1$ - $C_8$ -烷硫基或-CO-烷基氨基；且

G 是部分饱和的、全饱和的或全不饱和的 5 至 8 元环，其任选地具有 1-3 个独立地选自氧、硫和氮的杂原子，或者是由两个稠合的部分饱和、全饱和或全不饱和的 3-6 元环组成的二环，其任选地具有 1-4 个独立地选自氮、硫和氧的杂原子；其中所述的 G 任选地被卤素、 $C_1$ - $C_8$ -烷基独立地单-、二-或三-取代；且

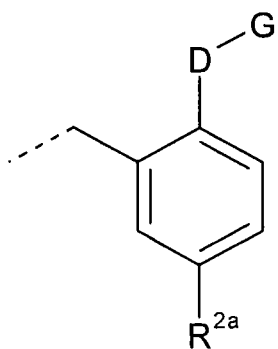
$R^3$  选自 H、卤素、任选地被卤素或 OH 取代的  $C_1$ - $C_8$ -烷基、 $C_1$ - $C_8$ -烷氧基、氨基、 $C_1$ - $C_8$ -烷基氨基、 $C_2$ - $C_{10}$ -链烯类、任选地被  $C_1$ - $C_8$ -烷基取代的  $C_2$ - $C_{10}$ -炔类、任选地被  $C_1$ - $C_8$ -烷基或 OH 取代的  $C_6$ - $C_{10}$ -芳基、巯基和  $C_1$ - $C_8$ -烷硫基。

3. 如权利要求 1 所述的化合物，

其中

$R^1$  为包含至少一个选自氮、氧和硫的环杂原子的 5-12 元杂环基团，或者

$R^1$  为-NH- $C_1$ - $C_8$ -烷基羰基；



$R^2$  为

其中

$R^{2a}$  是卤素;

D 是  $C_1$ - $C_8$ -烷氧基; 且

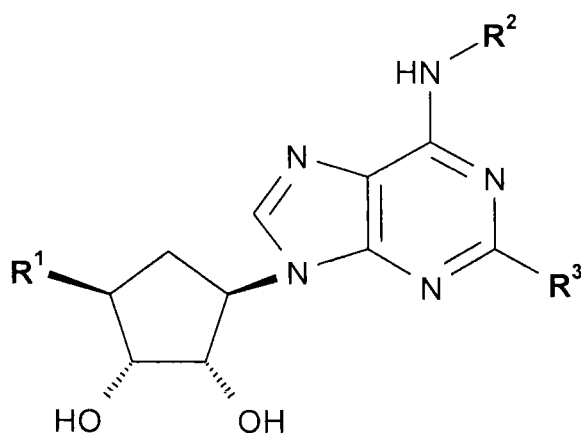
G 是被甲基取代的五元杂环基团, 或者

$R^2$  为被卤素取代的苄基, 或者

$R^2$  为  $C_1$ - $C_8$ -烷基; 且

$R^3$  为 H、卤素或任选地被  $C_1$ - $C_8$ -烷基取代的  $C_2$ - $C_{10}$ -炔类。

4. 如权利要求 1 所述的式 I 化合物,



I

其中  $R^1$ 、 $R^2$  和  $R^3$  为

| $R^1$ | $R^2$ | $R^3$ |
|-------|-------|-------|
|       |       | Cl    |
|       |       | Cl    |

|  |                       |          |
|--|-----------------------|----------|
|  | <b>CH<sub>3</sub></b> |          |
|  |                       | <b>H</b> |
|  |                       | <b>H</b> |

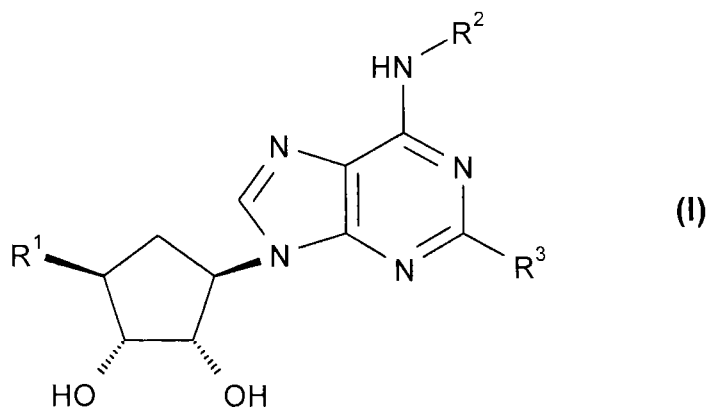
5. 用作药物的如权利要求 1-4 中任意一项所述的化合物。

6. 包含如权利要求 1-4 中任意一项所述的化合物的药物组合物。

7. 如权利要求 1-4 中任意一项所述的化合物在制备治疗由腺苷 A<sub>3</sub> 受体激活所介导的病症的药物中的用途。

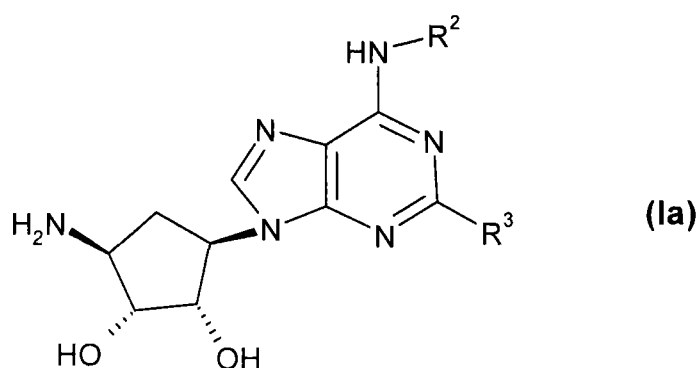
8. 如权利要求 7 所述的化合物的用途，其中所述的由腺苷 A<sub>3</sub> 受体激活所介导的病症是风湿性关节炎。

9. 制备式(I)化合物的方法



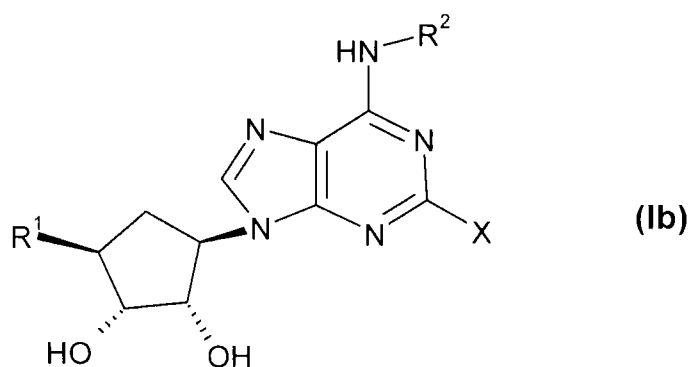
其中 R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup> 和 R<sup>3</sup> 如上文所定义，该方法包括下述步骤：

(i) (A) 为了制备式(I)的化合物，将式(Ia)的化合物



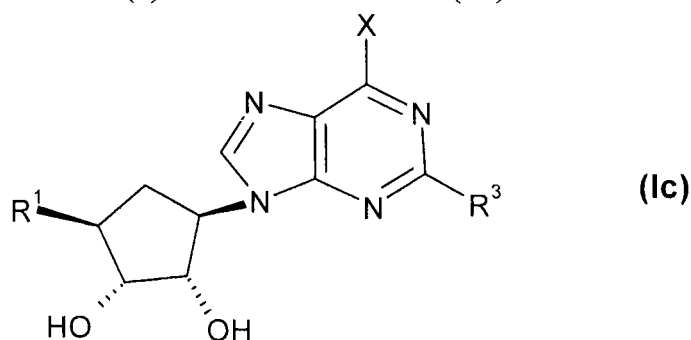
其中  $R^2$  和  $R^3$  如上文所定义，与乙酰氯在碱存在下进行反应；

(B) 为了制备其中  $R^3$  是  $C_2$ - $C_8$ -炔基的式(I)化合物，将式(Ib)的化合物



其中 X 是离去基团，与式  $H-C\equiv C-R$  的化合物进行反应，其中 R 可以是  $C_1$ - $C_6$ -烷基；

(C) 为了制备式(I)的化合物，将式(Ic)的化合物



其中  $R^1$  和  $R^3$  如上文所定义；且 X 是离去基团，

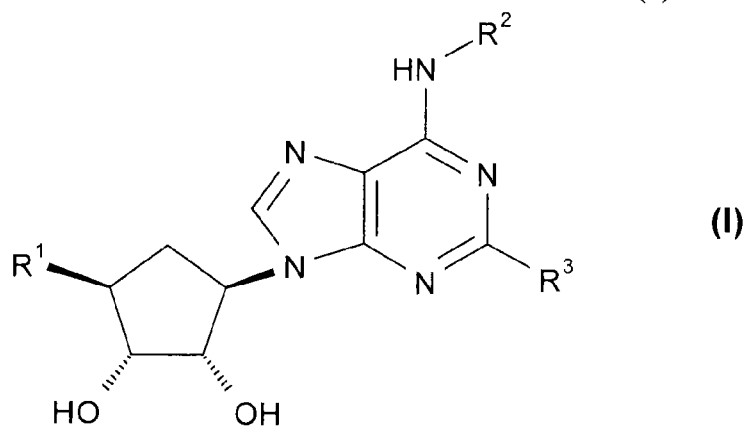
与其中  $R^2$  如上文所定义的式  $H_2N-R^2$  的化合物在碱存在下反应；和

(ii) 将所得的游离形式或可药用盐形式的式(I)化合物回收。

## 腺苷 A3 受体激动剂

本发明涉及有机化合物、其制备方法和其作为药物的用途。

一方面，本发明提供了游离形式或盐形式的式(I)化合物

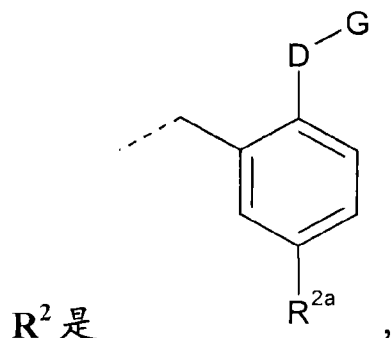


其中

$R^1$  表示含有 1-4 个环氮原子并任选地含有 1-4 个选自氧和硫的其它杂原子的 N-连接的 3-至 12-元杂环基团，该基团任选地被下述取代基所取代：氧代、 $C_1$ - $C_8$ -烷氧基、 $C_6$ - $C_{10}$ -芳基、 $R^{1a}$  或任选地被羟基取代的  $C_1$ - $C_8$ -烷基；或者

$R^1$  是任选地被 OH 取代的 -NH- $C_1$ - $C_8$ -烷基羰基、-NH- $C_3$ - $C_8$ -环烷基羰基、-NH-SO<sub>2</sub>- $C_1$ - $C_8$ -烷基、-NH- $C_7$ - $C_{14}$ -芳烷基羰基、-NH-C(=O)-3 到 12 元杂环基团、-NH-C(=O)- $C_6$ - $C_{10}$ -芳基，或任选地被  $R^{1a}$  取代的 -NH-C(=O)-C(=O)-NH- $C_1$ - $C_8$ -烷基，其中  $R^{1a}$  是包含至少一个选自氮、氧和硫的环杂原子的 3 到 12 元杂环基团，所述 3 到 12 元杂环任选地被下述取代基所取代：卤素、氰基、氧代、OH、羧基、氨基、硝基、 $C_1$ - $C_8$ -烷基、 $C_1$ - $C_8$ -烷基磺酰基、氨基羰基、 $C_1$ - $C_8$ -烷基羰基或任选地被氨基羰基取代的  $C_1$ - $C_8$ -烷氧基；

$R^2$  选自  $C_1$ - $C_8$ -烷基、 $R$ -和  $S$ -1-苯基乙基、未取代的苄基基团，和在一个或多个位置上被选自下述的基团所取代的苯乙基或苄基基团： $C_1$ - $C_8$ -烷基、氨基、卤素、 $C_1$ - $C_8$ -卤代烷基、硝基、OH、乙酰氨基、 $C_1$ - $C_8$ -烷氧基和磺基，或



$R^{2a}$  是卤素、三氟甲基、氰基、 $C_1$ - $C_8$ -烷基、 $C_1$ - $C_8$ -烷氧基、乙烯基或乙炔基；

D 是氧、硫、NH、 $C_1$ - $C_8$ -烷氧基、 $C_1$ - $C_8$ -烷硫基或-CO-烷基氨基；且

G 是部分饱和、全饱和或全不饱和的 5-8 元环，其任选地具有 1-3 个独立地选自氧、硫和氮的杂原子，或者是由两个稠合的部分饱和、全饱和或全不饱和的 3-6 元环组成的二环，其独立地任选地具有 1-4 个独立地选自氮、硫和氧的杂原子；其中所述的 G 任选地被卤素、 $C_1$ - $C_8$ -烷基、三氟甲基、三氟甲氧基、硝基、氰基、 $C_3$ - $C_{10}$ -环烷基、羟基或  $C_1$ - $C_8$ -烷氧基独立地单-、二-或三-取代，或者

G 是氰基、 $C_1$ - $C_8$ -烷氧基羰基、 $C_3$ - $C_{10}$ -环烷氧基羰基、 $C(O)NR^4R^5$ 、 $C(S)NR^4R^5$ 、 $C(NH)NR^4NR^5$ 、 $C(N(C_1-C_3)烷基)NR^4R^5$  或  $C(N(C_3-C_{10})环烷基)NR^4R^5$ ；

$R^3$  选自 H、卤素、任选地被卤素或 OH 取代的  $C_1$ - $C_8$ -烷基、 $C_1$ - $C_8$ -烷氧基、氨基、 $C_1$ - $C_8$ -烷基氨基、 $C_2$ - $C_{10}$ -链烯类、任选地被  $C_1$ - $C_8$ -烷基取代的  $C_2$ - $C_{10}$ -炔类、任选地被  $C_1$ - $C_8$ -烷基或 OH 取代的芳基、硫基和  $C_1$ - $C_8$ -烷硫基；

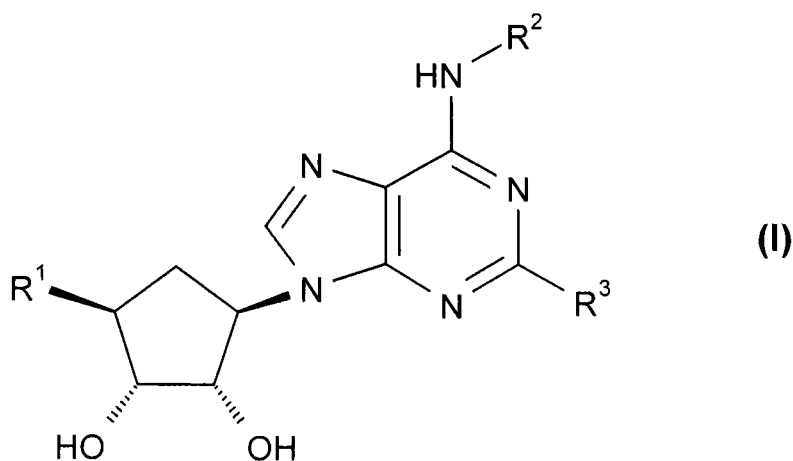
$R^4$  是键、H、 $C_1$ - $C_{10}$ -烷基、羟基、 $C_1$ - $C_{10}$ -烷氧基、 $C_3$ - $C_{10}$ -环烷氧基，

或任选地通过 C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-烷基连接的部分饱和、全饱和或全不饱和的 5-8 元环，其任选地具有 1-3 个独立地选自氧、硫和氮的杂原子，或者是任选地通过 C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-烷基连接的二环或具有任选的 C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-桥的二环，所述二环或桥连的二环任选地具有 1-4 个独立地选自氮、硫和氧的杂原子，其中所述 C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-烷基、C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-烷氧基、C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub>-环烷氧基或 R<sup>4</sup> 环任选地独立地被下述基团单-、二-或三-取代：卤素、C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-烷基、三氟甲基、硝基、氰基、C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub>-环烷基、OH 或 C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-烷氧基；

R<sup>5</sup> 是键、H、C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-烷基或 C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-环烷基，或

R<sup>4</sup> 和 R<sup>5</sup> 与它们所连接的氮一起形成全饱和或部分不饱和的 4-9 元环，所述的环任选地桥连，任选地具有 1-3 个独立地选自氧、硫和氮的杂原子，所述的环任选地独立地被下述基团单-或二-取代：氧代、羟基、C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-烷氧基、C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-烷基、氨基、单-N-或二-N,N-C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-烷基氨基羰基、单-N-或二-N,N-C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub>-环烷基氨基羰基、N-C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-烷基-N-C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub>-环烷基氨基羰基、单-N-或二-N,N-C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-烷基氨基、单-N-或二-N,N-C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub>-环烷基氨基、N-C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-烷基-N-C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub>-环烷基氨基、甲酰氨基、C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-烷基羰基氨基、C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub>-环烷基羰基氨基、C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-烷氧基羰基氨基、N-C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-烷氧基羰基-N-C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-烷基氨基、C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-氨磺酰基、C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-烷基磺酰基氨基、C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub>-环烷基磺酰基氨基，或部分饱和、全饱和或全不饱和的 5-8 元环，其任选地通过 C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-烷基连接，任选地具有 1-3 个独立地选自氧、硫和氮的杂原子，或者是由两个稠合的部分饱和、全饱和或全不饱和的 3-6 元环组成的二环，其独立地任选地通过 C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-烷基连接，任选地具有 1-4 个独立地选自氮、硫和氧的杂原子，并且任选地被下述基团单-或二-取代：卤素、三氟甲基、三氟甲氧基、C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-烷基或 C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-烷氧基。

在另一方面，本发明提供了游离形式或盐形式的式(I)化合物

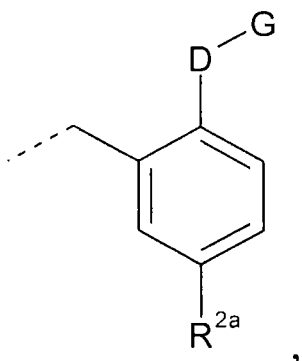


其中

$R^1$  表示 N-连接的 3 到 12 元杂环基团, 其包含 1-4 个环氮原子并且任选地包含 1-4 个选自氧和硫的其它杂原子, 或者

$R^1$  是 -NH-C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-烷基羰基;

$R^2$  是 C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-烷基或任选地被卤素取代的苄基, 或者



其中

$R^{2a}$  是卤素、三氟甲基、氰基、C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-烷基、C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-烷氧基、乙烯基或乙炔基;

D 是氧、硫、NH、C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-烷氧基、C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-烷硫基或 -CO-烷基氨基; 且

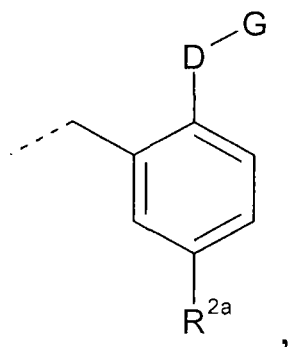
G 是部分饱和的、全饱和的或全不饱和的 5 至 8 元环, 其任选地具有 1-3 个独立地选自氧、硫和氮的杂原子, 或者是由两个稠合的部分饱和、全饱和或全不饱和的 3-6 元环组成的二环, 其任选地具有 1-4 个独立地选自氮、硫和氧的杂原子; 其中所述的 G 任选地被卤素、C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-烷基独立地单-、二-或三-取代; 且

$R^3$  选自 H、卤素、任选地被卤素或 OH 取代的 C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-烷基、C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-烷

氧基、氨基、 $C_1$ - $C_8$ -烷基氨基、 $C_2$ - $C_{10}$ -链烯类、任选地被  $C_1$ - $C_8$ -烷基取代的  $C_2$ - $C_{10}$ -炔类、任选地被  $C_1$ - $C_8$ -烷基或 OH 取代的  $C_6$ - $C_{10}$ -芳基、巯基和  $C_1$ - $C_8$ -烷硫基。

根据式(I),  $R^1$  合适的为包含至少一个选自氮、氧和硫的环杂原子的 5-12 元杂环基团。优选的  $R^1$  是 5-6 元杂环基团, 例如三唑。

根据式(I),  $R^1$  也合适的为  $-NH-C_1-C_8$ -烷基羰基。所述的  $-NH-C_1-C_8$ -烷基羰基优选  $-NHC(O)CH_3$ 。



根据式(I),  $R^2$  合适的为

其中

$R^{2a}$  合适的是卤素, 例如氯;

D 合适的是  $C_1$ - $C_8$ -烷氧基; 且

G 合适的是五元杂环基团, 例如被甲基单取代的异噁唑。

根据式(I),  $R^2$  也合适的为被卤素单取代的苄基基团。优选的卤素是碘。

根据式(I),  $R^2$  也合适的为  $C_1$ - $C_8$ -烷基。优选甲基。

根据式(I),  $R^3$  合适的为 H、卤素或任选地被  $C_1$ - $C_8$ -烷基取代的  $C_2$ - $C_{10}$ -炔类。

### 定义

用在说明书中的术语具有下列含义:

“任选地被取代的”是指所涉及的基团可以在一个或多个位置被任意一个或任意组合的下文所列的基团所取代。

本文所用的“卤代”或“卤素”可以是氟、氯、溴或碘。

本文所用的“羟基”是 OH。

本文所用的“ $C_1$ - $C_8$ -烷基”表示具有 1-8 个碳原子的直链或支链烷基。

优选的  $C_1$ - $C_8$ -烷基为  $C_1$ - $C_4$ -烷基。

本文中所用“ $C_1$ - $C_8$ -烷氧基”表示具有 1-8 个碳原子的直链或支链的烷氧基，例如  $O$ - $C_1$ - $C_8$ -烷基。优选的  $C_1$ - $C_8$ -烷氧基为  $C_1$ - $C_4$ -烷氧基。

本文所用的“ $C_1$ - $C_8$ -烷基氨基”和“二- $C_1$ - $C_8$ -烷基氨基”表示分别被一个或两个如上所定义的  $C_1$ - $C_8$ -烷基取代的氨基，所述烷基可以相同或不同。

本文所用的“ $C_1$ - $C_8$ -烷基羰基”和“ $C_1$ - $C_8$ -烷氧基羰基”表示通过碳原子与羰基连接的分别如上所定义的  $C_1$ - $C_8$ -烷基或  $C_1$ - $C_8$ -烷氧基。

本文所用的“ $C_6$ - $C_{10}$ -芳基”表示含有 6 至 10 个碳原子的一价碳环芳族基团，其可以是例如单环基团，例如苯基；或者二环基团，例如萘基。

本文所用的“ $C_7$ - $C_{14}$ -芳烷基”表示被如上所定义的  $C_6$ - $C_{10}$ -芳基取代的如上所定义的烷基，例如  $C_1$ - $C_4$ -烷基。优选的  $C_7$ - $C_{14}$ -芳烷基是  $C_7$ - $C_{10}$ -芳烷基，例如苯基- $C_1$ - $C_4$ -烷基。

本文所用的“ $C_1$ - $C_8$ -烷基氨基羰基”和“ $C_3$ - $C_8$ -环烷基氨基羰基”表示通过碳原子与羰基连接的分别如上所定义的  $C_1$ - $C_8$ -烷基氨基和  $C_3$ - $C_8$ -环烷基氨基。优选的  $C_1$ - $C_8$ -烷基氨基羰基和  $C_3$ - $C_8$ -环烷基氨基羰基分别是  $C_1$ - $C_4$ -烷基氨基羰基和  $C_3$ - $C_8$ -环烷基氨基羰基。

本文所用“ $C_3$ - $C_{15}$ -碳环基团”表示具有 3-15 个环碳原子的碳环基团，例如单环基团，其为芳族的或非芳族的，例如环丙基、环戊基、环己基、环庚基、环辛基或苯基；或二环基团，例如二环辛基、二环壬基、二环癸基、茚满基或茚基，它们都可以被一个或多个、通常为 1 个或 2 个  $C_1$ - $C_4$ -烷基再次取代。

本文所用的“包含至少一个选自氮、氧和硫的环杂原子的 3-12 元杂环”可以是例如呋喃、吡咯、吡咯烷、吡唑、咪唑、三唑、异三唑、四唑、噁二唑、异噁二唑、吡啶、哌啶、吡嗪、噁唑、异噁唑、吡嗪、哒嗪、嘧啶、哌嗪、吡咯烷、吗啉代、三嗪、噁嗪或噻唑。优选的杂环包括哌嗪、吡咯烷、吗啉代、咪唑、异三唑、吡唑、四唑、噻唑、三唑、噁二唑、吡啶、哌啶、吡嗪、呋喃、噁唑、异噁唑、噁二唑和氮杂环丁烷。所述 3-12 元杂环可以是未取代的或取代的。

在本说明书和所附的权利要求书中，除非需要另外说明，术语“含有”或其变化形式如“包含”或“包括”可理解为包括所述的整体或步骤或者所述整体或步骤的组，但不排除任何其它整体或步骤或者任何其它整体或步骤的组。正如本领域技术人员所理解的那样，只有在化学上可能的取代基的组合是本发明的实施方案。

特别优选的具体式(I)化合物是在下文实施例中描述的化合物。

立体异构体是那些有不对称碳原子的化合物。这些化合物以单一的光学活性异构体形式或其混合物的形式存在，例如以非对映异构体混合物的形式存在。本发明包括单一光学活性的 *R* 和 *S* 异构体以及其混合物。单一异构体可以通过本领域技术人员公知的方法，例如手性高效液相色谱(HPLC)进行分离。

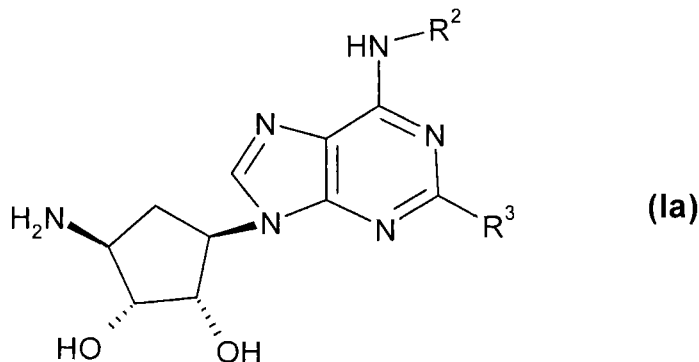
互变异构体是以平衡状态存在的两种或多种结构异构体的其中之一，其容易从一种异构体形式转化为另一种异构体形式。

本发明的化合物可以以非溶剂化的和溶剂化的形式存在。本文所用的术语“溶剂化物”是描述一种分子复合物，其包含本发明的化合物和一种或多种可药用的溶剂分子，例如乙醇。当所述溶剂为水时使用术语“水合物”。

## 合成

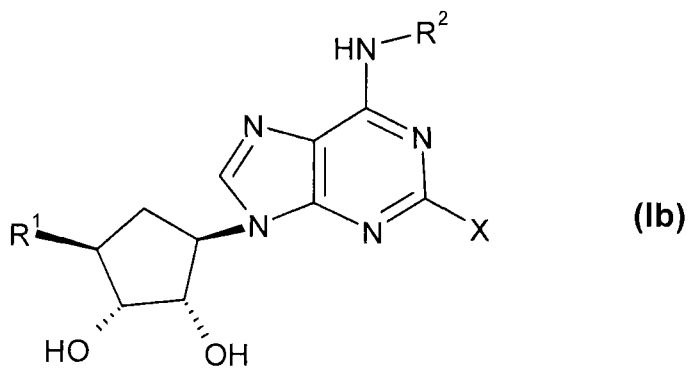
本发明另一方面还提供了制备游离形式或盐形式的式(I)化合物的方法，该方法包括以下步骤：

(i) (A) 为了制备式(I)的化合物，将式(Ia)的化合物



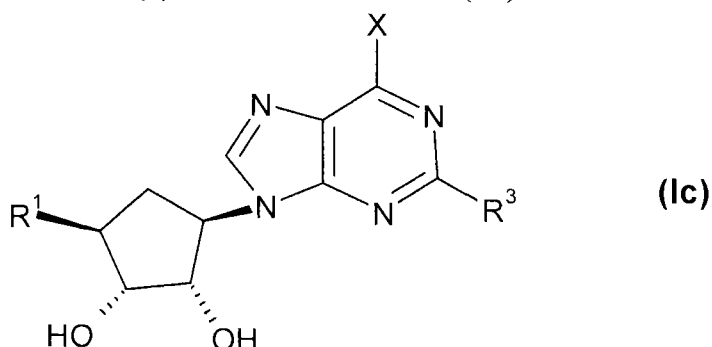
其中  $R^2$  和  $R^3$  如上文所定义, 与乙酰氯在碱存在下进行反应;

(B) 为了制备其中  $R^3$  是  $C_2$ - $C_8$ -炔基的式(I)化合物, 将式(Ib)的化合物



其中 X 是离去基团, 与式  $H-C\equiv C-R$  的化合物进行反应, 其中 R 可以是  $C_1$ - $C_6$ -烷基;

(C) 为了制备式(I)的化合物, 将式(Ic)的化合物



其中  $R^1$  和  $R^3$  如上文所定义; 且 X 是离去基团,

与式  $H_2N-R^2$  的化合物在碱存在下反应, 其中  $R^2$  如上文所定义; 和

(ii) 将所得的游离形式或可药用盐形式的式(I)化合物回收。

式(I)化合物可以例如采用下面所述以及实施例中所所述的反应和技术制备。反应可以在对于所应用的试剂和原料以及所进行的转化适宜的溶剂中进行。有机合成领域的技术人员应当理解, 在分子上存在的官能性应与待进行的转化一致。有时候需要对此加以判断, 调整合成步骤的顺序或选择某个特定的反应流程, 以获得所需要的本发明化合物。

在下述反应流程中所示的合成中间体和终产物上各种取代基可以以其具有合适保护基的完全修饰的形式存在(如果本领域技术人员认为需要的

话), 或者以其前体形式存在, 该前体稍后可以通过本领域技术人员熟知的方法将其处理成最终形式。这些取代基也可以在合成顺序的各种阶段添加或在合成顺序完成后添加。在许多情况下, 常规应用的官能团操作方法可以用于将一种中间体转化为另一种中间体, 或者将一种式(I)化合物转化为另一种式(I)化合物。此类操作方法的实例有: 酯或酮转化为醇; 酯转化为酮; 酯、酸和酰胺的相互转换; 醇和胺的烷基化、酰化和磺酰化; 以及其他多种方法。取代基也可以采用常规反应如烷基化、酰化、卤化或氧化来添加。此类操作方法在本领域中是众所周知的, 许多参考书总结了此类操作的流程和方法。某些参考书中给出了用于许多官能团操作的有机合成的主要文献的例子和参考以及在有机合成领域中常规使用的其它转化方法: *March's Organic Chemistry*, 第五版, Wiley 和 Chichester 编辑(2001); *Comprehensive Organic Transformations*, Larock 编辑, VCH(1989); *Comprehensive Organic Functional Group Transformations*, Katritzky 等人(系列编辑), Pergamon(1995); 和 *Comprehensive Organic Synthesis*, Trost 和 Fleming(系列编辑), Pergamon(1991)。还应该认识到: 在该领域任何合成途径的设计中, 另一个重要的考虑因素是明智地选择用于保护本发明所述化合物中存在的反应性官能团的保护基。在同一分子中可以选择多种保护基, 从而使得这些保护基团的每一种均可以被除去而不会除去同一分子中的其它保护基, 或者根据需要的结果, 可以使用相同的反应步骤除去多个保护基。向本领域技术人员描述了多种备选方案的权威参考书为: *Protective Groups In Organic Synthesis*, Greene 和 Wuts 编辑, Wiley and Sons(1999)。本领域技术人员应当理解, 只有在化学上可能的取代基的组合是本发明的实施方案。

### 药理学活性和用途

式(I)化合物及其可药用盐作为药物是有用的。具体而言, 它们激活腺苷 A3 受体, 即, 它们充当 A2A 受体激动剂。在 WO 05/063246、WO 02/055085、WO 95/02604 和 WO 06/011130 中描述了它们作为 A3 激

动剂的性质。

下文实施例的化合物在下面的试验中具有低于 5.0  $\mu\text{M}$  的  $K_i$  值和  $\text{EC}_{50}$  值。例如，实施例 1 的化合物在  $K_i$  结合试验中具有 0.91 nM 的  $K_i$  值，在  $\text{A}_3$  [ $^{35}\text{S}$ ]-GTP $\gamma$ S 功能试验中具有 11.0 nM 的  $\text{EC}_{50}$  值。

### A3 结合试验的方案

#### 缩写词列表

|                 |                                |
|-----------------|--------------------------------|
| A3              | 腺苷 A3 受体                       |
| BSA             | 牛血清白蛋白                         |
| CHO             | 中国仓鼠卵巢                         |
| DMSO            | 二甲亚砜                           |
| EDTA            | 乙二胺四乙酸                         |
| FCS             | 胎牛血清                           |
| HEPES           | 4-(2-羟基乙基)哌嗪-1-乙磺酸             |
| I-AB-MECA       | N6-(4-氨基-3-碘苄基)-5'-N-甲基氨甲酰基-腺苷 |
| $K_d$           | 解离常数                           |
| $\text{MgCl}_2$ | 氯化镁                            |
| NaCl            | 氯化钠                            |
| Tris-HCl        | 三(羟甲基)-氨基甲烷盐酸盐                 |

### 前言

腺苷是广泛的生物学功能的内源性调节物，其与至少四种细胞表面受体亚型相互作用，所述受体亚型分为  $\text{A}_1$ 、 $\text{A}_{2\text{A}}$ 、 $\text{A}_{2\text{B}}$  和  $\text{A}_3$ ，它们都与 G 蛋白偶联。参见 Linden, *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 卷 41, 775-787 页 (2001)。

直到最近，大多数腺苷的抗炎作用才被认为通过  $\text{A}_{2\text{A}}$  受体产生。但是， $\text{A}_3$  亚型可以在不同的病理学如炎症和神经变性[参见 Kohno 等人, *Biochem Biophys Res Commun*, 卷 219, 904-910 页 (1996)]和哮喘[参见 Jacobson 等

人, *Neuropharmacology*, 卷 36, 1157-1165 页(1997)]中起基础作用。

腺苷衍生物 4-氨基苄基-5'-N-甲基-甲酰氨基腺苷(AB-MECA)是有效的 A<sub>3</sub> 受体选择性激动剂, 其用作参照化合物。参见 Varani 等人, *Life Sci*, 卷 63, 第 5 期, 81-87 页(1998)。

本发明化合物在使用碘化配体 [<sup>125</sup>I]-AB-MECA 与从稳定表达人 A<sub>3</sub> 受体的 CHO 细胞中制备的膜的 A<sub>3</sub> 结合试验中进行测试。

## 方法

### 材料

- CHO 腺苷 A<sub>3</sub> 膜
- [<sup>125</sup>I]-AB-MECA: 安玛西亚-法玛西亚生物技术公司 (Amersham Pharmacia Biotech)(目录号 TRK)
- CGS21680: Tocris 公司(1063)
- Unifilter GF/B 96-孔板: 珀金埃尔默公司 (Perkin Elmer)(目录号 6005174)
- 96-孔 U 型底聚丙烯板: 格瑞纳公司 (Greiner)(目录号 650201)
- TopSeal: Canberra Packard 公司(目录号 6005185)
- BSA: 西格玛公司 (Sigma) 目录号 A-6003
- 腺苷脱氨酶 (1000 U/mL): 罗氏诊断试剂有限公司 (Roche Diagnostics Limited)(目录号 102121)
- Microscint-20 (1 L): 珀金埃尔默公司(目录号 6013611)
- 所有其它化学品均来自西格玛公司

### A<sub>3</sub> 膜的制备

#### 缓冲液

- 缓冲液 A: 10 mM HEPES, 0.9% NaCl, 0.2% EDTA, pH 7.4
- 缓冲液 B: 10 mM HEPES, 10 mM EDTA, pH 7.4
- 缓冲液 C: 10 mM HEPES, 0.1 mM EDTA, pH 7.4
- A<sub>3</sub> 培养基: 500 mL Iscove 改良的 DMEM 培养基, 含有 Glutamax (目

录号 31980-022, Invitrogen 公司)、50mL FCS (热灭活的)(目录号 10108-157, Invitrogen 公司)、5mL HEPES (1M) (目录号 15630-056, Invitrogen 公司)。

#### 制备方法:

- 将 A<sub>3</sub> CHO 细胞在 37℃和 5%CO<sub>2</sub> 下培养在旋转培养瓶中, 直到达到 95%汇合。
- 接着加入 40mL 冰冷却的缓冲液 A(提升缓冲液), 并将旋转瓶放回培养箱 10 分钟。
- 接着使用灭菌的刮刀将细胞从瓶壁上刮下, 转移至冰上的 50mL 的 Falcon 管中。
- 随后用 10mL 缓冲液 A 冲洗旋转瓶的瓶壁。将其转入 Falcon 管中, 接着将该管在 4℃下于 500 g 离心 5 分钟。
- 除去上清液, 将 25mL 冰冷的缓冲液 B(裂解缓冲液)加入沉淀中。
- 使用 polytron 在冰上对沉淀进行匀浆(搅动 4 次, 每次 5 秒, 在每次搅动之间间隔 20 秒)。
- 匀浆后, 使用 Beckman Avanti J-251 超速离心机, 将管子在 4℃下于 39,000 g 离心 25 分钟。
- 除去上清液, 向管中加入 20 mL 冰冷的缓冲液 C(冷冻缓冲液)。
- 使用 polytron 在冰上对沉淀再次进行匀浆, 接着使用 Beckman Avanti J-251 超速离心机在 4℃下于 39,000 g 离心 25 分钟。
- 除去上清液, 将沉淀重新悬浮于 1mL 冰冷的缓冲液中。
- 使用牛血清白蛋白作为标准品, 通过 Bradford Protein Micro-assay (BioRad®)来估计蛋白定量。
- 用缓冲液 C 调整膜浓度, 按照所需将试样等分, 急速冷冻, 之后储存于-80℃。

#### 结合试验

##### 缓冲液

- 试验缓冲液: 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA 和 0.1% w/v BSA。储存于 4℃, 一旦加入 BSA, 可保持 1 周。

- 清洗缓冲液: 50 mM Tris-HCl, pH 7.4 和 0.9% NaCl。储存于 4℃。

#### 化合物的准备

在 DMSO 中制备 10mM 的参照化合物和待测化合物溶液。将母液在包含 4%(v/v)DMSO 的试验缓冲液中稀释, 得到的终浓度为 40μM。

#### K<sub>d</sub> 测定

使用放射标记的激动剂 [<sup>125</sup>I]-AB-MECA 在 0.002-5nM 浓度范围内进行 CHO A<sub>3</sub> 膜的放射配体结合, 以获得饱和结合。使用 2.5μg 的膜在总体积 200μL 的试验缓冲液中进行结合试验, 一式两份。在 10μM 的激动剂 I-AB-MECA 存在下测定非特异性结合。

#### 结合试验

在 U 型底聚丙烯 96-孔板上, 在终体积 200 μL/孔中进行该试验。试验的组分按下述加入:

- 50 μL 在含有 4% (v/v) DMSO 的试验缓冲液中的待测化合物。总结合量使用 50μL 溶媒进行测定。使用 50μL 的 40μM I-AB-MECA 测定非特异性结合, 得到的最终试验浓度为 10μM。

- 50 μL [<sup>125</sup>I]-AB-MECA, 浓度为 1 nM (4x), 得到的最终试验浓度为 0.25 nM。

- 100 μL CHO A<sub>3</sub> 膜, 在含有 4 U/mL 腺苷脱氨酶(ADA)(最终试验浓度为 2 U/mL)的试验缓冲液中浓度为 25 μg/mL, 得到的最终试验浓度为 2.5 μg/孔。

在 Biomek 2000 上制备化合物稀释液, 得到一系列的 40-0.002 μM (4x) 的 10 个浓度。使用 Tomtec Quadra 将 50μL 的各浓度转移至 Dynex 96-孔板中。在不存在 I-AB-MECA 下测定总结合量, 在存在 10μM 的 I-AB-MECA 的条件下测定非特异性结合。CHO A<sub>3</sub> 膜在使用前迅速解冻, 在含有 4 U/mL(2x)腺苷脱氨酶的试验缓冲液中稀释到浓度为 25μg/mL。混

悬液保持在冰上直到使用。将放射性配体 [ $^{125}\text{I}$ ]-AB-MECA 进行稀释, 向 96-孔板各孔中加入 50 $\mu\text{L}$ , 得到的放射性配体终浓度为 0.25nM。将 100 $\mu\text{L}$  的稀释的膜制备物加入各孔, 得到的总蛋白浓度为 2.5 $\mu\text{g}$ /孔, 向各孔中加入 50 $\mu\text{L}$  试验缓冲液。将 96-孔板简单混匀, 在室温下孵育 120 分钟。

使用自动化的 Tomtec 9600 收集器, 将样品从试验板采集到 Unifilter GF/B 板(向其中各孔加入 50 $\mu\text{L}$  0.5%(w/v)的聚乙烯亚胺)。将 Unifilter GF/B 板在 50 $^{\circ}\text{C}$  下孵育 3 小时或在室温下过夜, 以使滤膜干燥。将衬膜用于 Unifilter GF/B 板, 向各孔中加入 Microscint-20, 按照生产商的说明书用 TopSeal-S 将板子密封。使用 Packard TopCount ( $^{125}\text{I}$ -Scintillation, 1 分钟/孔)对 Unifilter GF/B 板进行计数。采用次数/分钟(cpm)来测定  $\text{IC}_{50}$ , 并根据它们使用下述的方程确定  $K_i$ 。参见 Cheng 和 Prusoff, *Biochem Pharmacol*, 卷 22, 3099-3018 页(1973)。

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{C}{K_d}},$$

其中

$C$  = 放射性配体的浓度; 和

$K_d$  = 配体的解离常数。

### $A_3$ [ $^{35}\text{S}$ ]-GTP $\gamma$ S 结合功能试验

#### 缩写词列表

|                                    |                                                   |
|------------------------------------|---------------------------------------------------|
| [ $^{35}\text{S}$ ]-GTP $\gamma$ S | 鸟苷 5'-[ $\gamma$ - $^{35}\text{S}$ ]硫代三磷酸酯, 三乙基铵盐 |
| BSA                                | 牛血清白蛋白                                            |
| CHO                                | 中国仓鼠卵巢                                            |
| DMSO                               | 二甲亚砜                                              |
| GDP                                | 鸟苷 5'-二磷酸酯                                        |

|                   |                                |
|-------------------|--------------------------------|
| GTP- $\gamma$ -S  | 鸟苷 5'-O-(3-硫代三磷酸酯)             |
| HEPES             | 4-(2-羟基乙基)哌嗪-1-乙磺酸             |
| I-AB-MECA         | N6-(4-氨基-3-碘苄基)-5'-N-甲基氨甲酰基-腺苷 |
| MgCl <sub>2</sub> | 氯化镁                            |
| NaCl              | 氯化钠                            |
| SPA               | 闪烁逼近分析法                        |
| Tris-HCl          | 三(羟甲基)氨基甲烷盐酸盐                  |
| WGA               | 麦胚凝集素                          |

为了确定对本发明化合物的功能响应, 在从稳定表达腺苷 A<sub>3</sub> 受体的 CHO 细胞制备的膜中进行了测定 A<sub>3</sub> 激动剂刺激 [<sup>35</sup>S]-GTP $\gamma$ S 结合的试验。由激动剂诱导的刺激 G 蛋白结合 [<sup>35</sup>S]-GTP $\gamma$ S 而激活在多种受体包括腺苷受体中用作功能测试。参见 Lorenzen 等人, *Mol Pharmacol*, 卷 49, 915-926 页(1996); 和 Jacobson 等人, *Drug Dev Res*, 卷 37, 131 页(1996)。

当进行 [<sup>35</sup>S]-GTP $\gamma$ S 结合试验时, 必须考虑许多因素。首先, 在试验中包含 GDP 来促进 G 蛋白的失活。过量的 GDP 可以引起 G 蛋白活化的催化速率下降, 而高效能的激动剂对此的敏感性可能较低。在存在高浓度的 GDP 条件下, 低效能的激动剂可能很难引起响应。对于为何高效能的激动剂能够克服 GDP 阻断的一个可能的理论是, 它们诱导或稳定了受体构象的改变。第二, 试验中需要高浓度的钠离子来降低基础活性, 因此可能会破坏高亲和力的结合。第三,  $\alpha$ -亚基从  $\beta\gamma$  亚基上解离需要 Mg<sup>2+</sup> 离子, 其可能会影响某些激动剂的结合能力。Mg<sup>2+</sup> 的存在还可以造成 GTP $\gamma$ S 的不可逆结合, 因此可能产生非平衡状态。最后, 在 [<sup>35</sup>S]-GTP $\gamma$ S 结合试验中, GTP $\gamma$ S 结合所有的 G 蛋白, 即它不能分辨不同的 G 蛋白, 并且和其他膜蛋白试验一样, 它对于由蛋白酶造成的蛋白降解也是敏感的。

在上文中 Lorenzen 等人(1996)描述的常规 GTP $\gamma$ S 结合试验是基于过滤的方法, 因此需要分离的步骤; 我们将该方法改进为利用 SPA 进行操作的方法, 以便它可以用在半自动的和匀质的条件下。在 SPA 试验中, 膜被

麦胚凝集素(WGA)SPA珠子通过WGA和膜表面的糖蛋白的碳水化合物残基之间特异性的相互作用而捕获。一旦受体被刺激, [ $^{35}\text{S}$ ]-GTP $\gamma$ S就特异性地结合到G蛋白的 $\alpha$ -亚基上,从而将 [ $^{35}\text{S}$ ]-GTP $\gamma$ S引入很靠近SPA珠子之处。从 [ $^{35}\text{S}$ ]-GTP $\gamma$ S发射的 $\beta$ 粒子激发了珠子中的闪烁体并发光。在溶液中游离的 [ $^{35}\text{S}$ ]-GTP $\gamma$ S不靠近SPA珠子,因此并不激活闪烁体,所以不发光。

## 方法

### 材料

- CHO 腺苷 A3 细胞
- *N*-2-羟基乙基哌嗪-*N'*-2-乙磺酸(HEPES)(Invitogen 公司, 目录号 15630-056)
- BSA (必须无脂肪酸) (西格玛公司, 目录号 A-6003)
- Tris (BDH 生化试剂公司, 目录号 443864E)
- 乙二胺-四乙酸(EDTA) (西格玛公司, 目录号 E-5391)
- $\text{MgCl}_2$  (无水) (西格玛公司, 目录号 M-8266)
- GDP (钠盐) (西格玛公司, 目录号 G-7127)
- GTP $\gamma$ S (四锂盐) (西格玛公司, 目录号 G-8634)
- [ $^{35}\text{S}$ ]-GTP $\gamma$ S (安玛西亚 SJ1320, 1  $\mu\text{Ci}/\mu\text{L}$ )
- WGA SPA 珠子(安玛西亚国际公司, 目录号 SPQ0031)
- 聚丙烯 96-孔板(格瑞纳公司, 目录号 650201)
- 白色的非结合表面的 96-孔 Optiplate: Packard 目录号 6005190
- TopSeal - (Canberra Packard counter 目录号 6005185)

## A3 膜的制备

### 缓冲液

- 缓冲液 A: 10 mM HEPES, 0.9% NaCl, 0.2% EDTA, pH 7.4
- 缓冲液 B: 10 mM HEPES, 10 mM EDTA, pH 7.4
- 缓冲液 C: 10 mM HEPES, 0.1 mM EDTA, pH 7.4

• **A<sub>3</sub>培养基:** 500mL Iscove 改良的 DMEM 培养基, 含有 Glutamax (目录号 31980-022, Invitrogen 公司)、50mL FCS (热灭活的)(目录号 10108-157, Invitrogen 公司)、5mL HEPES (1M) (目录号 15630-056, Invitrogen 公司)。

制备方法:

• 将 A<sub>3</sub> CHO 细胞在 37℃ 和 5% CO<sub>2</sub> 下培养在旋转培养瓶中, 直到达到 95% 汇合。

• 接着加入 40 mL 冰冷却的缓冲液 A (提升缓冲液), 并将旋转瓶放回培养箱 10 分钟。

• 接着使用灭菌的刮刀将细胞从瓶壁上刮下, 转移至冰上的 50mL 的 Falcon 管中。

• 随后用 10 mL 缓冲液 A 冲洗旋转瓶的瓶壁。将其转入 Falcon 管中, 接着将该管在 4℃ 下于 500 g 离心 5 分钟。

• 除去上清液, 将 25mL 冰冷的缓冲液 B(裂解缓冲液)加入沉淀中。

• 使用 polytron 在冰上对沉淀进行匀浆(搅动 4 次, 每次 5 秒, 在每次搅动之间间隔 20 秒)

• 匀浆后, 使用 Beckman Avanti J-251 超速离心机, 将管子在 4℃ 下于 39,000 g 离心 25 分钟。

• 除去上清液, 向管中加入 20 mL 冰冷的缓冲液 C(冷冻缓冲液)。

• 使用 polytron 在冰上对沉淀再次匀浆, 接着使用 Beckman Avanti J-251 超速离心机在 4℃ 下于 39,000 g 离心 25 分钟。

• 除去上清液, 将沉淀重新悬浮于 1mL 冰冷的缓冲液中。

• 使用牛血清白蛋白作为标准品, 通过 Bradford Protein Micro-assay (BioRad®) 来估计蛋白定量。

• 用缓冲液 C 调整膜浓度, 按照所需将试样等分, 急速冷冻, 之后储存于 -80℃。

珠子储存缓冲液

• 50 mM Tris-HCl (7.88mg/mL), pH 7.4。

- 溶液储存在 4℃。

### 试验缓冲液

- 20 mM HEPES (4.766 g/L)
- 10 mM MgCl<sub>2</sub> (2.033 g/L)
- 100 mM NaCl (5.844 g/L)
- 1 mM EDTA (0.452 g/L)
- pH 7.4
- % BSA (1 g/L)

在试验缓冲液中将 WGA PVT SPA 珠子制成 250mg/mL，在 4℃ 下最多储存一周。

[<sup>35</sup>S]-GTPγS - [<sup>35</sup>S]-GTPγS 母液的浓度在当天按以下方法进行测定：

$$[\text{<sup>35</sup>S}]\text{-GTP}\gamma\text{S 的摩尔浓度}(\mu\text{M}) = \frac{\text{放射性浓度}(\text{mCi/mL})}{\text{母液的比活性}(\text{Ci/mmol})} \times 1000$$

举例： 在第 5 天，活性为 0.961 μCi/μL (按照安玛西亚公司目录后面的 [<sup>35</sup>S]放射性衰减表获得，参考= 1 μCi/μL)，因此对于一批比活性为 1082 Ci/mmol 的 [<sup>35</sup>S]-GTPγS 而言：

$$\text{换算为 mCi/mmol, 摩尔浓度为 } \frac{0.961 \times 1000}{1082} = 0.888 \mu\text{M}.$$

### 试验方法

在白色的非结合表面的 96-孔 Optiplate 板上，在终体积为 250μL/孔中进行该试验。按照下述加入试验的组分：

- 将 25μL 试验缓冲液加入 96-孔 Optiplate 板的各孔中。
- 向每孔中再加入 25μL 的 10μM GDP。
- 向孔 A1 到 D1 和 E12 到 H12 中加入 25μL 的 10%DMSO/试验缓冲液— 用于测定基础效应的对照。
- 向孔 E1 到 H1 和 A12 到 D12 中加入 25μL 的 100nM I-AB-MECA 在 10%DMSO/试验缓冲液中的溶液— 用于测定最大刺激的对照。

- 将化合物在带有枪头更换的 Biomek 上稀释(在 10%DMSO/试验缓冲液中进行 1:3 稀释), 将 25 $\mu$ L 一式两份转移至 Optiplates。
- 将 [ $^{35}$ S]-GTP $\gamma$ S 稀释到 1.25nM(见上文), 并将 25 $\mu$ L 加入各孔, 得到的最终试验浓度为 0.125nM [ $^{35}$ S]-GTP $\gamma$ S/孔。
- 将膜在试验缓冲液中稀释到 25  $\mu$ g/mL。
- 将 SPA 珠子的母液在试验缓冲液中稀释, 得到的浓度为 5mg/mL。
- 在加入板子之前(在使用前不超过 20 分钟内), 将珠子与膜按 1: 2 的比例(50 $\mu$ L 珠子: 100 $\mu$ L 膜)混合。
- 将 150 $\mu$ L 的珠子与膜的混合物加入各孔。
- 将板子用 TopSeal 密封, 在室温下孵育 40-170 分钟。
- 将板子在室温下于 850  $\times$  g 离心 10 分钟(Jouan B4i), 立即在 Packard Topcount 上采用程序 [ $^{35}$ S dpm]按 1 分钟/孔进行读板。

因此, 本发明的药物可以用于治疗由腺苷 A<sub>3</sub> 受体激活所介导的病症。

例如, 本发明可以用于治疗如 WO 04/045627 所述的风湿性关节炎。

还有, 本发明是基于下述的令人惊奇的发现, 即, 施用 A<sub>3</sub> 腺苷受体激动剂(A<sub>3</sub>RAg)减轻了如 WO 05/063246 所述的多发性硬化症的症状。

根据一项实施方案, 本发明涉及治疗人类个体的多发性硬化症(MS)的方法, 该方法包括向需要此类治疗的个体施用有效量的 A<sub>3</sub>RAg。

在本发明中, 术语“多发性硬化症”(MS)是指 CNS 的炎性疾病, 其中神经绝缘的髓鞘部分丢失, 导致多种病理症状。MS 包括多种类型, 例如复发/缓解型(RRMS)、继发性渐进型(SPMS)、进行性复发型(PRMS)和原发性渐进型(PPMS)。

在本发明中, 术语“治疗”或“神经痛的保护”是指疾病的临床症状的任何改善, 和/或 MS 病人恶化速度或复发率的降低, 以及病人良好生存的改善。例如, 改善可以表现为一种或多种下述情况: 肌无力降低、肌痉挛减少、痉挛状态减少、平衡改善和记忆改善。

本发明还基于下述发现, 即, 腺苷受体激动剂抑制病毒在细胞内复制,

如 WO 02/055085 所述。因此，本发明提供了用于抑制病毒的细胞内复制的方法，其包括向细胞施用有效量的至少一种 A<sub>3</sub>RAg。

本发明的激动剂是腺苷 A<sub>3</sub> 受体的完全激动剂或部分激动剂。如本文所用，如果化合物能够完全抑制腺苷酸环化酶(A<sub>3</sub>)，则化合物为腺苷 A<sub>3</sub> 受体的“完全激动剂”，如果化合物能够部分地抑制腺苷酸环化酶(A<sub>3</sub>)，则化合物为腺苷 A<sub>3</sub> 受体的“部分激动剂”。

本发明还提供了抑制病毒在细胞内复制的药物组合物，其包括有效量的至少一种所述的 A<sub>3</sub>RAg，还提供了该活性成分(即 A<sub>3</sub>RAg)在制备这类药物组合物中的用途。

本发明特别是用于，但不限于，抑制 HIV 病毒在人类细胞中的复制。

本发明的方法在如 WO 95/02604 所述的体内应用中可以特别有效。例如，如 WO 95/02604 所述，A<sub>3</sub> 腺苷受体激动剂可以用于治疗任何涉及肌醇-1,4,5-三磷酸酯(IP3)、二酰基甘油(DAG)和自由基的释放以及后续的花生四烯酸级联反应的疾病状态或病症。因此，本发明的方法可以用来治疗高血压、运动过度、过度紧张、急性缺氧、抑郁症和不育症，其中例如在症状发作或出现的约几分钟到约 1 小时内迅速使用一种上述的化合物。该方法还用于治疗慢性疾病状态和病症，特别是其中长期预防性或治疗性地施用一种上述的化合物可预防症状发作或减少恢复时间的那些病症和疾病状态。可以按照本发明的方法长期治疗的疾病状态和病症的例子包括：炎症病症如血管炎症和关节炎、变态反应、哮喘、创伤愈合、中风、心力衰竭、急性脊髓损伤、急性头部损伤或外伤、癫痫发作、新生儿缺氧(脑瘫；预防性的治疗包括通过胎盘血液循环的长期给药)、由于动静脉畸形和闭塞性脑动脉疾病所致的慢性缺氧、与兴奋性中毒相关的重度神经性障碍、帕金森病、亨廷顿舞蹈症以及中枢神经系统(CNS)的其它疾病、心脏病、肾病和避孕。

而且，发现上述化合物增加基础血压或全身血压，因此长期施用这类化合物可以用来治疗恶性低血压。例如，施用 IB-MECA 导致基础或全身血压(例如约 70mmHg 到约 90mmHg)的显著升高(例如约 10-30t)。

还发现这类化合物是有效的大脑保护剂。因此，上述化合物可以用于治疗和/或预防多种病症，包括例如癫痫发作、短暂缺血性休克、中风、源于血栓或脑出血的局部缺血、源于心搏骤停的全心缺血、外伤、新生儿麻痹、低血容量性休克、支气管扩张，和作为促进睡眠的药物、作为治疗脱髓鞘疾病如多发性硬化症的药物和作为神经保护药用于例如大脑出血性损伤、脊髓缺血-再灌注损伤、高血糖和相关的神经病。上述化合物，特别是例如 IB-MECA，还被发现具有认知保护作用，因此可以用于治疗其中诱发这类作用对于例如治疗阿尔茨海默症和其它痴呆和认知障碍证明有效的病症。

根据 WO 06/011130，向人类个体施用 A<sub>3</sub>RAg 减轻了干燥综合征(SS)的症状。

因此，根据一项实施方案，本发明涉及治疗人类个体的 SS 的方法，其包括向需要此类治疗的个体施用有效量的 A<sub>3</sub>RAg。在一个优选的实施方案中，A<sub>3</sub>RAg 被局部施用于例如眼睛或皮肤。在另一个优选的实施方案中，A<sub>3</sub>RAg 被口服施用。

在本发明中，术语“SS”是指造成 KCS 的自身免疫病，其中免疫细胞攻击和破坏产生泪液和唾液的腺体。在本发明的一个实施方案中，该术语是指被归类为继发性 SS 的病症。在优选的实施方案中，所述的继发性 SS 源自风湿性病症。该病的症状可以包括眼、口、皮肤、鼻和阴道干燥，并且可以影响其它的身体器官，包括肾、血管、肺、肝、胰腺和脑。

本发明的方法预期用作治疗或预防包括 SS 在内的干眼病的眼科临床症状和体征。SS 的眼科临床症状包括但不限于异物感、灼烧和瘙痒；SS 的眼科临床体征包括但不限于通过荧光素和玫瑰红染色的角膜和结膜糜烂，以及泪液膜破裂时间。

本发明的药物可以与 WO 01/23399、WO 95/02604、WO 05/063246、WO 02/055085 和 WO 06/011130 中所述的其它活性剂联合使用。

本发明的药物可以通过任何适宜的途径施用，例如以片剂或胶囊的形式口服施用；胃肠外施用，例如静脉内施用；通过吸入施用，或者按 WO

01/23399、WO 95/02604、WO 05/063246、WO 02/055085 和 WO 06/011130 所述的方法施用。

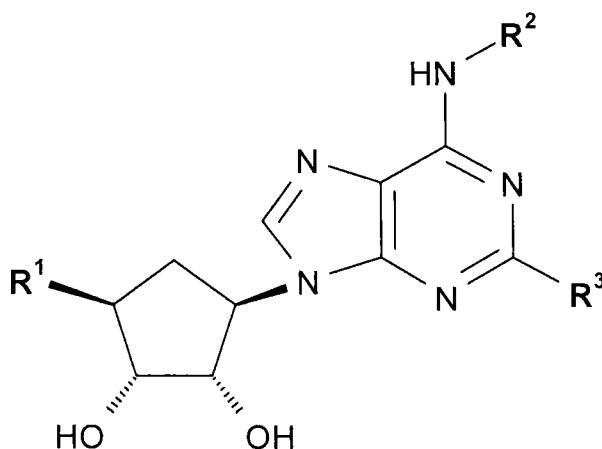
在另一方面，本发明还提供了药物组合物，其包含游离形式或可药用盐形式的式(I)化合物和任选地可药用的稀释剂或载体。该药物组合物可以包含如上文所述的共同治疗剂，例如抗炎药、支气管扩张药、抗组胺药或镇咳药。这类组合物可以使用常规的稀释剂或赋形剂并采用制剂领域公知的技术进行制备。因此，口服剂型可以包括片剂和胶囊剂。用于局部给药的制剂可以采用霜剂、软膏剂、凝胶剂或经皮递送系统，例如贴剂。用于吸入的组合物可以包括气雾剂或其他雾化的制剂或干粉制剂。其它的制剂可以是如 WO 01/23399、WO 95/02604、WO 05/063246、WO 02/055085 和 WO 06/011130 所述。

当然，在实践本发明中所用的式(I)化合物的剂量将根据例如所治疗的具体病症、所需要的效果和在本 WO 01/23399、WO 95/02604、WO 05/063246、WO 02/055085 和 WO 06/011130 中所述的给药方式而变化。

通过以下实施例来举例说明本发明。

### 实施例 1-5

#### 式 I 的化合物



| 实施例 | R <sup>1</sup> | R <sup>2</sup>  | R <sup>3</sup> |
|-----|----------------|-----------------|----------------|
| 1   |                |                 | Cl             |
| 2   |                |                 | Cl             |
| 3   |                | CH <sub>3</sub> |                |
| 4   |                |                 | H              |
| 5   |                |                 | H              |

### 实施例 1

#### (1*S*,4*R*)-4-(2,6-二氯-嘌呤-9-基)-环戊-2-烯醇

将 2,6-二氯嘌呤(10g, 52.90mmol)、(1*S*,4*R*)-顺式-4-乙酰氧基-2-环戊烯-1-醇(10g, 70.40mmol)、三(双亚苄基丙酮)二钯(0)(3.20g, 3.50mmol)和聚合物支持的三苯基膦(3mmol/g, 11.60g, 35.00mmol)放置在氩气氛下的烘干的烧瓶中。加入无水除氧的 THF(80 L), 并将反应混合物轻柔搅拌 5 分钟。加入三乙胺(20mL), 并将反应混合物在 50℃下搅拌。在 1 小时后, 通过 LCMS 显示反应完成。将反应混合物冷却, 过滤并真空除去溶剂。在快速柱色谱(硅胶, 二氯甲烷:甲醇 25:1)纯化后得到了标题化合物。

<sup>1</sup>H nmr (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz); 8.30(s, 1H), 6.40(m, 1H), 5.90(m, 1H),

5.50(m, 1H), 4.95(m, 1H), 3.05(m, 1H), 2.10(m, 1H), MS (ES+)  $m/e$  271 (MH<sup>+</sup>).

碳酸(1*S*,4*R*)-4-(2,6-二氯-嘌呤-9-基)-环戊-2-烯基酯乙基酯

将(1*S*,4*R*)-4-(2,6-二氯-嘌呤-9-基)-环戊-2-烯醇(9.5g, 35.05mmol)放置在氩气氛下的烘干的烧瓶中。先后加入无水 THF(200mL)和无水吡啶(5.54g, 70.1mmol)。缓慢加入氯甲酸乙酯(15.21g, 140.2mmol), 以使温度不高于 40 °C, 将反应混合物在室温下搅拌。在 1 小时后, 通过 LCMS 显示反应完成。真空除去溶剂, 将残余物分配在二氯甲烷(200mL)和水(200mL)中。有机层用水(150mL)和盐水(150mL)洗涤, 经 MgSO<sub>4</sub> 干燥, 过滤并真空除去溶剂。从甲醇中结晶后得到标题化合物。

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz); 8.20(s, 1H), 6.45(m, 1H), 6.25(m, 1H), 5.75(m, 1H), 5.70(m, 1H), 4.25(q, 2H), 3.20(m, 1H), 2.05(m, 1H), 1.35(t, 3H), MS(ES+)  $m/e$  343(MH<sup>+</sup>).

二-Boc-[(1*S*,4*R*)-4-(2,6-二氯-嘌呤-9-基)-环戊-2-烯基]-胺

将碳酸(1*S*,4*R*)-4-(2,6-二氯-嘌呤-9-基)-环戊-2-烯基酯乙基酯(2.5g, 7.29mmol)、亚氨基二甲酸二-叔丁基酯(1.74g, 8.02mmol)、三(双亚苄基丙酮)二钨(0)(0.33g, 0.36mmol)和三苯基磷(0.29g, 1.09mmol)放置在氩气氛下的烘干的烧瓶中。加入无水除氧的 THF(30mL), 将反应混合物在室温下搅拌。3 小时后通过 LCMS 显示反应完成。真空除去溶剂, 通过快速柱色谱(硅胶, 乙酸乙酯:异己烷 4:1)纯化后得到标题化合物。

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz); 8.70(s, 1H), 6.20(m, 1H), 5.85(m, 1H), 5.80(m, 1H), 5.40(m, 1H), 3.20(m, 1H), 2.15(m, 1H), 1.55(s, 18H), MS(ES+)  $m/e$  470(MH<sup>+</sup>).

(1*S*,2*R*,3*S*,5*R*)-3-(二-叔丁氧基羰基氨基)-5-(2,6-二氯-嘌呤-9-基)-环戊烷-1,2-二醇

通过将四氯化钨三水合物(60mg, 0.29mmol)溶于含有高碘酸钠(682 mg, 3.19mmol)的水(5mL)中制备深红色/橙色的四氯化钨水溶液, 将其一次性地加入(1*S*,4*R*)-1-(二-叔丁氧基羰基氨基)-4-(2,6-二氯嘌呤-9-基)-环戊-2-

烯(1.00g, 2.12mmol)在乙酸乙酯:乙腈 1:1(30mL)中的冷却溶液中(冰/水浴, 0℃)。将所得的混浊棕色混合物在冰/水上搅拌 10 分钟, 接着加入饱和的偏亚硫酸氢钠水溶液(25mL)猝灭, 搅拌 1 小时。混合物通过加入乙酸乙酯(75mL)稀释, 先后用水(2 x 25mL)和盐水(20mL)洗涤, 随后用硫酸镁干燥。过滤并减压除去挥发性成分后, 得到浅黄色固体状的所需产物, 其不经进一步纯化而使用。

**(1*S*,2*R*,3*S*,5*R*)-3-(二-叔丁氧基羰基氨基)-5-[2-氯-6-(3-碘苄基氨基)-嘌呤-9-基]-环戊烷-1,2-二醇**

将 3-碘苄基胺(500mg, 2.15mmol)和三乙胺(400μL, 291mg, 2.9mmol)溶于二氯甲烷(5mL), 将其加入 (1*S*,2*R*,3*S*,5*R*)-3-(二-叔丁氧基羰基氨基)-5-(2,6-二氯-嘌呤-9-基)-环戊烷-1,2-二醇(1.07g, 2.12mmol)在二氯甲烷(20mL)的溶液中。在环境温度下搅拌反应 4 天, 随后减压除去挥发性成分。使用 Argonaut Flashmaster Personal 系统, 从粗的残余物通过快速柱色谱纯化得到所需产物。将残余物溶在最小量的二氯甲烷中, 上样于用异己烷预饱和的 70g Varian Megabond Elut Flash Si 柱。产物经异己烷(250mL)和 1:1 的乙酸乙酯:异己烷(1 L)先后洗脱纯化; 将纯流分合并, 减压除去溶剂, 得到浅褐色泡沫状的产物(610mg; 41%产率)。LC-MS:  $MH^+$  701.49。

**(1*S*,2*R*,3*S*,5*R*)-3-氨基-5-[2-氯-6-(3-碘-苄基氨基)-嘌呤-9-基]-环戊烷-1,2-二醇**

将(1*S*,2*R*,3*S*,5*R*)-3-(二-叔丁氧基羰基氨基)-5-[2-氯-6-(3-碘苄基氨基)-嘌呤-9-基]-环戊烷-1,2-二醇(590mg, 0.84mmol)溶于甲醇(10mL); 加入 4.0M 氯化氢在 1,4-二噁烷(10mL)中的溶液, 将该浅黄色溶液在环境温度下搅拌 1 小时, 之后通过 TLC 发现反应完成。减压除去挥发性成分, 得到浅褐色固体(450mg, 定量产率)。LC-MS:  $MH^+$  501.15。

***N*-{(1*S*,2*R*,3*S*,4*R*)-4-[2-氯-6-(3-碘苄基氨基)-嘌呤-9-基]-2,3-二羟基环戊基}-乙酰胺**

将(1*S*,2*R*,3*S*,5*R*)-3-氨基-5-[2-氯-6-(3-碘-苄基氨基)-嘌呤-9-基]-环戊烷-1,2-二醇(450mg, 0.84mmol)混悬于含有三乙胺(380μL, 275mg, 2.73mmol)

的二氯甲烷(10mL)中。加入乙酰氯(65 $\mu$ L, 72mg, 0.91mmol), 将所得浅黄色溶液在环境温度下搅拌 1 小时。加入甲醇(5mL)来猝灭所有残余的乙酰氯, 减压除去所有挥发性成分, 得到棕色泡沫。将产物首先使用 Argonaut Flashmaster Personal 系统通过快速柱色谱进行纯化。将棕色泡沫溶于二氯甲烷(10mL)中, 并吸附到硅胶(3g)上。将其上样于用乙酸乙酯预饱和的 20g Isolute Flash Si 柱。产物用 5% 甲醇的乙酸乙酯溶液洗脱, 从含有纯产物的流分中减压除去溶剂, 得到无色固体。从甲醇中结晶得到无色结晶固体(210mg, 46%产率)。LC-MS:  $MH^+$  543.17

## 实施例 2

### 2,6-二氯-9-((1*R*,4*S*)-4-[1,2,3]三唑-2-基-环戊-2-烯基)-9*H*-嘌呤

将碳酸(1*S*,4*R*)-4-(2,6-二氯-嘌呤-9-基)-环戊-2-烯基酯乙基酯(1.0g, 2.91mmol)在氩气下溶于无水脱氧的 THF(20mL)中。先后加入三苯基膦(115mg, 0.44mmol, 0.15 当量)、[1,2,3]三唑(200 $\mu$ L, 238mg, 3.45mmol)和  $Pd_2(dba)_3$ (133mg, 0.146mmol, 5 mol%)。将反应混合物在 50 $^{\circ}C$ 下搅拌 2 小时, 并使之冷却到室温, 随后减压除去挥发性成分。产物使用 Argonaut Flashmaster Personal 通过快速柱色谱纯化。将残余物重新悬浮于二氯甲烷(5mL)中, 随后上样于用异己烷预饱和的 25g Isolute Flash Si 柱。将产物用异己烷(500mL)、异己烷:乙酸乙酯 4:1(250mL)和异己烷:乙酸乙酯 1:1(750mL)洗脱。从含有纯化产物的流分中减压除去溶剂, 并将产物从乙酸乙酯中重结晶, 得到浅褐色固体(280mg, 30%产率)。LC-MS  $MH^+$  321.80

### (1*R*,2*S*,3*R*,5*S*)-3-(2,6-二氯-嘌呤-9-基)-5-[1,2,3]三唑-2-基-环戊烷-1,2-二醇

将 2,6-二氯-9-((1*R*,4*S*)-4-[1,2,3]三唑-2-基-环戊-2-烯基)-9*H*-嘌呤(1 当量)溶于含有 *N*-甲基吗啉-*N*-氧化物(2 当量)的 THF(0.1 M)中。将 4%的四氧化钼水溶液(10 mol%)加入, 在室温下搅拌反应 24 小时, 随后再加入 4%的  $OsO_4$  水溶液(10 mol%), 再搅拌 24 小时。反应物用乙酸乙酯稀释, 用 0.2M HCl 水溶液和盐水先后洗涤, 接着用硫酸镁干燥。过滤并减压除去溶剂后

得到粗产物，其通过快速柱色谱/结晶进行纯化。

(1R,2S,3R,5S)-3-[2-氯-6-(3-碘-苄基氨基)-嘌呤-9-基]-5-[1,2,3]三唑-2-基-环戊烷-1,2-二醇

将 3-碘苄基胺(1 当量)和三乙胺(1.1 当量)溶于二氯甲烷(对于 3-碘苄基胺为约 0.4 M)，加入到(1R,2S,3R,5S)-3-(2,6-二氯嘌呤-9-基)-5-[1,2,3]三唑-2-基-环戊烷-1,2-二醇在二氯甲烷(1 当量; 0.1M)的溶液中。在室温下搅拌反应过夜，随后减压除去挥发性成分。通过快速柱色谱/结晶纯化所需产物。

### 实施例 3

(1S,4R)-4-(6-氯-2-碘-嘌呤-9-基)-环戊-2-烯醇

将 6-氯-2-碘-嘌呤(参见 Taddei 等人, *Org Biomol Chem*, 卷 2, 665-670 页(2004); 1 当量)、(1S,4R)-顺式-4-乙酰氧基-环戊-2-烯醇(1.33 当量)和聚合物支持的三苯基膦(0.66 当量)混合，在室温下置于真空中 24 小时。将新蒸馏过的除氧的 THF 加入(达到对于(1S,4R)-顺式-4-乙酰氧基-环戊-2-烯醇为 1.0M)，随后加入  $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ (5 mol%)。将混合物在室温下搅拌 15 分钟，随后加入三乙胺(通过氢氧化钾干燥)(3 当量)。将反应混合物在 50℃下搅拌 1 小时，使之冷却到室温并过滤。减压除去挥发性成分，产物通过快速柱色谱/结晶纯化。

碳酸(1S,4R)-4-(6-氯-2-碘-嘌呤-9-基)-环戊-2-烯基酯乙基酯

将吡啶(3 当量)加入到 0.2M 的(1S,4R)-4-(6-氯-2-碘-嘌呤-9-基)-环戊-2-烯醇(1 当量)在无水 THF 中的溶液中。缓慢加入氯甲酸乙酯(4 当量)，并确保反应温度不高于 40℃。一旦加入完成，就在室温下搅拌反应直到反应完成。通过过滤除去所有沉淀物，减压除去挥发性成分。将残余物溶于二氯甲烷，用 0.1M 盐酸、水(x2)和盐水先后洗涤，随后用硫酸镁干燥。过滤并减压除去溶剂，接着通过快速柱色谱/结晶纯化，得到所需产物。

乙酰基-[(1S,4R)-4-(6-氯-2-碘-嘌呤-9-基)-环戊-2-烯基]-氨基甲酸叔丁基酯

将碳酸(1S,4R)-4-(6-氯-2-碘-嘌呤-9-基)-环戊-2-烯基酯乙基酯(1 当量)、

乙酰基-氨基甲酸叔丁基酯(参见 Tanaka 等人, *Chem Pharm Bull*, 卷 36, 第 8 期, 3215-3129 页(1988); 1.15 当量)和三苯基膦(0.15 当量)在氩气氛下于烘干的烧瓶中混合。先后加入无水脱氧的 THF(达到对于碳酸(1*S*,4*R*)-4-(6-氯-嘌呤-9-基)-环戊-2-烯基酯乙基酯为 0.3M)和  $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ (5 mol%)。将反应混合物在 50℃ 下搅拌 1 小时,使之冷却到室温,随后减压除去挥发性成分,并将产物通过快速柱色谱/结晶纯化。

乙酰基-[(1*S*,2*R*,3*S*,4*R*)-4-(6-氯-2-碘-嘌呤-9-基)-2,3-二羟基-环戊基]-氨基甲酸叔丁基酯

将乙酰基-[(1*S*,4*R*)-4-(6-氯-嘌呤-9-基)-环戊-2-烯基]-氨基甲酸叔丁基酯(1 当量)、甲磺酰胺(1 当量)和 AD-mix- $\alpha$ (1.5g/mmol 底物)在叔丁醇:水 1:1 中混合(达到对于乙酰基-[(1*S*,4*R*)-4-(6-氯-嘌呤-9-基)-环戊-2-烯基]-氨基甲酸叔丁基酯为 0.1M)。加入四氧化锇(5 mol%, 其为 4%的水溶液),并将反应混合物剧烈搅拌过夜。反应完成后,将反应物分配在乙酸乙酯和水中;有机相用新鲜的水(x2)和盐水先后洗涤,随后用硫酸镁干燥。过滤并减压除去挥发性成分,得到所需产物。

乙酰基-[(1*S*,2*R*,3*S*,4*R*)-2,3-二羟基-4-(2-碘-6-甲基氨基-嘌呤-9-基)-环戊基]-氨基甲酸叔丁基酯

在-20℃下将乙酰基-[(1*S*,2*R*,3*S*,4*R*)-4-(6-氯-2-碘-嘌呤-9-基)-2,3-二羟基-环戊基]-氨基甲酸叔丁基酯加入大大过量的液体甲胺中,搅拌 30 分钟,随后使之加温到室温。所需产物通过快速柱色谱/结晶纯化。

*N*-[(1*S*,2*R*,3*S*,4*R*)-2,3-二羟基-4-(2-碘-6-甲基氨基-嘌呤-9-基)-环戊基]-乙酰胺

将乙酰基-[(1*S*,2*R*,3*S*,4*R*)-2,3-二羟基-4-(2-碘-6-甲基氨基-嘌呤-9-基)-环戊基]-氨基甲酸叔丁基酯溶于二氯甲烷(约 0.1 M)并在冰/水上冷却到 0℃。加入足够量的三氟乙酸,得到 20%的溶液,在冰上搅拌反应直到反应完成。减压除去挥发物,通过快速柱色谱/结晶纯化产物。

*N*-[(1*S*,2*R*,3*S*,4*R*)-4-(2-己-1-炔基-6-甲基氨基-嘌呤-9-基)-2,3-二羟基-环戊基]-乙酰胺

制备 0.05M 的 *N*-[(1*S*,2*R*,3*S*,4*R*)-2,3-二羟基-4-(2-碘-6-甲基氨基-嘌呤-9-基)-环戊基]-乙酰胺(1 当量)在 7:2 的无水 DMF 和三乙胺混合物中的溶液。向其中加入碘化亚铜(I)(1 当量)和二(三苯基膦)氯化钯(2 mol%), 随后加入 1-己炔(6 当量)。将所得混合物在室温下搅拌直到反应完成, 减压除去挥发性成分。产物通过快速柱色谱/结晶纯化。

#### 实施例 4

##### (1*S*,4*R*)-4-(6-氯-嘌呤-9-基)-环戊-2-烯醇

将 6-氯嘌呤(1 当量)、(1*S*,4*R*)-顺式-4-乙酰氧基-环戊-2-烯醇(1.33 当量)和聚合物支持的三苯基膦(0.66 当量)合并, 在室温下放置于真空中 24 小时。加入新蒸馏的除氧的 THF(达到对于(1*S*,4*R*)-顺式-4-乙酰氧基-环戊-2-烯醇为 1.0M), 随后加入 Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub>(5 mol%)。将混合物在室温下搅拌 15 分钟, 随后加入三乙胺(用氢氧化钾干燥)(3 当量)。将反应混合物在 50℃下搅拌 1 小时, 使之冷却到室温并过滤。减压除去挥发性成分, 产物通过快速柱色谱/结晶纯化。

##### 碳酸(1*S*,4*R*)-4-(6-氯-嘌呤-9-基)-环戊-2-烯基酯乙基酯

将吡啶(3 当量)加入 0.2M 的(1*S*,4*R*)-4-(6-氯-嘌呤-9-基)-环戊-2-烯醇(1 当量)在无水 THF 的溶液中。缓慢加入氯甲酸乙酯(4 当量), 并确保反应温度不高于 40℃。一旦加入完成, 在室温下搅拌反应直到反应完成。过滤除去所有沉淀物, 减压除去挥发性成分。将残余物溶于二氯甲烷, 用 0.1M 盐酸、水(x2)和盐水先后洗涤, 随后用硫酸镁干燥。过滤并减压除去溶剂, 接着通过快速柱色谱/结晶纯化, 得到所需产物。

##### 乙酰基-[(1*S*,4*R*)-4-(6-氯-嘌呤-9-基)-环戊-2-烯基]-氨基甲酸叔丁基酯

将碳酸(1*S*,4*R*)-4-(6-氯-嘌呤-9-基)-环戊-2-烯基酯乙基酯(1 当量)、乙酰基-氨基甲酸叔丁基酯(参见 Tanaka 等人(1988), 上文; 1.15 当量)和三苯基膦(0.15 当量)在氩气氛下于烘干的烧瓶中混合。加入无水脱氧的 THF(达到对于碳酸(1*S*,4*R*)-4-(6-氯-嘌呤-9-基)-环戊-2-烯基酯乙基酯为 0.3M), 随后加入 Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub>(5 mol%)。将反应混合物在 50℃下搅拌 1 小时, 并使之冷却

到室温，随后减压除去挥发性成分，通过快速柱色谱/结晶纯化产物。

乙酰基-[(1*S*,2*R*,3*S*,4*R*)-4-(6-氯-嘌呤-9-基)-2,3-二羟基-环戊基]-氨基甲酸叔丁基酯

将乙酰基-[(1*S*,4*R*)-4-(6-氯-嘌呤-9-基)-环戊-2-烯基]-氨基甲酸叔丁基酯(1 当量)、甲磺酰胺(1 当量)和 AD-mix- $\alpha$ (1.5g/mmol 底物)在叔丁醇:水 1:1 中混合(达到对于乙酰基-[(1*S*,4*R*)-4-(6-氯-嘌呤-9-基)-环戊-2-烯基]-氨基甲酸叔丁基酯为 0.1M)。加入四氧化锇(5 mol%，其为 4%的水溶液)，将反应混合物剧烈搅拌过夜。反应完成后，将反应物分配在乙酸乙酯和水中；有机相用新鲜的水(x2)和盐水先后洗涤，随后用硫酸镁干燥。过滤并减压除去挥发性成分，得到所需产物。

乙酰基-[(1*S*,2*R*,3*S*,4*R*)-2,3-二羟基-4-[6-(3-碘-苄基氨基)-嘌呤-9-基]-环戊基]-氨基甲酸叔丁基酯

将 3-碘苄基胺(1 当量)和三乙胺(1.1 当量)溶于二氯甲烷(对于 3-碘苄基胺为约 0.4M)，并将其加入到乙酰基-[(1*S*,2*R*,3*S*,4*R*)-4-(6-氯-嘌呤-9-基)-2,3-二羟基环戊基]-氨基甲酸叔丁基酯在二氯甲烷(1 当量；0.1M)的溶液中。在加热下搅拌反应过夜，随后减压除去挥发性成分。通过快速柱色谱/结晶纯化所需产物。

*N*-[(1*S*,2*R*,3*S*,4*R*)-2,3-二羟基-4-[6-(3-碘-苄基氨基)-嘌呤-9-基]-环戊基]-乙酰胺

将乙酰基-[(1*S*,2*R*,3*S*,4*R*)-2,3-二羟基-4-[6-(3-碘-苄基氨基)-嘌呤-9-基]-环戊基]-氨基甲酸叔丁基酯溶于二氯甲烷(约 0.1M)，并在冰/水上冷却到 0 °C。加入足够量的三氟乙酸，得到 20%的溶液，在冰上搅拌反应直到反应完成。减压除去挥发物，将产物通过快速柱色谱/结晶纯化。

## 实施例 5

乙酰基-[(1*S*,2*R*,3*S*,4*R*)-4-{6-[5-氯-2-(3-甲基-异噁唑-5-基甲氧基)-苄基氨基]-嘌呤-9-基}-2,3-二羟基-环戊基]-氨基甲酸叔丁基酯

将 5-氯-2-(3-甲基异噁唑-5-基甲氧基)苄基胺(参见 DeNinno 等人, *J*

*Med Chem*, 卷 46, 353-355 页(2003)增补材料; 1 当量)和三乙胺(1.1 当量)溶于二氯甲烷(对于 3-碘苄基胺为约 0.4M), 并将其加入到乙酰基-[(1*S*,2*R*,3*S*,4*R*)-4-(6-氯-嘌呤-9-基)-2,3-二羟基环戊基]-氨基甲酸叔丁基酯在二氯甲烷(1 当量; 0.1M)的溶液中。在加热下搅拌反应过夜, 随后减压除去挥发性成分。通过快速柱色谱/结晶纯化所需产物。

*N*-((1*S*,2*R*,3*S*,4*R*)-4-{6-[5-氯-2-(3-甲基-异噁唑-5-基甲氧基)-苄基氨基]-嘌呤-9-基}-2,3-二羟基-环戊基)-乙酰胺

将乙酰基-((1*S*,2*R*,3*S*,4*R*)-4-{6-[5-氯-2-(3-甲基-异噁唑-5-基甲氧基)-苄基氨基]-嘌呤-9-基}-2,3-二羟基-环戊基)-氨基甲酸叔丁基酯溶于二氯甲烷(约 0.1M)中, 并在冰/水上冷却到 0℃。加入足够量的三氟乙酸, 得到 20% 的溶液, 在冰上搅拌反应直到反应完成。减压除去挥发物, 通过快速柱色谱/结晶纯化产物。