

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2020 年 3 月 5 日 (05.03.2020)



(10) 国际公布号
WO 2020/042729 A1

(51) 国际专利分类号:
C07H 19/173 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
C07H 1/00 (2006.01) *A61P 35/02* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2019/092094

(22) 国际申请日: 2019 年 6 月 20 日 (20.06.2019)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201811003442.6 2018 年 8 月 30 日 (30.08.2018) CN

(71) 申请人: 浙江大学 (ZHEJIANG UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国浙江省杭州市西湖区余杭塘路 866 号浙江大学, Zhejiang 310058 (CN)。

(72) 发明人: 余露山 (YU, Lushan); 中国浙江省杭州市浙江省杭州市西湖区余杭塘路 866 号浙江大学药学院, Zhejiang 310058 (CN)。 曾苏 (ZENG, Su); 中国浙江省杭州市杭州市西湖区余杭塘路 866 号浙江大学药学院, Zhejiang

310058 (CN)。 张阳 (ZHANG, Yang); 中国浙江省杭州市西湖区余杭塘路 866 号浙江大学药学院, Zhejiang 310058 (CN)。

(74) 代理人: 杭州求是专利事务所有限公司 (HANGZHOU QIUSHI PATENT OFFICE CO., LTD.); 中国浙江省杭州市西湖区玉古路 147 号黄鸿年科技综合大楼 215 室陈升华, Zhejiang 310013 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL,

(54) Title: 6-DISULFIDE-SUBSTITUTED-2'-DEOXYGUANOSINE COMPOUND AND PREPARATION METHOD THEREFOR AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 6-双硫取代-2'-脱氧鸟苷类化合物及其制备方法和应用

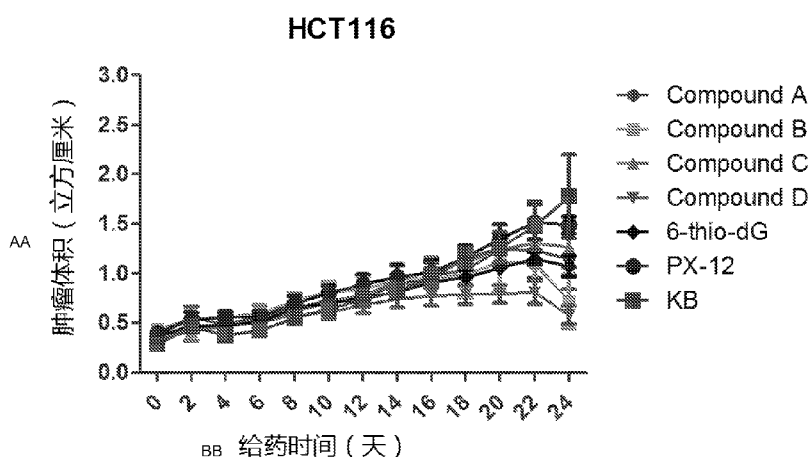
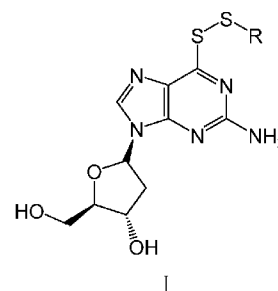


图 1



(57) Abstract: Disclosed are a 6-disulfide-substituted-2'-deoxyguanosine compound and a preparation method therefor and a use thereof in an anti-tumor drug. Using 2'-deoxyguanosine as a structure mother nucleus, the present invention designs and synthesizes a series of brand-new thioredoxin-1 (Trx-1) inhibitors. The compound of the present invention is in a structure of formula I, and Trx-1 activity inhibition testing is performed on such compounds, showing clear inhibitory activity. It is indicated from in vivo and in vitro study that these compounds show significant tumor inhibitory effects toward multiple types of tumors, can be applied to drugs of tumors related to human body cell proliferation, and provide a new way for the study of anti-cancer drugs.

SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,
US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

- (84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区
保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ,
NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM,
AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG,
CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU,
IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT,
RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告 (条约第21条(3))。

(57) 摘要: 本发明公开了一种6-双硫取代-2'-脱氧鸟苷类化合物及其制备方法和在抗肿瘤药物中的应用, 本发明以2'-脱氧鸟苷作为结构母核, 设计并合成了系列全新的硫氧还原蛋白-1(Trx-1)抑制剂, 本发明化合物为式 I 结构, 并对该类化合物进行了Trx-1活性抑制测试, 显示出明显的抑制活性。体内外研究表明, 这些化合物对多种类型肿瘤表现出显著的抑瘤作用, 可应用于人体细胞增殖相关的肿瘤的药物中, 为抗癌药物的研究提供了新的途径。

6-双硫取代-2'-脱氧鸟苷类化合物及其制备方法和应用

技术领域

本发明涉及药物化学技术领域，具体涉及一种 6-双硫取代-2'-脱氧鸟苷类化合物及其制备方法和在抗肿瘤药物中的应用。

背景技术

癌症是危害人类健康的最主要的疾病。据 2019 年 1 月我国最新的癌症统计数据显示，2015（统计数据晚 3 年）年我国恶性肿瘤发病约 392.9 万人，死亡 233.8 万人，恶性肿瘤死亡占居民全部死因的 23.9%。而 2018 年全球范围内有 1810 万癌症新发病例和 960 万癌症死亡病例。由于肿瘤的高度异质性，一些抗肿瘤药物只能对某种或是某类肿瘤有效，而且随着重复给药的进行又非常容易耐药，这使得肿瘤的复发率和死亡率居高不下，因此，抗癌药物的研发始终是新药研发的热点。

目前，临床上结直肠癌的常用治疗方案是 5-FU 联合奥沙利铂或伊立替康，但效果都不佳，特别是对中晚期病人。恶性黑色素瘤虽然临床上发病率较低，但转移性恶性黑色素瘤目前临床上没有好的治疗手段，一线用药达卡巴嗪疗效有限且毒副作用大。由此可见，开发疗效好、毒副作用低的结直肠癌和黑色素瘤治疗药物非常必要，同时也具有非常好的市场前景。

硫氧还原蛋白-1（Trx-1）是一种促进肿瘤生长，抑制细胞凋亡，上调低氧诱导因子-1 α 和血管内皮生长因子的低分子量的细胞氧化还原蛋白。Trx-1 一直是发现新型抗癌药物的热门靶点。研究表明，二硫类化合物 PX-12 作为新型硫氧还原蛋白抑制剂，化学名称为 1-甲基丙基-2-咪唑基二硫醚，其二硫键是该药物分子发生反应的关键活性区域，通过降低硫氧还原蛋白还原酶和硫氧还原蛋白的活性而触发了其分子靶向性的抗癌作用。目前，国内外对 Trx-1 促进肿瘤生长的机制，PX-12 的抑瘤作用机制进行了充分的研究，并对 PX-12 的构效关系和结构优化等进行了研究。虽然，在临床 II 期试验中 PX-12 对进展性胰腺癌患者（一线化疗方案失败患者）未表现出显著的抑瘤作用，但是其对结直肠癌的治疗作用还是被认为值得期待。

端粒位于真核线性染色体末端，作用是保持染色体的完整性和控制细胞分裂周期。由于“末端复制问题”，氧化损伤和其他复制相关的末端处理事件，端粒在正常体细胞中每轮 DNA 复制逐渐缩短。端粒酶通过在细胞中的线性染色体末端添加六聚体端粒 DNA (TTAGGG) 重复来减少端粒缩短。因而，在端粒酶阴性的细胞中，因为端粒缩短，细胞会进行复制性衰老，但在端粒酶阳性的细胞中，细胞会永生化，有可能发展为癌症。大多数正常的体细胞人体细胞不具有端粒酶活性，除了生殖细胞，干细胞，激活的淋巴细胞，但在约 85% 至 90% 的原发性人类癌症中几乎普遍检测到它。近年来，针对端粒酶靶点的药物设计和研究越来越受到人们的关注，相对其他方法其肿瘤特异性高，副作用较小，主要包括四类：①端粒酶酶活性的直接抑制；②直接靶向端粒完整性，从而促进快速端粒功能障碍和癌症生长抑制；③靶向端粒酶的疫苗；④靶向端粒酶的病毒，其中研究最多的是端粒酶酶活性的直接抑制。目前已有多个针对该靶点的候选新药处于临床试验研究阶段，如 imetelstat, GV1001, GRNVAC1 等。2-脱氧鸟苷类化合物 6-thio-dG 是最新发现的小分子端粒酶抑制剂，化学名称是核苷 6-硫代-2'-脱氧鸟苷，可被端粒酶识别，并被整合到从头合成的端粒中，导致端粒功能障碍。由于除了生殖细胞，干细胞，激活的淋巴细胞外，大多数正常的人体细胞不具有端粒酶活性，但在约 85% 至 90% 的原发性人类癌症中几乎普遍检测到它，因此，该类药物具有较为广谱的肿瘤抑制作用。目前，6-thio-dG 正处于临床前开发阶段，预计在 2019 年 2-3 季度会进行临床 I 期研究。

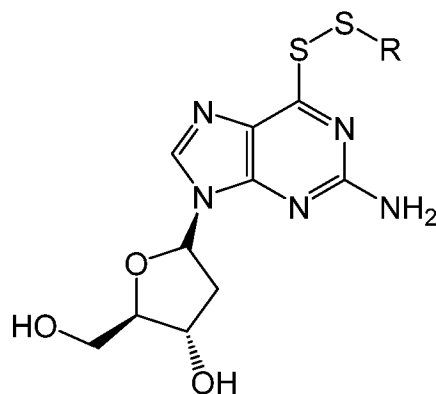
综上所述，Trx-1 和端粒酶在肿瘤的发生和发展过程中起着关键性的作用，本课题组针对 Trx-1 和端粒酶设计了多种同时具有 Trx-1 和端粒酶抑制作用的双靶点小分子化合物，获得了颇具苗头的具有治疗结肠癌和黑色素瘤作用的候选药物 A、B、C、D。拟通过本课题的实施，完成候选药物 A、B、C、D 的成药性综合评价，并按申报要求基本完成 A、B、C、D 的临床前评价，促使具有自主知识产权的创新性候选药物脱颖而出，为后续的新药临床研究奠定基础。

本项目的开展实施，将加强和提升我国在抗肿瘤创新药物方面的研发能力，促进具有我国自主知识产权的抗肿瘤创新药物的研制，为我国医药产业提供科技支撑和保障。同时对我国的人口健康、社会和经济的可持续发展有着重要的战略意义。

发明内容

本发明提供了一种 6-双硫取代-2'-脱氧鸟苷类化合物及其制备方法和应用，这类化合物的酶活性试验和抗肿瘤活性（细胞生长抑制活性试验和裸鼠荷瘤试验）都达到了较好的效果。

一种 6-双硫取代-2'-脱氧鸟苷类化合物，为式 I 结构：



式 I；

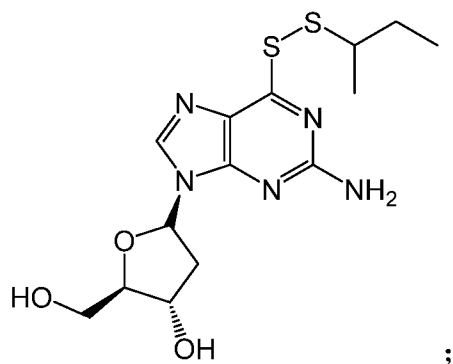
其中，R 为 C1-8 烷基、C1-8 氟烷基、C1-8 氯烷基、C1-8 羟基烷基、C1-8 酮基烷基、-（C1-4 烷基）R₁、-（C1-4 烷基）NH₂、-（C1-4 烷基）NH（C1-4 烷基）、任选地被 R₂ 取代的苯基、任选地被 R₂ 取代的 5 元芳环、任选地被 R₂ 取代的 C3-6 环烷基、任选地被 R₂ 取代的至少含 1 个氮的 5 至 6 元杂芳环；

R₁ 为苯基、任选地被 -F、-Cl、-OH、-NH₂、-C1-4 烷基、-OCH₃、-CONH₂ 或 -CONHCH₃ 取代的苯基、任选地被 R₂ 取代的至少含 1 个氮的 5 至 6 元杂芳环；

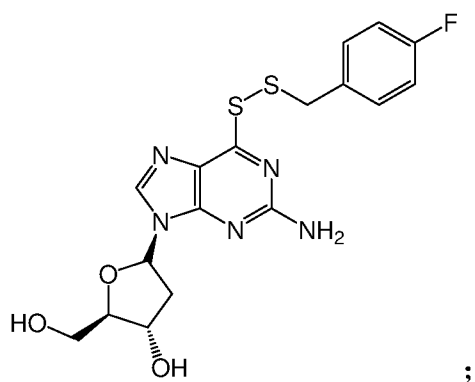
R₂ 为 C1-4 烷基、-CN、-OH、-OMe、-NH₂、-NHMe、-N(CH₃)₂、-F、-CF₃、-CO（C1-4 烷基）、-COCH₂CH₂OH、-CONHCH₃。

进一步优选，所述的 6-双硫取代-2'-脱氧鸟苷类化合物为式 A 结构的 6-（仲丁基双硫）-2'-脱氧鸟苷、式 B 结构的 6-（对氟苄基双硫）-2'-脱氧鸟苷、式 C 结构的 6-（叔丁基双硫）-2'-脱氧鸟苷或式 D 结构的 6-（异丙基双硫）-2'-脱氧鸟苷；

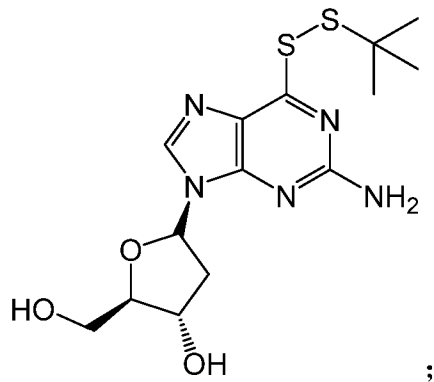
A： 6-（仲丁基双硫）-2'-脱氧鸟苷



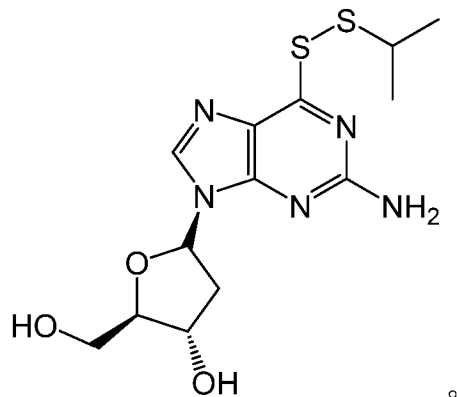
B: 6-(对氟苄基双硫)-2'-脱氧鸟苷



C: 6-(叔丁基双硫)-2'-脱氧鸟苷



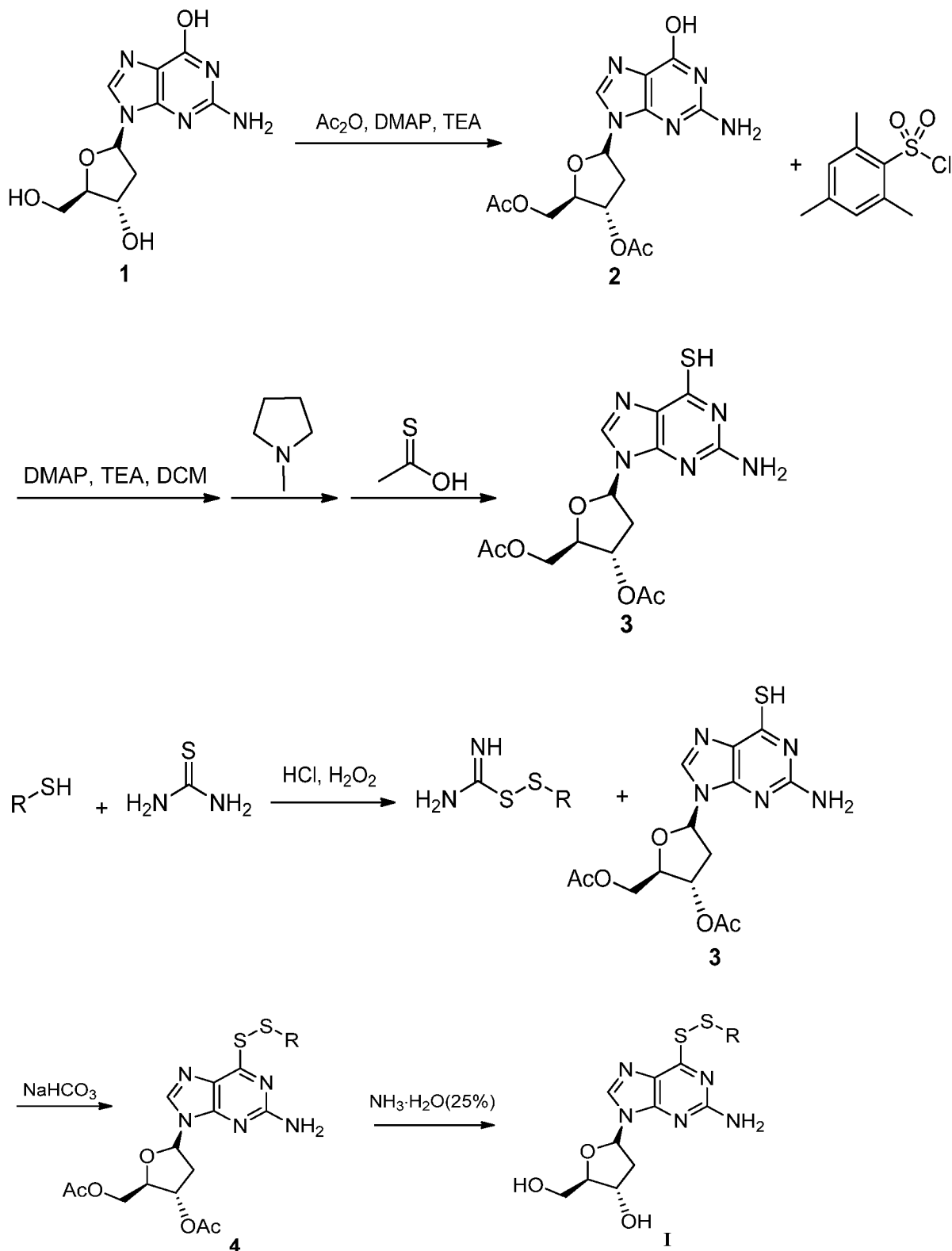
D: 6-(异丙基双硫)-2'-脱氧鸟苷



本发明的另一个目的是提供上述 6-双硫取代-2'-脱氧鸟苷类化合物的制

备方法，可以通过以下步骤实现：

合成反应式如下：

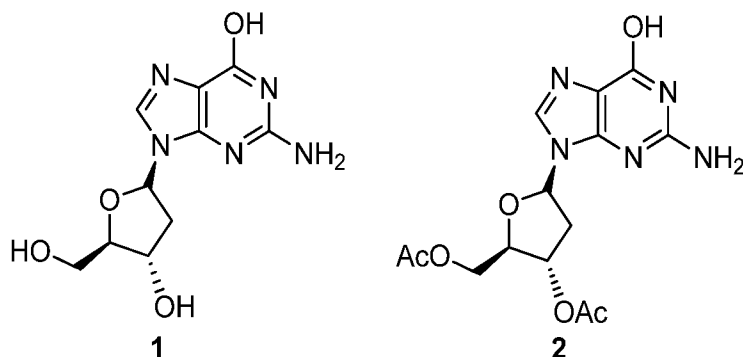


R 如通式 I 所述。

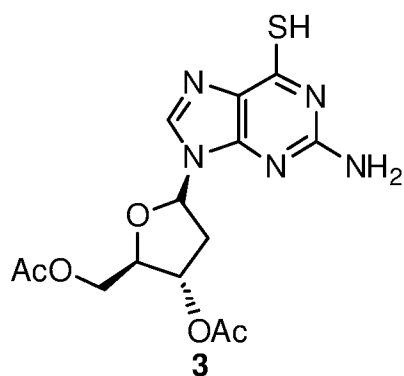
一种 6-双硫取代-2'-脱氧鸟苷类化合物的制备方法，包括以下步骤：

1) 将化合物 1、乙腈、乙酸酐和三乙胺加入至反应器中，再加入 4-二

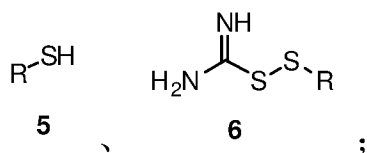
甲氨基吡啶，加完后氮气保护下搅拌反应 10~26h（进一步优选为 16~20h，最优选 18h），析出白色固体，经过过滤洗涤得到化合物 **2**；



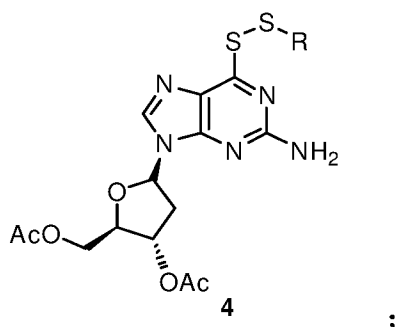
2) 将化合物 **2** 和二氯甲烷加入至反应器中，再依次加入三乙胺、2,4,6-三甲基苯磺酰氯和 4-二甲氨基吡啶，加完后在氮气保护下升温至回流，搅拌反应 10~24h（进一步优选为 14~18h，最优选 16h），之后用水淬灭，萃取后反应液再用冰水浴冷却至 0-5℃后，将 N-甲基吡咯烷的二氯甲烷溶液滴入，滴完后继续冰水浴下搅拌 0.3h~1.5h（进一步优选 0.5h），环境温度 15℃~35℃再搅拌 0.3h~1.5h（进一步优选为 0.5h），反应液再次用冰水浴冷却至 0-5℃后，将硫代乙酸的二氯甲烷溶液逐滴滴入，反应器内温度保持在 0-6℃（进一步优选为 5℃），滴完后自然升温至环境温度 15℃~35℃后搅拌反应 10~24h（进一步优选为 14~18h，最优选 16h），待反应完成后，加水淬灭，再用二氯甲烷萃取，经洗涤、干燥得到化合物 **3**；



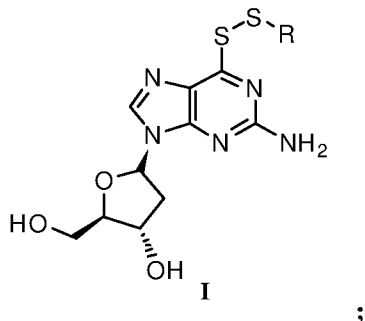
3) 在反应器中将式 **5** 结构的硫醇和硫脲溶于 H₂O 和乙醇中，冰水浴冷却至 0-5℃后，将浓盐酸滴加，滴完后再将 H₂O₂ 滴加，反应器内温度保持在 0-6℃（进一步优选为 5℃），滴完后氮气保护下自然升温至环境温度 15℃~35℃反应 10~24h（进一步优选为 14~18h，最优选 16h），之后过滤洗涤得式 **6** 结构的氨基脲（二硫氧基）酰亚胺；



4) 将化合物 **3**、式 **6** 结构的氨基脒（二硫氧基）酰亚胺和甲醇加入到反应器中，再将 NaHCO_3 水溶液逐滴滴加，滴完后环境温度 $15^\circ\text{C}\sim 35^\circ\text{C}$ 反应 10~24h（进一步优选为 14~18h，最优选 16h），反应完成后，经后处理得到化合物 **4**；



5) 将化合物 **4** 和甲醇加入到反应器中，再向反应器滴加氨水，滴完后环境温度 $15^\circ\text{C}\sim 35^\circ\text{C}$ 反应 10~24h（进一步优选为 14~18h，最优选 16h），经后处理得到式 I 结构的 6-双硫取代-2'-脱氧鸟苷类化合物；



其中，式 **5**、式 **6**、式 **4** 结构中的 R 与式 **I** 结构中的 R 具有相同意义。

步骤 1) 中，所述的化合物 **1**、乙腈、乙酸酐、三乙胺、4-二甲氨基吡啶各用量之比为 50mmol~70mmol：130mL~170mL：150mmol~210mmol：250mmol~350mmol：3mmol~9mmol。进一步优选，所述的化合物 **1**、乙腈、乙酸酐、三乙胺、4-二甲氨基吡啶各用量之比为 55mmol~65mmol：140mL~160mL：170mmol~190mmol：280mmol~320mmol：5mmol~7mmol。最优选的，所述的化合物 **1**、乙腈、乙酸酐、三乙胺、4-二甲氨基吡啶各用量之比为 60mmol：150mL：180mmol：300mmol：6mmol。

步骤 2) 中，所述的化合物 **2**、二氯甲烷、三乙胺、2,4,6-三甲基苯磺酰氯、4-二甲氨基吡啶、N-甲基吡咯烷的二氯甲烷溶液、硫代乙酸的二氯甲烷

溶的用量之比为 15mmol~25mmol : 150mL~250mL : 5mL~15mL : 30mmol~50mmol : 2mmol~6mmol : 10mL~30mL : 20mL~40mL。进一步优选, 所述的化合物 **2**、二氯甲烷、三乙胺、2,4,6-三甲基苯磺酰氯、4-二甲氨基吡啶、N-甲基吡咯烷的二氯甲烷溶液、硫代乙酸的二氯甲烷溶的用量之比为 18mmol~22mmol : 180mL~220mL : 8mL~12mL : 35mmol~45mmol : 3mmol~5mmol : 15mL~25mL : 25mL~35mL。最优选地, 所述的化合物 **2**、二氯甲烷、三乙胺、2,4,6-三甲基苯磺酰氯、4-二甲氨基吡啶、N-甲基吡咯烷的二氯甲烷溶液、硫代乙酸的二氯甲烷溶的用量之比为 20mmol : 200mL : 10mL : 40mmol : 4mmol : 20mL : 30mL。

所述的 N-甲基吡咯烷的二氯甲烷溶液由体积比 1 : 0.5~1.5 的 N-甲基吡咯烷和二氯甲烷组成, 所述的硫代乙酸的二氯甲烷溶液由体积比 1 : 1~3 的硫代乙酸和二氯甲烷组成。最优选, 所述的 N-甲基吡咯烷的二氯甲烷溶液由体积比 1 : 1 的 N-甲基吡咯烷和二氯甲烷组成, 所述的硫代乙酸的二氯甲烷溶液由体积比 1 : 2 的硫代乙酸和二氯甲烷组成。

步骤 3) 中, 所述的式 **5** 结构的硫醇、硫脲、H₂O、乙醇、浓盐酸、H₂O₂ 的用量之比为 50mmol~80mmol : 40mmol~60mmol : 15mL~30mL : 50mL~80mL : 4mL~7mL : 5mL~8mL。进一步优选, 所述的式 **5** 结构的硫醇、硫脲、H₂O、乙醇、浓盐酸、H₂O₂ 的用量之比为 60mmol~70mmol : 45mmol~55mmol : 20mL~25mL : 60mL~70mL : 5mL~6mL : 6mL~7mL。最优选的, 所述的式 **5** 结构的硫醇、硫脲、H₂O、乙醇、浓盐酸、H₂O₂ 的用量之比为 65mmol : 50mmol : 22.5mL : 65mL : 5.5mL : 6.5mL。

所述的浓盐酸的质量百分数为 35%~37%。

步骤 4) 中, 所述的化合物 **3**、氨基脲(二硫氧基)酰亚胺、甲醇、NaHCO₃ 水溶液的用量之比为 1g~2.5g : 2mmol~8mmol : 15mL~35mL : 5mL~10mL, 所述的 NaHCO₃ 水溶液由用量比 5mmol~10mmol : 5mL~10mL 的 NaHCO₃ 和水组成。进一步优选, 所述的化合物 **3**、氨基脲(二硫氧基)酰亚胺、甲醇、NaHCO₃ 水溶液的用量之比为 1.3g~1.7g : 4mmol~6mmol : 22.5mL~27.5mL : 6mL~9mL, 所述的 NaHCO₃ 水溶液由用量比 6mmol~9mmol : 6mL~9mL 的 NaHCO₃ 和水组成。最优选, 所述的化合物 **3**、氨基脲(二硫氧基)酰亚胺、甲醇、NaHCO₃ 水溶液的用量之比为 1.5g : 5mmol : 25mL : 7.5mL, 所述的 NaHCO₃ 水溶液由用量比 7.5mmol : 7.5mL 的 NaHCO₃ 和水组成。

步骤 5) 中, 所述的化合物 4、甲醇、氨水的用量之比为 1mmol~3mmol: 20mL~60mL: 20mL~60mL。进一步优选, 所述的化合物 4、甲醇、氨水的用量之比为 1.5mmol~1.5mmol: 35mL~45mL: 35mL~45mL。最优选, 所述的化合物 4、甲醇、氨水的用量之比为 2mmol: 40mL: 40mL。

本发明的另一个目的是提供所述 6-双硫取代-2'-脱氧鸟苷类衍生物在制备抗肿瘤药物中的应用。药理研究证实, 本发明提供的这类化合物可用来抑制硫氧还原蛋白还原酶和硫氧还原蛋白 (TrxR/Trx-1) 的活性, 也可以用来治疗癌症。

6-双硫取代-2'-脱氧鸟苷衍生物可用于制备抗肿瘤药物, 对各种癌细胞具有抑制作用, 所述的抗肿瘤药物为预防或/和治疗结肠癌、肺癌、皮肤黑色素瘤、乳腺癌、白血病、肝癌、胃癌药物中的一种或者两种以上 (包括两种)。

所述的抗肿瘤药物用于抑制硫氧还原蛋白 Trx 的活性。

与现有技术相比, 本发明具有如下优点:

本发明 6-双硫取代-2'-脱氧鸟苷衍生物是本课题组在对 PX-12 和 6-thio-dG 进行系统结构改造的过程中发现的, 是未见文献报道的新化合物, 具有完全自主知识产权; 体内外抗肿瘤活性研究表明, 其对不同肿瘤细胞的生长抑制活性普遍高于其类似物 PX-12 和 6-thio-dG, 高效广谱, 且毒性相对较小; 作用机制研究表明, 该化合物除了抑制硫氧还原蛋白还原酶和硫氧还原蛋白 (TrxR/Trx-1) 的活性, 还可阻断端粒酶, 具有双靶点作用。

附图说明

图 1 为本发明中 HCT116 细胞荷瘤鼠模型给药过程中各组裸鼠肿瘤体积的变化图;

图 2 为本发明中 HCT116 细胞荷瘤鼠模型给药后 HE 染色结果 (D 组); 其中, (a) 为心, (b) 为肺, (c) 为肾, (d) 为肝, (e) 为肠, (f) 为肿瘤组织;

图 3 为本发明中 HCT116 细胞荷瘤鼠模型给药后各组肿瘤组织 DAPI (活细胞) 和 TUNEL (凋亡细胞) 以及 MERGE (叠加) 染色结果图; A: 给化合物 A; B: 给化合物 B; C: 给化合物 C; D: 给化合物 D; E: 给化合物 6-thio-dG; F: 给化合物 PX-12; G: 空白组, 给溶剂;

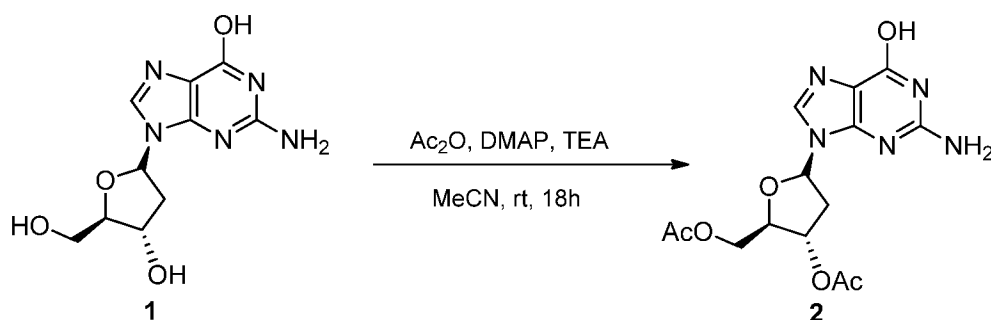
图 4 为 A375 细胞荷瘤鼠模型给药过程中各组裸鼠体重和肿瘤体积的变

化图，其中，图 4 (a) 为体重变化，图 4 (b) 为肿瘤体积变化。

具体实施方式

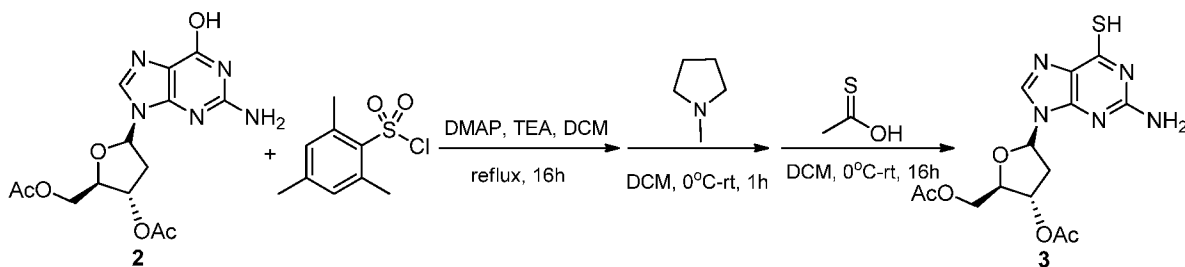
本发明结合实施例作进一步的说明。以下的实施例是说明本发明，而不是以任何方式限制本发明。

实施例 1（制备二乙酰基-2'-脱氧鸟苷 2）



将化合物 **1** (17.11g, 60mmol), MeCN (乙腈, 150mL), Ac₂O (乙酸酐, 18.38g, 180mmol) 和 TEA (三乙胺, 30.36g, 300mmol) 依次加入至 500ml 单口瓶中, 再缓慢加入 DMAP (4-二甲氨基吡啶, 0.73g, 6mmol), 加完后氮气保护下室温 25℃ 搅拌过夜 (18h)。析出大量白色固体, TLC 检测反应完全。停止反应, 抽滤, 滤饼再用 MeCN (10mL×3) 洗, 抽干, 再用油泵拉干。得到 20.1 g 化合物 **2** (经相关图谱数据确认为式 2 结构的化合物), 白色固体, 收率 95.2%。

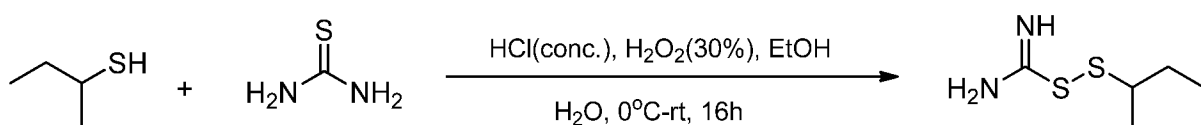
实施例 2（制备二乙酰基-6-巯代-2'-脱氧鸟苷 3）



将化合物 **2** (7.03g, 20mmol) 和 DCM (二氯甲烷, 200mL) 加入至 250mL 三口瓶中, 再依次加入 TEA (三乙胺, 10mL), 2,4,6-三甲基苯磺酰氯 (8.75g, 40mmol) 和 DMAP (4-二甲氨基吡啶, 0.49g, 4mmol), 加完后在氮气保护下升温至回流, 搅拌过夜 (16h)。取样后用水淬灭, 萃取后反应液再用冰水浴冷却至 0-5℃ 后, 将预先配好的 N-甲基吡咯烷 (10ml) 的 DCM (10ml) 溶液滴入, 滴完后继续冰水浴下搅拌 0.5h, 室温 25℃ 再搅拌 0.5h。反应液再

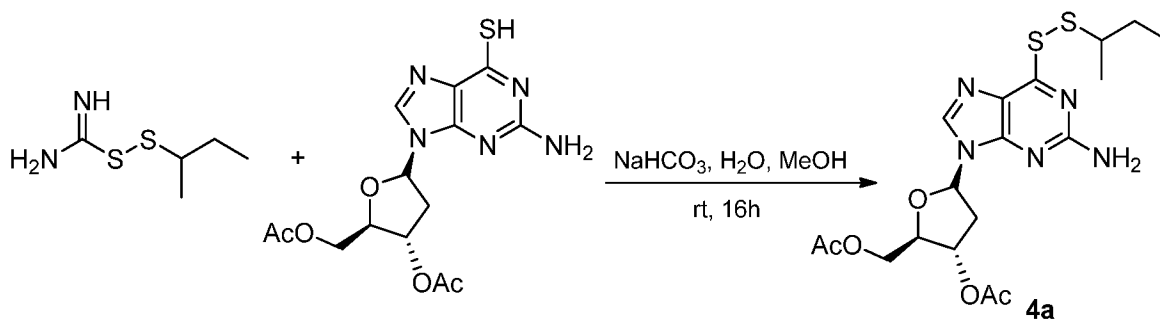
次用冰水浴冷却至 0-5℃后，将预先配好的硫代乙酸（10mL）的 DCM（二氯甲烷，20ml）溶液逐滴滴入，内温保持在 5℃，滴完后自然升温至室温 25℃后搅拌过夜（16h）。待反应完成后，加水（100mL）淬灭，再用 DCM（二氯甲烷，100mL×4）萃取，饱和 NaCl 水（100mL）洗一次，无水硫酸钠干燥，硅胶拌样旋干，过柱（DCM→DCM:甲醇 MeOH=100:1 → 50:1 → 20:1 → 10:1）。得到 5g 化合物 **3**（经相关图谱数据确认为式 3 结构的化合物），浅黄色固体，收率 71%。

实施例 3（制备仲丁基氨基脲（二硫氧基）酰亚胺）



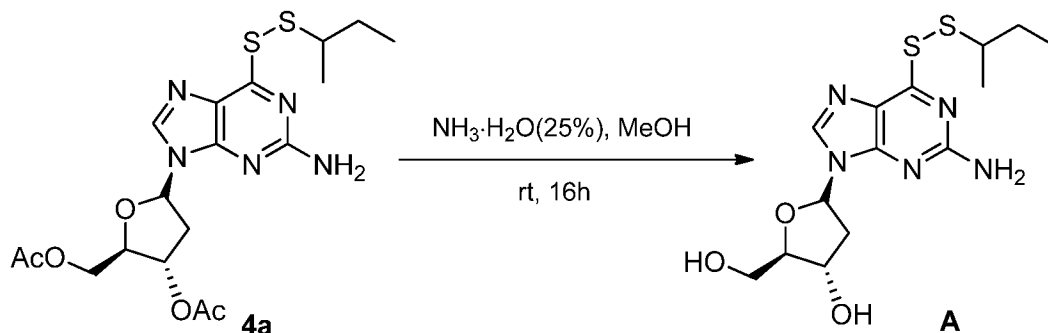
将仲丁硫醇（5.86g，65mmol）和硫脲（3.81g，50mmol）溶于 H₂O（22.5mL）和 EtOH（乙醇，65mL）中，冰水浴冷却至 0-5℃后，将浓盐酸（质量百分数 36.5%，5.5ml）缓慢滴加，滴完后再将 H₂O₂（6.5mL）逐滴滴加，内温保持在 5℃，滴完后氮气保护下自然升温至室温 25℃反应过夜（16h）。直接旋干，油泵拉干，得仲丁基氨基脲（二硫氧基）酰亚胺粗品。

实施例 4（制备二乙酰基-6-二硫叔丁基-2'-脱氧鸟苷 4a）



将化合物 **3**（粗品，1.5g），仲丁基氨基脲（二硫氧基）酰亚胺（1.84g，5mmol）和 MeOH（25mL）加入到 100mL 单口瓶中，加完后再将预先配好的 NaHCO₃（0.63g，7.5mmol）的 H₂O（7.5mL）溶液逐滴滴加，滴完后室温 25℃搅拌过夜（16h）。反应完成后，加硅胶拌样旋干，过柱（DCM→DCM:MeOH=100:1 → 50:1 → 20:1）。得到 1.2g 化合物 **4a**（经相关图谱数据确认为式 **4a** 结构的化合物），浅黄色油状固体。

实施例 5 (制备 6-(仲丁基双硫)-2'-脱氧鸟苷 A)

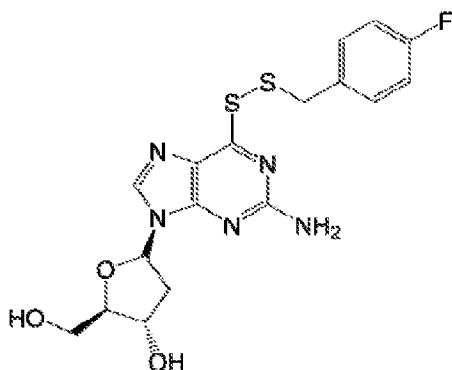


将化合物 **4a** (0.91g, 2mmol) 和 MeOH (40mL) 加入到 100mL 单口瓶中, 再缓慢滴加氨水 (40mL), 滴完后室温 25℃ 搅拌过夜 (16h)。TLC (薄层色谱) 检测反应完全, 停止反应, 旋干, 油泵拉干。得到 0.7g 化合物 **A**, 纯度在 96%, 米黄色固体。

化合物 **A** 表征数据如下:

^1H NMR (DMSO- D_6 , 600MHz) δ 8.17 (s, 1H), 6.59 (s, 2H), 6.14 (t, $J = 6.0$ Hz, 1H), 6.25 (d, $J = 4.2$ Hz, 1H), 4.93-4.90 (m, 1H), 4.29 (s, 1H), 3.75-3.41 (m, 1H), 3.51-3.48 (m, 1H), 3.44-3.41 (m, 1H), 3.03-3.01 (m, 1H), 2.56-2.51 (m, 1H), 2.17-2.14 (m, 1H), 1.59-1.54 (m, 1H), 1.45-1.40 (m, 1H), 1.18 (d, $J = 6.0$ Hz, 3H), 0.88 (t, $J = 6.0$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (DMSO- D_6 , 151MHz) δ 159.8, 158.2, 151.4, 139.8, 124.4, 87.7, 82.9, 70.8, 61.7, 47.5, 40.1, 28.3, 19.6, 11.3; MS (ESI) (m/z): calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{21}\text{N}_5\text{O}_3\text{S}_2$ ($\text{M}+\text{H}^+$): 372.11; Found: 372.27.

实施例 6 (制备 6-(对氟苄基双硫)-2'-脱氧鸟苷 B)

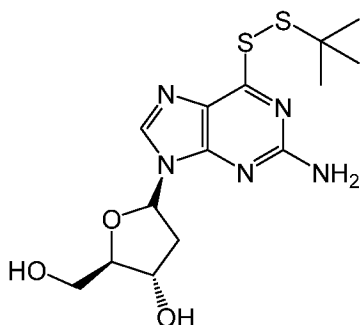


制备方法同制备实施例 3-5, 用对氟苄基硫醇替换仲丁基硫醇, 由硫脲与对氟苄基硫醇在浓盐酸、双氧水下反应, 所得对氟苄基氨基脲 (二硫氧基) 酰亚胺再与化合物 **3** 在碳酸氢钠下反应, 最后在氨水作用下水解, 得到 0.6g 化合物 **B**, 纯度在 96%, 米黄色固体。

化合物 **B** 表征数据如下:

^1H NMR (DMSO- D_6 , 600MHz) δ 8.25 (d, $J = 3.0$ Hz, 1H), 7.40 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 7.12 (t, $J = 8.4$ Hz, 2H), 6.77 (s, 2H), 6.25-6.23 (m, 1H), 5.34 (t, $J = 3.6$ Hz, 1H), 5.01 (d, $J = 5.4$ Hz, 1H), 4.38 (s, 1H), 4.23 (s, 2H), 3.84 (m, 1H), 3.59-3.57 (m, 1H), 3.52-3.50 (m, 1H), 2.63-2.61 (m, 1H), 2.26-2.23 (m, 1H); ^{13}C NMR (DMSO- D_6 , 151MHz) δ 161.6 (d, $J = 243.6$ Hz), 159.9, 157.9, 151.5, 139.8, 132.8, 131.8 (d, $J = 8.3$ Hz), 124.4, 115.2 (d, $J = 21.3$ Hz), 87.8, 82.9, 70.7, 61.7, 41.0, 40.1; MS(ESI)(m/z): calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{FN}_5\text{O}_3\text{S}_2(\text{M}+\text{H}^+)$: 423.08; Found: 424.39.

实施例 7 (制备 6-(叔丁基双硫)-2'-脱氧鸟苷 C)

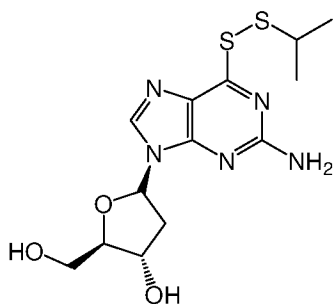


制备方法同制备实施例 3-5, 用叔丁基硫醇替换仲丁基硫醇, 由硫脲与叔丁基硫醇在浓盐酸、双氧水下反应, 所得叔丁基氨基脲(二硫氧基)酰亚胺再与化合物 **3** 在碳酸氢钠下反应, 最后在氨水作用下水解, 得到 0.59g 化合物 **C**, 纯度在 95%左右, 淡黄色粉末。

化合物 **C** 表征数据如下:

^1H NMR (CDCl_3 , 600MHz) δ 7.75 (s, 1H), 6.26-6.23 (m, 1H), 5.64 (br, 2H), 5.34 (s, 2H), 4.74 (d, $J = 5.4$ Hz, 1H), 4.20 (s, 1H), 3.96 (d, $J = 12.6$ Hz, 1H), 3.77 (d, $J = 12.0$ Hz, 1H), 2.99-2.95 (m, 1H), 2.30-2.27 (m, 1H), 1.34 (s, 9H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 151MHz) δ 162.1, 158.5, 149.6, 140.5, 126.9, 89.4, 87.6, 73.4, 63.6, 49.7, 40.5, 30.0; MS (ESI) (m/z): calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{21}\text{N}_5\text{O}_3\text{S}_2(\text{M}+\text{H}^+)$: 371.11; Found: 372.23.

实施例 8 (制备 6-(异丙基双硫)-2'-脱氧鸟苷 D)



制备方法同制备实施例 3-5，用异丙基硫醇替换仲丁硫醇，由硫脲与异丙基硫醇在浓盐酸、双氧水下反应，所得异丙基氨基脲（二硫氧基）酰亚胺再与化合物 **3** 在碳酸氢钠下反应，最后在氨水作用下水解，得到 0.62g 化合物 **D**，纯度在 98% 左右，白色粉末。

化合物 **D** 表征数据如下：

^1H NMR (CDCl_3 , 600MHz) δ 7.76 (s, 1H), 6.34 (d, $J = 12.0$ Hz, 1H), 6.26-6.23 (m, 1H), 5.39 (s, 2H), 4.72 (d, $J = 4.8$ Hz, 1H), 4.19 (s, 1H), 3.93 (d, $J = 12.6$ Hz, 1H), 3.75 (d, $J = 12.0$ Hz, 1H), 3.23-3.19 (m, 1H), 2.96-2.91 (m, 1H), 2.67-2.51 (m, 1H), 2.30-2.27 (m, 1H), 1.31 (s, 3H), 1.30 (s, 3H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 151MHz) δ 162.0, 158.6, 149.7, 140.5, 126.8, 89.2, 87.4, 73.1, 63.5, 41.8, 40.4, 22.51, 22.47; MS (ESI) (m/z): calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{19}\text{N}_5\text{O}_3\text{S}_2$ ($\text{M}+\text{H}^+$): 357.09; Found: 358.04.

生物实验 1:

Ellman 试验——6-双硫取代-2'-脱氧鸟苷类衍生物类似物化合物对 TrxR/Trx-1 活性抑制作用

我们使用基于 Ellman 反应的 TrxR/TR 实验来测定候选化合物的抑制活性。Ellman 反应是 5, 5'-二硫代双(2-硝基苯甲酸) (DTNB) 与巯基 (-SH) 反应生成黄色物质，在 412nm 下有吸收。吸收的增加可等量对应 TrxR 介导的 NADPH 的减少，从而进一步判断 TrxR/Trx-1 的活性。所有实验都在 96 孔板上进行。在酶反应开始之前先制备 5 组不同浓度的相应待测化合物储备液。TrxR/Trx-1 反应每孔总体积为 60 μL ，包括 100 mM HEPES, 5mM EDTA (HE buffer, pH 7.5), 1 mM NADPH, 1.0 μM TrxR, 0.8 μM Trx-1, 2.5 mg/mL 牛胰岛素和所需浓度的待测化合物。对照组不加待测化合物。空白组不加待测化合物、TrxR 和 Trx-1。将测定板在振荡器上摇动 30 秒以充分混合反应物。在 37 $^\circ\text{C}$ 孵育 30min 后，然后加入 100 μL 现配的包含 6 M 盐酸胍、50mM Tris 和 10 mM DTNB 的混合溶液终止反应。再孵育 15min 后，在 412nm 波长下

测定吸光度。最后, TrxR/Trx-1 活性%=($A_{\text{测}}-A_{\text{kb}}$)/($A_{\text{control}}-A_{\text{kb}}$), 即 TrxR/Trx-1 活性相对百分率为加了 2'-脱氧鸟苷类衍生物抑制了的活性相对于不加 2'-脱氧鸟苷类衍生物的活性, 作图, 并将数据拟合为具有可变斜率的浓度响应曲线, 从曲线中计算 IC₅₀ 值, 实验结果见表 1。

表 1 6-双硫取代-2'-脱氧鸟苷类衍生物的 TrxR/Trx-1 活性抑制

化合物	A	B	C	D	6-thio-dG	PX-12	Cladribine
IC ₅₀ (μM)	31.71	9.78	47.73	4.26	>100	2.55	>100

由表 1 可知, 以临床 II 期的 Trx-1 抑制剂 PX-12 作为阳性对照, 以已经上市的具有 2'-脱氧鸟苷类似结构的含硫抗肿瘤药物克拉屈滨 (Cladribine) 和抗肿瘤候选药物 6-硫代-2'-脱氧鸟苷 (6-thio-dG) 作为阴性对照, 该类全新结构的化合物中有部分化合物表现出了较好的 TrxR/Trx-1 抑制活性, 其中化合物 B 和化合物 D 的 TrxR/Trx-1 IC₅₀ 分别达到了 9.78 和 4.26 μM, 接近阳性对照 PX-12, 为制备靶向 Trx 的癌症治疗药物的研究提供了新的依据。

生物实验 2:

MTT 试验——6-双硫取代-2'-脱氧鸟苷类衍生物对肿瘤细胞生长抑制作用

我们使用 MTT 法对候选化合物的肿瘤细胞生长抑制活性进行测定。分别取对数生长期的人肿瘤细胞, 用 0.25% 的胰酶消化一定时间, 离心, 重悬后用血细胞计数板计数, 制备细胞悬液, 调整细胞悬液至 $1.0 \times 10^4 \sim 1 \times 10^5$ 个/mL。取细胞悬液接种于 96 孔培养板中, 每孔 100 μL, 置饱和湿度、37℃ 和 5%CO₂ 培养箱中培养 24h, 待细胞完全贴壁。用完全培养基稀释受试化合物至所需浓度, 将已接种人肿瘤细胞的 96 孔培养板的完全培养基吸出, 加入含药培养基, 每孔 100 μL, DMSO 终浓度小于 0.1%, 置于培养箱中培养 48h。96 孔板中每孔加入 MTT 10 μL, 继续培养 4h。终止培养, 小心吸去孔内培养液。每孔加入 150 μL DMSO, 置摇床上低速振荡 10 min, 使结晶物充分溶解。在酶联免疫检测仪 OD 570 nm 处测量各孔的吸光值。同时设置调零孔(培养基、MTT、二甲基亚砷), 对照孔(细胞、相同浓度的药物溶解介质、培养液、MTT、二甲基亚砷), 以相应溶剂为对照, 计算细胞生长抑制活性情

况。每组设定 3-6 个复孔，重复若干次。细胞活力 (cell viability of control) = $(A_{\text{药物组}} - A_{\text{调零孔}}) / (A_{\text{对照孔}} - A_{\text{调零孔}}) * 100\%$ 。作图，并将数据拟合为具有可变斜率的浓度响应曲线，从曲线中计算 IC_{50} 值，实验结果见表 2。

表 2 6-双硫取代-2'-脱氧鸟苷类衍生物的肿瘤细胞生长抑制 (IC_{50} , μM)

化合物 细胞株	A	B	C	D	6-thio-dG	PX-12	Cladribine
NCM460	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
HCT116	1.27	2.66	21.82	1.09	17.50	34.54	28.45
SW620	0.21	1.71	/	/	>100	1.68	>100
HT29	4.55	3.02	7.37	4.24	3.04	3.37	9.44
A375	0.60	0.52	3.06	0.37	0.40	2.98	/
BGC	6.09	/	/	11.70	>100	/	/
K562	9.885	10.134	28.732	15.732	23.342	21.657	7.863
HepG2	10~50	<10	10~50	<10	<10	10~50	/
A549	30.8	13.52	35.79	31.12	33.59	7.43	/
MCF7	/	15.56	/	41.31	>100	>100	>100
Bcap37	18.24	21.04	35.12	22.77	>100	>100	>100

由表 2 可知，以抗肿瘤化合物 6-硫代-2'-脱氧鸟苷 (6-thio-dG)、Trx 抑制剂 PX-12 和已经上市的具有 2'-脱氧鸟苷类似结构的抗肿瘤药物克拉屈滨 (Cladribine) 作为阳性对照，受试化合物 A、B、C、D 及阳性对照大多对人结肠癌细胞 HCT116、SW620、HT29、人黑色素瘤细胞 A375 的增值有明显的抑制作用，对人胃癌细胞 BGC、人白血病细胞 K562、人肝癌细胞 HepG2 的增值有次之的抑制作用、对人非小细胞肺癌 A549、人乳腺癌细胞 MCF7、Bcap37 的增值抑制作用相对较弱，对人正常结肠上皮细胞 NCM460 的增殖几乎无抑制作用。其中，对人结直肠肿瘤细胞 HCT116，受试化合物作用明显，且优于阳性对照。综合各类细胞，相较于受试化合物 A、C，受试化合物 B、D 对肿瘤细胞增殖抑制作用效果更明显，为制备癌症治疗药物，特别是黑色素瘤和结直肠癌治疗药物的研究提供了方向。

生物实验 3:

裸鼠荷瘤试验——6-双硫取代-2'-脱氧鸟苷类衍生物对裸鼠皮下移植瘤

组织生长抑制作用

1) 人结肠癌细胞株 HCT116 荷瘤鼠模型

我们以人结肠癌细胞株 HCT116 为研究对象,对 32 只免疫缺陷裸鼠建立人结肠癌皮下移植瘤模型。取对数生长期的第 24 代 HCT116 细胞,用胰酶消化后制备单细胞悬液,于 5 周左右的雄性裸鼠右侧腋窝皮下接种 1×10^7 个细胞,接种后腹腔注射免疫抑制剂环磷酰胺 (100mg/kg),连续两天。9~10 天见肿瘤生长,结肠癌细胞 HCT116 植入皮下后第 20 天,用随机数字表法将裸鼠分为 7 组,包括受试药组、阳性对照组和空白对照组,分别为: A 组: 给化合物 A; B 组: 给化合物 B; C 组: 给化合物 C; D 组: 给化合物 D; E 组: 给化合物 6-thio-dG; F 组: 给化合物 PX-12; G 组: 空白组,不给任何化合物。除 C 组 3 只, G 组 4 只,其它 5 组均 5 只,标记,尾静脉注射,每两天给药一次,给药 24 天,12 次,剂量以化合物 A 计,前 8 次 2mg/kg,后 4 次 10mg/kg,其他同摩尔量。肿瘤体积的计算方法是将肿瘤的长度作为肿瘤最长的直径,宽度作为相应的垂直直径,肿瘤体积 $V = (\text{长} \times \text{宽}^2) \text{ mm}^3 / 2$ 。最后一剂治疗后 48 小时,眼眶取血,然后处死动物。血液离心取上清,然后血生化分析。固定组织石蜡包埋切片,然后 HE 染色。冰冻组织中瘤块进行冰冻切片,然后 DAPI 和 TUNEL 染色,判断裸鼠肿瘤组织中细胞凋亡情况。实验结果如下。

给药过程中各组裸鼠肿瘤体积的变化如图 1 所示。各组裸鼠肿瘤体积变化斜率大小为: $D < B \approx A \approx 6\text{-thio-dG} < \text{PX-12} < C < \text{KB}$, 因而对裸鼠皮下移植瘤组织生长抑制作用强弱: $D > B \approx A \approx 6\text{-thio-dG} > \text{PX-12} > C > \text{KB}$ 。受试化合物 D 抑制移植瘤组织生长能力强于阳性对照 6-thio-dG 和 PX-12, 受试化合物 B 和 A 抑制移植瘤组织生长能力与阳性对照 6-thio-dG 接近, 强于阳性对照 PX-12, D、B 和 A 表现了预期的双靶点协同作用。

HE 染色结果如图 2 所示, 可通过观察各组织的形态判断化合物的毒副作用, 结果表明各组之间无明显差异, 化合物无明显毒副作用。

TUNEL 染色结果如图 3 所示, 可通过瘤组织凋亡染料染色所占比例计算凋亡率, 从而推测各组细胞凋亡强弱: $D \text{ 组} > A \text{ 组} \approx B \text{ 组} \approx E \text{ 组} (6\text{-thio-dG 组}) > C \text{ 组} > F \text{ 组} (\text{PX-12 组}) > G \text{ 组} (\text{KB 组})$ 。基本与裸鼠肿瘤体积生长抑制情况相符。

给药过程中各组裸鼠血生化指标检测结果如表 3 所示。

表 3 HCT116 细胞荷瘤鼠模型给药过程中各组裸鼠血生化指标检测结果

组别 指标	A	B	C	D	E	F	G
总蛋白 (g/L)	52.6	50.7	51.6	54.2	51.8	56.9	60.2
白蛋白 (g/L)	24.8	26.3	27.9	25.0	29.8	33.0	39.7
谷丙转氨酶 (U/L)	33.3	105.9	25.5	28.2	44.3	30.8	32.9
谷草转氨酶 (U/L)	153.4	254.4	128.3	122.2	172.4	169.0	193.2
总胆红素 ($\mu\text{mol/L}$)	0.40	0.90	0.80	-1.00	-0.10	-0.90	-1.10
碱性磷酸酶 (U/L)	36.0	31.0	33.7	31.5	49.6	44.2	56.0
尿素氮 (mmol/L)	10.7	14.8	9.00	8.80	11.5	8.10	10.6
肌酐 ($\mu\text{mol/L}$)	-0.80	8.67	6.67	-3.0	12.0	3.20	-11.5
葡萄糖 (mmol/L)	2.21	2.29	2.99	3.51	3.12	1.47	2.14
钾离子 (mmol/L)	7.56	6.26	6.17	6.43	7.18	7.64	7.76
钠离子 (mmol/L)	155.6	158.0	159.0	157.5	158.8	155.8	161.0
氯离子 (mmol/L)	113.8	124.0	120.5	115.3	120.8	109.9	104.8
甘油三酯 (mmol/L)	0.84	0.52	1.15	0.70	1.10	1.18	2.67
总胆固醇 (mmol/L)	2.99	2.76	2.65	3.21	2.62	2.53	3.37
肌酸激酶 (U/L)	1896	2169	980.7	1597	2125	1434	2183

由表 3 可知，裸鼠各组血生化指标基本无显著性差异。

2) 人黑色素瘤细胞 A375 荷瘤鼠模型

我们采用人恶性黑色素瘤细胞 A375 荷瘤鼠模型进一步研究了化合物 D 对人恶性黑色素瘤的抑制作用，方法基本同上。达卡巴嗪 (Dacarbazine, DTIC) 为黑色素瘤一线用药。设计给药组分别为：化合物 D 10 mg/kg 组；6-thio-dG+PX12 联合用药组（剂量分别相当于 2 倍的化合物 D 摩尔数量）；DTIC 20.4 mg/kg 组（剂量相当于 4 倍的化合物 D 摩尔数量）以及空白溶剂组。实验结果见图 4。

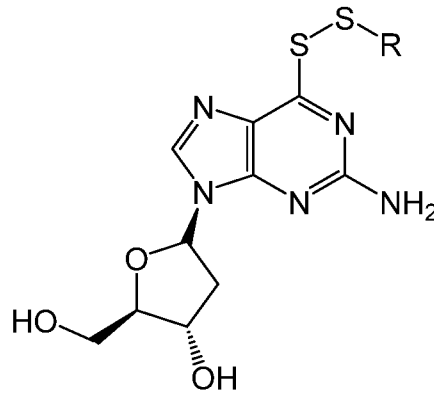
结果发现，按摩尔数计算，化合物 D 给药剂量为阳性对照药 DITC 给药剂量的四分之一时，其抑瘤作用都显著高于 DITC，而且其抑瘤作用也显著高于 2 倍摩尔给药剂量下 6-thio-dG 和 PX-12 联合用药组（见图 4）。该结果表明，化合物 D 的抑制人恶性黑色素瘤活性要显著高于临床一线用药 DITC，而且从大鼠体重来看，虽然给药初期化合物 D 组体重下降较快，但是给药 6

天后体重开始逐渐升高，到给药 13 天后，体重明显超过 DITC 组、6-thio-dG 和 PX-12 联合用药组，表明连续给药后机体能快速逆转该毒性。此外，从与 6-thio-dG 和 PX-12 联合用药组的抑瘤作用和体重变化相比，化合物 D 比联合用药组抑瘤作用显著增加，而且毒性更低。

此外，各组血生化指标基本无显著性差异，都未显示明显的毒性。

权 利 要 求 书

1、一种 6-双硫取代-2'-脱氧鸟苷类化合物，其特征在于，为式 I 结构：



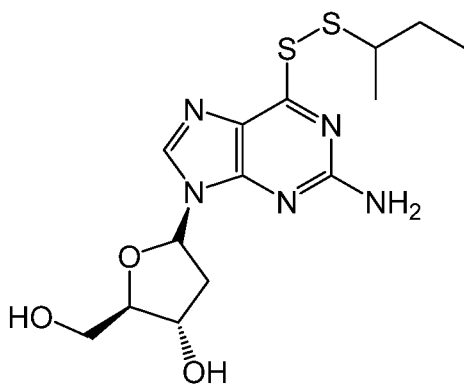
式 I ;

其中，R 为 C1-8 烷基、C1-8 氟烷基、C1-8 氯烷基、C1-8 羟基烷基、C1-8 酮基烷基、- (C1-4 烷基) R₁、- (C1-4 烷基) NH₂、- (C1-4 烷基) NH (C1-4 烷基)、任选地被 R₂ 取代的苯基、任选地被 R₂ 取代的 5 元芳环、任选地被 R₂ 取代的 C3-6 环烷基、任选地被 R₂ 取代的至少含 1 个氮的 5 至 6 元杂芳环；

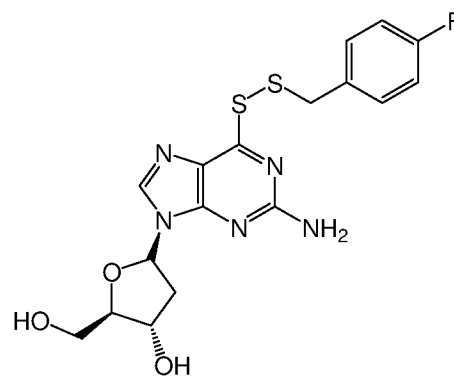
R₁ 为苯基、任选地被 -F、-Cl、-OH、-NH₂、-C1-4 烷基、-OCH₃、-CONH₂ 或 -CONHCH₃ 取代的苯基、任选地被 R₂ 取代的至少含 1 个氮的 5 至 6 元杂芳环；

R₂ 为 C1-4 烷基、-CN、-OH、-OMe、-NH₂、-NHMe、-N(CH₃)₂、-F、-CF₃、-CO (C1-4 烷基)、-COCH₂CH₂OH、-CONHCH₃。

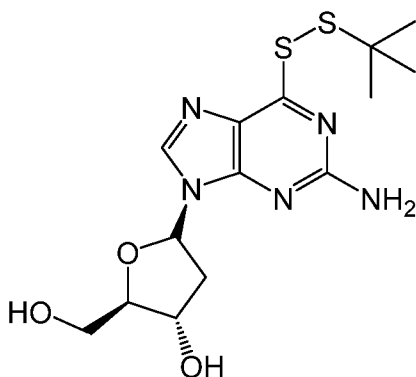
2、根据权利要求 1 所述的 6-双硫取代-2'-脱氧鸟苷类化合物，其特征在于，所述的 6-双硫取代-2'-脱氧鸟苷类化合物为式 A 结构的 6-（仲丁基双硫）-2'-脱氧鸟苷、式 B 结构的 6-（对氟苄基双硫）-2'-脱氧鸟苷、式 C 结构的 6-（叔丁基双硫）-2'-脱氧鸟苷或式 D 结构的 6-（异丙基双硫）-2'-脱氧鸟苷；



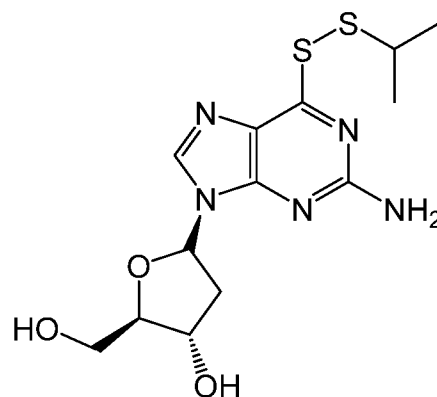
A



B



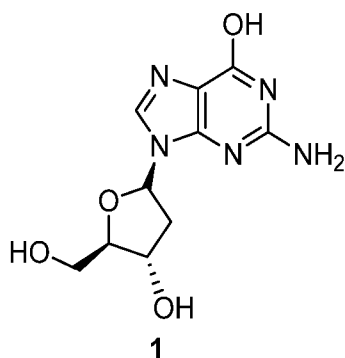
C



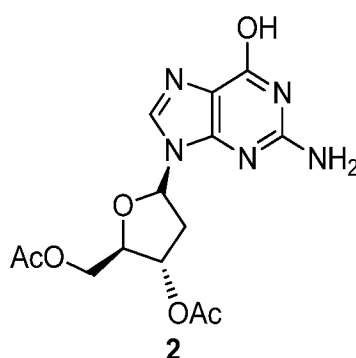
D

3、根据权利要求1所述的6-双硫取代-2'-脱氧鸟苷类化合物的制备方法，其特征在于，包括以下步骤：

1) 将化合物 **1**、乙腈、乙酸酐和三乙胺加入至反应器中，再加入 4-二甲氨基吡啶，加完后氮气保护下搅拌反应 10~26h，析出白色固体，经过过滤洗涤得到化合物 **2**；



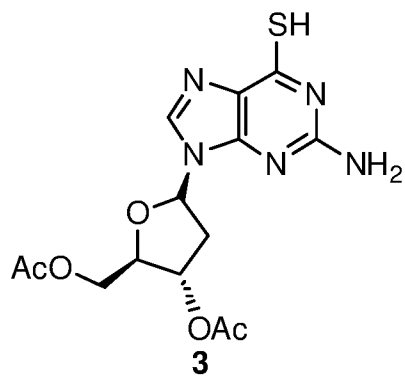
1



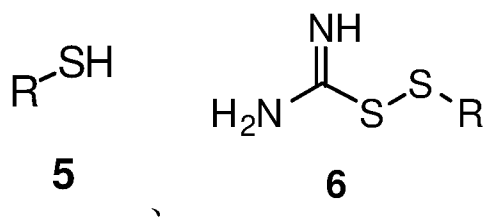
2

2) 将化合物 **2** 和二氯甲烷加入至反应器中，再依次加入三乙胺、2,4,6-三甲基苯磺酰氯和 4-二甲氨基吡啶，加完后在氮气保护下升温至回流，搅拌反应 10~24h，之后用水淬灭，萃取后反应液再用冰水浴冷却至 0-5℃后，将 N-甲基吡咯烷的二氯甲烷溶液滴入，滴完后继续冰水浴下搅拌 0.3h~1.5h，

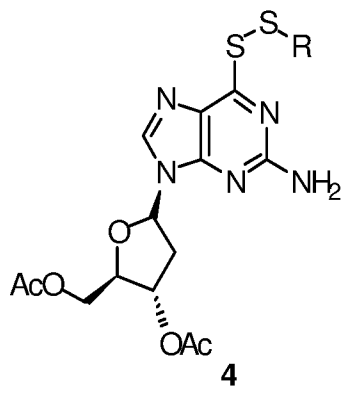
环境温度 15℃~35℃再搅拌 0.3h~1.5h, 反应液再次用冰水浴冷却至 0-5℃后, 将硫代乙酸的二氯甲烷溶液逐滴滴入, 反应器内温度保持在 0-6℃, 滴完后自然升温至环境温度 15℃~35℃后搅拌反应 10~24h, 待反应完成后, 加水淬灭, 再用二氯甲烷萃取, 经洗涤、干燥得到化合物 **3**;



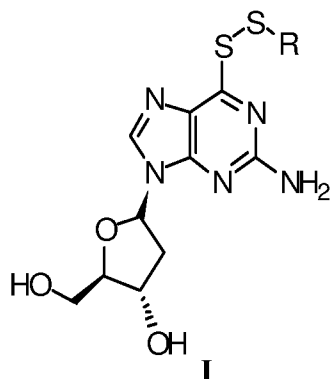
3) 在反应器中将式 **5** 结构的硫醇和硫脲溶于 H₂O 和乙醇中, 冰水浴冷却至 0-5℃后, 将浓盐酸滴加, 滴完后再将 H₂O₂ 滴加, 反应器内温度保持在 0-6℃, 滴完后氮气保护下自然升温至环境温度 15℃~35℃反应 10~24h, 之后过滤洗涤得式 **6** 结构的氨基脲(二硫氧基)酰亚胺;



4) 将化合物 **3**、式 **6** 结构的氨基脲(二硫氧基)酰亚胺和甲醇加入到反应器中, 再将 NaHCO₃ 水溶液逐滴滴加, 滴完后环境温度 15℃~35℃反应 10~24h, 反应完成后, 经后处理得到化合物 **4**;



5) 将化合物 **4** 和甲醇加入到反应器中, 再向反应器滴加氨水, 滴完后环境温度 15℃~35℃反应 10~24h (进一步优选为 14~18h, 最优选 16h), 经后处理得到式 I 结构的 6-双硫取代-2'-脱氧鸟苷类化合物;



;

其中，式 5、式 6、式 4 结构中的 R 与式 I 结构中的 R 具有相同意义。

4、根据权利要求 3 所述的 6-双硫取代-2'-脱氧鸟苷类化合物的制备方法，其特征在于，步骤 1) 中，所述的化合物 1、乙腈、乙酸酐、三乙胺、4-二甲氨基吡啶各用量之比为 50mmol~70mmol : 130mL~170mL : 150mmol~210mmol : 250mmol~350mmol : 3mmol~9mmol。

5、根据权利要求 3 所述的 6-双硫取代-2'-脱氧鸟苷类化合物的制备方法，其特征在于，步骤 2) 中，所述的化合物 2、二氯甲烷、三乙胺、2,4,6-三甲基苯磺酰氯、4-二甲氨基吡啶、N-甲基吡咯烷的二氯甲烷溶液、硫代乙酸的二氯甲烷溶的用量之比为 15mmol~25mmol : 150mL~250mL : 5mL~15mL : 30mmol~50mmol : 2mmol~6mmol : 10mL~30mL : 20mL~40mL；

所述的 N-甲基吡咯烷的二氯甲烷溶液由体积比 1 : 0.5~1.5 的 N-甲基吡咯烷和二氯甲烷组成，所述的硫代乙酸的二氯甲烷溶液由体积比 1 : 1~3 的硫代乙酸和二氯甲烷组成。

6、根据权利要求 3 所述的 6-双硫取代-2'-脱氧鸟苷类化合物的制备方法，其特征在于，步骤 3) 中，所述的式 5 结构的硫醇、硫脲、H₂O、乙醇、浓盐酸、H₂O₂ 的用量之比为 50mmol~80mmol : 40mmol~60mmol : 15mL~30mL : 50mL~80mL : 4mL~7mL : 5mL~8mL；

所述的浓盐酸的质量百分数为 35%~37%。

7、根据权利要求 3 所述的 6-双硫取代-2'-脱氧鸟苷类化合物的制备方法，其特征在于，步骤 4) 中，所述的化合物 3、氨基脲（二硫氧基）酰亚胺、甲醇、NaHCO₃ 水溶液的用量之比为 1g~2.5g : 2mmol~8mmol : 15mL~35mL : 5mL~10mL，所述的 NaHCO₃ 水溶液由用量比 5mmol~10mmol : 5mL~10mL 的 NaHCO₃ 和水组成。

8、根据权利要求 3 所述的 6-双硫取代-2'-脱氧鸟苷类化合物的制备方法，其特征在于，步骤 5) 中，所述的化合物 4、甲醇、氨水的用量之比为

1mmol~3mmol: 20mL~60mL: 20mL~60mL。

9、根据权利要求 1 或 2 所述的 6-双硫取代-2'-脱氧鸟苷类化合物在制备抗肿瘤药物中的应用。

10、根据权利要求 9 所述的应用，其特征在于，所述的抗肿瘤药物为预防或/和治疗结肠癌、肺癌、皮肤黑色素瘤、乳腺癌、白血病、肝癌、胃癌药物中的一种或者两种以上。

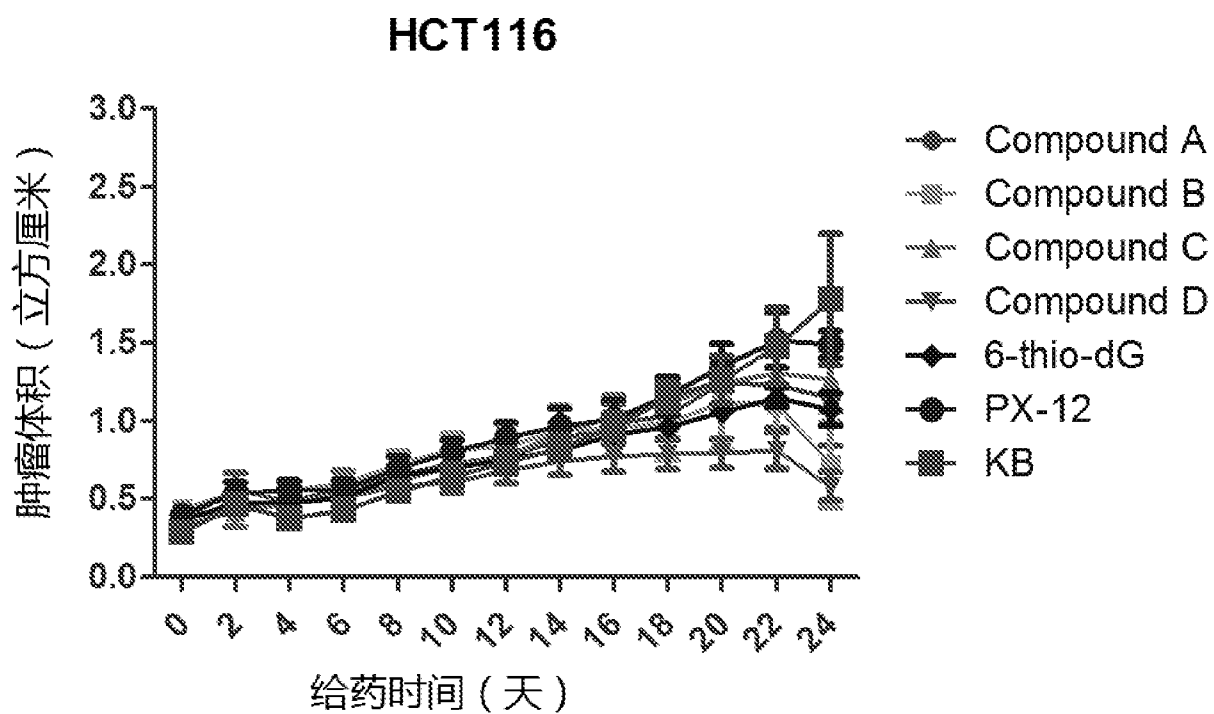


图 1

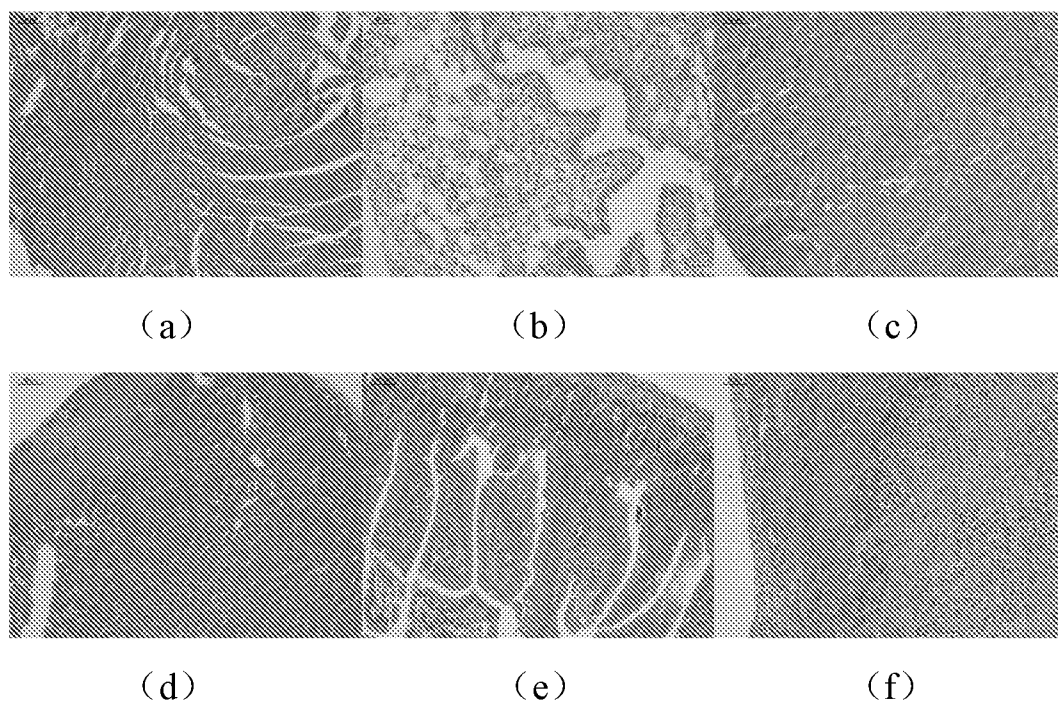


图 2

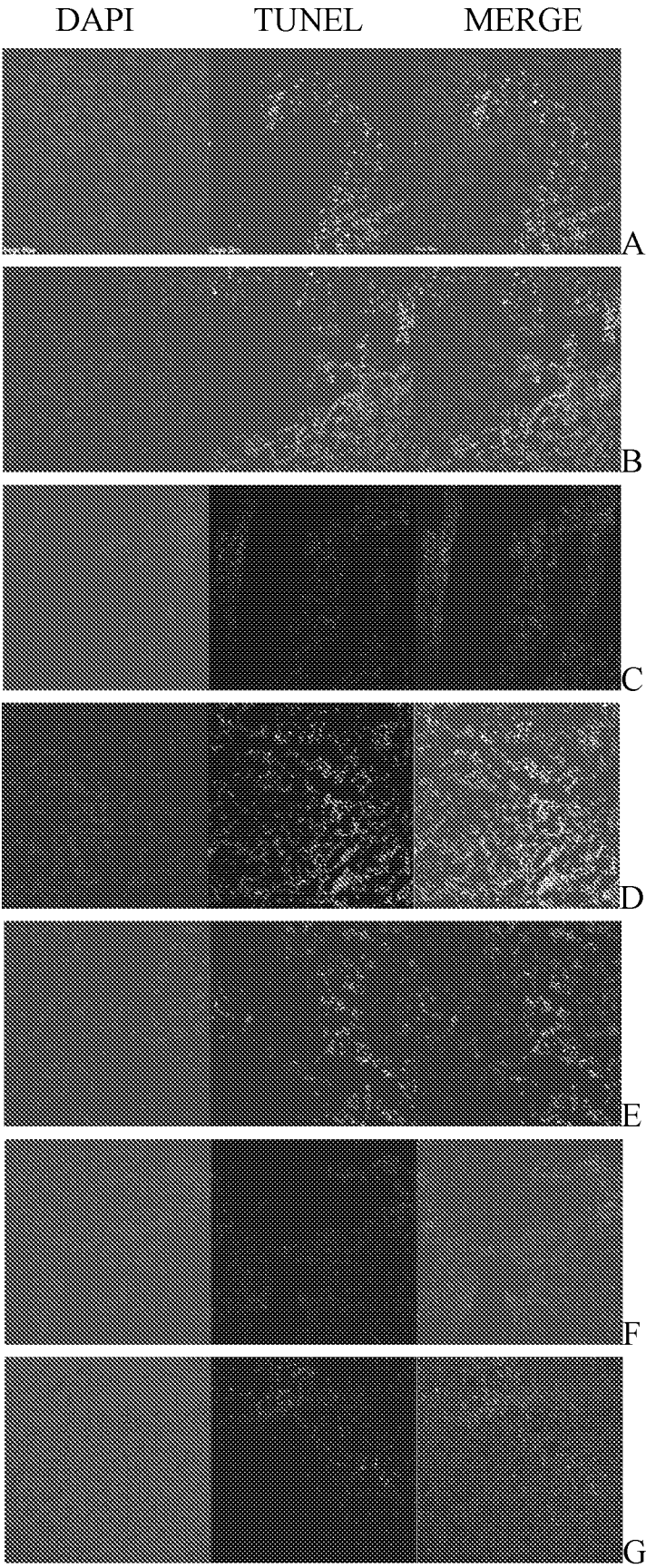


图 3

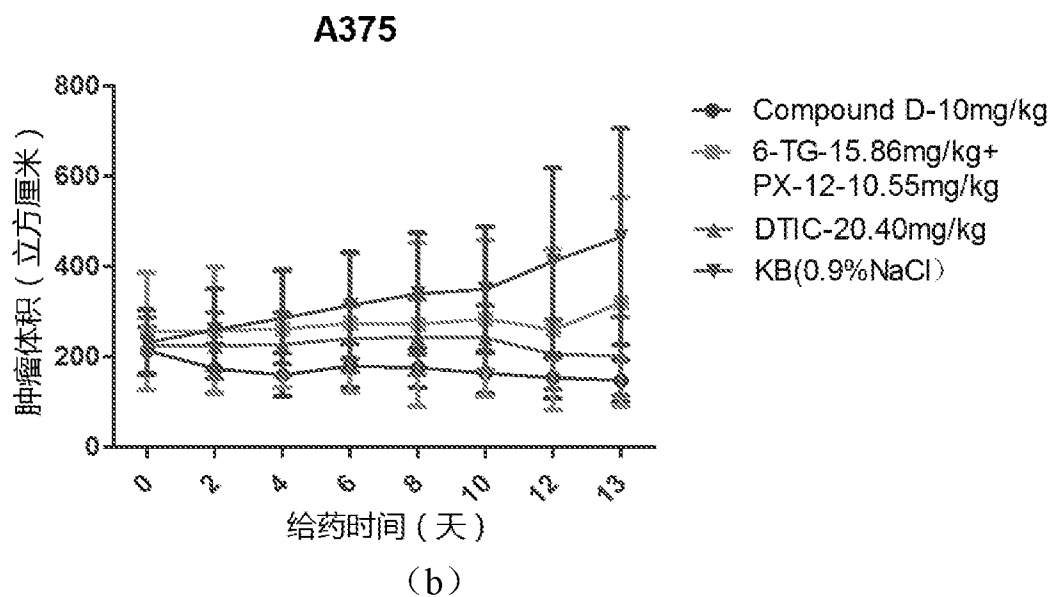
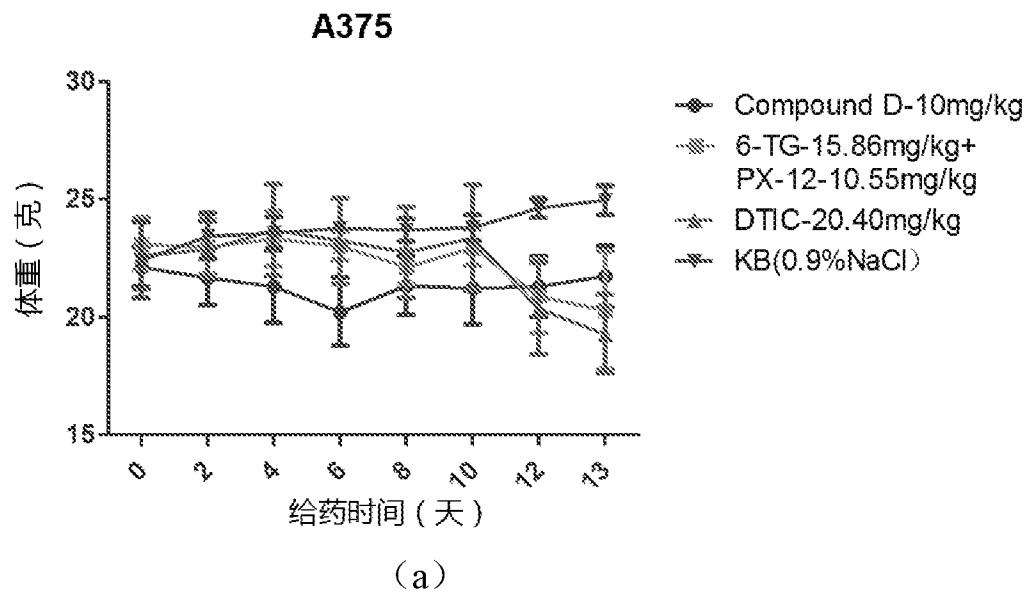


图 4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2019/092094

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07H 19/173(2006.01)i; C07H 1/00(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; A61P 35/02(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07H

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

REGISTRY, CAPLUS, CNABS, CNKI, DWPI 依据式I的结构进行了检索, search based on structure of fomula I, 余露山, 杭州求是专利事务所有限公司, 陈升华, 浙江大学, 双硫, 二硫, dithio, deoxyguanosine

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 109053841 A (ZHEJIANG UNIVERSITY) 21 December 2018 (2018-12-21) claims	1-10
A	WO 2004094447 A1 (KYUSHU TLO CO., LTD. ET AL.) 04 November 2004 (2004-11-04) embodiment	1-10
A	WO 0233128 A2 (PHARMASSET LTD.) 25 April 2002 (2002-04-25) entire document	1-10
X	SANEYOSHI, Mineo et al. "Synthetic Nucleosides and Nucleotides. X. Synthesis and Biological Activities of Several Purin-6-yl Benzyl Disulfides and Their Ribonucleosides" <i>Journal of Pharmacobio-Dynamics</i> , Vol. 1, No. 3, 31 December 1978 (1978-12-31), ISSN: 0386-846X, p. 169, figure 1, compound 8, and pp. 169-172, tables I-V	1, 9
A	SANEYOSHI, Mineo et al. "Synthetic Nucleosides and Nucleotides. X. Synthesis and Biological Activities of Several Purin-6-yl Benzyl Disulfides and Their Ribonucleosides" <i>Journal of Pharmacobio-Dynamics</i> , Vol. 1, No. 3, 31 December 1978 (1978-12-31), ISSN: 0386-846X, p. 169, figure 1, compound 8, and pp. 169-172, tables I-V	2-8, 10

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

17 September 2019

Date of mailing of the international search report

26 September 2019

Name and mailing address of the ISA/CN

China National Intellectual Property Administration (ISA/CN)
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088
China

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2019/092094

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	109053841	A	21 December 2018	None			
WO	2004094447	A1	04 November 2004	GB	2415431	A	28 December 2005
				GB	2415431	B	05 March 2008
				JP	4665758	B2	06 April 2011
				JP	WO2004094447	A1	13 July 2006
				US	2006199953	A1	07 September 2006
				GB	0521297	D0	30 November 2005
				US	7495095	B2	24 February 2009
WO	0233128	A2	25 April 2002	EP	2145965	A1	20 January 2010
				JP	2004533805	A	11 November 2004
				US	7919247	B2	05 April 2011
				CA	2426196	A1	25 April 2002
				US	2007196824	A1	23 August 2007
				EP	1360325	A2	12 November 2003
				EP	2180064	A2	28 April 2010
				US	2007031824	A1	08 February 2007
				US	7718790	B2	18 May 2010
				EP	2180064	A3	11 August 2010
				AU	2888502	A	29 April 2002
				NZ	561342	A	26 February 2010
				WO	0233128	A3	21 August 2003
				US	2003124512	A1	03 July 2003
				EP	2141244	A1	06 January 2010
				US	2009220950	A1	03 September 2009
				NZ	575481	A	29 October 2010

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2019/092094

A. 主题的分类

C07H 19/173(2006.01)i; C07H 1/00(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; A61P 35/02(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

C07H

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

REGISTRY, CAPLUS, CNABS, CNKI, DWPI 依据式I的结构进行了检索, 余露山, 杭州求是专利事务所有限公司, 陈升华, 浙江大学, 双硫, 二硫, dithio, deoxyguanosine

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
PX	CN 109053841 A (浙江大学) 2018年 12月 21日 (2018 - 12 - 21) 权利要求书	1-10
A	WO 2004094447 A1 (KYUSHU TLO CO LTD等) 2004年 11月 4日 (2004 - 11 - 04) 实施例	1-10
A	WO 0233128 A2 (PHARMASSET LTD) 2002年 4月 25日 (2002 - 04 - 25) 全文	1-10
X	SANEYOSHI, Mineo等. "Synthetic nucleosides and nucleotides. X. Synthesis and biological activities of several purin-6-yl benzyl disulfides and their ribonucleosides" Journal of Pharmacobio-Dynamics, 第1卷, 第3期, 1978年 12月 31日 (1978 - 12 - 31), ISSN: 0386-846X, 169页图1化合物8, 第169-172页表I-V	1, 9

☒ 其余文件在C栏的续页中列出。☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件 (如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2019年 9月 17日

国际检索报告邮寄日期

2019年 9月 26日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中国国家知识产权局 (ISA/CN)
中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

受权官员

赵贞贞

传真号 (86-10)62019451

电话号码 62086358

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	SANEYOSHI, Mineo等. "Synthetic nucleosides and nucleotides. X. Synthesis and biological activities of several purin-6-yl benzyl disulfides and their ribonucleosides" Journal of Pharmacobio-Dynamics, 第1卷, 第3期, 1978年 12月 31日 (1978 - 12 - 31), ISSN: 0386-846X, 169页图1化合物8, 第169-172页表I-V	2-8, 10

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2019/092094

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	109053841	A	2018年 12月 21日	无			
WO	2004094447	A1	2004年 11月 4日	GB	2415431	A	2005年 12月 28日
				GB	2415431	B	2008年 3月 5日
				JP	4665758	B2	2011年 4月 6日
				JP	W02004094447	A1	2006年 7月 13日
				US	2006199953	A1	2006年 9月 7日
				GB	0521297	D0	2005年 11月 30日
				US	7495095	B2	2009年 2月 24日
WO	0233128	A2	2002年 4月 25日	EP	2145965	A1	2010年 1月 20日
				JP	2004533805	A	2004年 11月 11日
				US	7919247	B2	2011年 4月 5日
				CA	2426196	A1	2002年 4月 25日
				US	2007196824	A1	2007年 8月 23日
				EP	1360325	A2	2003年 11月 12日
				EP	2180064	A2	2010年 4月 28日
				US	2007031824	A1	2007年 2月 8日
				US	7718790	B2	2010年 5月 18日
				EP	2180064	A3	2010年 8月 11日
				AU	2888502	A	2002年 4月 29日
				NZ	561342	A	2010年 2月 26日
				WO	0233128	A3	2003年 8月 21日
				US	2003124512	A1	2003年 7月 3日
				EP	2141244	A1	2010年 1月 6日
				US	2009220950	A1	2009年 9月 3日
				NZ	575481	A	2010年 10月 29日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2015年1月)