



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102786549 B

(45) 授权公告日 2013. 07. 03

(21) 申请号 201210286879. 1

CN 102417521 A, 2012. 04. 18, 全文.

(22) 申请日 2012. 08. 13

审查员 宋增锋

(73) 专利权人 洛阳聚慧投资股份有限公司

地址 471000 河南省洛阳市西工区九都路  
58 号

(72) 发明人 游国战 刘洪海 杨松峰

(74) 专利代理机构 郑州大通专利商标代理有限  
公司 41111

代理人 陈大通

(51) Int. Cl.

*C07F 9/6561* (2006. 01)

*A61K 31/675* (2006. 01)

*A61P 31/12* (2006. 01)

*A61P 31/18* (2006. 01)

(56) 对比文件

CN 101906119 A, 2009. 06. 03, 全文.

CN 101870713 A, 2010. 10. 27, 全文.

权利要求书2页 说明书16页 附图1页

(54) 发明名称

一组具有抑制 HIV-1 病毒复制活性的替诺福韦双酯化合物、制备方法及其药物用途

(57) 摘要

本发明公开了一组具有抑制 HIV-1 病毒复制活性的替诺福韦双酯化合物、制备方法及其药物用途。该组化合物具有通式(I), 其中  $m=0-4$ ,  $n=12-16$ , 当  $m=1, n=14$  时具有固定的结构式。还公开了结构通式(I)的制备方法以及含有该组化合物的药物组合物。试验证明本发明化合物具有抑制 HIV-1 复制的活性, 同时所述化合物具有比目前治疗艾滋病药物替诺福韦富马酸盐高得多的脂溶性, 可用于治疗艾滋病感染的药物的开发。



5. 一种含有权利要求 1 或 2 所述的替诺福韦双酯化合物的药物组合物,其特征在于:所述药物组合物含有治疗有效量的权利要求 1 或 2 所述的替诺福韦双酯化合物。

6. 如权利要求 5 所述的药物组合物,其特征在于:所述药物组合物的剂型为片剂或胶囊。

7. 权利要求 1 所述的替诺福韦双酯化合物在制备抗病毒药物中的应用。

## 一组具有抑制 HIV-1 病毒复制活性的替诺福韦双酯化合物、制备方法及其药物用途

### (一) 技术领域：

[0001] 本发明涉及一组类核苷化合物,尤其涉及一组具有抑制 HIV-1 病毒复制活性的替诺福韦双酯化合物、制备方法及其药物用途。

### (二) 背景技术：

[0002] 在病毒感染性疾病的治疗中,病毒耐药性问题日益突出。与环状核苷类逆转录酶抑制剂相比,非环核苷化合物阿德福韦和替诺福韦在防止病毒耐药性问题上具有明显优势,其对耐环状核苷类药物的病毒株有效,本身耐药发生率低,且毒性相对较小,可用于治疗感染 HIV-1 (艾滋病病毒)的患者。但是,由于阿德福韦和替诺福韦的磷酸酯基带负电荷,极性太强,生物膜透过性差,导致生物利用度很低,使其不能成为药物应用于临床。

[0003] 由于构成生物体的细胞的细胞膜是由脂质、蛋白质和糖类等物质组成,脂溶性大的物质易于透过细胞膜而进入细胞内部。药物也只有脂溶性大,才能较好地透过细胞膜进入细胞内,充分发挥治疗疾病的作用,所以提高药物的脂溶性是药物学家追求的一个重要价值目标。

[0004] 阿德福韦和替诺福韦双酯性前药阿德福韦和替诺福韦双异丙酰氧基甲酯富马酸盐改善了药物的生物利用度,于 2001 年被国际医疗审核权威机构美国食品药品监督管理局 (FDA) 批准上市。是迄今为止抗病毒活性较强、肾毒性又较低的艾滋病病毒 (HIV) 逆转录酶抑制剂类艾滋病 (AIDS) 治疗药物。

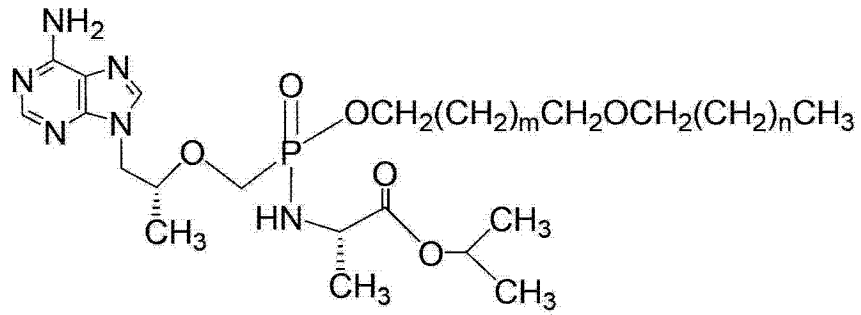
[0005] 作为前药,本身没有抗病毒活性,进入体内后必须游离出原药后才能发挥疗效,而部分药物在吸收进入血液前即被水解;另外,释放出的原药阿德福韦和替诺福韦同样由于膜透过性差的问题,迅速被排出体外而难以在感染部分保持足够的浓度,致使其人体生物利用度仍然只有 28% 左右。因此,对阿德福韦和替诺福韦进行进一步的研究和改造具有重要价值。

[0006] 中国医学科学院医药生物技术研究所一份关于对阿德福韦和替诺福韦进行研究和改造的中国专利申请号 2010056926.8 (国际申请公布号 W02012/041015A1) 文献中,明确记载:“在替诺福韦分子中磷酸基的一个羟基上引入脂溶性长链烷氧乙基长链,使分子结构中磷酸基团的一个羟基被酯化、一个仍处于游离状态,得到阿德福韦和替诺福韦的磷酸长链烷氧乙/丙基单酯衍生物。该化合物在引入长链烷氧乙/丙基后,不仅改善了化合物的药代动力学性质,而且磷酸基中另一个游离羟基仍可以被磷酸化、参与病毒复制过程,发挥抗病毒效果,因而保留了替诺福韦的抗病毒活性。即脂溶性长链的引入既改善了化合物的药代动力学性质以保留了抗病毒活性。”

[0007] 中国医学科学院医药生物技术研究所的专利 ZL200610056926.8 中的发明就是为了提高替诺福韦的脂溶性,而对其进行的研究和改造,并获得了重大进步。

[0008] 无独有偶,名为奇默里克斯 (Chimerix) 的一家美国医药公司在其一篇中国专利申请 CN101977610A 中也披露了,其研发的抗 HIV 病毒药物也是对替诺福韦及其衍生物的进一





( I )

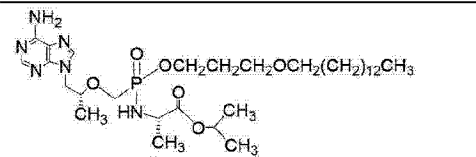
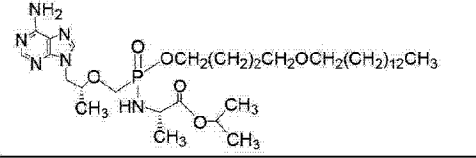
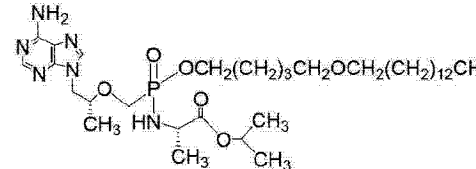
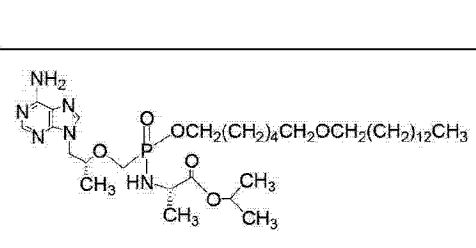
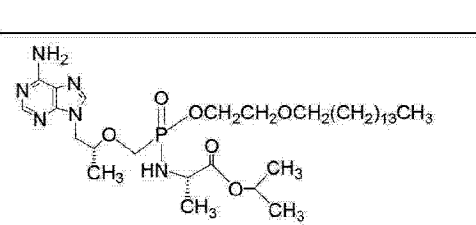
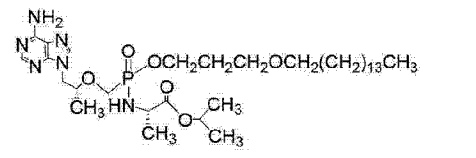
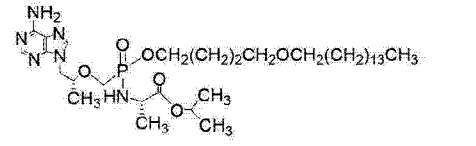
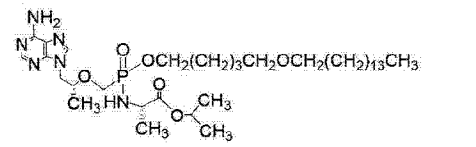
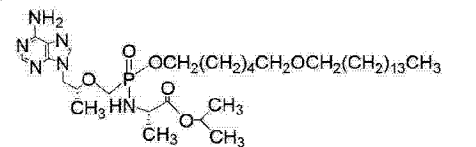
[0019] 其中 :m=0-4, n=12-16。

[0020] 本发明提供的替诺福韦双酯化合物,具体为下列化合物:

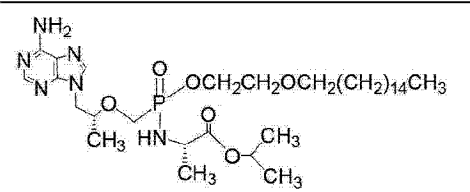
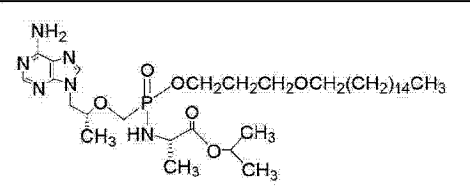
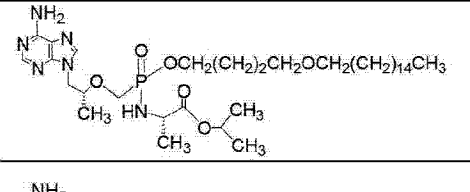
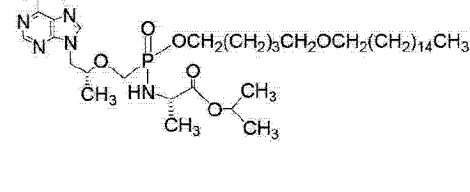
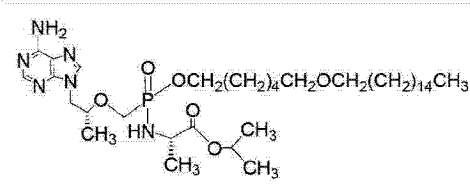
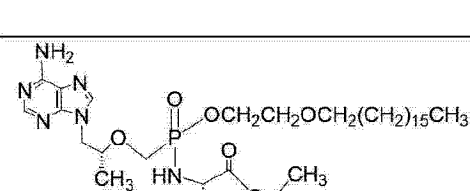
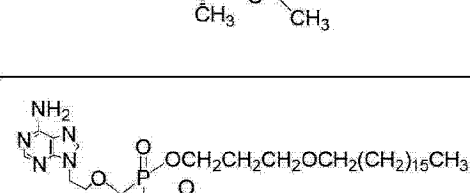
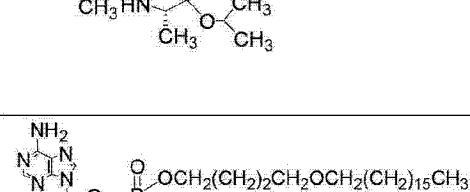
[0021]

化合物编号	m	n	结构式
1	0	12	

[0022]

2	1	12	
3	2	12	
4	3	12	
5	4	12	
6	0	13	
7	1	13	
8	2	13	
9	3	13	
10	4	13	

[0023]

11	0	14	
12	1	14	
13	2	14	
14	3	14	
15	4	14	
16	0	15	
17	1	15	
18	2	15	

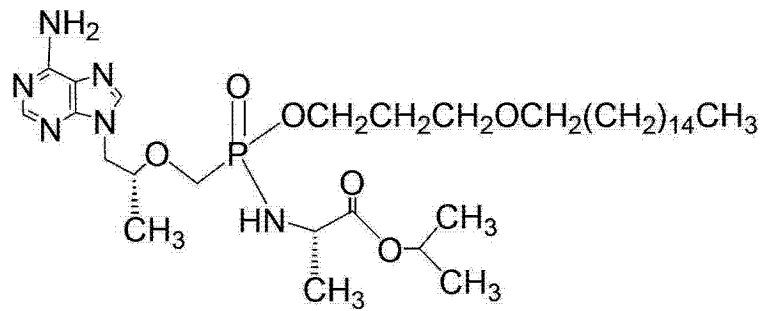
[0024]



19	3	15	
20	4	15	
21	0	16	
22	1	16	
23	2	16	
24	3	16	
25	4	16	

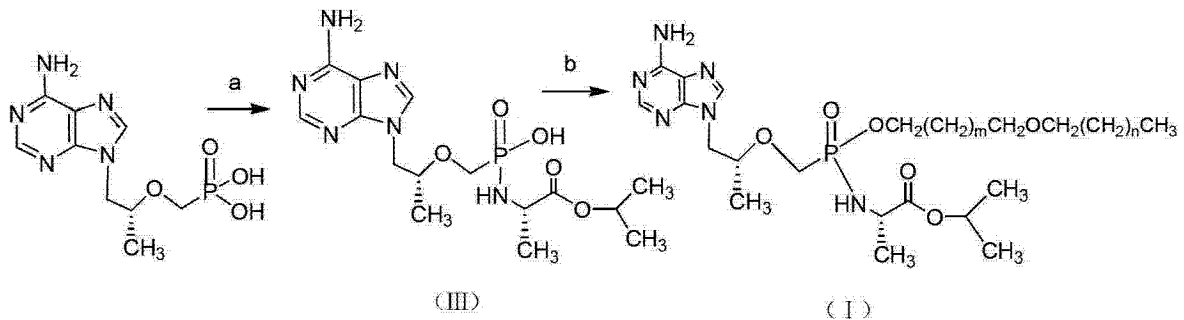
[0025] 一种如上述的替诺福韦双酯化合物,当  $m=1$ ,  $n=14$  时,所述化合物(又称为 C0P130)的结构式为下列结构式:

[0026]



[0027] 本发明提供了上述替诺福韦双酯化合物 (I) 的制备方法, 其合成路线如下:

[0028]



[0029] a)  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H-ALA-OIPR HCL}/\text{TEA}$

[0030] b)  $\text{BrCH}_2(\text{CH}_2)_m\text{CH}_2\text{OCH}_2(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3/\text{DMF}/\text{TEA}$

[0031] 其中:  $m=0-4$ ,  $n=12-16$ ;

[0032] 该制备方法的步骤: 用市售的替诺福韦 (PMPA) 为原料, 先与市售的 L-丙氨酸异丙酯盐酸盐缩合, 得到替诺福韦单酯化合物 (III), 再与自制的侧链溴代烃氧烷基  $\text{BrCH}_2(\text{CH}_2)_m\text{CH}_2\text{OCH}_2(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$  缩合, 得到替诺福韦双酯化合物 (I)。

[0033] 如上述的替诺福韦双酯化合物的方法, 所述用市售的替诺福韦与市售的 L-丙氨酸异丙酯盐酸盐反应得到化合物 (III) 的反应过程中反应温度为  $-5 \sim -15^\circ\text{C}$ , 反应时间为 1-2h; 所述 (III) 与自制的侧链溴代烃氧烷基  $\text{BrCH}_2(\text{CH}_2)_m\text{CH}_2\text{OCH}_2(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$  反应得到化合物 (I) 的反应过程中反应温度为  $75 \sim 85^\circ\text{C}$ , 反应时间为 6-8h。

[0034] 一种含有上述的替诺福韦双酯化合物的药物组合物, 所述药物组合物含有治疗有效量的上述的替诺福韦双酯化合物; 所述药物组合物的剂型为片剂或胶囊。

[0035] 本发明所述的替诺福韦双酯化合物在制备抗病毒药物中的应用。

[0036] 本发明提供了上述替诺福韦双酯化合物以及药物组合物在制备抗病毒药物中的应用。

[0037] 药理活性试验结果表明 (详见表 1), 本发明化合物 COP130 表现出了很好的抗 HIV-1 活性, 其可作为活性成分, 用于制备抗病毒药物, 如抗艾滋病病毒感染的药物。

[0038] 上述药物中还可以添加一种或多种药学上可接受的载体, 如药学上可接受的稀释剂、赋型剂、填充剂、粘合剂、崩解剂、吸收促进剂、表面活性剂、润滑剂、香味剂和甜味剂等。

[0039] 以本发明化合物为活性成分制备的药物可以是片剂、粉剂、胶囊、粒剂或口服液以及注射制剂等多种形式。上述各种剂型的药物均可以按药学领域的常规方法制备。

[0040] 本发明替诺福韦双酯化合物的药物组合物组成可以由下配比构成:

[0041]

本发明替诺福韦双酯化合物	5-95%
乳糖	1-60%
淀粉	0-20%
微晶纤维素有	1-40%
羧甲淀粉钠	1-5%
聚乙二醇(PEG6000)	0-10%
硬脂酸镁	1-5%

[0042] 本发明的积极有益效果：

[0043] 经过国家一级权威检测机构测定，本发明化合物具有成为治疗艾滋病药物所需的各种属性，具体如下：

[0044] (1) 本发明的化合物具有目前治疗艾滋病的首选药物齐多夫定(AZT)以及正处于临床实验阶段的潜在药物AGX-1009、CMX157相当的抑制HIV-1野生型和各种突变耐药型病毒复制的活性，达到了纳摩级( $10^{-9}$ )的水平。药物学家在寻找新药的筛选出中，找出这种活性水平的化合物是非常不容易的。

[0045] (2) 通常情况下，一种物质在具有很高的活性时往往也都具有很高的毒性。然而经权威检测机构检测，本发明化合物COP130在具有很高活性的同时，却具有很低的细胞毒性：“在终浓度 $1\mu\text{mol/L}$ 对细胞增殖无显著性影响”。在寻找新药的筛选出中，药物学家找到具有很高活性的同时又具有如此低的细胞毒性的化合物，是极为困难的。

[0046] (3) 在本发明化合物的结构中，氨基酸长链使本发明化合物具有了上述优点的同时，又使本发明化合物具有了很高的脂溶性。经检测本发明化合物COP130的脂溶性比CMX157脂溶性高出了5.228倍，这充分表明本发明化合物COP130的膜透过性是CMX157膜透过性的5.228倍，这必然极大地提高了替诺福韦的治疗效果。这也就是说，如果原来服用CMX157治疗艾滋病或乙型肝炎每天需5片，若改服化合物COP130则每天仅需服1片，就达到同样的效果。显然本发明化合物COP130极大地改善了替诺福韦的人体的生物利用度，从而显著地提高了替诺福韦治疗艾滋病的效果，相应也必将产生巨大的经济效益和社会效益。

[0047] 总之，本发明化合物集很高的活性、很低的毒性，极好的脂溶性等各种良好属性于一体，有着成为新一代治疗艾滋病药物的前景。这将为治疗艾滋病提供了一种新选择，可将来成为鸡尾酒疗法的一个组成部分。

#### (四)附图说明：

[0048] 图1为本发明化合物COP130和CMX157脂溶性对比的高效液相色谱图。

#### (五)具体实施方式：

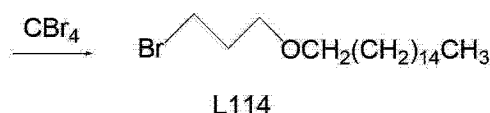
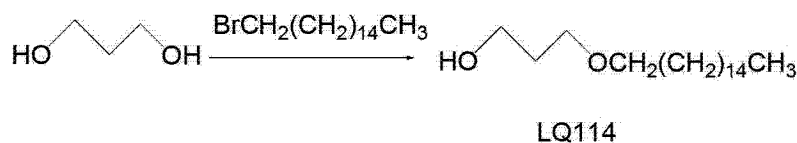
[0049] 以下实施例可以使本领域技术人员更全面地理解本发明，但不以任何方式限制本

发明。所有化合物的结构均经  $^1\text{H}$ NMR 或 MS 所确定。

[0050] 本发明自制的侧链溴代烃氧烷基  $\text{BrCH}_2(\text{CH}_2)_m\text{CH}_2\text{OCH}_2(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$  的具体制备方法：

[0051] a)  $m=1, n=14$  时, L114 的制备：

[0052]



[0053] 在 250ml 三口圆底烧瓶中, 依次加入 1, 3- 丙二醇(9. 2g, 0. 12mol)、叔丁醇钾(7. 0g, 0. 06mol) 和叔戊醇(50ml), 回流下, 慢慢滴加溴代十六烷(12. 2g, 0. 04mol) 和四氢呋喃(50ml) 的混合液, 回流搅拌 50h 后, 冷至室温, 将反应液倾入水中, 水相用 10% 的盐酸酸化后, 加入正己烷(100ml), 分出有机相, 水相用正己烷萃取, 合并有机相, 干燥浓缩后用正戊烷重结晶得到 LQ 114(3- 十六烷氧 -1- 丙醇), (17. 4g, 0. 058mol), 收率 :48. 3%。

[0054]  $^1\text{H}$  NMR(400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  0. 88(3H, t,  $\text{CH}_3$ ), 1. 16-1. 37(28H, m,  $14 \times \text{CH}_2$ ), 1. 79-1. 88(2H, m,  $\text{CH}_2$ ), 2. 52(1H, br, OH), 3. 43(2H, t,  $\text{OCH}_2$ ), 3. 62(2H, t,  $\text{OCH}_2$ ), 3. 78(2H, t,  $\text{OCH}_2$ )。

[0055] ESI-MS:  $[\text{M}+\text{H}]^+301. 3$ ,  $[\text{M}+\text{Na}]^+323. 2$

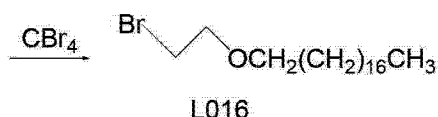
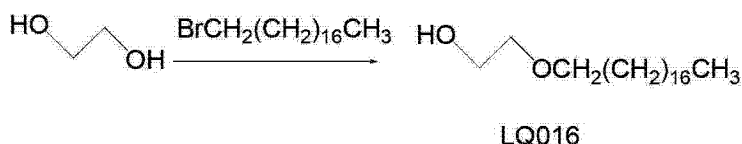
[0056] 在 250ml 圆底烧瓶中, 依次加入 LQ114(4. 8g, 0. 016mol)、四溴化碳(11. 2g, 0. 034mol) 和二氯甲烷(100ml), 在冰浴下, 慢慢滴加三苯基膦(10. 7g, 0. 041mol) 和二氯甲烷(50ml) 混合液, 冰浴下继续搅拌 30min 后, 撤去冰浴, 室温搅拌 1h; 蒸除溶剂, 加入乙醚(150ml), 室温搅拌 1h, 抽滤后将滤液浓缩, 柱层析分离得到 L114(3- 十六烷氧 -1- 溴丙烷)(4. 6g, 0. 013mol), 收率 :81. 3%。

[0057]  $^1\text{H}$  NMR(400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  0. 88(3H, t,  $\text{CH}_3$ ), 1. 18-1. 38(28H, m,  $14 \times \text{CH}_2$ ), 2. 04-2. 12(2H, m,  $\text{CH}_2$ ), 3. 42(2H, t,  $\text{CH}_2\text{Br}$ ), 3. 49-3. 55(4H, m,  $2 \times \text{OCH}_2$ )。

[0058] ESI-MS:  $[\text{M}+\text{H}]^+363. 2$ , 365. 2,  $[\text{M}+\text{Na}]^+385. 2$ , 387. 2。

[0059] b)  $m=0, n=16$  时, L016 的具体制备过程：

[0060]

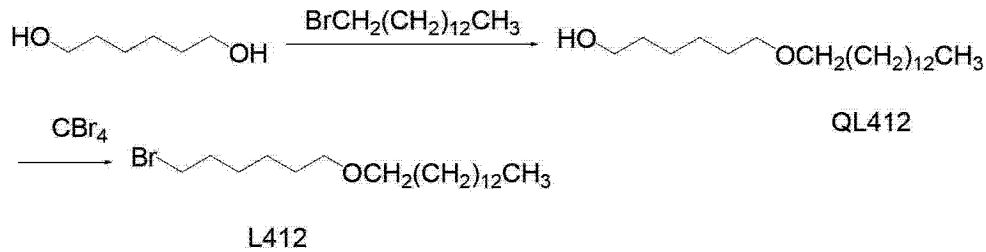


[0061] 以上述 L114 的制备方法合成得到 L016。

[0062] c)  $m=4, n=12$  时, L412 的具体制备过程：

[0063] 其反应式为：

[0064]

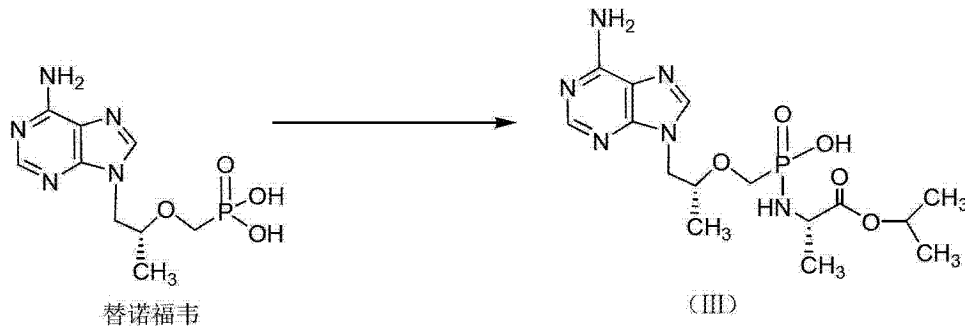


[0065] 以上述 L114 的制备方法合成得到 L412。

[0066] (R)-9-[2-[[[(S)-1-(异丙氧羰基)]乙基]氨基磷酸甲氧]丙基]腺嘌呤(III)的制备过程:

[0067] 其反应式为:

[0068]



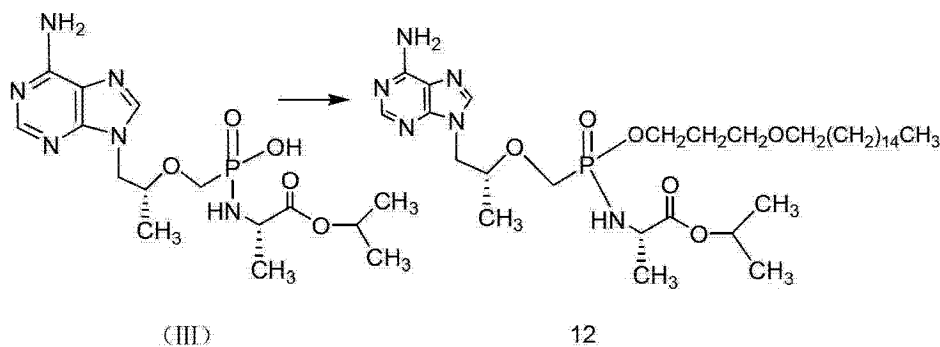
[0069] 在 500ml 的圆底烧瓶中,加入市售的替诺福韦(7.2g, 25.1mmol)到 200ml 无水乙醇溶剂中,在氮气保护下,升温至 50℃后,慢慢滴加二氯亚砷(1.8ml, 25mmol),滴完后升温至 80℃搅拌 2 小时;蒸除溶剂,加入无水二氯甲烷(200ml),在 -30℃下,加入 L-丙氨酸异丙酯盐酸盐(4.17g, 25mmol),慢慢滴加三乙胺(16.7ml, 120mmol),升温到 -10℃下反应 1h 后,用 10% 的磷酸二氢钠洗有机相,分出有机相并经干燥浓缩后,柱层析分离得到中间产物(III):(R)-9-[2-[[[(S)-1-(异丙氧羰基)]乙基]氨基磷酸甲氧]丙基]腺嘌呤(III)(4.4g, 11.0mmol),收率:43.81%。

[0070]  $^1\text{H}$  NMR(400MHz, DMSO):  $\delta$  0.92-0.98(3H, d,  $\text{CH}_3$ ), 1.11-1.36(9H, m,  $3 \times \text{CH}_3$ ), 2.82-2.92(3H, m, NCH and  $2 \times \text{OCH}$ ), 3.82-3.94(2H, m,  $\text{OCH}_2\text{P}$ ), 4.13-4.38(2H, m,  $\text{NCH}_2$ ), 5.76(1H, s, NH), 7.18(2H, s,  $\text{NH}_2$ ), 8.13(1H, s, 嘌呤环上的 H), 8.24(1H, s, 嘌呤环上的 H)。

[0071] ESI-MS:  $[\text{M}+\text{H}]^++401.2$ ,  $[\text{M}+\text{Na}]^++423.1$ 。

[0072] 实施例 1:本发明一种产品 (R)-9-[2-[[十六烷氧丙基[(S)-1-(异丙氧羰基)]乙基]氨基磷酸甲氧]丙基]腺嘌呤(化合物 12 即  $m=1$ ,  $n=14$  时的化合物),其结构式为:

[0073]



[0074] (R)-9-[2-[[十六烷氧丙基[(S)-1-(异丙氧羰基)]乙基]氨基磷酸甲氧]丙基]

腺嘌呤的制备方法：

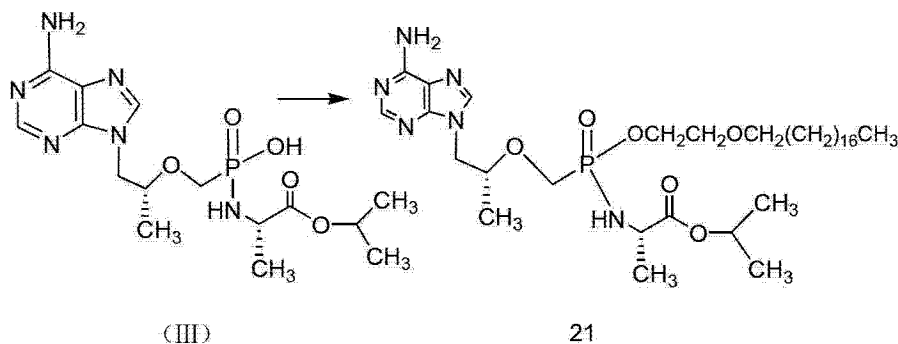
[0075] 在 50ml 圆底烧瓶中，依次加入上述制备的 (R)-9-[2-[[[(S)-1-(异丙氧羰基)]乙基]氨基磷酸甲氧]丙基]腺嘌呤 (III) (2.0g, 5.0mmol)、N,N-二甲基甲酰胺(25ml)、上述制备的 L114 (1.8g, 5.0mmol) 和三乙胺(0.85ml, 6.0mmol)，在 80℃ 下搅拌 6h，蒸除溶剂，加入乙酸乙酯：乙醇为 1:1 的混合溶剂 100ml 充分溶解后过滤，滤液旋干过柱得到白色固体 (R)-9-[2-[[十六烷氧丙基 [(S)-1-(异丙氧羰基)]乙基]氨基磷酸甲氧]丙基]腺嘌呤 (化合物 12) (2.3g, 3.4mmol)，收率：67.4%。

[0076]  $^1\text{H NMR}$ (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  0.88(3H, t,  $\text{CH}_3$ ), 1.21-1.37(38H, m,  $13 \times \text{CH}_2$  and  $4 \times \text{CH}_3$ ), 1.48-1.60(2H, m,  $\text{CH}_2$ ), 1.91-1.96(2H, m,  $\text{CH}_2$ ), 3.26-3.57(6H, m,  $3 \times \text{OCH}_2$ ), 3.81-4.11(6H, m,  $\text{OCH}_2\text{P}$ ,  $\text{NCH}_2$  and  $2 \times \text{OCH}$ ), 4.33-4.42(1H, m,  $\text{NCH}$ ), 4.94-5.03(1H, m,  $\text{NH}$ ), 6.04(2H, s,  $\text{NH}_2$ ), 8.00(1H, s, 嘌呤环上的 H), 8.34(1H, s, 嘌呤环上的 H)。

[0077] ESI-MS:  $[\text{M}+\text{H}]^+683.4$ ,  $[\text{M}+\text{Na}]^+705.4$ 。

[0078] 实施例 2：本发明另一种产品 (R)-9-[2-[[十八烷氧乙基 [(S)-1-(异丙氧羰基)]乙基]氨基磷酸甲氧]丙基]腺嘌呤 (化合物 21 即  $m=0, n=16$  时的化合物)，其结构式为：

[0079]



[0080] 上述产品 (R)-9-[2-[[十八烷氧乙基 [(S)-1-(异丙氧羰基)]乙基]氨基磷酸甲氧]丙基]腺嘌呤的制备方法：

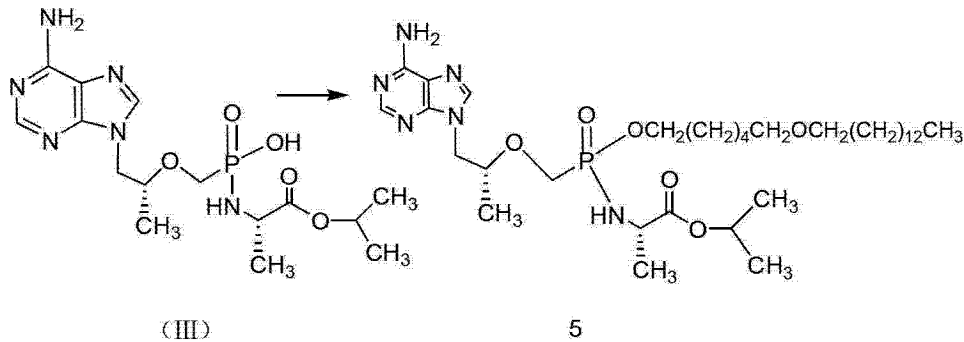
[0081] 在 50ml 圆底烧瓶中，依次加入上述制备的 (R)-9-[2-[[[(S)-1-(异丙氧羰基)]乙基]氨基磷酸甲氧]丙基]腺嘌呤 (III) (2.0g, 5.0mmol)、N,N-二甲基甲酰胺(25ml)、上述制备的 L016 (1.9g, 5.0mmol) 和三乙胺(0.85ml, 6.0mmol)，在 80℃ 下搅拌 6h，蒸除溶剂，加入乙酸乙酯：乙醇为 1:1 的混合溶剂 100ml 充分溶解后过滤，滤液旋干过柱得到白色固体 (R)-9-[2-[[十八烷氧乙基 [(S)-1-(异丙氧羰基)]乙基]氨基磷酸甲氧]丙基]腺嘌呤 (化合物 21) (2.48g, 3.56mmol)，收率：71.2%。

[0082]  $^1\text{H NMR}$ (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  0.88(3H, t,  $\text{CH}_3$ ), 1.22-1.38(42H, m,  $15 \times \text{CH}_2$  and  $4 \times \text{CH}_3$ ), 1.48-1.58(2H, m,  $\text{CH}_2$ ), 3.26-3.58(6H, m,  $3 \times \text{OCH}_2$ ), 3.82-4.12(6H, m,  $\text{OCH}_2\text{P}$ ,  $\text{NCH}_2$  and  $2 \times \text{OCH}$ ), 4.31-4.43(1H, m,  $\text{NCH}$ ), 4.95-5.06(1H, m,  $\text{NH}$ ), 6.05(2H, s,  $\text{NH}_2$ ), 8.00(1H, s, 嘌呤环上的 H), 8.33(1H, s, 嘌呤环上的 H)。

[0083] ESI-MS:  $[\text{M}+\text{H}]^+697.5$ ,  $[\text{M}+\text{Na}]^+719.5$ 。

[0084] 实施例 3：本发明另一种产品 (R)-9-[2-[[十四烷氧己基 [(S)-1-(异丙氧羰基)]乙基]氨基磷酸甲氧]丙基]腺嘌呤 (化合物 5 即  $m=4, n=12$  时的化合物)，其结构式为：

[0085]



[0086] 上述产品 (R)-9-[2-[[十四烷氧己基 [(S)-1-(异丙氧羰基)] 乙基] 氨基磷酸甲氧] 丙基] 腺嘌呤的具体制备方法:

[0087] 在 50ml 圆底烧瓶中, 依次加入上述制备的 (R)-9-[2-[[[(S)-1-(异丙氧羰基)] 乙基] 氨基磷酸甲氧] 丙基] 腺嘌呤 (III) (2.0g, 5.0mmol)、N,N-二甲基甲酰胺(25ml)、上述制备的 L412 (1.9g、5.0mmol) 和三乙胺(0.85ml, 6.0mmol), 在 80°C 下搅拌 6h, 蒸除溶剂, 加入乙酸乙酯:乙醇为 1:1 的混合溶剂 100ml 充分溶解后过滤, 滤液旋干过柱得到白色固体 (R)-9-[2-[[十四烷氧己基 [(S)-1-(异丙氧羰基)] 乙基] 氨基磷酸甲氧] 丙基] 腺嘌呤(1.2g, 3.17mmol), 收率:63.4%。

[0088]  $^1\text{H NMR}$  (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  0.88 (3H, t,  $\text{CH}_3$ ), 1.22-1.37 (38H, m,  $11 \times \text{CH}_2$  and  $4 \times \text{CH}_3$  and 己二醇上的  $2 \times \text{CH}_2$ ), 1.46-1.59 (2H, m,  $\text{CH}_2$ ), 1.89-1.98 (4H, m,  $2 \times \text{CH}_2$ ), 3.24-3.56 (6H, m,  $3 \times \text{OCH}_2$ ), 3.80-4.09 (6H, m,  $\text{OCH}_2\text{P}$ ,  $\text{NCH}_2$  and  $2 \times \text{OCH}$ ), 4.31-4.41 (1H, m,  $\text{NCH}$ ), 4.96-5.05 (1H, m,  $\text{NH}$ ), 6.04 (2H, s,  $\text{NH}_2$ ), 8.00 (1H, s, 嘌呤环上的 H), 8.34 (1H, s, 嘌呤环上的 H). ESI-MS:  $[\text{M}+\text{H}]^+697.5$ ,  $[\text{M}+\text{Na}]^+719.5$ 。

[0089] 实施例 4: 本发明产品 COP130 即实施例 1 产品的药物组合物可按通用的口服药物制剂制备方法制成片剂或胶囊, 100mg 剂量的化合物 COP130 片剂或胶囊单位含量如下 (mg/片, mg/粒)

[0090]

化合物 COP130 100mg

乳糖 65mg

[0091]

淀粉 24mg

微晶纤维素 5mg

羧甲淀粉钠 5mg

硬脂酸镁 1mg

[0092] 实施例 5: 抗 HIV-1 病毒活性的测定

[0093] 1. 实验材料

[0094] 1.1 供试品: 化合物 COP130。

[0095] 1.2 对照品: 阳性对照品齐多夫定由检测单位提供。

[0096] 1.3 细胞株

- [0097] 名称 :293T 来源 :ATCC
- [0098] 保存条件 :液氮
- [0099] 1.4 病毒株
- [0100] 名称 :VSVG/HIV-1 (NL4-3) ;来源 :实验室自存
- [0101] 保存条件 : $-80^{\circ}\text{C}$
- [0102] 1.5 培养基
- [0103] 名称 :DMEM 培养基 来源 :美国 Gibco 公司
- [0104] RPMI-1640
- [0105] FBS
- [0106] 配制方法 :RPMI-1640/DMEM+10%FBS
- [0107] 1.6 实验用介质 :二甲基亚砜 (DMSO) 美国 Sigma。
- [0108] 1.7 主要仪器及试剂 :
- [0109] BS124S 电子天平 :德国 Sartorius 公司
- [0110] 离心机 :美国 Beckman 公司 ;
- [0111]  $\text{CO}_2$  细胞培养箱 :美国 ShellAB 公司 ;
- [0112] Sirius 化学发光检测仪 :德国 Berthold 公司 ;
- [0113] 胰蛋白酶 :美国 Invitrogen 公司 ;
- [0114] 青链霉素 :美国 Invitrogen 公司 ;
- [0115] 胎牛血清 :美国 Gibco 公司 ;
- [0116] 细胞裂解液及荧光素酶检测试剂盒 :美国 Promega 公司
- [0117] 2. 实验方法
- [0118] 2.1 供试品、对照品配制
- [0119] 受试样品 :称重化合物并溶解于 DMSO 中,贮液浓度为  $10\text{mmol/L}$  ;
- [0120] 对照品 :称重齐多夫定溶解于 DMSO,贮液浓度为  $10\text{mmol/L}$ .
- [0121] 2.2 实验步骤
- [0122] 2.2.1 野生型 HIV-1 重组假病毒的制备 :
- [0123] 转染前一天,按  $2.2 \times 10^6$  个细胞的密度接种 293T 细胞到 100mm 培养皿中,用改良的磷酸钙沉淀法共转染  $3 \mu\text{g}$  VSV-G 质粒和  $8 \mu\text{g}$  野生型 HIV-1 核心基因,转染后 16 小时,用 PBS 冲洗细胞并换新鲜的培养基继续培养 32 小时,收集上清并经  $0.45 \mu\text{m}$  的滤膜过滤,生成野生型 HIV-1 重组病毒颗粒 VSVG/HIV-<sub>WT</sub>。
- [0124] 2.2.2 HIV-1 重组假病毒的 p24 抗原测定 :
- [0125] 倍比稀释病毒原液野生型后各取  $450 \mu\text{l}$ ,用  $50 \mu\text{l}$  的裂解液进行裂解,按照 p24 抗原 ELISA 试剂盒说明书 (ZeptoMatrix, Cat :0801111),测定并计算重组病毒原液的 p24 抗原浓度。
- [0126] 2.2.3 药物对 HIV-1 抑制性检测 :
- [0127] 感染前一天,将 293T 细胞按每孔  $6 \times 10^4$  的密度接种到 24 孔板上,用 DMSO 溶解待测化合物,于感染前 15 分钟加入细胞培养液中, DMSO 溶剂作空白对照,再加入  $0.5\text{ml}$  病毒液 (根据 p24 浓度将病毒原液稀释至  $0.1\text{--}0.5\text{ng p24/ml}$ )。感染后 48 小时,去除上清,每孔中加入  $50 \mu\text{l}$  细胞裂解液 (Promega) 裂解细胞,再将  $20 \mu\text{l}$  细胞裂解产物加入至  $30 \mu\text{l}$  荧光



素酶底物中(Promega),用FB15 荧光检测器(Sirius) 仪器测定细胞荧光素酶的相对活性,以 DMSO 作对照,计算化合物对野生型 HIV-1 复制的半数抑制浓度。

#### [0128] 2.2.4 应用 MTS 法检测化合物对细胞存活的影响

[0129] 将对数生长期的 293T 细胞按 8000 ~ 10000 个 / 孔的细胞密度接种至 96 孔板中,每孔 100 $\mu$ l, 37 $^{\circ}$ C, 5%CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 24h 后,加入待测化合物,并以 DMSO 为空白对照(终浓度为 0.1%), 37 $^{\circ}$ C, 5%CO<sub>2</sub> 培养箱中继续培养 44 小时。向每孔中加入 20  $\mu$  l MTS/PMS 现配的混合液, 37 $^{\circ}$ C, 5%CO<sub>2</sub> 培养箱中继续培养 4h 后显色。在酶联检测仪上,波长 490nm 和 650nm (本底) 处检测各孔的光吸收值(OD),并计算细胞的存活率。检测数据详见药理筛选结果表 1。

#### [0130] 表 1 药理筛选结果

[0131]

化合物	药理模型	细胞	给药途径	剂量 (mol/L)	抑制率 (%)	溶剂	备注
CMX157	VSVG/HIV-luc	293T 细胞	感染前加药	1*10 <sup>-6</sup>	100 $\pm$ 0.0	DMSO	IC <sub>50</sub> =1.66nM
				1*10 <sup>-7</sup>	99.7 $\pm$ 0.022		
				3*10 <sup>-8</sup>	97.5 $\pm$ 0.18		
				1*10 <sup>-8</sup>	85.5 $\pm$ 1.12		
				3*10 <sup>-9</sup>	59.0 $\pm$ 5.48		
				1*10 <sup>-9</sup>	44.6 $\pm$ 6.72		
CMX157	VSVG/HIV-luc	293T 细胞	感染前加药	3*10 <sup>-8</sup>	96.1 $\pm$ 0.2	DMSO	IC <sub>50</sub> =2.37nM
				1*10 <sup>-8</sup>	84.5 $\pm$ 1.7		
				3*10 <sup>-9</sup>	55.0 $\pm$ 8.0		
				1*10 <sup>-9</sup>	29.8 $\pm$ 1.1		
COP130	VSVG/HIV-luc	293T 细胞	感染前加药	1*10 <sup>-6</sup>	100 $\pm$ 0.0	DMSO	IC <sub>50</sub> =4.16nM 第一次实验
				1*10 <sup>-7</sup>	99.9 $\pm$ 0.027		
				3*10 <sup>-8</sup>	97.3 $\pm$ 0.05		
				1*10 <sup>-8</sup>	76.6 $\pm$ 0.76		
				3*10 <sup>-9</sup>	39.6 $\pm$ 1.26		
COP130	VSVG/HIV-luc	293T 细胞	感染前加药	3*10 <sup>-9</sup>	97.5 $\pm$ 0.417	DMSO	IC <sub>50</sub> =5.42nM 第二次实验
				1*10 <sup>-8</sup>	79.7 $\pm$ 1.93		
				3*10 <sup>-9</sup>	31.9 $\pm$ 7.93		
				1*10 <sup>-9</sup>	24.0 $\pm$ 1.51		
齐多夫定(AZT)	VSVG/HIV-luc	293T 细胞	感染前加药	1*10 <sup>-7</sup>	99.2 $\pm$ 0.2	DMSO	IC <sub>50</sub> =4.8nM
				1*10 <sup>-8</sup>	76.7 $\pm$ 1.6		
				1*10 <sup>-9</sup>	20.8 $\pm$ 2.6		

#### [0132] 2.2.4 应用 MTS 法检测化合物对细胞存活的影响：

[0133] 将对数生长期的 293T 细胞按 8000 ~ 10000 个 / 孔的细胞密度接种至 96 孔板中,每孔 100 $\mu$ l, 37 $^{\circ}$ C, 5%CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 24h 后,加入待测化合物,并以 DMSO 为空白对照(终浓度为 0.1%), 37 $^{\circ}$ C, 5%CO<sub>2</sub> 培养箱中继续培养 44 小时。向每孔中加入 20  $\mu$  l MTS/PMS 现配的混合液, 37 $^{\circ}$ C, 5%CO<sub>2</sub> 培养箱中继续培养 4h 后显色。在酶联检测仪上,波长 490nm 和 650nm (本底) 处检测各孔的光吸收值(OD),并计算细胞的存活率。

[0134]

MTS 实验	样品编号	剂量	生长率%	SD%
第一次	CMX157	10 $\mu$ M	103.1	0.12
	COP130	10 $\mu$ M	87.3	2.69
第二次	COP130	10 $\mu$ M	82.1	3.8
	COP130	1 $\mu$ M	98.2	0.7
	COP130	0.1 $\mu$ M	99.3	0.1

[0135] 4 实验结论：

[0136] 化合物 CMX157 和 COP130 可有效抑制野生型 HIV-1 的复制，其半数有效浓度分别为：CMX157 ( $2.02 \pm 0.5 \text{ nmol/L}$ )；COP130 ( $4.8 \pm 0.9 \text{ nmol/L}$ )，在相同条件下平行测定的阳性对照 AZT 半数有效浓度为  $4.8 \text{ nM}$ 。化合物 CMX157 在终浓度为  $10 \mu \text{ mol/L}$  对细胞增殖无显著性影响；化合物 COP130 在终浓度  $1 \mu \text{ mol/L}$  对细胞增殖无显著性影响。

[0137] 上述对本发明化合物抗 HIV 活性与细胞毒性的测定表明：

[0138] 本发明化合物 COP130 具有与正在开发处于临床阶段的治疗艾滋病和乙肝的药物 CMX157 及目前治疗艾滋病的首选药物齐多夫定 (AZT) 相当的活性，达到了纳摩级 ( $10^{-9}$ ) 水平。这种活性级别在药物研发筛选中是非常罕见的，而且本发明化合物 COP130 的细胞毒性也是很低的。这些检测数据充分证明本发明化合物 COP130 不仅具有 CMX157 抑制 HBV-1/HIV 野生型和各种突变耐药型病毒复制的很高的活性、很低的毒性，成为治疗艾滋病 HIV-1/HIV 的药物的优异属性。

[0139] 实施例 6：化合物 COP130 与 CMX157 脂溶性大小的测定：

[0140] 比较两种物质脂溶性大小的原理：

[0141] 物质的脂溶性与物质的极性大小相关，物质的极性越大，则该物质的脂溶性越小，物质的极性越小，则该物质的脂溶性越大。

[0142] 各种物质的脂溶性大小的比较，通常通过测定不同物质在一定的条件下，在反向液相色谱图上，保留时间的长短来表征。物质的脂溶性越高，则表现为该物质在反向液相色谱图上，保留时间越长。

[0143] 本发明化合物 COP130 和 CMX157 脂溶性大小的比较就是根据上述的原理来进行的。

[0144] 在色谱条件：色谱柱，Agilent ZorBax SB-C18 ( $250 \times 4.6 \text{ mm. id. } 5 \mu \text{ m}$ )；流动相，甲醇 / 水 =  $95:5 \text{ (v:v)}$ ；检测波长： $254 \text{ nm}$ ；流速： $1.0 \text{ ml/min}$ ；柱温： $30^\circ \text{C}$  下，CMX157 的保留时间为  $1.784 \text{ 分钟}$ ，化合物 COP130 的保留时间为  $9.326 \text{ 分钟}$ 。根据上述检测，本发明化合物 COP130 的脂溶性比 CMX157 本发明化合物 COP130 的脂溶性脂溶性高出了  $5.228 \text{ 倍}$ 。这也就是说本发明化合物 COP130 的膜透过性是 CMX157 膜透过性的  $5.228 \text{ 倍}$ ，这自然得出这样的结论：如果原来每天服用 CMX157 治疗艾滋病或乙型肝炎需  $5 \text{ 片}$ ，若改服化合物 COP130 则仅需服  $1 \text{ 片}$ ，就达到同样的效果。患者由于服药量减少到了  $1/5$ ，则药物对身体的不良反

应也减小到了原来的  $1/5$ , 相应也将产生巨在经济效益和社会效益。

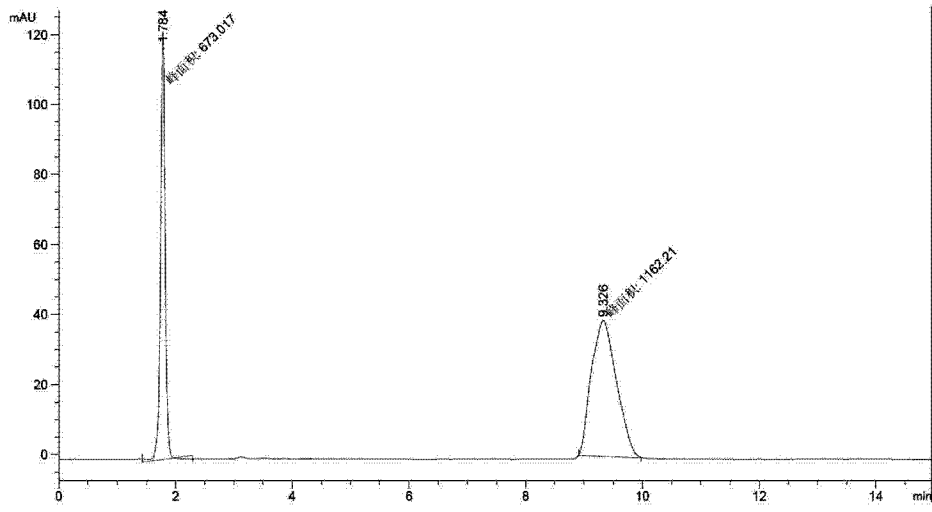


图 1