



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1248245 B

(45) 授权公告日 2012.07.04

(21) 申请号 98802734.8

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 1998.01.06

C07D 219/10 (2006.01)

(30) 优先权数据

C07D 493/04 (2006.01)

08/779,885 1997.01.06 US

A61L 2/18 (2006.01)

08/779,830 1997.01.07 US

C07F 9/64 (2006.01)

60/043,696 1997.04.15 US

C07F 9/6561 (2006.01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

C07D 405/12 (2006.01)

1999.08.20

C07D 311/00 (2006.01)

C07D 307/00 (2006.01)

(86) PCT申请的申请数据

审查员 刘文霞

PCT/US1998/000532 1998.01.06

(87) PCT申请的公布数据

W098/30545 EN 1998.07.16

(73) 专利权人 塞鲁斯公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 D·库克 J·马利特 A·耐里欧

H·拉伯波特 A·斯塔西诺波洛斯

S·沃洛维茨 J·马提约维克

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 李华英

权利要求书 6 页 说明书 35 页

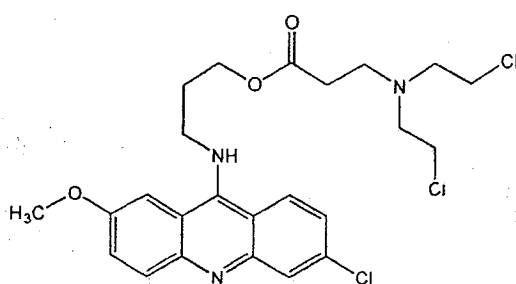
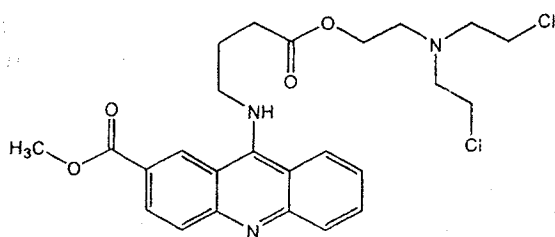
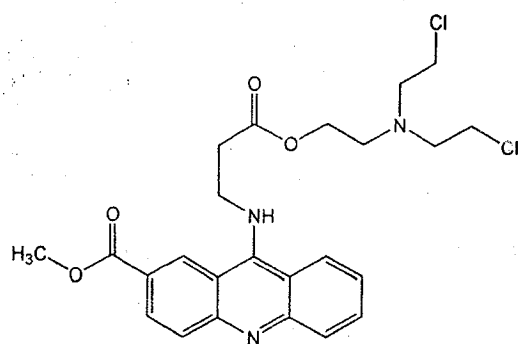
(54) 发明名称

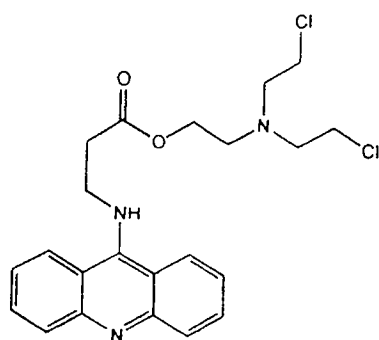
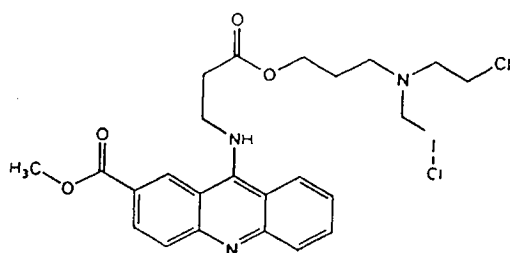
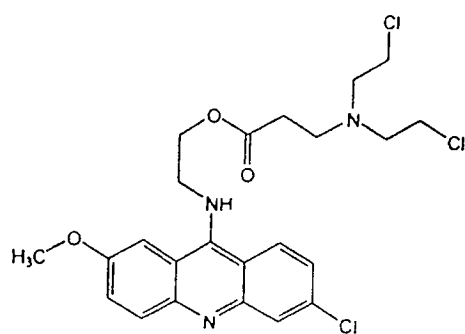
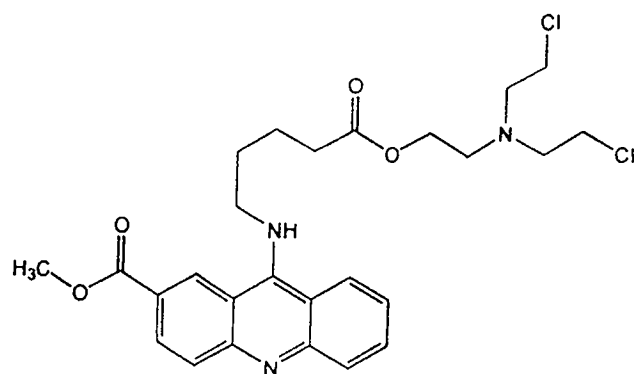
用于病原体灭活的脆性化合物

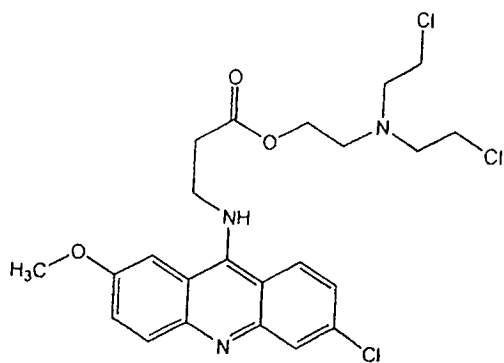
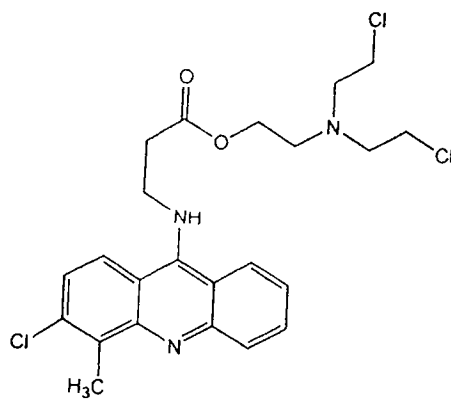
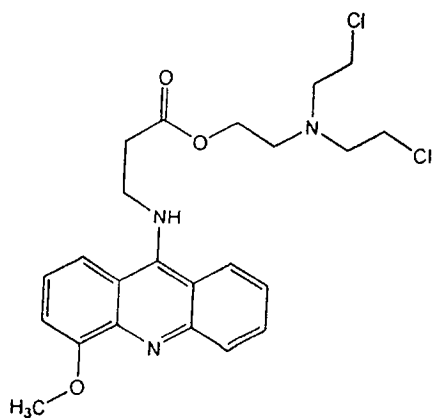
(57) 摘要

本发明公开了灭活材料中病原体的化合物和方法,包括灭活生物材料中病原体的组合物和方法,所述生物材料如红血细胞制品和血浆。所述化合物和方法可用于处理打算用于体外或体内(如临床试验或输血)的材料。该化合物应当能够与核酸进行特定结合和反应,然后降解生成分解产物。所述降解反应速度优选低于与核酸的反应速度。

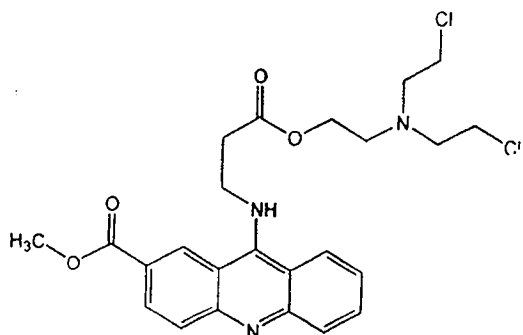
1. 一种选自下组的化合物及其所有盐：



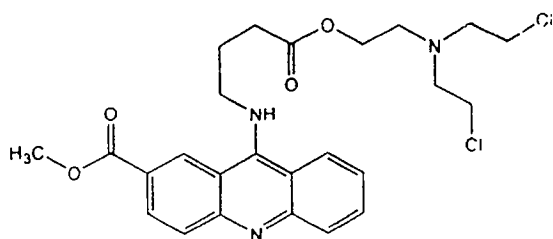




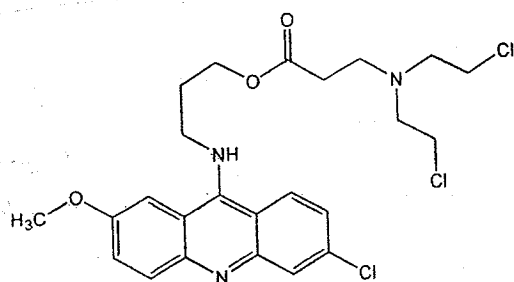
2. 根据权利要求 1 的化合物,它是下式化合物及其所有盐:



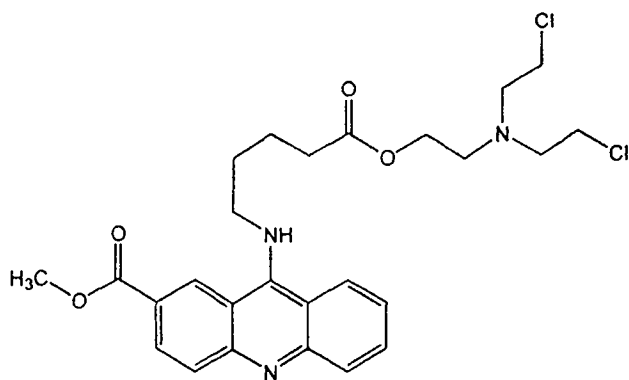
3. 根据权利要求 1 的化合物,它是下式化合物及其所有盐:



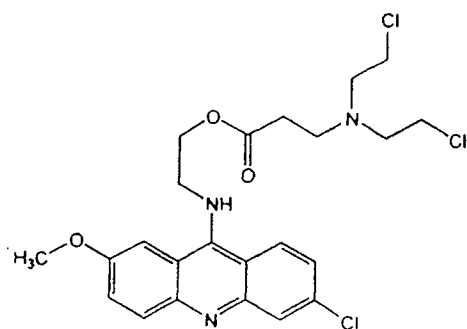
4. 根据权利要求 1 的化合物,它是下式化合物及其所有盐:



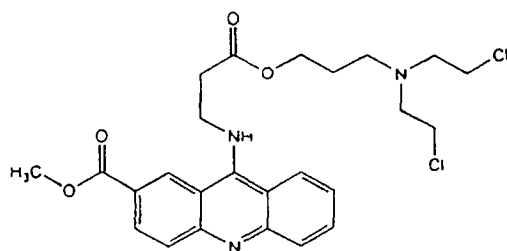
5. 根据权利要求 1 的化合物,它是下式化合物及其所有盐:



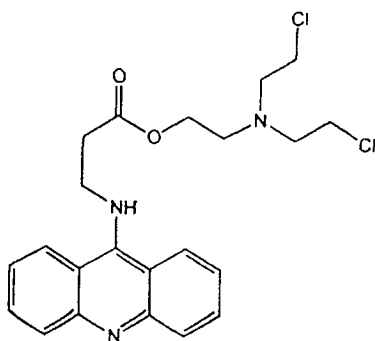
6. 根据权利要求 1 的化合物,它是下式化合物及其所有盐:



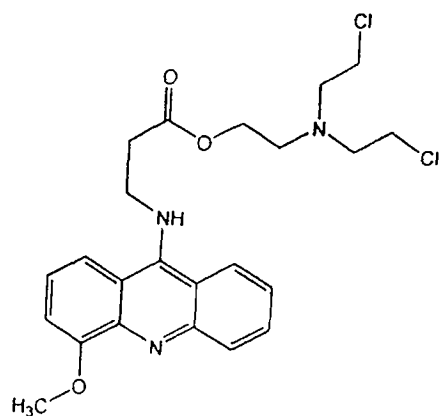
7. 根据权利要求 1 的化合物,它是下式化合物及其所有盐:



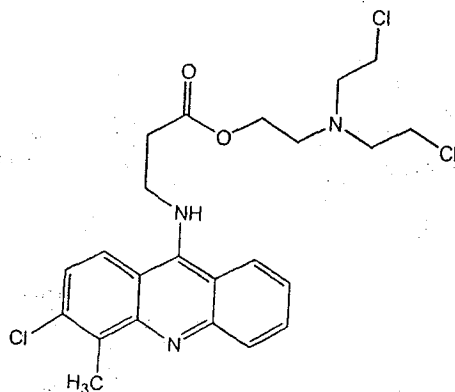
8. 根据权利要求 1 的化合物,它是下式化合物及其所有盐:



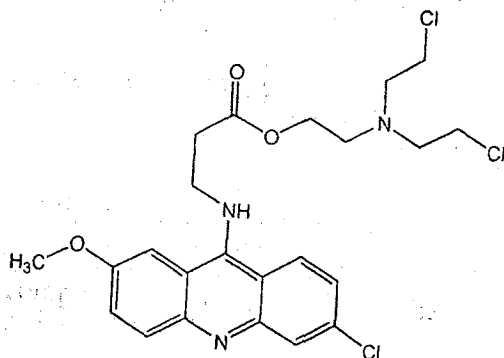
9. 根据权利要求 1 的化合物,它是下式化合物及其所有盐:



10. 根据权利要求 1 的化合物,它是下式化合物及其所有盐:



11. 根据权利要求 1 的化合物,它是下式化合物及其所有盐:



12. 灭活材料中病原体的方法,该方法包括:

向材料中加入权利要求 1-11 任一项的化合物;和

孵育所述材料。

13. 根据权利要求 12 的方法,其中将化合物加入到材料中,形成化合物浓度为 1 至 500 μ M 的最终溶液。

14. 根据权利要求 12 的方法,其中材料为生物材料。

15. 根据权利要求 14 的方法,其中生物材料包含选自下列组分的成分:血液、血液制品、血浆、血小板制剂、血红细胞、压紧血红细胞、血清、汗液、脑脊髓液、唾液、尿、粪便、精液、乳汁、组织样品、均化组织样品、细胞培养基;细胞培养物;病毒培养物及掺入了有机活体产生的材料的培养物。

16. 根据权利要求 14 的方法,其中材料包含血液制品。

17. 根据权利要求 14 的方法,其中材料包含血红细胞。

18. 根据权利要求 12 的方法,其中所述方法包括向材料中加入有效量的化合物,至少灭活 2 logs 的材料中的病原体。

19. 根据权利要求 12 的方法,其中孵育时间为 1 至 48 小时。

用于病原体灭活的脆性化合物

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求保护 1997 年 4 月 15 日递交的申请序号为 60/043,696 的美国临时申请的权利,该申请的公开在此引作参考。

[0003] 本申请也是 1997 年 1 月 6 日递交的序号为 08/779,885 的美国专利申请的部分继续申请;还是 1997 年 1 月 6 日递交的序号为 08/779,830 的美国专利申请的部分继续申请,这些申请的公开在此引作参考。

[0004] 在联邦政府资助研究下进行的发明的权利陈述

[0005] 本发明是在美国政府支持下进行的,NHLBI 的授权序号为 1-R01-HL53380。美国政府在发明中具有某些权利。

[0006] 技术领域

[0007] 本发明涉及可用于灭活材料(如血液制品)中的病原体的化合物以及该化合物的使用方法。

[0008] 背景技术

[0009] 通过血液制品和其它生物材料进行的疾病传播是一种严重的健康问题。尽管对献血者进行筛选和血液试验已经具有了巨大发展,但在试验中,由于病毒或病毒抗体的水平低,所以如乙型肝炎(HBV)、丙型肝炎(HCV)和人免疫缺陷病毒(HIV)的病毒可能在血液制品中躲避检测。除了病毒的危害,目前对用于输血的血液中所存在的细菌或原生动物还没有任何筛选许可试验。另外,由于迄今未知的病原体在血液供给中变得非常普遍,具有疾病传播的威胁,所以存在着危险,而且这种危险在认识到通过输血传播 HIV 之前就已经发生。

[0010] 实验室工作人员接触血液或其它体液也具有健康危害问题。根据疾病治疗中心的估计(防止医护人员及公共安全人员传播人免疫缺陷病毒及乙型肝炎指南(“Guidelines for Prevention of Transmission of Human Immunodeficiency Virus and Hepatitis B Virus to Health-Care and Public-Safety Workers”),每周疾病及死亡率报告(Morbidity and Mortality Weekly Report),vol.38, no. S-6, 1989 年 6 月),每年有 1.2 万工作涉及接触血液的医护人员感染乙肝病毒。

[0011] 为了降低由输血导致疾病的发生率,人们已经提出了几种对献血者进行补充筛选和血液试验的方法。有人建议:在临床使用血液制品之前,在血液或血浆中加入化学试剂,可灭活病原体。在研究有效杀病毒剂中,可向血液成分中加入氮芥 $\text{CH}_3\text{-N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl})_2$ 。然而,在灭活所研究的病毒之一所必须的浓度上会发生实质性溶血,表明氮芥不适用于血液。LoGrippe 等人.,国际输血协会第六次会议论文集(Proceedings of the Sixth Congress of the International Society of Blood Transfusion),血液学文库(Bibliotheca Haematologica)(Hollander, ed.),1958, pp. 225-230。

[0012] Horowitz, 等人,血液(Blood)79:826(1992)和 Horowitz, 等人,输血(Transfusion)25:516(1985)中描述了用于灭活病毒的“溶剂/洗涤剂(solvent/detergent)”(S/D)方法。该方法在 30℃ 下使用 1% 三(正丁基)磷酸盐和 1% 四丁酚醛 X-100 四小时,从而灭活新鲜冷冻血浆中的病毒。为了灭活新鲜冷冻血浆中的病毒,Piquet

等人, Vox Sang. 63 :251(1992) 使用 1%三(正丁基)磷酸盐和 1%辛苯聚醇-9。灭活血液中的病毒的另一方法涉及向血液中加入苯酚或甲醛(美国专利 4,833,165)。但是溶剂/洗涤剂方法和苯酚/甲醛方法均需要在临床使用血液制品之前去除化学添加剂。

[0013] 人们也描述了使用光活化剂灭活血液制品中病原体,参见如 Wagner 等人., 输血, 34 :521(1994)。然而由于血红细胞在紫外和可见光谱的几个区域中吸收光,所以光处理仅局限应用于含血红细胞的材料。另有一些迹象表明对血红细胞进行光处理可以某些方式改变细胞,参见 Wagner 等人,输血 33 :30(1993)。

[0014] 由此需要研制处理血液、血液衍生制品和其它生物材料的组合物和方法,它们能够在没有使制品或材料不适用于其使用目的的条件下,灭活存在于制品或材料中的病原体。无需在使用前从生物材料中分离的组合物特别有用,因为可省去用于分离组合物的设备和材料,且可降低处理生物材料的成本。然而,需要对组合物提出另外的要求,也就是说,如果组合物残留在生物材料中,当将生物材料用于所需目的时,该组合物不能具有任何危害。例如能够灭活血液样品中病原体的高毒性化合物应当预先排除将这种血液用于输血目的(尽管这种血液样品仍可以用于实验室分析)。

[0015] 本发明的目的之一在于提供一种在没有使材料不适用于其使用目的条件下灭活存在于生物材料中的病原体的组合物及其使用方法。如何完成上述目的的实例包括但不限于不限于在离体或体外使用化合物处理生物材料,然后在使用该材料之前分离化合物;使用一组合物,即使是其残留在材料中,也可使材料能够适用于所需使用目的;或使用一组合物,其能够在灭活材料中病原体之后分解成产物,其中所述分解产物可保留在所述材料中而不会使材料不适用于其使用目的。

[0016] 发明公开

[0017] 由此,本发明的目的在于提供能够灭活材料中病原体的化合物,其中这样的化合物包含核酸结合部分、能够与核酸反应形成共价键的效应子部分,以及包含共价连接核酸部分和效应子部分的脆性连接基,其中脆性连接基可在使材料仍适用于所需目的的条件下降解从而不能再共价连接核酸结合部分和效应子部分。

[0018] 本发明另一目的在于提供这类用于灭活材料中病原体的化合物,其中核酸结合部分选自吡啶、吡啶衍生物、补骨脂素、异补骨脂素和补骨脂素衍生物。

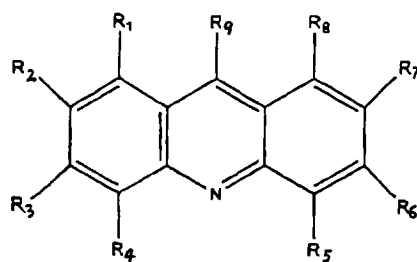
[0019] 本发明另一目的在于提供这类用于灭活材料中病原体的化合物,其中脆性连接基包含选自这里所定义的正向酯、反向酯、正向酰胺、反向酰胺、正向硫代酸酯、反向硫代酸酯、正向和反向硫羧酸酯、正向和反向二硫代酸、硫酸根、正向和反向磺酸根、磷酸根及正向和反向膦酸根的官能单元。

[0020] 本发明另一目的在于提供这类用于灭活材料中病原体的化合物,其中效应子基团包含烷基化试剂官能单元。

[0021] 本发明另一目的在于提供这类用于灭活材料中病原体的化合物,其中效应子基团包含选自氮芥基团、氮芥基团等同物、环氧化物、醛和甲醛合成元(formaldehyde synthons)的官能单元。

[0022] 本发明另一目的在于提供了下式化合物及其所有盐和立体异构体(包括对映体和非对映体):

[0023]



[0024] 其中至少 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 和 R_9 之一为下文定义的 $-V-W-X-E$ ，其余 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 和 R_9 独立地选自 $-H$ 、 $-R_{10}$ 、 $-O-R_{10}$ 、 $-NO_2$ 、 $-NH_2$ 、 $-NH-R_{10}$ 、 $-N(R_{10})_2$ 、 $-F$ 、 $-Cl$ 、 $-Br$ 、 $-I$ 、 $-C(=O)-R_{10}$ 、 $-C(=O)-O-R_{10}$ 和 $-O-C(=O)-R_{10}$ ，

[0025] 其中 $-R_{10}$ 独立地为 H 、 $-C_{1-8}$ 烷基、 $-C_{1-8}$ 杂烷基、 $-$ 芳基、 $-$ 杂芳基、 $-C_{1-3}$ 烷基-芳基、 $-C_{1-3}$ 杂烷基-芳基、 $-C_{1-3}$ 烷基-杂芳基、 $-C_{1-3}$ 杂烷基-杂芳基、 $-$ 芳基- C_{1-3} 烷基、 $-$ 芳基- C_{1-3} 杂烷基、 $-$ 杂芳基- C_{1-3} 烷基、 $-$ 杂芳基- C_{1-3} 杂烷基、 $-C_{1-3}$ 烷基-芳基- C_{1-3} 烷基、 $-C_{1-3}$ 烷基-芳基- C_{1-3} 杂烷基、 $-C_{1-3}$ 杂烷基-芳基- C_{1-3} 烷基、 $-C_{1-3}$ 杂烷基-芳基- C_{1-3} 杂烷基、 $-C_{1-3}$ 烷基-杂芳基- C_{1-3} 烷基或 $-C_{1-3}$ 杂烷基-杂芳基- C_{1-3} 杂烷基；

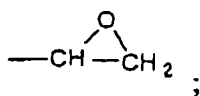
[0026] V 独立地为 $-R_{11}-$ 、 $-NH-R_{11}-$ 或 $-N(CH_3)-R_{11}-$ ，其中 $-R_{11}-$ 独立地为 $-C_{1-8}$ 烷基-、 $-C_{1-8}$ 杂烷基-、 $-$ 芳基-、 $-$ 杂芳基-、 $-C_{1-3}$ 烷基-芳基-、 $-C_{1-3}$ 杂烷基-芳基-、 $-C_{1-3}$ 烷基-杂芳基-、 $-C_{1-3}$ 杂烷基-杂芳基-、 $-$ 芳基- C_{1-3} 烷基-、 $-$ 芳基- C_{1-3} 杂烷基-、 $-$ 杂芳基- C_{1-3} 烷基-、 $-$ 杂芳基- C_{1-3} 杂烷基-、 $-C_{1-3}$ 烷基-芳基- C_{1-3} 烷基-、 $-C_{1-3}$ 杂烷基-芳基- C_{1-3} 烷基-、 $-C_{1-3}$ 烷基-杂芳基- C_{1-3} 杂烷基-、 $-C_{1-3}$ 杂烷基-杂芳基- C_{1-3} 杂烷基-或 $-C_{1-3}$ 杂烷基-杂芳基- C_{1-3} 杂烷基-；

[0027] W 独立地为 $-C(=O)-O-$ 、 $-O-C(=O)-$ 、 $-C(=S)-O-$ 、 $-O-C(=S)-$ 、 $-C(=S)-S-$ 、 $-S-C(=S)-$ 、 $-C(=O)-S-$ 、 $-S-C(=O)-$ 、 $-O-S(=O)_2-O-$ 、 $-S(=O)_2-O-$ 、 $-O-S(=O)_2-$ 、 $-C(=O)-NR_{10}-$ 、 $-NR_{10}-C(=O)-$ 、 $-O-P(=O)(-OR_{10})-O-$ 、 $-P(=O)(-OR_{10})-O-$ 、 $-O-P(=O)(-OR_{10})-$ ；

[0028] X 独立地为 $-R_{11}-$ ；和

[0029] E 独立地选自 $-N(R_{12})_2$ 、 $-N(R_{12})(R_{13})$ 、 $-S-R_{12}$ 和

[0030]

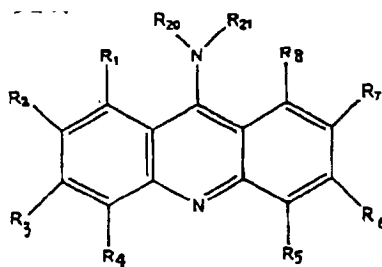


[0031] 其中 $-R_{12}$ 为 $-CH_2CH_2-G$ ，其中 G 独立地为 $-Cl$ 、 $-Br$ 、 $-I$ 、 $-O-S(=O)_2-CH_3$ 、 $-O-S(=O)_2-CH_2-C_6H_5$ 或 $-O-S(=O)_2-C_6H_4-CH_3$ ；

[0032] 以及其中 R_{13} 独立地为 $-C_{1-8}$ 烷基、 $-C_{1-8}$ 杂烷基、 $-$ 芳基、 $-$ 杂芳基、 $-C_{1-3}$ 烷基-芳基、 $-C_{1-3}$ 杂烷基-芳基、 $-C_{1-3}$ 烷基-杂芳基、 $-C_{1-3}$ 杂烷基-杂芳基、 $-$ 芳基- C_{1-3} 烷基、 $-$ 芳基- C_{1-3} 杂烷基、 $-$ 杂芳基- C_{1-3} 烷基、 $-$ 杂芳基- C_{1-3} 杂烷基、 $-C_{1-3}$ 烷基-芳基- C_{1-3} 烷基、 $-C_{1-3}$ 杂烷基-芳基- C_{1-3} 烷基、 $-C_{1-3}$ 烷基-杂芳基- C_{1-3} 杂烷基、 $-C_{1-3}$ 杂烷基-杂芳基- C_{1-3} 杂烷基、 $-C_{1-3}$ 烷基-杂芳基- C_{1-3} 杂烷基或 $-C_{1-3}$ 杂烷基-杂芳基- C_{1-3} 杂烷基。

[0033] 本发明另一目的在于提供了下式化合物及其所有盐和立体异构体（包括对映体和非对映体）：

[0034]



[0035] 其中 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 和 R_8 独立地选自 $-H$ 、 $-R_{10}$ 、 $-O-R_{10}$ 、 $-NO_2$ 、 $-NH_2$ 、 $-NH-R_{10}$ 、 $-N(R_{10})_2$ 、 $-F$ 、 $-Cl$ 、 $-Br$ 、 $-I$ 、 $-C(=O)-R_{10}$ 、 $-C(=O)-O-R_{10}$ 和 $-O-C(=O)-R_{10}$ ，

[0036] 其中 $-R_{10}$ 独立地为 H 、 $-C_{1-8}$ 烷基、 $-C_{1-8}$ 杂烷基、 $-芳基$ 、 $-杂芳基$ 、 $-C_{1-3}$ 烷基-芳基、 $-C_{1-3}$ 杂烷基-芳基、 $-C_{1-3}$ 烷基-杂芳基、 $-C_{1-3}$ 杂烷基-杂芳基、 $-芳基-C_{1-3}$ 烷基、 $-芳基-C_{1-3}$ 杂烷基、 $-杂芳基-C_{1-3}$ 烷基、 $-杂芳基-C_{1-3}$ 杂烷基、 $-C_{1-3}$ 烷基-芳基- C_{1-3} 烷基、 $-C_{1-3}$ 杂烷基-芳基- C_{1-3} 烷基、 $-C_{1-3}$ 烷基-杂芳基- C_{1-3} 烷基、 $-C_{1-3}$ 杂烷基-杂芳基- C_{1-3} 烷基、 $-C_{1-3}$ 烷基-芳基- C_{1-3} 杂烷基、 $-C_{1-3}$ 杂烷基-杂芳基- C_{1-3} 杂烷基、 $-C_{1-3}$ 烷基-杂芳基- C_{1-3} 杂烷基或 $-C_{1-3}$ 杂烷基-杂芳基- C_{1-3} 杂烷基；

[0037] R_{20} 为 $-H$ 或 $-CH_3$ ；和

[0038] R_{21} 为 $-R_{11}-W-X-E$ ，

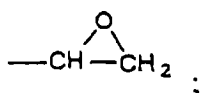
[0039] 其中 $-R_{11}-$ 独立地为 $-C_{1-8}$ 烷基-、 $-C_{1-8}$ 杂烷基-、 $-芳基-$ 、 $-杂芳基-$ 、 $-C_{1-3}$ 烷基-芳基-、 $-C_{1-3}$ 杂烷基-芳基-、 $-C_{1-3}$ 烷基-杂芳基-、 $-C_{1-3}$ 杂烷基-杂芳基-、 $-芳基-C_{1-3}$ 烷基-、 $-芳基-C_{1-3}$ 杂烷基-、 $-杂芳基-C_{1-3}$ 烷基-、 $-杂芳基-C_{1-3}$ 杂烷基-、 $-C_{1-3}$ 烷基-芳基- C_{1-3} 烷基-、 $-C_{1-3}$ 杂烷基-芳基- C_{1-3} 烷基-、 $-C_{1-3}$ 烷基-杂芳基- C_{1-3} 烷基-、 $-C_{1-3}$ 杂烷基-杂芳基- C_{1-3} 杂烷基-、 $-C_{1-3}$ 烷基-芳基- C_{1-3} 杂烷基-、 $-C_{1-3}$ 杂烷基-杂芳基- C_{1-3} 杂烷基-或 $-C_{1-3}$ 杂烷基-杂芳基- C_{1-3} 杂烷基-；

[0040] W 独立地为 $-C(=O)-O-$ 、 $-O-C(=O)-$ 、 $-C(=S)-O-$ 、 $-O-C(=S)-$ 、 $-C(=S)-S-$ 、 $-S-C(=S)-$ 、 $-C(=O)-S-$ 、 $-S-C(=O)-$ 、 $-O-S(=O)_2-O-$ 、 $-S(=O)_2-O-$ 、 $-O-S(=O)_2-$ 、 $-C(=O)-NR_{10}-$ 、 $-NR_{10}-C(=O)-$ 、 $-O-P(=O)(-OR_{10})-O-$ 、 $-P(=O)(-OR_{10})-O-$ 、 $-O-P(=O)(-OR_{10})-$ ；

[0041] X 独立地为 $-R_{11}-$ ；和

[0042] E 独立地选自 $-N(R_{12})_2$ 、 $-N(R_{12})(R_{13})$ 、 $-S-R_{12}$ 和

[0043]



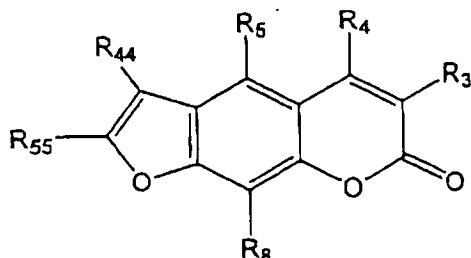
[0044] 其中 $-R_{12}$ 为 $-CH_2CH_2-G$ ，其中各个 G 独立地为 $-Cl$ 、 $-Br$ 、 $-I$ 、 $-O-S(=O)_2-CH_3$ 、 $-O-S(=O)_2-CH_2-C_6H_5$ 或 $-O-S(=O)_2-C_6H_4-CH_3$ ；

[0045] 以及其中 R_{13} 独立地为 $-C_{1-8}$ 烷基、 $-C_{1-8}$ 杂烷基、 $-芳基$ 、 $-杂芳基$ 、 $-C_{1-3}$ 烷基-芳基、 $-C_{1-3}$ 杂烷基-芳基、 $-C_{1-3}$ 烷基-杂芳基、 $-C_{1-3}$ 杂烷基-杂芳基、 $-芳基-C_{1-3}$ 烷基、 $-芳基-C_{1-3}$ 杂烷基、 $-杂芳基-C_{1-3}$ 烷基、 $-杂芳基-C_{1-3}$ 杂烷基、 $-C_{1-3}$ 烷基-芳基- C_{1-3} 烷基、 $-C_{1-3}$

杂烷基-芳基-C₁₋₃烷基、-C₁₋₃烷基-杂芳基-C₁₋₃烷基、-C₁₋₃烷基-芳基-C₁₋₃杂烷基、-C₁₋₃杂烷基-杂芳基-C₁₋₃烷基、-C₁₋₃杂烷基-芳基-C₁₋₃杂烷基、-C₁₋₃烷基-杂芳基-C₁₋₃杂烷基或-C₁₋₃杂烷基-杂芳基-C₁₋₃杂烷基。

[0046] 本发明另一目的在于提供了下式化合物及其所有盐和立体异构体(包括对映体和非对映体):

[0047]



[0048] 其中至少 R₄₄、R₅₅、R₃、R₄、R₅ 和 R₈ 之一为 -V-W-X-E, 其余 R₄₄、R₅₅、R₃、R₄、R₅ 和 R₈ 独立地选自 -H、-R₁₀、-O-R₁₀、-NO₂、-NH₂、-NH-R₁₀、-N(R₁₀)₂、-F、-Cl、-Br、-I、-C(=O)-R₁₀、-C(=O)-O-R₁₀ 和 -O-C(=O)-R₁₀,

[0049] 其中 -R₁₀ 独立地为 H、-C₁₋₈烷基、-C₁₋₈杂烷基、-芳基、-杂芳基、-C₁₋₃烷基-芳基、-C₁₋₃杂烷基-芳基、-C₁₋₃烷基-杂芳基、-C₁₋₃杂烷基-杂芳基、-芳基-C₁₋₃烷基、-芳基-C₁₋₃杂烷基、-杂芳基-C₁₋₃烷基、-杂芳基-C₁₋₃杂烷基、-C₁₋₃烷基-芳基-C₁₋₃烷基、-C₁₋₃烷基-芳基-C₁₋₃杂烷基、-C₁₋₃杂烷基-杂芳基-C₁₋₃烷基、-C₁₋₃杂烷基-芳基-C₁₋₃杂烷基、-C₁₋₃烷基-杂芳基-C₁₋₃杂烷基或-C₁₋₃杂烷基-杂芳基-C₁₋₃杂烷基;

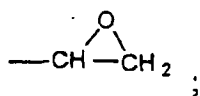
[0050] V 独立地为 -R₁₁-、-NH-R₁₁- 或 -N(CH₃)-R₁₁-, 其中 -R₁₁- 独立地为 -C₁₋₈烷基-、-C₁₋₈杂烷基-、-芳基-、-杂芳基-、-C₁₋₃烷基-芳基-、-C₁₋₃杂烷基-芳基-、-C₁₋₃烷基-杂芳基-、-C₁₋₃杂烷基-杂芳基-、-芳基-C₁₋₃烷基-、-芳基-C₁₋₃杂烷基-、-杂芳基-C₁₋₃烷基-、-杂芳基-C₁₋₃杂烷基-、-C₁₋₃烷基-芳基-C₁₋₃烷基-、-C₁₋₃烷基-芳基-C₁₋₃杂烷基-、-C₁₋₃杂烷基-杂芳基-C₁₋₃烷基-、-C₁₋₃杂烷基-芳基-C₁₋₃杂烷基-、-C₁₋₃烷基-杂芳基-C₁₋₃杂烷基-或-C₁₋₃杂烷基-杂芳基-C₁₋₃杂烷基-;

[0051] W 独立地为 -C(=O)-O-、-O-C(=O)-、-C(=S)-O-、-O-C(=S)-、-C(=S)-S-、-S-C(=S)-、-C(=O)-S-、-S-C(=O)-、-O-S(=O)₂-O-、-S(=O)₂-O-、-O-S(=O)₂-、-C(=O)-NR₁₀-、-NR₁₀-C(=O)-、-O-P(=O)(-OR₁₀)-O-、-P(=O)(-OR₁₀)-O-、-O-P(=O)(-OR₁₀)-;

[0052] X 独立地为 -R₁₁-; 和

[0053] E 独立地选自 -N(R₁₂)₂、-N(R₁₂)(R₁₃)、-S-R₁₂ 和

[0054]



[0055] 其中 -R₁₂ 为 -CH₂CH₂-G, 其中 G 独立地为 -Cl、-Br、-I、-O-S(=O)₂-CH₃、-O-S(=O)₂-CH₂-C₆H₅ 或 -O-S(=O)₂-C₆H₄-CH₃;

[0056] 以及其中 R_{13} 独立地为 $-C_{1-8}$ 烷基、 $-C_{1-8}$ 杂烷基、-芳基、-杂芳基、 $-C_{1-3}$ 烷基-芳基、 $-C_{1-3}$ 杂烷基-芳基、 $-C_{1-3}$ 烷基-杂芳基、 $-C_{1-3}$ 杂烷基-杂芳基、-芳基- $-C_{1-3}$ 烷基、-芳基- $-C_{1-3}$ 杂烷基、-杂芳基- $-C_{1-3}$ 烷基、-杂芳基- $-C_{1-3}$ 杂烷基、 $-C_{1-3}$ 烷基-芳基- $-C_{1-3}$ 烷基、 $-C_{1-3}$ 杂烷基-芳基- $-C_{1-3}$ 烷基、 $-C_{1-3}$ 烷基-杂芳基- $-C_{1-3}$ 烷基、 $-C_{1-3}$ 烷基-芳基- $-C_{1-3}$ 杂烷基、 $-C_{1-3}$ 杂烷基-杂芳基- $-C_{1-3}$ 烷基、 $-C_{1-3}$ 杂烷基-芳基- $-C_{1-3}$ 杂烷基、 $-C_{1-3}$ 烷基-杂芳基- $-C_{1-3}$ 杂烷基或 $-C_{1-3}$ 杂烷基-杂芳基- $-C_{1-3}$ 杂烷基。

[0057] 本发明再一目的在于提供化合物 β -丙氨酸, N-(2-甲氧甲酰吡啶-9-基), 2-[双(2-氯乙基)氨基]乙基酯; 4-氨基丁酸 N-(2-甲氧甲酰吡啶-9-基), 2-[双(2-氯乙基)氨基]乙基酯; 5-氨基戊酸 N-[(2-甲氧甲酰吡啶-9-基), 2-[双(2-氯乙基)氨基]乙基酯; β -丙氨酸, N-(2-甲氧甲酰吡啶-9-基), 3-[双(2-氯乙基)氨基]丙基酯; β -丙氨酸, [N, N-双(2-氯乙基)], 3-[(6-氯-2-甲氧基吡啶-9-基)氨基]丙基酯; β -丙氨酸, [N, N-双(2-氯乙基)], 2-[(6-氯-2-甲氧基吡啶-9-基)氨基]乙基酯; [N, N-双(2-氯乙基)]-2-氨基乙基 4,5', 8-三甲基-4'-补骨脂素乙酸酯; 以及 β -丙氨酸, N-(吡啶-9-基), 2-[双(2-氯乙基)氨基]乙基酯及其所有的盐。

[0058] 本发明提供了灭活材料(如生物材料)中病原体的方法, 该方法包括向所述材料中加入一种或多种本发明化合物, 然后孵育该材料。该化合物可加入到材料中形成化合物浓度(如果使用多种化合物, 则为所有化合物的总浓度)为如 1 至 500 μ M 的最终溶液。可被处理的生物材料包括由人或其它哺乳动物或脊椎动物产生的血液、血液制品、血浆、血小板制剂、红细胞、压紧(packed)红细胞、血清、脑脊髓液、唾液、尿、汗水、粪便、精液、乳汁、组织样品和均化组织样品。

[0059] 完成发明的最佳方案

[0060] 本发明提供了用于灭活存在于材料中的病原体的化合物, 特别是用于灭活存在于生物材料中的病原体的化合物, 所述生物材料包括血液或其它体液。本发明也提供了利用这类化合物灭活材料中病原体的方法。本发明还提供了灭活存在于生物用途材料中或存在于生物用途材料表面上的病原体的方法。该化合物可用于体外和离体。所述生物材料或用于生物用途的材料可用于体外、体内或离体。

[0061] 化合物可通过与核酸反应而灭活病原体。在水溶液中, 于适当 pH 值下, 当化合物与核酸结合并与核酸反应时, 所述化合物具有一段时期的活性。在这段时期之后, 化合物分解成不再能与核酸结合或与核酸反应的产物。

[0062] 化合物的化学结构可广义地描述成固定子(锚, anchor), 与脆性连接基共价相连, 该固定子与效应子通过共价键相连。“固定子”被定义成与核酸生物聚合物(DNA 或 RNA)共价结合的部分。“效应子”被定义成通过形成与核酸共价结合的机理与核酸反应的部分。“脆性连接基”被定义成用于共价连接固定子和效应子的部分, 该部分能够在一定条件下降解, 从而使得固定子与效应子不再共价连接。固定子-脆性连接基-效应子的排列使得化合物能够与核酸进行特殊结合(由于固定子的结合能力)。这就使效应子接近核酸, 与核酸反应。

[0063] 化合物可用于灭活存在于材料中的病原体, 特别是存在于生物材料如血液和其它体液中的病原体。细胞内和细胞外以及其它病原体材料均可被灭活。例如, 当本发明化合物在生理 pH 下与含病原体的红细胞组合物结合时, 化合物的效应子部分就会与病原体核

酸反应。不与核酸反应的效应子部分渐渐地被溶剂水解。脆性连接基的水解与效应子-核酸反应及效应子水解同时发生。因此需要脆性连接基以足够低的速度分解,从而使材料中的病原体灭活;也就是说,脆性连接基的分解速度低于化合物与核酸的反应速度。在足够长的时间过去之后,化合物分解成固定子(所述固定子仍可带有脆性连接基的片段)和效应子-核酸分解产物(其中脆性连接基的片段也可能仍然与效应子相连),或者是分解成固定子(所述固定子仍可带有脆性连接基的片段)和水解的效应子分解产物(其中脆性连接基的片段也可能仍然与效应子相连)。脆性连接基的另外片段也可能在化合物降解时产生,其不再与固定子或效应子相连。本发明化合物的具体实施方案决定了固定子分解产物或效应子分解产物是否带有脆性连接基片段,或是否能够产生另外的脆性连接基片段,所述片段不再与固定子或效应子分解产物结合。

[0064] 本发明的优选实施方案包括化合物,该化合物在脆性连接基裂解时得到具有低诱变性的分解产物。在效应子水解之后,化合物的诱变性主要取决于固定子部分,即使效应子部分已经水解,固定子也能与核酸进行相互反应且具有干扰核酸复制的能力。优选地,在脆性连接基裂解之后,固定子片段已基本上降低了诱变性。

[0065] 定义

[0066] “病原体”是指能够在人、其它哺乳动物或脊椎动物中导致疾病的任何含核酸剂。实例包括微生物,如单细胞或多细胞微生物。病原体的实例为能够在人、其它哺乳动物或脊椎动物中导致疾病的细菌、病毒、原生动物门、真菌、酵母菌、霉菌和支原菌属。病原体的基因物质可以是DNA或RNA,基因物质可以单链或双链核酸形式存在。病原体的核酸可存在于溶液、细胞内、细胞外中或与细胞结合。表I罗列了一些病毒,但不以任何方式限制本发明范围。

[0067] 表 I

[0068]

科名:	病毒:
腺病毒	腺病毒 2
	犬肝炎病毒
沙粒病毒	Pichinde
	拉沙病毒
本雅病毒	Turlock
	加利福尼亚脑炎病毒
疱疹病毒	单纯疱疹病毒 1
	单纯疱疹病毒 2
	巨细胞病毒
	假狂犬病病毒
Orothomyxo	流感病毒
乳多空病毒	SV-40 病毒
副粘病毒	麻疹病毒
	流行性腮腺炎病毒
	副流感病毒 2 和 3
细小核糖核酸病毒	脊髓灰质炎病毒 1 和 2
	柯萨奇病毒 A-9
	艾可病毒 11

[0069]

痘病毒	牛痘病毒
	禽痘病毒
呼肠孤病毒	
	蓝舌病病毒
	科洛拉多蜱传热病毒
反转录病毒	HIV(艾滋病病毒)
	鸟肉瘤病毒
	鼠肉瘤病毒
	鼠白血病病毒
弹状病毒	水泡性口炎病毒
披膜病毒	西方马脑炎病毒
	登革热病毒 2
	登革热病毒 4
	圣路易脑炎病毒
嗜肝 DNA 病毒	乙型肝炎病毒
噬菌体	λ
	T2
(立克次氏体)	R. akari (立克次氏体痘)

[0070] 材料或化合物的“体内”应用是指将材料或化合物引入到人、哺乳动物或脊椎动物的活体中。

[0071] 材料或化合物的“体外”应用是指在人、哺乳动物或脊椎动物的体外使用材料或化合物,其中不论是材料或化合物均不能再引入到人、哺乳动物或脊椎动物的活体中去。体外应用的实例为利用实验室设备对血样成分进行分析。

[0072] 化合物的“离体”应用是指将化合物用于在人、哺乳动物或脊椎动物的活体外部处理生物材料,其中处理过的生物材料打算用于人、哺乳动物或脊椎动物的活体内部。例如,从人体取出血液,向该血液中引入化合物,从而灭活病原体,如果打算将此血液再引入到该人或另一人体内,则可认为是该化合物的离体应用。相对于化合物的离体应用,将人的血液再引入到该人或另一人中去应当是血液的体内应用。如果当将血液再引入到人体时化合物仍然存在于血液中,那么该化合物除了离体应用之外,也引入到了体内。

[0073] “生物材料”是指来自于任何类型的生物有机体的材料。生物材料的实例包括但不限于:血液;血液制品,如血浆、血小板制剂、红细胞、压紧红细胞和血清;脑脊髓液;唾液;尿;粪便;精液;汗水、乳汁;组织样品;均化组织样品及其它任何源于生物有机体的物质。生物材料也可包括掺有源于生物有机体的物质的合成材料,如包含明矾和病原体(在这种情况下,病原体为源于生物有机体的物质)的疫苗制剂;分析用样品制剂,该样品制剂为血液和分析试剂的混合物;细胞培养基;细胞培养物;病毒培养物及其它由有机体活体产生的培养物。

[0074] “生物应用材料”是指与人、哺乳动物或脊椎动物的活体接触或加入到人、哺乳动物或脊椎动物的活体中去的任何材料,其中所述接触带有传染疾病或病原体的危险。这种材料包括但不限于:医疗植入物,如起搏器和人工关节;为持续释放药物设计的植入物;针、静脉线等;牙科器械;牙科用材料,如牙冠;导管;以及其它在与、哺乳动物或脊椎动物的活体接触或引入到人、哺乳动物或脊椎动物的活体中去存在传染疾病或病原体危险的任何材料。

[0075] “灭活病原体”是指使病原体在材料中不能复制。灭活被表达成能够复制的剩余病

原体部分的负对数。由此,如果某一浓度的化合物使得材料中 99% 的病原体不能复制,那么只有 1% (0.01) 的病原体能够复制。0.01 的负对数为 2,该化合物的浓度被认为以 $2\log s$ 灭活了病原体,换句话说,该化合物在该浓度时具有 $2\log s$ 杀伤。

[0076] 这里使用的“烷基”是指含有碳和氢的环链、支链或直链化学基团,如甲基、戊基和金刚烷基。烷基可以是未取代或由一个或多个取代基取代,所述取代基如卤素、烷氧基、酰氧基、氨基、羟基、巯基、羧基、苄氧基、苯基、苄基或其它官能团。烷基可以是饱和的或在一个或几个位置为不饱和(如含有 $-C-C-$ 或 $-C \equiv C-$ 亚单元)。典型地,除非另外指明,烷基可包含 1 至 12 个碳原子,优选 1 至 10 个碳原子,更优选 1 至 8 个碳原子。

[0077] 这里使用“杂烷基”是指链中掺有一个或多个 N、O、S 或 P 杂原子的烷基链。杂原子上可不带取代基或带有一个或多个上述取代基。“杂原子”也可包括杂原子 N、S 和 P 的氧化形式。杂烷基的实例包括(但不局限于):甲氧基、乙氧基和其它烷氧基基团;含醚基团;含酰胺基团,如多肽链;环系,如哌啶基、内酰胺和内酯;以及其它在碳链中掺有杂原子的基团。典型地,除非另外指明,除了杂原子之外,杂烷基基团将包含 1 至 12 个碳原子,优选 1 至 10 个碳原子,更优选 1 至 8 个碳原子。

[0078] “芳基”或“Ar”是指具有一个环(如苯基)或多个稠合环(如萘基或蒽基)的不饱和芳族碳环基团,该基团可任意地为未取代或由氨基、羟基、 C_{1-8} 烷基、烷氧基、卤素、巯基和其它取代基取代。

[0079] “杂芳基”基团是指具有一个环(如吡啶基或呋喃基)或多个稠合环(如吡啶基、吲哚基或苯并噻吩基)且在至少一个环中带有至少一个杂原子(如 N、O 或 S)的不饱和芳族碳环基团,该环可任意地为未取代或由氨基、羟基、烷基、烷氧基、卤素、巯基、酰氧基、羧基、苄氧基、苯基、苄基和其它取代基取代。

[0080] 缩略语

[0081] 本发明使用了下列缩略语:QM(奎纳克林氮芥);Hct(血细胞比容);RBC(血红细胞);LB(Luria 培养基);cfu(菌落形成单位);pfu(蚀斑形成单位);DMEM(Delbecco' s 改进的 eagles 培养基);FBS(胎牛血清);PRBC(压紧血红细胞);rpm(每分钟转数);TC(组织培养物);NHSP(正常人血清库);NCS(新生小牛血清);PBS(磷酸盐缓冲盐水)。

[0082] 化合物的化学结构

[0083] 可用作固定子、连接基和效应子的基团有许多种。可用于化合物的固定子基团实例包括但不限于:嵌入剂;小沟粘合剂;大沟粘合剂;通过静电作用结合的分子,如聚酰胺;以及通过特定的序列作用结合的分子。下列基团是一些可能的固定子基团非限定性实例:

[0084] 吡啶(及吡啶衍生物,如硫酸原黄素、吡啶黄素、二吡啶、吡啶酮、苯并吡啶、奎纳克林)、放线菌素、anthracyclines、紫红霉素、柔毛霉素、噻吨酮(及噻吨酮衍生物,如米来西 D)、安曲霉素、丝裂霉素、棘霉素(醌霉素 A)、三骨菌素、椭圆玫瑰树碱(及其二聚物、三聚物和类似物)、norphilin A、茛类(及其衍生物,如茛酮、茛二胺)、吩嗪、菲啶、吩噻嗪(如氯丙嗪)、吩噻嗪、苯并噻唑、吡啶和噻吨、蒽醌、蒽吡啶、苯并噻喃吡啶、3,4- 苯并茛、1- 茛基环氧乙烷、苯并蒽、苯并安乃近、喹啉类(如氯喹、奎宁、苯基喹啉、甲酰胺)、呋喃骈香豆精(如补骨脂素和异补骨脂素)、乙锭、丙锭、甲氧黴因(coraline)和多环芳烃及其环氧乙烷衍生物;

[0085] 偏端霉素、纺锤菌素、其它 lexitropsins、烟酸己可碱 (Hoechst) 33258 及其它烟酸己可碱染料、DAPI (4', 6-二脒基-2-苯基咪唑)、重氮氨苯脒乙酰甘氨酸盐和三芳基甲烷染料；

[0086] 黄曲霉毒素；

[0087] 精胺、亚精胺及其它聚酰胺；以及

[0088] 通过序列特殊作用结合的核酸或类似物，如三股螺旋形成、D-环路形成和与单链靶成对的直接碱基 (direct base)。这些化合物的衍生物也是固定子基团的非限定性实例，其中化合物的衍生物包括但不局限于：在任何位置带有一个或多个任何类型的取代基的化合物、化合物的氧化或还原产物等。

[0089] 可用于本发明的连接基的实例包括但不局限于包含下述官能团的化合物：酯（其中酯的羰基碳位于固定子与酯的 sp^3 氧之间，这种排列也被称为“正向酯”）、“反向酯”（其中酯的 sp^3 氧位于固定子与酯的羰基碳之间）、硫代酸酯（其中硫代酸酯的羰基碳位于固定子与硫代酸酯的硫之间，也被称为“正向硫代酸酯”）、反向硫代酸酯（其中硫代酸酯的硫位于固定子与硫代酸酯的羰基碳之间，也被称为“反向硫代酸酯”）、正向和反向硫羧酸酯、正向和反向二硫代酸、硫酸根、正向和反向磺酸根、磷酸根和正向和反向膦酸根。“硫代酸酯”是指 $-C(=O)-S-$ 基团；“硫羧酸酯”是指 $-C(=S)-O-$ 基团，而“二硫代酸”是指 $-C(=S)-S-$ 基团。脆性连接基也可包括酰胺，其中酰胺的羰基碳位于固定子与酰胺的氮之间（也称为“正向酰胺”），或者其中的酰胺的氮位于固定子与酰胺的羰基碳之间（也称为“反向酰胺”）。对于可被指定为“正向”和“反向”的基团，正向取向是指下述官能团的取向：其中当官能团水解之后，所得酸性官能团与固定子部分共价相连，所得醇或硫醇官能团与效应子部分共价相连。反向取向是指下述官能团的取向：其中当官能团水解之后，所得酸性官能团与效应子部分共价相连，所得醇或硫醇官能团与固定子部分共价相连。

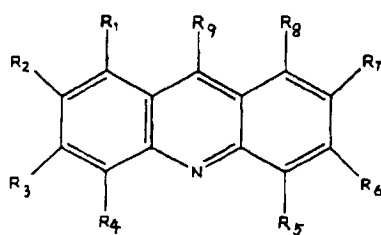
[0090] 脆性连接基（如酰胺部分）也能够酶降解条件下，通过所处理的生物材料中的内源酶或通过向材料中加入的酶而降解。

[0091] 可用于本发明的效应子实例包括但不局限于：氮芥基团、氮芥基团等同物、环氧化物、醛类、甲醛合成元及其它烷基化剂或交联剂。氮芥基团被定义成包括单或双卤代乙胺基团和单卤代乙基硫化物基团。氮芥基团等同物被定义成通过与氮芥类似的机理反应的基团（也就是，通过形成吡丙啶鎓盐中间体，或通过带有或形成氮丙啶环，所述氮芥基团等同物能够与亲核试剂反应），如单或双甲磺酰基乙胺基团、单甲磺酰基乙基硫化物基团、单或双甲苯磺酰基乙胺基团和单甲苯磺酰基乙基硫化物基团。甲醛合成元被定义成能够在水溶液中分解成甲醛的任何化合物，包括羟甲胺，如羟甲基甘氨酸。甲醛合成元的实例可参见美国专利 4,337,269 和国际专利申请 WO 97/02028。尽管本发明不限于任何特定机理，但是形成或能够形成亲电性基团（如氮芥基团）的效应子基团被认为能够与核酸反应或形成与核酸的共价键。

[0092] 下列通式 I、II 和 III 描述了本发明化合物的三个实施方案。

[0093] 通式 I 化合物及其所有盐和立体异构体（包括对映体和非对映体）：

[0094]



(I)

[0095] 其中至少 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 和 R_9 之一为下文定义的 $-V-W-X-E$, 其余 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 和 R_9 独立地选自 $-H$ 、 $-R_{10}$ 、 $-O-R_{10}$ 、 $-NO_2$ 、 $-NH_2$ 、 $-NH-R_{10}$ 、 $-N(R_{10})_2$ 、 $-F$ 、 $-Cl$ 、 $-Br$ 、 $-I$ 、 $-C(=O)-R_{10}$ 、 $-C(=O)-O-R_{10}$ 和 $-O-C(=O)-R_{10}$,

[0096] 其中 $-R_{10}$ 独立地为 H 、 $-C_{1-8}$ 烷基、 $-C_{1-8}$ 杂烷基、 $-$ 芳基、 $-$ 杂芳基、 $-C_{1-3}$ 烷基-芳基、 $-C_{1-3}$ 杂烷基-芳基、 $-C_{1-3}$ 烷基-杂芳基、 $-C_{1-3}$ 杂烷基-杂芳基、 $-$ 芳基- C_{1-3} 烷基、 $-$ 芳基- C_{1-3} 杂烷基、 $-$ 杂芳基- C_{1-3} 烷基、 $-$ 杂芳基- C_{1-3} 杂烷基、 $-C_{1-3}$ 烷基-芳基- C_{1-3} 烷基、 $-C_{1-3}$ 杂烷基-芳基- C_{1-3} 烷基、 $-C_{1-3}$ 烷基-杂芳基- C_{1-3} 烷基、 $-C_{1-3}$ 杂烷基-杂芳基- C_{1-3} 烷基、 $-C_{1-3}$ 烷基-芳基- C_{1-3} 杂烷基、 $-C_{1-3}$ 杂烷基-杂芳基- C_{1-3} 杂烷基、 $-C_{1-3}$ 烷基-杂芳基- C_{1-3} 杂烷基或 $-C_{1-3}$ 杂烷基-杂芳基- C_{1-3} 杂烷基;

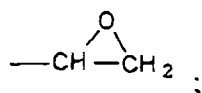
[0097] V 独立地为 $-R_{11}-$ 、 $-NH-R_{11}-$ 或 $-N(CH_3)-R_{11}-$, 其中 $-R_{11}-$ 独立地为 $-C_{1-8}$ 烷基-、 $-C_{1-8}$ 杂烷基-、 $-$ 芳基-、 $-$ 杂芳基-、 $-C_{1-3}$ 烷基-芳基-、 $-C_{1-3}$ 杂烷基-芳基-、 $-C_{1-3}$ 烷基-杂芳基-、 $-C_{1-3}$ 杂烷基-杂芳基-、 $-$ 芳基- C_{1-3} 烷基-、 $-$ 芳基- C_{1-3} 杂烷基-、 $-$ 杂芳基- C_{1-3} 烷基-、 $-$ 杂芳基- C_{1-3} 杂烷基-、 $-C_{1-3}$ 烷基-芳基- C_{1-3} 烷基-、 $-C_{1-3}$ 杂烷基-芳基- C_{1-3} 烷基-、 $-C_{1-3}$ 烷基-杂芳基- C_{1-3} 烷基-、 $-C_{1-3}$ 杂烷基-杂芳基- C_{1-3} 杂烷基-或 $-C_{1-3}$ 杂烷基-杂芳基- C_{1-3} 杂烷基-;

[0098] W 独立地为 $-C(=O)-O-$ 、 $-O-C(=O)-$ 、 $-C(=S)-O-$ 、 $-O-C(=S)-$ 、 $-C(=S)-S-$ 、 $-S-C(=S)-$ 、 $-C(=O)-S-$ 、 $-S-C(=O)-$ 、 $-O-S(=O)_2-O-$ 、 $-S(=O)_2-O-$ 、 $-O-S(=O)_2-$ 、 $-C(=O)-NR_{10}-$ 、 $-NR_{10}-C(=O)-$ 、 $-O-P(=O)(-OR_{10})-O-$ 、 $-P(=O)(-OR_{10})-O-$ 、 $-O-P(=O)(-OR_{10})-$;

[0099] X 独立地为 $-R_{11}-$ 和

[0100] E 独立地选自 $-N(R_{12})_2$ 、 $-N(R_{12})(R_{13})$ 、 $-S-R_{12}$ 和

[0101]

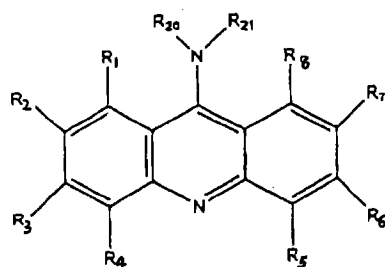


[0102] 其中 $-R_{12}$ 为 $-CH_2CH_2-G$, 其中每个 G 独立地为 $-Cl$ 、 $-Br$ 、 $-I$ 、 $-O-S(=O)_2-CH_3$ 、 $-O-S(=O)_2-CH_2-C_6H_5$ 或 $-O-S(=O)_2-C_6H_4-CH_3$;

[0103] 以及其中 R_{13} 独立地为 $-C_{1-8}$ 烷基、 $-C_{1-8}$ 杂烷基、 $-$ 芳基、 $-$ 杂芳基、 $-C_{1-3}$ 烷基-芳基、 $-C_{1-3}$ 杂烷基-芳基、 $-C_{1-3}$ 烷基-杂芳基、 $-C_{1-3}$ 杂烷基-杂芳基、 $-$ 芳基- C_{1-3} 烷基、 $-$ 芳基- C_{1-3} 杂烷基、 $-$ 杂芳基- C_{1-3} 烷基、 $-$ 杂芳基- C_{1-3} 杂烷基、 $-C_{1-3}$ 烷基-芳基- C_{1-3} 烷基、 $-C_{1-3}$ 杂烷基-芳基- C_{1-3} 烷基、 $-C_{1-3}$ 烷基-杂芳基- C_{1-3} 烷基、 $-C_{1-3}$ 杂烷基-杂芳基- C_{1-3} 杂烷基、 $-C_{1-3}$ 烷基-杂芳基- C_{1-3} 杂烷基或 $-C_{1-3}$ 杂烷基-杂芳基- C_{1-3} 杂烷基。

[0104] 通式 II 化合物及其所有盐和立体异构体 (包括对映体和非对映体):

[0105]



(II)

[0106] 其中 $R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_7$ 和 R_8 独立地选自 $-H, -R_{10}, -O-R_{10}, -NO_2, -NH_2, -NH-R_{10}, -N(R_{10})_2, -F, -Cl, -Br, -I, -C(=O)-R_{10}, -C(=O)-O-R_{10}$ 和 $-O-C(=O)-R_{10}$,

[0107] 其中 $-R_{10}$ 独立地为 $H, -C_{1-8}$ 烷基、 $-C_{1-8}$ 杂烷基、-芳基、-杂芳基、 $-C_{1-3}$ 烷基-芳基、 $-C_{1-3}$ 杂烷基-芳基、 $-C_{1-3}$ 烷基-杂芳基、 $-C_{1-3}$ 杂烷基-杂芳基、-芳基- $-C_{1-3}$ 烷基、-芳基- $-C_{1-3}$ 杂烷基、-杂芳基- $-C_{1-3}$ 烷基、-杂芳基- $-C_{1-3}$ 杂烷基、 $-C_{1-3}$ 烷基-芳基- $-C_{1-3}$ 烷基、 $-C_{1-3}$ 烷基-芳基- $-C_{1-3}$ 杂烷基、 $-C_{1-3}$ 杂烷基-杂芳基- $-C_{1-3}$ 烷基、 $-C_{1-3}$ 杂烷基-芳基- $-C_{1-3}$ 杂烷基、 $-C_{1-3}$ 烷基-杂芳基- $-C_{1-3}$ 杂烷基或 $-C_{1-3}$ 杂烷基-杂芳基- $-C_{1-3}$ 杂烷基;

[0108] R_{20} 为 $-H$ 或 $-CH_3$; 和

[0109] R_{21} 为 $-R_{11}-W-X-E$,

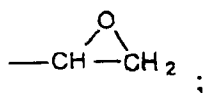
[0110] 其中 $-R_{11}$ 独立地为 $-C_{1-8}$ 烷基-、 $-C_{1-8}$ 杂烷基-、-芳基-、-杂芳基-、 $-C_{1-3}$ 烷基-芳基-、 $-C_{1-3}$ 杂烷基-芳基-、 $-C_{1-3}$ 烷基-杂芳基-、 $-C_{1-3}$ 杂烷基-杂芳基-、-芳基- $-C_{1-3}$ 烷基-、-芳基- $-C_{1-3}$ 杂烷基-、-杂芳基- $-C_{1-3}$ 烷基-、-杂芳基- $-C_{1-3}$ 杂烷基-、 $-C_{1-3}$ 烷基-芳基- $-C_{1-3}$ 烷基-、 $-C_{1-3}$ 烷基-芳基- $-C_{1-3}$ 杂烷基-、 $-C_{1-3}$ 杂烷基-杂芳基- $-C_{1-3}$ 烷基-、 $-C_{1-3}$ 杂烷基-芳基- $-C_{1-3}$ 杂烷基-、 $-C_{1-3}$ 烷基-杂芳基- $-C_{1-3}$ 杂烷基-或 $-C_{1-3}$ 杂烷基-杂芳基- $-C_{1-3}$ 杂烷基-;

[0111] W 独立地为 $-C(=O)-O-$ 、 $-O-C(=O)-$ 、 $-C(=S)-O-$ 、 $-O-C(=S)-$ 、 $-C(=S)-S-$ 、 $-S-C(=S)-$ 、 $-C(=O)-S-$ 、 $-S-C(=O)-$ 、 $-O-S(=O)_2-O-$ 、 $-S(=O)_2-O-$ 、 $-O-S(=O)_2-$ 、 $-C(=O)-NR_{10}-$ 、 $-NR_{10}-C(=O)-$ 、 $-O-P(=O)(-OR_{10})-O-$ 、 $-P(=O)(-OR_{10})-O-$ 、 $-O-P(=O)(-OR_{10})-$;

[0112] X 独立地为 $-R_{11}-$; 和

[0113] E 独立地选自 $-N(R_{12})_2$ 、 $-N(R_{12})(R_{13})$ 、 $-S-R_{12}$ 和

[0114]



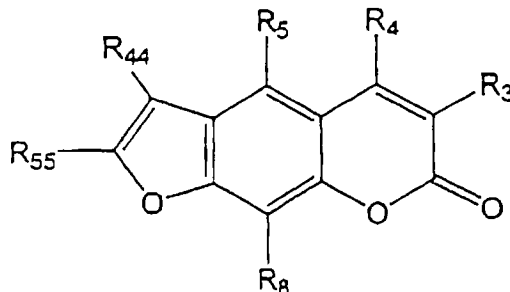
[0115] 其中 $-R_{12}$ 为 $-CH_2CH_2-G$, 其中各个 G 独立地为 $-Cl, -Br, -I, -O-S(=O)_2-CH_3, -O-S(=O)_2-CH_2-C_6H_5$ 或 $-O-S(=O)_2-C_6H_4-CH_3$;

[0116] 以及其中 R_{13} 独立地为 $-C_{1-8}$ 烷基、 $-C_{1-8}$ 杂烷基、-芳基、-杂芳基、 $-C_{1-3}$ 烷基-芳基、 $-C_{1-3}$ 杂烷基-芳基、 $-C_{1-3}$ 烷基-杂芳基、 $-C_{1-3}$ 杂烷基-杂芳基、-芳基- $-C_{1-3}$ 烷基、-芳基- $-C_{1-3}$ 杂烷基、-杂芳基- $-C_{1-3}$ 烷基、-杂芳基- $-C_{1-3}$ 杂烷基、 $-C_{1-3}$ 烷基-芳基- $-C_{1-3}$ 烷基、 $-C_{1-3}$ 烷基-芳基- $-C_{1-3}$ 杂烷基、 $-C_{1-3}$ 杂烷基-杂芳基- $-C_{1-3}$ 烷基、 $-C_{1-3}$ 杂烷基-芳基- $-C_{1-3}$ 杂烷基、 $-C_{1-3}$ 烷基-杂芳基- $-C_{1-3}$ 杂烷基或 $-C_{1-3}$ 杂烷基-杂芳基- $-C_{1-3}$ 杂烷基;

杂烷基-芳基-C₁₋₃烷基、-C₁₋₃烷基-杂芳基-C₁₋₃烷基、-C₁₋₃烷基-芳基-C₁₋₃杂烷基、-C₁₋₃杂烷基-杂芳基-C₁₋₃烷基、-C₁₋₃杂烷基-芳基-C₁₋₃杂烷基、-C₁₋₃烷基-杂芳基-C₁₋₃杂烷基或-C₁₋₃杂烷基-杂芳基-C₁₋₃杂烷基。

[0117] 通式 III 化合物及其所有盐和立体异构体(包括对映体和非对映体):

[0118]



(III)

[0119] 其中至少 R₄₄、R₅₅、R₃、R₄、R₅ 和 R₈ 之一为 -V-W-X-E, 其余 R₄₄、R₅₅、R₃、R₄、R₅ 和 R₈ 独立地选自 -H、-R₁₀、-O-R₁₀、-NO₂、-NH₂、-NH-R₁₀、-N(R₁₀)₂、-F、-Cl、-Br、-I、-C(=O)-R₁₀、-C(=O)-O-R₁₀ 和 -O-C(=O)-R₁₀,

[0120] 其中 -R₁₀ 独立地为 H、-C₁₋₈烷基、-C₁₋₈杂烷基、-芳基、-杂芳基、-C₁₋₃烷基-芳基、-C₁₋₃杂烷基-芳基、-C₁₋₃烷基-杂芳基、-C₁₋₃杂烷基-杂芳基、-芳基-C₁₋₃烷基、-芳基-C₁₋₃杂烷基、-杂芳基-C₁₋₃烷基、-杂芳基-C₁₋₃杂烷基、-C₁₋₃烷基-芳基-C₁₋₃烷基、-C₁₋₃杂烷基-芳基-C₁₋₃烷基、-C₁₋₃烷基-芳基-C₁₋₃杂烷基、-C₁₋₃杂烷基-杂芳基-C₁₋₃烷基、-C₁₋₃杂烷基-芳基-C₁₋₃杂烷基、-C₁₋₃烷基-杂芳基-C₁₋₃杂烷基或-C₁₋₃杂烷基-杂芳基-C₁₋₃杂烷基;

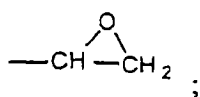
[0121] V 独立地为 -R₁₁-、-NH-R₁₁- 或 -N(CH₃)-R₁₁-, 其中 -R₁₁- 独立地为 -C₁₋₈烷基-、-C₁₋₈杂烷基-、-芳基-、-杂芳基-、-C₁₋₃烷基-芳基-、-C₁₋₃杂烷基-芳基-、-C₁₋₃烷基-杂芳基-、-C₁₋₃杂烷基-杂芳基-、-芳基-C₁₋₃烷基-、-芳基-C₁₋₃杂烷基-、-杂芳基-C₁₋₃烷基-、-杂芳基-C₁₋₃杂烷基-、-C₁₋₃烷基-芳基-C₁₋₃烷基-、-C₁₋₃杂烷基-芳基-C₁₋₃烷基-、-C₁₋₃烷基-杂芳基-C₁₋₃烷基-、-C₁₋₃杂烷基-杂芳基-C₁₋₃烷基-或-C₁₋₃杂烷基-杂芳基-C₁₋₃杂烷基-;

[0122] W 独立地为 -C(=O)-O-、-O-C(=O)-、-C(=S)-O-、-O-C(=S)-、-C(=S)-S-、-S-C(=S)-、-C(=O)-S-、-S-C(=O)-、-O-S(=O)₂-O-、-S(=O)₂-O-、-O-S(=O)₂-、-C(=O)-NR₁₀-、-NR₁₀-C(=O)-、-O-P(=O)(-OR₁₀)-O-、-P(=O)(-OR₁₀)-O-、-O-P(=O)(-OR₁₀)-;

[0123] X 独立地为 -R₁₁-;和

[0124] E 独立地选自 -N(R₁₂)₂、-N(R₁₂)(R₁₃)、-S-R₁₂ 和

[0125]



[0126] 其中 -R₁₂ 为 -CH₂CH₂-G, 其中 G 独立地为 -Cl、-Br、-I、-O-S(=O)₂-CH₃、-O-S(=

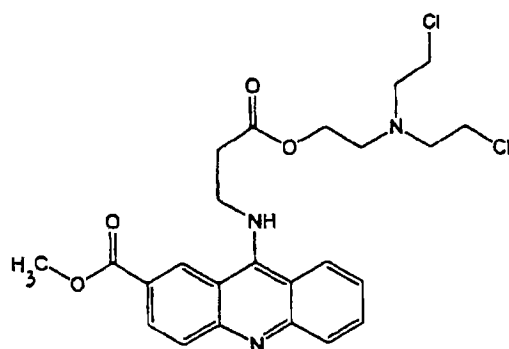
$O)_2-CH_2-C_6H_5$ 或 $-O-S(=O)_2-C_6H_4-CH_3$;

[0127] 以及其中 R_{13} 独立地为 $-C_{1-8}$ 烷基、 $-C_{1-8}$ 杂烷基、-芳基、-杂芳基、 $-C_{1-3}$ 烷基-芳基、 $-C_{1-3}$ 杂烷基-芳基、 $-C_{1-3}$ 烷基-杂芳基、 $-C_{1-3}$ 杂烷基-杂芳基、-芳基- $-C_{1-3}$ 烷基、-芳基- $-C_{1-3}$ 杂烷基、-杂芳基- $-C_{1-3}$ 烷基、-杂芳基- $-C_{1-3}$ 杂烷基、 $-C_{1-3}$ 烷基-芳基- $-C_{1-3}$ 烷基、 $-C_{1-3}$ 杂烷基-芳基- $-C_{1-3}$ 烷基、 $-C_{1-3}$ 烷基-杂芳基- $-C_{1-3}$ 烷基、 $-C_{1-3}$ 烷基-芳基- $-C_{1-3}$ 杂烷基、 $-C_{1-3}$ 杂烷基-杂芳基- $-C_{1-3}$ 烷基、 $-C_{1-3}$ 杂烷基-芳基- $-C_{1-3}$ 杂烷基、 $-C_{1-3}$ 烷基-杂芳基- $-C_{1-3}$ 杂烷基或 $-C_{1-3}$ 杂烷基-杂芳基- $-C_{1-3}$ 杂烷基。

[0128] 应当可以理解,在上述通式 I 中,吡啶核为固定子部分, $-V-W-X-$ 基团包含脆性连接基, E 基团为效应子部分。类似地,在上述通式 III 中,补骨脂素核为固定子部分, $-V-W-X-$ 基团包含脆性基团, E 基团为效应子基团。通式 II 为通式 I 的子集。

[0129] 本发明实例性化合物为下式结构,指定为 IV:

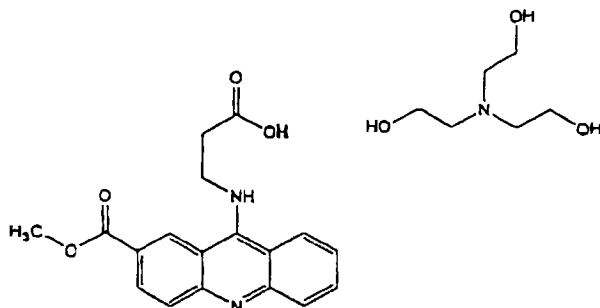
[0130]



IV

[0131] 在 IV 中,2-甲氧甲酰吡啶环系通过嵌入用作固定子部分。双(氯乙基)胺基团用作效应子部分,所述效应子部分能够将核酸烷氧化;如果所述效应子不与核酸反应,则氮芥水解。连接基为 $-NH-CH_2CH_2-C(=O)-O-CH_2CH_2-$ 。在生理 pH 的水溶液中,该含酯连接基在几小时内就水解。改变溶液 pH 可改变连接基的水解速率;对于相应的式 IV 醇类似物(其中式 IV 的 $-Cl$ 原子被 $-OH$ 替代),在 pH 3,37°C 下 100 分钟之后可观察到 $\leq 1\%$ 的酯键的水解;在 pH 8,37°C 下 100 分钟之后则可观察到大于 50% 的酯键的水解。所得的式 IV 水解产物为 N-(2-甲氧甲酰基-9-吡啶基)- β -丙氨酸和三乙醇胺:

[0132]



[0133] 其中 2-甲氧甲酰吡啶带有作为连接基片段的 β -丙氨酸,效应子分解产物带有作为连接基片段的乙醇基团。

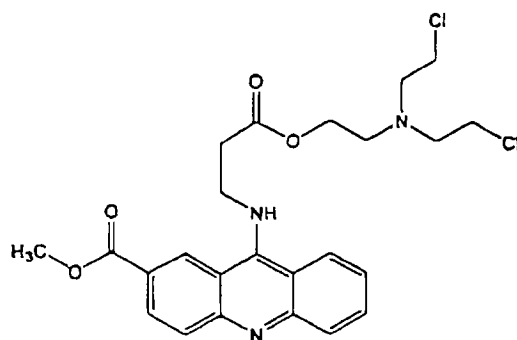
[0134] 在生理 pH 值下, β -丙氨酸的羧酸盐将带负电荷,该特征降低了相连的 2-甲氧甲酰吡啶基团插入到带负电荷的核酸分子中去的趋势。由此降低了 N-(2-甲氧甲酰-9-吡啶

基)- β -丙氨酸相对于 9-氨基吡啶的诱变性。这种降低固定子片段诱变性的效力揭示了由脆性连接基提供的一个优点。

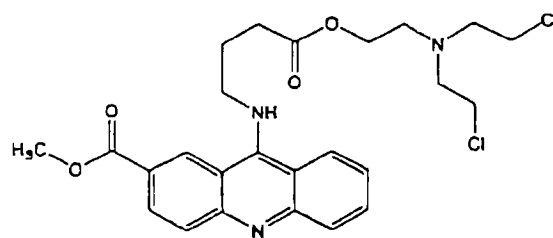
[0135] 在类似于式 IV 化合物中的脆性连接基的另一个优点在于通过改变 9-氨基吡啶固定子与酯官能团之间的连接臂长度,可调节其水解速率。正如下文实施例 7 和表 III 和 IV 中所描述,对于本发明某些化合物的二醇类似物(其中氮芥的 -Cl 原子被 -OH 替代),氨基吡啶固定子与酯基之间的亚甲基数量的增加可导致在 pH 8、37°C 下的水溶液中的水解量降低。

[0136] 下文给出了本发明化合物的一些实例,这些实例只用来说明本发明,而不是限制本发明。

[0137]

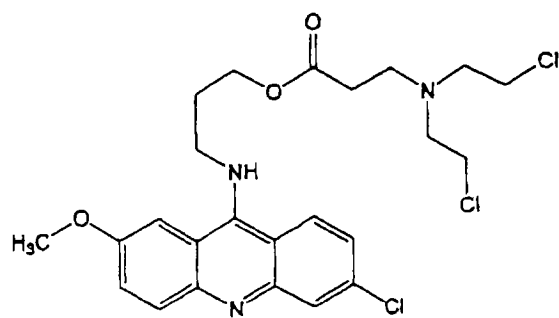


IV

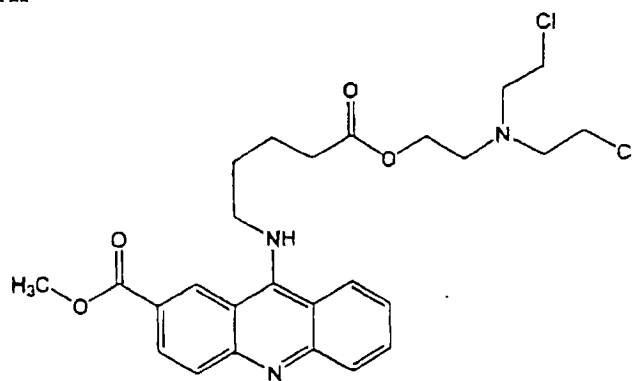


VI

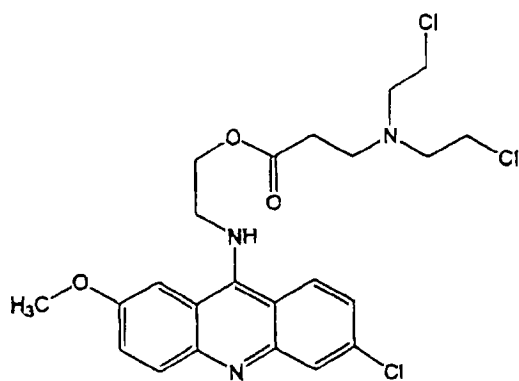
[0138]



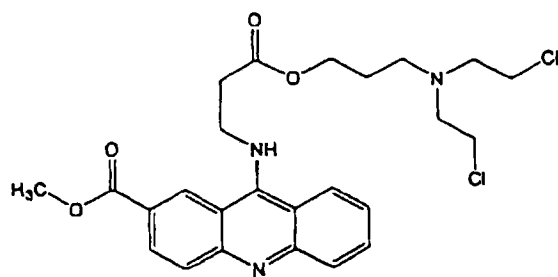
XI



VII

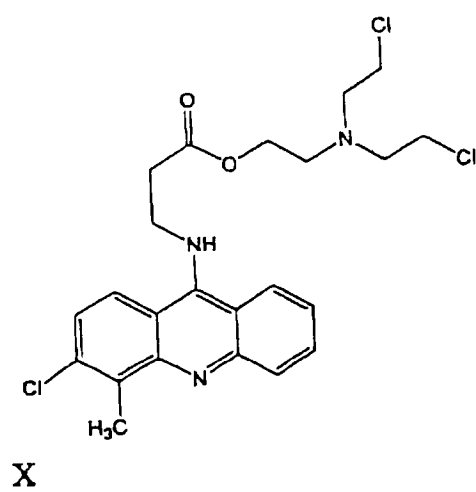
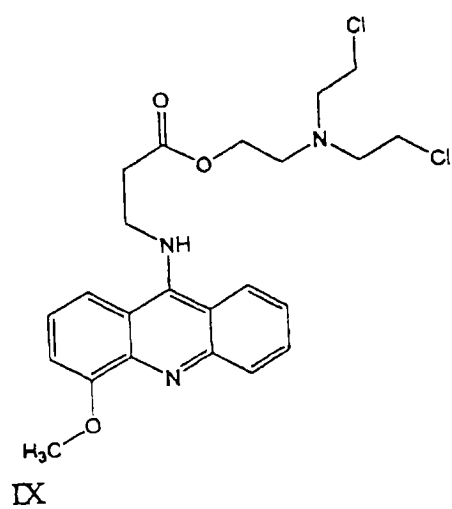
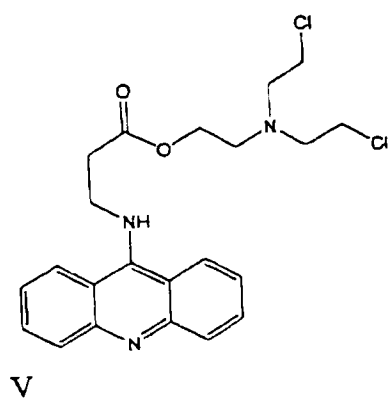


XII

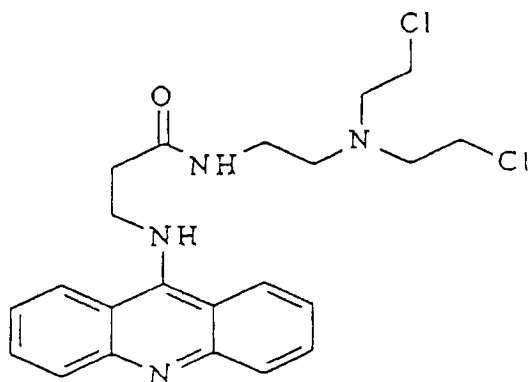
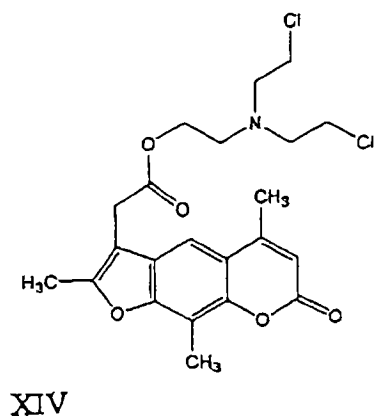
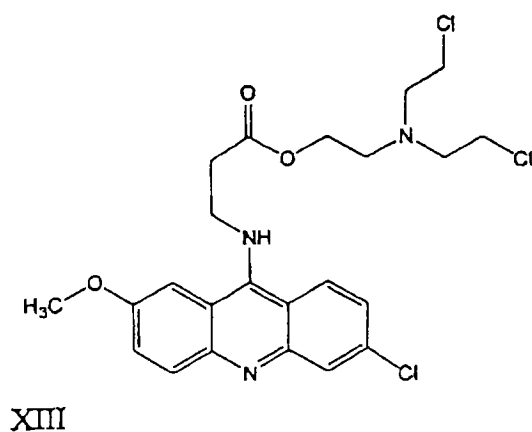


VIII

[0139]



[0140]



[0141] 应用

[0142] 本发明化合物的应用实例包括但不限于：将固体或溶液形式的本发明化合物加入生物材料，从而灭活存在于生物材料中的病原体；在本发明化合物溶液中对应用于生物用途的材料进行浸渍或其它处理，从而灭活存在于材料中或材料表面上的病原体；以及将本发明化合物夹杂在靶向脂质体中，使化合物对准特定的细胞，从而破坏那些细胞中的核酸。

[0143] 人们应当注意到：当将本发明化合物设计成在某些条件下水解时，该化合物在其它条件下则是稳定的。对于脆性连接基和效应子基团，在用于储存的某些条件下相对稳定是所需的。化合物可被储存的方式实例包括但不限于：无水固体、含低水分的油、冷冻水

溶液、冷冻非水溶液、悬浮液和不允许脆性基团或效应子基团水解的溶液（如液态非水溶液）。化合物可存放在 0℃ 以下（如于冷冻箱中）或 0℃ 以上（如于冷藏箱中或环境温度下）。优选地，化合物在储存条件下于下列时期内是稳定的：三天至一年、一周至一年、一月至一年、三月至一年、六月至一年、一周至六月、一月至六月、三月至六月、一周至三月或一月至三月。化合物的稳定性取决于其储存的温度及其储存的状态（如非水溶液、无水固体）。

[0144] 病原体灭活的条件

[0145] 利用病原体灭活化合物处理生物材料的条件可基于所选择的材料和灭活化合物进行选择。用于处理生物材料（如血液制品）的病原体灭活化合物的典型浓度为大约 0.1 μM 至 5mM 数量级，如约为 500 μM 。例如，所用病原体灭活化合物的浓度为足以灭活样品中病原体的至少约 1log，或至少约 2logs，如至少约 3 至 6logs。在一个实施方案中，病原体灭活化合物在不大于 500 μM 浓度下产生至少 1log 杀伤，更优选在不大于约 500 μM 浓度下产生至少 3logs 杀伤。在另一个非限定性实例中，病原体灭活化合物在大约 0.1 μM 至大约 3mM 浓度下产生至少 1log 杀伤，优选至少 6logs 杀伤。

[0146] 利用病原体灭活化合物孵育血液制品可进行如约 5 分钟至 72 小时或更长，或约 1 至 48 小时，如约 1 至 24 小时或约 8 至 20 小时。对于血红细胞，孵育可典型地在约 2℃ 至 37℃ 下进行，优选约 18℃ 至 25℃。对于血小板，温度优选为约 20 至 24℃。对于血浆，温度可以为约 0 至 60℃，典型地为约 0-24℃。被处理材料的 pH 优选为约 4 至 10℃，更优选为约 6 至 8℃。

[0147] 本发明的一个实施方案包括化合物及其在灭活血液或血液制品中的病原体中的使用方法，为此目的的优选储存条件应当是便于在血库中储存和使用化合物的那些条件。

[0148] 在用于灭活材料中或材料表面上病原体的条件下，脆性连接基和效应子基团将经历水解或反应。脆性连接基和效应子基团的水解速率应当足够慢，从而能够灭活所需数量的病原体。例如，用于灭活病原体所需的时间应当为约 5 分钟至 72 小时。

[0149] 处理血红细胞

[0150] 优选地，利用病原体灭活化合物处理含血红细胞的材料应当不损害血红细胞的功能或使处理后的血红细胞改性。对血红细胞功能的实质性损害作用的不足可通过测试血红细胞功能领域中公知的方法测定。例如可测定指示剂的水平并与未处理对照组进行比较，所述指示剂如细胞内 ATP (5' - 三磷酸腺苷)、细胞内 2,3-DPG (2,3- 二磷酸甘油) 或细胞外钾。另外也可测定溶血、pH、血细胞比容、血红蛋白、渗透脆性、葡萄糖消耗和乳酸盐生成。

[0151] 测定 ATP、2,3-DPG、葡萄糖、血红蛋白、溶血和钾的方法是本领域已有技术。如参见 Davey 等人, *Transfusion*, 32 :52-528 (1992), 本公开在此引作参考。测定血红细胞功能的方法也描述在下述文献中 :Greenwalt 等人, *Vox Sang*, 58 :94-99 (1990) ;Hogman 等人, *Vox Sang*, 65 :271-278 (1993) 和 Beutler 等人, *血液 (Blood)*, Vol. 59 (1982), 这些公开在此引作参考。细胞外钾的水平可利用 Ciba Corning 型 614K+/Na⁺ 分析仪 (Ciba Corning Diagnostics Corp., Medford, MA) 测定。pH 值可利用 Ciba Corning 型 238 血液气体分析仪 (Ciba Corning Diagnostics Corp., Medford, MA) 测定。

[0152] 下列物质如 IgG、白蛋白和 IgM 对血红细胞的结合也可利用现有技术已知的方法测定。分子对血红细胞的结合可利用如吡啶和 IgG 的抗体进行测定。用于测定的抗

体可市购或利用本领域公知的方法制得,所述方法描述在下列文献中:Harlow 和 Lane,“Antibodies, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory”,1998,此公开在此引作参考。例如抗 IgG(anti-IgG) 可从下列公司市购:Caltag, Burlingame, CA;Sigma Chemical Co., St. Louis, MO 和 Lampire Biological Laboratory, Pipersville, PA。

[0153] 在病原体灭活化合物处理含血红细胞的材料的方法中,一天后细胞外的钾水平优选不超过未处理对照组所显示的量的 3 倍,更优选不超过 2 倍。在另一实施方案中,储存 28 天后处理过的血红细胞的溶血优选低于 3%,更优选 42 天后低于 2%,最优选在 4℃ 下储存 42 天后低于或等于约 1%。

[0154] 生物材料

[0155] 利用病原体灭活化合物可处理大量的生物材料。生物材料包括血液制品,如全血;压紧血红细胞;血小板及新鲜或冷冻血浆。血液制品进一步包括血浆蛋白质部分、抗血友病因子(因子 VIII)、因子 IX 和因子 IX 复合物、纤维蛋白原、因子 XIII、凝血酶原和凝血酶、免疫球蛋白(如 IgG、IgA、IgD、IgE 和 IgM 及其片段)、白蛋白、干扰素和淋巴因子。另外还包括合成血液制品。

[0156] 其它生物材料包括疫苗、重组 DNA 生成的蛋白和寡肽配体。另外还包括临床样品,如尿、汗水、唾液、粪便、脊髓液。还进一步包括合成血液或血液制品储存介质。

[0157] 处理后降低材料中化合物的浓度

[0158] 在处理后可降低生物材料(如血液制品)中病原体灭活化合物的浓度。可使用的方法和装置描述在下述文献中:PCT US96/09846;1997 年 1 月 6 日申请的美国序号 08/779,830;以及共同申请从血液制品中减少小有机化合物的方法和装置“Methods and Devices for Reduction of Small Organic Compounds from Blood Products”,序号为 PCT/US98/00531,代理人记事本序号为 2000440,1998 年 1 月 6 日申请,这些文献的公开在此全部引作参考。

[0159] 淬灭

[0160] 在另一实施方案中,本发明化合物可以与淬灭剂结合的方式使用。淬灭病原体灭活化合物在生物材料中的不希望的副反应的方法描述在美国共同临时申请中,该申请的序号为 60/070597,申请日为 1998 年 1 月 6 日,代理人记事本序号为 282173000600,“用于淬灭生物材料中病原体灭活剂的方法(Methods for Quenching Pathogen Inactivators in Biological Materials)”,该公开在此引作参考。该共同申请公开了淬灭病原体灭活化合物的不希望的副反应的方法,所述病原体灭活化合物包括形成或能够形成亲电性基团的官能团。在该实施方案中,利用病原体灭活化合物和淬灭剂处理材料,其中淬灭剂包含能够与亲电性基团进行共价反应的亲核官能团。优选的淬灭剂为硫醇,如谷胱甘肽。

[0161] 实施例

[0162] 下列特定实施例用来说明制备用于本发明方法的有代表性化合物的方法,提供了对专业人员有用的化合物的相关数据;以及用来说明确定化合物有效性的方式。这些实施例不是用来限定本发明的范围。除非另外指明,所有 NMR 光谱均是在 CDCl₃ 中于 Varian 200MHz 仪器上记录的;所记录的化学位移为相对于四甲基硅烷(TMS);利用 PerkinElmer FTIR 记录 IR 光谱;利用梯度型 YMC C8 柱进行 HPLC 测定,流动相 A 为 5mM H₃PO₄ 水溶液,流动相 B 为 5mM CH₃CN;在 DMSO 或乙醇中制备样品,在注射前保持在 ≤ 15℃。

[0163] 表 II 指明各种化合物所使用的化合物序号。

[0164] 表 II

[0165]

化合物序号	化学名称
IV	β -丙氨酸, N-(2-甲氧甲酰基吡啶-9-基), 2-[双(2-氯乙基)氨基]乙酯
V	β -丙氨酸, N-(吡啶-9-基), 2-[双(2-氯乙基)氨基]乙酯
VI	4-氨基丁酸 N-(2-甲氧甲酰基吡啶-9-基), 2-[双(2-氯乙基)氨基]乙酯
VII	5-氨基戊酸 N-(2-甲氧甲酰基吡啶-9-基), 2-[双(2-氯乙基)氨基]乙酯
VIII	β -丙氨酸, N-(2-甲氧甲酰基吡啶-9-基), 3-[双(2-氯乙基)氨基]丙酯
IX	β -丙氨酸, N-(4-甲氧基吡啶-9-基), 2-[双(2-氯乙基)氨基]乙酯
X	β -丙氨酸, N-(3-氯-4-甲基吡啶-9-基), 2-[双(2-氯乙基)氨基]乙酯
XI	β -丙氨酸, [N, N-双(2-氯乙基)], 3-[(6-氯-2-甲氧基吡啶-9-基)氨基]丙酯
XII	β -丙氨酸, [N, N-双(2-氯乙基)], 2-[(6-氯-2-甲氧基吡啶-9-基)氨基]乙酯
XIII	β -丙氨酸, N-(6-氯-2-甲氧基吡啶-9-基), 2-[双(2-氯乙基)氨基]乙酯
XIV	[N, N-双(2-氯乙基)]-2-氨基乙基 4, 5', 8-三甲基-4'-补骨脂素乙酸酯
XV	β -丙氨酸, N-(吡啶-9-基), 2-[双(2-氯乙基)氨基]乙酰胺

[0166] 实施例 1

[0167] 合成 β -丙氨酸, N-(2-甲氧甲酰基吡啶-9-基), 2-[双(2-氯乙基)氨基]乙

酯二盐酸盐 (化合物 IV)

[0168] 步骤 A β -丙氨酸, N-(叔丁氧基羰基), 2-[双(2-羟乙基)氨基]乙酯

[0169] 在 N_2 气氛、 -15°C 下, 向搅拌着的 N-(叔丁氧基羰基)- β -丙氨酸 (20.3g, 107mmol) 和 4-甲基吗啉 (13.0ml, 12.0g, 119mmol) 的无水 THF (200ml) 溶液中加入氯甲酸异丁酯 (13.9ml, 14.6g, 107mmol), 得到中间形成的白色沉淀 (4-甲基吗啉·HCl)。反应混合物在 -15°C 下搅拌 5 分钟, 接着在 -15°C 下将反应混合物转移至包含搅拌着的三乙醇胺 (48.3g, 324mmol) 的无水 THF (150ml) 溶液的烧瓶中。将反应混合物温热至 23°C , 再搅拌 1.5 小时, 接着通过真空过滤分离沉淀。从滤液中真空分离 THF, 将所得粘性黄色油状物分配在水 (500ml) 和 EtOAc ($5 \times 150\text{ml}$) 之间。在 Na_2SO_4 上干燥合并的有机层。真空分离溶剂, 得到 25.8g (75%) 所需产物 β -丙氨酸, N-(叔丁氧基羰基), 2-[双(2-羟乙基)氨基]乙酯, 为浅黄色油状物。 ^1H NMR: δ 5.32 (br s, 1H), 4.18 (t, $J = 5.4\text{Hz}$, 2H), 3.58 (t, $J = 5.1\text{Hz}$, 4H), 3.37-3.23 (m, 2H), 2.80 (t, $J = 5.4\text{Hz}$, 2H), 2.69 (t, $J = 5.1\text{Hz}$, 4H), 2.51 (t, $J = 6.0\text{Hz}$, 2H), 1.41 (s, 9H) 未观测到羟基质子。 ^{13}C NMR: δ 173.0, 156.4, 79.8, 63.3, 60.2, 57.3, 54.1, 36.7, 35.3, 28.8.

[0170] 步骤 B β -丙氨酸, N-(叔丁氧基羰基), 2-[双(2-叔丁基二甲基硅烷氧基乙基)氨基]乙酯

[0171] 在 N_2 下, 将搅拌着的由步骤 A 得到的 β -丙氨酸, N-(叔丁氧基羰基), 2-[双(2-羟乙基)氨基]乙酯 (22.7g, 70.9mmol) 和咪唑 (11.1g, 163mmol) 的乙腈溶液 (70ml) 冷却至 0°C 。然后加入叔丁基二甲基硅烷基氯 (534mg, 3.54mmol), 在 0°C 下再搅拌反应混合物 5 分钟。将反应混合物温热至 23°C , 搅拌 2 小时, 接着通过真空过滤分离所得白色沉淀 (咪唑·HCl)。真空除去滤液中的乙腈, 将剩余物质分配在饱和盐水 (600ml) 和 EtOAc ($3 \times 200\text{ml}$) 之间。在 Na_2SO_4 上干燥合并的有机层。真空分离溶剂, 得到 35.2g (90%) 所需产物 β -丙氨酸, N-(叔丁氧基羰基), 2-[双(2-叔丁基二甲基硅烷氧基乙基)氨基]乙酯, 为黄色油状物。 ^1H NMR: δ 5.29 (br s, 1H), 4.14 (t, $J = 6.0\text{Hz}$, 2H), 3.65 (t, $J = 6.3\text{Hz}$, 4H), 3.37 (表观 q, 2H), 2.85 (t, $J = 6.0\text{Hz}$, 2H), 2.71 (t, $J = 6.3\text{Hz}$, 4H), 2.49 (t, $J = 5.9\text{Hz}$, 2H), 1.42 (s, 9H), 0.88 (s, 18H), 0.03 (s, 12H); ^{13}C NMR: δ 172.7, 156.3, 79.7, 63.3, 62.4, 57.7, 54.3, 36.7, 35.3, 28.9, 26.4, 18.7, -4.9.

[0172] 步骤 C β -丙氨酸, 2-[双(2-叔丁基二甲基硅烷氧基乙基)氨基]乙酯

[0173] 向含由步骤 B 得到的 β -丙氨酸, N-(叔丁氧基羰基), 2-[双(2-叔丁基二甲基硅烷氧基乙基)氨基]乙酯 (3.01g, 5.48mmol) 的烧瓶中加入纯三氟乙酸 (5ml), 放出 CO_2 气体。搅拌反应混合物 5 分钟, 真空分离三氟乙酸。将剩余物质分配在饱和 NaHCO_3 (100ml) 和 EtOAc ($3 \times 30\text{ml}$) 之间。在 Na_2SO_4 上干燥合并的有机层。真空分离溶剂, 得到 2.45g (100%) 所需产物 β -丙氨酸, 2-[双(2-叔丁基二甲基硅烷氧基乙基)氨基]乙酯, 为浅黄色油状物。 ^1H NMR: δ 4.12 (t, $J = 6.0\text{Hz}$, 2H), 3.63 (t, $J = 6.4\text{Hz}$, 4H), 2.96 (t, $J = 6.2\text{Hz}$, 2H), 2.84 (t, $J = 6.0\text{Hz}$, 2H), 2.69 (t, $J = 6.4\text{Hz}$, 4H), 2.44 (t, $J = 6.2\text{Hz}$, 2H), 0.86 (s, 18H), 0.03 (s, 12H). 未观测到胺质子, ^{13}C NMR (CDCl_3): δ 173.0, 63.4, 62.6, 57.9, 54.4, 38.4, 38.1, 26.4, 18.7, -4.9.

[0174] 步骤 D β -丙氨酸, N-(2-甲氧甲酰基吡啶-9-基), 2-[双(2-羟乙基)氨基]乙酯

[0175] 在室温下,通过在 10ml CHCl_3 中搅拌 12.5 小时,将 β -丙氨酸,2-[双(2-叔丁基二甲基硅烷氧基乙基)氨基]乙酯(736mg,1.64mmol)与 9-甲氧基吡啶-2-羧酸甲酯(669mg,2.50mmol)反应。过滤沉淀(吡啶酮),将滤液分配在饱和 NaHCO_3 (100ml)和 CHCl_3 (3×35ml)之间。在 Na_2SO_4 上干燥合并的有机层并真空浓缩,得到 1.61g 粘性褐色油状物。所得二醇的脱保护可通过下述方法进行:在 N_2 气氛下,将粗中间体溶解在 3.0ml THF 中,在冷却至 0℃ 时,利用 HF/吡啶(1.0ml)处理。在搅拌 1 小时条件下,将溶液温热至室温。真空除去挥发性物质,将残留物分配在饱和 NaHCO_3 水溶液(100ml)和 CHCl_3 (3×35ml)之间。干燥合并的有机层并浓缩,得到 649mg 黄褐色固体。进行制备性 TLC(C-18, CH_3CN) 后得到收率为 20% 的所需二醇, β -丙氨酸, N-(2-甲氧甲酰基吡啶-9-基), 2-[双(2-羟乙基)氨基]乙酯(通过 HPLC 测定,纯度 > 80%); ^1H NMR: δ 8.82(s, 1H), 8.21-7.94(m, 2H), 7.94-7.72(m, 2H), 7.59(表观 t, 1H), 7.23(表观 t, 1H), 4.30-4.18(m, 2H), 4.18-4.05(m, 2H), 3.89(s, 3H), 3.69-3.50(m, 4H), 2.92-2.73(m, 4H), 2.73-2.55(m, 4H)

[0176] 未观察到胺和羟基质子。

[0177] 步骤 E β -丙氨酸, N-(2-甲氧甲酰基吡啶-9-基), 2-[双(2-氯乙基)氨基]乙酯二盐酸盐

[0178] 通过类似于 Peck, 等人(美国化学学会杂志(J. Am. Chem. Soc.) 1959, 81:3984)描述的方法,将 β -丙氨酸, N-(2-甲氧甲酰基吡啶-9-基), 2-[双(2-羟乙基)氨基]乙酯转变成二氯化物。在室温下搅拌步骤 D 产物(41mg, 0.090mmol)的纯 SOCl_2 (6ml)黄色溶液 20 小时。真空除去 SOCl_2 , 得到黄色固体(二盐酸盐)。将物质分配在饱和 NaHCO_3 (50ml)和 CH_2Cl_2 (3×20ml)之间。在 Na_2SO_4 上干燥合并的有机层。真空除去溶剂得到 35.4mg 二氯化物游离碱,为桔黄色胶状物。

[0179] ^1H NMR: δ 8.82(s, 1H), 8.20-7.83(m, 4H), 7.5(表观 t, 1H), 7.25(表观 t, 1H), 4.36-4.15(m, 4H), 3.93(s, 3H), 3.48(t, $J = 6.9\text{Hz}$, 4H), 3.06-2.77(m, 4H), 2.86(t, $J = 6.9\text{Hz}$, 4H) 未观测到胺质子。 ^{13}C NMR: δ 172.3, 166.6, 155.2, 146.5, 144.6, 133.1, 131.6, 128.7, 124.6, 124.3, 116.1, 114.3, 63.7, 57.2, 53.5, 52.9, 46.3, 42.5, 35.2.

[0180] 未观察到其它碳。通过滴加 1M HCl 的醚溶液,从 CH_2Cl_2 中沉淀出 HCl 盐,得到 β -丙氨酸, N-(2-甲氧甲酰基吡啶-9-基), 2-[双(2-氯乙基)氨基]乙酯二盐酸盐(化合物 IV),为黄色固体(通过 HPLC 测定,纯度为 81%)。

[0181] 根据类似的方法,可制备 β -丙氨酸, N-(吡啶-9-基), 2-[双(2-氯乙基)氨基]乙酯二盐酸盐(化合物 V)。由此,在步骤 D 中,利用 9-甲氧基吡啶替代 9-甲氧基吡啶-2-羧酸甲酯,可得到中间体二醇(7.1%),为黄色油状物(通过 HPLC 测定,纯度为 74%)。

[0182] ^1H NMR: δ 8.14(d, $J = 7.5\text{Hz}$, 2H), 7.93(d, $J = 8.6\text{Hz}$, 2H), 7.52(表观 t, 2H), 7.23(表观 t, 2H), 4.36-4.08(m, 4H), 3.76-3.5(m, 4H), 3.08-2.60(m, 8H)

[0183] 未观察到胺和羟基质子。

[0184] 在 23℃ 下搅拌中间体二醇(37.3mg, 0.0793mmol)的亚硫酸氯(4.0ml)溶液 7.5 小时。真空除去亚硫酸氯,得到黄色油状物。将该物质溶解在乙醇(~4ml)中,真空除去溶剂。然后将该物质溶解在 CH_2Cl_2 (4ml)中,真空除去溶剂;重复该步骤两次。然后利用己烷(3×4ml)研磨该物质,得到 40.0mg(通过 HPLC 测定,纯度为 42%)产物,为黄色吸湿玻璃状固体。为了分析,有些物质可通过下述方法转变成游离胺:将其分配在饱和 NaHCO_3 和

CH_2Cl_2 之间,在 Na_2SO_4 上干燥合并的有机层,真空除去溶剂。

[0185] ^1H NMR: δ 8.21-8.00(m, 4H), 7.66(表观 t, 2H), 7.38(表观 t, 2H), 4.26-4.12(m, 2H), 4.12-3.98(m, 2H), 3.43(t, $J = 6.9\text{Hz}$, 4H), 2.96-2.68(m, 8H)

[0186] 未观察到胺质子。

[0187] 根据上述步骤,只是利用 N-(叔丁氧基羰基)-4-氨基丁酸替代 N-(叔丁氧基羰基)- β -丙氨酸,可制备 4-氨基丁酸 N-(2-甲氧甲酰基吡啶-9-基),2-[双(2-氯乙基)氨基]乙酯二盐酸盐,化合物 VI(通过 HPLC 测定,纯度为 78%)。 ^1H NMR: δ 8.89(s, 1), 8.12(表观 t, 2), 7.93-7.80(m, 2), 7.59(表观 q, 1), 7.36-7.20(m, 1), 4.16(t, 2, $J = 5.7\text{Hz}$), 4.07-3.92(m, 2), 3.97(s, 3), 3.46(t, 4, $J = 6.9\text{Hz}$), 2.93-2.80(m, 6), 2.60(t, 2, $J = 6.5\text{Hz}$), 2.29-2.12(m, 2)。

[0188] 未观察到胺质子。

[0189] 实施例 2

[0190] 利用 3-[N,N-双(2-叔丁基二甲基硅烷氧基乙基)]氨基丙醇替代实施例 1 步骤 A 中的三乙醇胺,然后继续步骤 C,可制得 β -丙氨酸, N-(2-甲氧甲酰基吡啶-9-基),3-[双(2-氯乙基)氨基]丙酯二盐酸盐,化合物 VIII(通过 HPLC 测定,纯度为 63%)。

[0191] ^1H NMR: δ 8.91(s, 1), 8.20-7.93(m, 4), 7.18(表观 t, 1), 7.39(表观 t, 1), 4.30(m, 4), 3.96(s, 3), 3.48(t, 4, $J = 6.9\text{Hz}$), 2.88-2.60(m, 2), 2.83(t, 4, $J = 6.9\text{Hz}$), 2.62(t, 2, $J = 6.7\text{Hz}$), 1.85-1.68(m, 2)

[0192] 未观察到胺质子。

[0193] 实施例 3

[0194] 在实施例 1 中合成的化合物也可通过下述方法制备:

[0195] 合成 β -丙氨酸, N-(吡啶-9-基),2-[双(2-氯乙基)氨基]乙酯二盐酸盐(化合物 V):方法 II

[0196] 步骤 A β -丙氨酸, N-(吡啶-9-基),甲酯盐酸盐

[0197] 合并 9-氯吡啶(11.7g, Organic Synthesis, Coll. Vol III, pg57)、 β -丙氨酸甲酯盐酸盐(9.9g)和甲醇钠(3.26g),加入 60ml 甲醇。利用磁性搅拌器搅拌混合物并回流 5.5 小时。除去加热装置,趁热($\leq 35^\circ\text{C}$)过滤悬浮液。通过再加约 10ml 甲醇漂洗固体盐,浓缩合并的深绿色滤液,得到 21g 含水绿黄色固体。

[0198] 将该固体溶解在 350ml 沸腾的 2-丙醇中,在室温下结晶。利用约 15ml 2-丙醇和 15ml 己烷漂洗所得晶体,然后空气干燥,得到 15.5g 亮黄色产物, β -丙氨酸, N-(吡啶-9-基),甲酯盐酸盐(收率 78.5%)。

[0199] ^1H NMR: δ 1.9(brs, 2H); 3.24(t, $J = 7.0\text{Hz}$, 2H); 3.76(s, 3H); 4.45(br s, 2H); 7.23(app. t, $J = 8\text{Hz}$, 2H); 7.49(app. t, $J = 8\text{Hz}$, 2H); 8.11(d, $J = 8.4\text{Hz}$, 2H); 8.30(d, $J = 8.4\text{Hz}$, 2H); 9.68(br s, 0.5H). IR: 1574(s), 1691(s), 1726(s), 2336(m), 2361(m), 3227(m)。

[0200] 步骤 B β -丙氨酸, N-(吡啶-9-基),2-[双(2-羟乙基)氨基]乙酯二盐酸盐

[0201] 将步骤 A 得到的 β -丙氨酸, N-(吡啶-9-基),甲酯盐酸盐(5.00g)分配在甲苯(750ml)、饱和 Na_2CO_3 (200ml)和水(50ml)之间。利用甲苯($3 \times 250\text{ml}$)再萃取水层,合并有机层,利用饱和 Na_2CO_3 水溶液(50ml)洗涤。通过旋转蒸发,将甲苯体积降至约 100ml。然后加入三乙醇胺(30ml),形成部分不混溶体系。然后加入 NaOMe(50mg)的 MeOH(2ml)溶液。

在室温下,通过搅拌旋转蒸发,迅速从反应混合物中除去溶剂。除去溶剂之后,反应混合物在真空下再放置 1-1.5 小时,得到糖浆状溶液。

[0202] 为了分离过多的三乙醇胺,将粗混合物分配在 CH_2Cl_2 (200ml) 和盐水 (200ml) 之间。用 CH_2Cl_2 (5×100ml) 萃取盐水层,合并有机层,利用盐水 (50ml) 洗涤,然后利用 0.5M HCl (2×100ml) 萃取。合并水性酸层,利用 CH_2Cl_2 (50ml) 洗涤。在 CH_2Cl_2 (200ml) 存在下,利用粉状 $\text{K}_2\text{CO}_{3(s)}$ 使酸溶液呈碱性。分离有机层,再利用 CH_2Cl_2 (5×100ml) 萃取水层。利用盐水 (50ml) 洗涤合并的有机相,利用无水 $\text{Na}_2\text{SO}_{4(s)}$ 干燥,汽提后得到粗二醇游离胺 (5.02g) 为粘稠黄色胶状物。通过 NMR 测定,该物质与实施例 1 中通过另一方法制得的物质相同。

[0203] 将部分上述粗物质 (0.400g) 与异丙醇 (100ml) 一起剧烈搅拌,利用 1M HCl 的乙醚溶液酸化。骤冷胶状物,除去第一次沉淀物。除去一半溶剂后,第二次晶体得到 β -丙氨酸, N-(吡啶-9-基), 2-[双(2-羟乙基)氨基]乙酯二盐酸盐,为亮黄色结晶固体 (0.200g, HPLC 测定,纯度 > 95%)。 ^1H NMR: δ 8.11 (表观 t, 4H), 7.69 (表观 t, 2H), 7.41 (表观 t, 2H), 4.23 (t, J = 5.4Hz, 2H), 4.03 (t, J = 5.9Hz, 2H), 3.58 (t, J = 5.2Hz, 4H), 2.73 (t, J = 5.4Hz, 2H), 2.70 (t, J = 5.9Hz, 2H) 2.68 (t, J = 5.2Hz, 4H)。未观测到胺和羟基质子

[0204] ^{13}C NMR: δ 173.3, 151.7, 149.4, 130.5, 129.5, 124.0, 123.4, 118.4, 63.5, 60.1, 57.3, 54.0, 46.6, 35.8。

[0205] 步骤 C β -丙氨酸, N-(吡啶-9-基), 2-[双(2-氯乙基)氨基]乙酯二盐酸盐

[0206] 将 SOCl_2 (0.5ml) 加入到搅拌着的步骤 B 得到的 β -丙氨酸, N-(吡啶-9-基), 2-[双(2-羟乙基)氨基]乙酯二盐酸盐 (113mg, 0.24mmol) 的 CH_3CN (0.5ml) 悬浮液中。在 23°C 下搅拌所得黄色溶液 16 小时,接着真空除去挥发性物质。将剩余桔黄色油状物溶解在 EtOH (~2ml) 中,真空除去 EtOH,得到黄色固体。利用己烷 (2×3ml) 研磨该物质,真空除去残留溶剂,得到 123mg 所需物质 β -丙氨酸, N-(吡啶-9-基), 2-[双(2-氯乙基)氨基]乙酯二盐酸盐 (HPLC 测定,纯度为 93%),为黄色固体。 ^1H NMR: δ 8.09 (表观 t, J = 8.8Hz, 4H), 7.66 (表观 t, J = 7.6Hz, 2H), 7.38 (表观 t, J = 7.7Hz, 2H), 4.14 (t, J = 5.9Hz, 2H), 4.00 (t, J = 5.8Hz, 2H), 3.43 (t, J = 6.9Hz, 4H), 2.87 (t, J = 6.9Hz, 4H), 2.77 (t, J = 5.9Hz, 2H), 2.69 (t, J = 5.8Hz, 2H)。未观测到胺质子。

[0207] ^{13}C NMR: δ 173.0, 151.5, 149.4, 130.5, 129.6, 124.1, 123.4, 118.6, 63.5, 57.3, 53.5, 46.7, 42.5, 35.7。IR (HCl 盐的 KBr 小丸): 3423, 3236, 2939, 2879, 1736, 1634, 1586, 1572, 1540, 1473, 1272, 1173 cm^{-1} 。

[0208] 实施例 4

[0209] β -丙氨酸, N-(4-甲氧基吡啶-9-基), 2-[双(2-氯乙基)氨基]乙酯二盐酸盐, 化合物 IX

[0210] 通过下述方法制备 β -丙氨酸, N-(4-甲氧基吡啶-9-基), 甲酯: 混合 1.4g (5.84mmol) 4,9-二甲氧基吡啶、0.89g (6.42mmol) β -丙氨酸甲酯盐酸盐和 20ml 甲醇,然后在 N_2 气氛下加热回流 12 小时。接着真空浓缩反应,溶解在 CHCl_3 -异丙醇 (50ml, 4:1v/v) 中,利用 50% NH_4OH (2×25ml) 和盐水 (1×25ml) 洗涤。利用 Na_2SO_4 干燥有机层并真空浓缩,得到 1.24g (68%) 甲酯 (通过 HPLC 测定,纯度 > 74%),为黄色油状物; R_f (SiO_2 , 乙酸乙酯) = 0.25; IR (薄膜):

[0211] 3363, 2947, 1730, 1611, 1573, 1518, 1484, 1463, 1423, 1420, 1246, 1170, 1081 cm^{-1} ;

^1H NMR: δ 2.70 (t, 2H, $J = 5.7\text{Hz}$), 3.74 (s, 3H), 4.00 (t, 2H, $J = 6.3\text{Hz}$), 4.11 (s, 3H), 6.98 (d, 1H, $J = 7.4\text{Hz}$), 7.36 (m, 2H), 7.65 (m, 2H), 8.12 (d, 2H, $J = 8.5\text{Hz}$); ^{13}C NMR: δ 35.7, 46.9, 52.3, 56.5, 107.2, 115.3, 119.8, 123.5, 124.1, 130.0, 151.4, 173.6.

[0212] 在实施例 3 步骤 B 描述的条件下, 将其转变成二醇, 得到 647mg 黄色油状物。HPLC 分析粗混合物表明收率为 85% ($\lambda = 278\text{nm}$); $R_f(\text{SiO}_2, 20\% \text{ 甲醇} - \text{乙酸乙酯}) = 0.17$; IR(薄膜): 3337, 2947, 2828, 1726, 1616, 1569, 1522, 1484, 1463, 1420, 1348, 1250, 1174, 1127, 1081, 1043cm^{-1} ; ^1H NMR: δ 2.7 (m, 8H), 3.55 (m, 4H), 3.97-4.08 (m, 2H), 4.08 (s, 3H), 4.19 (t, 2H, $J = 5.5\text{Hz}$), 6.96 (d, 1H, $J = 7.4\text{Hz}$), 7.29 (m, 2H), 7.61 (m, 2H), 8.10 (m, 2H); ^{13}C NMR: δ 36.0, 46.9, 53.7, 56.4, 57.1, 60.1, 63.3, 107.4, 115.7, 119.1, 119.6, 123.2, 123.5, 123.9, 128.5, 130.0, 140.8, 147.4, 151.6, 151.7, 154.3, 173.3.

[0213] 正如实施例 3 步骤 C 描述, 利用亚硫酸氯将其转变成 β -丙氨酸, N-(4-甲氧基吡啶-9-基), 2-[双(2-氯乙基)氨基]乙酯二盐酸盐。利用乙酸乙酯快速过滤 (SiO_2) 粗产物, 接着再用 10% 甲醇-乙酸乙酯过滤; 柱中降解一些产物后得到 58mg 黄色油状物; $R_f(\text{SiO}_2, \text{乙酸乙酯}) = 0.26$; IR(薄膜):

[0214] 3405, 2955, 2828, 1726, 1616, 1577, 1518, 1463, 1416, 1348, 1246, 1174, 1123, 1081, 1013cm^{-1} ; ^1H NMR: δ 2.69-2.99 (m, 8H), 3.45 (t, 4H, $J = 6.7\text{Hz}$), 4.03 (m, 2H), 4.09 (s, 3H), 4.16 (t, 2H, $J = 5.9\text{Hz}$), 6.97 (d, 1H, $J = 7.7\text{Hz}$), 7.32 (m, 2H), 7.65 (m, 2H), 8.12 (d, 2H, $J = 8.7\text{Hz}$).

[0215] 通过共沸分离过量的亚硫酸氯 ($2 \times 5\text{ml}$ 甲苯) 真空浓缩反应, 可分离粗品形式的二盐酸盐。HPLC 表明起始原料完全耗尽, 4-甲氧基吡啶酮 ($R_t = 22.3$ 分钟) 为主要杂质。 ^1H NMR (CD_3OD): δ 3.18 (t, 2H, $J = 6.4\text{Hz}$), 3.71 (m, 6H), 4.04 (m, 4H), 4.18 (s, 3H), 4.51 (m, 2H), 7.17 (m, 2H), 7.56 (m, 2H), 7.91-8.15 (m, 2H), 8.55 (d, 1H, $J = 8.8\text{Hz}$).

[0216] 根据类似的方法从 3-氯-9-甲氧基-4-甲基吡啶制备 β -丙氨酸, N-(3-氯-4-甲基吡啶-9-基), 2-[双(2-氯乙基)氨基]乙酯二盐酸盐, 化合物 X。游离碱的 ^1H NMR 为: δ 7.96-8.17 (m, 3H), 7.29-7.52 (m, 3H), 4.19 (t, $J = 5.8\text{Hz}$, 2H), 4.00 (s, 3H), 3.89 (t, $J = 5.1\text{Hz}$, 2H), 3.47 (t, $J = 6.8\text{Hz}$, 4H), 2.91 (t, $J = 6.8\text{Hz}$, 4H), 2.83 (t, $J = 5.8\text{Hz}$, 2H), 2.67 (t, $J = 5.5\text{Hz}$, 2H).

[0217] 根据类似的方法从 6-氯-2,9-二甲氧基吡啶制备 β -丙氨酸, N-(6-氯-2-甲氧基吡啶-9-基), 2-[双(2-氯乙基)氨基]乙酯二盐酸盐, 化合物 XIII。游离碱的 ^1H NMR 为: δ 7.96-8.17 (m, 3H), 7.29-7.52 (m, 3H), 4.19 (t, $J = 5.8\text{Hz}$, 2H), 4.00 (s, 3H), 3.89 (t, $J = 5.1\text{Hz}$, 2H), 3.47 (t, $J = 6.8\text{Hz}$, 4H), 2.91 (t, $J = 6.8\text{Hz}$, 4H), 2.83 (t, $J = 5.8\text{Hz}$, 2H), 2.67 (t, $J = 5.5\text{Hz}$, 2H).

[0218] 实施例 5

[0219] β -丙氨酸, [N,N-双(2-氯乙基)], 3-[(6-氯-2-甲氧基吡啶-9-基)氨基]丙酯二盐酸盐, 化合物 XI

[0220] 步骤 A β -丙氨酸, [N,N-双(2-三异丙基硅烷氧基)乙基]乙酯

[0221] 将 β -丙氨酸乙酯盐酸盐 (1.99g, 12.9mmol)、 K_2CO_3 (6.0g, 43.4mmol) 和碘乙基三异丙基甲硅烷基醚 (9.47g, 28.9mmol) 的乙腈 (175ml) 浆状液回流 5-7 天。真空蒸发溶剂后, 利用 CH_2Cl_2 研磨固体。利用稀 Na_2CO_3 水溶液洗涤有机层, 然后利用盐水洗涤, 在无水

Na₂SO₄ 上干燥。粗产物通过硅胶色谱纯化 (1 : 4 EtOAc/ 己烷), 得到 5.60g 油状物 β-丙氨酸, [N,N-双(2-三异丙基硅烷氧基)乙基]乙酯 (83.1%)。¹H NMR: δ 4.12(q, J = 7.1Hz, 2H), 3.73(t, J = 6.8Hz, 4H), 2.92(t, J = 7.3Hz, 2H), 2.70(t, J = 6.6Hz, 4H), 2.46(t, J = 7.4Hz, 2H), 1.4-0.9(m, 45H, 包括三峰 1.25(3H) 及单峰 1.06 和 1.05)。

[0222] 步骤 B β-丙氨酸 N,N-双(2-三异丙基硅烷氧基)乙酯

[0223] 将上述步骤 A 得到的 β-丙氨酸, [N,N-双(2-三异丙基硅烷氧基)乙基]乙酯 (5.60g, 10.8mmol) 和氢氧化锂 (0.59g, 14.1mmol) 在乙醇中搅拌并回流 3 小时。分离溶剂, 将粗产物分配在 CH₂Cl₂ 和稀 NaHCO₃ 水溶液之间。利用盐水洗涤有机层, 在无水 Na₂SO₄ 上干燥并汽提, 得到 β-丙氨酸 N,N-双(2-三异丙基硅烷氧基)乙酯, 为浅黄色油状物 (5.03g, 收率 95.1%)。¹H NMR: δ 3.90(t, J = 5.5Hz, 4H), 3.04(t, J = 6.2Hz, 2H), 2.92(t, J = 5.5Hz, 4H), 2.50(t, J = 6.1Hz, 2H), 1.06(s, 42H)。

[0224] 步骤 C β-丙氨酸, [N,N-双(2-羟乙基)], 3-[(6-氯-2-甲氧基吡啶-9-基)氨基]丙酯

[0225] 在 N₂ 气氛下于 CH₂Cl₂ (1ml) 中搅拌由上述步骤 B 得到的 β-丙氨酸 N,N-双(2-三异丙基硅烷氧基)乙酯 (51.0mg, 0.104mmol)。在冰浴中骤冷的同时, 滴加 SOCl₂ (0.5ml), 搅拌反应 2.25 小时。在汽提反应混合物除去过量的 SOCl₂ 后, 加入无水 CH₂Cl₂ (0.5ml), 在 N₂ 气氛下使溶液在冰浴上骤冷。加入骤冷的 9-(3-羟基)丙氨基-6-氯-2-甲氧基吡啶 (29.0mg, 91.5mmol) 的 CH₂Cl₂ (1ml) 浆状液。0.5 小时之后, 将混合物分配在 CH₂Cl₂ 和 NaHCO₃ 水溶液之间。利用盐水洗涤有机层, 在无水 Na₂SO₄ 上干燥并汽提。利用己烷研磨得到的胶状物, 汽提己烷提取液, 得到非常粗的三异丙基甲硅烷基被保护的原料和产物的混合物 (53.5mg)。

[0226] 为了去除三异丙基甲硅烷基基团, 在冰冷却 THF (1ml) 中搅拌部分粗品被保护的二醇 (33.1mg)。在加入 HF/吡啶 (0.5ml) 之后, 在充填 N₂ 气下于环境温度中搅拌混合物 2.5 小时。将反应混合物分配在 CH₂Cl₂ 和 NaHCO₃ 水溶液之间, 利用稀 NaHCO₃ 水溶液洗涤有机层数次, 除去过量的 HF/吡啶。在利用盐水初步干燥后, 再利用无水 Na₂SO₄ 干燥, 汽提溶剂, 得到粗二醇 (13.1mg)。

[0227] 将其与另外的粗二醇 (5.0mg) 合并, 以 95 CH₂Cl₂/5 iPA/1 TFA 作为洗脱液, 通过 C-18 制备性 TLC 纯化, 得到二醇 TFA 盐。在将该盐分配在 CH₂Cl₂ 和 NaHCO₃ 水溶液之间之后, 利用盐水干燥有机层, 再利用无水 Na₂SO₄ 干燥并汽提, 得到二醇游离碱 β-丙氨酸, [N,N-双(2-羟乙基)], 3-[(6-氯-2-甲氧基吡啶-9-基)氨基]丙酯 (5.0mg)。

[0228] ¹H NMR: δ 7.92-8.25(m, 3H), 7.23-7.47(m, 3H), 4.30(t, J = 5.7Hz, 2H), 3.98(s, 3H), 3.81(t, J = 6.2Hz, 2H), 3.64(t, J = 4.9Hz, 4H), 2.86(t, J = 6.1Hz, 2H), 2.67(t, J = 4.9Hz, 4H), 2.51(t, J = 5.9Hz, 2H), 2.04(表观五重峰, 2H)。

[0229] 步骤 D β-丙氨酸, [N,N-双(2-氯乙基)], 3-[(6-氯-2-甲氧基吡啶-9-基)氨基]丙酯二盐酸盐, 化合物 XI

[0230] 将上述得到的 β-丙氨酸, [N,N-双(2-羟乙基)], 3-[(6-氯-2-甲氧基吡啶-9-基)氨基]丙酯 (4.0mg, 0.0073mmol) 溶解在 CH₂Cl₂ (1ml) 中, 在冰/水浴上骤冷。加入冰冷 SOCl₂ (0.1ml), 反应在室温下搅拌 4 小时。汽提反应混合物, 除去溶剂, 利用己烷研磨, 将其分配在 CH₂Cl₂ 和 NaHCO₃ 水溶液之间。先利用盐水干燥有机层, 再利用无水 Na₂SO₄ 干燥并汽提, 得到二氯-化合物, 为黄色胶状物。¹H NMR: δ 7.8-8.2(m, 3H), 7.2-7.5(m, 3H),

4.35(t, J = 5.9Hz, 2H), 3.85-4.10(3.99, s, OMe 和 3.9-4.0, m, NHCH_2 , 总共 5H), 3.48(t, J = 6.9Hz, 4H), 2.9-3.0(m, 6H), 2.49(t, J = 6.6Hz, 2H), 2.1-2.3(m, 2H).

[0231] 在骤冷的 CH_2Cl_2 中搅拌游离胺, 利用 1M HCl 的乙醚溶液酸化并滴入几滴甲醇汽提, 得到所需化合物 β -丙氨酸, [N, N-双(2-氯乙基)], 3-[(6-氯-2-甲氧基吡啶-9-基)氨基]丙酯二盐酸盐 (2.5mg), (3.5mg, 81%), 为黄色固体。

[0232] 利用上述步骤 C 给出的相同方法, 只是利用 6-氯-9-(2-羟基)乙氨基-2-甲氧基-吡啶替代 6-氯-9-(3-羟基)丙氨基-2-甲氧基-吡啶, 可制得类似的二醇。

[0233] ^1H NMR: δ 7.96-8.13(m, 3H), 7.20-7.47(m, 3H), 4.76(t, J = 4.9Hz, 2H), 3.99(s, 3H), 3.92-4.14(m, 2H), 3.60(t, J = 5.1Hz, 4H), 2.78(t, J = 6.1Hz, 2H), 2.63(t, J = 5.1Hz, 4H), 2.45(t, J = 6.0Hz, 2H).

[0234] 通过类似于步骤 D 的方法, 将其转变成 β -丙氨酸, [N, N-双(2-氯乙基)], 2-[(6-氯-2-甲氧基吡啶-9-基)氨基]乙酯二盐酸盐, 化合物 XII. ^1H NMR: δ 7.94-8.20(m), 7.20-7.50(m), 4.42($\text{CH}_2\text{OC}=\text{O}$), 3.90-4.10(OCH_3 , NHCH_2), 3.46(CH_2Cl), 2.82($\text{N}(\text{CH}_2)_3$), 2.39-2.56($\text{CH}_2\text{C}=\text{O}$).

[0235] 实施例 6

[0236] [N, N-双(2-氯乙基)]-2-氨基乙基 4,5',8-三甲基-4'-补骨脂素乙酸酯盐酸盐, 化合物 XIV

[0237] 步骤 A [N, N-双(2-羟乙基)]-2-氨基乙基 4,5',8-三甲基-4'-补骨脂素乙酸酯

[0238] 在 100°C 下, 搅拌 4,5',8-三甲基-4'-补骨脂素乙酸甲酯 (250mg, 0.832mmol)、三乙醇胺 (12ml) 和 1M HCl 的乙醚 (2ml) 浆状液 2 小时。将所得亮褐色溶液冷却至室温, 将其分配在 CH_2Cl_2 和饱和 NaHCO_3 水溶液之间。利用饱和 NaHCO_3 水溶液漂洗有机层数次, 利用无水 Na_2SO_4 干燥之后, 真空除去溶剂, 将残留物分配在 CH_2Cl_2 和 1M HCl 水溶液之间。利用 CH_2Cl_2 漂洗水层数次, 然后在存在有机溶剂条件下, 利用 $\text{K}_2\text{CO}_3(\text{s})$ 使其呈碱性。利用水漂洗含中性产物的有机层, 然后干燥并浓缩。重复酸-碱提取步骤, 得到所需产物, 为米色固体 (84.3mg, 24.3%): ^1H NMR: δ 7.53(s, 1H), 6.24(s, 1H), 4.23(t, J = 5.4Hz, 2H), 3.69(s, 2H), 3.56(t, J = 5.3Hz, 4H), 2.82(t, J = 5.4Hz, 2H), 2.69(t, J = 5.3Hz, 4H), 2.57(s, 3H), 2.51(d, J = 1.1Hz, 3H), 2.47(s, 3H).

[0239] 步骤 B [N, N-双(2-氯乙基)]-2-氨基乙基 4,5',8-三甲基-4'-补骨脂素乙酸酯盐酸盐

[0240] 将亚硫酸氯 (0.2ml) 加入到上述二醇 (9.8mg, 0.023mmol) 的 CH_2Cl_2 (1ml) 冰冷混合物中, 在氮气气氛下于室温下搅拌过夜。浓缩所得浆状液, 然后利用己烷研磨, 得到所需产物 (6.2mg, 53.9%) 为黄白色固体: ^1H NMR(CD_3OD): δ 7.71(s, 1H), 6.28(s, 1H), 4.56(t, J = 4.8Hz, 2H), 3.95(t, J = 6.1Hz, 4H), 3.89(s, 2H), 3.60-3.83(m, 6H), 2.54(s, 3H), 2.53(s, 3H), 2.50(s, 3H).

[0241] 实施例 7

[0242] 合成 β -丙氨酸, N-(吡啶-9-基), 2-[双(2-氯乙基)氨基]乙酰胺 (化合物 XV)

[0243] 步骤 A 2-[N', N'-双(2-羟乙基)]-N-(叔丁氧基羰基)乙二胺

[0244] 在 0℃ 下, 向 N-(叔丁氧基羰基)乙醇胺 (1.21g, 7.5mmol) 和三乙胺 (1.57ml, 1.1g, 11mmol) 的无水 CH_2Cl_2 (25ml) 溶液中滴加甲磺酰氯 (0.64ml, 0.95g, 8.3mmol)。反应在 0℃ 下搅拌 1 小时, 温热至 23℃ 并搅拌过夜。真空除去挥发性物质, 得到甲磺酸盐, 为白色固体。加入二乙醇胺 (7.2ml, 7.9g, 75mmol), 在搅拌条件下, 将反应混合物加热至 75℃ 6 小时。将粗反应混合物分配在水 (60ml) 和 CH_3Cl (4×20ml) 之间。利用盐水 (20ml) 洗涤合并的有机层, 在 Na_2SO_4 上干燥。真空去除溶剂, 得到 1.21g (65%) 二醇, 为粘稠黄色油状物。

[0245] ^1H NMR: δ 5.51–5.39 (m, 1H), 3.61 (t, J = 4.9Hz, 4H), 3.29–3.13 (m, 2H), 2.68–2.52 (m, 6H), 1–44 (s, 9H)。

[0246] 未观察到羟基质子。

[0247] 步骤 B 2-[N', N' - 双 (2-叔丁基二甲基硅烷氧基乙基)]-N-(叔丁氧基羰基)乙二胺

[0248] 在 0℃ 下, 向上述步骤 A 得到的二醇 (1.21g, 4.87mmol) 和吡啶 (1.59ml, 1.55g, 19.6mmol) 的无水 CH_2Cl_2 (12ml) 搅拌溶液中加入叔丁基二甲基硅烷基氯 (2.21g, 14.7mmol)。将反应混合物温热至 23℃ 并搅拌 2 天。利用 CH_2Cl_2 (80ml) 稀释反应混合物并先利用水 (3×25ml) 洗涤, 再用盐水 (3×25ml) 洗涤。在 Na_2SO_4 上干燥有机层。真空除去溶剂, 得到 2.26g (97%) 浅黄色油状物。

[0249] ^1H NMR: δ 5.37–5.22 (m, 1H), 3.62 (t, J = 6.2Hz, 4H), 3.19–3.08 (m, 2H) 2.63 (t, J = 6.2Hz, 6H), 1.42 (s, 9H), 0.873 (s, 18H), 0.04 (s, 12H)。

[0250] 步骤 C 2-[N, N-双 (2-叔丁基二甲基硅烷氧基乙基)]乙二胺

[0251] 在 23℃ 下, 向含步骤 B 的被护胺 (4.24g, 8.89mmol) 的烧瓶中加入 5ml 三氟乙酸。反应混合物在 23℃ 下搅拌 15 分钟, 然后真空除去三氟乙酸。将粗产物分配在 2N NaOH (100ml) 和 CH_2Cl_2 (3×35ml) 之间。在 Na_2SO_4 上干燥合并的有机层。真空除去溶剂, 得到 1.76g (53%) 黄色油状物。 ^1H NMR: δ 3.66 (t, J = 6.5Hz, 4H), 2.72–2.53 (m, 8H), 1.72–1.63 (m, 2H), 0.87 (s, 18H), 0.02 (s, 12H)。

[0252] 步骤 D β -丙氨酸, N-(叔丁氧基羰基), 2-[双 (2-叔丁基二甲基硅烷氧基乙基)氨基]乙酰胺

[0253] 在 -15℃ 下, 向 3-(N-叔丁氧基羰基)氨基丙酸 (822.0mg, 4.34mmol) 和 4-甲基吗啉 (442.0mg, 4.37mmol) 的 14ml 无水 THF 溶液中加入氯甲酸异丁基酯 (0.53ml, 0.56g, 4.1mmol)。反应混合物在 -15℃ 下搅拌 1 分钟, 接着加入由步骤 C 得到的胺 (1.72g, 4.57mmol)。将反应混合物温热至 23℃, 搅拌 1 小时。然后过滤混合物, 利用 THF (5ml) 洗涤沉淀物, 真空浓缩滤液。将残留物质分配在 2N NaOH (50ml) 和 CH_2Cl_2 (3×20ml) 之间。在 Na_2SO_4 上干燥合并的有机层。真空除去溶剂, 得到 2.25g 褐黄色胶状物。通过中压液相色谱 (硅胶, 1 : 1 $\text{CHCl}_3/\text{EtOAc}$) 纯化粗品 (2.25g), 得到 627.0mg (26%) 浅黄色油状物。 ^1H NMR: δ 3.63 (t, J = 6.2Hz, 4H), 3.54–3.35 (m, 4H), 3.20–3.19 (m, 2H), 2.71–2.50 (m, 6H), 1.43 (s, 9H), 0.89 (s, 18H), 0.05 (s, 12H)。

[0254] 未观察到酰胺和氨基甲酸酯质子。

[0255] 步骤 E β -丙氨酸, 2-[双 (2-叔丁基二甲基硅烷氧基乙基)氨基]乙酰胺

[0256] 在 23℃ 下, 将上述步骤 D 得到的被护胺 (627.0mg, 1.14mmol) 溶解在三氟乙酸

(5ml) 中。搅拌所得溶液 5 分钟 (直至停止放出 CO_2) ,接着真空除去三氟乙酸。将残留物质分配在饱和 NaHCO_3 (50ml) 和 CH_2Cl_2 ($3 \times 20\text{ml}$) 之间。在 Na_2SO_4 上干燥合并的有机层,真空除去溶剂,得到 203.4mg (40%) 浅黄色油状物。

[0257] 步骤 F β -丙氨酸, N-(吡啶-9-基), 2-[双(2-叔丁基二甲基硅烷氧基乙基)氨基]乙酰胺

[0258] 将步骤 E 粗品胺 (203.4mg, 0.45mmol)、9-甲氧基吡啶 (96.8mg, 0.46mmol) 和甲醇 (10ml) 的混合物加热至回流 4 小时。反应混合物冷却至 23°C , 再搅拌 2.5 天。真空除去甲醇, 将残留物质分配在 2N NaOH (50ml) 和 CH_2Cl_2 ($3 \times 20\text{ml}$) 之间。在 Na_2SO_4 上干燥合并的有机层, 真空除去溶剂, 得到 69.6mg 黄色油状物。通过 TLC (硅胶, 1 : 1 $\text{CHCl}_3/\text{EtOAc}$) 纯化粗品 (69.6mg), 得到 23.4 (8.3%) 黄色油状物。

[0259] ^1H NMR : δ 8.19 (d, $J = 8.8\text{Hz}$, 2H), 8.06 (d, $J = 8.8\text{Hz}$, 2H), 7.65 (br t, $J = 7.6\text{Hz}$, 2H), 7.36 (br t, $J = 7-6\text{Hz}$, 2H), 6.8-6.7 (m, 1H), 4.06 (t, $J = 5.6\text{Hz}$, 2H), 3.61 (t, $J = 5.8\text{Hz}$, 4H), 3.37-3.32 (m, 2H), 2.72-2.61 (m, 6H), 2.51 (t, $J = 5.5\text{Hz}$, 2H), 0.86 (s, 18H), 0.02 (s, 12H). 未观测到胺质子, ^{13}C NMR : δ 172.1, 152.4, 149.3, 130.5, 129.3, 123.7, 118.0, 112.8, 62.3, 57.4, 54.1, 47.4, 38.2, 36.5, 26.4, 18.8, -4.8.

[0260] 步骤 G β -丙氨酸, N-(吡啶-9-基), 2-[双(2-羟乙基)氨基]乙酰胺二盐酸盐

[0261] 在 23°C 下, 向步骤 F 得到的双被护二醇 (22.0mg, 0.04mmol) 的异丙醇 (1.0ml) 搅拌溶液中加入 5-6N HCl /异丙醇溶液 (0.05ml)。在 23°C 下搅拌反应混合物 17 小时, 通过真空过滤收集所得的黄色沉淀。利用另外的 1.0ml 异丙醇漂洗黄色固体。真空 (过夜) 除去残留的异丙醇, 得到 11.4mg (69%) 二醇盐酸盐, 为黄色固体。

[0262] ^1H NMR (CD_3OD) : δ 8.52 (d, $J = 8.8\text{Hz}$, 2H), 7.96 (br t, $J = 7.5\text{Hz}$, 2H), 7.82 (d, $J = 8.4\text{Hz}$, 2H), 7.57 (br t, $J = 7.5\text{Hz}$, 2H), 4.49 (t, $J = 6.2\text{Hz}$, 2H), 3.91 (t, $J = 4.8\text{Hz}$, 4H), 3.74-3.56 (m, 2H), 3.53-3.38 (m, 6H), 2.97 (t, $J = 6.1\text{Hz}$, 2H).

[0263] 未观察到酰胺、胺和羟基质子。

[0264] 步骤 H β -丙氨酸, N-(吡啶-9-基), 2-[双(2-氯乙基)氨基]乙酰胺二盐酸盐

[0265] 在 23°C 下, 向步骤 G 得到的二醇 (11.4mg, 0.024mmol) 的 CH_3CN (1.0ml) 搅拌悬浮液中加入 SOCl_2 (0.12ml, 200mg, 1.7mmol)。在 23°C 下搅拌反应混合物 15 分钟, 将溶液加热至 50°C 3.5 小时。通过真空过滤收集所得的黄色沉淀物, 利用 CH_3CN ($3 \times 1.0\text{ml}$) 漂洗并真空干燥, 得到 8.3mg (67%) 黄色粉状物 (通过 HPLC 测定, 纯度为 95%)。

[0266] ^1H NMR (CD_3OD) : δ 8.55 (d, $J = 8.7\text{Hz}$, 2H), 8.00 (br t, $J = 7.7\text{Hz}$, 2H), 7.84 (d, $J = 8.7\text{Hz}$, 2H), 7.59 (br t, $J = 7.7\text{Hz}$, 2H), 4.51 (t, $J = 6.2\text{Hz}$, 2H), 3.98 (t, $J = 5.7\text{Hz}$, 4H), 3.71 (t, $J = 5.7\text{Hz}$, 4H), 3.65-3.55 (m, 2H), 3.55-3.42 (m, 2H), 2.99 (t, $J = 6.2\text{Hz}$, 2H).

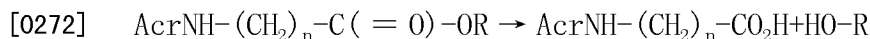
[0267] 未观察到酰胺和胺质子。

[0268] 实施例 8

[0269] 脆性化合物的水解

[0270] 对于脆性连接基中包含酯基 (“正向”和“反向”酯) 的脆性化合物, 为了确定酯的水解量, 本发明研究了一些典型化合物。

[0271] 本发明研究了下列反应：



[0273] (“正向酯”) (“吡啶酸”)

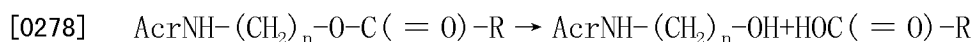
[0274] 其中 AcrNH 表示带有下表中所指明的取代基的 9-氨基吡啶, 以及 n 和 R 也如表中所指明。表 III 表明了当吡啶环与烷氨基之间的酯连接为饱和时酯水解速率的提高情况。不论吡啶部分位于酯的酸末端或醇末端, 其水解速率都很快。

[0275] 表 III

[0276]

100 分钟时的水解百分数 (水溶液, pH8, 37℃)				
吡啶取代基(S)	n =	R = 甲基	R = $-(\text{CH}_2)_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH})_2$	R = $-(\text{CH}_2)_3\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH})_2$
6-Cl, 2-OMe	1	28 %		
6-Cl, 2-OMe	2	22 %		
6-Cl, 2-OMe	3	5 %		
6-Cl, 2-OMe	4	2 %		
6-Cl, 2-OMe	7	<1 %		
2-CO ₂ CH ₃	2	9 %	55 %	57 %
2-CO ₂ CH ₃	3		18 %	
2-CO ₂ CH ₃	4		17 %	

[0277] 对于反应：



[0279] (“反向酯”) (“吡啶醇”)

[0280] 其中 AcrNH 表示带有下表中所指明的取代基的 9-氨基吡啶, 以及 n 和 R 也如表中所指明, 可获得如下结论：

[0281] 表 IV

[0282]

100 分钟时的水解百分数 (水溶液, pH8, 37℃)				
吡啶取代基(S)	n =	R = 甲基	R = $-(\text{CH}_2)_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH})_2$	R = $-(\text{CH}_2)_3\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH})_2$
6-Cl, 2-OMe	2	2 %	99 %	
6-Cl, 2-OMe	3	2 %	65 %	

[0283] 当 pH 为 3 时, 表 III 和 IV 中所有化合物在 100 分钟时的水解 $\leq 1\%$ 。

[0284] 由于氮芥化合物同时发生多重降解反应, 所以不能利用相同的方法来评价。尽管

如此,当在如表 III 和 IV 的相同条件下孵育化合物 VIII 时,长时间孵育后的主要产物为吡啶酸 ($\geq 95\%$) 且在 100 分钟时形成 40%。这可与表中类似的二醇的记录相比 (100 分钟时的水解百分比为 57%)。

[0285] 从表 III 和 IV 中的数据可明显地看出,酯连接键的水解速率与 9-氨基吡啶部分和酯基的连接臂长度成反比 (在表 III 和 IV 中,随着 n 的增加,100 分钟时的水解量降低)。这就提供了一种调整化合物水解速率的方法。这种调整连接基分解速率的能力使得允许根据需要调节各种应用条件下的化合物反应度。

[0286] 材料

[0287] 下述材料可用于下列实施例中。

[0288] 尽管可从 Baxter Healthcare Corp., Deerfield, IL 市购,但本实验及下列实验中所用的 Adsol 是通过无菌过滤下述混合物制得的:22g 葡萄糖、9g NaCl、7.5g 甘露醇和 0.27g 腺嘌呤,于 1 升蒸馏水中。

[0289] 奎纳克林氮芥可从 Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO. 得到。

[0290] 全血可从 Sacramento Blood Center (Sacramento CA) 得到。

[0291] 实施例 9

[0292] 灭活水疱性口炎病毒 (VSV)

[0293] 通过下列方法制备各种化合物的贮备液 (典型地为 10-30mM):将适量物质溶解在先前利用 2mM H_3PO_4 酸化的血库盐水中,然后迅速冷冻成 1ml 等分试样。在使用时,将等分试样温热至 $\leq 10^\circ\text{C}$ 并在 1 小时内使用。

[0294] 为了制备压紧血红细胞 (PRBC),将测定过 Hct 的全血以 3800rpm 转速离心 6 分钟。分离上清液血浆并测定。加入 Adsol,得到 60% Hct 的 PRBC。血浆浓度为 15-20%。

[0295] 将 VSV (贮备液,大约 10^9 pfu/ml,由 ATCC 美国典型细胞培养物 (American Type Cell Culture), Rockville, MD 得到) 以 1:10 稀释至组织培养基 (含 10% NCS 的 DMEM) 或 PBRC,从而得到试验培养基,该培养基为装入 2ml 无菌 0-环试管的等分试样 (1ml)。

[0296] 向每个试管中加入足够的试验化合物溶液,得到浓度为 10-300 μM 的试验化合物。通过完全抽吸数次混合物,将各种样品快速混合。在环境温度下孵育悬浮液 4 小时。在 BHK (幼鼠肾) 宿主细胞中孵育处理过的培养基之后,确定病毒滴定度。直接使用 PRBC,而不只是上清液。病毒杀伤与细胞培养液中的蚀斑出现的量成反比。未处理培养基的滴定度与处理过的样品滴定度之间的差异能够给出该浓度时的化合物 log 杀伤。检出限为 $10^{1.4}$ pfu/ml。

[0297] 在组织培养基中,在 $< 50 \mu\text{M}$ 试验化合物时,奎纳克林氮芥 (QM) 和化合物 IV、VI、XI、VII 和 VIII 灭活了 $> 3\log$ s VSV。化合物 XII 在大约 200 μM 时灭活 2log。由于酯的水解,该化合物被认为是特别不稳定的。如实施例 8 表 IV 中的第一个记录所表示,在 pH 8、 37°C 、100 分钟后,相应二醇化合物 (β -丙氨酸, [N, N-双 (2-羟乙基)], 2-[(6-氯-2-甲氧基吡啶-9-基) 氨基] 乙酯) 水解 99%。氮芥化合物似乎也经历着快速水解。这就说明了向核酸引导分子效应子部分的固定子部分的重要性,以及说明了调整 9-氨基吡啶类化合物反应度,从而使得它们在实际使用条件下具有作用的重要性。在所描述的灭活记录中,化合物 XII 的水解有望与灭活相竞争。

[0298] 在 PRBC 中,在试验化合物浓度 $< 150 \mu\text{M}$ 时, QM 和化合物 IV、VI、VIII、V 和 XIII

的灭活 $> 2\log$ s VSV。

[0299] 实施例 10

[0300] 灭活小肠结肠炎耶尔森氏菌

[0301] 根据实施例 9 制备 VSV 的方法制备 PRBC 和贮备液。

[0302] 在振荡器上于 37°C 下, 在 LB- 肉汤培养基上培养耶尔森氏菌属 (California Department of Health Services, Microbial Disease Laboratory, Berkeley, CA)。取一部分 (10ml) 在 15ml 锥形试管中以 2500rpm 转速离心 10 分钟。将沉淀再悬浮于 1ml Adsol 中, 得到大约 10^9 细菌 /ml。为了测定滴定度, 测量 1 : 100 稀释液在 Adsol (10^8 细菌 /ml 处的 $\text{OD}_{610} = 0.2$) 中的光学密度。然后, 将细菌原液以 1 : 100 稀释至盐水或 PRBC 中, 得到试验培养基, 该培养基为装入 2ml 无菌 0- 环试管的等分试样 (1ml)。

[0303] 向每个试管中加入足够的试验化合物溶液, 得到浓度为 10-300 μM 的试验化合物。通过完全抽吸数次混合物, 将各种样品快速混合。在环境温度下将其孵育 2 小时, 然后置于开始含 100 μl 样品的 LB- 琼脂板上, 开始时稀释浓度为 10^{-1} , 然后继续稀释至 10^{-8} 。将该板在 37°C 下孵育过夜并计数克隆数。未处理培养基的滴定度与处理过的样品滴定度之间的差异能够给出该浓度时的化合物 $\log$ 杀伤。检出限为 10 细菌 /ml。

[0304] 在盐水中, 于浓度 $\leq 200 \mu\text{M}$ 时, 奎纳克林氮芥 (QM) 和化合物 IV、VI、VIII、V、IX 和 X 灭活了 $> 2\log$ s 耶尔森氏菌。

[0305] 在 PSBC 中, 于浓度 $\leq 200 \mu\text{M}$ 时, QM 和化合物 VI、VIII、V、X 和 XIII 灭活了 $> 2\log$ s 耶尔森氏菌属。

[0306] 实施例 11

[0307] 引入本发明化合物之后的血液功能测定

[0308] 本发明化合物意向中的一个用途包括将一种或多种本发明化合物加入到输注用血液或血液制品中。血液或血液制品在利用化合物处理后必须保持适于输注。为了评估化合物对血红细胞功能的作用, 将化合物进行下述试验。

[0309] 通过以 2500rpm 离心已知 Hct 的全血 6 分钟, 制备 50% 血细胞比容 (Hct) 为 50% 的压紧血红细胞。分离上清液并测定。利用足够体积的 Adsol 稀释悬浮液, 得到所需的 Hct。

[0310] 将 1.5ml PRBC 置于各自 2ml 0- 环试管中, 加入足够的试验化合物贮备液, 得到所需的浓度。样品在环境温度下孵育 4 小时, 然后在 4°C 下储存过夜。按照 Hogman 等人., Transfusion, 31 :26-29 (1991) 描述的方法测定溶血。

[0311] 通过利用水以两步稀释 $10 \mu\text{M}$ 孵育混合物制备各种样品的溶胞标准, 得到最终稀释为 1 : 4000。

[0312] 对于测定, 从 4°C 储存位置中取出样品并温热 < 15 分钟。直接涡旋混合后, 分离等分试样并在 14,000rpm 下旋转 2 分钟。分离上清液并在 14000rpm 下旋转 10 分钟。分离上清液并根据需要在水中稀释。相对于水空白对照组, 记录溶胞标准在 414nm 处的吸光度和稀释的上清液。计算溶血百分比:

[0313] $(100\% - 50\% \text{ Hct}) \times (\text{样品 } A_{414} \times \text{稀释因子}) / (\text{溶胞标准 } A_{414} \times 4000)$

[0314] 由于存在本发明化合物, 样品 A_{414} 任何吸光度均未校正。结果示于表 Va 中。

[0315] 表 Va

[0316] 第一天的溶血数据

[0317]

化合物和浓度	溶血百分数	被试样品的序号
BBS*	0.066	14
ABBS**	0.065	8
150 μ M QM***	0.220	14
300 μ M QM	0.320	14
150 μ M IV	0.091	14
300 μ M IV	0.109	14
150 μ M VI	0.103	14
300 μ M VI	0.140	14
150 μ M VIII	0.110	6
300 μ M VIII	0.135	6
150 μ M V	0.136	2
300 μ M V	0.149	2
150 μ M IX	0.116	2
300 μ M IX	0.099	2
150 μ M X	0.121	2
300 μ M X	0.153	2

[0318] *BBS = 血库盐水

[0319] **ABBS = 酸性血库盐水

[0320] ***QM = 奎纳克林氮芥

[0321] 细胞外钾可利用 Ciba Corning 型 614K⁺/Na⁺ 分析仪 (Ciba Corning Diagnostics Corp., Medford, MA) 测定。ATP 可利用 Sigma 方法 No. 366 (Sigma, St. Louis, MO) 测定。

[0322] 表 Vb 表明了该实验中细胞外钾相对于未处理 PRBC 样品的对照值的相对值。例如, 相对值 1.03 表示处理过的样品的细胞外钾浓度比未处理对照组大 3%。

[0323] 表 Vb 细胞外钾相对水平 (平行测定值)*

[0324]

化合物	浓度 (μ M)	第 1 天	第 7 天	第 14 天
IV	100	1.01(1)	0.98(1)	1.03(1)
	200	1.05(1)	1.15(1)	1.01(1)
	300	1.03(1)	1.15(1)	1.15(1)
V	300	1.04-1.46(4)	0.96-1.01(4)	0.95-1.01(4)

[0325] *[K⁺] (处理过)/[K⁺] (未处理)

[0326] 表 Vc 表明了该实验中相对于未处理 PRBC 样品对照值的 ATP 相对值。例如, 相对值 1.03 表示处理过的样品的 ATP 比未处理对照组大 3%。

[0327] 表 Vc ATP 相对水平 (平行测定值)*

[0328]

化合物	浓度 (μ M)	第 1 天	第 7 天	第 14 天
IV	100	1.01(1)	0.93(1)	0.94(1)
	200	1.05(1)	0.94(1)	0.94(1)
	300	1.03(1)	0.93(1)	0.92(1)
V	300	0.96-1.00(4)	0.91-1.01(4)	0.94-1.01(4)

[0329] *[ATP] (处理过)/[ATP] (未处理)

[0330] 实施例 12

[0331] 通过本发明化合物灭活 HIV

[0332] TC 培养基中的与细胞相关的 HIV (Popovic 等人., 科学 (Science), 224:

497(1984) :H9-IIIb 细胞悬浮在 TC 培养基中,得到滴定度大约 $\geq 10^6$ pfu/ml 的悬浮液。在 15ml 锥形试管中向 2ml 试验介质等分试样中加入足够量的试验化合物溶液,得到所需浓度的活性材料。通过完全抽吸数次,将悬浮液立即混合,然后快速涡旋。样品在环境温度下孵育 2-4 小时,然后离心。将沉淀悬浮在 1ml 蚀斑测定稀释液中,然后在 -80°C 下迅速冷冻,通过微蚀斑测定滴定度。(Hanson 等人., 临床微生物杂志 (J. Clin. Micro.), 28 : 2030(1990))。

[0333] 在试验化合物浓度为 $\leq 25 \mu\text{M}$ 时,化合物奎纳克林氮芥、IV 和 VI 灭活 $> 3\log$ s HIV。

[0334] PRBC 中与细胞相关的 HIV :为了在 PRBC 中进行测定,根据 VSV 测定中描述的方法制备压紧细胞。在稀释离心细胞之前,将 HIV9-IIIb 细胞加入到 Adso1 中。通过完全抽吸所有物质混合所得悬浮液。在完成试验化合物孵育之时,利用含 $5 \mu\text{l}$ 肝素的 3ml 1 : 1 血浆 :DMEM 溶液稀释样品。然后利用 ficoll-hypaque 梯度分离感染的细胞,再悬浮在 1ml 稀释剂中并冷冻,以备以后滴定之用。

[0335] 在试验化合物浓度为 $\leq 200 \mu\text{M}$ 时,化合物奎纳克林氮芥、VI 和 V 灭活 $> 3\log$ s HIV。

[0336] PRBC 中不含细胞的 HIV :方法类似于上文所述,只是在制备后将不含细胞的 HIV 直接加入到 PRBC 中。在孵育之后离心培养基,冷冻上清液,以备以后滴定之用。

[0337] 在试验化合物浓度为 $\leq 100 \mu\text{M}$ 时,化合物奎纳克林氮芥、IV、V 和 VI 灭活 $> 3\log$ s HIV。

[0338] 尽管通过说明及实施例清楚完整地对上述发明进行了详细描述,但对本领域技术人员来讲非常明显 :可以进行某些改变和修饰。因此,说明书和实施例不应当用来限制本发明的范围,本发明范围已描述在所附权利要求书中。美国专利 5,559,250 和 5,399,719 的全部在此引作参考。这里所引用的所有其它专利和参考文献均在此引作参考。