

# 5取代嘧啶开环核苷磷酸酯类化合物的合成及其抗病毒活性研究

冯继禄, 吴 广, 余建鑫, 刘 嘉, 牛春娟, 李 科 (第二军医大学药学院药物化学教研室, 上海 200433)

**摘要** 目的: 设计合成 5取代嘧啶开环核苷磷酸酯类新化合物并进行体外抗病毒活性实验。方法: 氯甲基氯乙基醚与三氟乙醇磷酸酯缩合后, 经碘 氯交换得碘代乙氧基甲基三氟乙醇磷酸酯侧链, 和 5取代嘧啶在 DBU 作用下缩合, 氯甲酸酯酰胺化, 设计合成得到 8 个新化合物 1a~1h。对合成的目标化合物进行了初步的体外抗乙肝病毒药理活性实验。结果: 设计合成的 8 个化合物对 HBsAg 和 HBeAg 都有一定的抑制作用, 其中化合物 1d 的抑制活性优于拉米夫定。结论: 5取代嘧啶开环核苷磷酸酯类化合物保持抗病毒活性, N6 位长链脂肪氯甲酸酯取代的化合物抗 HBV 病毒活性较好。

**关键词** 5取代嘧啶; 化学合成; 开环核苷类化合物; 抗乙肝病毒活性

**中图分类号**: R914.5      **文献标识码**: A      **文章编号**: 1006-0111(2009)05-0328-04

## Studies on synthesis and antiviral activities of 5-substituted pyrimidine acyclic nucleoside phosphonate compounds on HBV

FENG Jielu, WU Guang, YU Jianxin, LIU Jiachun, LIU Chunjuan, LI Ke (Department of Medicinal Chemistry, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

**ABSTRACT** Objective To study on synthesis and antiviral activities of 5-substituted pyrimidine acyclic nucleoside phosphonate compounds on HBV. Methods Starting with substituted pyrimidine, we synthesized 8 firstly reported compounds 1a~1h. Preliminary pharmacological test was made on HBV. Results The test results show the inhibitory rate of targeted compounds on HBsAg and HBeAg is normal but 1d is higher than lamivudine. Conclusion 5-substituted pyrimidine acyclic nucleoside phosphonate compounds keep the normal activities on HBV and introducing chain of chloroformate at N6 of pyrimidine shows better activity.

**KEY WORDS** 5-substituted pyrimidine, chemical synthesis, acyclic nucleoside, anti-HBV activity

### 1 前言

慢性乙型肝炎是一种慢性、进展性、致死性疾病。我国为病毒性肝炎的高流行区, 其流行特点为 HBsAg 阳性率高, 约占全球的 1/3, 多数在婴幼儿感染, 易发展成慢性。

目前治疗乙型肝炎的主要药物之一拉米夫定 (lamivudine, 2',3'-双脱氧-2'-巯胞苷), 由英国葛兰素史克研发生产。作为治疗艾滋病的核苷类 HIV 逆转录酶抑制剂<sup>[1]</sup>, 1998 年拉米夫定被美国 FDA 和我国 SDA 批准用于治疗慢性乙型肝炎。拉米夫定是胞嘧啶核苷类似物, 抑制 HBV DNA 聚合酶, 在治疗慢性乙型肝炎中显示了良好的作用。但在长期的单剂治疗过程中, 部分病人的乙型肝炎病毒 (HBV) 聚合酶基因区的酪氨酸 2 蛋氨酸 2 天门冬氨酸 2 天门冬氨酸基序 (tyrosine methionine 2

aspartic acid 2 aspartic acid, YMDD) 可产生基因变异, 其中编码蛋氨酸的 codon 550 出现核苷酸的替代<sup>[2]</sup>。至今已报告有两种常见的变异形式: M550V (伴随 L526M) 和 M550I 对拉米夫定的治疗产生了耐药性<sup>[3]</sup>。亚洲的一项研究表明, 拉米夫定用药 3 年 YMDD 变异的发生率为 46.7%<sup>[4]</sup>。在中国进行的拉米夫定临床实验结果显示 12.1% 的患者治疗 48 周时出现 YMDD 变异<sup>[5]</sup>。拉米夫定进入国内不到 5 年时间, 服用拉米夫定的乙肝患者近 30 万人次, 对其耐药患者已近 70%。乙肝患者需常年、多年连续用药, 因此拉米夫定耐药非常棘手, 不仅再用拉米夫定无效, 更严重的是当发生 YMDD 变异时, 会出现病情反复, 部分病人出现肝炎急性发作, 甚至肝功能衰竭而死亡。

人们尝试对此类药物进行结构修饰, 如: 引入磷酸酯, 避开限速步骤的第一步磷酸化反应, 将糖环打开, 保持化合物构象柔软性, 由此发展了一系列开环核苷磷化物, 成为近些年抗病毒药物研究的热点。

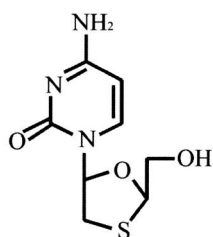
开环核苷磷化物是一类抗病毒感染的新化合

基金项目: 上海市 2004 年度重大科技攻关项目 (2004DZ19209) 1

作者简介: 冯继禄 (1982), 男, 硕士研究生。

通讯作者: 李科, Tel: (021) 81871237, E-mail: proflke@sina.com

物,由核苷类抗病毒药物的结构修饰发展而来<sup>[6]</sup>,开环核苷磷化物的抗病毒机制与环状核苷类似物基本一致,都是通过体内或病毒的核苷激酶活化成三磷酸代谢物,进而通过 DNA 聚合酶和逆转录酶抑制病毒复制。



拉米夫定 ( lamivudine)

本试验为取代胞嘧啶核苷类化合物的开环核苷磷化物的设计进行合成研究。参考 H o l y A<sup>[7]</sup>报道的合成路线,氯乙醇和多聚甲醛缩合得氯甲基氯乙基醚 (2),三氯化磷和三氟乙醇反应得三氟乙醇磷酸酯 (3)。氯甲基氯乙基醚 (2)和三氟乙醇磷酸酯 (3)缩合得氯代乙氧基甲基三氟乙醇磷酸酯 (4),再经碘 氯 交换得碘代乙氧基甲基三氟乙醇磷酸酯侧链 (5),侧链 (5)和 5 取代胞嘧啶在 DBU 作用下缩合得开环氟胞苷磷酸酯 (6),然后和氯甲酸酯反应,设计合成得到 8 个未见文献报道的 5 取代胞嘧啶开环核苷磷酯类新化合物 1 a 2 l h。对合成的目标化合物进行了初步的体外抗乙肝病毒药理活性实验。合成路线如图 1 所示。

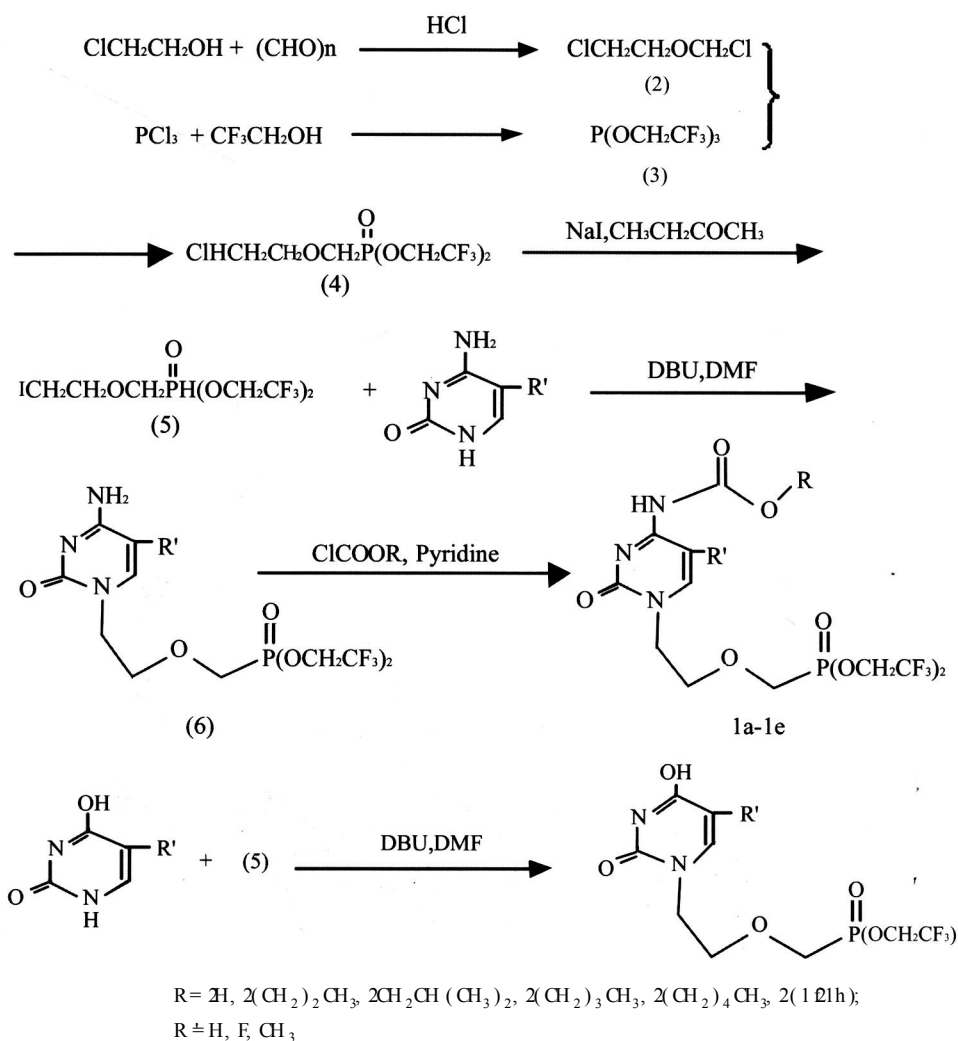


图 1 目标化合物合成路线

## 2 实验部分

2.1 仪器和材料 RY22型熔点仪,温度未经过校正;核磁共振氢谱用 Bruker AC2300P型仪器测定,CDCl<sub>3</sub>为溶剂,TMS为内标。药理实验采用酶联免

疫法(ELISA),阳性对照药拉米夫定由第二军医大学药学院药物化学教研室合成,结构经过确证,HPLC测试含量\ 99%。目标化合物合成所用试剂均为市售分析纯。

### 2.2 目标化合物的合成

2.2.1 氯乙基氯甲醚 (2) 的制备 31.6 g (1.09 mol) 粉碎的多聚甲醛加入到 84.6 g (70.5 mL, 1.05 mol) 2-氯乙醇中, 搅拌下通入干燥的氯化氢气体, 持续 24 h。停止搅拌后反应液分为两层, 分出下层, 加入石油醚 250 mL, 以氯化钙干燥, 持续搅拌 10 h。过滤后, 将滤液减压分馏, 收集沸程为 73~78 e / 20 mmHg 的馏分, 得 (2) 74.3 g 收率 54.9%。

2.2.2 三(2,2,2-三氟乙基)亚磷酸酯 (3) 的制备 向三氟乙醇 46 g (46 mmol) 中, 缓慢滴加三氯化磷 21 g (152 mmol), 12 h 滴加结束, 在 80~90 e 搅拌反应 4 h 蒸馏, 收集 95~100 e / 20 mmHg 的馏分, 得 41 g (3), 收率 81.9%。

2.2.3 92[双(2,2,2-三氟乙基)磷酰基甲氧基]乙基氯 (4) 的制备 氯乙基氯甲醚 18 g (140 mmol) 与三(2,2,2-三氟乙基)亚磷酸酯 40 g (122 mmol) 混合, 于 160 e 搅拌 5 h 减压蒸除溶剂。得液体 (4) 40.2 g

2.2.4 92[双(2,2,2-三氟乙基)磷酰基甲氧基]乙基碘 (5) 的制备 92[双(2,2,2-三氟乙基)磷酰基甲氧基]乙基氯 69 g (205 mmol) 和碘化钠 90 g (600 mmol), 溶于丁酮 1.6 L 中, 搅拌, 回流 8 h 冷却, 浓缩, 硅胶拌样, 上柱层析, 用氯仿:石油醚 = 1:1~1:2 得化合物 (5) 81 g 收率 92.3%。

2.2.5 5-氟 92[双(2,2,2-三氟乙基)磷酰基甲氧基]乙基胞嘧啶 (6) 的制备 5-氟胞嘧啶 7.0 g (54.2 mmol) 悬浮于 DMF 150 mL 中, 加入 DBU 7.8 mL, 80 e 反应 1 h 加入 92[双(2,2,2-三氟乙基)磷酰基

甲氧基]乙基碘 24 g (54.2 mmol), 100 e 反应 5 h 减压蒸除 DMF, 柱层析分离纯化, 氯仿:甲醇 = 10:1 淋洗, 得固体 14.8 g mp 133~135 e, 收率: 56%。

2.2.6 62E-丙氧基酰胺 5-氟 92[双(2,2,2-三氟乙基)磷酰基甲氧基]乙基胞嘧啶 (1a) 的制备 5-氟 92[双(2,2,2-三氟乙基)磷酰基甲氧基]乙基胞嘧啶 (7) 0.86 g (2 mmol) 溶于无水二氯甲烷 50 mL, 加入无水吡啶 0.2 mL, 滴加氯甲酸正丙酯 1 mL (自制), 室温搅拌 2 h 反应完全, 蒸除溶剂, 柱层析分离纯化, 用二氯甲烷:甲醇 = 30:1 淋洗, 得固体 11.0 g 即 62E-丙氧基酰胺 5-氟 92[双(2,2,2-三氟乙基)磷酰基甲氧基]乙基胞嘧啶 (1a)。mp 79.4~80.2 e, 收率: 72.2%。

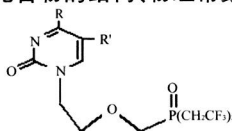
目标化合物 1b~1e 按同法制备。

2.2.7 5-氟 92[双(2,2,2-三氟乙基)磷酰基甲氧基]乙基尿嘧啶 (1g) 的制备 5-氟尿嘧啶 1.3 g (10.0 mmol) 悬浮于 DMF 10 mL 中, 加入 DBU 0.5 mL, 80 e 反应 1 h 加入 92[双(2,2,2-三氟乙基)磷酰基甲氧基]乙基碘 4.4 g (10.0 mmol), 100 e 反应 5 h 减压蒸除 DMF, 柱层析分离纯化, 氯仿:甲醇 = 10:1 淋洗, 得固体 3.2 g 即 5-氟 [92[双(2,2,2-三氟乙基)磷酰基甲氧基]乙基尿嘧啶 (1g)。

mp 126.4~127.2 e, 收率: 74.7%。目标化合物 1f~1h 按同法制备。

8 个目标化合物经光谱确证其结构, 理化性质即光谱数据见表 1。

表 1 目标化合物的结构、物理常数和 <sup>1</sup>H-NMR



编号	R	R'	mp(°C)	收率(%)	<sup>1</sup> H-NMR (CDCl <sub>3</sub> ) δ
1a	-NHCO <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	F	79.4~80.2	72.2	0.97-0.99 (m, 3H, -CH <sub>3</sub> ), 1.71-1.75 (t, 2H, -CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ), 3.86-3.88 (m, 2H, -OCH <sub>2</sub> P), 3.95-3.96 (m, 4H, NCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> O), 4.13-4.15 (m, 2H, -COOCH <sub>2</sub> ), 4.38-4.45 (m, 4H, OCH <sub>2</sub> CF <sub>3</sub> ), 7.42-7.43 (d, 1H, 4-H)
1b	-NHCO <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	F	75.1~76.4	75.8	0.97-0.98 (d, 6H, -CH <sub>3</sub> ), 2.01-2.03 (m, 1H, -CH), 3.86-3.87 (m, 2H, OCH <sub>2</sub> P), 3.94-3.97 (m, 6H, NCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> O), 4.14-4.16 (m, 2H, -COOCH <sub>2</sub> ), 4.39-4.44 (m, 4H, OCH <sub>2</sub> CF <sub>3</sub> ), 7.40-7.41 (d, 1H, 4-H)
1c	-NHCO <sub>2</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH <sub>3</sub>	F	84.4~85.3	72.7	0.93-0.98 (m, 3H, -CH <sub>3</sub> ), 1.41-1.45 (t, 2H, -CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ), 1.66-1.71 (m, 2H, -CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ), 3.86-3.87 (m, 2H, OCH <sub>2</sub> P), 3.94-3.95 (m, 4H, NCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> O), 4.17-4.20 (m, 2H, -COOCH <sub>2</sub> ), 4.37-4.46 (m, 4H, OCH <sub>2</sub> CF <sub>3</sub> ), 7.39-7.40 (d, 1H, 4-H)
1d	-NHCO <sub>2</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> CH <sub>3</sub>	F	67.3~68.1	74.9	0.89 (m, 3H, -CH <sub>3</sub> ), 1.31-1.39 (m, 4H, -CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ), 1.69-1.72 (m, 2H, -COOCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ), 3.86-3.87 (m, 2H, OCH <sub>2</sub> P), 3.94-3.96 (m, 4H, NCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> O), 4.16-4.19 (m, -COOCH <sub>2</sub> ), 4.38-4.44 (m, 4H, OCH <sub>2</sub> CF <sub>3</sub> ), 7.40-7.41 (d, 1H, 4-H)
1e	-NHCO <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	F	72.7~73.8	67.3	3.84-3.85 (m, 2H, OCH <sub>2</sub> P), 3.93-3.95 (m, 4H, NCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> O), 4.37-4.45 (m, 4H, OCH <sub>2</sub> CF <sub>3</sub> ), 5.20 (s, 2H, -COCH <sub>2</sub> ), 7.26-7.34 (m, 5H, Ph-H), 7.46-7.49 (d, 1H, 4-H)

编号	R	R'	mp(℃)	收率(%)	<sup>1</sup> H-NMR (CDCl <sub>3</sub> )δ
1f	OH	H	135.3 ~ 137.2	86.3	3.83-3.85 (m, 2H, OCH <sub>2</sub> P), 3.92-3.96 (m, 4H, NCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> O), 4.39-4.43 (m, 4H, OCH <sub>2</sub> CF <sub>3</sub> ), 5.64-5.66 (m, 1H, 4-H), 7.20-7.21 (d, 1H, 5-H)
1g	OH	F	126.4 ~ 127.2	74.7	3.84-3.88 (m, 2H, OCH <sub>2</sub> P), 4.02-4.22 (m, 4H, NCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> O), 4.38-4.47 (m, 4H, OCH <sub>2</sub> CF <sub>3</sub> ), 7.25-7.34 (m, 1H, 4-H)
1h	OH	CH <sub>3</sub>	115.4 ~ 116.8	78.7	1.89-1.90 (d, 3H, 5-CH <sub>3</sub> ), 3.82-3.84 (OCH <sub>2</sub> P), 3.89-3.91 (m, 2H, 2-H), 3.95-3.96 (m, 2H, 1-H), 4.38-4.44 (m, 4H, OCH <sub>2</sub> CF <sub>3</sub> ), 7.03 (s, 1H, 4-H)

### 2.3 药理实验

2.3.1 受试药溶剂及配制方法 试验时根据所设计剂量组浓度用 MEM 培养液配制。4e 冰箱保存。

2.3.2 阳性对照药 拉米夫定 (第二军医大学药学院药物化学教研室)。4e 冰箱保存。

2.3.3 体外细胞模型 乙型肝炎病毒 (HBV) DNA 克隆转染人肝癌细胞 (HepG2) 的 2.2.15 细胞 (HepG2 2.2.15 细胞)。

2.3.4 药物毒性试验 MTT 法检测样品对细胞的毒性, MTT (Aldrich)。

2.3.5 HBV 抗原检测 采用酶联免疫法 (ELISA) 检测样品对 HBsAg 和 HBeAg 的抑制作用。用 DMEM 培养液 (GIBCO), 培养液添加 10% 胎牛血清、G418 100 Lg/mL (GIBCO)、0.03% 谷氨酰胺, 用 0.23% HePes 调 pH 至 6.48。称取适量样品加 0.2 mL DMSO, 完全溶解后补加 3.79 mL 2% DMEM 过滤, 除菌得含药培养液, 用 0.06% 胰蛋白酶将 2.2.15 细胞分散成单个细胞悬液, 按 3 × 10<sup>4</sup> 细胞/孔浓度接种于 96 孔板, 2 d 后换用含药培养液。与细胞作用 12 d 后, 吸上清液做 ELISA 测定 HBsAg、HBeAg 的抑制率, 余下细胞用 MIF 法测定药物细胞毒性。实验结果见表 2。

表 2 目标化合物的抗 HBV 活性

化合物	BsAg (%)		HBeAg (%)	
	200 Lg/mL	100 Lg/mL	200 Lg/mL	100 Lg/mL
1a	8.1	6.6	10.2	8.9
1b	10.6	6.7	0	0
1c	34.1	29.7	20.4	8.3
1d	46.2	33.1	30.8	22.0
1e	10.3	9.0	/	/
1f	23.0	18.0	17.8	14.5
1g	20.9	15.5	/	/
1h	21.0	18.4	13.3	10.6
拉米夫定	34.9	20.2	23.1	10.0

### 3 结果和讨论

3.1 抗病毒活性实验结果表明: 设计合成的 8 个化合物对 HBsAg 和 HBeAg 都有一定的抑制作用, 其中化合物 1c、1d、1f 和 1h 活性较好。° 化合物 1d

对 HBsAg 和 HBeAg 的抑制活性均好于拉米夫定, 特别是对 HBeAg 表现较好的抑制活性, 值得进一步关注。» 同样浓度下目标化合物对 HBsAg 抑制活性强于对 HBeAg 抑制活性, 与核苷类抗病毒化合物的性质一致。

3.2 5<sup>2</sup>取代嘧啶开环核苷磷酸酯类化合物保持抗病毒活性; 5<sup>2</sup>氟胞嘧啶核苷类化合物 N6 氯甲酸酯取代对活性有一定影响, 长链脂肪氯甲酸酯取代的化合物抗 HBV 病毒活性较好, 柔性基团比刚性环状基团 (如苯基) 取代化合物如 1e 对抗 HBV 病毒活性更为有利; 在 N6 位引入较长碳链的正戊氧基的 1d 活性最佳。由于化合物的数量有限, 更深一步的构效关系, 有待于进一步的研究。

### 参考文献:

- [1] 陶佩珍. 抗艾滋病病毒药物研究进展 [J]. 中国新药杂志, 2002, 11(11): 842
- [2] Allen MJ, Deslauriers M, Andrews CW, et al. Identification and characterization of mutations in hepatitis B virus resistant to Lamivudine. Clinical Investigation Group [J]. Hepatology 1998; 27(6): 1670
- [3] Bartholomew MM, Jansen RW, Jeffers LJ, et al. Hepatitis B virus resistance to lamivudine given for recurrent infection after orthotopic liver transplantation [J]. Lancet 1997; 349(9044): 20.
- [4] Lai CL, Liav YF, Leung NWY, et al. Genotypic resistance to lamivudine in a prospective placebo-controlled multicentre study in Asia of lamivudine therapy for chronic hepatitis B infection: incidence, kinetics of emergence and correlation with disease parameters [J]. Hepatology 1997; 26(4): 259A.
- [5] Yao G. YMDD mutation in Chinese patients following lamivudine therapy for chronic hepatitis B infection [J]. Gastroenterology 1999; 116: 849
- [6] 李国秀, 李科, 梁峰. 基于 HIV/HBV 开环核苷化合物的抗病毒药物研究进展 [J]. 中华实用医药杂志, 2004, 4(20), 1862.
- [7] Holy A, Gunter J, Dvorakova H, et al. Structure-Activity Relationship in the Series of Pyrimidine and Purine N2-(2,2-Phosphonomethoxyethyl) Nucleotide Analogues. I. Derivatives Substituted at the Carbon Atoms of the Base [J]. J Med Chem, 1999, 42: 2064