

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200580025952.8

[51] Int. Cl.

C07H 19/213 (2006.01)
A61K 31/7076 (2006.01)

[43] 公开日 2007年7月18日

[11] 公开号 CN 101001865A

[22] 申请日 2005.6.20

[21] 申请号 200580025952.8

[30] 优先权

[32] 2004.6.18 [33] GB [31] 0413726.1

[86] 国际申请 PCT/GB2005/002418 2005.6.20

[87] 国际公布 WO2005/123755 英 2005.12.29

[85] 进入国家阶段日期 2007.1.31

[71] 申请人 劳拉斯有限公司

地址 挪威奥斯陆

[72] 发明人 K·温海姆 K·塔什肯
J·克拉韦内斯 G·朗利
V·比约恩斯塔

[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
代理人 唐晓峰

权利要求书2页 说明书86页 附图1页

[54] 发明名称

嘌呤核苷酸衍生物

[57] 摘要

本发明提供了新型的8-二价碳基取代的cAMPS和用于制备8-Br-cAMP——一种关键起始材料的新方法。

1. 一种 8-二价碳基取代的 cAMPS 化合物或其衍生物。
2. 如权利要求 1 所述的化合物，其中所说的 8-取代基包含高至 25 个非氢原子。
3. 如权利要求 1 或权利要求 2 所述的化合物，其中所说的 8-取代基包括一种含有 5 至 10 个环原子的环基团。
4. 如权利要求 1 或权利要求 2 所述的化合物，其中所说的 8-取代基选自任选地被取代的芳基如苯、萘和环状的羧酸系统、以及环状的杂环系统，包括吡啶、二-和三嗪、呋喃、噻吩和吡咯，以及吡咯系，和三唑类、以及噁二唑和噻二唑类，以及四唑类；杂芳基如六-员环吡嗪类、吡啶、二嗪类、三嗪和环状的碳环系统，以及上面所定义的环状的杂环，和五-员环系如呋喃、噻吩和吡咯、吡咯系、和三唑类、以及噁二唑和噻二唑类，和四唑类以及环状的杂环和碳环系统。
5. 如权利要求 1 至 4 中任意一项所述的化合物，其中所说的 8-取代基包括苯基、呋喃基或噻吩基。
6. 如权利要求 1 至 5 中任意一项所述的化合物，其在硫代磷酸硫、腺苷胺基和呋喃基羟基中的一个或多个上被保护。
7. 如权利要求 1 至 6 中任意一项所述的化合物，其中 R_p 或 S_p 形式为至少 90% 摩尔。
8. 制备 8-二价碳基化的 cAMPS 或其衍生物的方法，所说的方法包括至少一步下面的步骤：
 - a) 将 2'-保护的 8-二价碳基化 -腺苷 3', 5'-环氨基磷酸酯与二硫化碳进行反应并将该 2'-羟基去保护；
 - b) 将 8-二价碳基化的-腺苷与 SPCl₃ 在无水溶剂中进行反应；
 - c) 将 8-二价碳基化的-腺苷与亚磷酸盐进行反应并随后使其与硫进行反应；
 - d) 将任选地 2'-保护的-8-卤代-cAMPS 与烷化剂进行反应并且如果需要的话将其 2' 羟基去保护；

- e) 将 8-二价碳基化的 cAMPS 转化成其盐;
- f) 将 8-二价碳基化的 cAMPS 与生物学可裂解的保护基团进行反应; 和
- g) 从 8-二价碳基化的 cAMPS 或其衍生物的 R_p/S_p 异构体混合物中分离出 R_p 和 S_p 异构体。
9. 8-二价碳基化的腺苷环 3', 5'-氨基磷酸酯或其衍生物。
10. 8-二价碳基化-2'-保护的 (例如硅烷化的) 腺苷环 3', 5'-硫代磷酸酯或其衍生物。
11. 8-卤代 (并且优选 2'-保护的 (例如硅烷化的)) 腺苷环 3', 5'-氨基磷酸酯或其衍生物。
12. 一种包含 8-二价碳基化的 cAMPS 或其衍生物和生理学可耐受的载体或容纳剂的药物组合物。
13. 一种对人或非人动物 (优选哺乳动物) 体进行治疗以在其中获得 cAMP 激动剂或拮抗剂作用的方法, 所说的方法包括给所说的机体使用有效量如权利要求 1 至 7 中任意一项所述的 8-二价碳基化的 cAMPS 或其衍生物。
14. 如权利要求 1 至 7 中任意一项所述的 8-二价碳基化的 cAMPS 或其衍生物用于制备用于对人或非人动物 (优选哺乳动物) 体进行治疗以在其中获得 cAMP 激动剂或拮抗剂作用的方法的药物的应用。
15. 一种用于测定样品, 通常为生物学样品中的 cAMP 的试验方法, 该方法包括将所说的样品与 cAMP-类似物和 cAMP 结合剂进行接触, 其特征在于所说的类似物是 8-二价碳基化的 cAMPS 或其衍生物。

嘌呤核苷酸衍生物

本发明涉及新型嘌呤核苷酸衍生物、其制备方法、其制备中的中间体、包含其的组合物、其在医学和诊断学中的应用、以及用其来进行治疗和试验的方法，具体而言其中所说的嘌呤核苷酸衍生物是在嘌呤环的 8-碳上被碳连接的取代基取代的嘌呤环单磷酸硫代磷酸酯 (phosphorothioate)。

天然存在的环单磷酸嘌呤、环磷酸腺苷 (cAMP) 和环磷酸鸟苷 (cGMP) 是对于调控对激素的细胞功能的作用而言很重要的信使分子。

已经提出该类环核苷酸的类似物可用于治疗与免疫功能降低或增加有关的疾病状态。因此，一种该类类似物是环单硫代磷酸腺苷 (cAMPS)，或者更确切地说，是腺苷 3', 5'-环单硫代磷酸盐，其中悬挂在硫原子上的一个氧原子被硫代替。因此，该磷是一个手性中心并且在其为 R_p 构型 (该磷原子上的构型) 时，cAMPS 是一种 cAMP 拮抗剂，而在其为 S_p 构型 (在该磷原子上的构型) 时，其是一种 cAMP 激动剂。例如在 W098/48809 中已经提出用 R_p -cAMPS 作为用作 HIV 治疗的一部分的 cAMP 拮抗剂，在 US-A-5843916 中已经提出用 cAMPS 作为肿瘤生长的抑制剂。

W098/48809 特别是建议了用 cAMP 拮抗剂来抑制酶——cAMP-依赖性蛋白激酶 I (PKAI) 的活性，并且在这一点上，其提出了使用在嘌呤环的 8-碳上被杂原子 (例如 Br 或 Cl) 或者杂原子连接的基团 (例如哌啶) 取代的 R_p -cAMPS。此外，Gjertsen 等人在 J. Biol. Chem. 270: 20599-20607 (1995) 中证明了对于 PKAI 而言，8-氯和 8-溴 R_p -cAMPS 的拮抗活性高于在 8 位上未被取代的 R_p -cAMPS。

许多 8-取代的 cAMPS 可以通过商业途径得自 Biolog-Life Science Institute of Bremen, 德国，特别是 R_p -8-Br-cAMPS、 R_p -8-Br-MB-cAMPS (MB 是位于该核糖环的 2' 位上的单丁酰基取代基)、

Rp-8-Cl-cAMPS、Rp-8-CPT-cAMPS(其中 CPT = 4-氯苯硫基)、Rp-8-HA-cAMPS(其中 HA = 己基氨基)、Rp-8-OH-cAMPS、Rp-8-PIP-cAMPS(其中 PIP = 哌啶子基)、Rp-8-AEA-cAMPS(其中 AEA = 2-氨基乙基氨基)、Rp-8-AHA-cAMPS(其中 AHA = 6-氨基己基氨基)、Rp-8-N₃-cAMPS(其中 N₃ = 叠氨基)、和 Rp-8-I-cAMPS。Biolog 还提供 Sp-cAMPS 化合物,但是所有的产品也都是 8 位未被取代或者在 8 位上被杂原子或杂原子连接的基团所取代。

目前对 HIV 感染的治疗有抗-HIV 药的有效鸡尾酒疗法;高活性抗逆转录病毒疗法(HAART)。HAART 包括靶向于所说病毒并且是对感染 HIV 的患者进行治疗的主要组分的蛋白酶抑制剂和核苷以及非核苷类似物。但是,虽然 HAART 通过中止 AIDS 的发展而显著延长了感染 HIV 患者的寿命,但是 T 细胞功能似乎仍然持续受损。事实上,在 HAART 期间,HIV-特异性免疫响应看起来是下降而不是增加。此外,HAART 不能消灭所说的病毒,患者在停止治疗时表现出病毒复发并且对于一些患者而言,病毒对该治疗产生耐受性。此外,许多患者还不能耐受目前的药物,在使用这些药物时可能会出现严重的不良事件。

因此,越来越认识到需要其它治疗方式。以免疫调节为基础的改善 HIV 患者“被击垮的”免疫系统功能的治疗可以使免疫系统有能力将所说的病毒从其储库中驱赶出来,并且其可能是 HIV 患者一种重要的辅助治疗。cAMP 水平升高并从而导致的 I 型 PKA 活化的增加可以不依赖于正在进行的 HAART 地显著抑制 HIV-感染个体的 T 细胞增殖。使用选择性 I 型 PKA 抑制剂改善了 HIV 感染患者受损的 T 细胞增殖,改善率高至 300%。上述观察结果表明 I 型 PKA 可作为免疫调节疗法的潜在目标。选择性 I 型 PKA 拮抗剂如 Rp-8-Br-cAMPS 提供了一种逆转免疫缺陷中 I 型 PKA 不适当活化的可能并且从而恢复了 T 细胞功能和免疫响应能力。已经表明大多数 Rp-cAMPS 异构体可以通过与 R 亚基的 cAMP 结合部分竞争性结合来作为 PKA 的拮抗剂,但是其不会分裂和活化所说的酶。

此外,已经表明 Rp-cAMPS 衍生物的特征在于一些化合物(例如

Rp-8-Br-cAMPS)可作为 I 型 PKA 同工酶的选择性和完全拮抗剂并且可作为 II 型 PKA 同工酶的部分激动剂。大多数细胞和组织包含很高数量的被固定在许多亚细胞部位上并参与介导许多 cAMP 诱导的作用的 II 型 PKA。

相反, 虽然 I 型 PKA 的分布也很广泛, 但是表明其主要是调节免疫细胞功能所必需的并且其足以调节免疫细胞功能。其提供了一些组织/细胞选择性, 从而支持一种以 I 型 PKA 选择性拮抗剂为基础的治疗可能。尽管 I 型 PKA 是人们感兴趣的药物目标, 但是可药用的 cAMP 拮抗剂无法获得。研制干扰 cAMPS 作用的免疫刺激药将改善 T 淋巴细胞的免疫功能并且可以通过研制抵抗 cAMP 作用的 I 型 PKA 选择性 cAMP 拮抗剂来使其恢复临床前试验。所进行的研究的特定目标是研制该类化合物和建立用于对作为可逆转 HIV 中的免疫缺陷的免疫刺激药的化合物进行评估的方法和模型。

我们现在令人吃惊地发现用其中嘌呤 8-碳被二价碳基, 即碳-连接的基团取代的 cAMPS 可以获得特别高的 PKAI (或更精确地讲, PKA RI α) 亲合力, 即 cAMP 激动并且更尤其是拮抗作用。

因此, 本发明一方面提供了 8-二价碳基取代的 cAMPS 或其衍生物。

本文中的术语衍生物指的是进行了化学修饰但是在应用时保留了发挥 8-被取代的 cAMPS 活性的能力的化合物, 例如盐、酯、前体药物 (即生物前体) 等形式。在所说的衍生物在使用时包含或者产生一种从 8-取代的 cAMPS 上分离下来的组分, 例如反荷离子或可裂解的保护基团的情况中, 这种组分优选地是生理学可耐受的。

所述的需要通过碳-碳键被连接到腺嘌呤环的 8-位上的 8-取代基可常常包含高至 25 个非氢原子, 更优选地包含高至 20, 尤其是高至 15, 特别是高至 10 个非氢原子。这些非氢原子包括至少一个碳并且可以全部都是碳; 但是, 优选地, 所说的非氢原子中的至少一个, 例如高至 6 个可以是杂原子, 例如卤素、氧、硫、氮或磷, 尤其是 O、N 或 S。所说的 8-取代基可以是直链、支链或环状的或者可以是其两种或多种形式的组合并且可以是饱和或不饱和的。所说的取代基尤其优

选地是或包含一种环状基团，特别是同素环的或杂环的芳基，例如包含 5 至 10 个环原子的芳基，更具体地是包含 5 个环原子的杂芳基或苯基。因此，所说的取代基例如可以是任选地通过羰基或硫代羰基被连接并且可任选地被酰基、卤素、羟基、硫羟、氨基、羧基(或其它含氧酸)、氰基、叠氮基、烷氧基、酯、醚或烷硫基取代的芳基、芳烷基、烷芳基、烷基、环烷基、链烯基、或炔基。在任何该类取代基中，烷基或其不饱和的类似物优选地包含高至 10 个碳，特别是高至 6 个碳。

本发明典型 8-取代基的实例包括芳基如苯、萘和环状羧酸系统、和环状杂环系统，包括吡啶、二-和三嗪、咪唑、噻吩和吡咯、以及吡咯系、和三唑类、以及噁二唑和噻二唑、以及四唑类；杂芳基如六-员的环吡啶类、吡啶、二嗪、三嗪和环状的碳环系统、以及上面所定义的环状的杂环系统，和五-员环系如咪唑、噻吩和吡咯、吡咯系、和三唑类、以及噁二唑和噻二唑类，和四唑类以及上面所定义的环状的杂环和碳环系统；任选地被取代的芳基和杂芳基，例如被

(i) OR^1 ，其中 $R^1 = H$ 、 C_1-C_{10} 烷基、 C_2-C_{10} 链烯基、 C_2-C_{10} 炔基、芳基或杂芳基、以及其任选地被取代的衍生物，

(ii) SR^1 、 SOR^1 和 SO_2R^1 ，其中 R^1 的定义如上所述，

(iii) NR^1R^1 ，其中可以相同或不同的各 R^1 的定义如上所述，

(iv) 卤素，

(v) CO_2R^1 、 COR^1 、或 $CONR^1R^1$ ，其中可以相同或不同的各 R^1 的定义如上所述，和

(vi) 另外的任选地被取代的芳基和杂芳基所取代；

羰基、硫代羰基、亚氨基羰基和氰基衍生物如 CO_2R^1 、 COR^1 、 $CONR^1R^1$ 、 $C(NR^1)NR^1R^1$ 、 $CSNR^1R^1$ 和 CN ，其中可以相同或不同的各 R^1 的定义如上所述；和任选地被取代的非芳族碳取代基，如

C_1-C_{10} 烷基，

C_2-C_{10} 链烯基，

C_2-C_{10} 炔基，例如其中所说的任选的取代涉及

(a) 向 C_2-C_{10} 链烯基或炔基中插入另外的双键和三键

(b) 插入氧基从而形成酮或醛

(c) 被其本身任选地被卤素(例如 F 和/或 Cl)、 OR^1 、 SR^1 、S-氧化物(例如 SOR^1 和 SO_2R^1)、 NR^1R^1 、 CO_2R^1 、或 $CONR^1R^1$ 取代的芳基和杂芳基取代基所取代, 其中可以相同或不同的各 R^1 的定义如上所述。

特别优选的 8-取代基包括苯基、呋喃基、和噻吩基, 尤其是 2-呋喃基。

在所说的 8-取代基是芳基的情况下, 如果需要的话, 其可以被一个或多个极性基团, 例如 OR^1 、 SR^1 、 SOR^1 、 SO_2R^1 、 NR^1_2 、卤素、 CO_2R^1 、 COR^1 、 $CONR^1R^1$ 、 NO_2 、 $P(OR^1)_2$ 、和 CH_2OR^1 所取代。

在本发明 8-二价碳基-取代的 cAMPS 中, 如果需要的话, 其框架的其它位置也可以被取代, 所说的其它框架位置例如其 2'-氧、6-氨基的氮和从该环状磷原子上悬垂下来的氧和硫。在这一点上, 所说的取代基可以是上面 8-位上所定义的取代基或者例如可以是与 cAMP 和 cAMPS 有关联的已知取代基(例如酰基、烷基羰基、芳基等)。在本发明的化合物中, 尤其优选 2'-氧的甲硅烷基取代, 其是活性化合物的 2'-保护形式。

除产生前体药物的取代外, 本发明的化合物理想地是以其中仅 8 位被取代的形式被使用的。特别优选其中磷-悬垂的氧或硫被取代从而掩盖了该环状磷基团的酸度的前体药物形式。因此, 该类前体药物例如通常被 S-烷基化。虽然 S-烷基化是一种优选的选择, 但是所引入的基团通常也可以是直接或间接被连接到与该硫代磷酸的硫相连的亚甲基上的酯、硫代酸酯(即 $R-CS-S-R-$ 、 $R-CO-S-R-$ 或 $R-CS-O-R-$) 基团。在间接连接的情况下, 其连接物优选地包含一种离域的电子结构, 从而使得(硫代)酯的裂解触发了去保护(例如如下面的流程图 2b 中那样使用 P-酰基-苄基保护基)。或者, 可以使用其中腺嘌呤环 6-位中的氨基或呋喃环的羟基被在给药后可消除的基团例如酯或双酯保护基保护起来的前体药物形式。类似地, 可以用酰氧基烷基如新戊酰氧基甲基或烷氧基甲基对该 6-氨基进行 N-保护。一般而言, 在制备该类前体药

物时,根据其 *O*-和 *N*-保护基团的性质,可以在进行硫杂化之前或之后来进行胺或羟基保护。

在需要对 *R_p* 和 *S_p* 异构体进行分离例如用色谱法或结晶进行分离的制备方法中,在磷-悬垂的氧或硫上被取代的化合物尤其有用。其中 2'-位被硅烷化的化合物同样可特别优选地用作帮助进行纯化的中间体。

本发明 8-二价碳基取代的 cAMPS 可以为 *R_p* 或 *S_p* 构型并且可以同时包含 *R_p* 和 *S_p* 异构体。对于本发明的应用而言,所说的化合物优选地为至少 90% *R_p* (或 *S_p*), 尤其是至少 95%, 特别是至少 98%。对于作为 cAMP 拮抗剂的应用而言,该化合物优选地主要为 *R_p* 异构体的形式; 对于作为 cAMP 激动剂的应用而言,其优选地主要为 *S_p* 异构体的形式。

在下面特别详细地描述了四种加工流程图,可以由其来制备本发明 8-二价碳基取代的化合物。在第一个流程图中,将 8-卤化的 3',5'-环氨基磷酸酯 8-二价碳基化(carbylated),随后,在一种保留了手性磷的构型的反应中用硫代替与磷相连的氮;在第二和第三个流程图中,将腺苷 8-二价碳基化,随后,引入环状的磷基团;和在第四个流程图中,将 8-卤代-cAMPS 8-二价碳基化。首先由于其灵活性(和保留了其立体化学)并且其次由于经济方面的原因,优选第一和第二个加工流程图。所有这些加工流程图都形成了本发明的另一方面。从这一方面来看,本发明提供了一种制备 8-二价碳基化的 cAMPS 或其衍生物的方法,所说的方法包括至少一步下面的步骤:

a) 将 2'-保护的 8-二价碳基化的-腺苷 3',5'-环氨基磷酸酯与二硫化碳进行反应并将其 2'-羟基去保护;

b) 将 8-二价碳基化的-腺苷与 SPCl_3 在无水溶剂中进行反应;

c) 将 8-二价碳基化的-腺苷与亚磷酸盐进行反应,并且随后将其与硫进行反应;

d) 将任选地被 2'-保护的-8-卤代-cAMPS 与烷化剂进行反应,并且如果需要的话将其 2'-羟基去保护;

e) 将 8-二价碳基化的 cAMPS 转化成其盐;

f) 将 8-二价碳基化的 cAMPS 与生物学可裂解的保护基团进行反应；和

g) 由 8-二价碳基化的 cAMPS 或其衍生物的 R_p/S_p 异构体混合物分离出 R_p 和 S_p 异构体。

嘌呤 8-位的二价碳基化(carbylation)可以用一种在 8-位上被官能化的材料来特别容易地完成。可以通过用简单的溴化引入溴原子来方便地对所说嘌呤杂环的 8-位进行官能化。

根据需要, 本发明化合物中的 8-二价碳基取代基可以是电子供体或吸电子基团。

通过环境温度下向 NaOAc 缓冲的水溶液中加入溴来区域选择性地将在 8-位上溴化。可以以相似的方式将 cAMP 溴化, 但是溴化的 cAMP 也可以通过商业途径获得。或者, 可以通过相应的锂化类物质和卤素的加成, 特别是用于腺苷的溴化和碘化的方法来完成 8-位的卤化。在这种情况下中的底物是被完全甲硅烷基-保护的(TBDMS)腺苷。8-位的锂化可以用正丁基锂在标准条件下来完成。这种方法提供了获得 8-碘代衍生物的最佳入口。

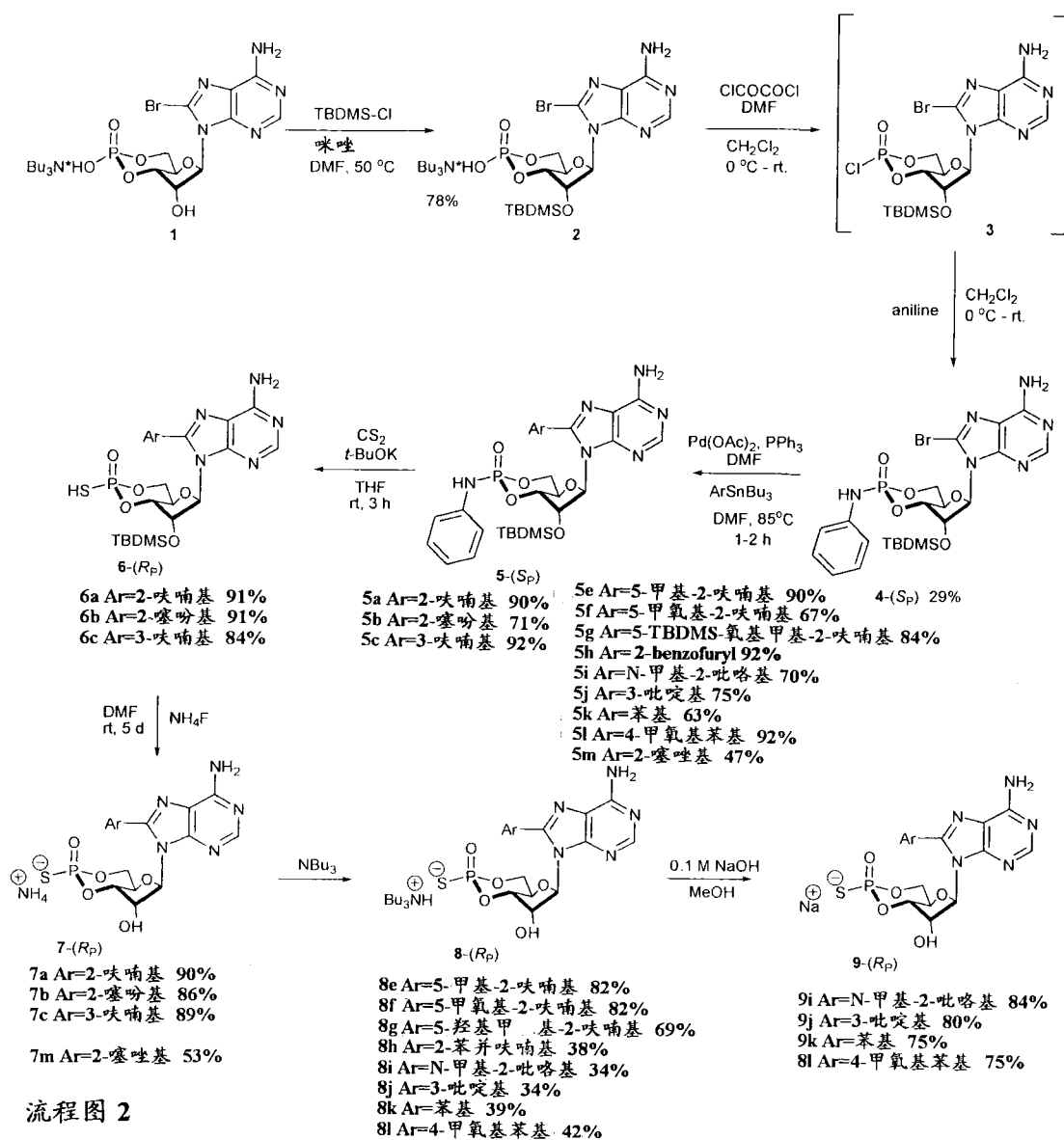
二价碳基化反应:

(i) 在核苷水平或者环核苷酸水平下, 二价碳基化都可以通过过渡金属催化的交叉-偶合反应来完成。我们现在确立了用于制备一系列钯催化的反应的方法学。

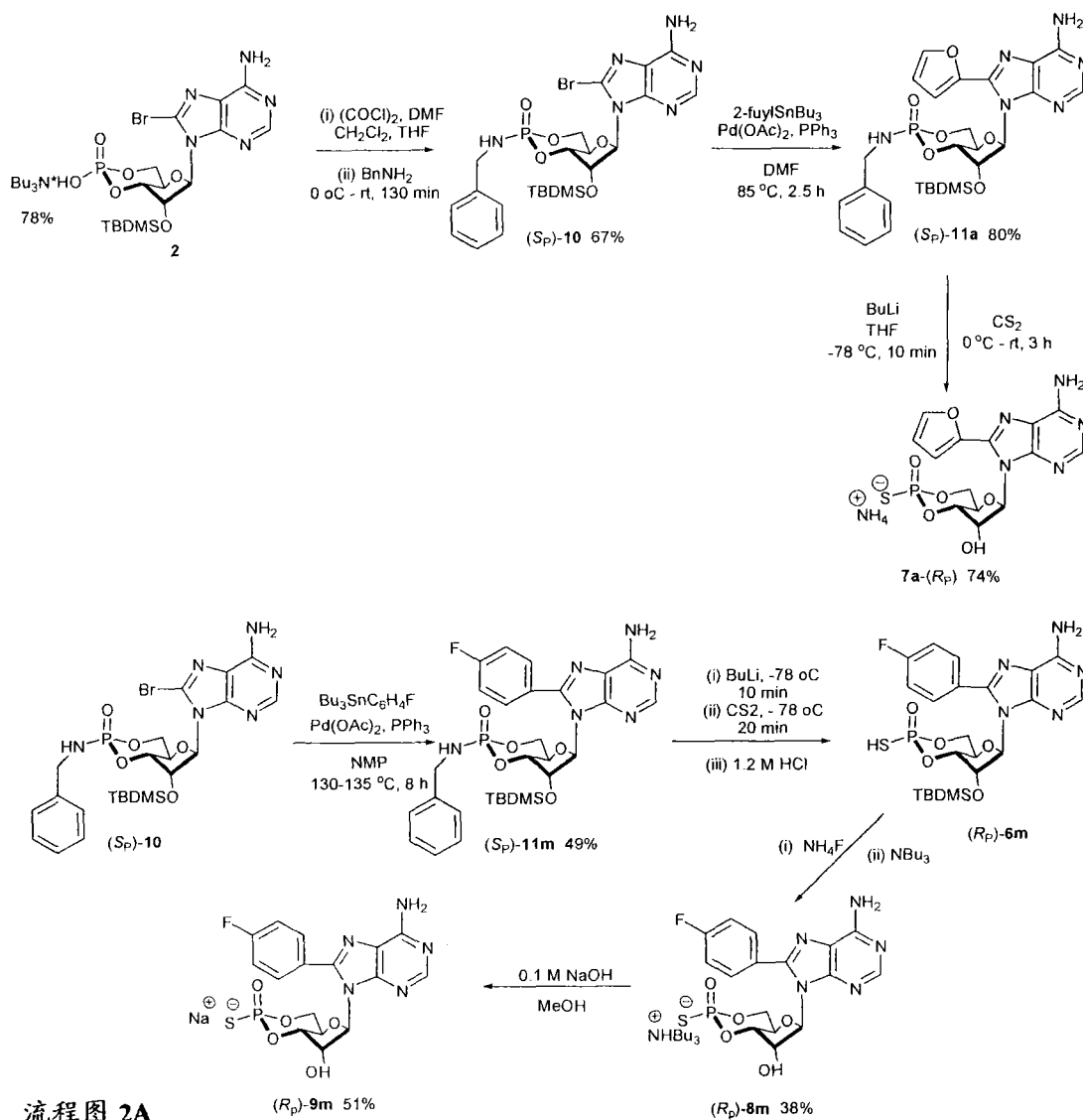
(ii) 在中间体环状氨基磷酸酯水平下, 嘌呤 8-位的二价碳基化可以通过过渡金属催化的交叉-偶合反应来完成。

(iii) 二价碳基化还可以在环硫代磷酸水平上来进行。所说的硫代磷酸优选地以 *O*-酯或 *S*-酯的形式存在。随后, 可以将该酯裂解, 从而获得相应的硫代磷酸衍生物。

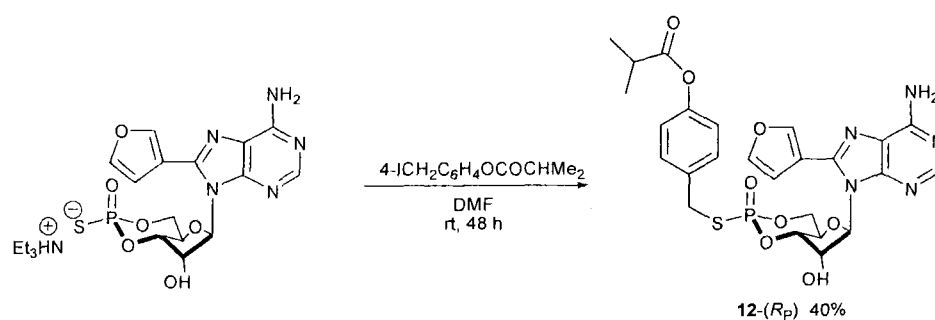
在这些交叉-偶合反应中, 已经在 Pd-催化条件下在全乙酰化的 8-Br-腺苷和四烷基锡烷类之间的反应中完成了简单的烷基化。用于合成低级烷基嘌呤核苷的一种更方便的方法是通过钯-催化的卤代嘌呤核苷与三烷基铝的交叉-偶合反应来实现的。乙烯化和烯丙基化都可以



流程图 2



流程图 2A



流程图 2b

在我们新的和有创造性的流程图 2 的方法中，用庞大的甲硅烷基对铵盐 1 形式的 cAMP-8-Br 进行 2'-O-保护。对于此目的而言，

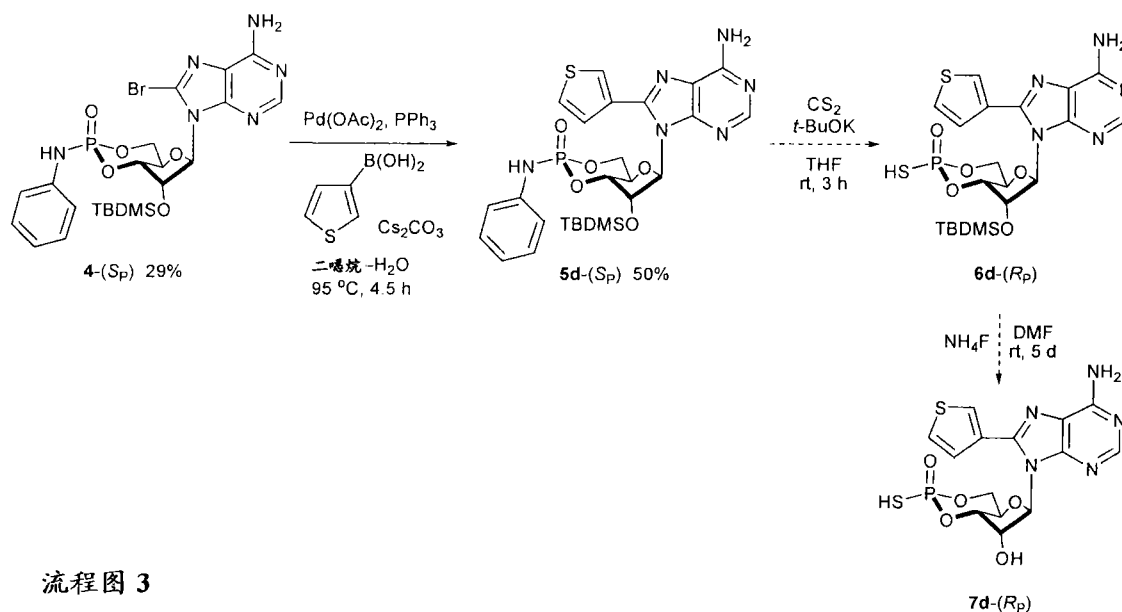
TBDMS-C1 是一种方便有效的试剂 (TBDMS = 叔-丁基二甲基甲硅烷基)。随后, 将甲硅烷基醚 2 氯化, 从而形成结构 3。

庞大的甲硅烷基在该合成序列中还具有第二种重要的功能。其使得硫杂化后的产物可以有效地从含水反应混合物中沉淀出来并且有助于如下那样进行的纯化。也可以使用具有相似性质的其它保护基团。

在该氯化方法中, 已经成功地将草酰氯与催化数量或甚至过量的 DMF 一起使用。磷的实际氯化剂是由草酰氯和 DMF 在原位产生的氯-亚氨基衍生物中间体。可以分离出所需的磷酰氯立体异构体 3。但是, 该粗品可以被用于随后的酰胺化步骤中。

可以用各种伯胺或被掩蔽的胺来进行所说的酰胺化。亲核性的胺可以容易地与该氯化物进行反应。但是, 所说酰胺化物必需具有足够强的酸性来夺取氨基剩余的氢。一些芳族胺可满足后一种需求。我们选择苯胺来进行我们的工作。与苯胺的反应可以在冰冷的二氯甲烷中完成。在这些条件下, 该反应是立体有择性的, 即由该反应混合物中仅获得一种酰胺化物立体异构体 4。

该酰胺化物是适于溶解于一些普通有机溶剂中的中性分子。因此, 这些分子对于 8-位的二价碳基化反应而言是适宜的。数种过渡金属将催化此过程。我们在所说的催化剂系统中广泛地使用钯。在大多数情况中, 在我们的初期工作中使用利用甲锡烷基试剂的 Stille 条件。交叉-偶合产物的收率极佳。可以使用其它有机金属试剂, 例如锌和硼化合物。如流程图 3 中所示, 以相同方式进行在 Suzuki 条件下进行的硼酸的偶合。因此, 用这种方法可以获得许多 8-取代的衍生物。



流程图 3

随后，将流程图 2, 2a 和 3 中的 8-溴代衍生物 4 和 8-二价碳基化的酰胺化物 5 以及 11 硫杂化。推荐通过用二硫化碳对该胺进行置换来引入含硫基。我们发现，使用位于 THF 中的二硫化碳和作为碱的叔-丁醇钾，在室温下进行的硫杂化需要的时间低于 3 小时。以极佳的收率获得了硫代磷酸酯 6。继续在保留磷原子构型的情况下进行立体有择性取代。但是，因为命名法的优先原则，其形式上的构型分配发生了变化。这种处理在该硫代磷酸目标分子中产生了 Rp 构型。

除保护作用外，因为在分离和纯化过程中的相对溶解度，所以存在的庞大的甲硅烷基对于被硫杂化的产物 6 的分离而言也是十分重要的。

产物 6 的脱甲硅基作用是用氟化铵在 DMF 溶液中完成的。使该脱甲硅基作用在室温下进行 5 天，其后，以极佳的收率分离出目标产物 7。用这种方式，获得了 8-二价碳基化的目标产物以及 8-溴代 cAMPS。当需要时，可以在如方法 IV 中所述的那样对其酸性官能团进行 O-或 S-保护后，将该 8-溴代 cAMPS 作为交叉-偶合反应的底物。

以立体有择方式形成酰胺化物(流程图 2 中的 4)是本节所概括的合成中的一个重要步骤。该苯胺酰胺化物的氢具有足够的酸性，从而

使得对于随后的硫杂化而言可以容易地被夺取(例如使用醇化物碱)。但是,在用脂族或被取代的脂族胺(例如苄胺)代替苯胺来形成酰胺化物的情况中,也可以十分有效地进行立体有择性的硫杂化。在这种情况下,用强碱(例如丁基锂)来去质子化(见例如流程图 2A)。

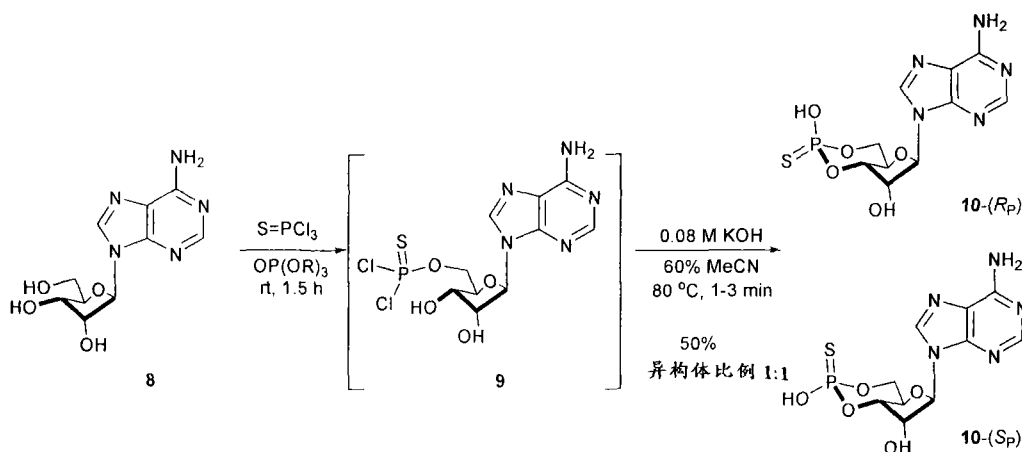
此外,在使用脂族或被取代的胺(如苄胺)的情况中,可以有利地用有机锌化合物来进行 δ -二价碳基化,所说的有机锌化合物尤其是其中所说的有机基团是小的杂环的物质,特别是一种在与环杂原子相邻的环碳上进行连接,例如与钨催化剂连接的物质。一般而言,在一个环状基团被连接到 δ -位的情况中,与该环碳连接相邻的原子优选地未被取代。

方法 II

通过闭环反应进行的硫杂化:

已经由相应的核苷 5'-*O*-(1-硫代三磷酸酯)通过酶催化合成了(*Rp*)-cAMPS。在下面的实施例中并没有使用酶促技术,但是在这里提供该方法作为一种供替代的选择。

在化学合成中,将未进行*O*-保护的*N*-苯甲酰基-腺苷用二(对-硝基苯基)氯代硫代磷酸酯(phosphorochlorothioate)在吡啶中进行处理。随后,将产物——腺苷 5'-二(对-硝基苯基)硫代磷酸酯在无水的DMF中用叔-丁醇钾作为碱来进行环化。在用浓氨水解封后,用色谱法对该非对映体进行分离。

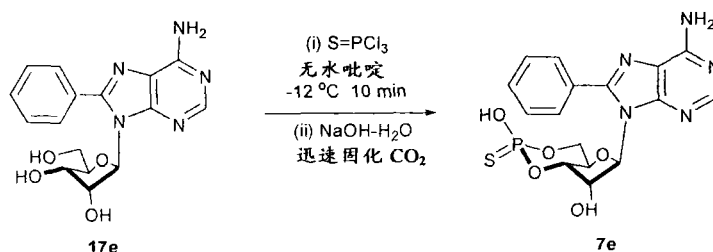


流程图 4

已经用三氯硫磷(thiosphoryl trichloride)通过对未被保护的核苷进行环硫代磷酸化来完成了核苷-3', 5'-环硫代磷酸酯的合成(流程图 4)。推测这种最初的磷酸化作用发生在该糖的 5'-OH 上。建议用三烷基磷酸酯作为溶剂。在高稀释度下用金属氢氧化物在含水乙腈中将这种产物直接环化, 从而以 1:1 的比例得到非对映异构的核苷-3', 5'-环硫代磷酸酯 cAMP, 用色谱技术对其进行分离。流程图 4 中母体化合物 10 的非对映异构体在 8-上没有取代基。

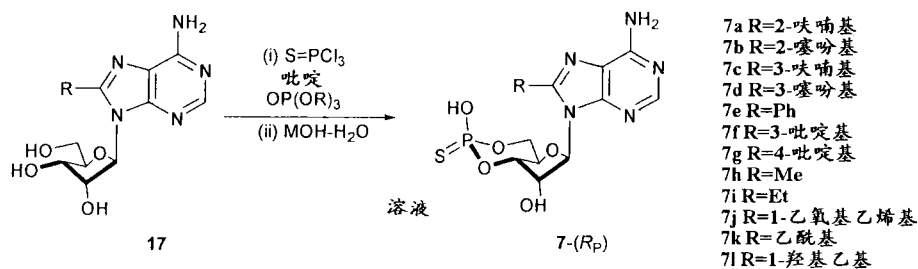
在本发明中, 如流程图 6 中所概述的那样, 腺苷 8 被转化成 (*Rp*)-8-取代的-腺苷-3', 5'-环硫代磷酸酯 7。我们确立了一种几乎仅提供所需的 3', 5'-环硫代磷酸酯 7 的方法, 但是其是以立体化学混合物的形式被提供的。当在冰冷的无水吡啶中进行硫代磷酸化和环化时, 该反应在这一点上是清洁的。在进行色谱分离后, 可以以纯物质的状态分离出任何一种立体异构体。用流程图 5 中所示的这种方法制得了 8-苯基衍生物 7e。

当需要时, 可以以相似的方式获得 (*Sp*)-cAMPS 衍生物。



流程图 5

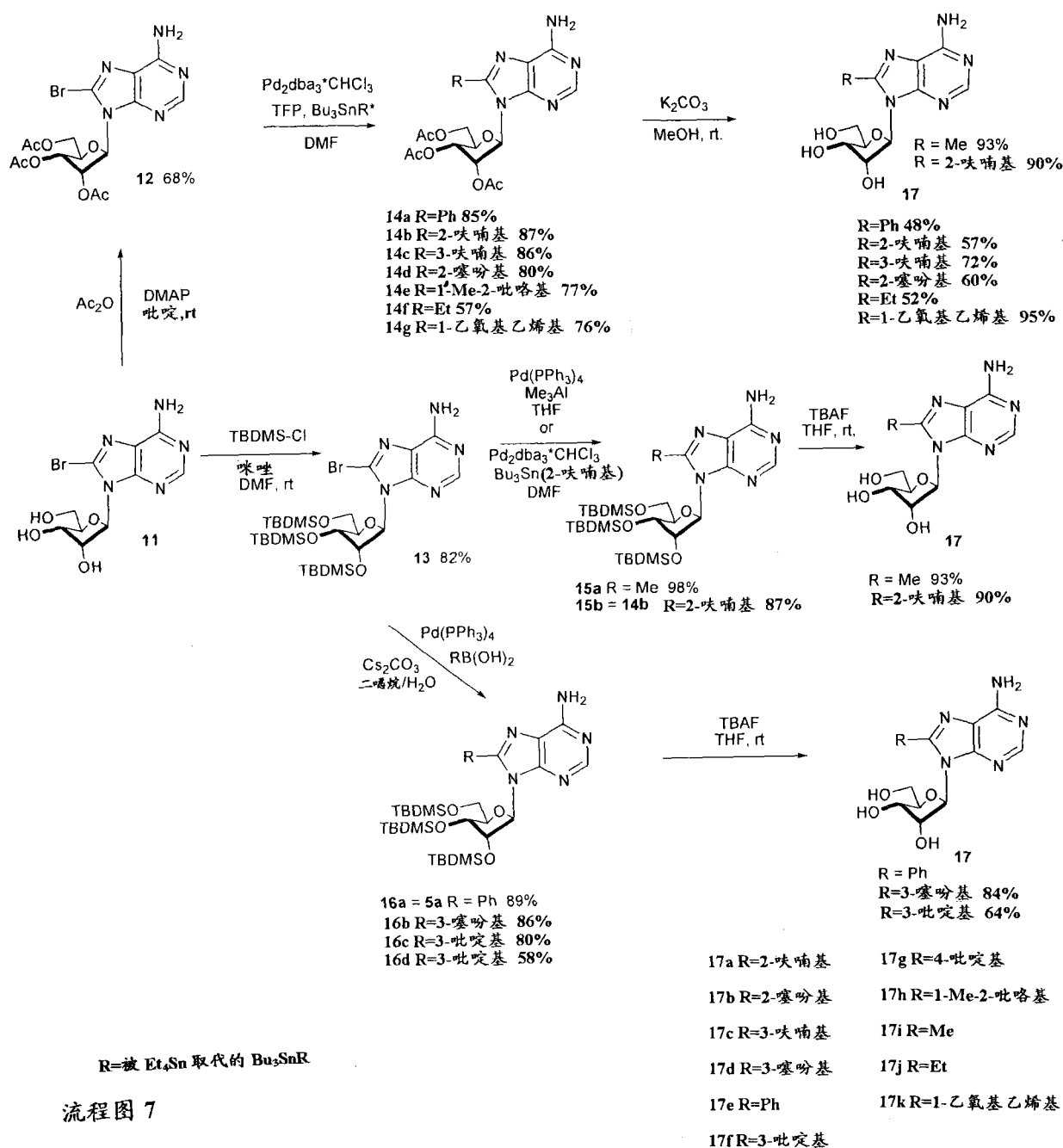
发现吡啶和相似的溶剂必需特别干燥的发现代表了本发明的创造性,这是因为在这些条件下进行的环化反应大大改善了选择性和收率。



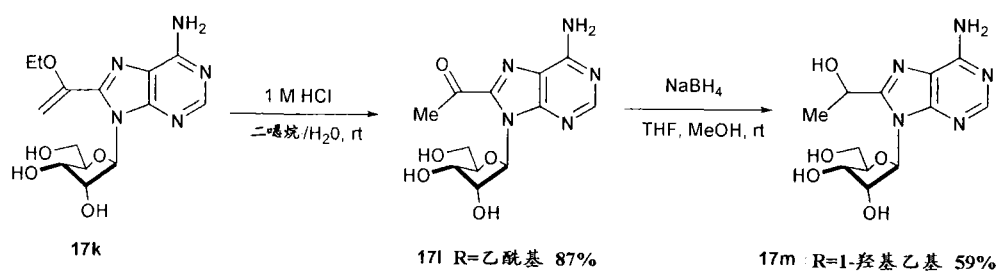
流程图 6

对于方法 II 和方法 III 的工作而言,我们制备了许多 8-二价碳基化的核苷。用常规方法,用氯硫磷将这些核苷中间体环化。在流程图 6 中概括了腺苷的二价碳基化反应。

对于流程图 7 中的核苷的二价碳基化而言,使用腺苷的 8-溴代衍生物 11。通过乙酰化从而得到三乙酰化底物 12 或者通过硅烷化从而得到三甲硅烷基化的底物 13 来对糖羟基进行保护。用一些 Pd-催化剂系统来进行交叉-偶合反应。反应条件可以不同。在流程图 7 中给出了我们制备化合物 14-16 的一些更好的条件。对于交叉-偶合产物 14 的制备而言使用 Stille 条件,而甲基化(15a)是由三甲基铝在 Negishi 条件下来完成的。还可以用相同的条件以与 Stille 条件(其提供了编号为 14b 的相同化合物)下获得的收率相同的收率来制备 2-咪喃基衍生物 15b。



也可以很好地进行在 Suzuki 条件下由硼酸进行的反应,从而以高收率获得化合物 16。以大约与 Stille 条件下 14a 的收率相同的收率得到苯基化合物 16a。随后,在水解条件下由酯 14、和用氟化四丁基铵脱甲硅基由甲硅烷基醚 15 和 16 制得 8-取代的腺苷。所有的反应都可以令人满意地进行。



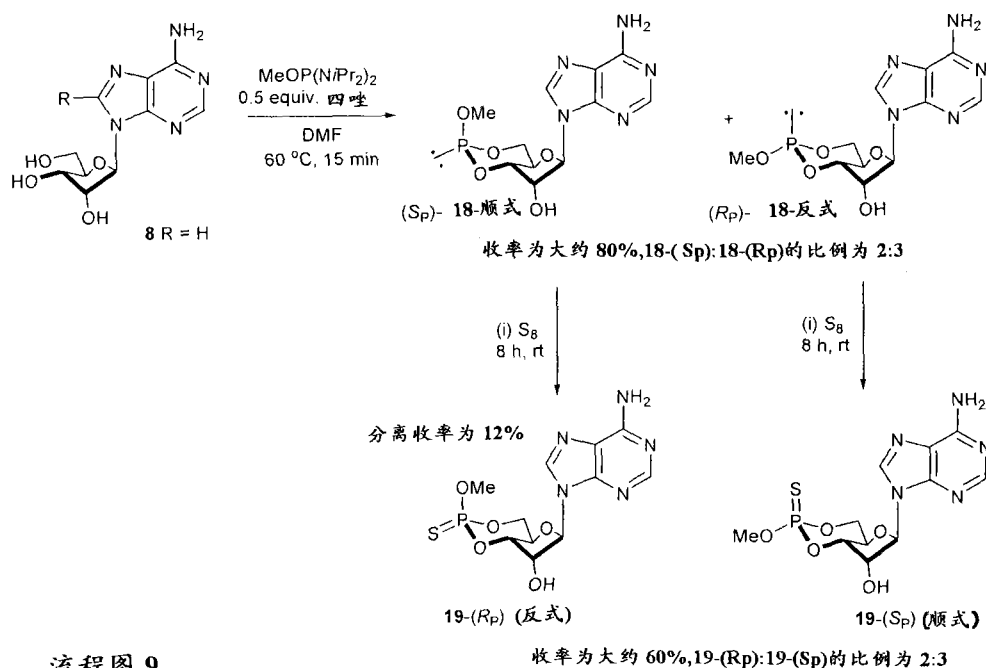
流程图 8

流程图 8 表示了在 8-取代基的 α -碳上携带氧代基团和羟基的腺苷的制备。起始材料是交叉-偶合的 8-(α -乙氧基乙烯基)腺苷 17k。在温和的酸性条件下对该乙烯酯官能度进行裂解，以高收率形成乙酰基衍生物 17l。随后，用硼氢化钠进行还原，得到相应的羟基衍生物 17m。在其差向异构的醇碳上没有观察到立体选择性。没有做对以等量存在的该立体异构体进行分离的努力。

方法 III

亚磷酸盐 P(III) 法:

流程图 7 和 8 中的 8-二价碳基化的核苷 17 及其衍生物是方法 III 以及方法 II (参看上文) 的适宜底物。迄今为止，我们已经证明了用于制备母体硫代磷酸 19 的方法 III 的原理。在流程图 9 中所示的底物 9 中的 8-R 取代基表示 8-二价碳基化的类似物。



流程图 9

将腺苷与三价磷试剂进行反应，从而形成环状的亚磷酸盐。为了确保区域选择性地对 3', 5'-环亚磷酸化(cyclophosphitylation)，最初需要由双官能磷(III)试剂对 5'-伯羟基上进行攻击。所以，最有利的试剂将具有很大的空间体积度。根据文献，可以在与二(*N,N*-二异丙基氨基)甲氧基磷的反应中将 2'-*O*-甲基腺苷转化成单亚磷酸 2'-*O*-甲基-顺式-腺苷-3', 5'-环甲酯。用 1*H*-四唑来促进该反应。既形成了顺式-环亚磷酸酯，又形成了反式-环亚磷酸盐。在升高的温度下，其反式-非对映体被转化为顺式-异构体。

随后，用硫将各异构体或异构体混合物硫杂化。硫的氧化加成在保留该磷原子的相对构型的情况下发生在磷原子的孤对电子上。所说的氧化性硫杂化是在立体异构体混合物或纯立体异构体上进行的。在前者中，需要对该硫代磷酸立体异构体进行进一步分离。

我们发现同样可以对未进行保护的腺苷很好地进行亚磷酸化(phosphitylation)。最初形成的产物是顺式-(^{31}P NMR δ 123)和反式-(^{31}P NMR δ 129)亚磷酸酯的混合物。在不损失物质的情况下使该混合物平衡至顺式-异构体。发现加入 1*H*-四唑可以加速异构体的转化。随后，用硫将各异构体或异构体混合物硫杂化。硫的氧化加成在保留

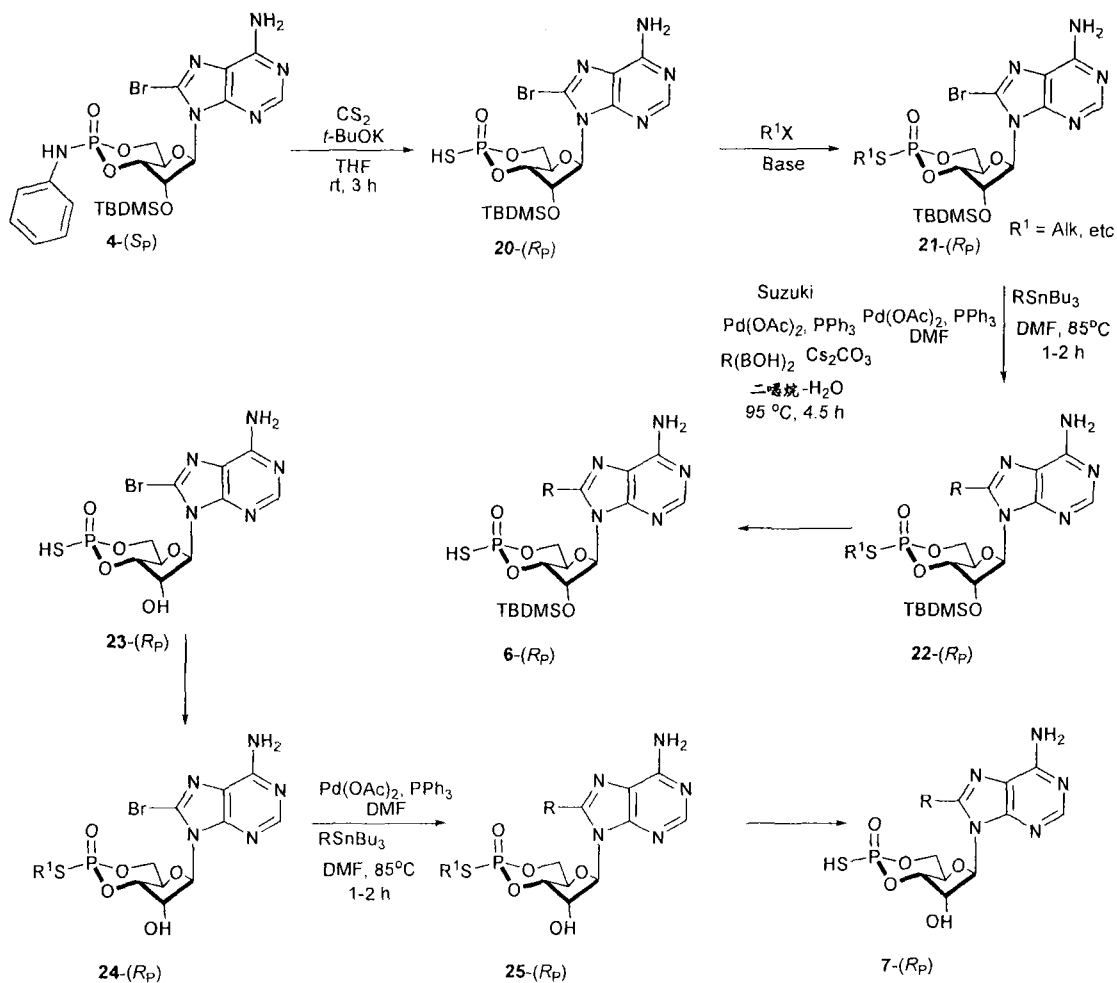
该磷原子的相对构型的情况下发生在磷原子的孤对电子上。在这里所述的实例中，该氧化性硫杂化是在该磷酸酯的非对映异构体混合物的水平上进行的。在这种情况下，用色谱法对该硫代磷酸非对映体进行分离。

方法 IV

二价碳基化

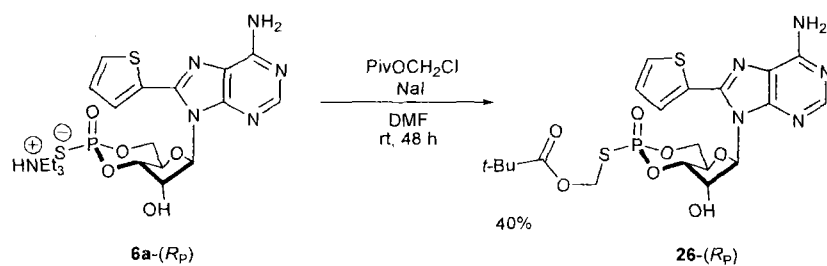
可以如流程图 10 中所示的那样在最后的硫酸磷酸水平上通过交叉-偶合反应来进行二价碳基化。该底物在嘌呤的 8-位上携带一个离去基团。说明了一种用于纯立体异构体或非对映异构体混合物形式的 2'-OTBDMS-8-溴代衍生物 20 (其是用前面流程图中所示的反应获得的，需要在进行所说的二价碳基化反应后将其分离成纯的立体异构体) 的反应序列。

对该硫代磷酸的 *S*-或 *O*-原子进行保护，从而得到 *S*-酯 21 或相应的 *O*-酯。如流程图 11 中所示的那样，将 *S*-酯 21 在 Stille 或 Suzuki 条件下交叉-偶合，或者对其进行交叉-偶合反应中所用的供选择的变型，从而得到 8-二价碳基化产物 22。可以将后者去保护，从而得到硫代酸 6，进而得到目标化合物 7。偶合反应可以用相似的方式在具有游离 2'-OH 的底物上来进行，序列 23 → 25，并且进而得到目标化合物 7。

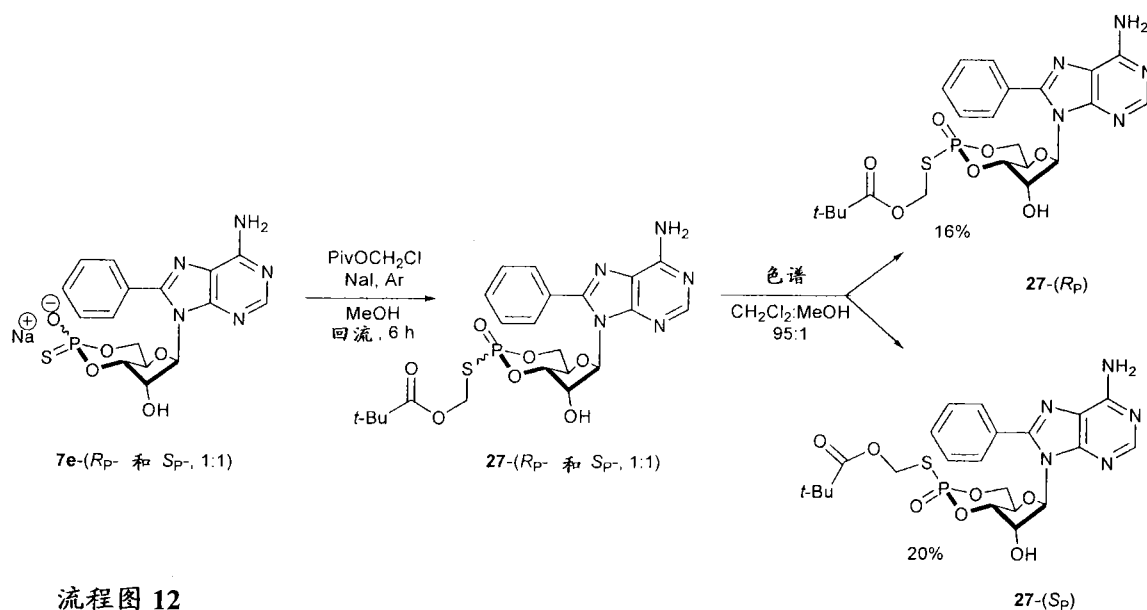


流程图 10

如上所述，可能需要使用前体药物形式的本发明的化合物。该类前体药物通常可以通过 S-烷基化来进行制备，并且在下面的流程图 11 和 12 中描述了两个用于 S-烷基化的反应流程图。流程图 11 和 12 描述了硫代磷酸酯与卤代烷，或者更特定地讲与卤代烷基羧酸酯的反应。



流程图 11



流程图 12

在上面所讨论方法的流程图中的各种中间体是新的并且其本身构成了本发明的另一方面。

本发明亲水性的 8-取代的 cAMPS 化合物优选地是通过转化成其可溶的三烷基铵(例如三丁基铵)盐,然后用闪柱色谱,例如硅胶闪柱色谱进行处理来进行纯化的。该类烷基铵盐可以通过将铵盐与烷基胺混合并蒸发掉氨来进行制备。然后,如果需要的话,可以在使用前将所得的产物转化成另一种盐的形式,例如可以将其转化成钠盐的形式。

在这些方法中所用的条件和试剂仅仅是实例性说明。也可以使用其它试剂、溶剂和反应条件,当这些方法在工业上被应用用来制备药物时尤其如此。具有化学开发背景的熟练的化学家可以通过在着眼于:费用、安全性、危险性、毒性、环境和管理方面的情况下对条件、试剂和溶剂进行选择,从而来对这些方法进行常规改善。

因此,从另一方面来看,本发明提供了一种 8-二价碳基化腺苷环 3',5'-氨基磷酸酯或其衍生物。

本发明另一方面还提供了一种 8-二价碳基化-2'-保护的(例如硅烷化的)腺苷环 3',5'-硫代磷酸酯或其衍生物。

本发明另一方面还提供了一种 8-卤代(并且优选地是 2'-保护的

(例如硅烷化的))腺苷环 3', 5'-氨基磷酸酯或其衍生物。

本发明另一方面还提供了一种 8-二价碳基化腺苷环 3', 5'-单亚磷酸盐或其衍生物。

本发明另一方面还提供了一种包含 8-二价碳基化的 cAMPS 或其衍生物以及生理学可耐受的载体或容纳剂(recipient)的药物组合物。

本发明的组合物可以采取任何方便的给药形式, 例如片剂、胶囊、粉末、糖浆、喷雾、溶液、分散体、栓剂等。将活性剂与适宜的载体或赋形剂, 例如溶剂(如注射用水)、稀释剂、稳定剂、粘性改性剂、pH 调节剂、芳香剂、矫味剂、抗氧剂等混合到一起, 并且该组合物可以用常规方式来进行制备。

本发明另一方面还提供了对人或非人动物(优选哺乳动物)体进行治疗从而在其中获得 cAMP 激动或拮抗作用的方法, 所说的方法包括给所说的机体使用有效量本发明 8-二价碳基化的 cAMPS 或其衍生物。

所说的治疗方法尤其优选地是用于治疗瘤形成疾病、免疫缺陷和病毒感染, 尤其是 HIV 感染的方法。

本发明另一方面提供了本发明 8-二价碳基化的 cAMPS 或其衍生物用于制备用于对人或非人动物(优选哺乳动物)体进行治疗从而在其中获得 cAMP 激动或拮抗作用的方法的药物的应用。

所说 8-二价碳基化的 cAMPS 或衍生物的剂量将取决于被治疗的情况以及领受者的大小、性别和种属。一般而言, 特定地用于人类个体的日剂量通常为 0.01 至 100 mg/kg 体重。优选口服给药或 iv 给药。

因为其 cAMP 激动剂/拮抗剂的性质, 本发明 8-二价碳基化的 cAMPS 以及衍生物可用于 cAMP 的竞争性结合试验, 例如可用于生物学样品中 cAMP 的竞争性结合试验。在 WO 2004/027074 中对一种该类试验进行了描述。在该类试验中, 优选地对 8-二价碳基化的 cAMPS 进行标记(例如放射性标记或发色团标记)并且其可以方便地与底物结合。

因此, 本发明另一方面还提供了一种用于测定样品(通常为生物学样品)中的 cAMP 的方法, 该方法包括将所说的样品与 cAMP-类似物和 cAMP 结合试剂进行接触, 其特征不在于所说的类似物是 8-二价碳基化的

cAMPS 或其衍生物。

本发明可用于除腺苷外的其它嘌呤核苷酸，特别是鸟苷，以及腺苷和鸟苷类似物，包括其二-和三-氮杂类似物，例如环状二-和三-氮杂类似物(例如环状的咪唑并-吡啶、苯并咪唑和环状的吡咯并-嘧啶和吡咯并-吡啶)如 1-脱氮杂嘌呤、3-脱氮杂嘌呤、7-脱氮杂嘌呤和 1,3-脱氮杂嘌呤，并且在本发明的另一个方面，在对这里所包含的定义和实验教导在细节上做必要修改的情况下可将其用于可以在其它框架位置上与上述 8-二价碳基化的 cAMPS 类似地进行取代的该类其它嘌呤核苷酸。该类 8-二价碳基化非-腺苷嘌呤环 3',5' 硫代磷酸酯在治疗上可用于该特定核苷酸可应用的应用，例如可用于治疗病毒感染、免疫缺陷和瘤形成疾病。

本发明的一个方面是本发明的 cAMP 拮抗剂/激动剂与对免疫系统具有作用的其它药物的组合的应用。

本发明的另一方面涉及本发明的 cAMP 拮抗剂/激动剂与用于治疗 HIV 感染和瘤形成疾病的其它药物的联合的应用。

在本发明许多化合物的制备中的一种关键试剂是 8-Br-cAMP。直至最近，在文献中的报道仅涉及用 cAMP 在醋酸/醋酸钠的稀溶液(0.1M)中来小规模(例如<100 mg)制备这种物质。试图用这种类似的稀释条件进行大规模制备时由于所需溶剂的体积很大而产生了一些问题。我们现在发现可以用使用浓缓冲液的 cAMP 的浓溶液来扩大规模，使用这种溶液可以清除在 cAMP 与溴反应过程中产生的 HBr。通过使用浓 cAMP 溶液，还可以获得双倍益处-可以优化沉淀出来的 8-Br-cAMP 产物(如果形成的话)的比例并且该 cAMP(H)起始材料有助于所说的缓冲剂系统。因此，例如 0.2M cAMP(H)和 0.4M 醋酸钠产生了一种相当于 0.2M NaOAc/AcOH 的缓冲剂系统，其 pH 在溴化期间仍然稳定在约 4.7。

该类方法形成了本发明的另一个方面。本发明另一方面提供了一种制备 8-Br-cAMP 的方法，其包括将 cAMP 与溴在缓冲液(优选含水缓冲液)中进行反应，与还原剂(例如亚硫酸钠)进行反应以除去过量的溴，收集所产生的 8-Br-cAMP，并任选地从所收集的 8-Br-cAMP 中除

去游离的溴，其中 cAMP 是以浓溶液(例如 0.15 至 0.6M, 优选 0.16 至 0.3M, 尤其是 0.17 至 0.25M)的形式进行应用的并且所述缓冲液(例如醋酸盐缓冲液)的浓度足以将该溶液的 pH 维持在 3.5 至 5.5, 尤其是 4 至 5。在这种方法中，优选地缓慢地加入溴并随后也缓慢地加入还原剂。在下面的实施例 47 中对这种方法进行了举例说明。

现在将参考下面的非限制性实例来对本发明进行描述。

实施例 1

8-溴-2'-O-(叔-丁基二甲基甲硅烷基)腺苷-3', 5'-环磷酸三丁基铵盐 (2)

在室温下，将 TBDMS-Cl (2.72 g, 18 mmol) 加入到 8-溴-cAMP 三丁基铵盐 (1) (7.0 g, 11.8 mmol) 和咪唑 (2.45 g, 36 mmol) 在 DMF (30 ml) 中的溶液中。将该混合物在 50°C 下在氩气下搅拌 48 小时。减压除去溶剂，将该粗品混悬于水 (150 ml) 中并向其中加入 1.2 M HCl (76 ml)。将沉淀滤出，用水洗涤并在真空下对其进行干燥。将该酸混悬于 MeOH (80 ml) 中并向其中加入 Bu₃N (5 ml)。将该混合物在室温下搅拌 3 小时，蒸馏掉溶剂并将产物真空干燥；得到 6.50 g (78%) 白色固体。¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 0.01 (3H, s, Si-CH₃), 0.03 (3H, s, Si-CH₃), 0.83 (9H, s, Si-叔-Bu), 0.87 (9H, t), 1.28 (6H, m), 1.53 (6H, m), 2.79 (6H, m), 3.90 (2H, m), 4.11 (1H, m), 5.02 (2H, m), 7.53 (2H, s, NH₂), 8.15 (1H, s, H-2)。¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 75 MHz): δ -5.3, -4.7, 13.6, 18.0, 19.6, 25.6, 25.7, 51.9, 65.4, 72.3, 72.4, 76.2, 94.3, 119.2, 126.5, 150.0, 153.2, 155.0。³¹P NMR (CDCl₃, 81 MHz): δ -1.36。HRMS (电喷射): 实测值: 阴离子: M 520.0427。计算值: 520.0422。

实施例 2

(S_p)-8-溴腺苷-2'-O-(叔-丁基二甲基甲硅烷基)-3', 5'-环 N-苯基氨基磷酸盐 (4)

在 0°C 下，将 8-溴腺苷-2'-O-(叔-丁基二甲基甲硅烷基)-3', 5'-环磷酸三丁基铵盐 (2) (500 mg, 0.71 mmol) 在 CH₂Cl₂ (7 ml) 中的溶液

滴加到草酰氯(0.24 ml, 2.8 mmol)和 DMF(1 drop)在 CH_2Cl_2 (15 ml) 中的溶液中。将该混合物在室温下搅拌 30 分钟,然后在真空下除去溶剂。将该粗品重新溶解于 CH_2Cl_2 (20 ml)中并在 0°C 下向其中滴加苯胺(0.5 ml, 4.26 mmol),并将该混合物在室温下搅拌一整夜。蒸发掉溶剂并将残余物用闪柱色谱进行纯化,用 CH_2Cl_2 :MeOH(3:97 和 5:95)进行洗脱;得到 125 mg (29%)白色固体。 ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 300 MHz): δ -0.09 (3H, s, Si- CH_3), 0.02 (3H, s, Si- CH_3), 0.79 (9H, s, Si-叔-Bu), 4.4 (2H, m), 4.65 (1H, m), 5.12 (1H, d), 5.52 (1H, m), 5.92 (1H, s), 6.93 (1H, t), 7.10 (2H, d), 7.20 (2H, t), 7.56 (2H, s, NH_2), 8.23 (1H, s, H-2), 8.55 (1H, d, Ar-NH)。 ^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 75 MHz): δ -5.2 -5.0, 17.8, 24.9, 68.2, 70.4, 72.3, 76.1, 92.9, 117.7, 118.5, 121.8, 128.9, 135.9, 139.5, 149.7, 153.4, 155.1。 ^{31}P NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 81 MHz): δ 2.28。

实施例 3

(S_p)-8-(2-咪喃基)腺苷-2' *O*-(叔-丁基二甲基甲硅烷基)-3', 5'-环 *N*-苯基氨基磷酸盐 (5a)

将 $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (99 mg, 0.37 mmol)和 PPh_3 (253 mg, 0.81 mmol)在 DMF(15 ml)中的溶液在 50°C 下搅拌 15 分钟,然后向其中加入三-正-丁基(2-咪喃基)锡烷(1.4 ml, 4.4 mmol)。其后,向其中加入(S_p)-8-溴腺苷-2' *O*-(叔-丁基二甲基甲硅烷基)-3', 5'-环 *N*-苯基氨基磷酸盐(4)(2.2 g, 3.7 mmol)在 DMF(10 ml)中的溶液。将该混合物在 80°C 下搅拌 1 小时。蒸发掉溶剂并将残余物用闪柱色谱进行纯化,用 CH_2Cl_2 :MeOH 3:97 和 5:95 作为洗脱剂;得到 1.93 g (90%)白色固体。 ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 300 MHz): δ -0.14 (3H, s, Si- CH_3), -0.11 (3H, s, Si- CH_3), 0.70 (9H, s, Si-叔-Bu), 4.4-4.5 (2H, m), 4.65 (1H, dm), 5.19 (1H, d), 5.65 (1H, m), 6.31 (1H, s), 6.77 (1H, dd), 6.93 (1H, t), 7.1-7.2 (5H, m), 7.58 (2H, br. s), 8.00 (1H, d), 8.27 (1H, s), 8.56 (1H, d)。 ^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 75 MHz): δ -5.6, -5.0, 17.7, 25.3, 68.3, 70.2, 72.4, 76.3, 93.6, 112.3, 113.9, 118.45, 121.8,

128.9, 139.6, 140.3, 143.2, 145.6, 149.8, 153.4, 156.1。 ^{31}P NMR (CDCl_3 , 81 MHz): δ 3.06。 HRMS (电喷射, TOF ES)-阳离子: M 585.2023。 计算值: 585.2041。

实施例 4

(S_p)-8-(2-噻吩基)腺苷-2'-*O*-(叔-丁基二甲基甲硅烷基)-3', 5'-环 *N*-苯基氨基磷酸盐 (5b)

将 $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (117 mg, 0.44 mmol) 和 PPh_3 (299 mg, 0.96 mmol) 在 DMF (15 ml) 中的溶液在 50°C 下搅拌 30 分钟, 然后向其中加入三-正-丁基 (2-噻吩基) 锡烷 (2.2 ml, 6.8 mmol)。其后, 向其中加入 (S_p)-8-溴腺苷-2'-*O*-(叔-丁基二甲基甲硅烷基)-3', 5'-环 *N*-苯基氨基磷酸盐 (4) (2.72 g, 4.6 mmol) 在 DMF (10 ml) 中的溶液。将该混合物在 85°C 下搅拌 1 小时。蒸发掉溶剂并将残余物用硅胶闪柱色谱进行纯化, 用 CH_2Cl_2 : MeOH 3:97 和 5:95 作为洗脱剂; 得到 1.91 g (71%) 白色固体。 ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 200 MHz): δ -0.18 (3H, s, Si- CH_3), -0.17 (3H, s, Si- CH_3), 0.63 (9H, s, Si-叔-Bu), 4.4-4.5 (2H, m), 4.69 (1H, dm), 5.23 (1H, d), 5.55 (1H, m), 5.97 (1H, s), 6.93 (1H, t), 7.0-7.2 (4H, m), 7.31 (1H, dd), 7.55 (3H, br. m), 7.90 (1H, dd), 8.26 (1H, s), 8.56 (1H, d)。 ^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 50 MHz): δ -5.6, -5.0, 17.7, 25.3, 68.3, 70.2, 71.9, 76.5, 93.6, 118.3, 118.5, 118.7, 121.8, 128.3, 128.9, 129.4, 129.7, 130.6, 139.5, 143.9, 150.1, 153.3, 155.9。 ^{31}P NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 81 MHz): δ 2.41。

实施例 5

(S_p)-8-(3-咪喃基)腺苷-2'-*O*-(叔-丁基二甲基甲硅烷基)-3', 5'-环 *N*-苯基氨基磷酸盐 (5c)

将 $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (133 mg, 0.50 mmol) 和 PPh_3 (342 mg, 1.1 mmol) 在 DMF (20 ml) 中的溶液在 50°C 下搅拌 30 分钟, 然后向其中加入三-正-丁基 (3-咪喃基) 锡烷 (2.67 g, 7.5 mmol)。其后, 向其中加入 (S_p)-8-溴腺苷-2'-*O*-(叔-丁基二甲基甲硅烷基)-3', 5'-环 *N*-苯基氨基磷酸盐 (4) (3.00 g, 5.0 mmol) 在 DMF (10 ml) 中的溶液。将该混合物在 85°C

下搅拌 2 小时。蒸发掉溶剂并将残余物用闪柱色谱进行纯化, 用 $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ 3:97 和 5:95 作为洗脱剂; 得到 2.70 g (92%) 白色固体。

^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 200 MHz): δ -0.16 (s, 3H, Si- CH_3), -0.14 (3H, s, Si- CH_3), 0.66 (9H, s, Si-叔-Bu), 4.4-4.5 (2H, m), 4.65 (1H, dm), 5.26 (1H, d), 5.44 (1H, m), 5.86 (1H, s), 6.9-7.0 (2H, m), 7.0-7.2 (4H, m), 7.48 (2H, br. s), 7.96 (1H, t), 8.24 (1H, s), 8.29 (1H, s), 8.57 (1H, d)。 ^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 50 MHz): δ -5.5, -5.0, 17.7, 25.3, 68.3, 70.0, 71.8, 76.5, 93.4, 110.4, 114.9, 118.4, 118.5, 118.7, 121.8, 128.9, 139.5, 143.2, 143.5, 145.0, 149.9, 153.1, 155.9。
 ^{31}P NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 81 MHz): δ 2.43。

实施例 6

(S_p)-8-(3-噻吩基)腺苷-2' *O*-(叔-丁基二甲基甲硅烷基)-3', 5'-环 *N*-苯基氨基磷酸盐 (5d)

将 $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (0.008 g, 0.03 mmol) 和 PPh_3 (0.02 g, 0.07 mmol) 在二噁烷 (3 ml) 中的溶液在氩气下进行充溢。将该混合物在 50°C 下搅拌 25 分钟, 这时, 该反应混合物变成淡红色-褐色。向其中加入 (S_p)-8-溴腺苷-2' *O*-(叔-丁基二甲基甲硅烷基)-3', 5'-环 *N*-苯基氨基磷酸盐 (4) (0.10 g, 0.17 mmol)、3-噻吩硼酸 (0.03 g, 0.25 mmol) 和 Cs_2CO_3 (0.16 g, 0.50 mmol) 在水中的溶液。将其温度增加至 95 °C, 搅拌 4.5 小时。将所得的溶液冷却, 用 THF (15 ml) 稀释和用饱和 NaHCO_3 (10 ml) 对其进行洗涤。将有机相分离出来并用 MgSO_4 对其进行干燥。将滤液在减压下蒸发至干燥并在用闪柱色谱进行纯化后, 从该残余的材料中分离出所说的产物, 用 3%MeOH 的 EtOAc 溶液进行洗脱; 得到 50% 黄褐色固体。 ^1H NMR: (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$); δ -0.18 (6H, s, $2 \times \text{SiCH}_3$), 0.63 (9H, s, $3 \times \text{SiCCH}_3$), 4.39-4.73 (3H, m), 5.16 (1H, d, J 5.2 Hz), 5.53-5.58 (1H, m), 5.86 (1H, s), 6.91-7.23 (5H, m, Ph-H), 7.46 (1H, dd, J 1.2 Hz, J' 5.0 Hz, H-4''), 7.50 (2H, s, NH_2), 7.85 (1H, dd, J 2.9 Hz, J' 5.0 Hz, H-5''), 8.04 (1H, dd, J 1.2 Hz, J' 2.9 Hz, H-2''), 8.26 (1H, s, H-2), 8.56 (1H, d, J 8.9

Hz, NH-Ph)。

实施例 7

(*R_p*)-8-(2-咪喃基)腺苷-2'-*O*-(叔-丁基二甲基甲硅烷基)-3', 5'-环硫代磷酸 (6a)

在室温下, 将 1.0 M 叔-BuOK 在 THF 中的溶液 (3.6 ml, 3.6 mmol) 加入到 (*S_p*)-8-(2-咪喃基)腺苷-2'-*O*-(叔-丁基二甲基甲硅烷基)-3', 5'-环 *N*-苯基氨基磷酸盐 (5a) (1.51 g, 2.6 mmol) 在 THF (30 ml) 中的溶液中。将该混合物在这种温度下搅拌 1 小时, 然后向其中加入 CS₂ (0.47 ml, 7.8 mmol) 并将该混合物在室温下再搅拌 3 小时。将溶剂的体积降至约 10 ml, 然后向其中加入己烷 (90 ml)。形成沉淀并通过过滤对其进行收集, 将其混悬于水 (55 ml) 中并向其中加入 1.2 M HCl (9 ml)。通过过滤收集产物, 用水对其进行洗涤并对其干燥; 得到 1.23 g (91%) 淡黄褐色固体。¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ -0.03 (3H, s, Si-CH₃), 0.04 (3H, s, Si-CH₃), 0.79 (9H, s, Si-叔-Bu), 4.0-4.5 (3H, m), 5.06 (1H, d), 5.34 (1H, m), 6.21 (1H, s), 6.79 (1H, q), 7.18 (1H, d), 8.02 (1H, s), 8.2 (2H, br. s), 8.33 (1H, s)。¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 75 MHz): δ -5.4, -4.6, 17.9, 25.5, 67.7, 71.1, 72.8, 75.9, 93.2, 112.4, 114.4, 119.1, 141.3, 142.8, 146.0, 149.4, 150.2, 153.7。³¹P NMR (DMSO-*d*₆, 81 MHz): δ 58.4。HRMS (电喷射): M 526.1326。C₂₀H₂₈N₅O₆PSSi 的计算值: 526.1339。

实施例 8

(*R_p*)-8-(2-噻吩基)腺苷-2'-*O*-(叔-丁基二甲基甲硅烷基)-3', 5'-环硫代磷酸 (6b)

将 1.0 M 叔-BuOK 在 THF (3.8 ml, 3.8 mmol) 中的溶液在室温下加入到 (*S_p*)-8-(2-噻吩基)腺苷-2'-*O*-(叔-丁基二甲基甲硅烷基)-3', 5'-环 *N*-苯基氨基磷酸盐 (5b) (1.87 g, 3.1 mmol) 在 THF (35 ml) 中的溶液中。将该混合物搅拌 1 小时, 然后向其中加入 CS₂ (0.57 ml, 9.5 mmol) 并将这种混合物在室温下再搅拌 3 小时。将溶剂的体积降至约 10 ml, 然后向其中加入己烷 (90 ml)。形成沉淀并通过过滤对其进

行收集, 将其混悬于水(55 ml)中并向其中加入 1.2 M HCl(10 ml)。通过过滤收集产物, 用水对其进行洗涤并对其进行干燥; 得到 1.54 g (91%) 淡黄褐色固体。¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ -0.07 (3H, s, Si-CH₃), 0.03 (3H, s, Si-CH₃), 0.73 (9H, s, Si-叔-Bu), 4.1-4.5 (3H, m), 5.13 (1H, d), 5.28 (1H, m), 5.92 (1H, s), 7.31 (1H, q), 7.60 (1H, d), 7.94 (1H, d), 8.37 (1H, s)。¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 75 MHz): δ -5.3, -4.5, 17.8, 25.5, 67.5, 71.2, 72.5, 76.0, 93.3, 118.9, 128.4, 128.6, 129.4, 129.8, 131.0, 145.2, 149.8, 153.4。³¹P NMR (DMSO-*d*₆, 81 MHz): δ 58.18。

实施例 9

(*R*_p)-8-(3-咪喃基)腺苷-2' *O*-(叔-丁基二甲基甲硅烷基)-3', 5'-环硫代磷酸(6c)

将 1.0 M 叔-BuOK 在 THF(5.3 ml, 5.3 mmol) 中的溶液在室温下加入到 (S_p)-8-(3-咪喃基)腺苷-2' *O*-(叔-丁基二甲基甲硅烷基)-3', 5'-环 *N*-苯基氨基磷酸盐(5c) (2.58 g, 4.4 mmol) 在 THF(35 ml) 中的溶液中。将该混合物搅拌 1 小时, 然后向其中加入 CS₂(0.80 ml, 13.3 mmol) 并将该混合物在室温下再搅拌 3 小时。将溶剂的体积降至约 10 ml, 然后向其中加入己烷(90 ml)。形成沉淀并通过过滤对其进行收集, 将其混悬于水(55 ml)中并向其中加入 1.2 M HCl(10 ml)。通过过滤收集产物, 用水对其进行洗涤并对其进行干燥; 得到 1.95 g (84%) 淡黄褐色固体。¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ -0.057 (3H, s, Si-CH₃), 0.033 (3H, s, Si-CH₃), 0.76 (9H, s, Si-叔-Bu), 4.1-4.5 (3H, m), 5.13 (1H, d), 5.20 (1H, m), 5.81 (1H, s), 6.90 (1H, d), 7.97 (1H, d), 8.29 (1H, s), 8.37 (1H, s)。¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 75 MHz): δ -5.3, -4.5, 17.9, 25.5, 67.5, 71.0, 72.3, 76.0, 93.1, 110.4, 114.6, 118.8, 143.8, 144.7, 145.1, 149.5, 152.0, 153.2。³¹P NMR (DMSO-*d*₆, 81 MHz): δ 58.08。

实施例 10

(*R*_p)-8-(2-咪喃基)腺苷-3', 5'-环硫代磷酸铵盐(7a)

将 (R_p)-8-(2-咪喃基)腺苷-2'-*O*-(叔-丁基二甲基甲硅烷基)-3',5'-环硫代磷酸(6a) (1.15 g, 2.7 mmol) 和 NH_4F (225 mg, 6.0 mmol) 在 DMF (10 ml) 中的溶液在室温下搅拌 5 天。随后, 向其中加入 TMSOMe (1 mL) 并将其继续搅拌 24 小时。在减压下蒸馏掉溶剂, 将该粗品混悬于 MeOH (10 ml) 中并向其中加入 Et_2O (80 ml)。将该淡黄褐色的固体滤出并对其进行干燥; 得到 847 mg (90%) 产物。 ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 300 MHz): δ 4.0-4.2 (4H, m), 5.03 (1H, d), 5.14 (1H, m), 6.02 (1H, s), 6.76 (1H, dd), 7.13 (1H, d), 8.01 (1H, d), 8.21 (1H, s)。 ^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 75 MHz): δ 66.2, 75.3, 76.9, 75.4, 92.8, 112.3, 113.8, 118.9, 141.2, 143.1, 145.8, 149.8, 152.7, 155.6。 ^{31}P NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 81 MHz): δ 54.3。 HRMS (电喷射, TOF ES)-阴离子: M 410.0330。 计算值: 410.0329。

实施例 11

(R_p)-8-(2-噻吩基)腺苷-3',5'-环硫代磷酸铵盐 (7b)

将 (R_p)-8-(2-噻吩基)腺苷-2'-*O*-(叔-丁基二甲基甲硅烷基)-3',5'-环硫代磷酸(6b) (1.33 g, 2.5 mmol) 和 NH_4F (281 mg, 7.5 mmol) 在 DMF (15 ml) 中的溶液在室温下搅拌 5 天。随后, 向其中加入 TMSOMe (1 ml) 并将其继续搅拌 24 小时。在减压下蒸馏掉溶剂, 将该粗品混悬于 MeOH (10 ml) 中并向其中加入 Et_2O (80 ml)。将该淡黄褐色的固体滤出并对其进行干燥; 得到 934 mg (86%) 淡黄褐色固体。 ^1H NMR (CD_3OD , 200 MHz): δ 4.2-4.4 (3H, m), 5.20 (1H, d), 5.5 (1H, m), 6.00 (1H, s), 7.27 (1H, dd), 7.69 (1H, d), 7.75 (1H, d), 8.21 (1H, s)。 ^{13}C NMR (CD_3OD , 75 MHz): δ 68.5, 72.6, 73.2, 77.8, 94.2, 120.0, 129.3, 131.1, 131.2, 147.1, 151.8, 154.0, 156.8。 ^{31}P NMR (CD_3OD , 81 MHz): δ 58.0。

实施例 12

(R_p)-8-(3-咪喃基)腺苷-3',5'-环硫代磷酸铵盐 (7c)

将 (R_p)-8-(3-咪喃基)腺苷-2'-*O*-(叔-丁基二甲基甲硅烷基)-3',5'-环硫代磷酸(6c) (1.9 g, 3.6 mmol) 和 NH_4F (404 mg, 10.8

mmol) 在 DMF (20 ml) 中的溶液在室温下搅拌 5 天。随后, 向其中加入 TMSOMe (1 ml) 并将其继续搅拌 24 小时。在减压下蒸馏掉溶剂, 将该粗品混悬于 MeOH (10 ml) 中并向其中加入 Et₂O (80 ml)。将该淡黄褐色的固体滤出并对其进行干燥; 得到 1.38 g (89%) 淡黄褐色固体。¹H NMR (CD₃OD, 300 MHz): δ 4.2-4.4 (3H, m), 5.24 (1H, d), 5.42 (1H, m), 5.88 (1H, s), 6.89 (1H, d), 7.69 (1H, t), 8.11 (1H, s), 8.18 (1H, s)。¹³C NMR (CD₃OD, 75 MHz): δ 68.5, 72.4, 73.1, 77.7, 93.9, 111.3, 116.4, 119.9, 144.9, 145.8, 146.7, 151.4, 153.0, 156.2。³¹P NMR (DMSO-d₆, 81 MHz): δ 54.3。

实施例 13

(R_p)-8-苯基腺苷-3', 5'-环硫代磷酸 (7e)

通过反复与吡啶共沸蒸馏来对 8-苯基腺苷 (17e) (0.343 g, 1 mmol) 进行干燥, 然后将其溶解于在氩气下在连续蒸馏下由氯化钙新蒸馏出来的吡啶 (10 ml) 中。在氩气气氛下在 -12 °C 下在 10 分钟内向上面的吡啶溶液中加入位于无水 THF (2 ml) 中的氯硫磷 (0.169 g, 1 mmol)。将该混合物在 -12 °C 下搅拌 15 分钟, 然后, 在 60 °C 下, 将该反应混合物加入到强烈进行着搅拌的氢氧化钠 (0.240 g, 6 mmol) 在水 (40 ml) 中的溶液中, 其后, 将其迅速倾倒在被粉碎了的干冰上。当停止产生二氧化碳时, 在减压下蒸馏掉溶剂。在蒸馏的过程中, 不能使其浴温超过 35 °C。将该固体残余物用乙醚反复洗涤, 将其萃取到甲醇 (5 ml) 中, 将该混合物过滤并在强烈搅拌的情况下, 将该滤液缓慢加入到 THF (100 ml) 中。用硅藻土过滤并将滤液减压蒸发, 剩余一种固体材料。该产物是 1:1 的 (R_p)-和 (S_p)-8-苯基腺苷-3', 5'-环硫代磷酸非对映异构体的混合物。用色谱法对该异构体进行分离, 这时用被官能化的 C18 硅胶柱反相色谱对该混合物进行制备, 用水: 甲醇: 甲酸 80: 20: 0.5 作为洗脱剂。标题化合物的物理数据: MS (电喷射; 阴性 ESI, m/z): 863.1 (8%, 2 M+Na-2 H), 420 (100%, M-1) 210.1 (35%)。³¹P NMR (CD₃OD) (钠盐): 57.8 ppm。

在所谈的 HPLC-分离后, 类似地获得了 (S_p)-8-苯基腺苷-3', 5'-

环硫代磷酸(7e)。

实施例 14

2', 3', 5'-三-(*O*-乙酰基)-8-溴腺苷(12)

将醋酸酐(5.66 ml, 60 mmol)滴加到 8-溴腺苷(11)(3.46 g, 10 mmol)在吡啶(50 ml)中的溶液中, 然后向其中加入 DMAP(1 mmol)并将该混合物在室温下搅拌 5 小时。通过加入甲醇(10 ml)将该反应淬熄。将该溶液在减压下蒸发至干燥, 将残余物溶解于乙酸乙酯(250 ml)中, 将该溶液与 NaHCO₃(100 ml)、水(3 × 50 ml)一起振摇, 干燥(MgSO₄)并将该溶液减压浓缩。该产物是一种固体; 收率为 3.21 g(68%)。

实施例 15

2', 3', 5'-三-(*O*-叔-丁基二甲基甲硅烷基)-8-溴腺苷(13)

将 TBDMS-Cl(2.30 g, 15.0 mmol)加入到 8-溴腺苷(11)(1.32 g, 3.82 mmol)和咪唑(2.08 g, 30.5 mmol)在 DMF(15 ml)中的溶液中并将该溶液在室温下搅拌 24 小时。向其中加入饱和 NH₄Cl 溶液(35 ml)并将该混合物用 EtOAc(2 × 40 ml)进行萃取。将该有机萃取物用水(2 × 15 ml)洗涤, 干燥(MgSO₄)并对其进行蒸发, 得到标题化合物; 收率为 2.16 g(82%)。

实施例 16

2', 3', 5'-三-(*O*-乙酰基)-8-苯基腺苷(14a)

将 2', 3', 5'-三-(*O*-乙酰基)-8-溴腺苷(12)(0.89 g, 1.88 mmol)、TFP(0.17 g, 0.75 mmol)和 Pd₂dba₃·CHCl₃(0.10 g, 0.10 mmol)在氩气下溶解于 DMF(14 ml)中并将该溶液加热至 50 °C, 在这时向其中滴加 Bu₃SnPh(0.61 ml, 1.88 mmol)。将该反应混合物在 110 °C 下加热 20 小时并将其在减压下蒸发至干燥。在用硅胶闪柱色谱进行纯化后, 从残余的材料中分离出所说的产物, 用 EtOAc:MeOH 99:1 进行洗脱; 收率为 0.75 g(85%)。HRMS: M 469.1581. C₂₂H₂₃N₅O₇ 的计算值: 469.1597. MS(EI): M 469(M, 12%), 259(25), 212(27), 211(68), 139(40), 104(9), 97(18), 43(100)。

实施例 17

2', 3', 5'-三-(*O*-乙酰基)-8-(2-呋喃基)腺苷 (14b)

在氩气下,在 50 °C 下,将 2-(三丁基甲锡烷基)呋喃 (12) (1.52 ml, 4.84 mmol) 加入到 2', 3', 5'-三-(*O*-乙酰基)-8-溴腺苷 (1.90 g, 4.03 mmol)、TFP (0.37 g, 1.61 mmol) 和 Pd₂dba₃*CDCl₃ (0.21 g, 0.20 mmol) 在 DMF (30 ml) 中的溶液中。将该反应混合物在 110 °C 下加热一整夜,将该溶液减压蒸发并在用硅胶闪柱色谱进行混合后,从该残余物中分离出标题物质,用 EtOAc:MeOH, 99:1 进行洗脱;收率为 1.61 g (87%)。HRMS: M 458.1402。C₂₀H₂₁N₅O₈ 的计算值: 459.1390。MS (EI): 460 (M, 5%), 459 (21), 259 (19), 202 (25), 201 (100), 174 (9), 157 (6), 139 (35), 97 (19), 43 (59)。

实施例 18

2', 3', 5'-三-(*O*-乙酰基)-8-(3-呋喃基)腺苷 (14c)

在氩气下,在 50 °C 下,将 3-三丁基甲锡烷基呋喃 (1.36 g, 3.81 mmol) 在室温下滴加到 2', 3', 5'-三-(*O*-乙酰基)-8-溴腺苷 (12) (1.50 g, 3.18 mmol)、TFP (0.30 g, 1.27 mmol) 和 Pd₂dba₃*CHCl₃ (0.16 g, 0.16 mmol) 在 DMF (22.5 ml) 中的溶液中。将其温度增加至 110 °C 并将该反应混合物在这种温度下搅拌一整夜。减压除去溶剂并将该残余物用硅胶闪柱色谱进行纯化,用 EtOAc:MeOH 99:1 进行洗脱;收率为 1.25 g (86%)。HRMS: M 459.1384。C₂₀H₂₁N₅O₈ 的计算值: 459.1390。¹H NMR: (300 MHz, CDCl₃); δ 1.97/2.01/2.08 (9H, s, 3 × COCH₃), 4.26-4.48 (3H, m, H-5', C-4'), 5.97-6.02 (2H, m, H-1', H-3'), 6.31 (2H, s, NH₂), 6.58 (1H, dd, *J* 4.4 Hz, *J'* 5.8 Hz, H-2'), 6.81-6.82 (1H, m, 呋喃基-H), 7.53-7.54 (1H, m, 呋喃基-H), 7.93-7.94 (1H, m, 呋喃基-H), 8.27 (1H, s, H-2)。¹³C NMR: (75 MHz, CDCl₃): δ 20.4/20.46/2.5 (3 × COCH₃), 62.8 (C-5'), 70.7/71.9/80.1/87.4 (C-2', C-3', C-1', C-4'), 110.7/115.3 (C-4'', C-3''), 119.5 (C-5), 143.3/144.0/145.0/150.5/152.7/155.3 (C-2'', C-5'', C-8, C-6, C-2, C-4), 169.3/169.4/170.5 (3 × COCH₃)。MS (EI):

460 (M, 6%), 459 (28), 260 (6), 259 (54), 202 (34), 201 (100), 139 (81), 97 (39), 43 (92)。

实施例 19

2', 3', 5'-三-(*O*-乙酰基)-8-(2-噻吩基)腺苷 (14d)

在氩气下, 在 50 °C 下, 将 2-(三丁基甲锡烷基)噻吩 (0.40 ml, 1.27 mmol) 滴加到 2', 3', 5'-三-(*O*-乙酰基)-8-溴腺苷 (12) (0.50 g, 1.06 mmol)、TFP (0.10 g, 0.42 mmol) 和 Pd₂dba₃*CHCl₃ (0.05 g, 0.05 mmol) 在 DMF (9 ml) 中的溶液中。将所得的混合物在 110 °C 下搅拌一整夜。将该混合物在减压下蒸发至干燥并在将残余物用硅胶闪柱色谱进行纯化, 用 EtOAc:MeOH 99:1 进行洗脱后, 分离出标题化合物; 收率 > 80%。HRMS: M 475.1158。C₂₀H₂₁N₅O₇S 的计算值: 475.1162。MS (EI): 476 (M, 3%), 475 (14), 260 (7), 259 (31), 219 (6), 218 (20), 217 (100), 190 (7), 157 (9), 139 (42), 97 (21)。

实施例 20

2', 3', 5'-三-(*O*-乙酰基)-8-(1-甲基-2-吡咯基)腺苷 (14e)

将 2', 3', 5'-三-(*O*-乙酰基)-8-溴腺苷 (12) (1.50 g, 3.18 mmol)、三(2-咪唑基)膦 (0.29 g, 1.27 mmol) 和 Pd₂dba₃*CHCl₃ (0.16 g, 0.16 mmol) 在氩气下进行充溢并将其溶解于 DMF (10 ml) 中。将该混合物加热至 50 °C, 向其中加入 1-甲基-2-(三丁基锡)n 吡咯 (1.41 g, 3.81 mmol) 并将该溶液在 110 °C 下加热一整夜。在减压下除去溶剂并将残余物用硅胶闪柱色谱进行纯化, 用 EtOAc:MeOH 99:1 进行洗脱; 收率为 1.15 g (77%)。HRMS: M 472.1716。C₂₁H₂₄N₆O₇ 的计算值: 472.1706。¹³C NMR: (75 MHz, CDCl₃); δ 20.4/20.5/20.7 COCH₃, 35.6 (NCH₃), 63.0 (C-5'), 70.6/72.2 (C-2', C-3'), 79.7 (C-4'), 87.7 (C-1'), 108.3/114.3 (C-3'', C-4''), 119.7/120.2 (C-5, C-2''), 126.9 (C-5''), 144.7 (C-8), 150.3 (C-4), 152.6 (C-2), 155.0 (C-6), 169.3/169.5/170.6 (3 × CO)。MS (EI): M 473 (9%), 472 (40), 215 (17), 214 (100), 213 (35), 139 (21), 97 (10)。

实施例 21

2', 3', 5'-三-(*O*-乙酰基)-8-乙基腺苷(14f)

在氩气下, 在室温下, 将 Et_4Sn (0.84 ml, 4.24 mmol) 滴加到 2', 3', 5'-三-(*O*-乙酰基)-8-溴腺苷(12) (1.0 g, 2.12 mmol) 和 $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (0.24 g, 0.21 mmol) 在 NMP (25 ml) 中的溶液中。将该混合物加热至 130 °C 并将该混合物在这种温度下加热 20 小时。向这种冷反应混合物中加入 EtOAc (100 ml) 并将溶液用水 (4 × 50 ml) 和饱和 NaCl 水溶液 (50 ml) 进行洗涤。将该有机溶液干燥 (MgSO_4), 蒸馏掉溶剂并将残余物用硅胶闪柱色谱进行纯化, 用 10% MeOH 的 CH_2Cl_2 溶液进行洗脱; 收率为 0.51 g (57%)。HRMS: M 421.1585。 $\text{C}_{18}\text{H}_{23}\text{N}_5\text{O}_7$ 的计算值: 421.1597。 ^1H NMR: (300MHz, CDCl_3); δ 1.36 (3H, t, J 7.5 Hz, CH_2CH_3), 1.98/2.03/2.09 (3 × 3H, s, COCH_3), 2.77-2.78 (1H, m, H-3' 或 H-4'), 2.83-2.90 (2H, m, CH_2CH_3), 4.28-4.48 (3H, m, H-5', H-4' 或 H-3'), 5.87-5.93 (3H, m, NH_2 , H-2' 或 H-1'), 6.25-6.29 (1H, m, H-1' 或 H-2'), 8.22 (1H, s, H-2)。 ^{13}C NMR: (75 MHz, CDCl_3); δ 11.7 (CH_2CH_3), 20.4/20.5/20.6 (3 × COCH_3), 21.2 (CH_2CH_3), 63.0 (C-5'), 70.5/72.3 (C-2', C-3'), 79.9/86.6 (C-4', C-1'), 118.7 (C-5), 150.7/152.2/153.8/154.7 (C-8, C-4, C-2, C-6), 169.4/169.4/170.5 (3 × CO)。 MS (EI): 421 (11), 362 (23), 259 (53), 192 (33), 164 (53), 163 (45), 139 (86), 97 (42), 43 (100)。

实施例 22

2', 3', 5'-三-(*O*-乙酰基)-8-(1-乙氧基乙烯基)腺苷(14g)

在氩气下, 在 50 °C 下, 将 (1-乙氧基乙烯基)三丁基锡 (0.60 ml, 1.78 mmol) 滴加到 2', 3', 5'-三-(*O*-乙酰基)-8-溴腺苷(12) (0.70 g, 1.48 mmol)、TFP (0.14 g, 0.59 mmol) 和 $\text{Pd}_2\text{dba}_3 \cdot \text{CHCl}_3$ (0.08 g, 0.07 mmol) 在 DMF (14 ml) 中的溶液中。将该反应混合物在 80 °C 下搅拌 17 小时。将该反应混合物在减压下蒸发至干燥并将残余物用硅胶闪柱色谱进行纯化, 用 $\text{EtOAc}:\text{MeOH}$ 99:1 进行洗脱; 得到 0.52 g (76%) 白色固体。

实施例 23

2', 3', 5'-三-(*O*-叔-丁基二甲基甲硅烷基)-8-甲基腺苷 (15a)

在氩气下, 将 AlMe_3 (2 M 甲苯溶液, 0.44 ml, 0.87 mmol) 滴加到 8-溴-2', 3', 5'-三-(*O*-叔-丁基二甲基甲硅烷基)腺苷 (13) (0.30 g, 0.44 mmol) 和 $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (0.03 g, 0.02 mmol) 在 THF (5 ml) 中的溶液中。将该混合物在 70 °C 下加热 4 小时, 这时, TLC 表明该反应已经进行完全。将该溶液减压蒸发并在将残余物用硅胶闪柱色谱进行纯化后分离出所说的产物, 用 10% MeOH 的 CH_2Cl_2 溶液进行洗脱; 收率为 0.27 g (>98%)。

实施例 24

2', 3', 5'-三-(*O*-叔-丁基二甲基甲硅烷基)-8-(2-呋喃基)腺苷 (15b)

将 8-溴-2', 3', 5'-三-*O*-(叔-丁基二甲基甲硅烷基)腺苷 (13) (3.44 g, 5.0 mmol)、 $\text{Pd}_2\text{dba}_3 \cdot \text{CHCl}_3$ (65 mg, 0.063 mmol)、三(2-呋喃基)膦 (115 mg, 0.5 mmol) 和 2-三丁基甲锡烷基呋喃 (1.9 ml, 6.0 mmol) 在 NMP (25 ml) 中的溶液在 80 °C 下加热 25 小时。向冷却了的该反应混合物中加入 EtOAc (300 ml), 将该溶液与水 (3 × 50 ml) 一起进行振摇, 将有机溶液干燥 (MgSO_4), 蒸发并将残余物用硅胶闪柱色谱进行纯化, 用 EtOAc: 己烷 (开始 1:4, 然后 1:2) 进行洗脱。该产物是一种白色固体; 收率为 2.94 g (87%)。 ^1H NMR (CDCl_3 , 200 MHz): δ -0.39 (3H, s, $\text{CH}_3\text{-Si}$), -0.11 (3H, s, $\text{CH}_3\text{-Si}$), -0.07 (3H, s, $\text{CH}_3\text{-Si}$), -0.02 (3H, s, $\text{CH}_3\text{-Si}$), 0.13 (3H, s, $\text{CH}_3\text{-Si}$), 0.71 (9H, s, *t*-Bu-Si), 0.80 (9H, s, *t*-Bu-Si), 0.92 (9H, s, *t*-Bu-Si), 3.70 (1H, q), 4.0-4.1 (2H, m), 4.62 (1H, dd), 5.60 (1H, dd), 6.20 (1H, d), 6.5 (3H, m), 7.08 (1H, d), 7.60 (1H, d), 8.24 (1H, s, H-2)。 ^{13}C NMR (CDCl_3 , 50 MHz): δ -5.6, -5.5, -5.2, -4.7, -4.60 和 -4.58 (SiCH_3), 17.8, 18.0 和 18.2 (叔-Bu 中的 C), 25.6, 25.7 和 25.8 (叔-Bu 中的 CH_3), 62.3, 72.0, 72.2, 85.1, 89.1, 111.7, 113.8, 120.0, 143.3, 143.4, 144.7, 150.6, 152.4, 155.6。

实施例 25

2', 3', 5'-三-(*O*-叔-丁基二甲基 (dimethyl) 甲硅烷基)-8-苯基腺苷 (16a)

在氩气下, 在室温下将苯基硼酸 (0.09 g, 0.76 mmol) 和 Cs₂CO₃ (0.49 g, 1.53 mmol) 加入到 2', 3', 5'-三-(*O*-叔-丁基二甲基甲硅烷基)-8-溴腺苷 (13) (0.35 g, 0.51 mmol) 和 Pd(PPh₃)₄ (0.06 g, 0.05 mmol) 在二恶烷 (5 ml) 中的溶液中。将该混合物加热至 100 °C, 向其中加入水直至所有的 Cs₂CO₃ 都被溶解, 将该混合物在回流下加热一整夜。向冷却了的该反应混合物中加入 EtOAc (15 ml), 随后将其与水 (10 ml) 一起进行振摇。将该有机溶液干燥 (MgSO₄), 蒸发并在用硅胶闪柱色谱进行混合后由该残余物中分离出所说的标题化合物, 用 EtOAc:MeOH 99:1 进行洗脱; 收率为 0.31 g (89%)。¹H NMR: (300 MHz, CDCl₃); δ -0.42/-0.12/0.04/0.05/0.09/0.11 (18H, s, 3 × Si(CH₃)₂), 0.69/0.87/0.88 (27H, s, 3 × SiC(CH₃)₃), 3.75 (1H, dd, *J* 4.7 Hz, *J'* 10.6 Hz, H-5'), 3.98-4.02 (1H, m, H-4'), 4.12 (1H, dd, *J* 8.2 Hz, *J'* 10.6 Hz, H-5'), 4.51 (1H, dd, *J* 2.1 Hz, *J'* 4.3 Hz, H-3'), 5.61 (1H, dd, *J* 4.3 Hz, *J'* 6.6 Hz, H-2'), 5.96 (1H, d, *J* 6.6 Hz, H-1'), 6.06 (2H, s, NH₂), 7.46-7.51 (3H, m, H-3'', H-4'', H-5''), 7.76-7.79 (2H, m, H-2'', H-6''), 8.35 (1, s, H-2)。¹³C NMR: (75 MHz, CDCl₃); δ -5.5/-5.4/-5.3/-4.7/-4.4 (3 × Si(CH₃)₂), 17.8/18.0/18.3 (3 × SiC(CH₃)₃), 25.7/25.8/25.9 (3 × SiC(CH₃)₃), 61.7 (C-5'), 71.7/72.5 (C-2', C-3'), 85.5/88.6 (C-4', C-1'), 119.9 (C-5), 128.7/129.1/129.8/130.3 (苯基), 150.9/151.9/153.1/155.1 (C-6, C-8, C-2, C-4)。

实施例 26

2', 3', 5'-三-(*O*-叔-丁基二甲基 (dimethyl) 甲硅烷基)-8-(3-噻吩基)腺苷 (16b)

在氩气下, 将 3-噻吩硼酸 (0.14 g, 1.09 mmol) 和 Cs₂CO₃ (0.71 g,

2.18 mmol) 加入到 2', 3', 5'-三-(*O*-叔-丁基二甲基(dimethyl)甲硅烷基)-8-溴腺苷(13) (0.50 g, 0.73 mmol) 和 Pd(PPh₃)₄ (0.08 g, 0.07 mmol) 在二恶烷(7 ml) 中的溶液中。将该混合物加热至 100 °C 并向其中加入水(1 ml) 以使所有的 Cs₂CO₃ 溶解。将该溶液在回流下加热一整夜, 冷却至室温并向其中加入 EtOAc(20 ml)。将该溶液与水(15 ml) 一起进行振摇, 干燥(MgSO₄) 并将其减压蒸发。在用硅胶闪柱色谱进行混合后从该残余物中分离出所说的产物, 用 EtOAc:MeOH 99:1 进行洗脱; 收率为 0.43 g (86%)。HRMS: M 691.3425。C₃₂H₅₇N₅O₄SSi₃ 的计算值: 691.3439。¹H NMR: (CDCl₃, 300 MHz); δ -0.39/-0.11/-0.01/0.002/0.12/0.13/0.70/0.84/0.91 (45 H, s, 3 × Si(CH₃)₂(CH₃)₃), 3.74 (1H, dd, *J* 4.0 Hz, *J'* 10.2 Hz, H-5'), 4.00-4.11 (2H, m, H-5', H-4'), 4.60 (1H, dd, *J* 2.7 Hz, *J'* 4.3 Hz, H-3'), 5.58 (1H, dd, *J* 4.3 Hz, *J'* 6.0 Hz, H-2'), 5.88 (2H, s, NH₂), 6.03 (1H, d, *J* 6.0 Hz, H-1'), 7.43 (1H, dd, *J* 2.9 Hz, *J'* 5.0 Hz, H-5''), 7.54 (1H, dd, *J* 1.2 Hz, *J'* 5.0 Hz, H-4''), 7.90 (1H, dd, *J* 1.2 Hz, *J'* 2.9 Hz, H-2'')。 ¹³C NMR: (CDCl₃, 75 MHz); δ -5.5/-5.4/-5.2/-4.7/-4.6/-4.5 (6 × SiCH₃), 17.9/18.0/18.3 (3 × SiCCH₃), 25.7/25.8/25.8 (9 × SiCCH₃), 62.5 (C-5'), 72.0/72.3 (C-2', C-3'), 85.2/88.7 (C-1', C-4'), 119.8 (C-5), 126.6/127.9/128.4/130.0 (C-2'', C-3'', C-4'', C-5''), 148.6/150.8/152.2/155.2 (C-8, C-4, C-2, C-6)。MS (EI): 691 (M, 0.6%), 636 (26), 624 (100), 374 (25), 147 (15), 89 (21), 73 (91)。

实施例 27

2', 3', 5'-三-*O*-(叔-丁基二甲基甲硅烷基)-8-(3-吡啶基)腺苷(16c)

在氩气下, 将吡啶-3-硼酸(0.59 g, 0.48 mmol) 和 Cs₂CO₃ (3.11 g, 9.57 mmol) 加入到 2', 3', 5'-三-*O*-(叔-丁基二甲基甲硅烷基)-8-溴腺苷(13) (2.20 g, 3.19 mmol) 和 Pd(PPh₃)₄ (0.37 g, 0.32 mmol) 在二恶烷(50 ml) 中的溶液中。向其中加入水(10 ml) 以使所有的 Cs₂CO₃ 溶解。将该溶液在回流下加热一整夜。向该冷却了的该反应混合物中加入

EtOAc (200 ml), 将所得的溶液与水 (100 ml) 一起进行振摇, 将该有机溶液干燥 (MgSO_4), 蒸发并将残余物用硅胶闪柱色谱进行纯化, 用 EtOAc:MeOH 99:1 进行洗脱; 收率为 1.76 g (80%)。HRESI: M+H 687.3900。 $\text{C}_{33}\text{H}_{58}\text{N}_6\text{O}_4\text{Si}_3 + \text{H}$ 的计算值: 687.3900。 ^1H NMR: (300 MHz, CDCl_3); δ -0.41/-0.12/0.01/0.02/0.09/0.11 (18 H, s, $3 \times \text{Si}(\text{CH}_3)_2$), 0.67/0.85/0.86 (27 H, s, $3 \times \text{SiC}(\text{CH}_3)_3$), 3.71-4.12 (3H, m, H-5', H-3' 或 H-4'), 4.53-4.55 (1H, m, H-4' 或 H-3'), 5.61-5.65 (1H, m, H-2'), 5.81 (1H, d, J 6.3 Hz, H-1'), 6.02 (2H, s, NH_2), 7.38-7.42 (1H, m, H-5'), 8.09-8.12 (1H, m, H-4''), 8.30 (1H, s, H-2), 8.73-8.75 (1H, m, H-6''), 9.04-9.05 (1H, m, H-2'')。 ^{13}C NMR: (75 MHz, CDCl_3); δ -5.5/-5.4/-5.3/-4.7/-4.6/-4.5 ($3 \times \text{Si}(\text{CH}_3)_2$), 17.2/18.0/18.3 ($3 \times \text{SiC}$), 25.6/25.8/25.8 ($3 \times \text{SiC}(\text{CH}_3)_3$), 62.5 (C-5'), 71.7/72.4 (C-2', C-3'), 85.5/88.9 (C-4', C-1'), 120.1/123.1/125.7/136.9/149.9/150.4/151.0/151.1/152.6/155.6 (C-5, C-5'', C-3'', C-4'', C-6, C-8, C-6'', C-2'', C-2, C-4)。

实施例 28

2', 3', 5'-三-(*O*-叔-丁基二甲基甲硅烷基)-8-(4-吡啶基)腺苷 (16d)

将吡啶-4-硼酸 (0.27 g, 2.18 mmol) 和 Cs_2CO_3 (1.42 g, 4.35 mmol) 在水 (11 ml) 加入到 2', 3', 5'-三-(*O*-叔-丁基二甲基甲硅烷基)-8-溴腺苷 (13) (1.0 g, 1.45 mmol) 和 $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (0.17 g, 0.15 mmol) 在二恶烷 (25 ml) 中的溶液中并将该反应混合物在 100 °C 下加热一整夜。向该冷却了的反应混合物中加入 EtOAc (80 ml) 并将所得的混合物与水 (50 ml) 一起进行振摇。对该干燥 (MgSO_4) 了的溶液进行蒸发并将残余物用硅胶闪柱色谱进行纯化, 用 EtOAc:MeOH 99:1 进行洗脱; 收率为 0.58 g (58%)。HRESI: M+H 687.3883。 $\text{C}_{33}\text{H}_{58}\text{N}_6\text{O}_4\text{Si}_3 + \text{H}$ 的计算值: 687.3900。 ^1H NMR: (300 MHz, CDCl_3); δ -0.43/-0.12/0.02/0.04/0.09/0.11 (18 H, s, $3 \times \text{Si}(\text{CH}_3)_2$), 0.67/0.86/0.87 (27 H, s, $3 \times \text{SiC}(\text{CH}_3)_3$), 3.72-3.76 (1H, m, H-5'), 4.02-4.13 (2H, m, H-4' 或 H-3')

和 H-5'), 4.49-4.51 (1H, m, H-3' 或 H-4'), 5.61-5.65 (1H, m, H-2'), 5.92 (1H, d, J 6.6 Hz, H-1'), 6.08 (2H, s, NH₂), 7.71-7.73 (2H, m, H-2'' 和 H-6''), 8.30 (1H, s, H-2), 8.75-8.77 (2H, m, H-3'' 和 H-5''). ¹³C NMR: (75 MHz, CDCl₃); δ -5.5/-5.4/-5.3/-4.7/-4.5 (3 × Si(CH₃)₂), 17.8/17.9/18.3 (3 × SiC), 25.6/25.7/25.8 (3 × SiC(CH₃)₃), 62.5 (C-5'), 71.6/72.4 (C-2', C-3'), 85.7/88.6 (C-4', C-1'), 120.1/123.7/136.9/150.3/151.1/152.9/155.7 (C-5, C-5'', C-3'', C-6, C-8, C-6'', C-2'', C-2, C-4, C-1').

实施例 29

8-(2-咪喃基)腺苷(17a) (酯水解)

将 2', 3', 5'-三-(*O*-乙酰基)-8-(2-咪喃基)腺苷(14b) (1.39 g, 3.03 mmol) 和 K₂CO₃ (0.14 g, 1.01 mmol) 在 MeOH (50 ml) 中的溶液在室温下搅拌一整夜。向该溶液中加入硅胶, 将该混悬液搅拌并蒸发至干燥, 将残余物施加到硅胶柱的顶端, 用闪柱色谱进行纯化。用 15% MeOH 的 CH₂Cl₂ 溶液对该柱进行展开, 收率为 0.68 g (67%)。

实施例 30

8-(2-咪喃基)腺苷(17a) (脱甲硅基作用)

将 2', 3', 5'-三-(*O*-叔-丁基二甲基甲硅烷基)-8-(2-咪喃基)腺苷(15b) (2.78 g, 4.1 mmol) 和 TBAF × 3 H₂O (5.30 g, 16.8 mmol) 在 THF (70 ml) 中的溶液在室温下搅拌 2 小时。蒸馏掉溶剂并将产物用闪柱色谱进行纯化, 用 MeOH: CH₂Cl₂ 1:9 进行洗脱并将产物用少量 MeOH 进行研磨; 得到 1.24 g (90%) 淡黄褐色固体。¹H NMR (DMSO-*d*₆, 200 MHz): δ 3.5 3.6 (1H, m), 3.70 (1H, dt), 3.99 (1H, m), 4.20 (1H, m), 5.0-5.2 (2H, m), 5.45 (1H, d), 6.76 (1H, q), 7.13 (1H, dd), 7.56 (2H, br s, NH₂), 8.00 (1H, d), 8.14 (1H, s, H-2)。¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 50 MHz): δ 62.2, 71.0, 71.6, 86.7, 89.3, 112.1, 113.9, 119.4, 141.5, 143.2, 145.5, 149.6, 152.3, 156.2.

实施例 31

8-(2-噻吩基)腺苷(17b)

将 2', 3', 5'-三-(*O*-乙酰基)-8-(2-噻吩基)腺苷(14d)和 K_2CO_3 在 MeOH 中的溶液在室温下搅拌一整夜, 在减压下蒸发至干燥并在用硅胶闪柱色谱进行混合后由该残余物中分离出所说的标题化合物, 用 10% MeOH 的 CH_2Cl_2 溶液进行洗脱; 收率 > 60%。HRMS: M 349.0832。 $C_{14}H_{15}N_5O_4S$ 的计算值: 349.0845。 1H NMR: (300 MHz, $DMSO-d_6$); δ 3.51-3.73 (2H, m, H-5'), 3.98-3.99 (1H, m, H-4'), 4.19-4.20 (1H, m, H-3'), 5.16-5.21 (2H, m, H-2', 3'-OH), 5.53 (1H, d, J 6.3 Hz, 2'-OH), 5.80 (1H, dd, J 3.4 Hz, J' 8.9 Hz, 5'-OH), 6.00 (1H, d, J 7.0 Hz, H-1'), 7.28 (1H, dd, J 3.7 Hz, 5.0 Hz, H-4''), 7.51 (2H, s, NH_2), 7.65 (1H, dd, J 0.9 Hz, J' 3.7 Hz, H-3''), 7.86 (1H, dd, J 0.9 Hz, J' 5.0 Hz, H-5''), 8.14 (1H, s, H-2)。 ^{13}C NMR: (75 MHz, $DMSO-d_6$); δ 62.2 (C-5'), 71.1 / 71.4 (C-2', C-3'), 86.77 (C-4'), 89.2 (C-1'), 119.2 (C-5), 128.2 / 129.9 / 130.0 (C-3'', C-4'', C-5''), 130.7 (C-2''), 145.0 (C-8), 150.0 (C-4), 152.2 (C-2), 156.0 (C-6)。 MS (EI): 350 (M , 0.3%), 349 (4), 260 (6), 219 (6), 218 (20), 217 (100), 190 (14), 110 (10)。

实施例 32

8-(3-咪喃基)腺苷(17c)

将 2', 3', 5'-三-(*O*-乙酰基)-8-(3-咪喃基)腺苷(14c) (0.95 g, 2.07 mmol) 和 K_2CO_3 (0.10 g, 0.69 mmol) 在 MeOH (35 ml) 中的溶液在室温下搅拌一整夜。向其中加入硅胶, 将该混悬液搅拌并在减压下蒸发掉溶剂。将残余物用硅胶色谱进行纯化, 用 15% MeOH 的 CH_2Cl_2 溶液进行洗脱; 收率为 0.50 g (72%)。 HRESI: $M+H$ 350.0902。 $C_{14}H_{15}N_5O_4S$ + H 的计算值: 350.0917。 $M+Na$: 372.0747。 $C_{14}H_{15}N_5O_4S$ + Na 的计算值: 372.0736。 1H NMR: (300 MHz, $DMSO-d_6$); δ 3.53-3.60 (2H, m, C-5'), 3.99-4.00 (1H, m, H-4'), 4.19-4.22 (1H, m, H-3'), 5.06-5.13 (1H, m, H-2'), 5.24 (1H, d, J 4.6 Hz, 3'-OH), 5.52 (1H, d, J 6.6 Hz, 2'-OH), 5.87-5.94 (2H, m, 5'-OH, H-1'), 6.94 (1H, d, J 1.2 Hz, H-4''), 7.48 (2H, s, NH_2), 7.92/8.14 (2H, s, H-1'', H-5''), 8.24 (1H,

s, H-2)。¹³C NMR: (75 MHz, DMSO-*d*₆); δ 62.2 (H-5'), 71.1/71.7/86.9/89.0 (C-2', C-3', C-4', C-1'), 111.1/115.6 (C-4'', C-3''), 119.2 (C-5), 143.6/144.2/144.5/149.7/151.9/156.0 (C-2'', C-5'', C-6, C-8, C-2, C-4)。

实施例 33

8-(3-噻吩基)腺苷 (17d)

将 2', 3', 5'-三-(*O*-叔-丁基二甲基 (dimethyl) 甲硅烷基)-8-(3-噻吩基)腺苷 (16b) (1.21 g, 1.75 mmol) 和 TBAF (1.83 g, 6.99 mmol) 在 THF (67 ml) 中的溶液在室温下搅拌一整夜。蒸馏掉溶剂并将残余物用硅胶闪柱色谱进行纯化, 用 10% MeOH 的 CH₂Cl₂ 溶液进行洗脱; 收率为 0.51 g (84%)。HRESI: M+H 350.0902。C₁₄H₁₅N₅O₄S + H 的计算值: 350.0917。M+Na 372.0747。C₁₄H₁₅N₅O₄S + Na 的计算值: 372.0736。¹H NMR: (300 MHz, DMSO); δ 3.51-3.73 (2H, m, H-5'), 3.96-3.97 (1H, m, H-4'), 4.17-4.21 (1H, m, H-3'), 5.11-5.18 (1H, m, H-2'), 5.20 (1H, d, *J* 4.4 Hz, 3'-OH), 5.54 (1H, d, *J* 6.4 Hz, 2'-OH), 5.85-5.90 (2H, m, 5'-OH 或 H-1'), 7.47 (2H, s, NH₂), 7.52 (1H, dd, *J* 1.2 Hz, *J'* 5.0 Hz, H-4''), 7.78 (1H, dd, *J* 2.9 Hz, *J'* 5.0 Hz, H-5''), 8.05 (1H, dd, *J* 1.2 Hz, *J'* 2.9 Hz, H-2''), 8.14 (1H, s, H-2)。¹³C NMR: (75 MHz, DMSO-*d*₆); 62.3 (C-5'), 71.1/71.5 (C-2', C-3'), 86.8/87.0 (C-4', C-1'), 119.0 (C-5), 127.5/128.3/128.4/130.0 (C-2'', C-3'', C-4'', C-5''), 146.7/149.6/152.0/156.1 (C-8, C-4, C-2, C-6)。

实施例 34

8-苯基腺苷 (17e)

将 2', 3', 5'-三-(*O*-乙酰基)-8-苯基腺苷 (14a) (0.73 g, 1.56 mmol) 和 K₂CO₃ (0.07 g, 0.52 mmol) 在 MeOH (23 ml) 中的溶液在室温下搅拌 24 小时。向其中加入硅胶 (约 2 g)。将该混悬液搅拌并在减压下蒸发至干燥。将该残余物施加到硅胶闪柱色谱柱的顶端并用 10% MeOH 的 CH₂Cl₂ 溶液对该柱进行展开; 收率为 0.48 g (91%)。HRMS: M

343.1287. $C_{16}H_{17}N_3O_4$ 的计算值: 343.1281. MS (EI): 343 (M, 1%), 254 (9), 240 (7), 212 (25), 211 (100), 184 (12), 104 (12)。

实施例 35

8-(3-吡啶基)腺苷 (17f)

将 2', 3', 5'-三-*O*-(叔-丁基二甲基甲硅烷基)-8-(3-吡啶基)腺苷 (16c) (0.56 g, 0.82 mmol) 和 TBAF (0.85 g, 3.26 mmol) 在 THF (31 ml) 中的溶液在氩气下在室温下搅拌一整夜。蒸馏掉溶剂并将残余物溶解于 MeOH (10 ml) 中。使该溶液在 0 °C 放置一整夜并通过过滤分离出标题化合物。 ^{13}C NMR: (75 MHz, DMSO); δ 62.27 (C-5'), 71.13/71.62 (C-2', C-3'), 86.95/89.27 (C-4, C-1), 119.33/123.69/125.71/137.20/148.20/149.80/149.85/150.88/152.33/156.34 (C-5, C-5'', C-3'', C-4'', C-6, C-8, C-6'', C-2'', C-2, C-4)。MS (EI): 344 (M, 2%), 255 (5), 241 (5), 213 (22), 212 (100), 211 (5) 185 (12), 104 (12)。

实施例 36

8-(4-吡啶基)腺苷 (17g)

将 TBAF (7.39 ml, 1 M, 7.39 mmol) 加入到 2', 3', 5'-三-(*O*-叔-丁基二甲基甲硅烷基)-8-(4-吡啶基)腺苷 (16d) (1.27 g, 1.85 mmol) 在 THF (28 ml) 中的溶液中并将该溶液在室温下搅拌一整夜。将该溶液在减压下蒸发至干燥并将残余物用硅胶闪柱色谱进行纯化, 用 15% MeOH 的 CH_2Cl_2 溶液进行洗脱; 收率为 0.46 g (72%)。HRESI: M+H 345.1313. $C_{15}H_{16}N_6O_4 + H$ 的计算值: 345.1305. 1H NMR: (300 MHz, DMSO); δ 3.51-3.60 (2H, m, H-5'), 3.97-3.98 (1H, m, H-4' 或 H-3'), 4.15-4.19 (1H, m, H-3' 或 H-4'), 5.13-5.19 (1H, m, H-2') 5.22 (1H, d, J 4.4 Hz, 3'-OH), 5.54 (1H, d, J 6.5 Hz, 2'-OH), 5.75 (1H, d, J 7.3 Hz, H-1'), 5.74-5.81 (1H, m, 5'-OH), 7.66 (2H, s, NH_2), 7.74-7.76 (2H, m, H-2'' 和 H-6''), 8.19 (1H, s, H-2), 8.80-8.82 (2H, m, H-3'' 和 H-5'')。 ^{13}C NMR: (75 MHz, DMSO); δ 62.2 (C-5'), 71.0/71.4 (C-2', C-3'), 87.0/89.1 (C-4', C-1'), 119.4 (C-5), 123.8 (C-2'' , C-6'') , 150.3 (C-3' 和 C-5') ,

136.9/148.4/150.0/152.7/156.5 (C-6, C-8, C-2, C-4, C-1'')。

实施例 37

8-(1-甲基-2-吡咯基)腺苷 (17h)

将 2', 3', 5'-三-(*O*-乙酰基)-8-(1-甲基-2-吡咯基)腺苷 (14e) (1.04 g, 2.20 mmol) 和 K_2CO_3 (0.10 g, 0.73 mmol) 在 MeOH (37 ml) 中的溶液在室温下搅拌一整夜, 将该溶液减压蒸发并将残余物用硅胶闪柱色谱进行纯化, 用 15% MeOH 的 CH_2Cl_2 溶液进行洗脱; 收率为 0.64 g (84%)。HRMS: M 346.1371。 $C_{15}H_{18}N_6O_4$ 的计算值: 346.1390。 ^{13}C NMR: (75 MHz, DMSO); δ 35.1 (NCH₃), 62.4 (C-5'), 71.2/71.4 (C-2', C-3'), 86.6/89.0 (C-4', C-1'), 107.71/113.9 (C-3'', C-4''), 119.2/120.4 (C-5, C-2''), 126.8 (C-5''), 144.1 (C-8), 149.2 (C-4), 151.7 (C-2), 155.9 (C-6)。MS (EI): M^+ 346 (5%), 215 (11), 214 (100), 213 (60), 129 (12), 128 (8), 115 (35), 97 (9), 69 (12)。

实施例 38

8-甲基腺苷 (17i)

将 8-溴-2', 3', 5'-三-(*O*-叔-丁基二甲基甲硅烷基)腺苷 (15a) (1.41 g, 2.26 mmol) 和 TBAF (2.37 g, 9.05 mmol) 在 THF (30 ml) 中的溶液在室温下搅拌一整夜。蒸馏掉溶剂并将残余物用硅胶闪柱色谱进行纯化, 用 15% MeOH 的 CH_2Cl_2 溶液进行洗脱; 收率为 0.59 g (93%)。

实施例 39

8-乙基腺苷 (17j)

将 2', 3', 5'-三-(*O*-乙酰基)-8-乙基腺苷 (14f) (0.63 g, 1.5 mmol) 和 K_2CO_3 (0.07 g, 0.50 mmol) 在 MeOH (19 ml) 中的溶液在室温下搅拌 18 小时。向其中加入硅胶, 将该混悬液搅拌并在减压下蒸发掉溶剂。将该残余物施加到硅胶闪柱色谱柱的顶端并将该柱用 15% MeOH 的 CH_2Cl_2 溶液进行展开; 收率为 0.23 g, 52%。

实施例 40

8-(1-乙氧基乙烯基)腺苷 (17k)

将 2', 3', 5'-三-(*O*-乙酰基)-8-(1-乙氧基乙烯基)腺苷 (14g) (0.53 g, 1.15 mmol) 和 K_2CO_3 (0.05 g, 0.38 mmol) 在 MeOH (17 ml) 中的溶液在室温下搅拌 24 小时, 这时, TLC 表明其已经完全转化。向该溶液中加入硅胶, 将该混悬液搅拌并在减压下蒸发至干燥。将该残余物施加到硅胶闪柱色谱柱的顶端, 将其用 10% MeOH 的 CH_2Cl_2 溶液进行展开; 收率为 0.37 g (>95%)。HRMS: M 337.1395。 $C_{14}H_{19}N_5O_5$ 的计算值: 337.1386。 1H NMR: (300 MHz, $DMSO-d_6$); δ 1.31 (3H, t, J 6.9 Hz, OCH_2CH_3), 3.53-3.71 (2H, m, H-5'), 3.94 (2H, J 13.9 Hz, J' 6.9 Hz, OCH_2CH_3), 3.90-3.98 (1H, m, H-4'), 4.19-4.22 (1H, m, H-3'), 4.76-4.79 (2H, m, CCH_2), 5.0-5.02 (1H, m), 5.1 (1H, d, 4.15 Hz), 5.29 (1H, d, J 6.3 Hz), 5.71-5.75 (1H, m, H-2'), 5.97 (1H, d, J 6.8 Hz, H-1'), 7.51 (2H, s, NH_2), 8.12 (1H, s, H-2)。 ^{13}C NMR: (75 MHz, DM_2 (C-1', C-4', CCH_2), 118.5 (C-5), 146.7/149.3/150.6/152.4/156.5 (C-6, C-8, C-2, C-4, CCH_2)。 MS (EI): 337 (M, 8%), 308 (18), 278 (17), 234 (21), 205 (96), 190 (100), 178 (47), 161 (80), 135 (16)。

实施例 41

8-乙酰基腺苷 (171)

将 1 M HCl (10 ml) 加入到 8-乙氧基乙烯基腺苷 (17k) (1.48 g, 4.37 mmol) 在 THF (40 ml) 中的溶液中并将该溶液在室温下搅拌 20 小时。向其中加入 K_2CO_3 至中性 pH 并将该混合物直接施加到闪柱色谱的硅胶柱上, 用 15% MeOH 的 CH_2Cl_2 溶液进行展开; 收率为 1.17 g (87%)。 1H NMR: (300 MHz, $DMSO-d_6$); δ 2.72 (3H, s, $COCH_3$), 3.52-3.71 (2H, m, H-5'), 3.94-3.96 (1H, m, H-4' e1. H-3'), 4.10-4.23 (1H, m, H-3' 或 H-4'), 4.94 (1H, m, H-2'), 5.11 (1H, d, J 4.4 Hz, 3'-OH), 5.24 (1H, d, J 6.1 Hz, 2'-OH), 5.56-5.59 (1H, m, 5'-OH), 6.76 (1H, d, J 6.5 Hz, H-1'), 7.87 (2H, s, NH_2), 8.21 (1H, s, H-2)。 ^{13}C NMR: (75 MHz, $DMSO-d_6$); δ 27.9 (CH_3), 62.3 (C-5'), 70.9/72.0 (C-2', C-3'), 86.3/89.3 (C-4', C-1'), 118.7 (C-5), 143.7/150.5/154.7/157.7 (C-6, C-8, C-2, C-4), 191.7 (CO)。

实施例 42

8-(1-羟基乙基)腺苷(17m)

在氩气下, 将 NaBH_4 (0.19 g, 5.05 mmol) 加入到 8-乙酰基腺苷(171) (0.78 g, 2.52 mmol) 在 THF (35 ml) 和 MeOH (4 ml) 中的溶液中并将该混合物在室温下搅拌 18 小时。通过滴加 1 M HCl 来对该混合物进行处理, 滴加至其为中性 pH 并将该混合物施加到闪柱色谱柱的顶端, 用 30% MeOH 的 CH_2Cl_2 溶液进行展开; 收率为 0.46 g (59%)。该产物是两种醇差向异构体比例为 1: 1 的混合物。

实施例 43

(R_p)-腺苷-3', 5'-环硫代磷酸 *O*-甲酯(19)

将腺苷(9) (0.106 g, 0.4 mmol) 在无水的 DMF (7 ml) 中的溶液加入到 (0.45 ml, 0.2 mmol) 0.5 M 四唑在乙腈中的溶液中并将该溶液在氩气气氛下加热至 60 °C。然后, 向其中缓慢加入二(*N,N*-二异丙基氨基)甲氧基膦(0.105 g, 0.4 mmol) 并使该反应混合物在这种温度下放置 15 分钟。将该反应混合物冷却至室温并向其中加入硫(0.013 g, 0.4 mmol)。将该混合物在室温下搅拌 8 小时。将该反应混合物在减压下蒸发至干燥。剩余下来的固体是比例为 2: 3 的 (R_p)-腺苷-3', 5'-环硫代磷酸以及其 (S_p)-异构体的混合物。在反相 C18-官能硅胶上用制备 HPLC 这些异构体进行分离。分离获得的标题化合物是 0.018 g (12%)。 ^{31}P NMR ($\text{DMSO}-d_6$): 66.4 ppm。 ^1H NMR: 3.83 (d, J 10 Hz, 3H, HMe) 4.2-5.0 (6H, m, H-2', H-3', H 4', H-5', OH), 6.14 (1H, s, H-1'), 8.34 (1H, s, H-2), 8.88 (1H, s, H-8)。

实施例 44

(R_p)-8-(2-噻吩基)腺苷-3', 5'-环硫代磷酸 *S*-甲基新戊酸酯(26)

将 (R_p)-8-(2-噻吩基)腺苷-3', 5'-环硫代磷酸铵盐(7b) (0.2 mmol) 溶解于甲醇 (5 ml) 中并向其中加入三乙胺 (0.3 mmol)。在真空下对该混合物进行蒸发, 得到 (R_p)-8-(2-噻吩基)腺苷-3', 5'-环硫代磷酸三乙基铵盐。将这种产物的一部分 (74 mg, 0.14 mmol) 和 NaI (20 mg, 0.11 mmol) 在氩气下溶解于 DMF (3 ml) 中, 向其中加入新戊酸氯甲酯

(20 mg, 0.11 mmol), 将该混合物在室温下搅拌 48 小时。在减压下蒸发掉溶剂并将残余物用硅胶闪柱色谱进行纯化, 用 $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ (开始 3:97, 然后 5:95) 进行洗脱; 得到 30 mg (40%) 白色固体。 $^1\text{H NMR}$ (CD_3OD , 200 MHz): δ 1.22 (9H, s), 4.5–4.8 (3H, m), 5.26 (1H, d), 5.45 (1H, d), 5.49 (1H, s), 5.57 (1H, d), 5.7–5.8 (1H, m), 6.11 (1H, s), 7.26 (1H, dd), 7.65 (1H, dd), 7.75 (1H, dd), 8.22 (1H, s)。 $^{31}\text{P NMR}$ (CDCl_3 , 81 MHz): δ 27.3。

实施例 45

(R_p)-和(S_p)-8-苯基腺苷-3', 5'-环硫代磷酸 S-甲基新戊酸酯 (27)

将其钠盐形式的(R_p)-和(S_p)-8-苯基腺苷-3', 5'-环硫代磷酸 (7e) 的 1:1 的非对映体混合物粗品 (150 mg, 0.34 mmol) 溶解于甲醇 (5 ml) 中, 向其中加入碘化钠 (51 mg, 0.34 mmol), 然后向其中加入新戊酸氯甲酯 (61 mg, 0.41 mmol)。将该反应混合物保留在氩气下并将其在回流下加热 6 小时。将该混合物在减压下蒸发至干燥并将该固体残余物用二氯甲烷萃取几次。收集该萃取物并将其蒸发, 得到一种呈褐色的固体 (142 mg)。从磷 NMR 可以看出该粗品是仅由比例为与 1:1 的标题化合物组成的。然后, 用硅胶闪柱色谱对该非对映异构体进行分离, 用 $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ 95:1 进行洗脱。

(R_p)-8-苯基腺苷-3', 5'-环硫代磷酸 S-甲基新戊酸酯 (27)

以 16% 的收率分离出所说的固体产物 (28 mg)。 $^{31}\text{P NMR}$ (CD_3OD): 27.5 ppm。 $^1\text{H NMR}$ (CD_3OD): δ 1.30 (9H, s), 3.01 (2H, q), 3.36 (2H, q), 5.28 (1H, d), 5.54 (1H, d), 5.60 (1H, d), 6.05 (1H, s), 7.2–7.5 (5H, m), 8.40 (1H, s)。

(S_p)-8-苯基腺苷-3', 5'-环硫代磷酸 S-甲基新戊酸酯 (27)

以 20% 的收率分离出所说的固体产物 (36 mg)。 $^{31}\text{P NMR}$ (CD_3OD): 24.0 ppm。 $^1\text{H NMR}$ (CD_3OD): δ 1.32 (9H, s), 2.89 (2H, q), 3.46 (2H, q), 5.13 (1H, d), 5.30 (1H, d), 5.40 (1H, d), 6.21 (1H, s), 7.2–7.5 (5H, m), 8.38 (1H, s)。

实施例 46

PKA I α 酶活性

在偶联的 Cook 比色测定中对 Rp-8-二价碳基化的 cAMPS 对 I α 型 PKA 酶活性的效力进行试验，将其与已知 Rp-8-Br-cAMPS 进行比较。结果如下面的表 1 所述：

表 1

化合物	效力
Rp 8-(2-咪喃基)-cAMPS	4.24
Rp 8-(2-噻吩基)-cAMPS	3.01
Rp 8-(3-咪喃基)-cAMPS	2.23
Rp 8-(3-噻吩基)-cAMPS	1.83
Rp 8-(苯基)-cAMPS	1.28
Rp 8-溴-cAMPS	1.00

实施例 47

8-溴腺苷-3', 5'-环磷酸 (1)

在搅拌的情况下，在室温下，在 1 小时内，向 cAMP (98.8 g, 0.30 mol) 和醋酸钠三水合物 (81.6 g, 0.60 mol) 在水 (1.5 l) 中的溶液中加入溴 (15.4 ml, 0.30 mol)。在 24 小时后，缓慢向其中加入亚硫酸钠直至其深红色消失。通过过滤收集沉淀，将该固体用水、异丙醇和乙醚进行洗涤，然后将其减压干燥。将该产物分散于水 (500 ml) 中并通过缓慢加入碳酸氢钠 (1 当量) 使其溶解。当所有的物质都被溶解时，向其中加入小份亚硫酸钠以除去该溶液的深红色。通过在强烈搅拌的情况下滴加 1.0 M 氢溴酸来使产物沉淀。收集这些沉淀，用水、异丙醇、乙醚进行洗涤，将亮黄色的粉末在高真空下进行干燥；收率为 92.0 g (76%)。¹HNMR 与文献一致。

实施例 48

(Sp)-8-溴腺苷-2' O-(叔-丁基二甲基甲硅烷基)-3', 5'-环 N-苯基氨基磷酸盐 (4)

将位于无水 THF (20 ml) 中的 DMF (0.289 g, 3.96 mmol) 放置在氩

气氛下并将其冷却至 0°C, 然后缓慢向其中加入位于二氯甲烷中的草酰氯 (2 ml, 2 M, 4 mmol)。除去冷却浴并将该混悬液在室温下搅拌 30 分钟, 将该反应混合物冷却至 -7°C 并将其加入到 8-溴腺苷-2'-O-TBDMS-3,5-环单磷酸三丁基铵 (1) (2.55 g, 3.60 mmol) 在无水二氯甲烷 (8 ml) 中的溶液中。将该混合物在这种温度下搅拌 1 小时, 使之达到室温并向其中加入无水 (CaH₂) 苯胺 (3.35 g, 36 mmol)。在 3 小时后, 将该混浊的反应混合物用二氯甲烷稀释至 100 ml 并用冰冷的饱和碳酸氢钠溶液对其进行洗涤 (3 × 25 ml)。然后, 将其有机相用 MgSO₄ 进行干燥, 在减压下除去溶剂, 在强烈搅拌的情况下将残余物缓慢加入到环己烷 (100 ml) 中。将沉淀干燥并用硅胶闪柱色谱对其进行纯化, 用 7% 甲醇的二氯甲烷溶液作为洗脱剂; 收率为 1.46 g (68%)。¹H NMR 与文献一致。

实施例 49

(Sp)-8-(5-甲基-2-咪喃基)腺苷-2'-O-(叔-丁基二甲基甲硅烷基)-3',5'-环 N-苯基氨基磷酸盐 (5e)

将已经进行了脱气的无水 DMF (6 ml)、醋酸钨 (0.0169 g, 0.07 mmol) 和三苯基膦 (0.041 g, 0.158 mmol) 一起在 50°C 下在氩气下加热至产生一种深红色的同质溶液 (约 15 分钟)。向其中加入 2-三丁基甲锡烷基-5-甲基咪喃 (0.904 mmol) 和 (Sp)-8-溴腺苷-2'-O-(叔-丁基二甲基甲硅烷基)-3',5'-环 N-苯基氨基磷酸盐 (0.450 g, 0.753 mmol) 并将该混合物在 80°C 下加热 4 小时。蒸馏掉溶剂, 将残余物溶解于二氯甲烷 (3 ml) 中并在强烈搅拌的情况下将该溶液加入到己烷 (50 ml) 中。将该沉淀用闪柱色谱进行纯化, 用 7% 甲醇的二氯甲烷溶液进行洗脱, 得到所说的产物, 收率: 0.405 g (90%)。HRMS (电喷射): (M+H) 599.2181。C₂₇H₃₅N₆O₆PSi+H 的计算值: 599.2197。³¹P NMR (CDCl₃, 81 MHz): ¹H NMR (DMSO-d₆, 300 MHz): δ -0.130 (3H, s, CH₃Si), -0.09 (3H, s, CH₃Si), 0.730 (9H, s, (CH₃)₃C), 2.40 (3H, s, CH₃-Fur), 4.3-4.7 (3H, m, H4' H5'), 5.21 (1H, d, J 5.2 Hz, H2'), 5.6-5.7 (1H, m, H3'), 6.30 (1H, s, H1'), 6.41 (1H, d, J_{PH} 3.3 Hz, NH), 6.9-7.2 (6H, m,

H-Ar), 8.23 (1H, s, H2), 7.52 (2H, br. s, NH₂), 8.54 (1H, d, *J* 9.4 Hz, H-Fur). ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz): δ -5.5, -5.0, 13.4, 17.7, 25.4, 68.3, 70.1, 72.2, 76.3, 93.5, 108.6, 115.0, 118.4, 118.5, 119.0, 128.8, 139.5, 140.5, 141.5, 149.8, 153.1, 154.8, 155.9

实施例 50

(*Sp*)-8-(5-甲氧基-2-咪喃基)腺苷-2'-*O*-(叔-丁基二甲基甲硅烷基)-3', 5'-环 *N*-苯基氨基磷酸盐 (5f)

将醋酸钨 (16.9 mg, 0.075 mmol) 和三苯基膦 (41.5 mg, 0.158 mmol) 在已经进行了脱气的无水 DMF (6 ml) 中的溶液在 50 °C 下在氩气下加热 15 分钟 (深红色), 然后向其中加入 2-(三丁基甲锡烷基)-5-甲氧基咪喃 (0.387 g, 1.00 mmol) 和 (*Sp*)-8-溴腺苷-2'-*O*-(叔-丁基二甲基甲硅烷基)-3', 5'-环 *N*-苯基氨基磷酸盐 (4) (0.450 g, 0.753 mmol)。将该混合物在 85 °C 下加热 4 小时。在真空下除去溶剂, 将残余物溶解于二氯甲烷 (3 ml) 中, 将该溶液缓慢加入到强烈进行着搅拌的己烷 (50 ml) 中并将沉淀出来的物质用二氧化硅闪柱色谱进行纯利, 用 7% 甲醇的二氯甲烷溶液进行洗脱; 收率为 310 mg (67%)。HRMS (电喷射): (M+H) 615.2118。C₂₇H₃₅N₆O₇PSi+H 的计算值: 615.2146。³¹P NMR (CDCl₃, 81 MHz): δ 3.05。¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz): δ -0.02 (1H, s, CH₃Si), 0.00 (3H, s, CH₃Si), 0.82 (9H, s, (CH₃)₃C), 3.96 (3H, s, CH₃O), 4.5-4.7 (3H, m, H4' H5'), 5.30 (1H, d, *J* 5.1 Hz, H2'), 5.40 (1H, d, *J*_{PH} 3.6 Hz, NH), 5.8-5.9 (1H, m, H3'), 6.32 (1H, s, H1'), 6.65 (2H, br. s, NH₂), 7.0-7.3 (6H, m, H-Ar), 7.68 (1H, d, *J* 9.4 Hz, H-Fur), 8.39 (1H, s, H2)。¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz): δ -5.4, -4.8, 18.0, 25.5, 58.1, 69.1, 70.6, 72.9, 82.6, 94.2, 116.7, 119.4, 119.6, 122.8, 129.1, 133.2, 138.7, 141.8, 150.2, 152.9, 155.3, 163.3, 174.0。

实施例 51

(*Sp*)-8-(5-(叔-丁基二甲基甲硅烷氧基甲基)-2-咪喃基)腺苷-2'-*O*-(叔-丁基二甲基甲硅烷基)-3', 5'-环 *N*-苯基氨基磷酸盐 (5g)

将醋酸钨(16.9 mg, 0.075 mmol)和三苯基膦(41.5 mg, 0.158 mmol)在已经进行了脱气的无水 DMF (6 ml) 中的溶液在 50°C 下在氩气下加热 15 分钟(深红色), 然后向其中加入 2-三丁基甲锡烷基-5-(叔-丁基二甲基甲硅烷氧基甲基)呋喃(0.478 g, 0.904 mmol)和 (*S_p*)-8-溴腺苷-2'-*O*-(叔-丁基二甲基甲硅烷基)-3', 5'-环 *N*-苯基氨基磷酸盐 (4) (0.450 g, 0.753 mmol)。将该混合物在 85 °C 下加热 4 小时。在真空下除去溶剂, 将残余物溶解于二氯甲烷 (3 ml) 中, 将该溶液缓慢加入到强烈进行着搅拌的己烷 (50 ml) 中并将沉淀出来的物质用硅胶闪柱色谱进行处理, 用 7% 甲醇的二氯甲烷溶液进行洗脱; 收率为 461mg (84%)。HRMS (电喷射): (M+H) 729.3001。C₃₃H₄₉N₆O₇PSi₂+H 的计算值: 729.3011。³¹P NMR (CDCl₃, 81 MHz): δ 3.05。¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz): δ -0.01 (3H, s, CH₃SiOCH), 0.00 (3H, s, CH₃SiOCH), 0.17 (6H, s, CH₃SiOCH₂), 0.81 (9H, s, (CH₃)₃CSiOCH), 0.98 (9H, s, (CH₃)₃CSiOCH₂), 4.5-4.7 (3H, m, H4' H5'), 4.78 (2H, s, OCH₂Fur), 5.31 (1H, d, *J* 5.2 Hz, H2'), 5.8-5.9 (1H, m, H3'), 6.40 (1H, s, H1'), 6.47 (1H, d, *J_{PH}* 3.4 Hz, NH), 6.61 (2H, br. s, NH₂), 7.1-7.3 (6H, m, H-Ar), 7.63 (1H, d, *J* 9.4 Hz, H-Fu), 8.42 (1H, s, H2)。¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz): δ -5.3, -4.7, 18.0, 18.3, 25.6, 25.8, 58.2, 69.1, 70.7, 72.8, 94.2, 109.1, 115.1, 119.5, 119.7, 122.8, 129.2, 138.7, 141.8, 142.5, 150.2, 153.3, 155.6, 157.6。

实施例 52

(*S_p*)-8-(2-苯并呋喃基)腺苷-2'-*O*-(叔-丁基二甲基甲硅烷基)-3', 5'-环 *N*-苯基氨基磷酸盐 (phosphoroamidate) (5h)

将醋酸钨(16.9 mg, 0.075 mmol)和三苯基膦(41.5 mg, 0.158 mmol)在已经进行了脱气的无水 DMF (6 ml) 中的溶液在 50 °C 下在氩气下加热 15 分钟(深红色), 然后向其中加入 2-(三丁基甲锡烷基)苯并呋喃(0.381 g, 0.936 mmol)和 (*S_p*)-8-溴腺苷-2'-*O*-(叔-丁基二甲基甲硅烷基)-3', 5'-环 *N*-苯基氨基磷酸盐 (4) (0.450 g, 0.753 mmol)。将该混合物在 85 °C 下加热 4 小时。在真空下除去溶剂, 将残余物溶解于二

氯甲烷 (3 ml) 并将该溶液缓慢加入到强烈进行着搅拌的己烷 (50 ml) 中。将沉淀用硅胶闪柱色谱进行处理, 用 7% 甲醇的二氯甲烷溶液进行洗脱; 收率: 439 mg (92%)。HRMS (电喷射): (M+H) 635.2171。 $C_{30}H_{35}N_6O_6PSi+H$ 的计算值: 635.2197。 ^{31}P NMR ($CDCl_3$, 81 MHz): δ 3.05。 1H NMR ($CDCl_3$, 200 MHz): δ 0.00 (3H, s, CH_3Si), 0.03 (3H, s, CH_3Si), 0.83 (9H, s, $(CH_3)_3C$), 4.4–4.8 (3H, m, $H4'$ $H5'$), 5.38 (1H, d, J 5.0 Hz, $H2'$), 5.9–6.1 (1H, m, $H3'$), 6.58 (1H, s, $H1'$), 6.61 (1H, br. s, NH), 7.0–7.8 (12H, m, H-Ar, NH_2), 8.46 (1H, s, H2)。 ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz): δ -5.3, -4.7, 18.1, 25.6, 68.8, 70.8, 73.0, 73.1, 94.3, 110.5, 111.8, 119.5, 119.7, 122.0, 123.0, 123.9, 126.4, 127.4, 129.2, 138.6, 141.7, 144.7, 150.5, 153.8, 155.4, 155.8。

实施例 53

(S_p)-8-(2-*N*-甲基吡咯基)腺苷-2'-*O*-(叔-丁基二甲基甲硅烷基)-3', 5'-环 *N*-苯基氨基磷酸盐 (5i)

将 $Pd(OAc)_2$ (37 mg, 0.166 mmol) 和 PPh_3 (91 mg, 0.348 mmol) 在 DMF (5 ml) 中的混合物在 50 °C 下搅拌至该溶液变成深红色。向其中加入位于 DMF (2 ml) 中的 (S_p)-8-溴腺苷-2'-*O*-(叔-丁基二甲基甲硅烷基)-3', 5'-环 *N*-苯基-氨基磷酸酯 (4) (0.500 g, 0.83 mmol) 和 2-(三丁基甲锡烷基)-*N*-甲基-2-吡咯 (0.461 g, 1.24 mmol)。将该反应混合物在 90 °C 下搅拌 4 小时。在减压下除去 DMF 并将残余物用硅胶闪柱色谱进行纯化, 用 7.5% MeOH 的 CH_2Cl_2 溶液进行洗脱。该产物是一种具有痕量有机锡残余物的白色固体, 通过将产物溶解于 CH_2Cl_2 中并用己烷使其重新沉淀来除去该痕量的污染物; 收率为 0.350 g (70%); HRMS (电喷射): M+H 598.2339。 $C_{27}H_{36}N_7O_5PSi+H$ 计算值: 598.2357。 1H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz): δ -0.13 (6H, s, $2 \times CH_3$), 0.66 (9H, s, $C(CH_3)_3$), 3.73 (3H, s, *N*- CH_3), 4.35–4.41 (1H, m, $H-4'$), 4.50–4.66 (2H, m, $O-CH_2$), 5.06 (1H, d, J 5.3, $H-2'$), 5.80–5.85 (1H, m, $H-3'$), 5.99 (1H, s, $H-1'$), 6.19–6.21 (1H, m, H-pyr.), 6.57–6.59 (1H, m, H-pyr),

6.65 (2H, bs, NH₂), 6.76–6.78 (1H, m, H-pyr), 6.95 (1H, t, *J* 7.3 Hz, H-Ph), 7.05 (2H, d, *J* 7.6 Hz, 2 × H-Ph), 7.17 (2H, t, *J* 7.9 Hz, 2 × H-Ph), 7.83 (1H, d, *J* 9.5 Hz, NH), 8.31 (1H, s, H-2);)。 ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz): δ -5.5 和 -4.9 (2 × CH₃), 17.9 (Si-C), 25.5 (3 × CH₃), 36.3 (N-CH₃), 68.9 (d, *J* 6.6 Hz, OCH₂), 70.5 (d, *J* 4.0 Hz, CH-4'), 72.8 (d, *J* 8.5 Hz, CH-2'), 77.5 (d, *J* 3.7 Hz, CH-3'), 94.2 (CH-1'), 108.4, 114.2, 119.4, 119.9, 119.9, 122.7, 126.8, 129.2, 129.2, 138.6, 144.2, 149.8, 152.9, 155.5, 162.5。

实施例 54

(S_P)-8-(3-吡啶基)腺苷-2'-O-(叔-丁基二甲基甲硅烷基)-3',5'-环 *N*-苯基氨基磷酸盐 (5j)

将 Pd(OAc)₂ (37mg, 0.166 mmol) 和 PPh₃ (91mg, 0.348 mmol) 在 NMP (4 ml) 中的混合物在 50 °C 下搅拌至该溶液变成深红色。向其中加入 (S_P)-8-溴腺苷-2'-O-(叔-丁基二甲基甲硅烷基)-3',5'-环 *N*-苯基氨基磷酸盐 (4) (0.500 g, 0.83 mmol) 在 NMP (2 ml) 和 3-(三丁基甲锡烷基)吡啶 (0.610 g, 1.66 mmol) 中的溶液。将该反应混合物在 110 °C 下搅拌 10 小时, 然后在减压下除去 NMP 并将残余物用硅胶闪柱色谱进行纯化, 用 7.5% MeOH 的 CH₂Cl₂ 溶液进行洗脱。该产物是一种具有痕量有机锡残余物的白色固体, 通过将该偶合产物溶解于 CH₂Cl₂ 中并用己烷使其重新沉淀来除去该痕量的污染物; 收率为 0.280 g (57%); HRMS (电喷射): M+H 596.2211。C₂₇H₃₄N₇O₅PSi+H 的计算值: 596.2201。 ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ (CDCl₃) -0.16 (3H, s, CH₃), -0.15 (3H, s, CH₃), 0.60 (9H, s, C(CH₃)₃), 4.30–4.43 (1H, m, H-4'), 4.60–4.68 (2H, m, OCH₂), 5.15 (1H, d, *J* 5.2 Hz, H-2'), 5.69 (1H, s, H-1'), 5.75–5.82 (1H, m, H-3'), 6.37 (2H, bs, NH₂), 6.58 (1H, d, *J* 9.2 Hz, NH), 6.99–7.10 (3H, m, 3 × H-Ph), 7.17–7.24 (2H, t, *J* 7.4 Hz, 2 × H-Ph), 7.42–7.48 (1H, m, H-pyr), 8.02–8.06 (1H, m, H-pyr), 8.37 (1H, s, H-2), 8.76–8.79 (1H, m, H-pyr), 8.97 (1H, d, *J* 1.7 Hz, H-pyr); ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz): δ -5.5 和 -4.8 (2 × CH₃),

18.0 (Si-C), 25.4 ($3 \times \text{CH}_3$), 68.9 (d, J 6.8 Hz, OCH_2), 71.3 (d, J 4.5 Hz, CH-4'), 73.3 (d, J 8.8 Hz, CH-2'), 77.5 (d, J 3.8 Hz, CH-3'), 94.2 (CH-1'), 119.4, 119.5, 119.6, 122.9, 123.5, 125.0, 129.1, 129.1, 136.8, 138.5, 148.1, 149.8, 150.3, 151.4, 153.5, 155.9.

实施例 55

(*S_p*)-8-(苯基)腺苷-2'-*O*-(叔-丁基二甲基甲硅烷基)-3',5'-环-N-苯基氨基磷酸盐 (5k)

将 $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (37 mg, 0.166 mmol) 和 PPh_3 (91 mg, 0.348 mmol) 在 DMF (4 ml) 中的混合物在 50 °C 下搅拌至该溶液变成深红色。向其中加入 (*R_p*)-8-溴腺苷-2'-*O*-(叔-丁基二甲基甲硅烷基)-3',5'-环-N-苯基氨基磷酸盐 (4) (0.500 g, 0.83 mmol) 在 NMP (2 ml) 中的溶液和苯基三丁基氯化锡 (0.609 g, 1.66 mmol)。将该反应混合物在 135 °C 下搅拌 7 小时, 然后在减压下除去 NMP 并将残余物用硅胶闪柱色谱进行纯化, 用 7.5% MeOH 的 CH_2Cl_2 溶液进行洗脱。该产物是一种具有痕量有机锡残余物的固体, 通过将产物溶解于 CH_2Cl_2 中并用己烷使其重新沉淀来除去该痕量的污染物; 收率为 0.310 g (63%); HRMS (电喷射): $M+H$ 595.2275。 $\text{C}_{28}\text{H}_{35}\text{N}_6\text{O}_5\text{PSi}+H$ 的计算值: 595.2248。 $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz): δ -0.21 (6H, s, $2 \times \text{CH}_3$), 0.57 (9H, s, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 4.32-4.36 (1H, m, H-4'), 4.52-4.63 (2H, m, OCH_2), 4.99 (1H, d, J 5.1 Hz, H-2'), 5.75 (1H, s, H-1'), 5.76-5.83 (1H, m, H-3'), 6.35 (2H, bs, NH_2), 6.93 (1H, t, J 7.3 Hz, H-Ph), 7.03 (2H, d, J 8.0 Hz, $2 \times$ H-Ph), 7.16 (2H, t, J 7.9 Hz, $2 \times$ H-Ph), 7.33 (1H, d, J 9.4 Hz, NH), 7.51-7.54 (3H, m, H-Ph), 7.63 (2H, d, J 7.7 Hz, H-Ph), 8.26 (1H, s, H-2); $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz): δ -5.8 和 -5.0 ($2 \times \text{CH}_3$), 17.7 (Si-C), 25.2 ($3 \times \text{CH}_3$), 68.9 (d, J 6.7 Hz, OCH_2), 70.5 (d, J 4.2 Hz, CH-4'), 72.8 (d, J 8.6 Hz, CH-2'), 76.9 (d, J 3.8 Hz, CH-3'), 94.1 (CH-1'), 118.7, 119.1, 119.1, 119.2, 119.2, 122.8, 127.9, 128.9, 128.9, 129.2, 129.2, 130.8, 138.3, 150.1, 151.2, 152.9, 155.2.

实施例 56

(*S_p*)-8-(4-甲氧基苯基)腺苷-2'-*O*-(叔-丁基二甲基甲硅烷基)-3',5'-环 *N*-苯基氨基磷酸盐 (51)

将 Pd(OAc)₂ (37 mg, 0.166 mmol) 和 PPh₃ (91 mg, 0.348 mmol) 在 DMF (4 ml) 中的混合物在 50 °C 下搅拌至该溶液变成深红色。向其中加入 (*S_p*)-8-溴腺苷-2'-*O*-(叔-丁基二甲基甲硅烷基)-3',5'-环 *N*-苯基氨基磷酸盐 (4) (0.500 g, 0.83 mmol) 在 NMP (2 ml) 中的溶液和 4-(三丁基甲锡烷基)茴香醚 (0.666 g, 1.66 mmol)。将该反应混合物在 120-125 °C 下搅拌 10 小时, 然后在减压下除去 NMP。将该残余物用硅胶闪柱色谱进行处理, 用 7.5% MeOH 的 CH₂Cl₂ 溶液进行洗脱。该产物是一种具有痕量有机锡残余物的白色固体, 通过将该产品溶解于 CH₂Cl₂ 中并用己烷使其重新沉淀来除去该痕量的残余物; 收率为 0.315 g (61%); HRMS (电喷射): M+H 625.2368。C₂₉H₃₇N₆O₆PSi+H 计算值: 625.2354。¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ -0.15 (3H, s, CH₃), -0.14 (3H, s, CH₃), 0.62 (9H, s, C(CH₃)₃), 3.85 (3H, s, OCH₃), 4.32-4.37 (1H, m, H-4'), 4.55-4.69 (2H, m, OCH₂), 5.07 (1H, d, *J* 5.3 Hz, H-2'), 5.78 (1H, s, H-1'), 5.79-5.88 (1H, m, H-3'), 6.20 (2H, bs, NH₂), 6.90 (1H, d, *J* 9.3 Hz, NH), 6.94-7.08 (5H, m, 5 × H-Ph), 7.19 (2H, t, *J* 7.4 Hz, 2 × H-Ph), 7.62 (2H, d, *J* 6.9 Hz, 2 × H-Ph), 8.35 (1H, s, H-2); ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz): δ -5.4 和 -4.7 (2 × CH₃), 18.0 (Si-C), 25.5 (3 × CH₃), 55.4 (OCH₃), 69.0 (d, *J* 6.9 Hz, OCH₂), 70.7 (d, *J* 4.2 Hz, CH-4'), 72.8 (d, *J* 8.6 Hz, CH-2'), 76.9 (d, *J* 3.8 Hz, CH-3'), 94.3 (CH-1'), 114.5, 114.5, 119.3, 119.5, 119.5, 119.6, 119.6, 120.7, 123.0, 129.2, 129.2, 130.9, 130.9, 138.4, 150.4, 151.5, 152.8, 155.2, 161.5。

实施例 57

(*S_p*)-8-(2-噻唑基)腺苷-2'-*O*-(叔-丁基二甲基甲硅烷基)-3',5'-环 *N*-苯基氨基磷酸盐 (5m)

将 Pd(OAc)₂ (27 mg, 0.10 mmol) 和 PPh₃ (62 mg, 0.20 mmol) 在 DMF (5 ml) 中的溶液在 50 °C 下搅拌 30 分钟, 然后向其中加入 2-(三丁基甲锡

烷基)噻唑(260 mg, 0.70 mmol), 然后再向其中加入(*S_p*)-8-溴腺苷-2'-*O*-(叔-丁基二甲基甲硅烷基)-3', 5'-环 *N*-苯基氨基磷酸盐(4)(340 mg, 0.58 mmol)。将该混合物搅拌在 85 °C 下搅拌 3 小时。蒸发掉溶剂并将残余物用硅胶闪柱色谱进行纯化, 用 CH₂Cl₂:MeOH 3:97 和 5:9 进行洗脱, 收率: 160 mg (47%) 黄褐色固体。MS(电喷射) 602.2; ³¹P NMR(CDCl₃, 81 MHz): δ 2.71; ¹H NMR(CDCl₃, 200 MHz): δ -0.04(6H, s, SiMe), 0.75(9H, s, Si-*t*Bu), 4.44-4.77(3H, m, 5.42(d, *J* 5.1 Hz), 5.77-5.85(1H, m), 5.96(1H, s), 6.44(2H, br. s, NH₂), 6.96-7.35(6H, m), 8.40(1H, s), 8.47(1H, s), 9.06(1H, s,)。

实施例 58

(*R_p*)-8-(2-噻唑基)腺苷-3', 5'-环硫代磷酸铵盐(7m)

在室温下, 将 1.0 M 叔-*BuOK* 在 THF (0.29 ml, 0.29 mmol) 中的溶液加入到 (*S_p*)-8-(2-噻唑基)腺苷-2'-*O*-(叔-丁基二甲基甲硅烷基)-3', 5'-环 *N*-苯基-氨基磷酸酯(5m) (136 mg, 0.23 mmol) 在 THF (3 ml) 中的溶液中。将该混合物搅拌 1 小时, 然后向其中加入二硫化碳 (0.04 ml, 0.7 mmol)。将该混合物在室温下再搅拌 3 小时。将溶剂的体积降至约 1 ml, 然后向其中加入己烷 (30 ml)。形成沉淀, 将其滤出。将该粗品溶解于 DMF (2 ml) 中, 向其中加入 NH₄F (52 mg, 1.4 mmol) 并将该混合物在氩气下在 40 °C 下搅拌 48 小时。蒸发掉溶剂并将该产物粗品用硅胶闪柱色谱进行纯化, 用 *i*PrOH:EtOAc:H₂O:NH₃(aq) 7:7:1:1 进行洗脱; 得到 54 mg (53%) 白色固体。HRMS(电喷射) M 427.0047。C₁₃H₁₂N₆O₅PS₂ 的计算值: 427.0048。³¹P NMR(DMSO-*d*₆, 81 MHz): δ 54.02; ¹H NMR(DMSO-*d*₆, 200 MHz): δ 3.95-4.15(3H, m), 4.92-5.12(2H, m), 6.60-7.30(4H, br. s), 7.50(2H, s,), 8.22(1H, s), 8.34(1H, s), 9.36(1H, d, *J* 0.5 Hz)。

实施例 59

(*R_p*)-8-(5-甲基-2-咪喃基)腺苷-3', 5'-环硫代磷酸三丁基铵盐(8e)

在氩气下,将 1 M 叔-丁醇钠 (0.60 ml) 加入到 (*Sp*)-8-(5-甲基-2-咪喃基)-腺苷-2'-*O*-(叔-丁基二甲基甲硅烷基)-3',5'-环 *N*-苯基氨基磷酸盐 (5e) (0.350 g, 0.552 mmol) 在无水的 THF (7 ml) 中的溶液中。将该混合物搅拌 30 分钟,然后向其中加入二硫化碳 (0.126 g, 1.66 mmol) 并将其继续搅拌 3 小时。将该反应混合物缓慢加入到己烷中,将沉淀滤出并将其溶解于水 (10 ml) 中。在强烈搅拌的情况下,向用冰冷却的该反应混合物中滴加 1 M HCl 直至其 pH 为 3。将沉淀出来的硫代酸 6e 滤出,用冷水洗涤并在高真空下对其进行干燥;得到 0.270 g 黄色固体。然后,将该酸 (6e) 在氩气下溶解于 DMF (3 ml) 中并向其中加入氯化铵 (0.056 g, 1.5 mmol)。将该混合物搅拌在 40 °C 下搅拌 3 天,这时,向其中加入过量的三丁胺。在减压下蒸馏掉所有的挥发性物质并将残余物用硅胶闪柱色谱进行纯化,用 1% 三丁胺和 5% 甲醇的二氯甲烷溶液进行洗脱。该硫代酸盐产物包含一些游离三丁胺,可以通过重复用己烷进行洗涤来除去这些三乙胺;收率: 0.276 g (82%)。HRMS (电喷射): M 424.0488。C₁₅H₁₅N₅O₆PS⁻ 的计算值: 424.0487。³¹P NMR (CDCl₃, 81 MHz): δ 57.0。¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz): δ 1.00 (9H, t, J 7.2 Hz, CH₂CH₃), 1.3-1.5 (6H, m, CH₂), 1.7-1.9 (6H, m, CH₂), 2.44 (3H, s, CH₃Fur), 3.05 (6H, t, J 6.5 Hz, NCH₂), 4.4-4.6 (3H, m, H4' H5'), 5.24 (1H, d, J 4.8 Hz, H2'), 5.5-5.6 (1H, m, H3'), 6.20-6.24 (4H, m, H1' H-Fur NH₂), 7.06 (1H, d, J 3.3 Hz, H-Fu), 8.24 (1H, s, H2)。¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz): δ 13.4, 19.7, 24.9, 30.6, 51.7, 67.0, 71.1, 71.2, 71.5, 92.2, 108.1, 115.2, 119.0, 140.7, 142.4, 149.9, 152.0, 154.8, 155.3。

实施例 60

(*Rp*)-8-(5-甲氧基-2-咪喃基)腺苷-3',5'-环硫代磷酸三丁基铵盐 (8f)

在氩气下,将 1 M 叔-丁醇钠 (0.50 ml) 加入到 (*Sp*)-8-(5-甲氧基-2-咪喃基)-腺苷-2'-*O*-(叔-丁基二甲基甲硅烷基)-3',5'-环 *N*-苯基氨基磷酸盐 (5f) (0.280 g, 0.456 mmol) 在无水的 THF (6 ml) 中的溶液中。

将该混合物搅拌 30 分钟,然后向其中加入二硫化碳(0.104 g, 1.3 mmol)并将其继续搅拌 3 小时。将该反应混合物缓慢加入到己烷中,将沉淀滤出并将其溶解于水(10 ml)中。在强烈搅拌的情况下,向用冰冷却的该反应混合物中滴加 1 M HCl 直至其 pH 为 3。将沉淀出来的硫代酸 6f 滤出,用冷水进行洗涤并在高真空下对其进行干燥;得到 0.127 g 褐色固体。将该硫代酸 6f 在氩气下溶解于无水 DMF(2 ml)中并向其中加入氟化铵(0.037 g, 1 mmol)。将该混合物在 40 °C 下搅拌 3 天,然后向其中加入过量的三丁胺。减压蒸发除去所有的挥发性物质。将该残余物用硅胶闪柱色谱进行处理,用 1% 三丁胺和 5% 甲醇的二氯甲烷溶液进行洗脱。通过用己烷重复洗涤来除去存在于该硫代酸盐中的游离三丁胺;收率: 0.109 g (29%)。HRMS (电喷射): M 440.0427。C₁₅H₁₅N₅O₇PS⁻的计算值: 440.0436。³¹P NMR (CDCl₃, 81 MHz): δ 57.0。¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz): δ 0.99 (9H, t, J 7.2 Hz, CH₂CH₃), 1.3-1.5 (6H, m, CH₂), 1.7-1.9 (m, 6H, CH₂), 3.05 (t, J 6.5 Hz, 6H, NCH₂), 3.89 (3H, s, CH₃O), 4.3-4.5 (3H, m, H4' H5'), 5.24 (1H, d, J 5.2 Hz, H2'), 5.6-5.7 (1H, m, H3'), 6.21 (1H, s, H1'), 6.41 (2H, br. s, NH₂), 6.89 (1H, d, J 8.4 Hz, H-Fur), 7.66 (1H, d, J 8.6 Hz, H-Fur), 8.35 (1H, s, H2)。¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz): δ 13.3, 19.8, 24.8, 51.6, 69.2, 70.6, 72.8, 76.4, 83.0, 94.2, 116.9, 119.4, 132.7, 138.7, 150.0, 152.8, 155.1, 163.3。

实施例 61

(Rp)-8-(2-羟基甲基-5-咪喃基)腺苷-3', 5'-环硫代磷酸三丁基铵盐 (8g)

在氩气下,将 1 M 叔-丁醇钠(0.62 ml)加入到 (Sp)-8-(5-叔-丁基二甲基甲硅烷氧基甲基)-2-咪喃基)腺苷-2' O-(叔-丁基二甲基甲硅烷基)-3', 5'-环 N-苄基氨基磷酸盐 (5g) (0.410 g, 0.563 mmol) 在无水 THF (7 ml) 中的溶液中。将该混合物搅拌 30 分钟,然后向其中加入二硫化碳(0.128 g, 1.69 mmol)。将该反应混合物搅拌 3 小时,然后将其滴加到己烷中。将所形成的沉淀重新溶解于水中。缓慢向用冰冷

却着的强烈进行着搅拌的该水溶液中加入 1 M HCl 直至其 pH 为 3, 硫代酸 6g 沉淀出来, 将其滤出, 用冷水洗涤并将其在高真空下进行干燥, 从而得到褐色固体形式的硫代酸 (0.294 g)。将该产物在氩气下重新溶解于无水 DMF (3 ml) 中并向其中加入氟化铵 (0.097 g, 2.63 mmol)。将该混合物在 40 °C 下搅拌 3 天, 然后向其中加入过量的三丁胺。减压蒸馏除去虽有的挥发性物质并将残余物用硅胶闪柱色谱进行处理, 用 1% 三丁胺和 5% 甲醇的二氯甲烷溶液进行洗脱。获得包含一些游离三丁胺的产物, 通过用己烷重复洗涤来除去该游离的三丁胺; 收率为 0.243 g (69%)。HRMS (电喷射): M 440.043。C₁₅H₁₅N₅O₇PS⁻ 的计算值: 440.0436。³¹P NMR (CDCl₃, 81 MHz): δ 57.0。¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz): δ 1.00 (9H, t, J 7.1 Hz, CH₂CH₃), 1.3-1.5 (6H, m, CH₂), 1.7-1.9 (6H, m, CH₂), 2.9-3.1 (6H, m, NCH₂), 4.4-4.6 (3H, m, H4' H5'), 4.85 (2H, s, HOCH₂Fur), 5.26 (1H, d, J 5.0 Hz, H2'), 5.5-5.6 (1H, m, H3'), 6.2-6.3 (4H, m, H1' H-Fur NH₂), 7.12 (1H, d, J 8.3 Hz, H-Fur), 8.22 (1H, s, H2)。¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz): δ: 13.4, 19.7, 24.9, 57.2, 51.7, 67.7, 71.1, 72.6, 75.9, 94.3, 108.8, 115.5, 119.1, 141.2, 149.5, 141.6, 150.2, 153.7, 155.2。

实施例 62

(Rp)-8-(2-苯并咪唑基)腺苷-3', 5'-环硫代磷酸三丁基铵盐 (8h)
在氩气下, 将 1 M 叔-丁醇钠 (0.69 ml) 加入到 (Sp)-8-(2-苯并咪唑基)-腺苷-2' O-(叔-丁基二甲基甲硅烷基)-3', 5'-环 N-苯基氨基磷酸盐 (5h) (0.400 g, 0.631 mmol) 在无水 THF (8 ml) 中的溶液中。将该混合物搅拌 30 分钟, 然后向其中加入二硫化碳 (0.143 g, 1.89 mmol) 并将其继续搅拌 3 小时。将该反应混合物缓慢加入到己烷中, 将沉淀滤出并将其溶解于水 (4 ml) 中。向该用冰进行着冷却的强烈进行着搅拌的该水溶液中缓慢加入 1 M HCl 直至其 pH 为 3, 硫代酸 6h 沉淀出来, 将其滤出, 用冷水洗涤并在高真空下对其进行干燥, 得到一种褐色固体 (0.221 g)。将该产物在氩气下重新溶解于无水 DMF (2 ml) 中并向其中加入氟化铵 (0.043 g, 1.1 mmol)。将该混合物在 40 °C 下搅拌

3 天并向其中加入过量的三丁胺。通过在减压下蒸馏来除去挥发性物质并将残余物用硅胶闪柱色谱进行纯化,用 1% 三丁胺和 5% 甲醇的二氯甲烷溶液进行洗脱。用己烷重复对该产物进行洗涤以除去游离三丁胺;收率为 0.155 g (38%)。HRMS (电喷射): M 460.0461。C₁₈H₁₅N₅O₆PS⁻ 的计算值: 460.0487。³¹P NMR (CDCl₃, 81 MHz): δ 57.0。¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz): δ 1.00 (9H, t, J 7.2 Hz, CH₂CH₃), 1.3-1.5 (6H, m, CH₂), 1.7-1.9 (6H, m, CH₂), 3.08 (6H, t, J 6.4 Hz, NCH₂), 4.4-4.6 (3H, m, H4' H5'), 5.33 (1H, d, J 5.2 Hz, H2'), 5.9-6.1 (1H, m, H3'), 6.43 (1H, s, H1'), 7.3-7.7 (5H, m, H-Ar), 8.31 (1H, s, H2)。¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz): δ 13.4, 19.8, 24.8, 51.6, 66.3, 72.4, 72.8, 75.5, 94.6, 111.8, 112.6, 120.0, 123.7, 124.3, 127.0, 128.3, 126.4, 149.9, 153.1, 154.2, 154.4, 155.8

实施例 63

(R_p)-8-(2-*N*-甲基吡咯基)腺苷-3',5'-环硫代磷酸三丁基铵盐 (8i)

将位于无水 THF (6 ml) 中的 (S_p)-8-(2-*N*-甲基吡咯基)腺苷-2'-*O*-(叔-丁基二甲基甲硅烷基)-3',5'-环 *N*-苄基-氨基磷酸酯 (5i) (0.300 g, 0.5 mmol) 和叔-丁醇钾 (0.62 ml, 0.62 mmol, 1 M THF 溶液) 的混合物在氩气下在室温下搅拌 1 小时,然后向其中加入二硫化碳 (0.09 ml, 1.5 mmol)。反应混合物在室温下搅拌 3 小时,然后,在减压下蒸馏掉大部分溶剂。向其中加入乙醚,得到一种固体沉淀,将其溶解于水 (9 ml) 中并在 0 °C 下向其中加入 1.2 M HCl (1.25 ml)。该沉淀是硅烷化 (R_p)-8-(2-*N*-甲基吡咯基)腺苷-3',5'-环硫代磷酸 6i。将该产物在真空下充分干燥,然后将该固体 (0.170 g, 0.3 mmol) 在氩气下溶解于 DMF (1.5 ml) 中并向其中加入氟化铵 (0.075 g, 2.0 mmol)。将该反应混合物在室温下搅拌 5 天,然后向其中加入三丁胺 (0.111 g, 0.6 mmol) 来产生一种澄清的溶液。在减压下除去挥发性物质,将该残余物用己烷进行研磨以除去任何三丁胺并将残余物用硅胶闪柱色谱进行纯化,用 CH₂Cl₂:CH₃OH:NBu₃ 100:10:1 进行洗脱。通过

将其溶解于 CH_2Cl_2 中并用己烷进行沉淀来对该包含一些游离三丁胺的铵盐进一步进行纯化；得到 0.105 g (34%，由 5i 来进行计算) 白色固体。HRMS (电喷射): M-NHBU_3 423.0647。 $\text{C}_{27}\text{H}_{44}\text{N}_7\text{O}_5\text{PS-NH}(\text{C}_4\text{H}_9)_3$ 的计算值: 423.0646。 $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz, CH_3OD): δ 0.93 (9H, t, J 7.3 Hz, $3 \times \text{CH}_3$), 1.29–1.41 (6H, m, $3 \times \text{CH}_2$), 1.55–1.65 (6H, m, $3 \times \text{CH}_2$), 2.98–3.04 (6H, m, $3 \times \text{CH}_2$), 3.78 (3H, s, $N\text{-CH}_3$), 4.12–4.24 (1H, m, H-4'), 4.25–4.30 (2H, m, OCH_2), 4.96 (1H, d, J 5.3 Hz, H-2'), 5.49–5.57 (1H, m, H-3'), 5.94 (1H, s, H-1'), 6.25–6.28 (1H, m, H-pyr), 6.60–6.62 (1H, m, H-pyr), 6.93–6.95 (1H, m, H-pyr), 8.13 (1H, s, H-2)。 $^{13}\text{C NMR}$ (CH_3OD , 75 MHz): δ 13.9 ($3 \times \text{CH}_3$), 20.9 ($3 \times \text{CH}_2$), 26.9 ($3 \times \text{CH}_2$), 35.7 ($N\text{-CH}_3$), 54.0 ($3 \times \text{CH}_2$), 68.5 (d, J 9.8 Hz, OCH_2), 72.8 (d, J 7.6 Hz, CH-4'), 73.1 (d, J 5.7 Hz, CH-2'), 77.7 (d, J 6.6 Hz, CH-3'), 94.2 (CH-1'), 109.4, 120.1, 121.1, 128.4, 146.3, 151.2, 153.6, 156.8。

实施例 64

(R_p)-8-(3-吡啶基)腺苷-3', 5'-环-硫代磷酸三丁基铵盐 (8j)

将 (S_p)-8-(3-吡啶基)腺苷-2'-*O*-(叔-丁基二甲基甲硅烷基)-3', 5'-环 N -苯基氨基磷酸盐 (5j) (0.300 g, 0.5 mmol) 和叔-丁醇钾 (0.62 ml, 0.62 mmol, 1 M in THF) 在 THF (6 ml) 中的混合物在氩气下在室温下搅拌 1 小时，然后向其中加入二硫化碳 (0.09 ml, 1.5 mmol)。将该反应混合物在室温下搅拌 3 小时。在减压下部分除去溶剂并向其中加入己烷直至其完全沉淀。将该沉淀重新溶解于水 (9 ml) 中并在 0 °C 下向其中加入 1.2 M HCl (1.25 ml)。通过过滤收集沉淀出来的硅烷化 (R_p)-8-(3-吡啶基)腺苷-3', 5'-环硫代磷酸 6j 并将其在高真空下干燥一整夜。在氩气下，使这种物质的大部分 (0.180 g, 0.33 mmol) 溶解于无水 DMF (1.5 ml) 中并向其中加入氟化铵 (0.075 g, 2 mmol)。将该混合物在室温下搅拌 5 天并对其进行过滤。向滤液中加入三丁胺 (0.111 g, 0.6 mmol)，然后将其减压蒸发。将残余物用己烷进行研磨以除去过量的三丁胺并将其用硅胶闪柱色谱进行处理，用

CH₂Cl₂: CH₃OH: NBU₃ 100: 10: 1 进行洗脱。通过溶解于 CH₂Cl₂ 中并通过加入乙醚使其重新沉淀来对将该包含痕量三丁胺的铵盐进一步进行纯化; 得到 0.100 g (34%, 由 5j 来进行计算) 白色固体。HRMS (电喷射): M-NHBU₃ 421.0492。C₂₇H₄₂N₇O₅PS-NH(C₄H₉)₃ 的计算值: 421.0489。¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ 0.93 (9H, t, *J* 7.2 Hz, 3 × CH₃), 1.29–1.43 (6H, m, 3 × CH₂), 1.67–1.79 (6H, m, 3 × CH₂), 2.98–3.06 (6H, m, 3 × CH₂), 4.30–4.44 (3H, m, H-4' 和 OCH₂), 5.14 (1H, d, *J* 5.2 Hz, H-2'), 5.50–5.57 (1H, m, H-3'), 5.71 (1H, s, H-1'), 6.00 (2H, bs, NH₂), 7.38–7.45 (1H, m, H-pyr), 8.03–8.09 (1H, m, H-pyr), 8.19 (1H, s, H-2), 8.70–8.73 (1H, m, H-pyr), 9.01 (1H, d, *J* 1.6 Hz, H-pyrid)。¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz): δ 13.6 (3 × CH₃), 20.1 (3 × CH₂), 25.2 (3 × CH₂), 51.9 (3 × CH₂), 67.2 (d, *J* 9.7 Hz, OCH₂), 71.6 (d, *J* 7.4 Hz, CH-4'), 71.8 (d, *J* 6.5 Hz, CH-2'), 77.2 (d, *J* 6.2 Hz, CH-3'), 92.6 (CH-1'), 120.1, 124.0, 125.7, 137.3, 149.3, 150.6, 151.1, 151.7, 153.3, 155.8。

实施例 65

(*R_p*)-8-苯基腺苷-3', 5'-环硫代磷酸三丁基铵盐 (8k)

将 (*S_p*)-8-(苯基)腺苷-2'-*O*-(叔-丁基二甲基甲硅烷基)-3', 5'-环-*N*-苯基氨基磷酸盐 (5k) (0.250 g, 0.42 mmol) 和叔-丁醇钾 (0.52 ml, 0.52 mmol, 1 M) 在 THF (6 ml) 中的混合物在氩气下在室温下搅拌 1 小时, 然后向其中加入二硫化碳 (0.08 ml, 1.26 mmol)。将该反应混合物在室温下搅拌 3 小时并蒸发掉大部分溶剂。向残余物中加入己烷直至其完全沉淀。将该固体沉淀溶解于水 (9 ml) 中并在 0 °C 下向其中加入 1.2 M HCl (1.05 ml)。该产物是硅烷化 (*R_p*)-8-苯基腺苷-3', 5'-环硫代磷酸。将一部分这种物质 (0.210 g, 0.39 mmol) 在氩气下溶解于无水 DMF (2 ml) 中并向其中加入氟化铵 (0.100 g, 2.73 mmol)。将该混合物在室温下搅拌 5 天。将该反应混合物过滤并向滤液中加入三丁胺 (0.144 g, 0.78 mmol)。在减压下蒸馏掉挥发性物质并将残余物用己烷进行研磨以除去任何游离的三丁胺。将残余物用硅胶闪柱色谱进

行处理, 用 $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}:\text{NBu}_3$ 100:10:1 进行洗脱。通过溶解于 CH_2Cl_2 中并用己烷使其重新沉淀来对该包含三丁胺的铵盐进一步进行纯化; 得到 0.100 g (39%, 由 5k 来进行计算) 白色固体。HRMS (电喷射): M-NHBu_3 420.0534。 $\text{C}_{28}\text{H}_{43}\text{N}_6\text{O}_5\text{PS-NH}(\text{C}_4\text{H}_9)_3$ 的计算值: 420.0537。 ^1H NMR (CH_3OD , 300 MHz): δ 0.94 (9H, t, J 7.3 Hz, $3 \times \text{CH}_3$), 1.32–1.41 (6H, m, $3 \times \text{CH}_2$), 1.59–1.66 (6H, m, $3 \times \text{CH}_2$), 3.03–3.09 (6H, m, $3 \times \text{CH}_2$), 4.10–4.15 (1H, m, H-4'), 4.25–4.33 (2H, m, OCH_2), 4.98 (1H, d, J 5.3 Hz, H-2'), 5.47–5.54 (1H, m, H-3'), 5.71 (1H, s, H-1'), 7.52–7.55 (3H, m, H-Ph), 7.72–7.75 (2H, m, H-Ph), 8.17 (1H, s, H-2)。 ^{13}C NMR (CH_3OD , 75 MHz): δ 13.9 ($3 \times \text{CH}_3$), 20.9 ($3 \times \text{CH}_2$), 26.9 ($3 \times \text{CH}_2$), 54.0 ($3 \times \text{CH}_2$), 68.4 (d, J 9.7 Hz, OCH_2), 72.8 (d, J 7.6 Hz, CH-4'), 73.2 (d, J 5.7 Hz, CH-2'), 77.7 (d, J 6.6 Hz, CH-3'), 94.2 (CH-1'), 130.0, 130.1, 130.1, 130.7, 130.7, 131.9, 151.7, 153.1, 153.9, 157.0。

实施例 66

(R_p)-8-(4-甲氧基苯基)腺苷-3', 5'-环硫代磷酸三丁基铵盐 (81)

将 (R_p)-8-(4-甲氧基苯基)腺苷-2'-*O*-(叔-丁基二甲基甲硅烷基)-3', 5'-环 *N*-苯基氨基磷酸盐 (51) (0.300 g, 0.48 mmol) 和叔-丁醇钾 (0.6 ml, 0.6 mmol, 1 M THF 溶液) 在 THF (6 ml) 中的混合物在氩气下在室温下搅拌 1 小时, 然后向其中加入二硫化碳 (0.09 ml, 1.44 mmol)。将该反应混合物在室温下搅拌 3 小时, 这时在减压下蒸发掉大部分溶剂并向其中加入乙醚直至其沉淀完全。将该沉淀重新溶解于水 (9 ml) 中并在 0 °C 下向其中加入 1.2 M HCl (1.2 ml)。通过过滤收集硅烷化 (R_p)-8-(4-甲氧基苯基腺苷)-3', 5'-环硫代磷酸 61 并将其在高真空下干燥一整夜。将一部分这种干燥产物 (0.250 g, 0.44 mmol) 在氩气下溶解于无水 DMF (2 ml) 中并向其中加入氟化铵 (0.104 g, 2.8 mmol)。将该混合物在室温下搅拌 5 天并对其进行过滤。向滤液中加入三丁胺 (0.163 g, 0.88 mmol) 并在减压下除去溶剂。将残余物用己烷进行萃取以除去任何过量的三丁胺并将残余物用硅胶闪柱色谱进行处

理, 用 $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}:\text{NBu}_3$ 100:10:1 进行洗脱。通过溶解于 CH_2Cl_2 中并用己烷使其重新沉淀来对该包含一些游离三丁胺的铵盐进一步进行纯化; 得到 0.130 g (42%, 由 51 来进行计算) 白色固体。HRMS (电喷射): M-NHBu_3 450.0648。 $\text{C}_{29}\text{H}_{45}\text{N}_6\text{O}_6\text{PS-NH}(\text{C}_4\text{H}_9)_3$ 的计算值: 450.0642。 ^1H NMR (CH_3OD , 300 MHz): δ 0.93 (9H, t, J 7.3 Hz, $3 \times \text{CH}_3$), 1.29–1.42 (6H, m, $3 \times \text{CH}_2$), 1.58–1.69 (6H, m, $3 \times \text{CH}_2$), 3.04–3.24 (6H, m, $3 \times \text{CH}_2$), 3.81 (3H, s, OCH_3), 4.10–4.17 (1H, m, H-4'), 4.25–4.33 (2H, m, O-CH_2), 4.97 (1H, d, J 5.3, H-2'), 5.46–5.52 (1H, m, H-3'), 5.71 (1H, s, H-1'), 7.0 (2H, d, J 8.6 Hz, $2 \times \text{H-Ph}$), 7.6 (2H, d, J 8.6 Hz, $2 \times \text{H-Ph}$), 8.14 (1H, s, H-2); ^{13}C NMR (CH_3OD , 75 MHz): δ 14.0 ($3 \times \text{CH}_3$), 21.0 ($3 \times \text{CH}_2$), 26.9 ($3 \times \text{CH}_2$), 54.0 ($3 \times \text{CH}_2$), 56.1 (OCH_3), 68.5 (d, J 9.7 Hz, OCH_2), 72.8 (d, J 7.6 Hz, CH-4'), 73.2 (d, J 5.7 Hz, CH-2'), 77.7 (d, J 6.6 Hz, CH-3'), 94.4 (CH-1'), 115.6, 115.6, 119.8, 121.9, 132.2, 151.7, 153.3, 153.4, 156.6, 163.3。

实施例 67

(R_p)-8-(2-*N*-甲基吡咯基)-3',5'-环硫代磷酸钠盐 (9i)

(R_p)-8-(*N*-甲基-2-吡咯基)-3',5'-环硫代磷酸铵盐 (5i) (0.100 g, 0.16 mmol) 溶解于 0.1 M NaOH 的 MeOH 溶液 (1.7 ml) 中。通过加入乙醚来使该钠盐沉淀并通过过滤来对其进行收集; 得到 0.060 g (84%) 白色固体物质。HRMS (电喷射): M-Na 423.0630。 $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{N}_6\text{O}_5\text{PS-Na}$ 的计算值: 423.0646。 ^1H NMR (CH_3OD , 300 MHz): δ 3.86 (3H, s, *N*- CH_3), 4.22–4.41 (3H, m, H-4' 和 OCH_2), 5.04 (1H, d, J 5.3 Hz, H-2'), 5.49–5.56 (1H, m, H-3'), 5.93 (1H, s, H-1'), 6.25–6.29 (1H, m, H-Pyr), 6.67–6.70 (1H, m, H-Pyr), 7.01–7.03 (1H, m, H-Pyr), 8.22 (1H, s, H-2); ^{13}C NMR (CH_3OD , 75 MHz): δ 35.7 (*N*- CH_3), 68.5 (d, J 9.8 Hz, OCH_2), 72.8 (d, J 7.6 Hz, CH-4'), 73.1 (d, J 5.7 Hz, CH-2'), 77.7 (d, J 6.6 Hz, CH-3'), 94.2 (CH-1'), 109.4, 120.1, 121.1, 128.4, 146.3, 151.2, 153.6, 156.8。

实施例 68

(*R_p*)-8-(3-吡啶基)腺苷-3', 5'-环硫代磷酸钠盐 (9j)

将 (*R_p*)-8-(3-吡啶基)腺苷-3', 5'-环硫代磷酸三丁基铵盐 (8j) (0.100 g, 0.16 mmol) 溶解于 0.1 M NaOH 的 MeOH 溶液 (1.7 ml) 中。加入乙醚以使该钠盐沉淀; 得到 0.057 g (80%) 白色固体物质。HRMS (电喷射): M-Na 421.0495。C₁₅H₁₄N₆O₅PS-Na 的计算值: 421.0489。¹H NMR (CH₃OD, 300 MHz): δ 4.16-4.31 (3H, m, H-4' 和 OCH₂), 5.03 (1H, d, *J* 5.1 Hz, H-2'), 5.41-5.45 (1H, m, H-3'), 5.64 (1H, s, H-1'), 7.57-7.61 (1H, m, H-pyrid), 8.18-8.22 (1H, m, H-pyrid), 8.19 (1H, s, H-2), 8.68-8.71 (1H, m, H-pyrid), 8.92 (1H, d, *J* 1.4 Hz, H-pyrid)。¹³C NMR (CH₃OD, 75 MHz): δ 68.3 (d, *J* 9.4 Hz, OCH₂), 72.7 (d, *J* 7.7 Hz, CH-4'), 73.3 (d, *J* 5.6 Hz, CH-2'), 77.6 (d, *J* 6.4 Hz, CH-3'), 94.2 (CH-1'), 120.3, 125.3, 127.2, 138.9, 149.7, 150.6, 151.8, 151.9, 154.3, 157.3。

实施例 69

(*R_p*)-8-苯基腺苷-3', 5'-环硫代磷酸钠盐 (9k)

将 (*R_p*)-8-苯基腺苷-3', 5'-环硫代磷酸三丁基铵盐 (8k) (0.100 g, 0.16 mmol) 溶解于 0.1 M NaOH 的 MeOH 溶液 (1.7 ml) 中。在加入乙醚时, 该钠盐沉淀出来; 得到 0.053 g (75%) 白色固体。HRMS (电喷射): M-Na 420.0529。C₁₆H₁₅N₅O₅PS-Na 的计算值: 420.0537。¹H NMR (CH₃OD, 300 MHz): δ 4.16-4.40 (3H, m, H-4' 和 OCH₂), 5.03 (1H, d, *J* 5.3 Hz, H-2'), 5.50-5.58 (1H, m, H-3'), 5.76 (1H, s, H-1'), 7.57-7.60 (3H, m, H-Ph), 7.76-7.81 (2H, m, H-Ph), 8.21 (1H, s, H-2)。¹³C NMR (CH₃OD, 75 MHz): δ 68.4 (d, *J* 9.7 Hz, OCH₂), 72.8 (d, *J* 7.6 Hz, CH-4'), 73.3 (d, *J* 5.7 Hz, CH-2'), 77.7 (d, *J* 6.4 Hz, CH-3'), 94.2 (CH-1'), 130.0, 130.1, 130.1, 130.7, 130.7, 131.9, 151.7, 153.1, 154.0, 157.0。

实施例 70

(*R_p*)-8-(4-甲氧基苯基)腺苷-3', 5'-环-硫代磷酸钠盐 (9l)

将 (*R_p*)-8-(4-甲氧基苯基)腺苷-3', 5'-环硫代磷酸三丁基铵盐

(81) (0.090 g, 0.14 mmol) 溶解于 0.1 M NaOH 的 MeOH 溶液 (1.5 ml) 中。通过加入乙醚来使该钠盐沉淀; 得到 0.050 g (75%) 白色固体。HRMS (电喷射): M-Na 450.0648。C₁₇H₁₇N₅O₆PS-Na 的计算值: 450.0642。¹H NMR (CH₃OD, 300 MHz): δ 3.88 (3H, s, OCH₃), 4.20-4.24 (1H, m, H-4'), 4.25-4.39 (2H, m, OCH₂), 5.02 (1H, d, *J* 5.3 Hz, H-2'), 5.51-5.57 (1H, m, H-3'), 5.76 (1H, s, H-1'), 7.12 (2H, d, *J* 8.6 Hz, 2 × H-Ph), 7.73 (2H, d, *J* 8.6 Hz, 2 × H-Ph), 8.21 (1H, s, H-2)。¹³C NMR (CH₃OD, 75 MHz): δ 56.0 (OCH₃), 68.3 (d, *J* 9.7 Hz, OCH₂), 72.8 (d, *J* 7.6 Hz, CH-4'), 73.2 (d, *J* 5.7 Hz, CH-2'), 77.7 (d, *J* 6. Hz, CH-3'), 94.4 (CH-1'), 115.5, 115.5, 119.7, 121.9, 132.1, 132.1, 151.7, 153.2, 153.4, 156.7, 163.2。

实施例 71

(S_p)-8-溴腺苷-2'-*O*-(叔-丁基二甲基甲硅烷基)-3', 5'-环 *N*-苄基氨基磷酸酯 (10)

在 0°C 下, 将 8-溴腺苷-2'-*O*-(叔-丁基-二甲基甲硅烷基)-3', 5'-环磷酸三丁基铵盐 (2) (2.14 g, 3.0 mmol) 在 CH₂Cl₂ (5 ml) 中的溶液滴加到草酰氯 (0.31 ml, 3.6 mmol) 和 DMF (0.28 ml, 3.6 mmol) 在 THF (15 ml) 中的溶液中。在 30 分钟后, 向其中加入苄胺 (15 mmol, 1.64 ml) 并将该混合物在 0°C 下搅拌 10 分钟, 在室温下搅拌 2 小时, 用 CHCl₃ (50 ml) 进行稀释并用饱和 NaHCO₃ (含水) 对其进行洗涤 (2 × 15 ml)。将有机相干燥 (MgSO₄), 蒸馏掉溶剂并将残余物用闪柱色谱进行纯化, 用 CH₂Cl₂: MeOH 3: 97 和 5: 95 进行洗脱; 得到 1.28 g (67%) 白色固体。MS (电喷射): 611.2/613.2; ³¹P NMR (CDCl₃, 121 MHz): δ 8.29; ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ 0.011 (3H, s, Si-Me), 0.014 (3H, s, Si-Me), 0.82 (9H, s, Si-*t*Bu), 4.12-4.21 (3H, m), 4.39-4.68 (3H, m), 4.97 (1H, d, *J* 5.1 Hz), 5.54-5.60 (1H, m), 5.88 (1H, s), 6.50 (2H, br. s, NH₂), 7.19-7.33 (5H, m), 8.04 (1H, s, H-2)。¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz): δ -5.2, -4.8, 18.0, 25.5, 45.2, 68.2 (*J*_p 6.9 Hz), 71.2 (*J*_p 4.2 Hz), 72.9 (*J*_p 8.3 Hz), 76.2 (*J*_p 3.6 Hz), 93.4, 118.3, 127.0, 127.4, 128.5,

137.3, 138.7 (J_p 6.5 Hz), 149.9, 153.4, 154.6.

实施例 72

(S_p)-8-(2-咪喃基)腺苷-2' *O*-(叔-丁基二甲基甲硅烷基)-3', 5'-环 *N*-苄基氨基磷酸酯 (11a)

将 Pd(OAc)₂ (60 mg, 0.27 mmol) 和 PPh₃ (142 mg, 0.54 mmol) 在 DMF (8 ml) 中的溶液在氩气下在 50℃ 下搅拌 15 分钟, 然后向其中加入 2-(三-正-丁基甲锡烷基)咪喃 (0.63 ml, 2.0 mmol)。随后, 向其中加入 (S_p)-8-溴腺苷-2' *O*-(叔-丁基二甲基甲硅烷基)-3', 5'-环 *N*-苄基氨基磷酸酯 (10) (800 mg, 1.3 mmol) 在 DMF (10 ml) 中的溶液。将该混合物在 85℃ 下搅拌 2.5 小时。蒸馏掉溶剂并将残余物用硅胶闪柱色谱进行纯化, 用 CH₂Cl₂:MeOH 3:97 和 5:95 进行洗脱; 得到 636 mg (80%) 白色固体。MS (电喷射): 599.2; ³¹P NMR (CDCl₃, 121 MHz): δ 8.08; ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ 0.00 (3H, s, Si-Me), 0.04 (3H, s, Si-Me), 0.82 (9H, s, Si-*t*Bu), 4.02-4.09 (1H, m), 4.17-4.29 (3H, m), 4.41-4.65 (2H, m), 5.16 (d, J 5.2 Hz), 5.79 (1H, J 1.8, 5.2 Hz), 6.31-6.34 (3H, s + br. s), 6.62 (1H, q, J 1.8 Hz), 7.14 (1H, dd, J 0.6, 3.5 Hz), 7.25-7.38 (5H, m), 7.65 (1H, dd, J 0.6, 1.8 Hz), 8.25 (1H, s, H-2); ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz): δ -5.3, -4.7, 18.0, 25.5, 45.3, 68.4 (J_p 7.2 Hz), 71.3 (J_p 4.3 Hz), 73.1 (J_p 8.5 Hz), 77.2, 94.2, 112.1, 114.1, 119.7, 127.1, 127.5, 128.6, 138.8 (J_p 6.5 Hz), 141.7, 143.5, 144.8, 150.2, 153.1, 155.3.

实施例 73

(R_p)-8-(2-咪喃基)腺苷-3', 5'-环硫代磷酸铵盐 (7a)

在 -78 °C 下, 将 1.6 M 正 BuLi 在己烷 (0.25 ml, 0.39 mmol) 中的溶液加入到 (S_p)-8-(2-咪喃基)腺苷-2' *O*-(叔-丁基二甲基甲硅烷基)-3', 5'-环 *N*-苄基氨基磷酸酯 (11a) (200 mg, 0.33 mmol) 在 THF (4 ml) 中的溶液中。将该混合物在这种温度下搅拌 10 分钟, 然后向其中加入二硫化碳 (0.06 ml, 1.0 mmol) 并除去冷却浴。将该混合物搅拌 3 小时在室温下。将溶剂的体积降至约 1 ml, 然后向其中加入己烷 (40

ml)。收集沉淀并将其溶解于无水 DMF (2 ml) 中, 向其中加入氟化铵 (75 mg, 2.0 mmol)。将该混合物在氩气下在 40 °C 下搅拌 48 小时。蒸馏掉溶剂并将该产物粗品用硅胶闪柱色谱进行纯化, 用 *i*PrOH: EtOAc: H₂O: NH₃ (含水) 7: 7: 1: 1 进行洗脱; 收率: 106 mg (74%) 白色固体。光谱学数据是之前所记录的数据。

实施例 74

S-4-(异丁酰氧基)苄基 (*R_p*)-8-(3-咪喃基)腺苷-3', 5'-环硫代磷酸酯 (12)

将 (*R_p*)-8-(3-咪喃基)腺苷-3', 5'-环硫代磷酸铵盐 (7c) (0.2 mmol) 溶解于甲醇 (5 ml) 中并向其中加入三乙胺 (0.3 mmol)。在真空下对该混合物进行蒸发, 得到 (*R_p*)-8-(3-咪喃基)腺苷-3', 5'-环硫代磷酸三乙基铵盐。将这种产物的一部分 (70 mg, 0.16 mmol) 和 4-(异丁酰氧基)苄基碘 (73 mg, 0.24 mmol) 在 DMF (2 mL) 中在室温下搅拌 48 小时。蒸发掉溶剂, 将残余物用硅胶闪柱色谱进行纯化, 用 CH₂Cl₂: MeOH 3: 97 和 5: 95 进行洗脱; 收率: 38 mg (40%) 白色固体。MS (电喷射): 588.2; ³¹P NMR (CDCl₃, 81 MHz): δ 27.1; ¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz): δ 1.26 (6H, d, *J* 7.0 Hz), 2.75 (1H, sep, *J* 7.0 Hz), 4.08 (1H, s), 4.16 (1H, s), 4.34-4.50 (3H, m), 5.26 (1H, d, *J* 4.8 Hz), 5.67-5.74 (1H, m), 5.91 (1H, s), 6.46 (2H, br. s.), 6.80 (1H, s.), 6.98 (2H, d, *J* 8.5 Hz,), 7.34 (2H, d, *J* 8.5 Hz,), 7.92 (1H, s), 8.13 (1H s)。

实施例 75

(*R_p*)-8-(4-氟苯基)腺苷-2'-*O*-(叔-丁基二甲基甲硅烷基)-3', 5'-环 *N*-苄基氨基磷酸酯 11m

将 Pd(OAc)₂ (0.037 g, 0.163 mmol) 和 PPh₃ (0.091 g, 0.348 mmol) 在 NMP (4 ml) 中的混合物在 50 °C 下搅拌至该溶液变成深红色。向其中加入 8-溴腺苷-2'-*O*-(叔-丁基二甲基甲硅烷基)-3', 5'-环-*N*-苄基氨基磷酸酯 (10) (0.500 g, 0.81 mmol) 在 NMP (2 ml) 中的溶液和 1-三丁基甲锡烷基-4-氟苯 (0.623 g, 1.62 mmol)。将该反应混合物在 130-135 °C 下搅拌 8 小时, 使之冷却至室温, 在减压下除去 NMP 并将残余

物用硅胶闪柱色谱进行纯化, 用 7.5% MeOH 的 CH_2Cl_2 溶液进行洗脱。该产物是一种包含痕量有机锡残余物的白色固体物质, 通过将该产物溶解于 CH_2Cl_2 中并通过加入己烷使其重新沉淀来除去该痕量残余物; 收率为 0.248 g (49%); $^1\text{H NMR}$ (CH_3OD , 300 MHz): δ -0.17 (3H, s, CH_3), -0.11 (3H, s, CH_3), 0.62 (9H, s, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 4.06 (2H, d, J 12.5 Hz, $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2$), 4.12-4.21 (1H, m, H-4'), 4.44-4.59 (2H, m, OCH_2), 5.05 (1H, d, J 5.3 Hz, H-2'), 5.63-5.70 (1H, m, H-3'), 5.71 (1H, s, H-1'), 7.15-7.33 (7H, m, $7 \times \text{H-Ph}$), 7.71-7.76 (2H, m, $2 \times \text{H-Ph}$), 8.21 (1H, s, H-2)。 $^{13}\text{C NMR}$ (MeOH, 75 MHz): δ -5.2 和 -4.5 ($2 \times \text{CH}_3$), 18.9 (Si-C), 25.9 ($3 \times \text{CH}_3$), 45.9 (NHCH_2), 69.8 (d, J 7.2 Hz, OCH_2), 72.5 (d, J 4.4 Hz, CH-4'), 74.2 (d, J 8.3 Hz, CH-2'), 78.1 (d, J 3.8 Hz, CH-3'), 95.6 (CH-1'), 117.1, 117.4, 120.0, 126.1, 126.1, 128.1, 128.1, 128.4, 132.9, 133.0, 140.8, 140.85, 151.5, 151.6, 154.2, 157.2, 164.0。

实施例 76

(R_p)-8-(4-氟苯基)-3', 5'-环硫代磷酸三丁基铵盐 8m

在 -78°C 下, 将位于己烷 (0.27 ml, 0.43 mmol) 中的 1.6 M 正 BuLi 加入到 (R_p)-8-(4-氟苯基)腺苷-2'- O -(叔-丁基二甲基甲硅烷基)-3', 5'-环- N -苄基氨基磷酸酯 (11m) (0.250 g, 0.39 mmol) 在 THF (6 ml) 中的溶液中。将该混合物在 -78°C 下在氩气下搅拌 10 分钟, 然后向其中加入 CS_2 (0.08 ml, 1.24 mmol)。将该反应混合物在 -78°C 下搅拌 20 分钟, 在室温下搅拌 2 小时。蒸馏掉大部分溶剂并向其中加入己烷直至其沉淀完全。将该沉淀溶解于水 (9 ml) 中并在 0°C 下向其中加入 1.2 M HCl (1.1 ml)。(R_p)-8-(4-氟苯基)-2'- O -(叔-丁基二甲基甲硅烷基)-3', 5'-环硫代磷酸 (6m) 沉淀出来。将干燥的该硫代酸 (0.150 g, 0.27 mmol) 溶解于无水 DMF (1.5 ml) 中, 向其中加入氟化铵 (0.070 g, 1.9 mmol) 并将该混合物在室温下搅拌 5 天。将该反应混合物过滤并向滤液中加入三丁胺直至产生一种澄清的溶液。从滤液中蒸馏掉挥发性物质, 将该残余物用己烷进行萃取以除去过量的三丁胺

并将剩余物用硅胶闪柱色谱进行处理,用 $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}:\text{NBu}_3$ 100:10:1 进行洗脱。通过将其溶解于 CH_2Cl_2 中并通过加入己烷使其重新沉淀来对该包含三丁胺的铵盐进一步进行纯化;得到 0.065 g (38%, 由 11m 来进行计算) 白色固体物质。 $^1\text{H NMR}$ (CH_3OD , 300 MHz): δ 0.90 (9H, t, J 7.3 Hz, $3 \times \text{CH}_3$), 1.31-1.40 (6H, m, $3 \times \text{CH}_2$), 1.56-1.65 (6H, m, $3-\text{CH}_2$), 3.04-3.15 (6H, m, $3-\text{CH}_2$), 3.87-3.92 (1H, m, H-4'), 4.04-4.32 (2H, m, OCH_2), 5.02 (1H, d, J 5.3 Hz, H-2'), 5.40-5.48 (1H, m, H-3'), 5.68 (1H, s, H-1'), 7.22-7.27 (2H, m, $2 \times \text{H-Ph}$), 7.73-7.78 (2H, m, $2 \times \text{H-Ph}$), 8.16 (1H, s, H-2)。 $^{13}\text{C NMR}$ (MeOD , 75 MHz): δ -5.2 (CH_3OD) 13.9 ($3 \times \text{CH}_3$), 20.9 ($3 \times \text{CH}_2$), 26.7 ($3 \times \text{CH}_2$), 53.9 ($3 \times \text{CH}_2$), 68.2 (d, J 9.6 Hz, OCH_2), 72.8 (d, J 7.6 Hz, CH-4'), 73.4 (d, J 5.7 Hz, CH-2'), 78.7 (d, J 6.4 Hz, CH-3'), 94.5 (CH-1'), 116.9, 116.9, 119.8, 126.2 132.9, 132.9, 151.6, 153.3, 153.9, 156.9, 163.9。

实施例 77

(R_p)-8-(4-氟苯基)-3',5'-环硫代磷酸钠盐 (9m)

将 (R_p)-8-(4-氟苯基)-3',5'-环硫代磷酸三丁基铵盐 (8m) (0.050 g, 0.11 mmol) 溶解于 0.1 M NaOH 的 MeOH 溶液 (1.1 ml) 中。通过加入己烷使该钠盐沉淀;得到 0.027 g (51%) 白色固体物质。 $^1\text{H NMR}$ (CH_3OD , 300 MHz): δ 4.20-4.41 (3H, m, H-4' 和 OCH_2), 5.08 (1H, d, J 5.4 Hz, H-2'), 5.51-5.58 (1H, m, H-3'), 5.75 (1H, s, H-1'), 7.29-7.34 (2H, m, $2 \times \text{H-Ph}$), 7.80 7.86 (2H, m, $2 \times \text{H-Ph}$), 8.23 (1H, s, H-2); $^{13}\text{C NMR}$ (MeOD , 75 MHz): δ 68.3 (d, J 9.3 Hz, OCH_2), 72.9 (d, J 7.8 Hz, CH-4'), 73.2 (d, J 5.6 Hz, CH-2'), 77.6 (d, J 6.5 Hz, CH-3'), 94.1 (CH-1'), 116.9, 117.2, 119.8, 126.2, 132.9, 132.9, 151.6, 153.2, 153.9, 156.9, 163.8。

实施例 78

(S_p) 8-(2-噻吩基)腺苷-2' *O*-(叔-丁基二甲基甲硅烷基)-3',5'-环 *N*-苄基氨基磷酸酯 (11b)

将氯化 2-噻吩基锌 (0.3 ml, 1 M, 0.300 mmol) 在 THF (2 ml) 中的溶液在氩气下加入到 (S) 8-溴腺苷-2'-O-(叔-丁基二甲基甲硅烷基)-3', 5'-环 N-苄基氨基磷酸酯 (10) (0.122 g, 0.200 mmol) 和四(三苯基膦)钼 (0.046 g, 0.040 mmol) 在 THF (2 ml) 中的溶液中。将该反应混合物在温和回流下加热 3 小时。将饱和氯化铵水溶液 (3 ml) 和二氯甲烷 (10 ml) 加入到冷却了的该反应混合物中, 并将有机相用饱和盐水进行萃取 (2 × 3 ml), 干燥 (MgSO₄) 并蒸馏掉溶剂。将残余物用硅胶闪柱色谱进行处理, 用 MeOH:CH₂Cl₂ 1: 20 进行洗脱; 收率为 0.059 g (48%)。³¹P NMR (CDCl₃, 81 MHz): δ 8.3。 ¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz): δ 0.11 (6H, s, CH₃Si), 0.88 (9H, s, (CH₃)₃C), 4.2-4.7 (5H, m, H4' H5' PhCH₂), 5.08 (1H, d, J 5.1 Hz, H2'), 5.28 (1H, s, NH), 5.5-5.6 (1H, m, H3'), 5.94 (1H, s, H1'), 6.53 (2H, br. s, NH₂), 7.09 (1H, dd, J 4.0, 5.6 Hz, H4-噻吩基), 7.2-7.4 (7H, m, H-Ar), 8.10 (1H, s, H2)。

接下来, 例如用二硫化碳和强碱来进行硫杂化并进行脱甲硅基作用, 从而得到硫代酸 7b。

实施例 79

用于口服给药的胶囊的制备

(Rp)-8-(2-咪喃基)腺苷-3', 5'-环硫代磷酸铵盐 (实施例 73)-50 mg

乳糖 - 适量

将这些粉末混合并填充到胶囊 (0 号胶囊) 中。

实施例 80

注射剂的制备

(Rp)-8-(4-氟苯基)-3', 5'-环硫代磷酸钠盐 (实施例 77) -25 mg

氯化钠 - 适量

净化水 - 加至 5 ml

通过将这种化合物和氯化钠溶解于水中来制备 (Rp)-8-(4-氟苯基)-3', 5'-环硫代磷酸钠盐的等渗溶液。将该溶液过滤到 5 ml 的小瓶

中并对其进行高压灭菌。该产品每 ml 包含 5 mg Rp)-8-(4-氟苯基)-3', 5'-环硫代磷酸钠盐。

实施例 81

新 Rp-cAMPS 类似物在 I α 型 PKA 酶体外活化试验 (Cook 激酶试验) 中 IC₅₀ 值的测定

下面分析的目的是要将新的 Rp-cAMPS 类似物分类为 cAMP-依赖性蛋白激酶 I 型 (RI α / C α) 全酶复合体的拮抗剂或激动剂和通过 Cook 用以分光光度测量试验为基础的抑制或活化试验来测定其 EC₅₀ 值。

Rp-cAMPS 类似物拮抗剂和激动剂活性筛选:

首先, 在使用 10 nM RI α 全酶和 10 μ M 各 Rp-cAMPS 类似物来对活化进行试验的活化试验中对新 Rp-cAMPS 类似物进行筛选。为了对该 Rp-cAMPS 类似物的拮抗性详细进行定性, 使用一种抑制试验。通过加入 1 μ M Sp-8-Br-cAMPS (位于试验混合物中 3 分钟) 来将 10 nM RI α 全酶部分 (80%) 活化。然后, 通过加入 Rp-cAMPS 拮抗剂 (浓度渐增, 培养 5 分钟, 然后用肯普肽来开始该试验) 来重建全酶。然后, 拮抗剂通过竞争性拮抗阻断了 Sp-8-Br-cAMPS 对 PKA 的结合和活化并使得激酶活性降低。

Rp-cAMPS 类似物对 PKA I α 型的 EC₅₀ 的测定:

通过 Cook, 用以分光光度测量试验为基础的抑制试验和范围为 pM 至 mM 的 Rp-cAMPS 类似物的浓度差异来测定这些拮抗剂的 EC₅₀ 值。每个类似物用部分活化的 RI α 全酶 (10 nM) 在 1 μ M Sp-8-Br cAMPS (80% 的复合体活化) 下来一式两份地进行至少 10 次测量。预培养 5 分钟, 然后加入肯普肽来使得具有拮抗活性的化合物重建该全酶复合体。在该试验中将本发明的新化合物与 Rp-8-Br-cAMPS 进行比较。

测定 cAMP 对 RI α 全酶的活化常数。在将浓度渐增的 cAMP 与 10 nM RI α 全酶一起在试验混合物中预培养 3 分钟后, 通过加入 200 μ M 肯普肽来开始该反应。对其 OD₃₄₀ 监测 1 分钟并将其斜率 (Δ OD₃₄₀/min) 作为与被活化的催化亚基的相对活性直接相关。EC₅₀ 为 88nM。

研究了 Rp-8-(2-咪喃基)-cAMPS 对 Sp-8-Br-cAMP-介导的 PKA 活

化的逆转。Rp-8-(2-咪喃基)-cAMPS 的最大半数拮抗作用 (IC_{50} 或 EC_{50}) 在这种试验系统的三次试验中为 238、337 和 360 nM。

研究了 Rp-8-(2-噻吩基)-cAMPS 对 Sp-8-Br-cAMP-介导的 PKA 活化的逆转。Rp-8-(2-噻吩基)-cAMPS 的最大半数拮抗作用 (IC_{50} 或 EC_{50}) 在这种试验系统中为 449 nM。

研究了 Rp-8-(3-咪喃基)-cAMPS 对 Sp-8-Br-cAMP-介导的 PKA 活化的逆转。Rp-8-(3-咪喃基)-cAMPS 的最大半数拮抗作用 (IC_{50} 或 EC_{50}) 在这种试验系统中为 607 nM。

研究了 Rp-8-(3-噻吩基)-cAMPS 对 Sp-8-Br-cAMP-介导的 PKA 活化的逆转。Rp-8-(3-噻吩基)-cAMPS 的最大半数拮抗作用 (IC_{50} 或 EC_{50}) 在这种试验系统中为 739 nM。

研究了 Rp-8-苯基-cAMPS 对 Sp-8-Br-cAMP-介导的 PKA 活化的逆转。Rp-8-苯基-cAMPS 的最大半数拮抗作用 (IC_{50} 或 EC_{50}) 在这种试验系统中为 1058 μ M。

研究了 Rp-8-乙酰基-cAMPS 对 Sp-8-Br-cAMP-介导的 PKA 活化的逆转。Rp-8-乙酰基-cAMPS 的最大半数拮抗作用 (IC_{50} 或 EC_{50}) 在这种试验系统中为 1.58 μ M。

研究了 Rp-8-乙氧基乙烯基-cAMPS 对 Sp-8-Br-cAMP-介导的 PKA 活化的逆转。Rp-8-乙氧基乙烯基-cAMPS 的最大半数拮抗作用 (IC_{50} 或 EC_{50}) 在这种试验系统中为 2.4 μ M。

研究了 Rp-8-(2-Br-5-咪喃基)-cAMPS 对 Sp-8-Br-cAMP-介导的 PKA 活化的逆转。Rp-8-(2-Br-5-咪喃基)-cAMPS 的最大半数拮抗作用 (IC_{50} 或 EC_{50}) 在这种试验系统中为 2.9 μ M。

研究了 Rp-8-乙基-cAMPS 对 Sp-8-Br-cAMP-介导的 PKA 活化的逆转。Rp-8-乙基-cAMPS-cAMPS 的最大半数拮抗作用 (IC_{50} 或 EC_{50}) 在这种试验系统中为 6.13 μ M。

研究了 Rp-8-甲基-cAMPS 对 Sp-8-Br-cAMP-介导的 PKA 活化的逆转。Rp-8-甲基-cAMPS 的最大半数拮抗作用 (IC_{50} 或 EC_{50}) 在这种试验系统中为 8.76 μ M。

研究了之前已知的化合物 Rp-8-Br-cAMPS 对 Sp-8-Br-cAMP-介导的 PKA 活化的逆转。Rp-8-Br-cAMPS 的最大半数拮抗作用 (IC_{50} 或 EC_{50}) 在这种试验系统中为 1202 nM 并且在一些实验 ($n=3$) 中的平均值为 1350 nM。

研究了 Rp-8-(3-吡咯)-cAMPS 对 Sp-8-Br-cAMP-介导的 PKA 活化的逆转。Rp-8-(3-吡咯)-cAMPS 的最大半数拮抗作用 (IC_{50} 或 EC_{50}) 在这种试验系统中为 3.61 μ M。

研究了 Rp-8-(5-甲基-2-咪喃基)-cAMPS 对 Sp-8-Br-cAMP-介导的 PKA 活化的逆转。Rp-8-(5-甲基-2-咪喃基)-cAMPS 的最大半数拮抗作用 (IC_{50} 或 EC_{50}) 在这种试验系统中为 1.16 μ M。

研究了 Rp-8-苯并咪喃基-cAMPS 对 Sp-8-Br-cAMP-介导的 PKA 活化的逆转。Rp-8-甲基-cAMPS 的最大半数拮抗作用 (IC_{50} 或 EC_{50}) 在这种试验系统中为 2.78 μ M。

研究了 Rp-8-(5-羟基甲基-2-咪喃基)-cAMPS 对 Sp-8-Br-cAMP-介导的 PKA 活化的逆转。Rp-8-(5-羟基甲基-2-咪喃基)-cAMPS 的最大半数拮抗作用 (IC_{50} 或 EC_{50}) 在这种试验系统中为 1.98 μ M。

实施例 82

在 II α 型 PKA 酶体外活化试验 (Cook 激酶试验) 中对新 Rp-cAMPS 类似物 IC_{50} 值的测定

为了对拮抗剂化合物对优选的药物目标 (PKA I α 型) 与其它 PKA 酶 (优选地当为了免疫刺激靶向于 I α 型 PKA 时不应被抑制) 的选择性进行定性, 通过 Cook 用以分光光度测量为基础的抑制试验来测定一些所选择的化合物对 II α 型 PKA 的 EC_{50} 值。

Rp-cAMPS 类似物对 II α 型 PKA 的 EC_{50} 的测定: 每个类似物用部分活化的 RII α 全酶 (10 nM) 在 1 μ M Sp-8-Br cAMPS (75% 的复合体活化) 下一式两份地进行至少 10 次测量。预培养 5 分钟, 然后加入肯普肽以使得该全酶复合物 (holo complex) 重建。

测定激动剂 Sp-8-Br-cAMPS 对 Holo RII α 的活化常数。在将浓度渐增的 cAMP 与 10 nM Holo RII α 在试验混合物中预培养 3 分钟后,

通过加入 200 μM 肯普肽来开始该反应。对 OD_{340} 进行 1 分钟的监测并将斜率 ($\Delta \text{OD}_{340}/\text{min}$) 作图为与被活化的催化亚基的相对活性直接相关。 EC_{50} 为 294nM。

研究了 Rp-8-(2-咪喃基)-cAMPS 对 Sp-8-Br-cAMP-介导的 II 型 PKA 活化的逆转。Rp-8-(2-咪喃基)-cAMPS 的最大半数拮抗作用 (IC_{50} 或 EC_{50}) 在这种试验系统中在两次实验中为 11.6 和 16.7 μM 。

研究了 Rp-8-苯基-cAMPS 对 Sp-8-Br-cAMP-介导的 II 型 PKA 活化的逆转。Rp-8-苯基-cAMPS 的最大半数拮抗作用 (IC_{50} 或 EC_{50}) 在这种试验系统中为 48.6 μM 。

研究了之前已知的化合 Rp-8-Br-cAMPS 对 Sp-8-Br-cAMP-介导的 II 型 PKA 活化的逆转。Rp-8-Br-cAMPS 的最大半数拮抗作用 (IC_{50} 或 EC_{50}) 在这种试验系统中为 14.9 μM 。

实施例 83

在体外竞争性配体结合试验 (Biacore 试验) 中与 $\text{I}\alpha$ 型 PKA 结合的新 Rp-cAMPS 类似物的 EC_{50} 值的测定

本实验的目的是在以 Biacore 技术为基础的表面结合和竞争试验中对作为 cAMP 依赖性蛋白激酶的 I 型 ($\text{RI}\alpha/\text{C}\alpha$) 全酶复合体拮抗剂的 cAMP 类似物的性质进行评估和用这种独立于所说酶活性试验的配体结合方法测定拮抗作用的 EC_{50} 值。

用 holo $\text{RI}\alpha$ 的拮抗剂进行的表面竞争试验: 将该 Biacore 表面竞争试验设计为一种获得以 Cook 试验为基础的活性的供选择的替代方法。这种试验使得可以独立于激酶活性地测量拮抗剂结合, 从而使得可以测定特定结合于所说全酶复合体内不同 cAMP 结合区域的 cAMP 类似物的 EC_{50} 值。因此, 以活性或结合为基础的这两种试验产生了有关激动剂结合如何阻止该全酶复合体的活化的机理的补足信息。

对于这些研究而言, 不仅需要将调节亚基捕获到激动剂传感器表面 (即 8-AHA cAMP) 上, 而且需要通过拮抗剂配体 (即 Rp-8AHA cAMPS) 固定该部位定向的整个全酶复合体。其有助于测定与全酶复合体或单一的调节亚基部位结合的拮抗剂的 EC_{50} 值。在注射到芯片表面之前,

将所说的全酶复合体与不同数量的拮抗剂一起进行培养。拮抗剂的结合导致了芯片表面上结合信号的降低(表面竞争),从而产生了该拮抗剂的 EC_{50} 值。但是,如果在结合到配体表面时因为配体的部分激动活性而使得所说的全酶复合体(holo complex)裂解,则所产生的结合信号将低于预期并且该解离可能会改变所观察到的拮抗剂的 EC_{50} 值。因此,必需进行各种实验来确认在缔合期间是 holo $RI\alpha$ 还是仅仅是 $RI\alpha$ 被结合到 Rp-8-AHA cAMPS 或 8-AHA cAMP 表面上。

为此,用两种不同的条件,对 holo $RI\alpha$ 与两种不同表面——8-AHA cAMP 和 Rp 8AHA-cAMPS 表面的结合进行试验。在存在 ATP 和 Mg 的情况下,所说的调节和催化亚基紧密结合并形成了所说的全酶复合体,而在存在螯合 Mg 离子的 EDTA 的情况下,亲和力显著降低并促进了所说复合体的解离。在 10 nM $RI\alpha$ 全酶溶液的缔合期间,在 Rp-8-AHA cAMPS 表面获得了 900 RU 的响应信号。在 8-AHA cAMP 表面达到的信号低于这种信号的一半,表明仅该全酶的 $RI\alpha$ 亚基被结合到 8-AHA cAMP 表面上或者在该全酶结合期间,该复合体被解离,只剩下 $RI\alpha$ 亚基被结合到 chip 表面上。当在注射前向该全酶中加入 10 mM EDTA 以促进复合体的解离时,仅 250 RU 被同时结合到 Rp-8-AHA cAMPS 和 8-AHA cAMP 表面上,其可能是由于仅 $RI\alpha$ 亚基进行结合。当向所说的全酶中加入过量的拮抗剂(10 μ M Rp-8-Br cAMPS 或 10 μ M Rp-8-(2-咪喃基) cAMPS)时,全酶复合体(holo complex)在 Rp-8-AHA cAMPS 表面的结合被完全阻断,而没有观察到其对 8-AHA cAMP 表面的结合有影响。

为了测定所说拮抗剂的 EC_{50} 值,将不同浓度的拮抗剂与 10 nM holo $RI\alpha$ 一起进行培养并将其注射到两个检测表面上。仅在 Rp-8AHA cAMPS 表面上探测到了 Rp-8-(2 咪喃基) cAMPS 和 Rp-8-Br cAMPS 的竞争作用,而在任何拮抗剂浓度下与 8-AHA cAMP 的结合都不受影响。所得的 EC_{50} 's 是在 Rp-8-AHA cAMPS 表面上测得的。Rp-8-(2-咪喃基) cAMPS 的 EC_{50} 为 377 nM 和 Rp-8-Br cAMPS 的 EC_{50} 为 2.9 μ M, 这些数据与之前研究中用 Cook 试验估算的这些 EC_{50} 值(Rp-8-(2-咪喃基) cAMPS 的

$EC_{50} = 349 \text{ nM}$ 和 Rp-8-Br cAMPS 的 $EC_{50} = 1.3 \text{ }\mu\text{M}$) 相似。以相同的方式对 Rp-8-(3 咪喃基) cAMPS 进行分析并且其具有 743 nM 的 EC_{50} (Cook 试验的 EC_{50} 为 607 nM)。因此, 可以推定 Biacore 的配体结合拮抗剂试验的结果可以与以活性试验为基础的数据相提并论。

用 10 nM Holo RI α 、Holo RI α 在 10 mM EDTA 中和用 Holo RI α 在存在 $10 \text{ }\mu\text{M}$ 拮抗剂 Rp-8-Br cAMPS 或 Rp-8-2-咪喃基 cAMPS 的情况下进行在 Rp-8-AHA cAMPS 和 8-AHA cAMP 表面上的竞争结合试验。记录在 $10 \mu\text{l}/\text{min}$ 的流速下 5 分钟的缔合和解离时间。

注射 10 nM Holo RI α 和与 Rp-8-AHA cAMPS 和 8-AHA cAMP 感受器表面结合的 3.9 nM - $8 \text{ }\mu\text{M}$ Rp-8-(2-咪喃基) cAMPS 和 19 nM - $38.4 \text{ }\mu\text{M}$ Rp-8-Br cAMPS 在 $10 \mu\text{l}/\text{min}$ 的流速下产生了 5 分钟的缔合和解离时间。

测定拮抗剂 Rp-8-(2 咪喃基) cAMPS 在 Rp-8-AHA cAMPS 表面上的 EC_{50} 值; 用在 $10 \mu\text{l}/\text{min}$ 的流速下 5 分钟的缔合时间后 Holo RI α 的结合信号对拮抗剂浓度的对数作图。测得 EC_{50} 为 377 nM 。

测定拮抗剂 Rp-8-(3 咪喃基) cAMPS 在 Rp-8-AHA cAMPS 表面上的 EC_{50} 值; 用在 $10 \mu\text{l}/\text{min}$ 的流速下 5 分钟的缔合时间后 Holo RI α 的结合信号对拮抗剂浓度的对数作图。测得 EC_{50} 为 743 nM 。

测定之前已知的拮抗剂 Rp-8-Br-cAMPS 在 Rp-8-AHA cAMPS 表面上的 EC_{50} 值; 用用在 $10 \mu\text{l}/\text{min}$ 的流速下 5 分钟的缔合时间后 Holo RI α 的结合信号对拮抗剂浓度的对数作图。测得 EC_{50} 为 $2.6 \text{ }\mu\text{M}$ 。

体外生物学特性结果概述

表 1 对得自用于 I α 型 PKA 酶活性的 Cook 试验的数据进行了概述。

表 1

Rp cAMPS 类似物	拮抗剂	激动剂	EC ₅₀ 抑制	相对效力*
Rp-8-(2-咪喃基)cAMPS	是	否	3.19E-07	4.24
Rp-8-(2-噻吩基)cAMPS	是	否	4.49E-07	3.01
Rp-8-(3-咪喃基)cAMPS	是	否	6.07E-07	2.23
Rp-8-(3-噻吩基)cAMPS	是	否	7.39E-07	1.83
Rp-8-Phe cAMPS	是	否	1.06E-06	1.28
Rp-8-(5-Me-2-咪喃基)cAMPS	是	否	1.16E-06	1.17
Rp-8-Br cAMPS (3x)	是	否	1.35E-06	1.00
Rp-8-乙酰基 cAMPS	是	否	1.58E-06	0.86
Rp-8-(5-MeOH-2-咪喃基)cAMPS	是	否	在 1.98E-06 下 50%抑制	0.68
Rp-8-(1-乙氧基乙烯基)cAMPS	是	否	2.40E-06	0.56

表 1 (续)

Rp cAMPS 类似物	拮抗剂	激动剂	EC ₅₀ 抑制	相对效力*
Rp-8-苯并咪喃基 cAMPS	是	否	2.78E-06	0.49
Rp-8-(2-Br-5-咪喃基)cAMPS	是*	否	在 3E-06 下 50%抑制	0.45
Rp-8-(3-Pyr)cAMPS	是	否	3.61E-06	0.37
Rp-8-Eth cAMPS	是	否	6.13E-06	0.22
Rp-8-Me cAMPS	是	否	8.72E-06	0.16

*相对于 Rp-8Br-cAMPS 而言的拮抗剂

表 2 对得自用于 II α 型 PKA 酶活性的 Cook 试验的数据进行了综述, 将其与所选择化合物对 I α 型 PKA 酶的活化数据进行了比较并表明了其选择性。

表 2

Holo RII α

Rp cAMPS 类似物	拮抗剂	相对抑制*	激动剂	EC ₅₀ 抑制	相对效力**	EC ₅₀ RII/EC ₅₀ RI***
Sp-8Br cAMPS	否		是	4.65E-07		
Rp-8(2-咪喃基)cAMPS	是	59%	否	1.16E-05	1.28	32
Rp-8Br cAMPS	是	79%	否	1.49E-05	1.00	12
Rp-8-Phe cAMPS	是	61%	否	4.86E-05	0.31	46

*在 250 μ M Rp-cAMPS 类似物下 1 μ M Sp-8Br-cAMPS 的拮抗剂作用%

**相对于 Rp-8-Br-cAMPS 而言的拮抗剂

***对 PKA I 型的选择性 (EC₅₀ PKA II 型/EC₅₀ PKA I 型)

表 3 表示了与用所选择的化合物由配体结合竞争试验 (Biacore

试验)获得的数据进行比较的得自用于 I α 型 PKA 酶活性的 Cook 试验的数据。

表 3

拮抗剂	holo RI α Cook	holo RI α Biacore	holo RI α Cook	holo RI α Biacore
Rp-8 (2-咪唑基) cAMPS	349nM	377nM*		
Rp-8 (3-咪唑基) cAMPS	607nM	743nM*		
Rp-8Br cAMPS	1.3 μ M	2.9 μ M* (10nM holo)	14.9 μ M	10.8 μ M (Rp-8-AHA surface)
Rp-8Br cAMPS	1.3 μ M	2.4 μ M* (2nM holo)	14.9 μ M	21.2 μ M (8-AHA surface)

实施例 84

用人 T 细胞进行的临床前试验, 用 HIV+T 细胞进行的离体临床试验。

用可以对所说化合物对 T 淋巴细胞增生的作用进行评估的试验, 在激动剂或拮抗剂性质、效力和毒性作用方面对 cAMP 类似物的特性进行描述。以多克隆方式通过 CD3 表面标记物的交联来激活人外周 T 淋巴细胞以使其增生。使这些细胞在不存在和存在 I 型 PKA 激动剂 Sp-8-Br-cAMPS (加入这种物质是为了模拟 HIV 感染个体 T 淋巴细胞中的 cAMP 水平升高) 的情况下与浓度渐增的各种新 cAMP 类似物进行接触。

根据其手性磷的 Rp 构型, 预期所说的化合物表现出拮抗剂性质。被试验的化合物是在腺嘌呤环的 8-位上被取代的 Rp-8-Br-cAMPS 的衍生物。该位置是提供了药物靶向选择性的吸电子中心。预期对这一位置进行修饰产生了对 I 型 PKA 的 R 亚基上的结合部位 B 具有更强的亲和力并且因此具有更高的效力和改善的选择性的化合物。

表 4 概括了用人原代 T 淋巴细胞进行试验的 cAMP 类似物化合物的性质。已经在各种位置对该 cAMP 分子进行了一些修饰, 但是迄今为止, 与用 T 淋巴细胞增生试验探测的起始化合物 Rp-8-Br-cAMPS 相比, 这些修饰在功效和选择性方面没有产生任何改善。但是, 当用酶试验在 I 型 PKA 全酶上直接进行试验时, 表明一些化合物 (见表 4) 比参考化合物 Rp-8-Br-cAMPS 更有效。

表 4

在 T 淋巴细胞中进行的 离体试验				
化合物	类似物 号码	拮抗剂性质	激动剂性质	相对效力*
Rp-8-Br-cAMPS	LA-1001	有	无	1.00
Sp-8-Br-cAMPS	-	无	有	1.00
Rp-8-(2-FU)-cAMPS	LA-3026 LA-3001	有	无	0.37
Rp-8-(2-Br-5-FU)-cAMPS ×	LA-3027/ LA-3002	有	无	0.19
Rp-8-cPA-cAMPS	LA-3028	有	无	0.04
Rp-8-Phe-cAMPS	LA-3003	有	无	0.09
Rp-8-EthVin-cAMPS	LA-3004	有	无	0.26
Rp-8-Me-cAMPS	LA-3005	有	无	0.69
Rp-8-Ac-cAMPS	LA-3006	有	无	0.43
Rp-8-Eth-cAMPS	LA-3007	有	无	0.63
Rp-8-(1-OHEth)-cAMPS §	LA-3008			
Rp-8-(3-FU)-cAMPS	LA-3009	有	未试验	0.56
Rp-8-(3-TH)-cAMPS	LA-3010	有	未试验	0.02
Rp-8-(2-TH)-cAMPS	LA-3011	有	无	0.24
Rp-8-(3-Pyr)-cAMPS	LA-3012	有	无	0.11
Rp-8-(5-Me-2-FU)-cAMPS	LA-4006	有	无	0.35
Rp-8-苯并咪喃基-cAMPS	LA-4007	有	无	0.10
Rp-8-(5-MeO-2-FU)-cAMPS	LA-4008	有	无	0.25
Rp-8-(5-MeOH-2-FU)-cAMPS	LA-4010	有	无	0.15
Rp-8-(2'-N-Me-吡咯并 (pyrrolo))-cAMPS	LA-4013	有	无	0.35
Rp-8-(2-噻唑)-cAMPS	LA-4014	弱	无	-
Rp-8-(3-吡啶基)-cAMPS	LA-4015	无	无	-
Rp-8-(对-MeOH-Phe)-cAMPS	LA-4016	无	有	-

实施例 85

在小鼠逆转录病毒诱导的免疫缺陷,小鼠 AIDS 中实验原理的证明

图 1. 用 I 型 PKA 拮抗剂对被感染的小鼠进行的治疗降低了分泌 TNF- α 的 CD4 T 细胞的频率。通过胞质内染色来对 TNF- α 阳性细胞的频率进行评估。在使用葡萄球菌肠毒素 (SEB) 后或者在基础条件下对这些细胞进行分析。Rp-8-Br-cAMP 对 SEB 刺激的分泌的作用很显著, $p=0.0012$ 。Rp-8-咪喃基的作用也很显著, $p=0.0041$ 。

用 Rp-8-Br-cAMP 进行的治疗显著降低了被感染小鼠 CD4 T 细胞的

TNF- α 分泌(图 1)。MAIDS 的特征在于分泌 TNF- α 的 CD4⁺ T 细胞的频率自动或者在用 SEB 刺激后显著增加。对于被治疗的小鼠而言, 这种频率被降低至正常值。在 Rp-8-Br-cAMP 的情况中, 因为对抗-CD3 mAb 的增生响应实际增加, 所以其不会产生毒性作用。Rp-8-咪喃基-cAMP 抑制了得自被感染动物 CD4⁺ T 细胞的 TNF- α 分泌。在这些实验中, Rp-8-咪喃基-cAMP 和 Rp-8-Br-cAMP 对自动和 SEB-诱导的 CD4⁺ T 细胞进行的 TNF- α 分泌具有相似的作用(图 1)。Rp-8-Br-cAMP 和 Rp-8-(2-咪喃基)-cAMPs 治疗改变了得自被感染小鼠 CD4⁺ T 细胞的分泌性, 在用葡萄球菌肠毒素 SEB 进行刺激后, 略微增加了 IFN- γ (botshown) 和降低了 TNF- α 分泌。其表明用这类活性剂进行治疗可改善指向细胞内条件致病菌的 Th1 免疫响应, 同时有助于降低该综合征的炎性表现。

实施例 81 至 85 的实验细节

Cook 耦合的 PKA 酶试验

RI α 全酶复合体的制备:

通过用摩尔比为 1.2 至 1.0 的 PKA RI α 和 PKA C α 透析一整夜来形成全酶。进行三个 1 l 缓冲液变化(透析缓冲液: 20 mM MOPS pH 7.0, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 100 μ M ATP, 5 mM β -巯基-乙醇)来从该调节亚基上除去 cAMP。

全酶复合体形成试验和试验条件: 将全酶稀释(稀释缓冲液: 100 mM MOPS pH 7.0; 10 mM MgCl₂, 1 mM ATP, 1 mM DTT)至 1 μ M 的储备液并对其在 Cook 试验(试验混合物: 100 mM MOPS pH 7.0, 10 mM MgCl₂, 1 mM 磷酸烯醇丙酮酸, 1 mM ATP, 200 μ M NADH, 1 mM DTT, 15 U/ml 乳酸脱氢酶, 70 U/ml 丙酮酸激酶)中的活性进行试验。通过将 1 μ l 25 mM 肯普肽(该活性肽的终浓度为 200 μ M)与 1 μ l 全酶(终浓度为 10 nM)在 100 μ l 的试验混合物总体积中进行混合来开始反应。对 OD₃₄₀ 进行 1 分钟的监测并将 C α 的相对活性作图为 OD-decay/分钟的斜率。C α (<8% 被激活的复合体)仅有些微的残余活性表明几乎完全形成无活性的全酶复合体。

通过将浓度渐增的 cAMP 和 10 nM 全酶一起在试验混合物中预培

养 3 分钟来测定 cAMP 的活化常数 ($EC_{50} = 88 \text{ nM}$)。

RII α 全酶复合物 (holo complex) 的制备:

通过用摩尔比为 1.2 至 1.0 的 PKA RII α 和 PKA C α 透析一整夜来形成全酶。虽然 holo RII α 的形成不需要 ATP/Mg, 但是还是使用与形成 holo RI α 所用的透析缓冲液相同的透析缓冲液 (20 mM MOPS pH 7.0, 150 mM NaCl, 100 μ M ATP, 1mM MgCl₂), 这是因为在 Cook 试验中需要 ATP 并且这种缓冲液模拟了体内条件。在滴定实验前和滴定实验后对 1 μ M cAMP 的完全全酶形成 (holo formation) 和全酶活化 (holo activation) 进行检查。即使在冰上放置四周后, holo RII α 仍然表现出 21% 的 PKA C α 相同残余活性并且可以如新制备的那样被 cAMP 充分活化。

Rp-cAMPS 储备液的制备:

将所有的 Rp-cAMPS 类似物都以 10 mM 的终浓度溶解于具有 20% DMSO 的稀释缓冲液中并且用摩尔消光系数 λ_{max} 用分光光度测量来测定其浓度。通过用稀释缓冲液重复地以 1:10 倍的稀释比进行稀释来制备另外一些 Rp-cAMPS 类似物的稀释物。优选地向所说的试验混合物中加入 1 μ l, 但是不高于 5 μ l Rp-cAMPS 类似物。因此, 在最终的试验混合物中的 DMSO 浓度不高于 1%。对 DMSO 对试验酶的作用进行试验并且这些结果表明 1% 或更高的 DMSO 浓度对试验酶 (ADP 柱) 和 Holo RI α (C α , Holo RI α 和 cAMP 活化的 Holo RI α 柱) 没有作用。

cAMP 拮抗剂的体外竞争性配体结合试验 (Biacore 试验)

RI α 和 RII α 全酶复合物 (holo complex) 的制备:

通过用摩尔比为 1.2 至 1.0 的 PKA RI α 或 RII α 和 PKA C α 透析一整夜来形成全酶。进行三个 1 l 缓冲液变化 (透析缓冲液: 20 mM MOPS pH 7.0, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 100 μ M ATP, 5 mM β -巯基-乙醇) 来从该调节亚基上除去 cAMP。在之前的研究中使用这两种全酶复合物并对其进行试验。

Rp-8-AHA cAMPS 和 8-AHA cAMP 表面的制备: 将两种核苷酸溶解于 100 mM 硼酸盐缓冲液 (pH 8.5) 中至 3 mM 的浓度并用 EDC/NHS 通过标

准氨基偶合使其共价连接到 CM5 sensor chip 上。用未进行处理的 CM 葡聚糖表面作为空白表面。

用于表面竞争试验的实验条件:

仪器: Biacore 2000, Biacore AB, Uppsala, 瑞典

温度: 25°C

CM5 Chip(01.12.03): FC1: CM 葡聚糖(参考)

FC2: 3 mM Rp-8-AHA cAMPS

FC3: CM 葡聚糖

FC4: 3 mM 8-AHA cAMP

表面: FC1-FC2-FC3-FC4, 连续流

参考: FC1

电泳缓冲液 1: 20 mM MOPS pH 7.4, 150 mM NaCl, 100 μ M ATP, 5 mM MgCl₂, 0.005 % 吐温 20, 过滤并对其进行脱气

电泳缓冲液 2: 20 mM MOPS pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.005 % 吐温 20, 过滤并对其进行脱气

试验条件: 在具有 5 分钟解离时间的情况下, 用 kinject command 将 10 或 2 nM 全酶复合物(holo complex)注射 5 分钟。对于 holo RI α 而言使用电泳缓冲液 1, 对于 holo RII α 而言, 使用电泳缓冲液 2。用位于适宜范围内的十至十四种不同浓度的 PKA 激动剂或拮抗剂来测定这些 cAMP 类似物的 EC₅₀ 值。因此, 用 5 分钟的缔合时间后 Rp-8-AHA cAMPS 和 8-AHA cAMP 表面上的结合信号对化合物浓度的对数作图。

注射体积: 50 μ l

流速: 10 μ l/min

再生: 0.1 % SDS, 3 M 盐酸胍

用人 T 细胞进行的临床前试验, 在 HIV+ T 细胞中进行的离体临床试验。

外周血 CD3+ T 细胞的阴性选择:

通过用淋巴细胞分离剂溶液进行密度梯度离心而从棕黄层中常规分离出人外周血单核细胞(PBMC)。通过在 PBS 中进行洗涤来除去大部

分与 PBMC 一起被分离出来的血小板。从 PBMC 中进行的 T 淋巴细胞的分离是以用涂布有对抗各细胞特定标记物的单分散磁珠除去具有 CD14 表面标记物和具有 CD19 表面标记物的 B 淋巴细胞的单核细胞为基础的。

向各 50 mL 试管中分别加入 10 mL 棕黄层和 25 mL PBS 并对其进行混合。将 10 mL 淋巴细胞分离剂溶液堆积在该试管的底部并在最小制动的情况下将其在 $800 \times g$ 下在 4°C 下离心 25 分钟。分离出 PBMC 的层并将其在 PBS 中洗涤两次(在 $300 \times g$ 下在 4°C 下离心 7 分钟)。将该小丸混悬于 RPMI 1640/10 % FCS/PS 中并对 PBMC 的数目进行计数。用 MPC 在 RPMI 1640/10 % FCS/PS 中将 Dynabeads CD14 和 CD19 洗涤六次, 然后将其与 PBMC (3×10^7 个细胞/mL) 以 5: 1 的小珠: 细胞比例进行混合(估计 PBMC 包含 20% 的单核细胞和 20% 的 B 淋巴细胞)并在 4°C 下将其放置在摇摆的平台上。在 45 分钟后, 用 MPC 从该细胞混合物中除去明确选择的细胞(单核细胞和 B 淋巴细胞), 剩下一一种 T 淋巴细胞的混悬液。对 T 淋巴细胞的数目进行计数, 并将这些细胞用于这些试验中或者将其以 $1-2 \times 10^6$ 个细胞/mL RPMI 1640/10 % FCS/PS 混悬液的形式在 37°C 和 5 % CO_2 下进行培养。

增生试验:

进行增生试验以对各种 cAMP 类似物作为 T 淋巴细胞增生抑制剂或增强剂的效力进行研究。将成百上千的消极选择的 T 淋巴细胞以 100 μL RPMI 1640/10 % FCS/PS 的总体积在平底 96 孔微量滴定板的各孔中进行培养。通过以 $1:10^4$ (50 ng/mL) 的最终稀释度加入抗-CD3 抗体来完成这些细胞的活化, 随后, 通过以 1: 1 的小珠: 细胞比例加入涂覆有绵羊抗-小鼠 IgG 的磁珠来进行 TCR/CD3 复合体的交联。将这些小珠在 RPMI 1640/10 % FCS/PS 中用 MPC 洗涤六次, 然后将其加入到所说的细胞混悬液中。将这些细胞在 37°C 和 5 % CO_2 下培养 65 小时并在培养 48 小时后通过加入 5 μCi [甲基- ^3H]胸腺嘧啶核苷来对其增生进行检查。用多样品收获器来将这些细胞收集到滤板上, 将这些滤板在热恒温箱中在 50°C 下干燥 2 小时。向各孔中加入 20 μL 闪烁液,

随后用 β -闪烁计数来测量增生。所有的分析都是一式三份地进行的。

用 cAMP 类似物对活化 T 淋巴细胞进行的处理:

将 T 淋巴细胞用浓度渐增的各种 cAMP 类似物进行处理,在通过加入抗-CD3 抗体使这些化合物扩散到所说细胞来活化这些细胞前 30 分钟加入 cAMP 类似物。通过测量与 cAMP 类似物浓度有函数关系的 [甲基- ^3H]胸腺嘧啶核苷混入来测定各类似物抑制或刺激细胞增生的效力。

在小鼠逆转录病毒诱导的免疫缺陷,小鼠 AIDS 中实验原理的证明动物:

用包含引起 MAIDS 的缺陷病毒的病毒制剂(用 XC 噬菌斑测定进行滴定并包含 10^3 PFU 同向性病毒)对 C57BL6 小鼠进行感染并在感染后约 10 周时用不同的药理学活性剂对其进行处理。

处理:

在 10 天内,通过反复 IP 注射或渗透泵插入来将不同的化合物进行给药。对下面的物质进行试验:

-Rp-8-Br-cAMP : 1 mg/天/小鼠

-Rp-8-呋喃基-cAMP : 对两个试验剂量进行试验——1 mg/天/小鼠和 2.5 mg/天/小鼠

-罗非考昔: 60 μg /天/小鼠

分别用接受英脱利匹特 (intralipid) 或 PBS 注射的被感染小鼠作为罗非考昔或 Rp-Br/呋喃基-cAMP 的对照。各实验组通常包含 6 至 9 只动物。当在将动物处死后对细胞进行培养时,将不同的物质加入到培养基中。

增生和细胞因子试验:

在将动物处死后,将细胞在存在抗-CD3 mAb (2C11 : 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 的情况下培养 72 小时。在培养结束时向其中加入氘化胸腺嘧啶核苷并在闪烁分析器上测量其放射活性。

除在淋巴结淋巴细胞上进行作为对抗-CD3 Ab 响应的增生试验时,我们还测量了在用胞质内染色法用 SEB 活化 6 小时后 CD4 $^+$ T 细胞上 TNF α 的分泌。

实施例 86

(Sp) 8-(2-噻吩基)腺苷-2'-O-(叔-丁基二甲基甲硅烷基)-3',5'-环 N-苄基氨基磷酸酯(11b)

将氯化 2-噻吩基锌(0.3 ml, 1 M, 0.300 mmol)在 THF(2 ml)中的溶液在氩气下加入到(S) 8-溴腺苷-2'-O-(叔-丁基二甲基甲硅烷基)-3',5'-环 N-苄基氨基磷酸酯(0.122 g, 0.200 mmol)和四(三苯基膦)钯(0.046 g, 0.040 mmol)在 THF(2 ml)中的溶液中。将该反应混合物在温和回流下加热 3 小时。向该冷却了的反应混合物中加入饱和氯化铵水溶液(3 ml)和二氯甲烷(10 ml)加入到,将有机相用饱和盐水(2 × 3 ml)进行萃取,干燥(MgSO₄)并蒸馏掉溶剂。将残余物用硅胶闪柱色谱进行处理,用 MeOH:CH₂Cl₂ 1:20 进行洗脱;收率为 0.059 g(48%)。³¹P NMR(CDCl₃, 81 MHz): δ 8.3。 ¹H NMR(CDCl₃, 200 MHz): δ 0.11(s, 6H, CH₃Si), 0.88(s, 9H, (CH₃)₃C), 4.2-4.7(m, 5H, H4' H5' PhCH₂), 5.08(d, J 5.1 Hz, 1H, H2'), 5.28(s, 1H, NH), 5.5-5.6(m, 1H, H3'), 5.94(s, 1H, H1'), 6.53(bs, 2H, NH₂), 7.09(dd, J 4.0, 5.6 Hz, 1H, H4-噻吩基), 7.2-7.4(m, 7H, H-Ar), 8.10(s, 1H, H2)。

图1

