



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102070670 A

(43) 申请公布日 2011. 05. 25

(21) 申请号 200910102876. 6

(22) 申请日 2009. 11. 20

(71) 申请人 贵阳医学院

地址 550004 贵州省贵阳市云岩区北京路 9 号

(72) 发明人 傅晓钟 王永林 兰燕宇 王爱民
李勇军 罗春 欧瑜 黄勇 郑林
周雯

(51) Int. Cl.

C07F 9/6561 (2006. 01)

A61K 31/675 (2006. 01)

A61P 31/20 (2006. 01)

A61P 1/16 (2006. 01)

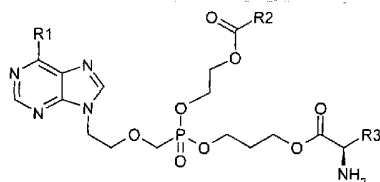
权利要求书 3 页 说明书 18 页

(54) 发明名称

一类治疗乙型肝炎的嘌呤类衍生物、其制备方法
与用途

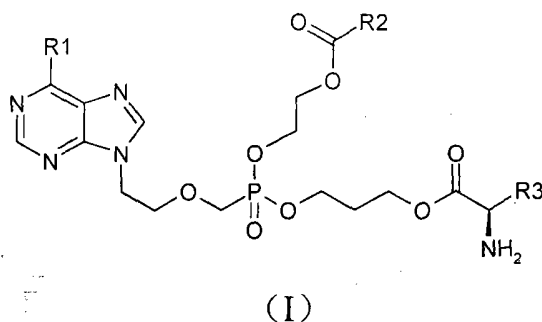
(57) 摘要

本发明设计药物化学领域。具体地本发明涉及一类能够治疗乙型肝炎的具有以下结构通式 I 所示结构的嘌呤类化合物及其药理上可接受的无机或有机酸盐、及其制备方法与用途。药理实验证明,这类化合物具有明显的抗乙肝病毒活性,可用于制备抗病毒药物中的应用。



(I)

1. 一类具有以下结构式 (I) 所示的嘌呤类化合物及其药理上可以接受的有机、无机盐结晶水合物、溶剂合物。



其中

R1 为氨基；

R2 为非甾类抗炎药阿司匹林酰基、布洛芬酰基、氟比洛芬酰基；

R3 为烃基或氢原子。

2. 如权利要求 1 所述的嘌呤类化合物，其特征再于，所述化合物为：

1) 9-[2-(磷酸基甲氧基)乙基]腺嘌呤单 N-叔丁氧羰基 L-缬氨酸丙基酯，单阿司匹林丙基酯

2) 9-[2-(磷酸基甲氧基)乙基]腺嘌呤单 N-叔丁氧羰基 L-亮氨酸丙基酯，单阿司匹林丙基酯

3) 9-[2-(磷酸基甲氧基)乙基]腺嘌呤单 N-叔丁氧羰基 L-异亮氨酸丙基酯，单阿司匹林丙基酯

4) 9-[2-(磷酸基甲氧基)乙基]腺嘌呤单 N-叔丁氧羰基 L-苯丙氨酸丙基酯，单阿司匹林丙基酯

5) 9-[2-(磷酸基甲氧基)乙基]腺嘌呤单 N-叔丁氧羰基甘氨酸丙基酯，单布洛芬丙基酯

6) 9-[2-(磷酸基甲氧基)乙基]腺嘌呤单 N-叔丁氧羰基 L-丙氨酸丙基酯，单布洛芬丙基酯

7) 9-[2-(磷酸基甲氧基)乙基]腺嘌呤单 N-叔丁氧羰基 L-缬氨酸丙基酯，单布洛芬丙基酯

8) 9-[2-(磷酸基甲氧基)乙基]腺嘌呤单 N-叔丁氧羰基 L-亮氨酸丙基酯，单布洛芬丙基酯

9) 9-[2-(磷酸基甲氧基)乙基]腺嘌呤单 N-叔丁氧羰基 L-异亮氨酸丙基酯，单布洛芬丙基酯

10) 9-[2-(磷酸基甲氧基)乙基]腺嘌呤单 N-叔丁氧羰基 L-苯丙氨酸丙基酯，单布洛芬丙基酯

11) 9-[2-(磷酸基甲氧基)乙基]腺嘌呤单 N-叔丁氧羰基甘氨酸丙基酯，单氟比洛芬丙基酯

12) 9-[2-(磷酸基甲氧基)乙基]腺嘌呤单 N-叔丁氧羰基 L-丙氨酸丙基酯，单氟比洛芬丙基酯

13) 9-[2-(磷酸基甲氧基)乙基]腺嘌呤单 N-叔丁氧羰基 L-缬氨酸丙基酯，单氟比洛

芬丙基酯

14) 9-[2-(膦酰基甲氧基)乙基]腺嘌呤单 N-叔丁氧羰基 L-亮氨酸丙基酯, 单氟比洛芬丙基酯的合成

15) 9-[2-(膦酰基甲氧基)乙基]腺嘌呤单 N-叔丁氧羰基 L-异亮氨酸丙基酯, 单氟比洛芬丙基酯

16) 9-[2-(膦酰基甲氧基)乙基]腺嘌呤单 N-叔丁氧羰基 L-苯丙氨酸丙基酯, 单氟比洛芬丙基酯

17) 9-[2-(膦酰基甲氧基)乙基]腺嘌呤单 L-缬氨酸丙基酯, 单阿司匹林丙基酯

18) 9-[2-(膦酰基甲氧基)乙基]腺嘌呤单 L-亮氨酸丙基酯, 单阿司匹林丙基酯

19) 9-[2-(膦酰基甲氧基)乙基]腺嘌呤单 L-异亮氨酸丙基酯, 单阿司匹林丙基酯

20) 9-[2-(膦酰基甲氧基)乙基]腺嘌呤单 L-苯丙氨酸丙基酯, 单阿司匹林丙基酯

21) 9-[2-(膦酰基甲氧基)乙基]腺嘌呤单甘氨酸丙基酯, 单布洛芬丙基酯

22) 9-[2-(膦酰基甲氧基)乙基]腺嘌呤单 L-丙氨酸丙基酯, 单布洛芬丙基酯

23) 9-[2-(膦酰基甲氧基)乙基]腺嘌呤单 L-缬氨酸丙基酯, 单布洛芬丙基酯

24) 9-[2-(膦酰基甲氧基)乙基]腺嘌呤单 L-亮氨酸丙基酯, 单布洛芬丙基酯

25) 9-[2-(膦酰基甲氧基)乙基]腺嘌呤单 L-异亮氨酸丙基酯, 单布洛芬丙基酯

26) 9-[2-(膦酰基甲氧基)乙基]腺嘌呤单 L-苯丙氨酸丙基酯, 单布洛芬丙基酯

27) 9-[2-(膦酰基甲氧基)乙基]腺嘌呤单甘氨酸丙基酯, 单氟比洛芬丙基酯

28) 9-[2-(膦酰基甲氧基)乙基]腺嘌呤单 L-丙氨酸丙基酯, 单氟比洛芬丙基酯

29) 9-[2-(膦酰基甲氧基)乙基]腺嘌呤单 L-缬氨酸丙基酯, 单氟比洛芬丙基酯

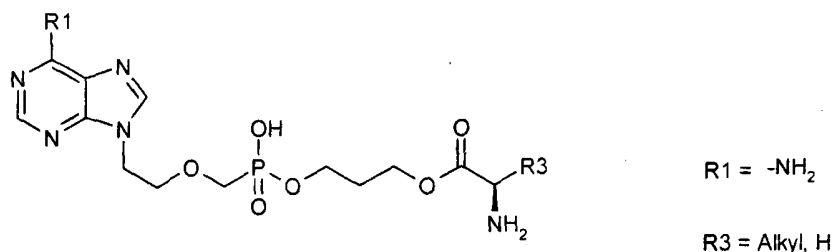
30) 9-[2-(膦酰基甲氧基)乙基]腺嘌呤单 L-亮氨酸丙基酯, 单氟比洛芬丙基酯的合成

31) 9-[2-(膦酰基甲氧基)乙基]腺嘌呤单 L-异亮氨酸丙基酯, 单氟比洛芬丙基酯

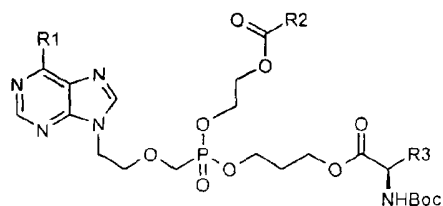
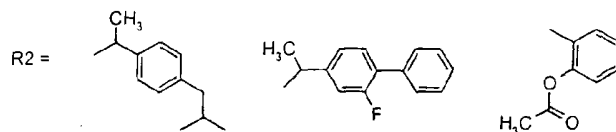
32) 9-[2-(膦酰基甲氧基)乙基]腺嘌呤单 L-苯丙氨酸丙基酯, 单氟比洛芬丙基酯

3. 一种用于制备权利要求 1 的嘌呤类化合物的方法, 其特征在于所述方法包括以下步骤:

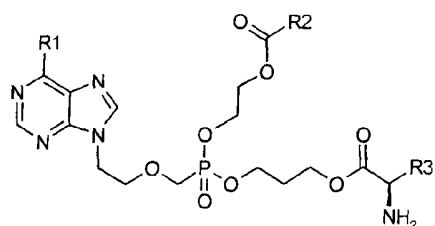
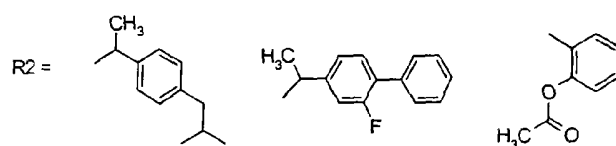
(1) 9-[2-(膦酰基甲氧基)乙基]腺嘌呤 (PMEA) 与 N-叔丁氧羰基-L-氨基酸 3-溴丙基酯在极性非质子溶剂中, 以 N, N'-二环己基-4-吗啉基-脒 (DCMC) 或 1,8-二氮杂双环 [5.4.0] 十一烷-7 烯为碱, 反应得到化合物。



(2) 上述步骤 1) 得到的化合物后不经分离, 即加入适当比例的阿司匹林 3-溴丙基酯、布洛芬 3-溴丙基酯或氟比洛芬 3-溴丙基酯, 升高反应温度使步骤 1) 中得到的化合物与非甾体抗炎药物 3-溴丙基酯缩合生成 9-[2-(膦酰基甲氧基)乙基]腺嘌呤单 N-叔丁氧羰基 L-氨基酸丙酯, 单非甾体抗炎药丙基酯:

R¹ = -NH₂R³ = Alkyl, H

(3) 上述步骤 2) 得到的化合物在极性或非极性溶剂中用适量 85% 的磷酸溶液或乙酰氯 / 甲醇体系脱去叔丁氧羰基保护得到目标化合物。

R¹ = -NH₂R³ = Alkyl, H

4. 如权利要求 3 所述的方法, 其特征在于, 在步骤 1) 中 N-叔丁氧羰基-L-氨基酸 3-溴丙基酯加入量与 9-[2-(磷酸基甲氧基)乙基]腺嘌呤的比例为 1.0 ~ 5.5 : 1mol, 在 30~90℃ 下反应 4 ~ 48 小时, 优选 N-叔丁氧羰基-L-氨基酸 3-溴丙基酯与 9-[2-(磷酸基甲氧基)乙基]腺嘌呤的比例为 1.0 ~ 2.0 : 1mol 以 N,N'-二环己基-4-吗啉基-脒 (DCMC) 为碱, 在 N,N'-二甲基甲酰胺为溶剂条件下, 在 30 ~ 60℃ 下反应 4 ~ 10 小时。

5. 如权利要求 3 所述的方法, 其特征在于, 在步骤 2) 中非甾体抗炎药 3-溴丙基酯加入量与 9-[2-(磷酸基甲氧基)乙基]腺嘌呤的比例为 1.0 ~ 5.5 : 1mol, 在 60 ~ 120℃ 下反应 10 ~ 48 小时, 优选非甾体抗炎药 3-溴丙基酯与 9-[2-(磷酸基甲氧基)乙基]腺嘌呤比例为 1.0 ~ 2.0 : 1mol, 体系在 60 ~ 100℃ 反应 10 ~ 18 小时。

6. 如权利要求 3 所述的方法, 其特征在于, 在步骤 3) 溶剂可以选用氯仿、二氯甲烷或四氢呋喃, 或者在乙酰氯 / 甲醇体系中, 在 -10 ~ 25℃ 下反应 0.2 ~ 16 小时, 优选在氯仿为溶剂条件下, 体系用 85% 磷酸在 -5℃ ~ 室温下反应 8 ~ 12 小时, 或乙酰氯 / 甲醇体系 0℃ ~ 25℃ 反应 5-12 小时, 获得目标化合物。

7. 一种药物组合, 其特征在于包括有效治疗剂量的权利要求 1 的嘌呤类化合物、以及辅剂。

8. 权利要求 1 所述的嘌呤类化合物在制备用于治疗乙型肝炎的药物中的应用。

9. 权利要求 1 所述的嘌呤类化合物在治疗乙型肝炎的药物中的应用。

一类治疗乙型肝炎的嘌呤类衍生物、其制备方法与用途

技术领域

[0001] 本发明涉及药物合成和药理学领域。具体地,涉及含有 L-氨基酸和非甾类抗炎药基团的非环核苷磷酸酯类化合物及其组合物的制备方法,以及该类化合物在制备抗病毒药物中的用途。

背景技术

[0002] 乙型肝炎病毒 (Hepatitis B Virus, HBV),是最易感染人类的病毒之一。WHO 报告认为全球有超过 20 亿人曾被感染,目前仍约有 3.5-4 亿为慢性 HBV 感染者。统计表明世界上有 80% 的肝癌病例都是由于乙肝病毒感染而引起的,此外乙肝病毒感染也是引起肝衰竭的主要原因,全世界每年约有一百万人死于与乙型肝炎病毒感染相关的肝疾病。当前,治疗乙型肝炎病毒感染主要有两个途径:一是免疫治疗,如 α 干扰素;二是针对病毒靶点进行抗病毒治疗,如核苷类化合物(包括核苷类似物和非环核苷磷酸酯)。目前已有三个非环核苷磷酸酯类药物上市,其中阿德福韦酯 (Adefovir Dipivoxil, ADV) 是 2002 年经 FDA 批准第一个用于治疗慢性乙肝的小分子非环核苷磷酸前药,该药能明显改善乙型肝炎患者肝脏组织学性质,降低血清 HBV-DNA 及转氨酶水平,增加 e 抗原 (HBeAg) 转化率 (Yuen, M.-F. Expert Opin Pharmacother 2004,5, (11):2361)。尽管阿德福韦酯具有以上优点,但是临床研究发现其不足是产生剂量依赖性肾毒性,释放出具有细胞毒性的特戊酸和甲醛,同时化合物在胃肠液中稳定性较差,不能有效增加作用靶点的药物浓度 (Roula B. Clinical Therapeutics 2003,25(12):3084; Nozomu T. Human Pathology 2001,32(7)734; Douglass, H. S. Am J Physiol RenalPhysiol. 2001,281, F 197)。研究表明 Adefovir Dipivoxil 设计上是将外源性的片段与非环核苷磷酸通过酯键相连接,因而在释放原药阿德福韦的过程中可能会产生有细胞毒性的载体片段;另外该前药设计上没有考虑到如何降低载体裂解后形成的磷酸双负离子所产生的剂量依赖性肾毒性,从而在一定程度上可能限制这些前药的临床应用。

[0003] 在前期研究中我们根据小肠黏膜肽转运体 (PEPT1) 对寡肽的主动转运机理和已报道的核苷 L-氨基酸酯类抗病毒前药的设计原理 (Isabel, Rubio-A. Trends Pharmacol Sci 2003,23, (9):434),设计、合成了未见报道的新型阿德福韦双 L-氨基酸酯前药。抗 HBV 活性研究发现该类化合物具有较阿德福韦酯更强的抗 HBV 活性,更低的细胞毒性和更高的血浆稳定性 (Xiaozhong Fu. Bioorg MedChem Lett. 2007,17(2):465-470)。

[0004] 通过对阿德福韦酯产生剂量依赖性肾毒性的病因学机制研究发现,药物进入血液循环后裂解形成的阿德福韦磷酸双负离子能被存在于肾小管基底膜上的有机阴离子转运体 1 (hOAT1) 跨膜转运而沉积于肾脏近曲小管内,后者通过抑制近曲小管上皮细胞线粒体 DN(mtDNA) 的复制从而使 mtDNA 耗竭,并最终降低由 mtDNA 编码的细胞色素 C 氧化酶 (COX) 水平,破坏上皮细胞氧化呼吸过程是药物产生肾毒性的根本原因 (Edmund, S. H. J Am Soc Nephrol. 2000,11,383; Roula B. Clinical Therapeutics 2003,25(12):3084)。药理学研究发现在阿德福韦的治疗浓度下,非甾体抗炎药 (NSAIDs) 如布洛芬 (Ibuprofen),酮

洛芬 (Ketoprofen), 氟比洛芬 (Flurbiprofen), 萘普生 (Naproxen) 等能有效抑制 hOAT1 介导的阿德福韦跨肾小管基底膜转运过程并降低后者产生的肾细胞毒性, 非甾体抗炎药对阿德福韦的转运抑制机理与丙磺舒相同, 且其半数抑制浓度低于丙磺舒, 研究同时还发现 NSAIDs 不影响阿德福韦酯的抗病毒活性。另外上述 NSAIDs 对表达 hOAT1 的中国仓鼠卵巢细胞 (CHO^{hOAT}) 生长的半数抑制浓度远大于其对 hOAT1 介导的阿德福韦跨肾小管基底膜转运的半数抑制浓度 (Andrew, S. M. J Pharmacol Exp The. 2000, 295, 10 ; Tomas Cihlar Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids, 2001, 20 (4-7) :641)。研究同时发现可以利用 hOAT1 介导的非甾体抗炎药与阿德福韦之间的相互转运拮抗关系实现临床上降低两类药物肾毒性而不降低其治疗效果的策略 (Douglas H. S. Toxicology and Applied Pharmacology 2005, 204, 198)。这些研究表明 NSAIDs 在不产生细胞毒性的前提下可以有效抑制肾小管上皮细胞对阿德福韦吸收, 减少阿德福韦的肾细胞毒性。

[0005] 本专利以降低阿德福韦酯临床应用中产生的剂量依耐性肾毒性为关键突破口, 以具有较高抗 HBV 活性与较低细胞毒性的阿德福韦双 L- 氨基酸酯为先导化合物, 运用药物设计中的结构拼合原理将 L- 氨基酸与非甾体抗炎药物结构片段同时引入阿德福韦的磷酸基团上设计、合成阿德福韦单 L- 氨基酸酯, 单非甾体抗炎药物羧酸酯前药, 旨在利用前药结构中的 L- 氨基酸酯片段提高其抗 HBV 活性与作用选择性, 利用非甾体抗炎药物片段降低其肾毒性, 以期发现具有较高抗病毒活性、较低肾毒性的抗 HBV 阿德福韦前药。从而实现降低阿德福韦酯临床应用中出现的剂量依赖性肾毒性同时提高药物的抗 HBV 活性的目的。

发明内容

[0006] 本发明的目的是提供一类具有抗乙肝病毒活性的嘌呤类化合物及其药理上可以接受的无机或有机盐结晶水合物、溶剂合物。

[0007] 本发明的另一目的是提供上述化合物的制备方法

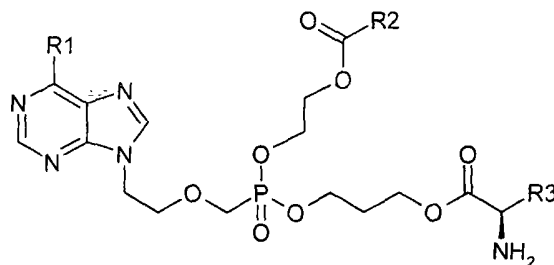
[0008] 本发明的再一目的是提供包含上述化合物的药物组合物

[0009] 本发明的再一目的是提供上述化合物的医药用途

[0010] 本发明的再一目的是提供上述组合物的医药用途

[0011] 本发明提供了一类具有以下结构式 I 所示结构的嘌呤类化合物及其药理上可以接受的无机或有机盐结晶水合物、溶剂合物。

[0012]



(I)

[0013] 其中,

[0014] R1 为氨基;

[0015] R2 为非甾体抗炎药阿司匹林酰基、布洛芬酰基、氟比罗芬酰基;

[0016] R3 为烃基或氢原子。

[0017] 优选地,本发明的代表性化合物可以为以下化合物:

[0018] 1) 9-[2-(膦酰基甲氧基) 乙基] 腺嘌呤单 N- 叔丁氧羰基 L- 缬氨酸丙基酯,单阿司匹林丙基酯

[0019] 2) 9-[2-(膦酰基甲氧基) 乙基] 腺嘌呤单 N- 叔丁氧羰基 L- 亮氨酸丙基酯,单阿司匹林丙基酯

[0020] 3) 9-[2-(膦酰基甲氧基) 乙基] 腺嘌呤单 N- 叔丁氧羰基 L- 异亮氨酸丙基酯,单阿司匹林丙基酯

[0021] 4) 9-[2-(膦酰基甲氧基) 乙基] 腺嘌呤单 N- 叔丁氧羰基 L- 苯丙氨酸丙基酯,单阿司匹林丙基酯

[0022] 5) 9-[2-(膦酰基甲氧基) 乙基] 腺嘌呤单 N- 叔丁氧羰基甘氨酸丙基酯,单布洛芬丙基酯

[0023] 6) 9-[2-(膦酰基甲氧基) 乙基] 腺嘌呤单 N- 叔丁氧羰基 L- 丙氨酸丙基酯,单布洛芬丙基酯

[0024] 7) 9-[2-(膦酰基甲氧基) 乙基] 腺嘌呤单 N- 叔丁氧羰基 L- 缬氨酸丙基酯,单布洛芬丙基酯

[0025] 8) 9-[2-(膦酰基甲氧基) 乙基] 腺嘌呤单 N- 叔丁氧羰基 L- 亮氨酸丙基酯,单布洛芬丙基酯

[0026] 9) 9-[2-(膦酰基甲氧基) 乙基] 腺嘌呤单 N- 叔丁氧羰基 L- 异亮氨酸丙基酯,单布洛芬丙基酯

[0027] 10) 9-[2-(膦酰基甲氧基) 乙基] 腺嘌呤单 N- 叔丁氧羰基 L- 苯丙氨酸丙基酯,单布洛芬丙基酯

[0028] 11) 9-[2-(膦酰基甲氧基) 乙基] 腺嘌呤单 N- 叔丁氧羰基甘氨酸丙基酯,单氟比洛芬丙基酯

[0029] 12) 9-[2-(膦酰基甲氧基) 乙基] 腺嘌呤单 N- 叔丁氧羰基 L- 丙氨酸丙基酯,单氟比洛芬丙基酯

[0030] 13) 9-[2-(膦酰基甲氧基) 乙基] 腺嘌呤单 N- 叔丁氧羰基 L- 缬氨酸丙基酯,单氟比洛芬丙基酯

[0031] 14) 9-[2-(膦酰基甲氧基) 乙基] 腺嘌呤单 N- 叔丁氧羰基 L- 亮氨酸丙基酯,单氟比洛芬丙基酯的合成

[0032] 15) 9-[2-(膦酰基甲氧基) 乙基] 腺嘌呤单 N- 叔丁氧羰基 L- 异亮氨酸丙基酯,单氟比洛芬丙基酯

[0033] 16) 9-[2-(膦酰基甲氧基) 乙基] 腺嘌呤单 N- 叔丁氧羰基 L- 苯丙氨酸丙基酯,单氟比洛芬丙基酯

[0034] 17) 9-[2-(膦酰基甲氧基) 乙基] 腺嘌呤单 L- 缬氨酸丙基酯,单阿司匹林丙基

[0035] 18) 9-[2-(膦酰基甲氧基) 乙基] 腺嘌呤单 L- 亮氨酸丙基酯,单阿司匹林丙基酯

[0036] 19) 9-[2-(膦酰基甲氧基) 乙基] 腺嘌呤单 L- 异亮氨酸丙基酯,单阿司匹林丙基酯

[0037] 20) 9-[2-(膦酰基甲氧基) 乙基] 腺嘌呤单 L- 苯丙氨酸丙基酯,单阿司匹林丙基

酯

- [0038] 21) 9-[2-(膦酰基甲氧基) 乙基] 腺嘌呤单甘氨酸丙基酯, 单布洛芬丙基酯
- [0039] 22) 9-[2-(膦酰基甲氧基) 乙基] 腺嘌呤单 L- 丙氨酸丙基酯, 单布洛芬丙基酯
- [0040] 23) 9-[2-(膦酰基甲氧基) 乙基] 腺嘌呤单 L- 缬氨酸丙基酯, 单布洛芬丙基酯
- [0041] 24) 9-[2-(膦酰基甲氧基) 乙基] 腺嘌呤单 L- 亮氨酸丙基酯, 单布洛芬丙基酯
- [0042] 25) 9-[2-(膦酰基甲氧基) 乙基] 腺嘌呤单 L- 异亮氨酸丙基酯, 单布洛芬丙基酯
- [0043] 26) 9-[2-(膦酰基甲氧基) 乙基] 腺嘌呤单 L- 苯丙氨酸丙基酯, 单布洛芬丙基酯
- [0044] 27) 9-[2-(膦酰基甲氧基) 乙基] 腺嘌呤单甘氨酸丙基酯, 单氟比洛芬丙基酯
- [0045] 28) 9-[2-(膦酰基甲氧基) 乙基] 腺嘌呤单 L- 丙氨酸丙基酯, 单氟比洛芬丙基酯
- [0046] 29) 9-[2-(膦酰基甲氧基) 乙基] 腺嘌呤单 L- 缬氨酸丙基酯, 单氟比洛芬丙基酯
- [0047] 30) 9-[2-(膦酰基甲氧基) 乙基] 腺嘌呤单 L- 亮氨酸丙基酯, 单氟比洛芬丙基酯

的合成

- [0048] 31) 9-[2-(膦酰基甲氧基) 乙基] 腺嘌呤单 L- 异亮氨酸丙基酯, 单氟比洛芬丙基酯

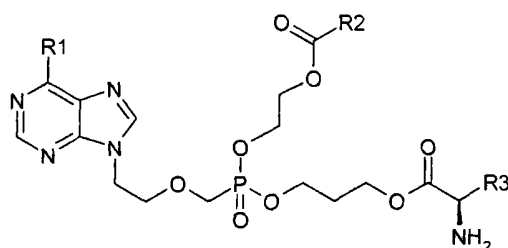
酯

- [0049] 32) 9-[2-(膦酰基甲氧基) 乙基] 腺嘌呤单 L- 苯丙氨酸丙基酯, 单氟比洛芬丙基酯

酯

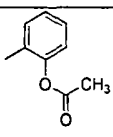

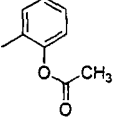
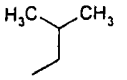
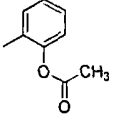

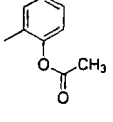
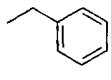
- [0050] 本发明代表化合物的结构式见表 1

[0051]



- [0052] 表 1 本发明代表化合物 17-32 结构式

[0053]

化合物编号	R1	R2	R3
17	-NH ₂		
18	-NH ₂		
19	-NH ₂		
20	-NH ₂		

[0054]

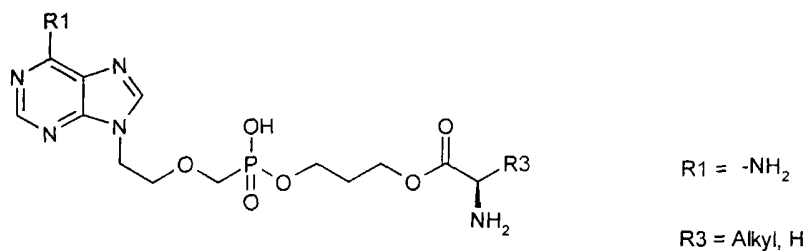
21	-NH ₂		-H
22	-NH ₂		-CH ₃
23	-NH ₂		
24	-NH ₂		
25	-NH ₂		
26	-NH ₂		
27	-NH ₂		-H
28	-NH ₂		-CH ₃
29	-NH ₂		
30	-NH ₂		
31	-NH ₂		
32	-NH ₂		

[0055] 本发明还提供了制备上述化合物的方法

[0056] 制备上述化合物的方法包括以下步骤：

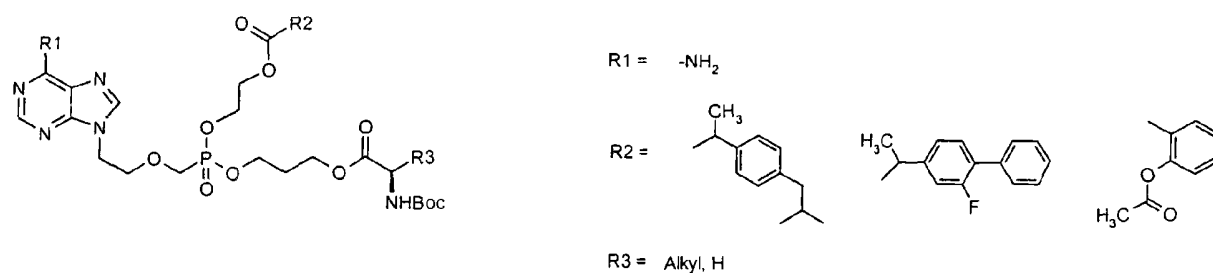
[0057] (1) 9-[2-(磷酸基甲氧基)乙基]腺嘌呤 (PMEA) 与 N-叔丁氧羰基-L-氨基酸 3-溴丙基酯在极性非质子溶剂中, 以 N, N'-二环己基-4-吗啉基-脒 (DCMC) 或 1,8-二氮杂双环[5.4.0]十一烷-7-烯为碱, 反应得到化合物：

[0058]



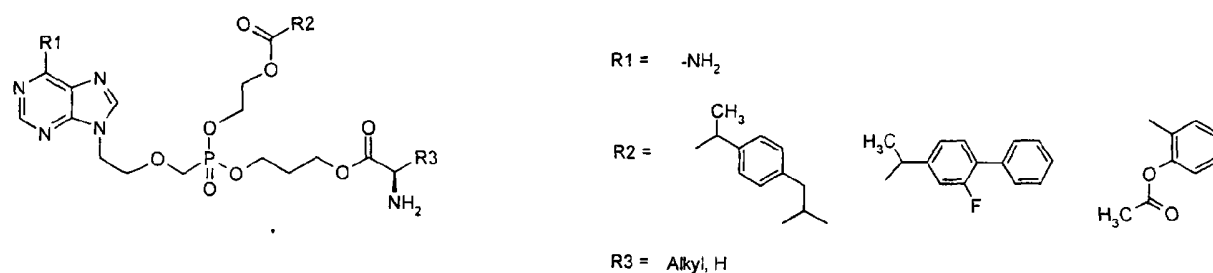
[0059] (2) 上述步骤 1) 得到的化合物后不经分离,即加入适当比例的阿司匹林 3- 溴丙基酯、布洛芬 3- 溴丙基酯或氟比洛芬 3- 溴丙基酯,升高反应温度使步骤 1) 中得到的化合物与非甾体抗炎药物 3- 溴丙基酯缩合生成 9-[2-(磷酸基甲氧基) 乙基] 腺嘌呤单 N- 叔丁氧羰基 L- 氨基酸丙酯,单非甾体抗炎药丙基酯:

[0060]



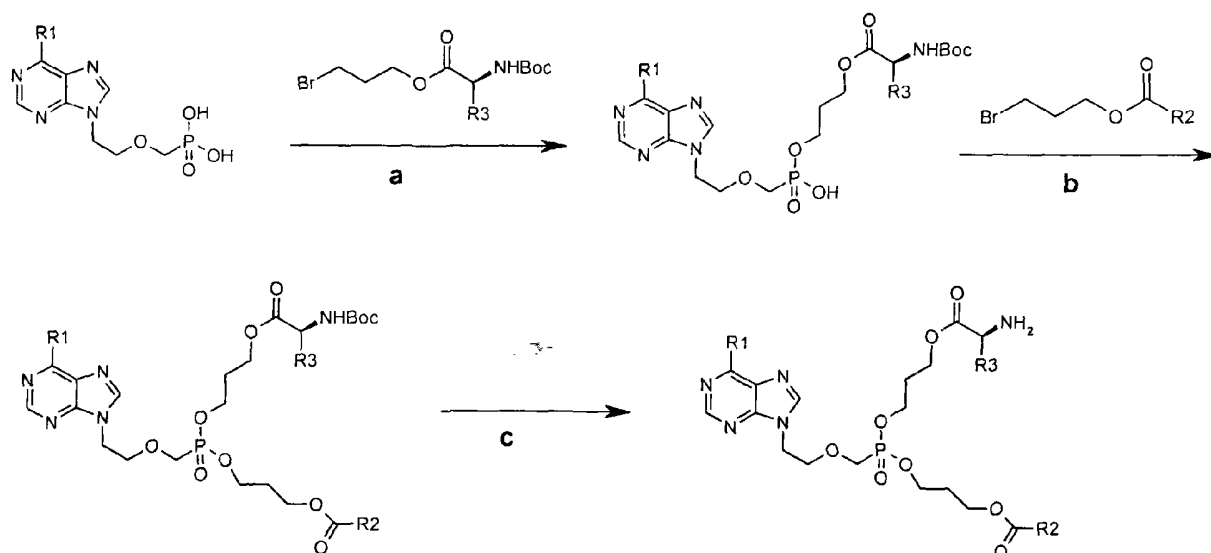
[0061] (3) 上述步骤 2) 得到的化合物在极性或非极性溶剂中用适量 85% 的磷酸溶液或乙酰氯 / 甲醇体系脱去叔丁氧羰基得到目标化合物:

[0062]



[0063] 具体地目标化合物的制备方法如流程 (I) 所示:

[0064]



[0065] 其中, a : N, N' - 二环己基 -4- 吗啉基 - 脒 (DCMC), N, N- 二甲基甲酰胺, 30 ~ 60℃; b : N, N' - 二环己基 -4- 吗啉基 - 脒 (DCMC), N, N- 二甲基甲酰胺, 60 ~ 120℃; c : 85% 磷酸溶液 / 氯仿或乙酰氯 / 甲醇, -5℃ ~ 25℃。

[0066] 流程 (I) 的实施方式详细说明如下:

[0067] 1、以 N- 叔丁氧羰基 -L- 氨基酸, 非甾体抗炎药物 (阿司匹林、布洛芬、氟比洛芬) 与 3- 溴 -1 丙醇为反应原料按照文献报道方法合成 N- 叔丁氧羰基 -L- 氨基酸 3- 溴丙基酯与非甾体抗炎药物 3- 溴丙基酯 (Tetrahedron Lett. 1979, 20, (40), 3811-3814. J. Chem. Res. 1991, 10, 292-302) ;

[0068] 2、N- 叔丁氧羰基 -L- 氨基酸 3- 溴丙基酯与 9-[2-(磷酸基甲氧基) 乙基] 腺嘌呤的比例为 1.0 ~ 5.5 : 1mol, 在极性非质子溶剂中, 以 N, N' - 二环己基 -4- 吗啉基 - 脒 (DCMC) 或 1,8- 二氮杂双环 [5.4.0] 十一烷 -7 烯 (DBU) 为碱, 在 30-90℃ 下反应 4 ~ 48 小时, 最佳反应条件为 N- 叔丁氧羰基 -L- 氨基酸 3- 溴丙基酯与 9-[2-(磷酸基甲氧基) 乙基] 腺嘌呤的比例为 1.0 ~ 2.0 : 1mol, 以 N, N' - 二环己基 -4- 吗啉基 - 脒 (DCMC) 为碱, 在 N, N- 二甲基甲酰胺为溶剂条件下, 在 30 ~ 60℃ 下反应 4 ~ 10 小时, 得到 9-[2-(磷酸基甲氧基) 乙基] 腺嘌呤单 N- 叔丁氧羰基 L- 氨基酸丙酯中间体;

[0069] 3、体系中产生的 9-[2-(磷酸基甲氧基) 乙基] 腺嘌呤单 N- 叔丁氧羰基 L- 氨基酸丙酯中间体转化率达到最大后, 体系不经分离, 即加入与 9-[2-(磷酸基甲氧基) 乙基] 腺嘌呤比例为 1.0 ~ 5.5 : 1mol 非甾体抗炎药 3- 溴丙基酯, 体系在 60 ~ 120℃ 下反应 10 ~ 48 小时, 最佳反应条件为非甾体抗炎药 3- 溴丙基酯与 9-[2-(磷酸基甲氧基) 乙基] 腺嘌呤比例为 1.0 ~ 2.0 : 1mol, 体系在 60 ~ 100℃ 反应 10 ~ 18 小时, 得到化合物 1-16;

[0070] 4、化合物 1-16 在极性或非极性溶剂中用适量 85% 的磷酸溶液或乙酰氯 / 甲醇体系, 在 -10 ~ 25℃ 下, 反应 0.2 ~ 16 小时, 最佳反应条件为在氯仿为溶剂条件下, 体系用 85% 磷酸在 -5℃ ~ 室温下反应 8 ~ 12 小时, 或乙酰氯 / 甲醇体系中 0℃ ~ 25℃ 反应 5-12 小时, 得到目标化合物 17-32。

[0071] 本发明还提供了包括上述嘌呤类化合物的药物组合物, 所述组合物包含治疗有效剂量的作为活性组分的本发明的化合物, 以及辅剂。

[0072] 本发明还提供了上述嘌呤类化合物在制备用于治疗乙型肝炎中的应用。

[0073] 本发明还提供了上述药物组合在治疗乙型肝炎的药物中的应用。

[0074] 除非特别注明,本文所用的术语具有以下定义:

[0075] “烷基”表示饱和或不饱和的、取代或非取代的直链、支链烷烃链,具体的可列举如甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基、仲丁基、叔丁基、戊基、异戊基、新戊基、叔戊基、1-甲基丁基、2-甲基丁基、2-甲基丙基、己基、异己基、1-甲基戊基、2-甲基戊基、3-甲基戊基、2-甲基丁基、1,1-二甲基丁基、1,2-二甲基丁基、1,3-二甲基丁基、2,3-二甲基丁基、3,3-二甲基丁基等。这些基团中,以甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基等碳原子数为1-4个的烷基为佳,以甲基、乙基、丙基为最佳。

[0076] “药学上可接受的盐”具体地可列举与盐酸、氢溴酸、氢氟酸、硫酸、硝酸、磷酸等无机酸的盐,与甲酸、乙酸、丙酸、草酸、丙二酸、琥珀酸、富马酸、马来酸、乳酸、苹果酸、酒石酸、柠檬酸等有机酸和天冬氨酸、谷氨酸等酸性氨基酸的酸加成盐或与赖氨酸、精氨酸、鸟氨酸等碱性氨基酸形成的盐。

具体实施方式

[0077] 制各实施例1:9-[2-(膦酰基甲氧基)乙基]腺嘌呤单N-叔丁氧羰基-L-缬氨酸丙基酯,单阿司匹林丙基酯的制备

[0078] 干燥、氮气保护条件下,将9-[2-(膦酰基甲氧基)乙基]腺嘌呤(0.4g, 1.47mmol),N,N'-二环己基-4-吗啉基-脒(DCMC)(0.84g, 2.88mmol),置于40mL干燥N,N-二甲基甲酰胺中,80℃加热1小时至澄清透明后,降温至60℃,在分次滴加含有N-叔丁氧羰基-L-缬氨酸-3-溴丙基酯(0.7g, 2.16mmol)10mLN,N-二甲基甲酰胺溶液,加毕,继续保温12h。TLC监测至单酯转化完全后,加入阿司匹林-3-溴丙基酯(0.43g, 1.44mmol),70℃反应12小时,TLC监测至双酯转化完全后,减压蒸除反应溶剂,残余物溶于50mL的EtOAc中,于低温(-10℃)静置1-2小时,过滤,滤液分别以0.5%盐酸溶液,水以及饱和氯化钠溶液洗涤至中性,无水硫酸钠干燥,过滤,滤液减压浓缩,残余物以乙酸乙酯:甲醇=20:1为洗脱剂,硅胶柱层析分离得无色油状目标产物157mg,产率14.3%。

[0079] $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, DMSO- d_6) δ : 8.11(s, 1H), 8.06(s, 1H), 7.79(d, J = 8.0Hz, 1H), 7.52(t, J = 8.0Hz, 1H), 7.20(brs, 3H), 6.97(d, J = 8.4Hz, 1H), 6.92(t, J = 7.6Hz, 1H), 4.33-3.80(m, 15H), 2.25(m, 1H), 1.96(brs, 5H), 1.80(t, J = 5.6Hz, 2H), 1.34(s, 9H), 0.83(d, J = 6.0Hz, 6H)。

[0080] 制备实施例2:9-[2-(膦酰基甲氧基)乙基]腺嘌呤单N-叔丁氧羰基-L-亮氨酸丙基酯,单阿司匹林丙基酯的制备

[0081] 以化合物N-叔丁氧羰基-L-亮氨酸-3-溴丙基酯,阿司匹林-3-溴丙基酯以及9-[2-(膦酰基甲氧基)乙基]腺嘌呤为反应原料按照类似于实施例1方法制备。得无色油状目标产物,产率10.4%。

[0082] $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, DMSO- d_6) δ : 8.10(s, 1H), 8.05(s, 1H), 7.95(d, J = 7.6Hz, 1H), 7.79(m, 1H), 7.26(m, 1H), 6.97(m, 1H), 4.25(m, 7H), 4.04(m, 4H), 3.87(m, 4H), 2.25(s, 1H), 1.97(m, 4H), 1.80(m, 2H), 1.58(s, 9H), 0.84(m, 6H)。

[0083] 制各实施例3:9-[2-(膦酰基甲氧基)乙基]腺嘌呤单N-叔丁氧羰基-L-异亮氨酸丙基酯,单阿司匹林丙基酯的制备

[0084] 以 N-叔丁氧羰基-L-异亮氨酸-3-溴丙基酯,阿司匹林-3-溴丙基酯以及 9-[2-(膦酰基甲氧基)乙基]腺嘌呤为反应原料按照类似于实施例 1 方法制备。得无色油状目标产物,产率 19.6%。

[0085] $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, DMSO- d_6) δ : 8.10(s, 1H), 8.06(s, 1H), 7.79(d, $J = 7.6\text{Hz}$, 1H), 7.50(m, 1H), 7.21(m, 1H), 6.97-6.92(m, 1H), 4.33(t, $J = 6.0\text{Hz}$, 4H), 4.07-3.89(m, 7H), 3.89(m, 2H), 3.87(d, $J = 7.2\text{Hz}$, 2H), 1.97(s, 3H), 1.81-1.78(m, 5H), 1.65-1.55(m, 2H), 1.34(s, 9H), 0.78(m, 6H)。

[0086] 制备实施例 4: 9-[2-(膦酰基甲氧基)乙基]腺嘌呤单 N-叔丁氧羰基-L-苯丙氨酸丙基酯,单阿司匹林丙基酯的制备

[0087] 以 N-叔丁氧羰基-L-苯丙氨酸-3-溴丙基酯,阿司匹林-3-溴丙基酯以及 9-[2-(膦酰基甲氧基)乙基]腺嘌呤为反应原料按照类似于实施例 1 方法制备。得无色油状目标产物,产率 9.6%。

[0088] $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, DMSO- d_6) δ : 8.11(s, 1H), 8.06(s, 1H), 7.79(d, $J = 7.6\text{Hz}$, 1H), 7.50(t, $J = 7.6\text{Hz}$, 1H), 7.35(d, $J = 8.0\text{Hz}$, 1H), 7.26-7.17(m, 5H), 6.97-6.90(m, 2H), 4.33(t, $J = 6.4\text{Hz}$, 4H), 4.14-3.98(m, 8H), 3.98-3.85(m, 3H), 2.94-2.83(2m, 2H), 1.96(brs, 5H), 1.73(t, $J = 4.8\text{Hz}$, 2H), 1.34(s, 9H)。

[0089] 制备实施例 5: 9-[2-(膦酰基甲氧基)乙基]腺嘌呤单 N-叔丁氧羰基-甘氨酸丙基酯,单布洛芬丙基酯的制备

[0090] 干燥、氮气保护条件下,将 9-[2-(膦酰基甲氧基)乙基]腺嘌呤(0.4g, 1.47mmol), N, N'-二环己基-4-吗啉基-脒(DCMC)(0.84g, 2.88mmol)置于 40mL 干燥 N, N-二甲基甲酰胺中, 80℃加热至澄清后,降温至 60℃。缓慢滴加 N-叔丁氧羰基-甘氨酸-3-溴丙酯(0.44g, 1.47mmol), 加毕,继续保温反应 18 小时。TLC 监测至单酯转化完全后,加入含有布洛芬-3-溴丙酯(0.48g, 1.47mmol)的 10mL N, N-二甲基甲酰胺溶液, 80℃反应 20 小时, TLC 监测至双酯转化完全后,减压蒸除溶剂,残余物溶于 50mL 乙酸乙酯中,低温(-10℃)静置,过滤,滤液分别以 0.5% 盐酸溶液,饱和氯化钠溶液洗涤,无水硫酸钠干燥过夜。过滤,溶剂减压蒸干,粗产物以二氯甲烷: 甲醇 = 15 : 1 为洗脱剂,硅胶柱层析分离得淡黄色油状目标产物 248mg,产率 24.4%。

[0091] $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3) δ : 8.33(s, 1H), 7.91(s, 1H), 7.19(d, $J = 8.0\text{Hz}$, 2H), 7.09(d, $J = 7.6\text{Hz}$, 2H), 4.38-4.37(m, 2H), 4.19-4.10(m, 4H), 4.03-3.87(m, 8H), 3.74-3.66(m, 3H), 2.43(d, $J = 7.2\text{Hz}$, 2H), 1.91-1.88(m, 4H), 1.85-1.79(m, 1H), 1.51-1.44(m, 12H) 1.88(d, $J = 6.4\text{Hz}$, 3H)。

[0092] 制备实施例 6: 9-[2-(膦酰基甲氧基)乙基]腺嘌呤单 N-叔丁氧羰基-L-丙氨酸丙基酯,单布洛芬丙基酯的制备

[0093] 以 N-叔丁氧羰基-L-丙氨酸-3-溴丙基酯,布洛芬-3-溴丙基酯以及 9-[2-(膦酰基甲氧基)乙基]腺嘌呤为反应原料按照类似于实施例 5 方法制备。得无色油状目标产物,产率 32.4%。

[0094] $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3) δ : 8.33(s, 1H), 7.91(s, 1H), 7.18(d, $J = 7.6\text{Hz}$, 2H), 7.08(d, $J = 7.6\text{Hz}$, 2H), 4.44-4.27(m, 2H), 4.18-4.01(m, 8H), 3.70-3.61(m, 5H), 3.48-3.44(m, 1H), 2.43(d, $J = 6.4\text{Hz}$, 2H), 1.91-1.78(m, 4H), 1.48-1.37(m, 15H),

0.88-0.87 (d, $J = 6.4\text{Hz}$, 3H)。

[0095] 制备实施例 7 : 9-[2-(磷酰基甲氧基) 乙基] 腺嘌呤单 N- 叔丁氧羰基 L- 缬氨酸丙基酯, 单布洛芬丙基酯的制备

[0096] 以 N- 叔丁氧羰基 -L- 缬氨酸 -3- 溴丙基酯, 布洛芬 -3- 溴丙基酯以及 9-[2-(磷酰基甲氧基) 乙基] 腺嘌呤为反应原料按照类似于实施例 5 方法制备。得淡黄色油状目标产物, 产率 22.9%。

[0097] $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3) δ : 8.34 (s, 1H), 7.91 (s, 1H), 7.19 (d, $J = 7.6\text{Hz}$, 2H), 7.09 (d, $J = 7.6\text{Hz}$, 2H), 4.39 (m, 2H), 4.38-4.00 (m, 9H), 3.89-3.88 (m, 2H), 3.75-3.68 (m, 3H), 2.43 (d, $J = 6.8\text{Hz}$, 2H), 1.92-1.81 (m, 5H), 1.49-1.43 (m, 12H), 0.96-0.87 (m, 5H)。

[0098] 制备实施例 8 : 9-[2-(磷酰基甲氧基) 乙基] 腺嘌呤单 N- 叔丁氧羰基 L- 亮氨酸丙基酯, 单布洛芬丙基酯的制备

[0099] 以 N- 叔丁氧羰基 -L- 亮氨酸 -3- 溴丙基酯, 布洛芬 -3- 溴丙基酯以及 9-[2-(磷酰基甲氧基) 乙基] 腺嘌呤为反应原料按照类似于实施例 5 方法制备。得淡黄色油状目标产物, 产率 7.3%。

[0100] $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3) δ : 8.34 (s, 1H), 7.91 (s, 1H), 7.26 (d, $J = 7.2\text{Hz}$, 2H), 7.09 (d, $J = 7.6\text{Hz}$, 2H), 5.30 (m, 1H), 4.39-4.33 (m, 3H), 4.17-4.12 (m, 4H), 4.02-4.00 (m, 4H), 3.89 (d, $J = 7.2\text{Hz}$, 2H), 1.91 (m, 6H), 1.49-1.43 (m, 12H), 0.93 (d, $J = 6.4\text{Hz}$, 12H)。

[0101] 制备实施例 9 : 9-[2-(磷酰基甲氧基) 乙基] 腺嘌呤单 N- 叔丁氧羰基 L- 异亮氨酸丙基酯, 单布洛芬丙基酯的制备

[0102] 以 N- 叔丁氧羰基 -L- 异亮氨酸 -3- 溴丙基酯, 布洛芬 -3- 溴丙基酯以及 9-[2-(磷酰基甲氧基) 乙基] 腺嘌呤为反应原料按照类似于实施例 5 方法制备。得无色油状目标产物, 产率 8.9%。

[0103] $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3) δ : δ : 8.33 (s, 1H), 7.91 (s, 1H), 7.19 (d, $J = 8.4\text{Hz}$, 2H), 7.09 (d, $J = 8.0\text{Hz}$, 2H), 4.40-4.36 (m, 2H), 4.20-4.13 (m, 4H), 4.08-3.99 (m, 4H), 3.90-3.87 (m, 1H), 3.75-3.66 (m, 4H), 3.39-3.37 (q, $J = 7.6\text{Hz}$, 1H), 2.43 (d, $J = 6.8\text{Hz}$, 2H), 1.95-1.89 (m, 4H), 1.84-1.72 (m, 2H), 1.42 (s, 9H) 1.48 (d, $J = 7.2\text{Hz}$, 3H), 1.25-1.16 (m, 2H), 0.94 (d, $J = 6.8\text{Hz}$, 3H), 0.91-0.87 (m, 9H)。

[0104] 制备实施例 10 : 9-[2-(磷酰基甲氧基) 乙基] 腺嘌呤单 N- 叔丁氧羰基 L- 苯丙氨酸丙基酯, 单布洛芬丙基酯的制备

[0105] 以 N- 叔丁氧羰基 -L- 苯丙氨酸 -3- 溴丙基酯, 布洛芬 -3- 溴丙基酯以及 9-[2-(磷酰基甲氧基) 乙基] 腺嘌呤为反应原料按照类似于实施例 5 方法制备。得无色油状目标产物, 产率 8.4%。

[0106] $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3) δ : 8.32 (s, 1H), 7.89 (s, 1H), 7.27-7.12 (m, 6H), 7.08-7.07 (m, 2H), 4.652 (s, 1H), 4.37-4.36 (m, 2H), 4.15-3.95 (m, 8H), 3.88-3.87 (m, 2H), 3.74-3.66 (m, 3H), 2.47-2.41 (m, 2H), 1.91-1.80 (m, 5H), 1.48-1.46 (d, $J = 7.2\text{Hz}$, 3H), 1.39 (s, 9H), 0.88 (d, $J = 6.4\text{Hz}$, 6H)。

[0107] 制备实施例 11 : 9-[2-(磷酰基甲氧基) 乙基] 腺嘌呤单 N- 叔丁氧羰基甘氨酸丙基酯, 单氟比洛芬丙基酯的制备

[0108] 以 N- 叔丁氧羰基 - 甘氨酸 -3- 溴丙基酯, 氟比洛芬 -3- 溴丙基酯以及 9-[2-(磷

酰基甲氧基)乙基]腺嘌呤为反应原料按照类似于实施例 5 方法制备。得淡黄色油状目标产物,产率 21.3%。

[0109] $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3) δ : 8.32 (s, 1H), 7.91 (s, 1H), 7.53-7.51 (m, 2H), 7.44-7.33 (m, 4H), 7.15-7.10 (m, 2H), 4.37-4.36 (m, 2H), 4.17-4.16 (m, 4H), 4.04-4.02 (m, 4H), 3.93-3.87 (m, 4H), 3.77-3.72 (m, 3H), 1.95-1.89 (m, 4H), 1.54 (d, $J = 6.8\text{Hz}$, 3H), 1.44 (s, 9H)。

[0110] 制备实施例 12: 9-[2-(膦酰基甲氧基)乙基]腺嘌呤单 N-叔丁氧羰基 L-丙氨酸丙基酯, 单氟比洛芬丙基酯的制备

[0111] 以 N-叔丁氧羰基-L-丙氨酸-3-溴丙基酯, 氟比洛芬-3-溴丙基酯以及 9-[2-(膦酰基甲氧基)乙基]腺嘌呤为反应原料按照类似于实施例 5 方法制备。得淡黄色油状目标产物, 产率 22.2%。

[0112] $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3) δ : 8.33 (s, 1H), 7.91 (s, 1H), 7.53-7.51 (m, 2H), 7.45-7.34 (m, 4H), 7.15-7.10 (m, 2H), 4.37 (m, 3H), 4.17-4.16 (m, 4H), 4.08-4.03 (m, 4H), 3.90-3.88 (m, 1H), 3.79-3.72 (m, 4H), 1.95-1.92 (m, 4H), 1.54-1.42 (d, $J = 7.2\text{Hz}$, 3H), 1.43 (s, 9H), 1.38-1.36 (d, $J = 7.2\text{Hz}$, 3H)。

[0113] 制备实施例 13: 9-[2-(膦酰基甲氧基)乙基]腺嘌呤单 N-叔丁氧羰基 L-缬氨酸丙基酯, 单氟比洛芬丙基酯的制备

[0114] 以 N-叔丁氧羰基-L-缬氨酸-3-溴丙基酯, 氟比洛芬-3-溴丙基酯以及 9-[2-(膦酰基甲氧基)乙基]腺嘌呤为反应原料按照类似于实施例 5 方法制备。得淡黄色油状目标产物, 产率 17.7%。

[0115] $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3) δ : 8.33 (s, 1H), 7.91 (s, 1H), 7.52 (d, $J = 7.6\text{Hz}$, 2H), 7.45-7.36 (m, 4H), 7.15-7.10 (m, 2H), 4.38-4.37 (m, 2H), 4.18-4.03 (m, 8H), 3.89-3.72 (m, 6H), 1.93-1.92 (m, 5H), 1.54-1.52 (d, $J = 7.2\text{Hz}$, 3H), 1.43 (s, 9H), 0.96-0.86 (m, 6H)。

[0116] 制备实施例 14: 9-[2-(膦酰基甲氧基)乙基]腺嘌呤单 N-叔丁氧羰基 L-亮氨酸丙基酯, 单氟比洛芬丙基酯的制备

[0117] 以 N-叔丁氧羰基-L-亮氨酸-3-溴丙基酯, 氟比洛芬-3-溴丙基酯以及 9-[2-(膦酰基甲氧基)乙基]腺嘌呤为反应原料按照类似于实施例 5 方法制备。得淡黄色油状目标产物, 产率 11.1%。

[0118] $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3) δ : 8.31 (s, 1H), 7.99 (s, 1H), 7.53-7.52 (m, 2H), 7.45-7.36 (m, 4H), 7.15-7.10 (m, 2H), 4.39-4.38 (m, 3H), 4.27-4.05 (m, 8H), 3.88-3.72 (m, 5H), 1.94 (m, 4H), 1.54-1.52 (m, 2H), 1.46-1.42 (m, 13H), 0.94-0.91 (m, 6H)。

[0119] 制备实施例 15: 9-[2-(膦酰基甲氧基)乙基]腺嘌呤单 N-叔丁氧羰基 L-异亮氨酸丙基酯, 单氟比洛芬丙基酯的制备

[0120] 以 N-叔丁氧羰基-L-异亮氨酸-3-溴丙基酯, 氟比洛芬-3-溴丙基酯以及 9-[2-(膦酰基甲氧基)乙基]腺嘌呤为反应原料按照类似于实施例 5 方法制备。得淡黄色油状目标产物, 产率 14.2%。

[0121] $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3) δ : 8.31 (s, 1H), 7.91 (s, 1H), 7.53 (d, $J = 8.0\text{Hz}$, 2H), 7.44-7.32 (m, 4H), 7.15-7.10 (m, 2H), 4.38-4.35 (m, 2H), 4.20-4.09 (m, 8H), 3.90-3.69 (m, 5H), 3.37-3.35 (m, 1H), 1.96-1.91 (m, 4H), 1.74-1.71 (m, 1H), 1.53 (d, $J = 7.2\text{Hz}$, 3H),

1.43 (s, 9H), 1.26-1.14 (m, 42H), 0.92-0.86 (m, 6H)。

[0122] 制备实施例 16 :9-[2-(膦酰基甲氧基) 乙基] 腺嘌呤单 N-叔丁氧羰基 L-苯丙氨酸丙基酯, 单氟比洛芬丙基酯的制备

[0123] 以 N-叔丁氧羰基 -L-苯丙氨酸 -3-溴丙基酯, 氟比洛芬 -3-溴丙基酯以及 9-[2-(膦酰基甲氧基) 乙基] 腺嘌呤为反应原料按照类似于实施例 5 方法制备。得淡黄色油状目标产物, 产率 9.8%

[0124] $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3) δ :8.31 (s, 1H), 7.88 (s, 1H), 7.53 (d, $J = 8.4\text{Hz}$, 2H), 7.44-7.30 (m, 4H), 7.28-7.2 δ (m, 2H), 7.23-7.10 (m, 5H), 4.37-4.35 (m, 2H), 4.34-3.15 (m, 4H), 4.03-3.94 (m, 4H), 3.89-3.84 (m, 2H), 3.80-3.71 (m, 5H), 2.17-1.84 (m, 4H), 1.53 (d, $J = 7.2\text{Hz}$, 3H), 1.44 (s, 9H)。

[0125] 制备实施例 17 :9-[2-(膦酰基甲氧基) 乙基] 腺嘌呤单 L-缬氨酸丙基酯, 单阿司匹林丙基酯的制备

[0126] 将干燥的 4.2mL 乙酸乙酯置于 25mL 的圆底烧瓶中, 冰水浴搅拌, 依次加入甲醇 (0.032mL, 0.74mmol), 乙酰氯 (0.054mL, 0.74mmol), 保温反应 4h。将 9-[2-(膦酰基甲氧基) 乙基] 腺嘌呤单 N-叔丁氧羰基 L-缬氨酸丙基酯, 单阿司匹林丙基酯 (80mg, 0.106mmol) 溶解于 4.2mL 的乙酸乙酯中, 加入至上述反应体系中, 保温反应 2 小时, 后逐渐升至室温, 反应 8 小时。TLC 监测反应进程至产物转化充分后 (展开剂二氯甲烷 : 甲醇 = 15 : 1)。停止反应, 静置, 减压蒸除溶剂, 加 5mL 乙醚, 使析出沉淀, 转移溶液部分至离心管离心分离 (5000r/m), 弃去上清液, 少量无水乙醇溶解并合并沉淀, 加入 5mL 乙醚使沉淀析出, 重复上述洗涤操作共 3 次使溶液至近中型。减压抽干得无色胶体状化合物, 以氯仿 : 甲醇 = 10 : 1 为洗脱剂, 硅胶柱层析分离得无色油状目标产物 11mg, 收率 15.9%。

[0127] $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, DMSO-d_6) δ :8.11 (s, 1H), 8.06 (s, 1H), 7.79 (d, $J = 8.4\text{Hz}$, 1H), 7.50 (m, 1H), 7.21 (m, 1H), 6.97 (m, 1H), 4.38 (m, 2H), 4.30 (m, 4H), 4.24 (m, 2H), 3.95 (d, $J = 6.4\text{Hz}$, 2H), 3.89 (m, 5H), 2.25 (s, 3H), 1.81 (m, 5H), 0.83 (d, $J = 6.4\text{Hz}$, 3H), 0.79 (d, $J = 6.4\text{Hz}$, 3H); ESI-MS (m/z) :637.6 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$ 。

[0128] 制备实施例 18 :9-[2-(膦酰基甲氧基) 乙基] 腺嘌呤单 L-亮氨酸丙基酯, 单阿司匹林丙基酯的制备

[0129] 以 9-[2-(膦酰基甲氧基) 乙基] 腺嘌呤单 N-叔丁氧羰基 L-亮氨酸丙基酯, 单阿司匹林丙基酯为反应原料, 按照类似于实施例 17 方法制备, 得无色胶体状目标产物, 收率 16.9%。

[0130] $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, DMSO-d_6) δ :8.11 (s, 1H), 8.08 (s, 1H), 7.94 (d, $J = 7.6\text{Hz}$, 1H), 7.66 (m, 1H), 7.41 (m, 1H), 7.23 (m, 1H), 7.20 (brs, 4H), 4.30 (m, 2H), 4.25 (m, 2H), 4.12 (m, 2H), 4.03 (m, 4H), 3.94 (m, 5H), 2.25 (s, 3H), 1.84 (m, 4H), 1.60 (m, 2H), 1.20 (m, 1H), 0.84 (d, $J = 6\text{Hz}$, 6H); ESI-MS (m/z) :651.5 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$ 。

[0131] 制备实施例 19 :9-12-(膦酰基甲氧基) 乙基] 腺嘌呤单 L-异亮氨酸丙基酯, 单阿司匹林丙基酯的制备

[0132] 以 9-[2-(膦酰基甲氧基) 乙基] 腺嘌呤单 N-叔丁氧羰基 L-异亮氨酸丙基酯, 单阿司匹林丙基酯为反应原料, 按照类似于实施例 17 方法制备, 得无色胶体状目标产物, 收率 13.6%。

[0133] $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, DMSO- d_6) δ : 8.11 (s, 1H), 8.07 (s, 1H), 7.95 (d, $J = 8.4\text{Hz}$, 1H), 7.69 (t, $J = 7.6\text{Hz}$, 1H), 7.41 (t, $J = 7.6\text{Hz}$, 1H), 7.23 (m, 3H), 4.30 (m, 2H), 4.25 (m, 2H), 4.12 (m, 5H), 3.99 (m, 3H), 3.87 (m, 4H), 3.77 (m, 2H), 2.25 (s, 3H), 1.82 (m, 4H), 1.41 (m, 1H), 0.81 (m, 8H); ESI-MS (m/z): 651.7 ($M+H$) $^+$ 。

[0134] 制备实施例 20 : 9-[2-(膦酰基甲氧基) 乙基] 腺嘌呤单 L- 苯丙氨酸丙基酯, 单阿司匹林丙基酯的制备

[0135] 以 9-[2-(膦酰基甲氧基) 乙基] 腺嘌呤单 N- 叔丁氧羰基 L- 苯丙氨酸丙基酯, 单阿司匹林丙基酯为反应原料, 按照类似于实施例 17 方法制备, 得无色胶体状目标产物, 收率 34.3%。

[0136] $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, DMSO- d_6) δ : 8.47 (s, 1H), 8.41 (s, 1H), 7.94 (d, $J = 7.6\text{Hz}$, 1H), 7.69 (t, $J = 8.0\text{Hz}$, 1H), 7.41 (t, $J = 7.6\text{Hz}$, 1H), 7.31 (d, $J = 6.8\text{Hz}$, 1H), 7.27-7.21 (m, 5H), 4.41 (brs, 2H), 4.26 (m, 4H), 4.06-4.03 (m, 5H), 3.88-3.84 (m, 4H), 3.21-3.18 (m, 2H), 3.08-3.04 (m, 2H), 2.25 (s, 3H), 1.96 (m, 2H), 1.73 (m, 2H); ESI-MS (m/z): 685.6 ($M+H$) $^+$ 。

[0137] 制备实施例 21 : 9-[2-(膦酰基甲氧基) 乙基] 腺嘌呤单甘氨酸丙基酯, 单布洛芬丙基酯的制备

[0138] 将 9-[2-(膦酰基甲氧基) 乙基] 腺嘌呤单 N- 叔丁氧羰基 - 甘氨酸丙基酯, 单布洛芬丙基酯 (150mg, 0.22mmol) 置于 25mL 干燥圆底烧瓶中, 加入 2.0mL 无水四氢呋喃搅拌使完全溶解, 加入 85% 的磷酸溶液 (1.7mL, 24.6mmol), 20 ~ 25℃ 反应 4.5 小时, 后反应体系中加入蒸馏水 40.0mL, 用氯仿萃取三次 (3×15mL), 弃去氯仿层, 将水层置于 0℃ 冰水浴中, 缓慢滴加 50% 的氢氧化钠溶液至体系 pH = 6 ~ 8, 再加入氯仿萃取三次 (3×15mL), 合并氯仿层, 无水硫酸镁干燥, 过滤, 溶剂减压蒸干, 得无色油状目标产物 70mg, 收率 50.8%。

[0139] $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3) δ : 8.09 (brs, 2H), 7.16 (d, $J = 7.6\text{Hz}$, 2H), 7.07 (d, $J = 7.6\text{Hz}$, 2H), 4.29 (m, 2H), 4.07 (m, 2H), 4.01-3.74 (m, 8H), 3.66-3.64 (m, 2H), 2.42d, $J = 6.8\text{Hz}$, 2H), 1.83-1.78 (m, 4H), 1.67 (m, 3H), 1.48 (d, $J = 6.8\text{Hz}$, 3H), 1.25 (m, 2H); ESI-MS (m/z): 621.5 ($M+H$) $^+$ 。

[0140] 制备实施例 22 : 9-[2-(膦酰基甲氧基) 乙基] 腺嘌呤单 L- 丙氨酸丙基酯, 单布洛芬丙基酯的制备

[0141] 以 9-[2-(膦酰基甲氧基) 乙基] 腺嘌呤单 N- 叔丁氧羰基 L- 丙氨酸丙基酯, 单布洛芬丙基酯为反应原料, 按照类似于实施例 21 方法制备, 得淡黄色油状目标产物, 收率 49.4%。

[0142] $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, DMSO- d_6) δ : 8.42 (s, 1H), 8.35 (s, 1H), 7.16 (d, $J = 8.0\text{Hz}$, 2H), 7.09 (d, $J = 8.0\text{Hz}$, 2H), 4.39-4.38 (m, 2H), 4.15-3.966 (m, 8H), 3.87-3.85 (m, 6H), 2.39-2.37 (d, $J = 7.2\text{Hz}$, 2H), 1.86-1.77 (m, 5H), 1.39-1.34 (m, 6H), 0.83-0.81 (d, $J = 6.8\text{Hz}$, 6H); ESI-MS (m/z): 635.6 ($M+H$) $^+$ 。

[0143] 制备实施例 23 : 9-[2-(膦酰基甲氧基) 乙基] 腺嘌呤单 L- 缬氨酸丙基酯, 单布洛芬丙基酯的制备

[0144] 以 9-[2-(膦酰基甲氧基) 乙基] 腺嘌呤单 N- 叔丁氧羰基 L- 缬氨酸丙基酯, 单布洛芬丙基酯为反应原料, 按照类似于实施例 21 方法制备, 得淡黄色油状目标产物, 收率 85.8%。

[0145] $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3) δ : 8.34 (s, 1H), 7.91 (s, 1H), 7.19 (d, $J = 7.6\text{Hz}$, 2H), 7.09 (d, $J = 7.6\text{Hz}$, 2H), 6.03 (brs, 2H), 4.38 (m, 2H), 4.20-3.99 (m, 8H), 3.90 (m, 2H), 3.73-3.66 (m, 3H), 3.35 (brs, 1H), 0.83-0.81 (d, $J = 6.8\text{Hz}$, 6H), 2.43 (d, $J = 7.2\text{Hz}$, 2H), 4.38 (m, 2H), 2.05-1.79 (m, 6H), 1.49 (d, $J = 7.6\text{Hz}$, 3H), 0.98 (d, $J = 6.8\text{Hz}$, 3H), 0.92-0.87 (m, 9H); ESI-MS (m/z): 663.8 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

[0146] 制备实施例 24 : 9-[2-(磷酸基甲氧基)乙基]腺嘌呤单 L-亮氨酸丙基酯, 单布洛芬丙基酯的制备

[0147] 以 9-[2-(磷酸基甲氧基)乙基]腺嘌呤单 N-叔丁氧羰基 L-亮氨酸丙基酯, 单布洛芬丙基酯为反应原料, 按照类似于实施例 21 方法制备, 得淡黄色目标化合物, 收率 61.8%。

[0148] $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3) δ : 8.33 (s, 1H), 7.91 (s, 1H), 7.19 (d, $J = 7.6\text{Hz}$, 2H), 7.09 (d, $J = 7.6\text{Hz}$, 2H), 4.39-4.37 (m, 2H), 4.17-3.99 (m, 8H), 3.90-3.87 (m, 1H), 3.75-3.68 (m, 4H), 3.50-3.49 (m, 1H), 2.43-2.41 (m, 2H), 1.95-1.74 (m, 6H), 1.54-1.42 (m, 5H), 0.94-0.87 (m, 12H); ESI-MS (m/z): 677.6 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

[0149] 制备实施例 25 : 9-[2-(磷酸基甲氧基)乙基]腺嘌呤单 L-异亮氨酸丙基酯, 单布洛芬丙基酯的制备

[0150] 以 9-[2-(磷酸基甲氧基)乙基]腺嘌呤单 N-叔丁氧羰基 L-异亮氨酸丙基酯, 单布洛芬丙基酯为反应原料, 按照类似于实施例 21 方法制备, 得淡黄色目标化合物, 收率 61.8%。

[0151] $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3) δ : 8.33 (s, 1H), 7.91 (s, 1H), 7.19 (d, $J = 7.6\text{Hz}$, 2H), 7.09 (d, $J = 7.6\text{Hz}$, 2H), 4.39-4.37 (m, 2H), 4.17-3.99 (m, 8H), 3.90-3.87 (m, 1H), 3.75-3.68 (m, 4H), 3.50-3.49 (m, 1H), 2.43-2.41 (m, 2H), 1.95-1.74 (m, 6H), 1.54-1.42 (m, 5H), 0.94-0.87 (m, 12H); ESI-MS (m/z): 677.6 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

[0152] 制备实施例 26 : 9-[2-(磷酸基甲氧基)乙基]腺嘌呤单 L-苯丙氨酸丙基酯, 单布洛芬丙基酯的制备

[0153] 以 9-[2-(磷酸基甲氧基)乙基]腺嘌呤单 N-叔丁氧羰基 L-苯丙氨酸丙基酯, 单布洛芬丙基酯为反应原料, 按照类似于实施例 21 方法制备, 得淡黄色目标化合物 85mg, 收率 57.3%。

[0154] $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3) δ : 8.32 (s, 1H), 7.89 (s, 1H), 7.30-7.28 (m, 2H), 7.24-7.17 (m, 5H), 7.09-7.06 (d, $J = 8.4\text{Hz}$, 2H), 4.38-4.35 (m, 2H), 4.17-4.11 (m, 4H), 4.10-3.95 (m, 2H), 3.89-3.84 (m, 1H), 3.79-3.76 (m, 1H), 3.74-3.66 (m, 4H), 3.10-3.05 (m, 1H), 3.19-2.86 (m, 1H), 2.43 (d, $J = 6.8\text{Hz}$, 2H), 1.91-1.80 (m, 5H), 1.48 (d, $J = 6.8\text{Hz}$, 3H), 0.89 (m, 6H); ESI-MS (m/z): 711.8 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

[0155] 制备实施例 27 : 9-[2-(磷酸基甲氧基)乙基]腺嘌呤单甘氨酸丙基酯, 单氟比洛芬丙基酯的制备

[0156] 以 9-[2-(磷酸基甲氧基)乙基]腺嘌呤单 N-叔丁氧羰基甘氨酸丙基酯, 单氟比洛芬丙基酯为反应原料, 按照类似于实施例 21 方法制备, 得淡黄色目标化合物, 收率 56.7%。

[0157] $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 8.11 (s, 1H), 8.04 (s, 1H), 7.52-7.43 (m, 4H), 7.39-7.36 (m, 1H), 7.24-7.19 (m, 3H), 4.29-4.28 (m, 4H), 4.05-4.00 (m, 4H), 3.96-3.82 (m,

9H), 1.81-1.77 (m, 2H), 1.63-1.60 (m, 2H), 1.42-1.40 (d, $J = 6.8\text{Hz}$, 3H); ESI-MS (m/z): 659.7 ($M+H$)⁺。

[0158] 制备实施例 28: 9-[2-(磷酸基甲氧基)乙基]腺嘌呤单 L-丙氨酸丙基酯, 单氟比洛芬丙基酯的制备

[0159] 以 9-[2-(磷酸基甲氧基)乙基]腺嘌呤单 N-叔丁氧羰基 L-丙氨酸丙基酯, 单氟比洛芬丙基酯为反应原料, 按照类似于实施例 21 方法制备, 得淡黄色目标化合物, 收率 48.7%。

[0160] ¹H-NMR (400MHz, CDCl₃) δ : 8.33 (s, 1H), 7.95 (s, 1H), 7.53-7.51 (m, 2H), 7.45-7.34 (m, 4H), 7.13-7.10 (m, 2H), 4.38-4.37 (m, 2H), 4.17-3.86 (m, 8H), 3.78-3.66 (m, 5H), 3.50-3.45 (m, 1H), 1.95-1.92 (m, 2H), 1.81-1.79 (m, 2H), 1.53-1.52 (d, $J = 6.8\text{Hz}$, 3H), 1.22-1.19 (m, 4H); ESI-MS (m/z): 673.6 ($M+H$)⁺。

[0161] 制备实施例 29: 9-[2-(磷酸基甲氧基)乙基]腺嘌呤单 L-缬氨酸丙基酯, 单氟比洛芬丙基酯的制备

[0162] 以 9-[2-(磷酸基甲氧基)乙基]腺嘌呤单 N-叔丁氧羰基 L-缬氨酸丙基酯, 单氟比洛芬丙基酯为反应原料, 按照类似于实施例 21 方法制备, 得淡黄色目标化合物, 收率 57.5%。

[0163] ¹H-NMR (400MHz, CDCl₃) δ : 8.32 (s, 1H), 7.90 (s, 1H), 7.53-7.51 (m, 2H), 7.44-7.33 (m, 4H), 7.15-7.10 (m, 2H), 4.37-4.36 (m, 2H), 4.17-4.16 (m, 4H), 4.06-4.01 (m, 4H), 3.90-3.86 (m, 1H), 3.78-3.72 (m, 4H), 3.31-3.30 (m, 1H), 2.03-1.93 (m, 5H), 1.54 (d, $J = 7.2\text{Hz}$, 3H), 0.97-0.88 (m, 6H); ESI-MS (m/z): 701.8 ($M+H$)⁺。

[0164] 制备实施例 30: 9-[2-(磷酸基甲氧基)乙基]腺嘌呤单 L-亮氨酸丙基酯, 单氟比洛芬丙基酯的制备

[0165] 以 9-[2-(磷酸基甲氧基)乙基]腺嘌呤单 N-叔丁氧羰基 L-亮氨酸丙基酯, 单氟比洛芬丙基酯为反应原料, 按照类似于实施例 21 方法制备, 得淡黄色目标化合物, 收率 94.8%。

[0166] ¹H-NMR (400MHz, CDCl₃) δ : 8.32 (s, 1H), 7.90 (s, 1H), 7.53-7.51 (m, 2H), 7.45-7.34 (m, 4H), 7.15-7.10 (m, 2H), 4.39-4.35 (m, 2H), 4.20-4.01 (m, 8H), 3.90-3.86 (m, 1H), 3.79-3.72 (m, 4H), 3.51-3.46 (m, 1H), 2.19-1.91 (m, 4H), 1.76-1.54 (m, 2H), 1.54 (d, $J = 7.2\text{Hz}$, 3H), 1.46-1.40 (m, 1H), 0.93-0.90 (m, 6H); ESI-MS (m/z): 715.6 ($M+H$)⁺。

[0167] 制备实施例 31: 9-[2-(磷酸基甲氧基)乙基]腺嘌呤单 L-异亮氨酸丙基酯, 单氟比洛芬丙基酯的制备

[0168] 以 9-[2-(磷酸基甲氧基)乙基]腺嘌呤单 N-叔丁氧羰基 L-异亮氨酸丙基酯, 单氟比洛芬丙基酯为反应原料, 按照类似于实施例 21 方法制备, 得淡黄色油状目标产物, 收率 75.8%。

[0169] ¹H-NMR (400MHz, CDCl₃) δ : 8.31 (s, 1H), 7.91 (s, 1H), 7.53 (d, $J = 8.0\text{Hz}$, 2H), 7.44-7.32 (m, 4H), 7.15-7.10 (m, 2H), 4.38-4.35 (m, 2H), 4.20-4.14 (m, 4H), 4.09-4.02 (m, 4H), 3.90-3.69 (m, 5H), 3.37-3.35 (m, 1H), 1.96-1.91 (m, 4H), 1.74-1.71 (m, 1H), 1.53 (d, $J = 7.2\text{Hz}$, 3H), 1.26-1.14 (m, 4H), 0.92-0.86 (m, 6H); ESI-MS (m/z): 715.4 ($M+H$)⁺。

[0170] 制备实施例 32: 9-[2-(磷酸基甲氧基)乙基]腺嘌呤单 L-苯丙氨酸丙基酯, 单氟

比洛芬丙基酯的制备

[0171] 以 9-[2-(膦酰基甲氧基) 乙基] 腺嘌呤单 N- 叔丁氧羰基 L- 苯丙氨酸丙基酯, 单氟比洛芬丙基酯为反应原料, 按照类似于实施例 21 方法制备, 得淡黄色油状目标产物, 收率 34.5%。

[0172] $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3) δ : 8.31 (s, 1H), 7.88 (s, 1H), 7.53 (d, $J = 8.4\text{Hz}$, 2H), 7.44-7.30 (m, 4H), 7.28-7.26 (m, 2H), 7.23-7.10 (m, 5H), 4.37-4.35 (m, 2H), 4.34-3.15 (m, 4H), 4.03-3.94 (m, 4H), 3.89-3.84 (m, 2H), 3.80-3.71 (m, 5H), 2.17-1.84 (m, 4H), 1.53 (d, $J = 7.2\text{Hz}$, 3H); ESI-MS (m/z): 749.7 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$ 。

[0173] 实验实施例

[0174] 1、试验材料

[0175] HepG2. 2. 15 细胞株由由中国医学科学院医药生物技术研究所提供; 测试化合物由贵阳医学院药学院提供; 阿德福韦酯 (国药准字 H20050803, 天津药物研究院药业有限责任公司); DMEM 高糖培养基、G418 购自 Gibco 公司; 胎牛血清购自 HyClone 公司; MTT 购自 Sigma 公司; HBV 荧光定量 PCR 试剂盒购自深圳匹基生物工程有限公司; μ Quant 酶标检测仪购自 BIO-TEK 公司; ABI GeneAmp7000 自动荧光定量检测仪购自美国 Applied Biosystem 公司。

[0176] 2、试验方法

[0177] (1) 细胞毒性试验

[0178] 采用四氮唑还原法, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide, MTT) 检测药物对 HepG2. 2. 15 细胞生长的抑制作用。将 HepG2. 2. 15 细胞消化为单个细胞悬液, 调整细胞密度为 5×10^4 个 /ml, 接种于 96 孔板 (100 μ l / 孔), 37 $^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱培养过夜。待细胞贴壁后吸去上清, 加入含浓度梯度稀释药物 (1000 μ M、500 μ M、250 μ M、125 μ M、25 μ M、5 μ M) 的培养液, 置培养箱中继续培养。于加药后第 4 天, 吸去上清, 加入含 MTT (0.5mg/ml) 无血清培养基, 培养 4 小时, 吸去培养液, 加入 150 μ l DMSO 振荡使 Formazan 结晶溶解, 490nm 测定各孔吸光值, 以细胞成活率计算药物 CC_{50} 值。

[0179] (2) 对乙型肝炎病毒 -DNA 的抑制试验

[0180] 采用 HepG2 2. 2. 15 细胞系作为筛选模型, 以化合物对 HBV-DNA 抑制的半数有效浓度 (EC_{50}) 为指标, 在体外初步评价所有化合物对 HBV 的抑制效果。将 HepG2. 2. 15 细胞消化为单个细胞悬液, 调整细胞密度为 2×10^4 个 /ml, 接种于 96 孔板 (100 μ l / 孔), 37 $^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱培养过夜。待细胞贴壁后吸去上清, 加入含不同浓度药物的培养液, 置培养箱中继续培养。于加药后第 3、6 天, 吸去上清, 加入含相同浓度药物新鲜培养液, 并于第 9 天收集各孔上清液, -20 $^\circ\text{C}$ 保存。取待测样品 100 μ l, 用 HBV 荧光定量 PCR 试剂盒测定其 HBV DNA 含量。

[0181] 以 GraphPad Prism 5.0 软件计算 CC_{50} 、 EC_{50} , 计算治疗指数 $\text{SI} = \text{CC}_{50}/\text{EC}_{50}$ 。

[0182] 3、试验结果

[0183] 各化合物对 HepG2 2. 2. 15 细胞中 HBV-DNA 抑制 EC_{50} , 细胞毒性 CC_{50} 与作用选择指数 SI 见表 2, 由表 2 可知在被测化合物中化合物 23、25、29、30、31 对 HBV DNA 的复制有不同强度的抑制作用 ($\text{SI} > 2$), 其中化合物 31 抗 HBV-DNA 活性较强 (EC_{50} 3.9 μ M), 作用选择指

数较高 (SI 9.974)。

[0184] 表 2.

	化合物	^a EC ₅₀ (μM)	^b CC ₅₀ (μM)	^c SI
[0185]	23	58.32	122.3	2.097
	24	40.28	36.61	0.908
	25	53.44	263.6	4.932
	26	1434	447.0	0.311
	29	175.4	365.2	2.082
	30	36.66	392.7	10.711
	31	3.902	38.95	9.974
	32	5284	63.68	0.012
	Adefovir dipivoxil	0.02504	1.237	49.401

[0186] a :EC₅₀, 半数有效抑制浓度 ;b :CC₅₀, 半数细胞毒性浓度 ;c :SI, 作用选择性指数 (CC₅₀/EC₅₀)