



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103224530 B

(45) 授权公告日 2014. 10. 29

(21) 申请号 201310134160. 0

A61P 31/18(2006. 01)

(22) 申请日 2013. 04. 17

A61P 31/20(2006. 01)

(66) 本国优先权数据

审查员 林琳

201210286411. 2 2012. 08. 13 CN

201310046588. X 2013. 02. 06 CN

(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 郑州科维专利代理有限公司

41102

代理人 马忠 王理君

(51) Int. Cl.

C07F 9/6561(2006. 01)

A61K 31/675(2006. 01)

权利要求书2页 说明书35页 附图1页

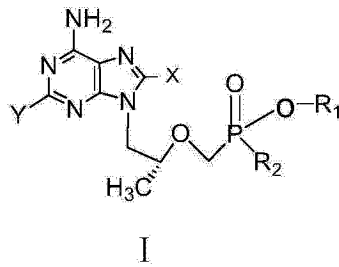
(54) 发明名称

一组替诺福韦酯化合物、制备方法及其在抗
病毒方面的应用

(57) 摘要

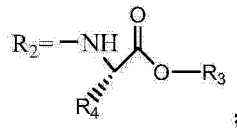
本发明公开了一组具有抑制 HIV-1/ HBV 病毒
复制活性的替诺福韦酯化合物及其药学上可接受
的盐、制备方法及其药物用途。该组化合物具有
通式 I, 其中 X=H, Y=H ;R₁=-CH₂(CH₂)_mCH₂OCH₂(CH₂)_n
CH₃, m=0-4, n=10-20 ;R₂, R₃, R₄分别如说明书中
所定义, 还公开了含有该组化合物的药物组合物。
实验证明本发明化合物之一具有的抑制 HIV-1 病
毒复制的活性是阳性对照药齐多夫定(AZT)的 20
倍、是目前治疗艾滋病最好的药物 ;TDF 的 1000
倍、约是处于临床阶段 CMX157 的 9 倍, 且脂溶性又
约是 CMX157 的 2 倍的优点, 实验还证明本发明化
合物还具有抑制 HBV 病毒复制的活性, 可用于治
疗艾滋病药物或乙型肝炎药物的开发。

1. 具有式 I 的替诺福韦酯化合物或其药学上可接受的盐：



其中 :X = H, Y = H ;

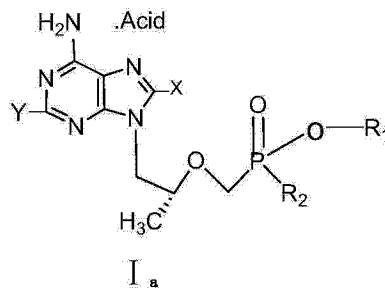
$R_1 = -CH_2(CH_2)_mCH_2OCH_2(CH_2)_nCH_3$, $m = 0-4$, $n = 12-16$;



R_3 是乙基、异丁基、新戊基、正丁基或环己基；

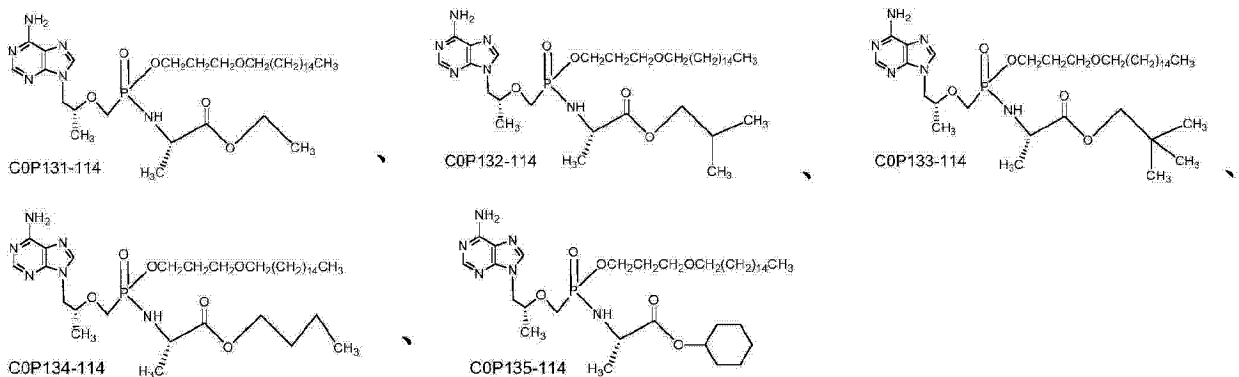
R_4 甲基；

具有式 I 的替诺福韦酯化合物药学上可接受的盐为式 I_a 所示：



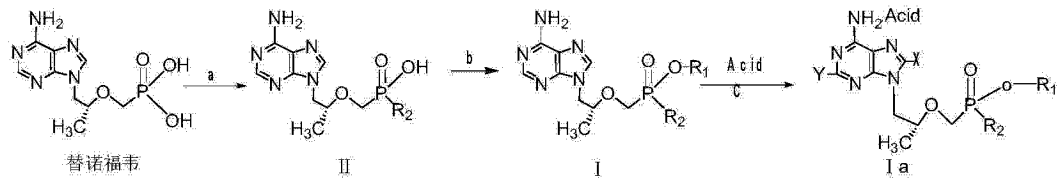
其中 X、Y、 R_1 、 R_2 、 R_3 或 R_4 与式 I 同；Acid 为可与腺嘌呤氨基部分成盐的富马酸、盐酸或硫酸。

2. 如权利要求 1 所述的替诺福韦酯化合物或其药学上可接受的盐,其特征在于,其中 $m = 1$, $n = 14$, 具体化合物为下列结构式所示：



或上列各结构式所示化合物分别与 Acid 为富马酸时形成的药学上可接受的盐。

3. 一种制备权利要求 1 至 2 任一项所述的替诺福韦酯化合物或其药学上可接受的盐的方法,其特征在于,所述方法的合成路线如下：



该制备方法包括如下步骤：

a、用 N-甲基吡咯烷酮为溶剂，三乙胺为脱水剂，2, 2' -二硫二吡啶、三苯基膦为络合剂，用替诺福韦与 L-丙氨酸酯盐酸盐进行脱酸缩合反应，反应过程中反应温度为 65℃ -85℃，反应时间为 20-26 个小时，即得到化合物 II；

b、用 N-甲基吡咯烷酮为溶剂，三乙胺为脱水剂，N, N' -二环己基碳二亚胺为络合剂，用上述反应中得到的化合物 II 与烷氧烷醇进行脱水缩合反应，反应过程中反应温度为 75℃ -95℃，反应时间为 7-9 个小时，得到替诺福韦酯化合物 I；或，进一步地

c、将替诺福韦酯化合物 I 与等量的 Acid 溶于乙腈中，回流搅拌 1-3 小时，室温下冷却析晶，滤出析出的固体并用乙醚洗涤即得到替诺福韦酯化合物药学上可接受的盐 I_a；

其中各符号的定义如权利要求 1 至 2 任一项所述。

4. 一种药物组合物，其特征在于，所述药物组合物含有治疗有效量的权利要求 1-2 中任一项所述的替诺福韦酯化合物或其药学上可接受的盐和一种或多种药学上可接受的载体或赋形剂。

5. 权利要求 1-2 中任一项所述的替诺福韦酯化合物或其药学上可接受的盐在制备用于预防或治疗病毒疾病药物中的应用。

6. 如权利要求 5 所述的应用，其特征在于，其中病毒疾病为 HIV-1 或 HBV 感染或 HIV-1 与 HBV 同时感染。

一组替诺福韦酯化合物、制备方法及其在抗病毒方面的应用

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酯化合物、制备方法及其在抗病毒方面的应用。

背景技术：

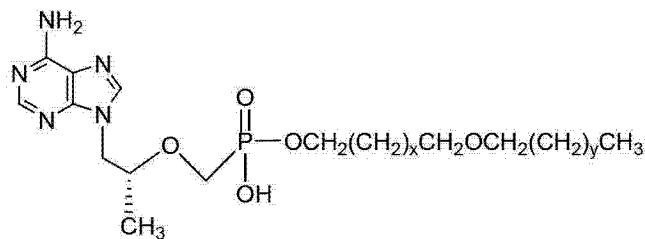
[0002] 人类在病毒感染性疾病的治疗中，病毒耐药性问题日益突出。与环状核苷类逆转录酶抑制剂相比，非环核苷化合物阿德福韦和替诺福韦在防止病毒耐药性问题上具有明显优势，其对耐环状核苷类药物的病毒株有效，本身耐药发生率低，且毒性相对较小，可用于治疗同时感染 HIV-1 和 HBV 的患者。但是，由于磷酸酯基带负电荷，极性太强，生物膜透过性差，导致生物利用度很低，使其不能成为药物应用于临床。其双酯性前药替诺福韦双异丙酰氧基甲酯富马酸盐 (TDF) [商品名：韦瑞德 (Viread)，其 IC_{50} 为 $1.6 \mu M$] 改善了药物的生物利用度，于 2001 年被 FDA 批准上市，是迄今为止抗病毒活性较强、肾毒性又较低 HIV 逆转录酶抑制剂类 AIDS 治疗药物。

[0003] 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。

[0004] 一份专利申请 W02012/041015A1 中，其发明人论述道：“专利 (CN1810816) 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又保留了抗病毒活性。”

[0005] 专利 CN1810816 中的发明化合物的通式结构式为：

[0006]

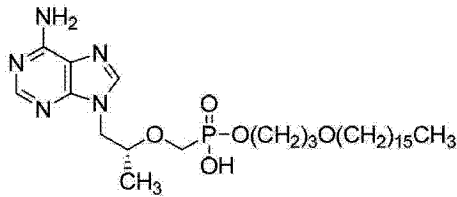


[0007] 其中， $x=0-8$ ， $y=1-20$ 。

[0008] 已完成了临床前的各项检测，不仅证明了该化合物有很高的活性和抗耐药性，而且还发现其毒性也是很低的，不会抑制肝脏内代谢这些药物的酶系。

[0009] 另一家外国公司研发的药物 CMX157 (专利 CN101977610A) 也是对替诺福韦及其衍生物进行的改造。CMX157 的结构式如下：

[0010]



[0011] 尤其是 CMX157, 无论是体外细胞活性筛选还是动物实验, 都表现出了良好的前景。对 HIV 病毒无论野生型还是各种突变耐药型, CMX157 都显示出了很高的活性、很低的毒性, 而且与上市的治疗 HIV 的药物联合使用时都有良好的协同作用。CMX157 有着成为新的治疗艾滋病药物的前景。

[0012] 上述两种化合物都是替诺福韦的前药, 其对替诺福韦加以改造的主要目的是提高其脂溶性, 改善膜透过性, 进而提高人体的生物利用度。然而上述两种前药的脂溶性仍有待进一步的提高, 从而提高人体的生物利用度。

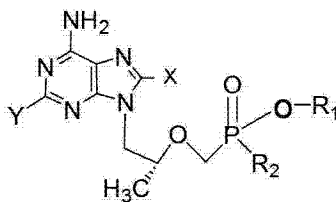
发明内容：

[0013] 本发明的目的是针对现有技术的不足, 对替诺福韦及其衍生的结构进行更进一步的改造, 得到具有更高的脂溶性和更高抑制病毒的活性的新的核苷类化合物。

[0014] 本发明提供了一组具有抑制 HIV-1 病毒复制的活性的替诺福韦酯化合物及其盐, 经国家权威部门检测, 本发明化合物之一的 COP131-114 的抑制 HIV-1 病毒复制活性、是齐多夫定 (AZT) 的 20 倍, 是目前治疗艾滋病最好的药物; 韦瑞德 (TDF) 的 31 倍, 约是 CMX157 的约 9 倍且脂溶性又约是 CMX157 脂溶性 2 倍的优点, 为今后深入研究与开发本发明化合物及其盐的抗病毒应用奠定基础。

[0015] 本发明采用的技术方案为具有通式 I 的替诺福韦酯化合物及其药学上可接受的盐：

[0016]



[0017] I

[0018] 其中 X=H, Y=H;

[0019] $R_1 = -CH_2(CH_2)_mCH_2OCH_2(CH_2)_nCH_3$, $m=0-4$, $n=10-20$;

[0020] $R_2 =$;

[0021] R_3 是氢、 C_{1-12} 烷基、 C_{2-12} 烯基、 C_{2-12} 炔基、 C_{5-6} 芳基或 C_{5-12} 芳烷基；

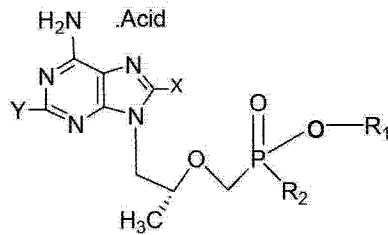
[0022] R_4 是任一天然或可药用氨基酸的侧链, 并且, 条件是当该侧链含有羧基时, 则任选

该羧基选用烷基或芳基酯化；

[0023] 其中： R_3 是异丙基、 R_4 是甲基的化合物除外；

[0024] 具有式 I 的替诺福韦酯化合物药学上可接受的盐为式 I_a 所示：

[0025]



[0026] I_a

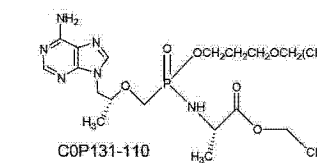
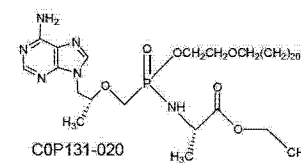
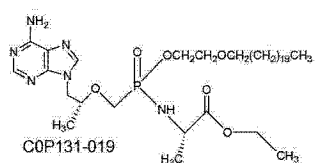
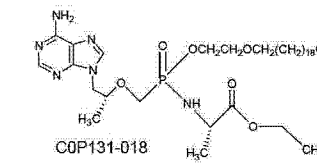
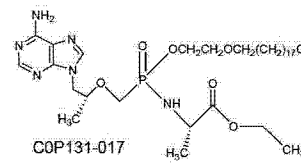
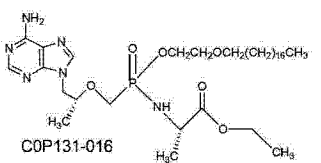
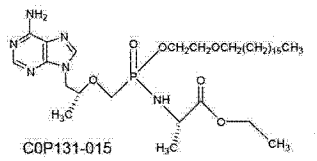
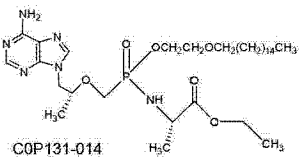
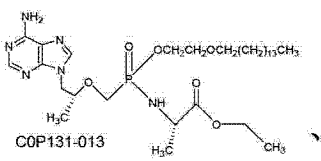
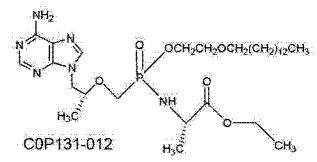
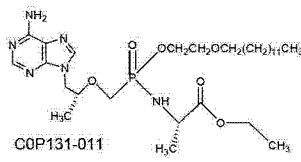
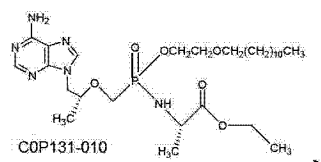
[0027] 其中 X, Y, R_1 , R_2 与式 I 同；Acid 为可与腺嘌呤氨基部分成盐的药学上可接受的无机酸或有机酸。

[0028] 本发明提供的上述的替诺福韦酯化合物或其药学上可接受的盐，优选其中， R_3 是氢或 C_{1-12} 烷基， R_4 是甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、色氨酸、丝氨酸、酪氨酸、半胱氨酸、蛋氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、苏氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、赖氨酸、精氨酸或组氨酸的氨基酸侧链。

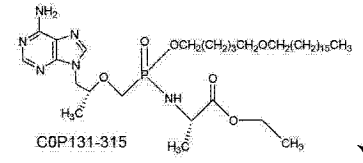
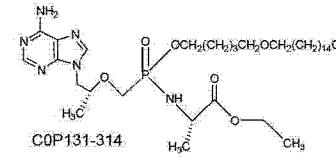
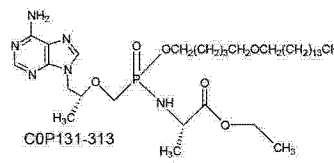
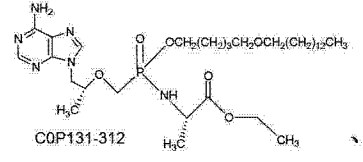
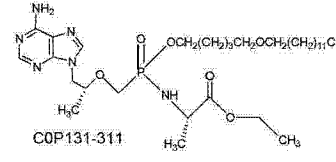
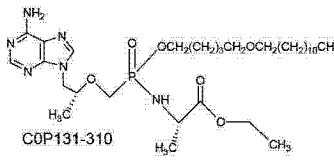
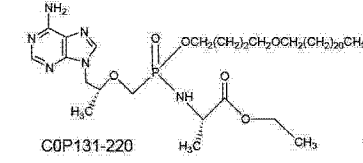
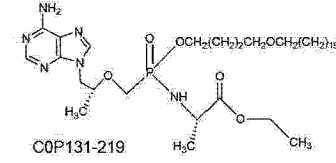
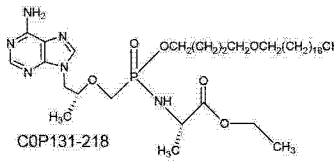
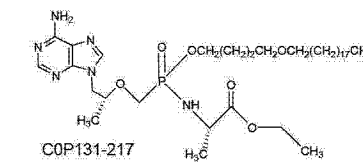
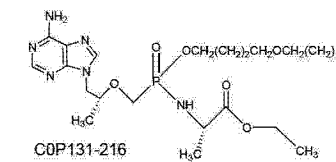
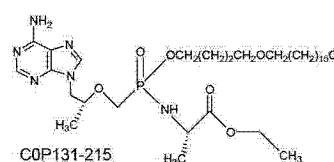
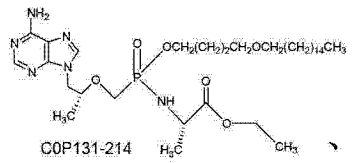
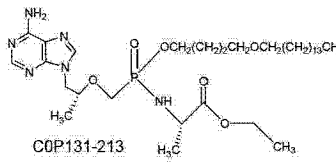
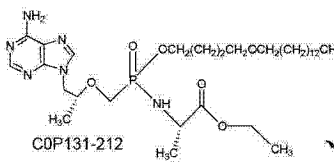
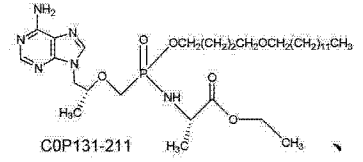
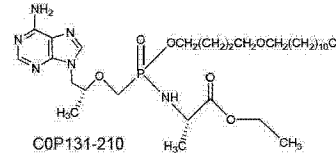
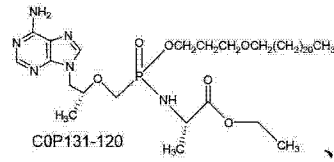
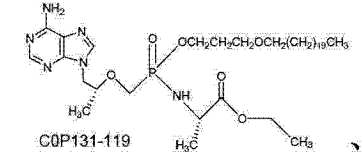
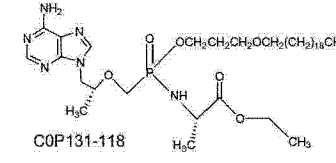
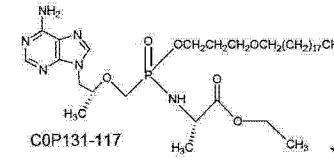
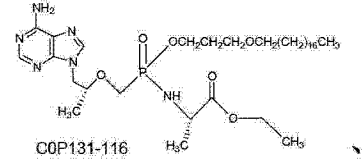
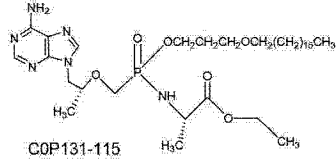
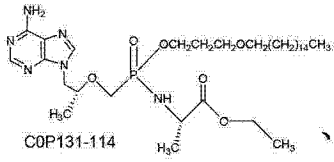
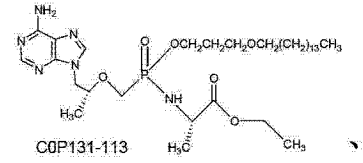
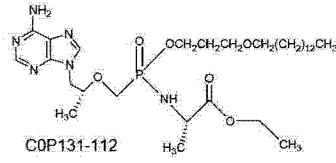
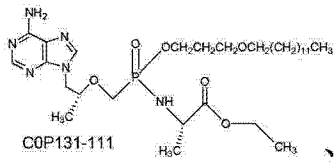
[0029] 本发明提供的上述的替诺福韦酯化合物或其药学上可接受的盐，又优选其中， R_3 是氢、乙基、异丁基、新戊基、正丁基、环己基、甲基、正丙基、仲丁基、叔丁基、正戊基、异戊基、3-甲基己基、正己基、2,2-二甲基戊基、2,3-二甲基戊基、正庚基、正辛基、正壬基、正癸基或正十二烷基， R_4 是丙氨酸侧链。

[0030] 本发明提供替诺福韦酯化合物或其药学上可接受的盐，又优选当 $m=0-4$, $n=10-20$ ； R_3 为乙基、异丁基、新戊基、正丁基或环己基时，为下列结构式所示的替诺福韦酯化合物：

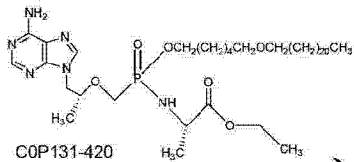
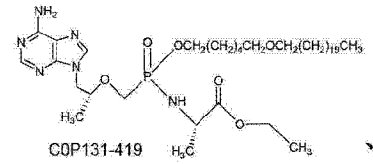
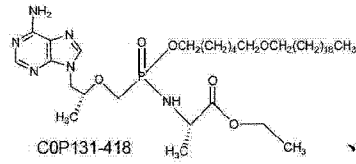
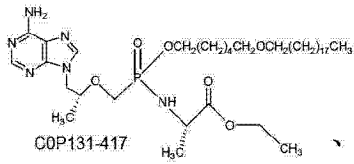
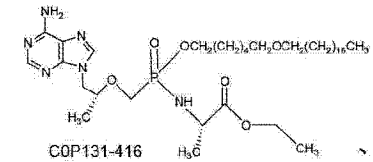
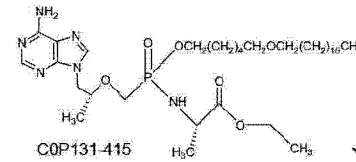
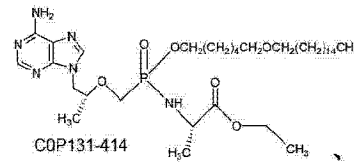
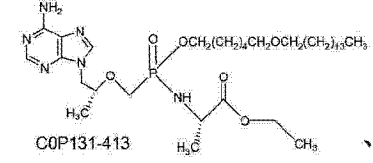
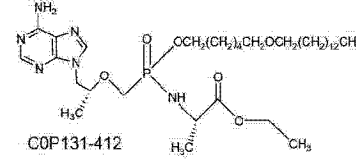
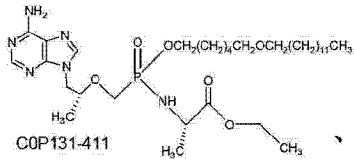
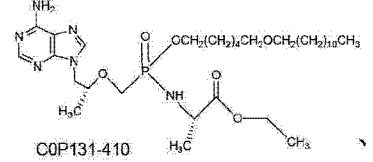
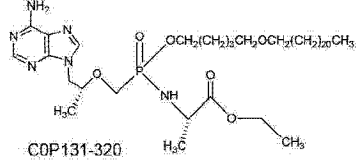
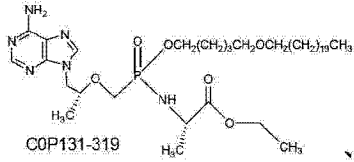
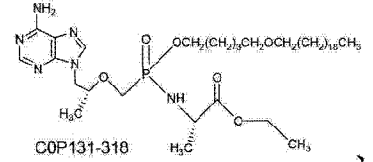
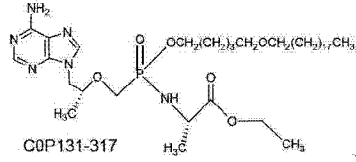
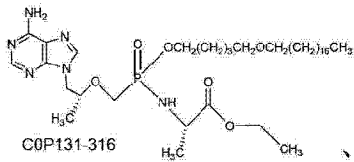
[0031]



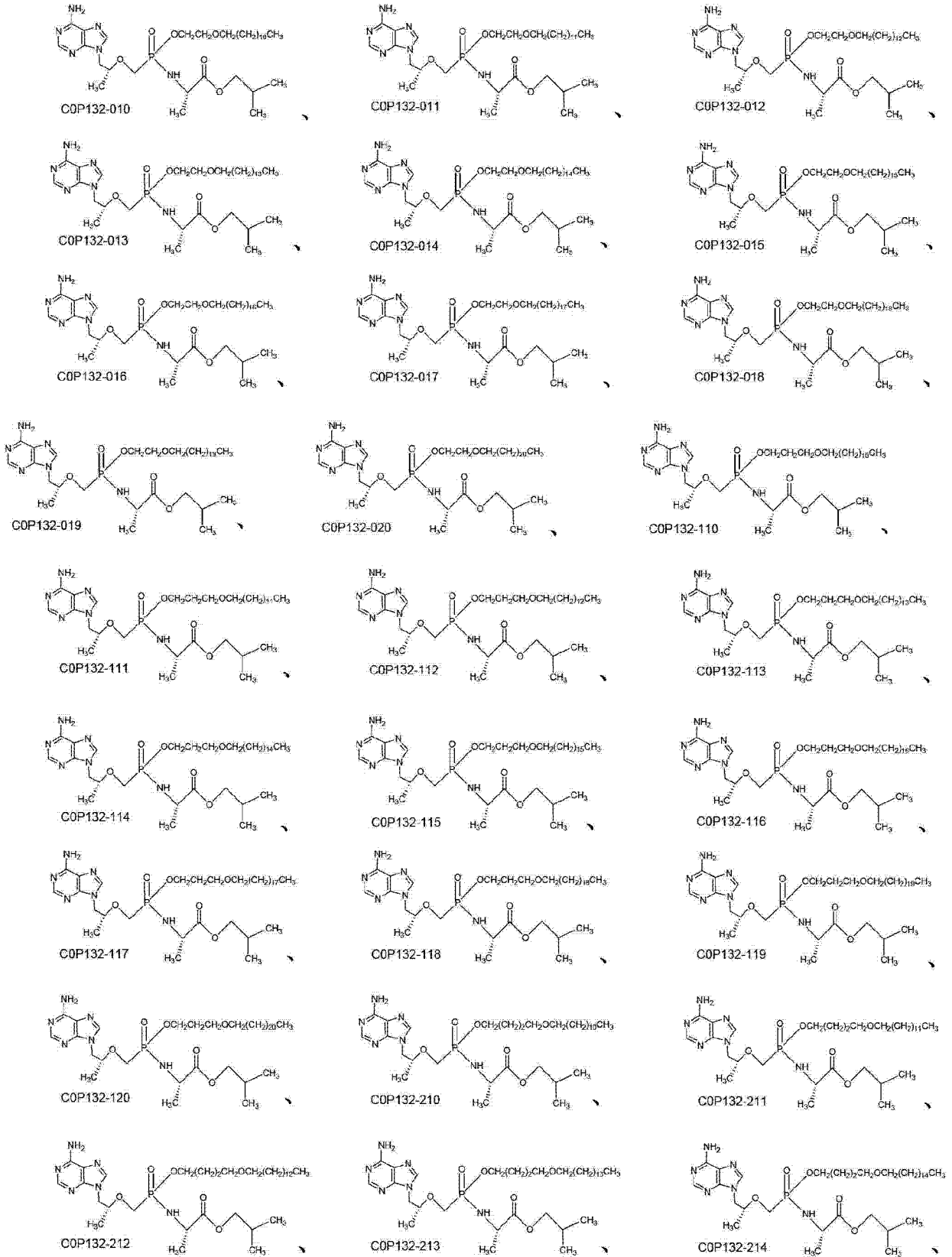
[0032]



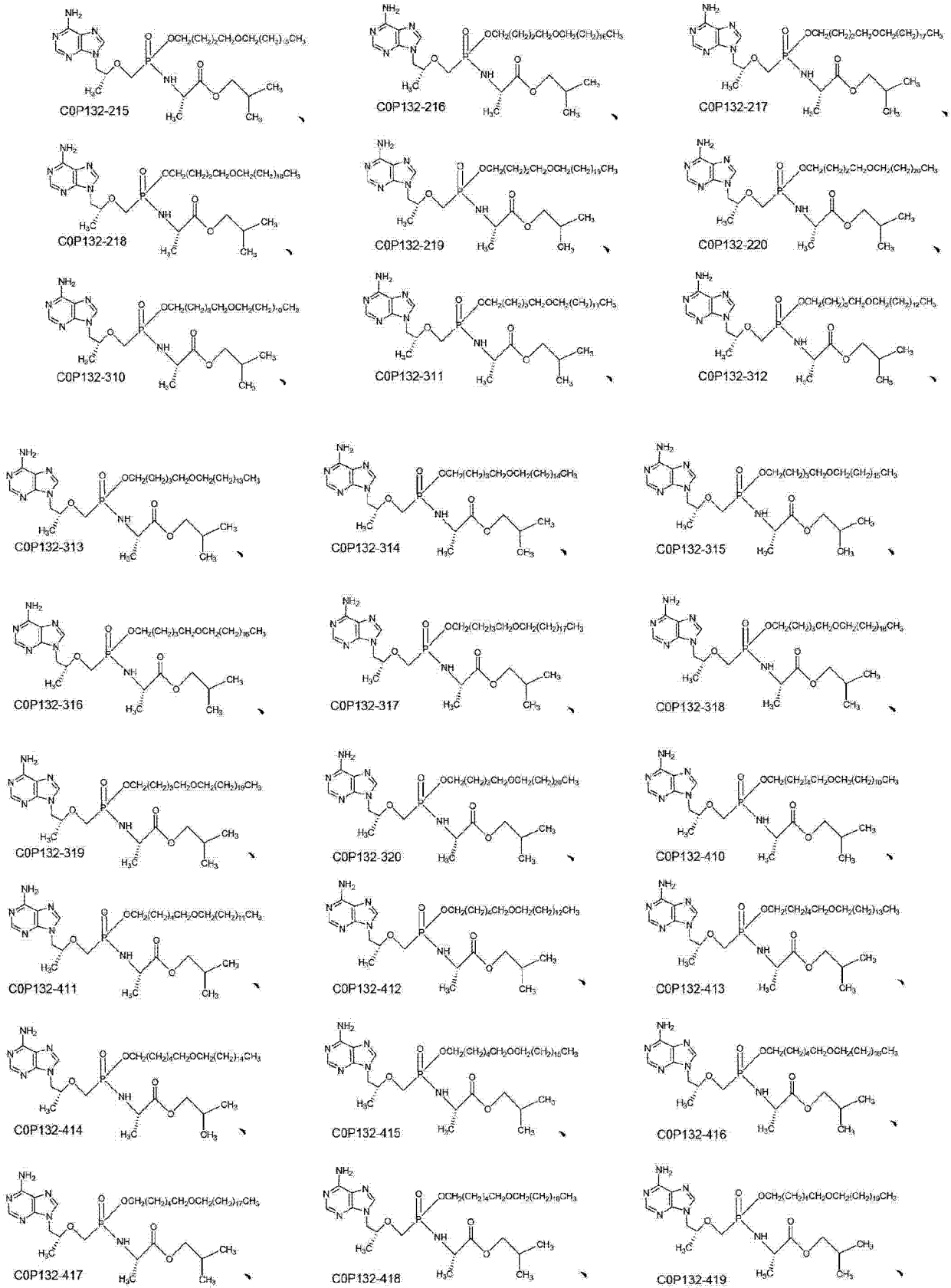
[0033]



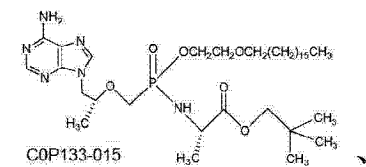
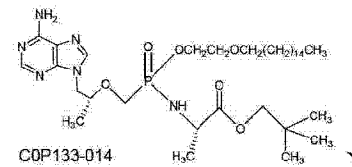
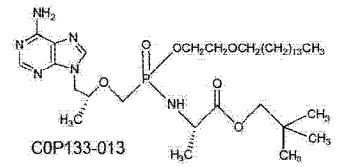
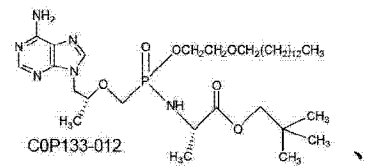
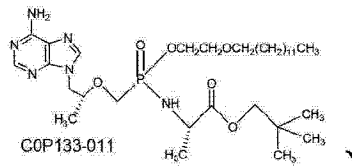
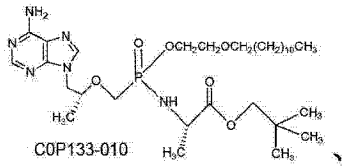
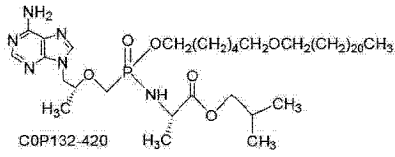
[0034]



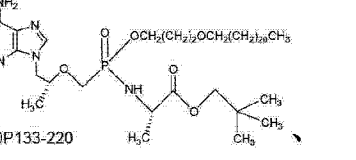
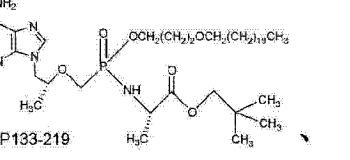
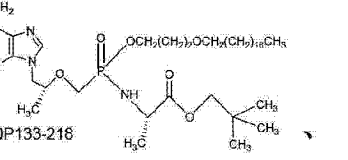
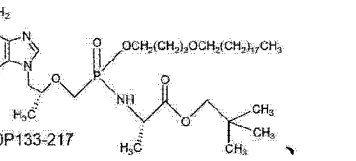
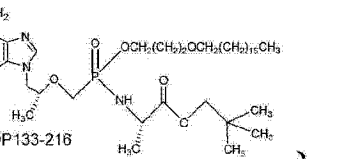
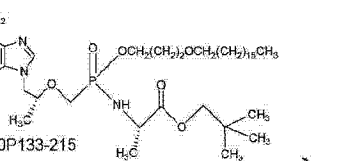
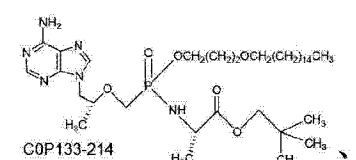
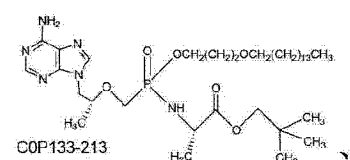
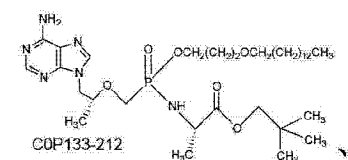
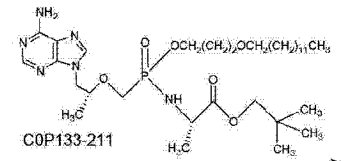
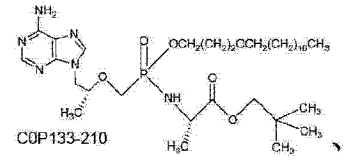
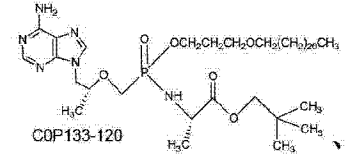
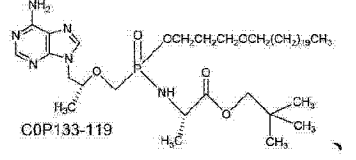
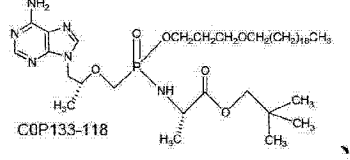
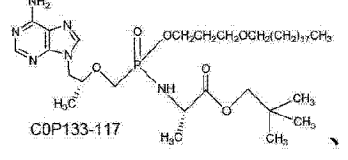
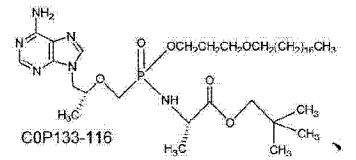
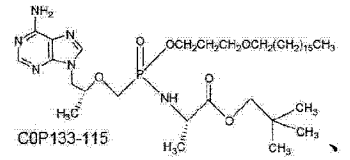
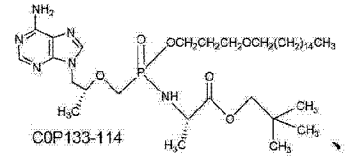
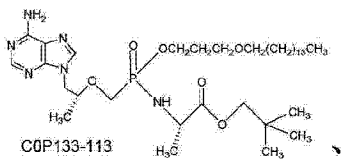
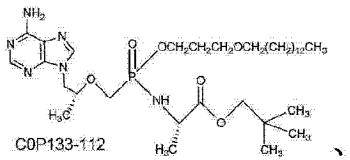
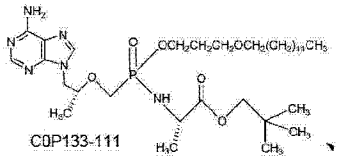
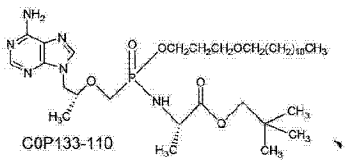
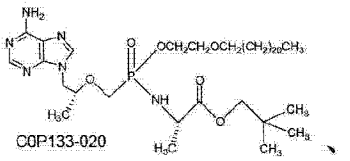
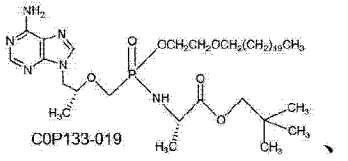
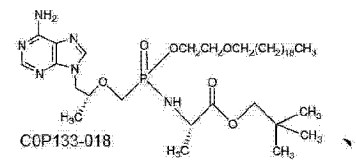
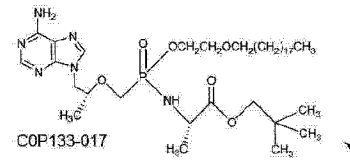
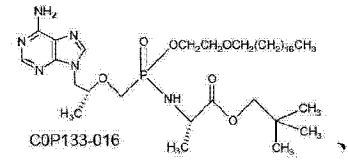
[0035]



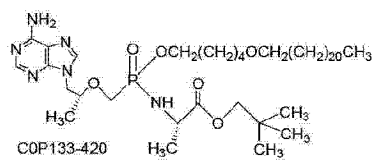
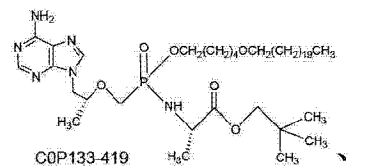
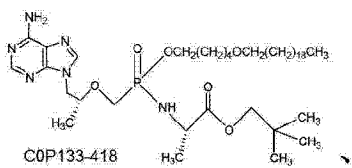
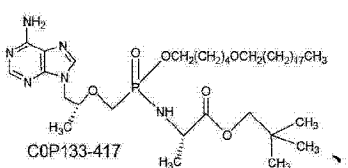
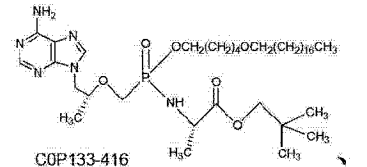
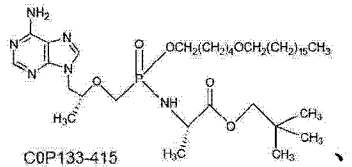
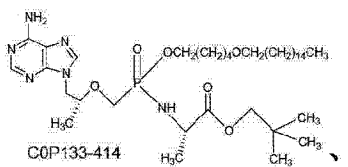
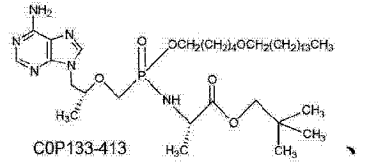
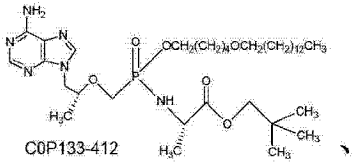
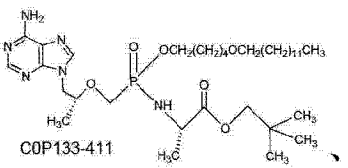
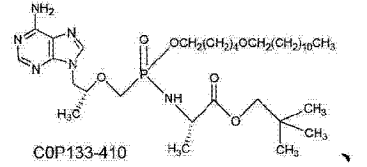
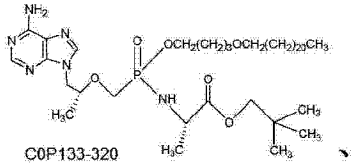
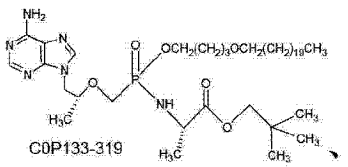
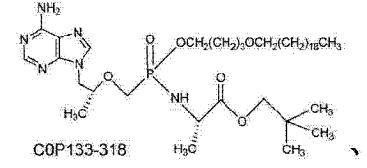
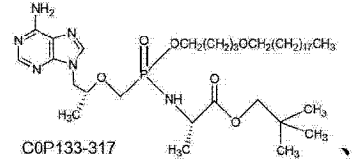
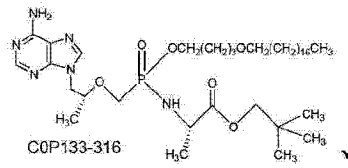
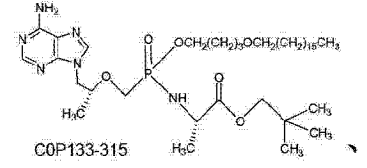
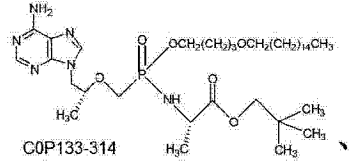
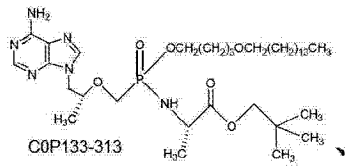
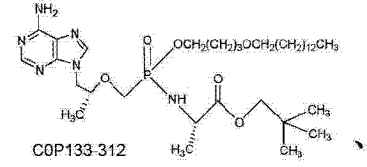
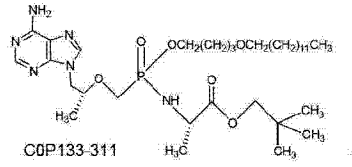
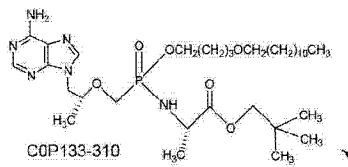
[0036]



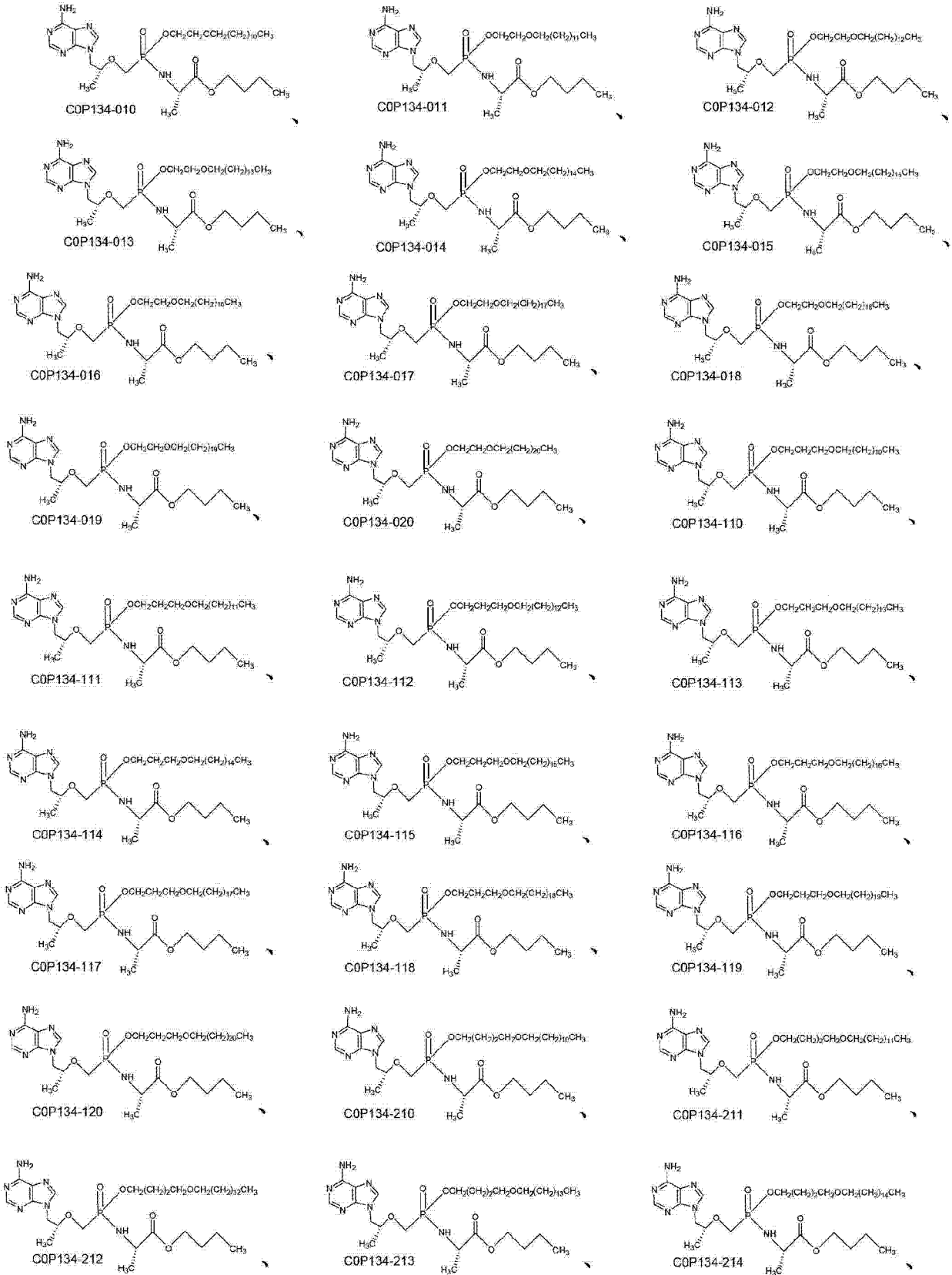
[0037]



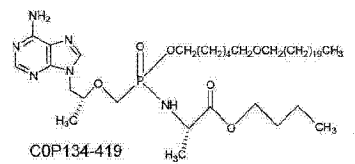
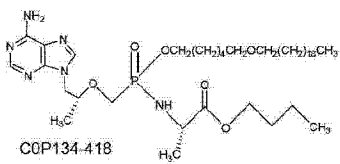
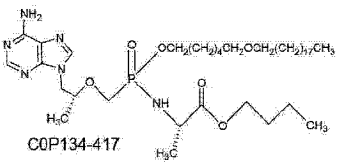
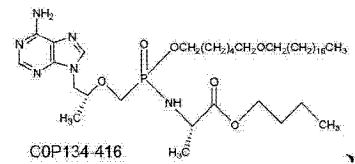
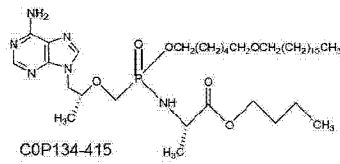
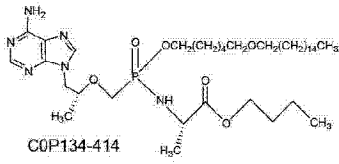
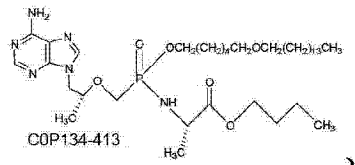
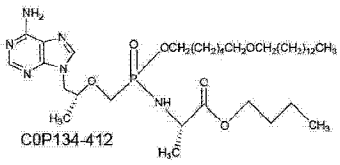
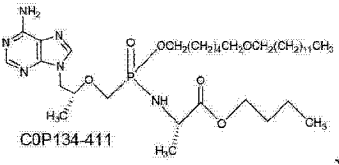
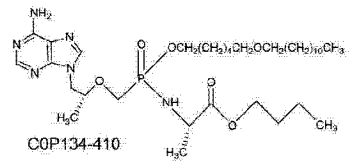
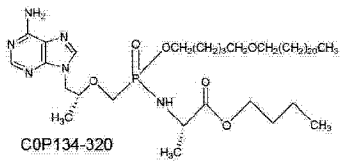
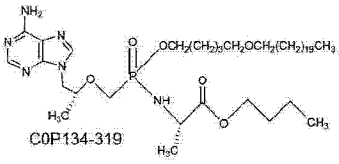
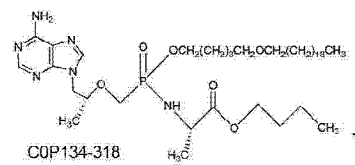
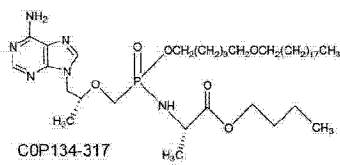
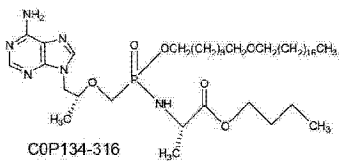
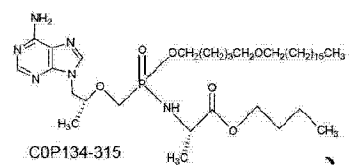
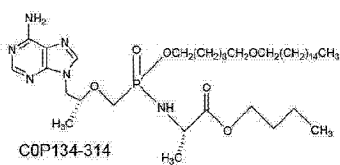
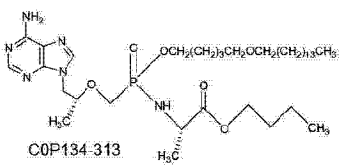
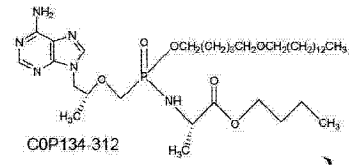
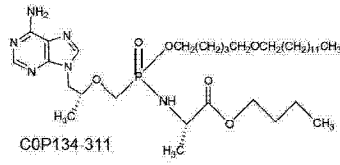
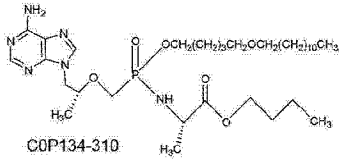
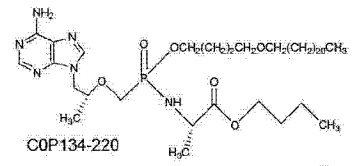
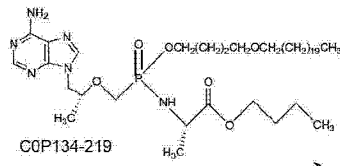
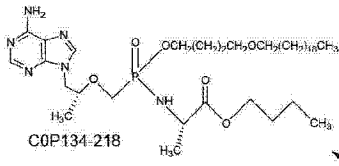
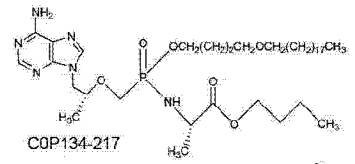
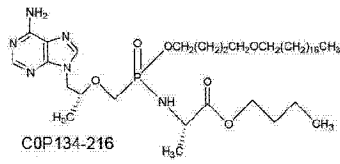
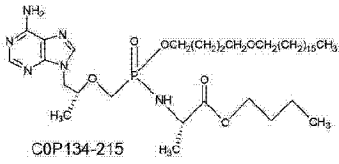
[0038]



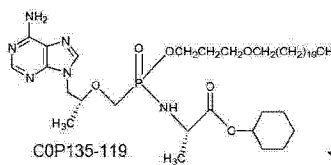
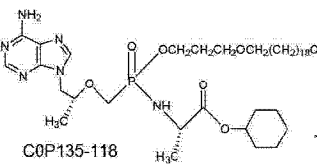
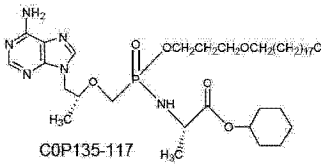
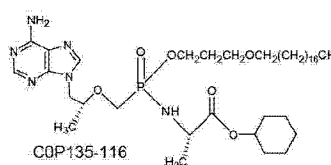
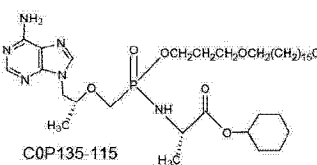
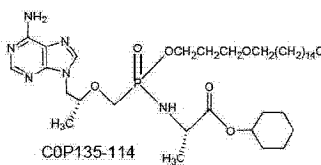
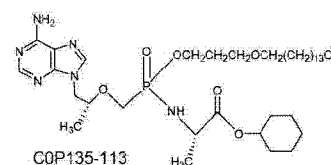
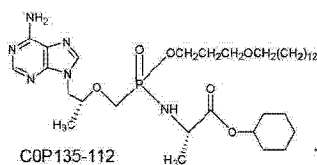
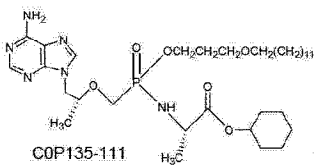
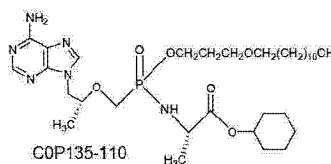
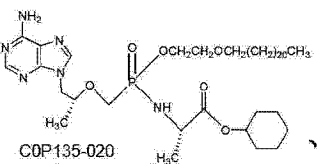
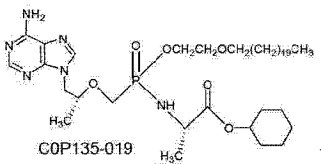
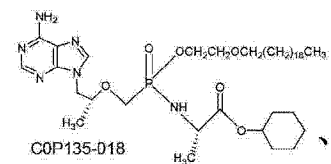
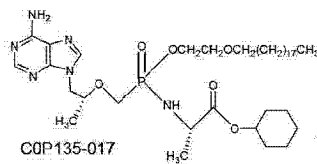
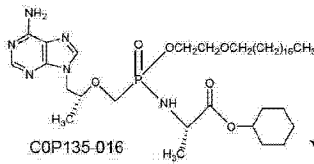
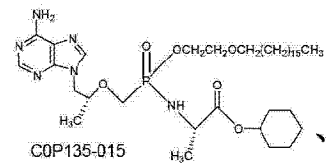
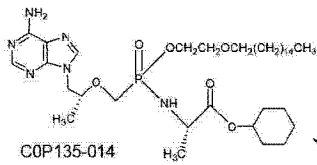
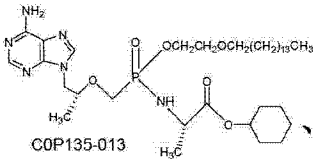
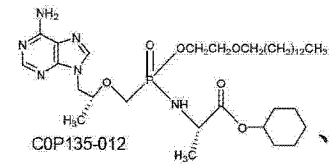
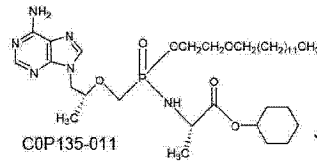
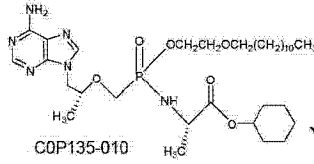
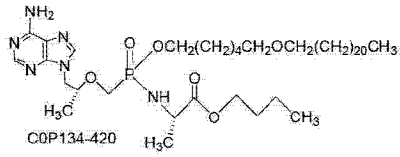
[0039]



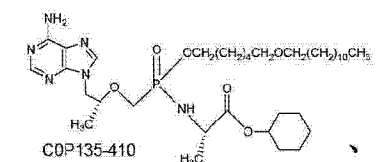
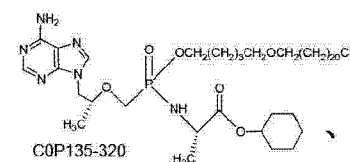
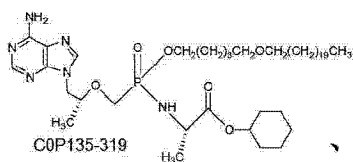
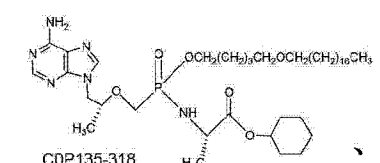
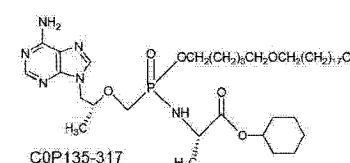
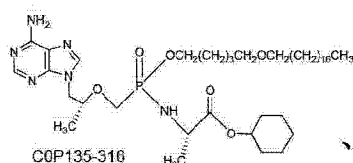
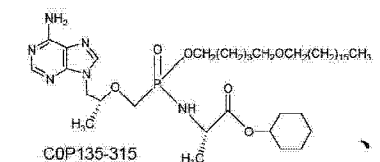
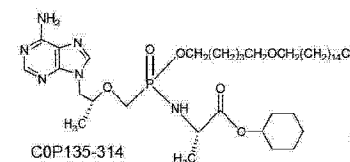
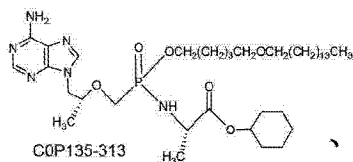
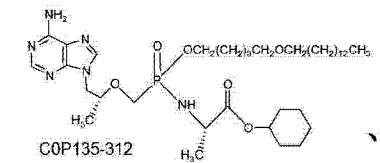
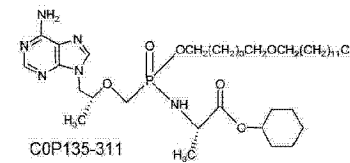
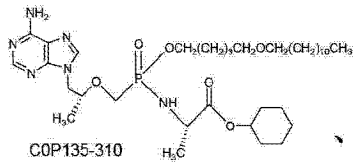
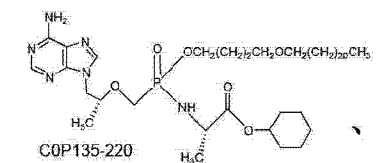
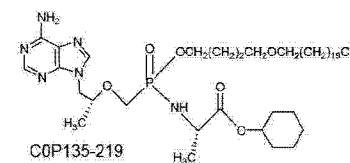
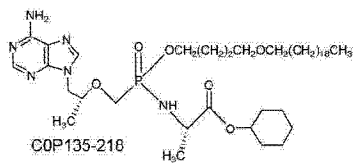
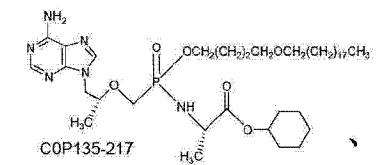
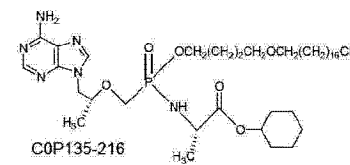
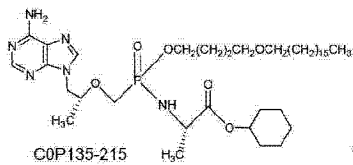
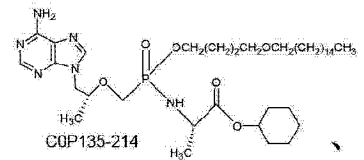
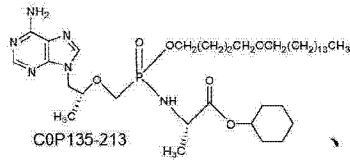
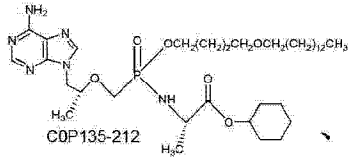
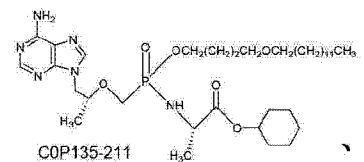
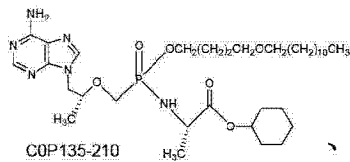
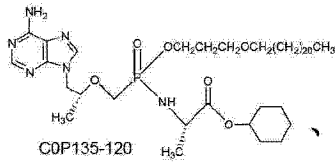
[0040]



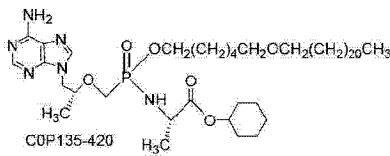
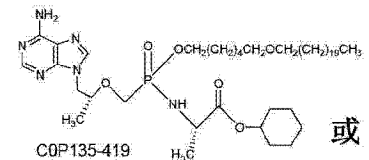
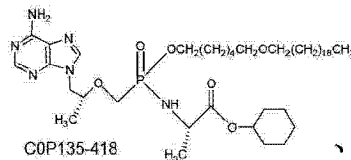
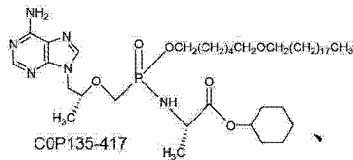
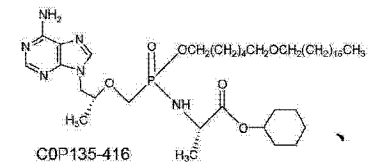
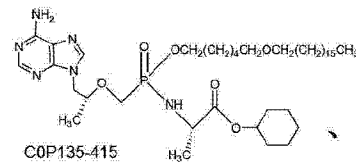
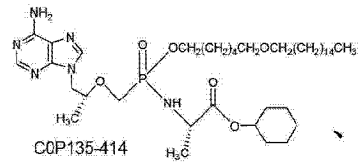
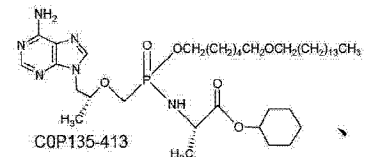
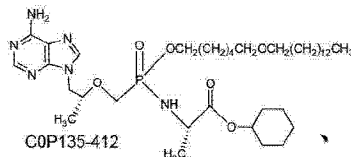
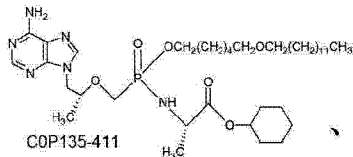
[0041]



[0042]



[0043]

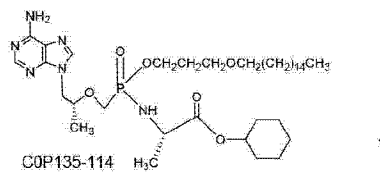
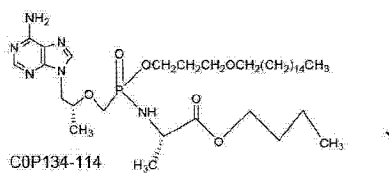
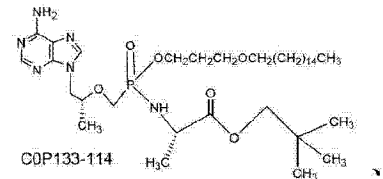
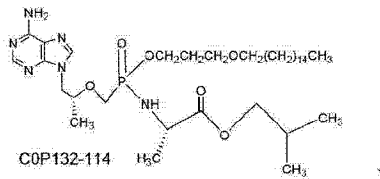
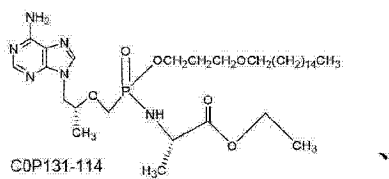


[0044] 或该上列各结构式所示的化合物分别与硫酸、盐酸或富马酸形成的药学上可接受的盐。

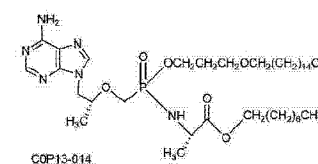
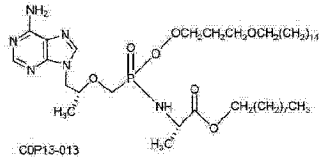
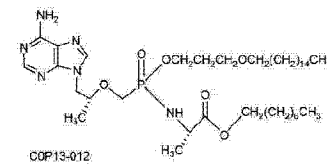
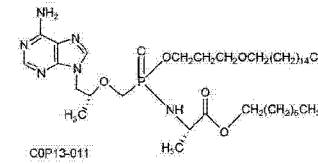
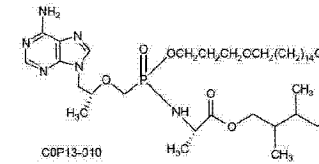
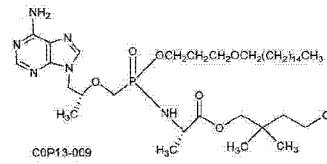
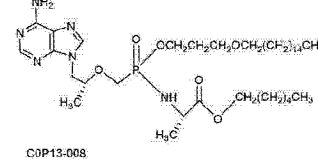
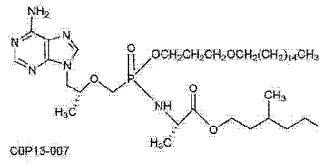
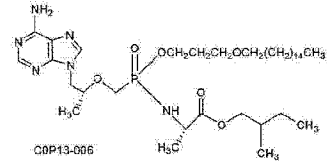
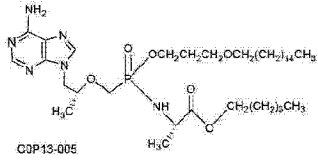
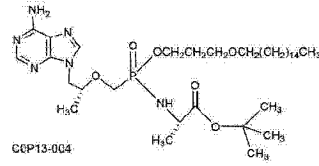
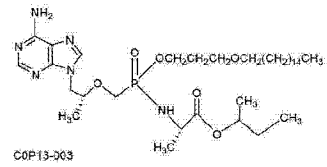
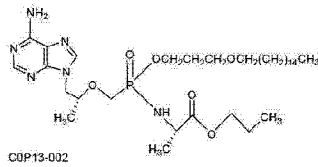
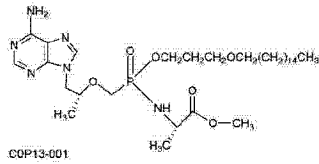
[0045] 本发明提供替诺福韦酯化合物或其药学上可接受的盐,又优选当 $m=0-4$, $n=12-16$; R_3 为乙基、异丁基、新戊基、正丁基或环己基时的化合物;或其药学上可接受的盐为 Acid 是硫酸、盐酸或富马酸时所成的盐。

[0046] 本发明提供的替诺福韦酯化合物或其药学上可接受的盐,又优选当 $m=1$, $n=14$, R_3 为乙基、异丁基、新戊基、正丁基、环己基、甲基、正丙基、仲丁基、叔丁基、正戊基、异戊基、3-甲基己基、正己基、2,2-二甲基戊基、2,3-二甲基戊基、正庚基、正辛基、正壬基、正癸基或正十二烷基时,为下列结构式所示的替诺福韦酯化合物:

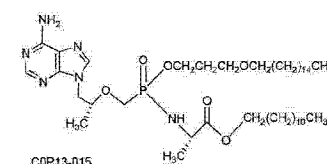
[0047]



[0048]



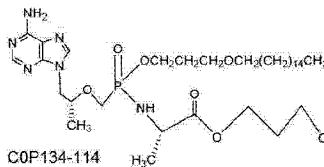
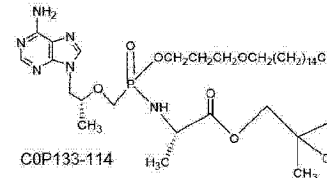
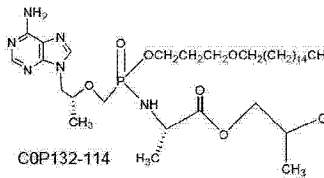
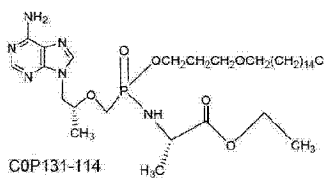
或



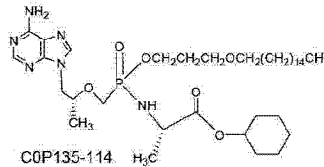
[0049] 或上列各结构式所示化合物分别与 Acid 为富马酸时形成的药学上可接受的盐。

[0050] 本发明提供的替诺福韦酯化合物或其药学上可接受的盐,又优选下列化合物:

[0051]



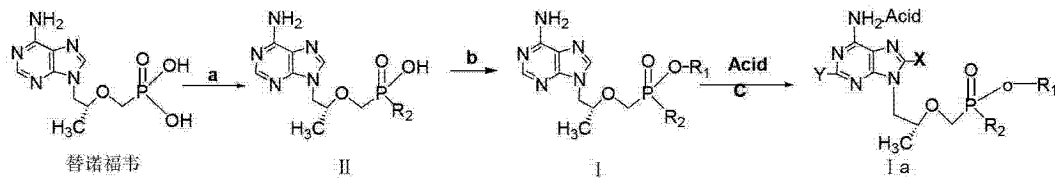
或



[0052] 或上列各结构式所示化合物分别与富马酸形成的药学上可接受的盐。

[0053] 本发明提供替诺福韦酯化合物或其药学上可接受的盐的方法,所述方法的合成路线如下:

[0054]



[0055] 该制备方法包括如下步骤：

[0056] a、用 N- 甲基吡咯烷酮为溶剂，三乙胺为脱水剂，2, 2' - 二硫二吡啶、三苯基膦为络合剂，用替诺福韦与 L- 丙氨酸酯盐酸盐进行脱酸缩合反应，反应过程中反应温度为 65℃ -85℃，反应时间为 20-26 个小时，即得到化合物 II ；

[0057] b、用 N- 甲基吡咯烷酮为溶剂，三乙胺为脱水剂，N, N' - 二环己基碳二亚胺为络合剂，用上述反应中得到的化合物 II 与烷氧烷醇进行脱水缩合反应，反应过程中反应温度为 75℃ -95℃，反应时间为 7-9 个小时，得到替诺福韦酯化合物 I ；

[0058] c、将替诺福韦酯化合物 I 与等量的 Acid 溶于乙腈中，回流搅拌 1-3 小时，室温下冷却析晶，滤出析出的固体并用乙醚洗涤即得到替诺福韦酯化合物药学上可接受的盐 I_a ；

[0059] 其中各符号的定义如上面所述，在上述的制备方法中，起始原料替诺福韦、氯甲基碳酸异丙酯由市售购得。

[0060] 本发明还提供一种药物组合物，所述药物组合物含有治疗有效量的替诺福韦酯化合物及其药学上可接受的盐和一种或多种药学上可接受的载体或赋形剂以及该药物组合物在制备用于预防或治疗病毒疾病药物中的应用。

[0061] 本发明还涉及替诺福韦酯化合物及其药学上可接受的盐在制备用于预防或治疗病毒疾病药物中的应用，尤其是在 HIV 病毒感染或 HBV 感染或 HIV 与 HBV 同时感染的疾病中的应用。

[0062] 发明效果：

[0063] 经过国家权威检测机构测定，本发明化合物具有成为治疗艾滋病的药物所需的各种优良属性，具体如下：

[0064] (1) 本发明的化合物 COP131-114、COP132-114、COP133-114、COP134-114、COP135-114 超越了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药物 CMX157 的抑制 HIV-1 野生型病毒复制的活性。从 IC₅₀ 这项指标看，COP131-114 的 IC₅₀ 是 CMX157 的 8.8 倍、是 AZT 的 20 倍，是目前治疗艾滋病的药物：韦瑞德 (TDF) 的 1000 倍，COP132-114 的 IC₅₀ 是 CMX157 的 2.9 倍、是 AZT 的 9.7 倍，COP133-114 的 IC₅₀ 是 CMX157 的 1.6 倍、是 AZT 的 5.4 倍，COP134-114 的 IC₅₀ 是 CMX157 的 1.7 倍、是 AZT 的 5.5 倍，COP135-114 的 IC₅₀ 是 CMX157 的 1.7 倍、是 AZT 的 3.3 倍。

[0065] (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 COP131-114、COP132-114、COP133-114、COP134-114、COP135-114 在具有很高活性的同时，却具有很低的细胞毒性：“在终浓度 10 μmol/L 对细胞增殖无显著性影响”。

[0066] (3) 经对比检测本发明化合物代表性实例 COP131-114 的脂溶性比 CMX157 脂溶性高出了许多，约是 CMX157 脂溶性 2 倍，表明本发明化合物的膜透过性比 CMX157 膜透过性要高出了许多，改善了替诺福韦的生物利用度，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。

[0067] (4) 经对比检测本发明化合物 C0P131-114、C0P132-114、C0P133-114、C0P134-114、C0P135-114 可有效抑制 HBV 的复制,其半数有效浓度分别为 :C0P131-114 (35.3 μ M);C0P132-114 (34.6 μ M);C0P133-114 (6.05 μ M);C0P134-114 (37.8 μ M);C0P135-114 (14.5 μ M); 在相同条件下平行测定的阳性对照 TDF 半数有效浓度为 80.1 μ M。

[0068] 这充分表明:本发明化合物比目前销售额最大的抗艾滋病药物、同时又被专家誉为最好的抗乙肝药物 TDF 抑制病毒复制的活性高出很多,有望成为治疗 HBV 感染的药物。

[0069] 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或治疗乙型肝炎的药物的前景。

附图说明

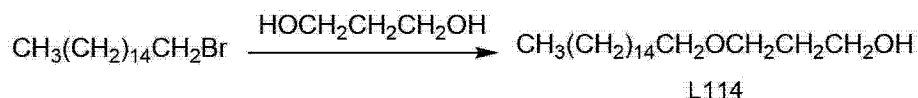
[0070] 图 1 为比较本发明化合物 C0P131-114 和 CMX157 脂溶性的高效液相色谱图。

具体实施方式:

[0071] 以下实施例可以使本专业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 ^1H NMR 或 MS 所确定。

[0072] 实施例 1 :3-十六烷氧基 -1-丙醇 (L114) 的制备

[0073]

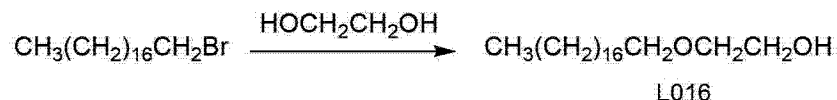


[0074] 在 250ml 三口圆底烧瓶中,依次加入 1,3-丙二醇(9.13g,0.12mol)、叔丁醇钾(6.8g,0.06mol)和叔戊醇(50ml),回流状态下,慢慢滴加溴代十六烷(12.17g,12.2ml,0.04mol)和四氢呋喃(50ml)的混合液,3 小时滴完。再回流搅拌 50 小时后,冷至室温,将反应液倾入 50ml 水中,搅拌,用 10% 的盐酸酸化至 PH=7,加入正己烷(100ml),分出有机相,水相用正己烷萃取,合并有机相,有机相干燥浓缩后用正戊烷重结晶得到 3-十六烷氧基 -1-丙醇 (L114) (7.8g,0.026mol),收率 :65%。

[0075] ^1H NMR(400MHz, CDCl_3) δ , (ppm) :0.88 (3H, t, CH_3), 1.14-1.37 (26H, m, $13 \times \text{CH}_2$), 1.48-1.65 (2H, m, CH_2), 1.71-1.94 (2H, m, CH_2), 2.38-2.53 (1H, br, OH), 3.43 (2H, t, OCH_2), 3.62 (2H, t, OCH_2), 3.78 (2H, t, OCH_2)。ESI-MS: $[\text{M}+\text{H}]^+301.3$, $[\text{M}+\text{Na}]^+323.2$

[0076] 实施例 2 :2-十八烷氧基乙醇 (L016) 的制备

[0077]

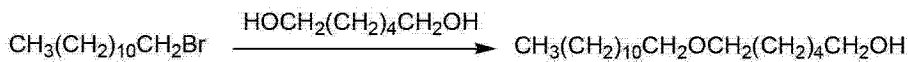


[0078] 以实施例 1 类似方法合成得到 2-十八烷氧基乙醇 (L016)

[0079] ^1H NMR(400MHz, CDCl_3) δ , (ppm) :0.88 (3H, t, CH_3), 1.06-1.49 (30H, m, $15 \times \text{CH}_2$), 1.53-1.654 (2H, m, CH_2), 1.90-2.10 (1H, br, OH), 3.47 (2H, t, OCH_2), 3.53 (2H, t, OCH_2), 3.73 (2H, t, OCH_2)。ESI-MS: $[\text{M}+\text{H}]^+315.3$, $[\text{M}+\text{Na}]^+337.3$ 。

[0080] 实施例 3 :6-十二烷氧基 -1-己醇 (L410) 的制备

[0081]

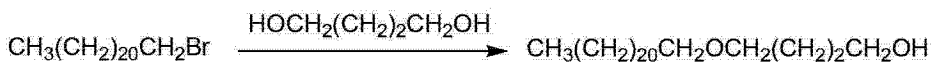


L410

[0082] 以实施例 1 类似方法合成得到 6-十二烷氧基-1-己醇 (L410)。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ, (ppm): 0.88 (3H, t, CH₃), 1.14-1.34 (18H, m, 9×CH₂), 1.35-1.42 (4H, m, 2×CH₂), 1.48-1.64 (6H, m, 3×CH₂), 1.93-2.01 (1H, br, OH), 3.28-3.48 (4H, m, 2×OCH₂), 3.62 (2H, t, OCH₂)。ESI-MS: [M+H]⁺287.3, [M+Na]⁺309.3。

[0083] 实施例 4 :4-二十二烷氧基-1-丁醇 (L220) 的制备

[0084]

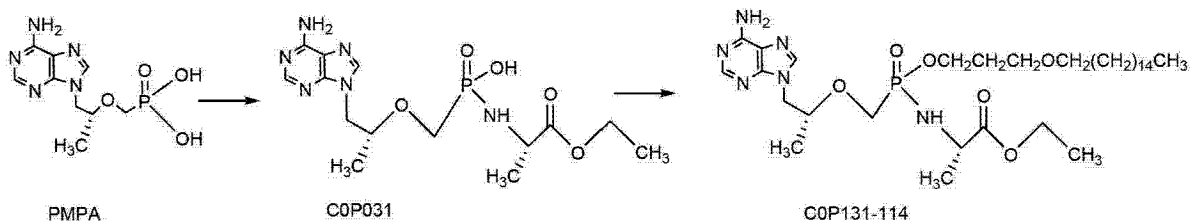


L220

[0085] 以实施例 1 类似方法合成得到 :4-二十二烷氧基-1-丁醇 (L220)。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ, (ppm): 0.88 (3H, t, CH₃), 0.99-1.46 (38H, m, 19×CH₂), 1.52-1.61 (2H, m, CH₂), 1.62-1.78 (4H, m, 2×CH₂), 1.95-2.67 (1H, br, OH), 3.30-3.51 (4H, m, 2×OCH₂), 3.64 (2H, t, OCH₂)。ESI-MS: [M+H]⁺399.4

[0086] 实施例 5 : (R)-9-[2-[[十六烷氧丙基 [(S)-1-(乙氧羰基)]乙基]氨基磷酸甲氧]丙基]腺嘌呤 (COP131-114) 的制备

[0087]

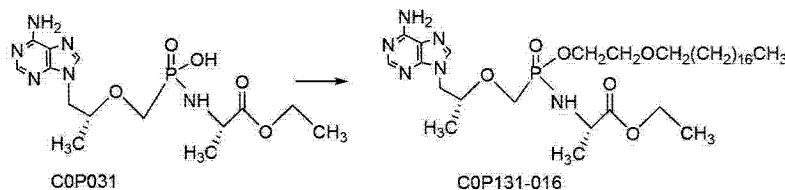


[0088] 在 50ml 圆底烧瓶中, 依次加入替诺福韦 (PMPA) (1.18g, 4.13mmol)、L-丙氨酸乙酯盐酸盐 (2.6g, 17mmol)、2,2'-二硫二吡啶 (1.82g, 8.26mmol)、三乙胺 (3.44g, 4.8ml, 34mmol)、三苯基膦 (2.16g, 8.24mmol) 和 N-甲基吡咯烷酮 (10ml), 在 80℃ 下密闭搅拌 10h 后, 蒸除溶剂, 用乙酸乙酯:乙醇=10:1 过柱, 得到中间产品 (R)-9-[2-[[[(S)-1-(乙氧羰基)]乙基]氨基磷酸甲氧]丙基]腺嘌呤 COP031 (1.04g, 2.7mmol), 收率 65.3%。

[0089] 在 250ml 圆底烧瓶中, 依次加入 COP031 (9.7g, 25mmol)、L114 (15g, 50mmol) 混合溶于 65ml N-甲基吡咯烷酮中, 加热到 85℃ 搅拌 30 分钟后, 慢慢滴加三乙胺 22ml, 然后升温至 100℃, 滴加二环己基碳二亚胺 (DCC) 11g (溶于 16ml N-甲基吡咯烷酮中)。在 100℃ 下搅拌反应 10 小时后, 冷却至 50℃, 旋干, 加入 500ml 二氯甲烷:甲醇=1:1 的混合溶剂, 搅拌 1 小时后抽滤, 多次冲洗滤饼, 合并滤液后干燥浓缩, 用二氯甲烷:甲醇=1:1 硅胶柱层析, 得到目标物: (R)-9-[2-[[十六烷氧丙基 [(S)-1-(乙氧羰基)]乙基]氨基磷酸甲氧]丙基]腺嘌呤 (COP131-114) (7.35g, 11mmol), 产率 44%。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ, (ppm): 0.88 (3H, t, CH₃), 1.17-1.34 (32H, m, 13×CH₂ and 2×CH₃), 1.37 (3H, t, CH₃), 1.46-1.61 (2H, m, CH₂), 1.75-1.98 (2H, m, CH₂), 3.33-3.66 (6H, m, 3×OCH₂), 3.75-4.22 (8H, m, OCH₂P, NCH₂, COOCH₂, OCH and NH), 4.27-4.47 (1H, m, NCH), 6.14 (2H, s, NH₂), 7.93-8.06 (1H, d, 嘌呤环上的 H), 8.27-8.39 (1H, d, 嘌呤环上的 H)。ESI-MS: [M+H]⁺669.3, [M+Na]⁺691.3

[0090] 实施例 6 : (R)-9-[2-[[十八烷氧乙基 [(S)-1-(乙氧羰基)]乙基]氨基磷酸甲氧]丙基]腺嘌呤 (COP131-016) 的制备

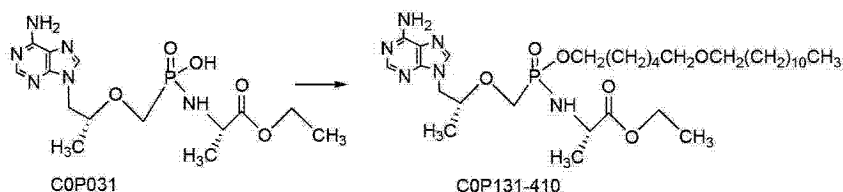
[0091]



[0092] 以实施例 5 类似方法合成得到 : (R)-9-[2-[[十八烷氧乙基 [(S)-1-(乙氧羰基)]乙基]氨基磷酸甲氧]丙基]腺嘌呤 (COP131-016)。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ, (ppm): 0.88 (3H, t, CH₃), 1.16-1.36 (36H, m, 15×CH₂ and 2×CH₃), 1.37 (3H, t, CH₃), 1.47-1.62 (2H, m, CH₂), 3.35-3.68 (6H, m, 3×OCH₂), 3.76-4.20 (8H, m, OCH₂P, NCH₂, COOCH₂, OCH and NH), 4.28-4.45 (1H, m, NCH), 6.15 (2H, s, NH₂), 7.94-8.04 (1H, d, 嘌呤环上的 H), 8.28-8.37 (1H, d, 嘌呤环上的 H). ESI-MS: [M+H]⁺683.4, [M+Na]⁺705.4

[0093] 实施例 7 : (R)-9-[2-[[十二烷氧己基 [(S)-1-(乙氧羰基)]乙基]氨基磷酸甲氧]丙基]腺嘌呤 (COP131-410) 的制备

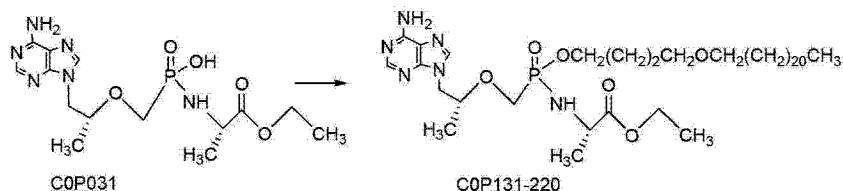
[0094]



[0095] 以实施例 5 类似方法合成得到 : (R)-9-[2-[[十二烷氧己基 [(S)-1-(乙氧羰基)]乙基]氨基磷酸甲氧]丙基]腺嘌呤 (COP131-410)。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ, (ppm): 0.88 (3H, t, CH₃), 1.16-1.35 (28H, m, 9×CH₂, 2×CH₂ and 2×CH₃), 1.36 (3H, t, CH₃), 1.45-1.62 (4H, m, 2×CH₂), 1.74-1.99 (2H, m, CH₂), 3.32-3.67 (6H, m, 3×OCH₂), 3.74-4.23 (8H, m, OCH₂P, NCH₂, COOCH₂, OCH and NH), 4.26-4.48 (1H, m, NCH), 6.13 (2H, s, NH₂), 7.92-8.07 (1H, d, 嘌呤环上的 H), 8.26-8.40 (1H, d, 嘌呤环上的 H). ESI-MS: [M+H]⁺655.4, [M+Na]⁺677.4

[0096] 实施例 8 : (R)-9-[2-[[二十二烷氧丁基 [(S)-1-(乙氧羰基)]乙基]氨基磷酸甲氧]丙基]腺嘌呤 (COP131-220) 的制备

[0097]

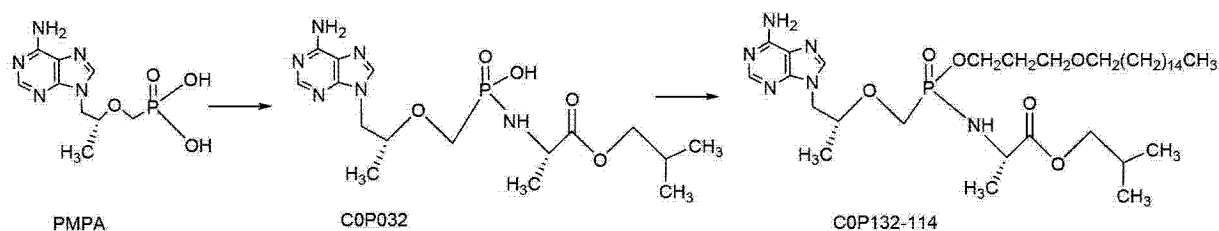


[0098] 以实施例 5 类似方法合成得到 : (R)-9-[2-[[二十二烷氧丁基 [(S)-1-(乙氧羰基)]乙基]氨基磷酸甲氧]丙基]腺嘌呤 (COP131-220)。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ, (ppm): 0.88 (3H, t, CH₃), 1.15-1.33 (44H, m, 19×CH₂ and 2×CH₃), 1.36 (3H, t, CH₃), 1.44-1.60 (4H, m, 2×CH₂), 1.73-1.97 (2H, m, CH₂), 3.31-3.65 (6H, m, 3×OCH₂), 3.73-4.21 (8H, m, OCH₂P, NCH₂, COOCH₂, OCH and NH), 4.25-4.46 (1H, m, NCH), 6.12 (2H, s, NH₂), 7.91-8.05 (1H, d, 嘌呤

环上的 H), 8.25-8.38(1H, d, 嘌呤环上的 H). ESI-MS: $[M+H]^+767.5$, $[M+Na]^+789.5$

[0099] 实施例 9: (R)-9-[2-[[十六烷氧丙基 [(S)-1-(异丁氧羰基)] 乙基] 氨基磷酸甲氧] 丙基] 腺嘌呤 (COP132-114) 的制备

[0100]

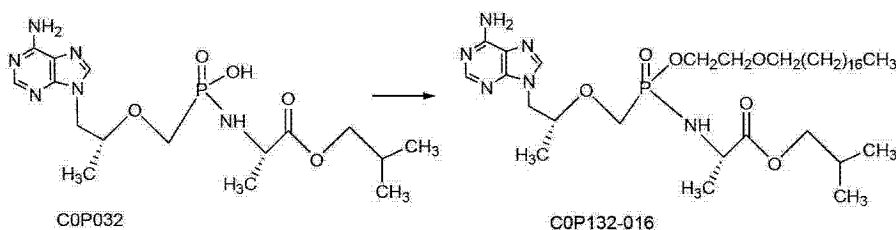


[0101] 在 50ml 圆底烧瓶中, 依次加入替诺福韦(PMPA) (1.18g, 4.13mmol)、L-丙氨酸异丁酯盐酸盐(3.08g, 17mmol)、2,2'-二硫二吡啶 (1.82g, 8.26mmol)、三乙胺 (3.44g, 4.8ml, 34mmol)、三苯基膦(2.16g, 8.24mmol) 和 N-甲基-2-吡咯烷酮(10ml), 在 75℃ 下搅拌 12 小时后, 蒸除溶剂, 用乙酸乙酯:乙醇=6:1 硅胶柱层析, 得到中间产品: (R)-9-[2-[[[(S)-1-(异丁氧羰基)] 乙基] 氨基磷酸甲氧] 丙基] 腺嘌呤 (COP032)。(0.89g, 2.16mmol), 收率 52.3%。

[0102] 在 250ml 圆底烧瓶中, 依次加入 COP032 (10.3g, 25mmol)、L114(15g, 50mmol) 混合溶于 65ml N-甲基吡咯烷酮中, 加热到 85℃ 搅拌 10 分钟, 滴加三乙胺 22ml 后, 升温至 100℃, 滴加二环己基碳二亚胺 (DCC) 11g (溶于 16ml N-甲基吡咯烷酮中), 在 105℃ 下搅拌反应 14 小时后, 冷却至 45℃, 旋干, 加入二氯甲烷:甲醇=1:1 (500ml) 的混合溶剂, 搅拌 1 小时后抽滤, 多次冲洗滤饼, 合并滤液后干燥浓缩, 用二氯甲烷:甲醇=1:1 硅胶柱层析, 得到产品: (R)-9-[2-[[十六烷氧丙基 [(S)-1-(异丁氧羰基)] 乙基] 氨基磷酸甲氧] 丙基] 腺嘌呤 (COP132-114)。(6.72g, 9.65mmol), 产率 38.6%。¹H NMR(400MHz, CDCl₃) δ, (ppm): 0.82-0.96(9H, m, 3×CH₃), 1.15-1.44(32H, m, 13×CH₂ and 2×CH₃), 1.47-1.59(2H, m, CH₂), 1.79-1.99(3H, m, CH₂ and CH), 3.30-3.74(6H, m, 3×OCH₂), 3.76-4.18(8H, m, OCH₂P, NCH₂, COOCH₂, OCH and NH), 4.31-4.44(1H, m, NCH), 6.57(2H, s, NH₂), 7.99-8.08(1H, d, 嘌呤环上的 H), 8.28-8.36(1H, d, 嘌呤环上的 H). ESI-MS: $[M+H]^+697.4$, $[M+Na]^+719.3$

[0103] 实施例 10: (R)-9-[2-[[十八烷氧乙基 [(S)-1-(异丁氧羰基)] 乙基] 氨基磷酸甲氧] 丙基] 腺嘌呤 (COP132-016) 的制备

[0104]

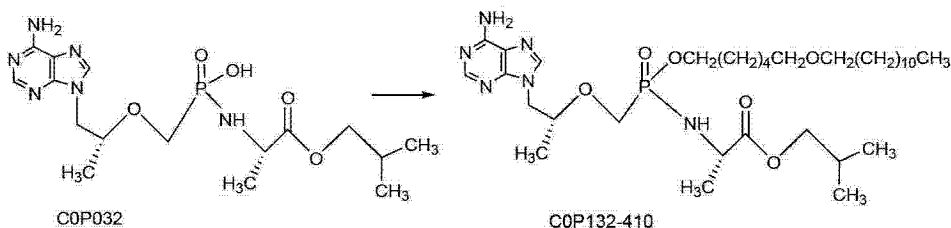


[0105] 以实施例 9 类似方法合成得到: (R)-9-[2-[[十八烷氧乙基 [(S)-1-(异丁氧羰基)] 乙基] 氨基磷酸甲氧] 丙基] 腺嘌呤 (COP132-016)。¹H NMR(400MHz, CDCl₃) δ, (ppm): 0.81-0.98(9H, m, 3×CH₃), 1.14-1.46(36H, m, 15×CH₂ and 2×CH₃), 1.48-1.60(2H, m, CH₂), 1.80-1.97(1H, m, CH), 3.32-3.72(6H, m, 3×OCH₂), 3.77-4.16(8H, m, OCH₂P, NCH₂, COOCH₂, OCH and NH), 4.32-4.42(1H, m, NCH), 6.58(2H, s, NH₂), 7.98-8.09(1H, d, 嘌呤

环上的 H), 8.27-8.38(1H, d, 嘌呤环上的 H). ESI-MS: $[M+H]^+711.5$, $[M+Na]^+733.5$

[0106] 实施例 11 : (R)-9-[2-[[十二烷氧己基 [(S)-1-(异丁氧羰基)] 乙基] 氨基磷酸甲氧] 丙基] 腺嘌呤 (COP132-410) 的制备

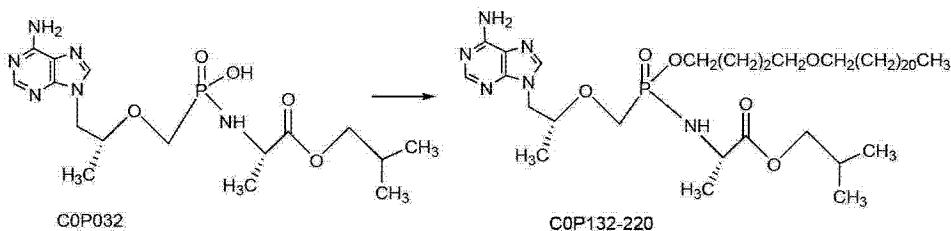
[0107]



[0108] 以实施例 9 类似方法合成得到 : (R)-9-[2-[[十二烷氧己基 [(S)-1-(异丁氧羰基)] 乙基] 氨基磷酸甲氧] 丙基] 腺嘌呤 (COP132-410)。 1H NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ , (ppm): 0.81-0.97(9H, m, $3 \times CH_3$), 1.14-1.45(28H, m, $9 \times CH_2$, $2 \times CH_2$ and $2 \times CH_3$), 1.46-1.60(4H, m, $2 \times CH_2$), 1.78-1.97(3H, m, CH_2 and CH), 3.29-3.75(6H, m, $3 \times OCH_2$), 3.75-4.19(8H, m, OCH_2P , NCH_2 , $COOCH_2$, OCH and NH), 4.30-4.45(1H, m, NCH), 6.56(2H, s, NH_2), 7.98-8.09(1H, d, 嘌呤环上的 H), 8.27-8.37(1H, d, 嘌呤环上的 H). ESI-MS: $[M+H]^+683.4$, $[M+Na]^+705.4$

[0109] 实施例 12 : (R)-9-[2-[[二十二烷氧丁基 [(S)-1-(异丁氧羰基)] 乙基] 氨基磷酸甲氧] 丙基] 腺嘌呤 (COP132-220) 的制备。

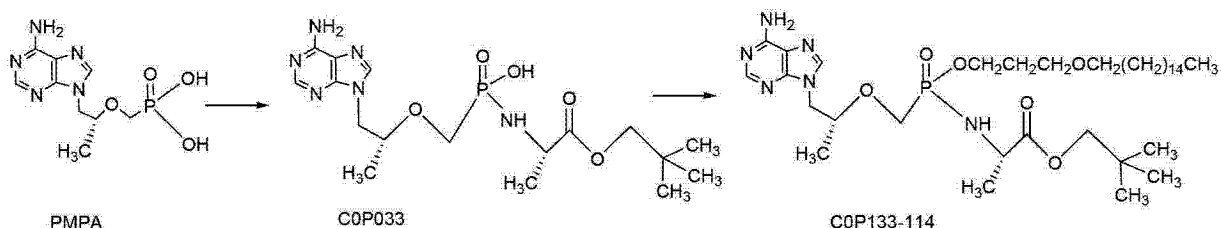
[0110]



[0111] 以实施例 9 类似方法合成得到 : (R)-9-[2-[[二十二烷氧丁基 [(S)-1-(异丁氧羰基)] 乙基] 氨基磷酸甲氧] 丙基] 腺嘌呤 (COP132-220)。 1H NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ , (ppm): 0.80-0.95(9H, m, $3 \times CH_3$), 1.13-1.43(44H, m, $19 \times CH_2$ and $2 \times CH_3$), 1.45-1.58(4H, m, $2 \times CH_2$), 1.77-1.98(3H, m, CH_2 and CH), 3.28-3.73(6H, m, $3 \times OCH_2$), 3.74-4.17(8H, m, OCH_2P , NCH_2 , $COOCH_2$, OCH and NH), 4.29-4.43(1H, m, NCH), 6.55(2H, s, NH_2), 7.97-8.07(1H, d, 嘌呤环上的 H), 8.26-8.35(1H, d, 嘌呤环上的 H). ESI-MS: $[M+H]^+795.6$, $[M+Na]^+817.6$

[0112] 实施例 13 : (R)-9-[2-[[十六烷氧丙基 [(S)-1-(新戊氧羰基)] 乙基] 氨基磷酸甲氧] 丙基] 腺嘌呤 (COP133-114) 的制备

[0113]



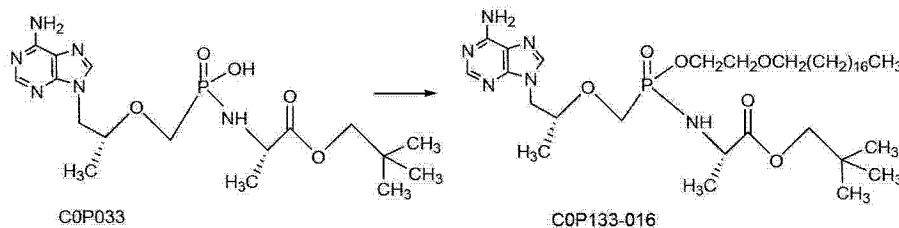
[0114] 在 50ml 圆底烧瓶中, 依次加入替诺福韦(PMPA) (1.18g, 4.13mmol)、L-丙氨酸新戊酯盐酸盐(3.32g, 17mmol)、2,2'-二硫二吡啶(1.82g, 8.26mmol)、三乙胺(3.44g,

4.8ml, 34mmol)、三苯基膦(2.16g, 8.24mmol)和 N-甲基吡咯烷酮(10ml), 在 72°C 下搅拌 10h 后, 蒸除溶剂, 用乙酸乙酯:乙醇=8:1 硅胶柱层析, 得到中间产品 (R)-9-[2-[[[(S)-1-(新戊氧羰基)]乙基]氨基磷酸甲氧]丙基]腺嘌呤 (COP033)(0.99g, 2.32mmol), 收率 56.2%。

[0115] 在 250ml 圆底烧瓶中, 依次加入 COP033 (10.7g, 25mmol)、L114(15g, 50mmol) 混合溶于 65ml N-甲基吡咯烷酮中, 加热到 85°C 搅拌 25 分钟, 滴加三乙胺 22ml, 然后升温至 100°C, 滴加二环己基碳二亚胺 (DCC) 11g (溶于 16ml N-甲基吡咯烷酮中), 在 110°C 下搅拌反应 12 小时后, 冷却至室温, 旋干, 加入二氯甲烷:甲醇=1:1 (500ml) 的混合溶剂, 搅拌分散 1 小时后抽滤, 多次冲洗滤饼, 合并滤液后干燥浓缩, 用二氯甲烷:甲醇=1:1 硅胶柱层析, 得到目标物:(R)-9-[2-[[十六烷氧丙基[(S)-1-(新戊氧羰基)]乙基]氨基磷酸甲氧]丙基]腺嘌呤 (COP133-114)。(6.52g, 9.17mmol), 产率 36.7%。¹H NMR(400MHz, CDCl₃) δ, (ppm): 0.78-1.00 (12H, m, 4×CH₃), 1.14-1.46 (32H, m, 13×CH₂and 2×CH₃), 1.47-1.60 (2H, m, CH₂), 1.80-1.95 (2H, m, CH₂), 3.25-3.52 (4H, m, 2×OCH₂), 3.54-3.64 (1H, m, OCH), 3.66-3.93 (4H, m, OCH₂and COOCH₂), 3.99-4.20 (5H, m, OCH₂P, NCH₂, and NH), 4.30-4.44 (1H, m, NCH), 6.67 (2H, s, NH₂), 7.93-8.11 (1H, d, 嘌呤环上的 H), 8.32 (1H, s, 嘌呤环上的 H). ESI-MS: [M+H]⁺711.4, [M+Na]⁺733.4

[0116] 实施例 14:(R)-9-[2-[[十八烷氧乙基[(S)-1-(新戊氧羰基)]乙基]氨基磷酸甲氧]丙基]腺嘌呤 (COP133-016) 的制备

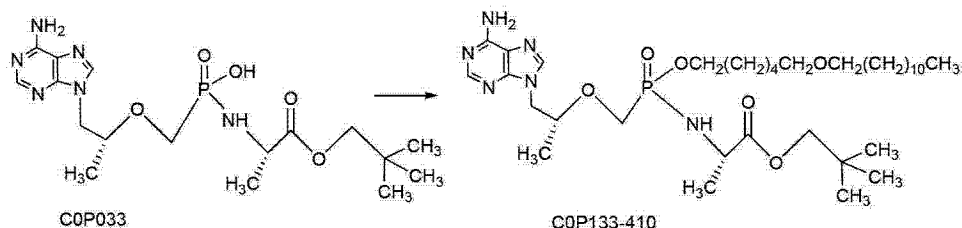
[0117]



[0118] 以实施例 13 类似方法合成得到 (R)-9-[2-[[十八烷氧乙基[(S)-1-(新戊氧羰基)]乙基]氨基磷酸甲氧]丙基]腺嘌呤 (COP133-016)。¹H NMR(400MHz, CDCl₃) δ, (ppm): 0.77-1.02 (12H, m, 4×CH₃), 1.13-1.48 (36H, m, 15×CH₂and 2×CH₃), 1.48-1.61 (2H, m, CH₂), 3.27-3.50 (4H, m, 2×OCH₂), 3.55-3.62 (1H, m, OCH), 3.67-3.91 (4H, m, OCH₂and COOCH₂), 3.97-4.19 (5H, m, OCH₂P, NCH₂, and NH), 4.31-4.42 (1H, m, NCH), 6.68 (2H, s, NH₂), 7.94-8.10 (1H, d, 嘌呤环上的 H), 8.33 (1H, s, 嘌呤环上的 H). ESI-MS: [M+H]⁺725.5, [M+Na]⁺747.5

[0119] 实施例 15:(R)-9-[2-[[十二烷氧己基[(S)-1-(新戊氧羰基)]乙基]氨基磷酸甲氧]丙基]腺嘌呤 (COP133-410) 的制备

[0120]

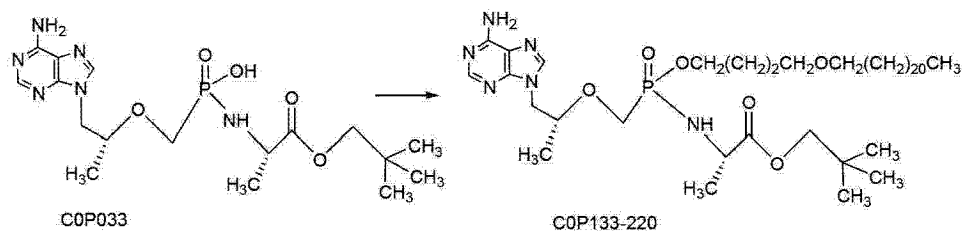


[0121] 以实施例 13 类似方法合成得到 (R)-9-[2-[[十二烷氧己基[(S)-1-(新戊氧羰基)]乙基]氨基磷酸甲氧]丙基]腺嘌呤 (COP133-410)。¹H NMR(400MHz, CDCl₃) δ, (p

pm): 0.77-1.01 (12H, m, 4×CH₃), 1.13-1.47 (28H, m, 9×CH₂, 2×CH₂ and 2×CH₃), 1.46-1.61 (4H, m, 2×CH₂), 1.79-1.96 (2H, m, CH₂), 3.24-3.53 (4H, m, 2×OCH₂), 3.53-3.65 (1H, m, OCH), 3.67-3.94 (4H, m, OCH₂ and COOCH₂), 3.98-4.21 (5H, m, OCH₂P, NCH₂, and NH), 4.29-4.45 (1H, m, NCH), 6.66 (2H, s, NH₂), 7.92-8.12 (1H, d, 嘌呤环上的 H), 8.31 (1H, s, 嘌呤环上的 H). ESI-MS: [M+H]⁺697.5, [M+Na]⁺719.5

[0122] 实施例 16: (R)-9-[2-[[二十二烷氧丁基 [(S)-1-(新戊氧羰基)] 乙基] 氨基磷酸甲氧] 丙基] 腺嘌呤 (COP133-220) 的制备

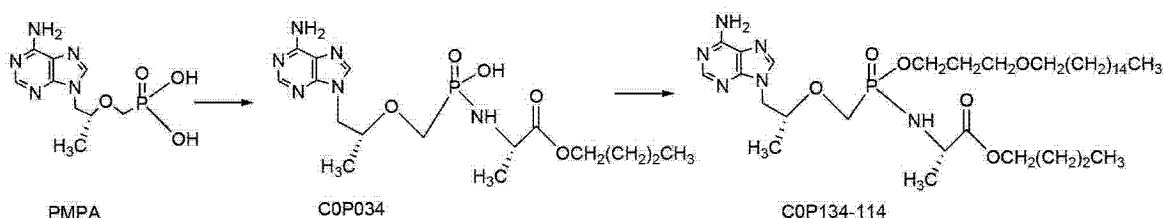
[0123]



[0124] 以实施例 13 类似方法合成得到 (R)-9-[2-[[二十二烷氧丁基 [(S)-1-(新戊氧羰基)] 乙基] 氨基磷酸甲氧] 丙基] 腺嘌呤 (COP133-220)。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ, (ppm): 0.76-0.99 (12H, m, 4×CH₃), 1.12-1.45 (44H, m, 19×CH₂ and 2×CH₃), 1.45-1.59 (4H, m, 2×CH₂), 1.78-1.94 (2H, m, CH₂), 3.23-3.51 (4H, m, 2×OCH₂), 3.52-3.63 (1H, m, OCH), 3.64-3.92 (4H, m, OCH₂ and COOCH₂), 3.97-4.19 (5H, m, OCH₂P, NCH₂, and NH), 4.28-4.43 (1H, m, NCH), 6.65 (2H, s, NH₂), 7.91-8.10 (1H, d, 嘌呤环上的 H), 8.31 (1H, s, 嘌呤环上的 H). ESI-MS: [M+H]⁺809.6, [M+Na]⁺831.6

[0125] 实施例 17: (R)-9-[2-[[十六烷氧丙基 [(S)-1-(正丁氧羰基)] 乙基] 氨基磷酸甲氧] 丙基] 腺嘌呤 (COP134-114) 的制备

[0126]



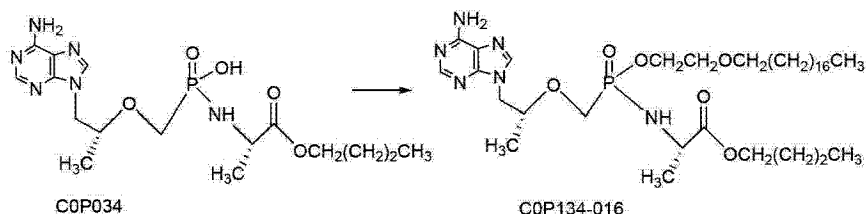
[0127] 在 50ml 圆底烧瓶中, 依次加入替诺福韦 (PMPA) (1.18g, 4.13mmol)、L-丙氨酸正丁酯盐酸盐 (3.08g, 0.017mol)、2,2'-二硫二吡啶 (1.82g, 8.26mmol)、三乙胺 (3.44g, 4.8ml, 34mmol)、三苯基膦 (2.16g, 8.24mmol) 和 N-甲基吡咯烷酮 (10ml), 在 80℃ 下搅拌 12h 后, 蒸除溶剂, 用乙酸乙酯:乙醇=10:1 硅胶柱层析, 得到中间产品: (R)-9-[2-[[[(S)-1-(正丁氧羰基)] 乙基] 氨基磷酸甲氧] 丙基] 腺嘌呤 (COP034) (0.807g, 1.95mmol), 收率 47.2%。

[0128] 在 250ml 圆底烧瓶中, 依次加入 COP034 (10.4g, 25mmol)、L114 (15g, 50mmol) 混合溶于 65ml N-甲基吡咯烷酮中, 加热到 85℃ 搅拌反应 30 分钟, 滴加三乙胺 22ml, 然后升温至 100℃, 滴加二环己基碳二亚胺 (DCC) 11g (溶于 16ml N-甲基吡咯烷酮中), 在 100℃ 下搅拌反应 8 小时后, 冷却至 45℃, 旋干, 加入二氯甲烷:甲醇=1:1 (500ml) 的混合溶剂, 搅拌分散 1 小时后抽滤, 多次冲洗滤饼, 合并滤液后干燥浓缩, 用二氯甲烷:甲醇=1:1 硅胶

柱层析,得到产品 (R)-9-[2-[[十六烷氧丙基 [(S)-1-(正丁氧羰基)]乙基]氨基磷酸甲氧]丙基]腺嘌呤 (COP134-114)。(5.68g,8.15mmol),产率 32.6%。¹H NMR(400MHz,CDCl₃) δ,(ppm):0.84-0.95(6H,m,2×CH₃),1.01-1.46(34H,m,13×CH₂,CH₂and2×CH₃),1.48-1.66(4H,m,2×CH₂),1.82-1.94(2H,m,CH₂),3.31-3.70(6H,m,3×OCH₂),3.77-4.20(8H,m,OCH₂P,NCH₂,COOCH₂,OCH and NH),4.32-4.43(1H,m,NCH),6.65(2H,s,NH₂),7.96-8.10(1H,d,嘌呤环上的H),8.23-8.40(1H,d,嘌呤环上的H).ESI-MS:[M+H]⁺697.4,[M+Na]⁺719.3

[0129] 实施例 18:(R)-9-[2-[[十八烷氧乙基 [(S)-1-(正丁氧羰基)]乙基]氨基磷酸甲氧]丙基]腺嘌呤 (COP134-016) 的制备

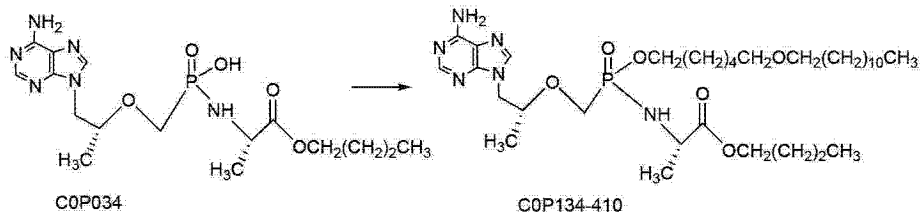
[0130]



[0131] 以实施例 17 类似方法合成得到:(R)-9-[2-[[十八烷氧乙基 [(S)-1-(正丁氧羰基)]乙基]氨基磷酸甲氧]丙基]腺嘌呤 (COP134-016)。¹H NMR(400MHz,CDCl₃) δ,(ppm):0.83-0.97(6H,m,2×CH₃),1.00-1.48(38H,m,15×CH₂,CH₂and2×CH₃),1.49-1.66(4H,m,2×CH₂),3.33-3.67(6H,m,3×OCH₂),3.78-4.18(8H,m,OCH₂P,NCH₂,COOCH₂,OCH and NH),4.33-4.41(1H,m,NCH),6.67(2H,s,NH₂),7.97-8.11(1H,d,嘌呤环上的H),8.24-8.41(1H,d,嘌呤环上的H).ESI-MS:[M+H]⁺711.5,[M+Na]⁺733.5

[0132] 实施例 19:(R)-9-[2-[[十二烷氧己基 [(S)-1-(正丁氧羰基)]乙基]氨基磷酸甲氧]丙基]腺嘌呤 (COP134-410) 的制备

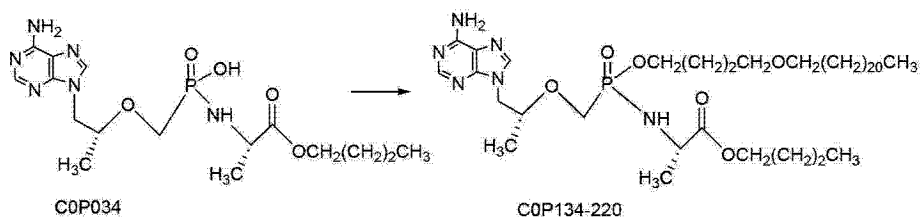
[0133]



[0134] 以实施例 17 类似方法合成得到:(R)-9-[2-[[十二烷氧己基 [(S)-1-(正丁氧羰基)]乙基]氨基磷酸甲氧]丙基]腺嘌呤 (COP134-410)。¹H NMR(400MHz,CDCl₃) δ,(ppm):0.83-0.96(6H,m,2×CH₃),1.02-1.47(30H,m,9×CH₂,2×CH₂,CH₂and2×CH₃),1.47-1.67(6H,m,3×CH₂),1.83-1.95(2H,m,CH₂),3.30-3.71(6H,m,3×OCH₂),3.76-4.21(8H,m,OCH₂P,NCH₂,COOCH₂,OCH and NH),4.31-4.44(1H,m,NCH),6.64(2H,s,NH₂),7.95-8.11(1H,d,嘌呤环上的H),8.22-8.41(1H,d,嘌呤环上的H).ESI-MS:[M+H]⁺683.4,[M+Na]⁺705.4

[0135] 实施例 20:(R)-9-[2-[[二十二烷氧丁基 [(S)-1-(正丁氧羰基)]乙基]氨基磷酸甲氧]丙基]腺嘌呤 (COP134-220) 的制备

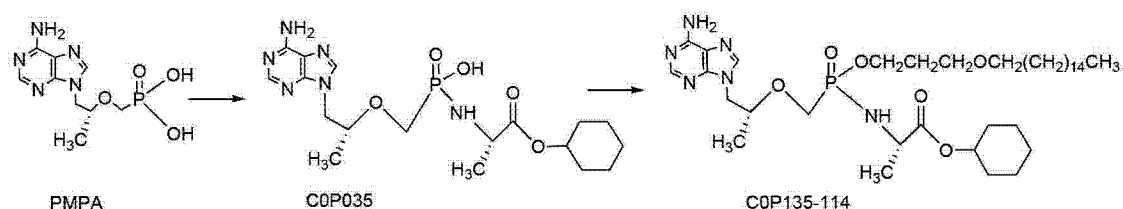
[0136]



[0137] 以实施例 17 类似方法合成得到：(R)-9-[2-[[二十二烷氧丁基 [(S)-1-(正丁氧羰基)]乙基]氨基磷酸甲氧]丙基]腺嘌呤 (COP134-220)。¹H NMR(400MHz, CDCl₃) δ, (ppm): 0.82-0.94 (6H, m, 2×CH₃), 0.99-1.45 (46H, m, 19×CH₂, CH₂ and 2×CH₃), 1.46-1.65 (6H, m, 3×CH₂), 1.80-1.93 (2H, m, CH₂), 3.29-3.69 (6H, m, 3×OCH₂), 3.75-4.19 (8H, m, OCH₂P, NCH₂, COOCH₂, OCH and NH), 4.30-4.42 (1H, m, NCH), 6.63 (2H, s, NH₂), 7.94-8.09 (1H, d, 嘌呤环上的 H), 8.21-8.39 (1H, d, 嘌呤环上的 H). ESI-MS: [M+H]⁺795.6, [M+Na]⁺817.6

[0138] 实施例 21：(R)-9-[2-[[十六烷氧丙基 [(S)-1-(环己氧羰基)]乙基]氨基磷酸甲氧]丙基]腺嘌呤 (COP135-114) 的制备

[0139]

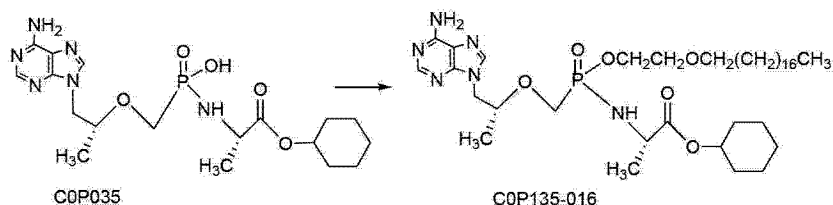


[0140] 在 50ml 圆底烧瓶中, 依次加入替诺福韦 (PMPA) (1.18g, 4.13mmol)、L-丙氨酸环己酯盐酸盐 (3.52g, 17mmol)、2,2'-二硫二吡啶 (1.82g, 8.26mmol)、三乙胺 (3.44g, 4.8ml, 34mmol)、三苯基膦 (2.16g, 8.24mmol) 和 N-甲基吡咯烷酮 (10ml), 在 75℃ 下密闭搅拌 14h 后, 蒸除溶剂, 用乙酸乙酯:乙醇=20:1~6:1 硅胶柱层析, 得到中间产品：(R)-9-[2-[[[(S)-1-(环己氧羰基)]乙基]氨基磷酸甲氧]丙基]腺嘌呤 COP035 (0.82g, 1.86mmol), 收率 45.1%。

[0141] 在 250ml 圆底烧瓶中, 依次加入 COP035 (11g, 25mmol)、L114 (15g, 50mmol) 混合溶于 65ml N-甲基吡咯烷酮中, 加热到 85℃ 搅拌反应 30 分钟, 滴加三乙胺 22ml, 然后升温至 100℃, 滴加二环己基碳二亚胺 (DCC) 11g (溶于 16ml N-甲基吡咯烷酮中), 在 115℃ 下搅拌 16 小时后, 冷却至室温, 旋干, 加入二氯甲烷:甲醇=1:1 (500ml) 的混合溶剂, 搅拌分散 1 小时后抽滤, 多次冲洗滤饼, 合并滤液后干燥浓缩, 用二氯甲烷:甲醇=1:1 硅胶柱层析, 得到目标物：(R)-9-[2-[[十六烷氧丙基 [(S)-1-(环己氧羰基)]乙基]氨基磷酸甲氧]丙基]腺嘌呤 (COP135-114)。(7.69g, 10.65mmol), 产率 42.6%。¹H NMR(400MHz, CDCl₃) δ, (ppm): 0.88 (3H, t, CH₃), 1.13-1.58 (40H, m, 13×CH₂, CH₂, 2×CH₃ and 环己基上的 3×CH₂), 1.62-1.74 (2H, m, CH₂), 1.75-1.95 (4H, m, 环己基上的 2×CH₂), 3.30-3.50 (4H, m, 2×OCH₂), 3.53-3.65 (1H, m, 环己基上与氧相连的 CH), 3.69-4.23 (7H, m, OCH₂P, NCH₂, OCH₂ and OCH), 4.26-4.46 (1H, m, NCH), 4.62-4.84 (1H, d, NH), 6.50-6.87 (2H, d, NH₂), 7.99-8.07 (1H, d, 嘌呤环上的 H), 8.26-8.37 (1H, d, 嘌呤环上的 H). ESI-MS: [M+H]⁺723.4, [M+Na]⁺745.4

[0142] 实施例 22：(R)-9-[2-[[十八烷氧乙基 [(S)-1-(环己氧羰基)]乙基]氨基磷酸甲氧]丙基]腺嘌呤 (COP135-016) 的制备

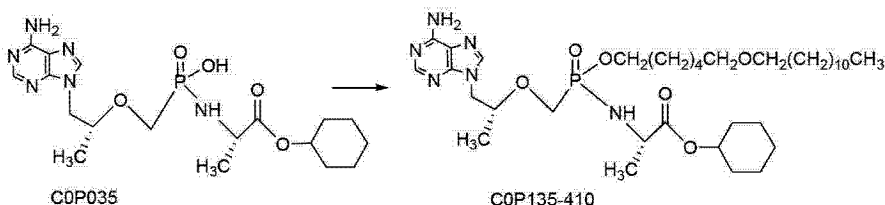
[0143]



[0144] 以实施例 21 类似方法合成得到 (R)-9-[2-[[十八烷氧乙基[(S)-1-(环己氧羰基)]乙基]氨基磷酸甲氧]丙基]腺嘌呤 (C0P135-016)。¹H NMR(400MHz, CDCl₃) δ, (ppm): 0.88(3H, t, CH₃), 1.12-1.60(44H, m, 15×CH₂, CH₂, 2×CH₃and 环己基上的 3×CH₂), 1.75-1.95(4H, m, 环己基上的 2×CH₂), 3.32-3.46(4H, m, 2×OCH₂), 3.54-3.63(1H, m, 环己基上与氧相连的 CH), 3.70-4.21(7H, m, OCH₂P, NCH₂, OCH₂and OCH), 4.27-4.44(1H, m, NCH), 4.63-4.82(1H, d, NH), 6.51-6.85(2H, d, NH₂), 7.98-8.08(1H, d, 嘌呤环上的 H), 8.27-8.35(1H, d, 嘌呤环上的 H). ESI-MS: [M+H]⁺737.5, [M+Na]⁺759.5

[0145] 实施例 23:(R)-9-[2-[[十二烷氧己基[(S)-1-(环己氧羰基)]乙基]氨基磷酸甲氧]丙基]腺嘌呤 (C0P135-410) 的制备

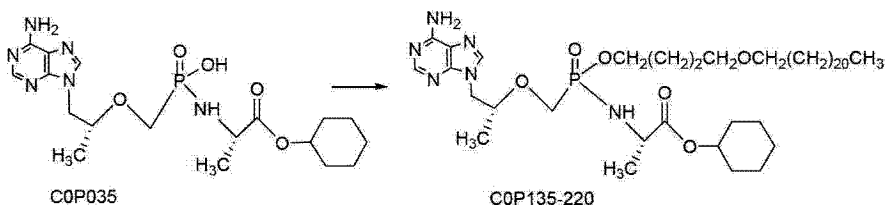
[0146]



[0147] 以实施例 21 类似方法合成得到 (R)-9-[2-[[十二烷氧己基[(S)-1-(环己氧羰基)]乙基]氨基磷酸甲氧]丙基]腺嘌呤 (C0P135-410)。¹H NMR(400MHz, CDCl₃) δ, (ppm): 0.88(3H, t, CH₃), 1.12-1.59(36H, m, 9×CH₂, 2×CH₂, CH₂, 2×CH₃and 环己基上的 3×CH₂), 1.61-1.75(4H, m, 2×CH₂), 1.74-1.96(4H, m, 环己基上的 2×CH₂), 3.29-3.51(4H, m, 2×OCH₂), 3.52-3.66(1H, m, 环己基上与氧相连的 CH), 3.68-4.24(7H, m, OCH₂P, NCH₂, OCH₂and OCH), 4.25-4.47(1H, m, NCH), 4.61-4.85(1H, d, NH), 6.49-6.88(2H, d, NH₂), 7.98-8.08(1H, d, 嘌呤环上的 H), 8.25-8.38(1H, d, 嘌呤环上的 H). ESI-MS: [M+H]⁺709.5, [M+Na]⁺731.5

[0148] 实施例 24:(R)-9-[2-[[二十二烷氧丁基[(S)-1-(环己氧羰基)]乙基]氨基磷酸甲氧]丙基]腺嘌呤 (C0P135-220) 的制备

[0149]

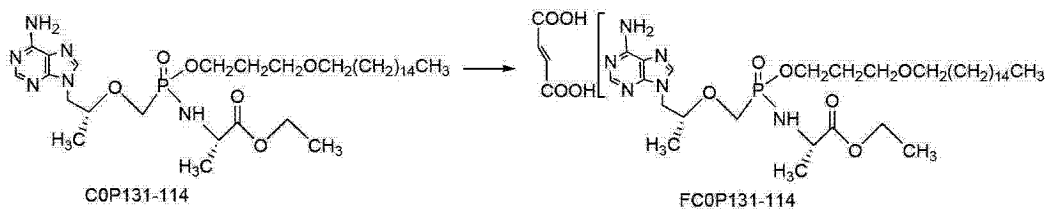


[0150] 以实施例 21 类似方法合成得到 (R)-9-[2-[[二十二烷氧丁基[(S)-1-(环己氧羰基)]乙基]氨基磷酸甲氧]丙基]腺嘌呤 (C0P135-220)。¹H NMR(400MHz, CDCl₃) δ, (ppm): 0.88(3H, t, CH₃), 1.11-1.57(54H, m, 19×CH₂, 2×CH₂, 2×CH₃and 环己基上的 3×CH₂), 1.60-1.73(2H, m, CH₂), 1.73-1.94(4H, m, 环己基上的 2×CH₂), 3.28-3.49(4H, m, 2×OCH₂), 3.51-3.64(1H, m, 环己基上与氧相连的 CH), 3.67-4.22(7H, m, OCH₂P, NCH₂, OCH₂and OCH), 4.24-4.

45 (1H, m, NCH), 4. 60-4. 83 (1H, d, NH), 6. 48-6. 86 (2H, d, NH₂), 7. 97-8. 06 (1H, d, 嘌呤环上的 H), 8. 24-8. 36 (1H, d, 嘌呤环上的 H). ESI-MS: [M+H]⁺821. 6, [M+Na]⁺843. 6

[0151] 实施例 25 : (R)-9-[2-[[十六烷氧丙基 [(S)-1-(乙氧羰基)] 乙基] 氨基磷酸甲氧] 丙基] 腺嘌呤富马酸盐 (FCOP131-114) 的制备

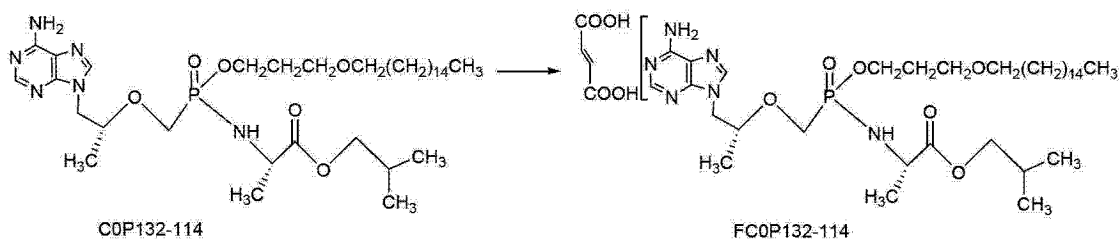
[0152]



[0153] 将等量的 (R)-9-[2-[[十六烷氧丙基 [(S)-1-(乙氧羰基)] 乙基] 氨基磷酸甲氧] 丙基] 腺嘌呤 (COP131-114) 和富马酸溶于热的乙腈中, 回流搅拌 2 小时, 室温下冷却析晶, 滤出析出的固体并用乙醚洗涤得白色固体: (R)-9-[2-[[十六烷氧丙基 [(S)-1-(乙氧羰基)] 乙基] 氨基磷酸甲氧] 丙基] 腺嘌呤富马酸盐 (FCOP131-114)。¹H NMR (400MHz, DMSO) δ, (ppm): 0. 85 (3H, t, CH₃), 1. 04 (3H, t, CH₃), 1. 10-1. 33 (32H, m, 13×CH₂ and 2×CH₃), 1. 35-1. 51 (2H, m, CH₂), 1. 66-1. 79 (2H, m, CH₂), 3. 26-3. 38 (4H, m, 2×OCH₂), 3. 59-3. 75 (2H, m, OCH₂), 3. 76-3. 95 (4H, m, OCH₂P, NH, and OCH), 4. 01-4. 29 (4H, m, NCH₂, COOCH₂), 5. 01-5. 19 (2H, s, NCH), 6. 63 (2H, s, 富马酸双键上的氢), 7. 19 (2H, s, NH₂), 8. 04-8. 10 (1H, d, 嘌呤环上的 H), 8. 13 (1H, s, 嘌呤环上的 H). ESI-MS: [M+H]⁺669. 3, [M+Na]⁺691. 3

[0154] 实施例 26 : (R)-9-[2-[[十六烷氧丙基 [(S)-1-(异丁氧羰基)] 乙基] 氨基磷酸甲氧] 丙基] 腺嘌呤富马酸盐 (FCOP132-114) 的制备

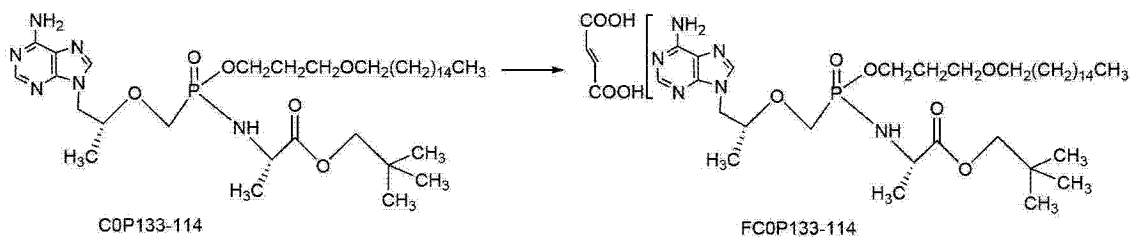
[0155]



[0156] 以实施例 25 类似方法合成得到: (R)-9-[2-[[十六烷氧丙基 [(S)-1-(异丁氧羰基)] 乙基] 氨基磷酸甲氧] 丙基] 腺嘌呤富马酸盐 (FCOP132-114)。¹H NMR (400MHz, DMSO) δ, (ppm): 0. 78-0. 96 (9H, m, 3×CH₃), 1. 04 (3H, t, CH₃), 1. 14-1. 38 (29H, m, 13×CH₂ and CH₃), 1. 39-1. 51 (2H, m, CH₂), 1. 67-1. 79 (2H, m, CH₂), 1. 80-1. 93 (1H, m, CH), 3. 27-3. 39 (4H, m, 2×OCH₂), 3. 60-3. 97 (8H, m, OCH₂P, NCH₂, OCH₂, OCH and NH), 4. 08-4. 30 (2H, m, COOCH₂), 5. 06-5. 21 (2H, m, NCH), 6. 63 (2H, s, 富马酸双键上的氢), 7. 20 (2H, s, NH₂), 8. 06-8. 11 (1H, d, 嘌呤环上的 H), 8. 13 (1H, s, 嘌呤环上的 H). ESI-MS: [M+H]⁺697. 4

[0157] 实施例 27 : (R)-9-[2-[[十六烷氧丙基 [(S)-1-(新戊氧羰基)] 乙基] 氨基磷酸甲氧] 丙基] 腺嘌呤富马酸盐 (FCOP133-114) 的制备

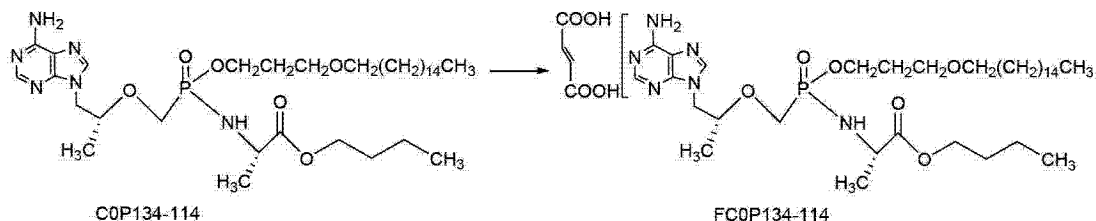
[0158]



[0159] 以实施例 25 类似方法合成得到： (R) -9-[2-[[十六烷氧丙基[(S)-1-(新戊氧羰基)]乙基]氨基磷酸甲氧]丙基]腺嘌呤富马酸盐(FCOP133-114)。 ^1H NMR(400MHz, DMSO) δ , (ppm): 0.75-0.94(12H, m, $4\times\text{CH}_3$), 1.03(3H, t, CH_3), 1.11-1.34(29H, m, $13\times\text{CH}_2$ and CH_3), 1.37-1.51(2H, m, CH_2), 1.66-1.79(2H, m, CH_2), 3.25-3.39(4H, m, $2\times\text{OCH}_2$), 3.59-3.98(8H, m, OCH_2P , NCH_2 , OCH_2 , OCH and NH), 4.05-4.32(2H, m, COOCH_2), 5.06-5.24(2H, m, NCH), 6.62(2H, s, 富马酸双键上的氢), 7.19(2H, s, NH_2), 8.05-8.09(1H, d, 嘌呤环上的 H), 8.12(1H, s, 嘌呤环上的 H). ESI-MS: $[\text{M}+\text{H}]^+711.4$, $[\text{M}+\text{Na}]^+733.4$

[0160] 实施例 28： (R) -9-[2-[[十六烷氧丙基[(S)-1-(正丁氧羰基)]乙基]氨基磷酸甲氧]丙基]腺嘌呤富马酸盐(FCOP134-114)的制备

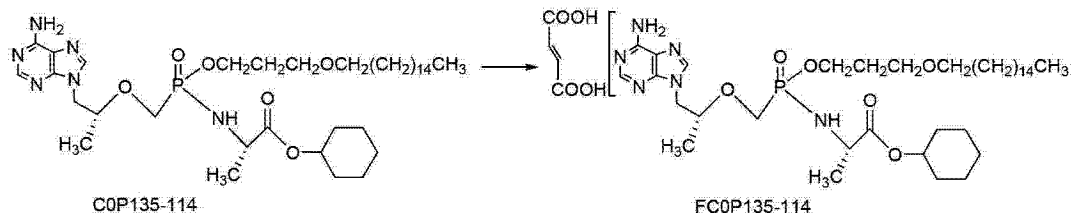
[0161]



[0162] 以实施例 25 类似方法合成得到： (R) -9-[2-[[十六烷氧丙基[(S)-1-(正丁氧羰基)]乙基]氨基磷酸甲氧]丙基]腺嘌呤富马酸盐(FCOP134-114)。 ^1H NMR(400MHz, DMSO) δ , (ppm): 0.77-0.95(6H, m, $2\times\text{CH}_3$), 1.04(3H, t, CH_3), 1.11-1.39(31H, m, $13\times\text{CH}_2$, C H_2 and CH_3), 1.40-1.60(4H, m, $2\times\text{CH}_2$), 1.67-1.79(2H, m, CH_2), 3.60-3.78(5H, m, OCH and $2\times\text{OCH}_2$), 3.79-3.97(5H, m, OCH_2P , NH and OCH_2), 3.98-4.29(4H, m, NCH_2 and COOCH_2), 5.04-5.18(1H, m, NCH), 6.63(2H, s, 富马酸双键上的氢), 7.19(2H, s, NH_2), 8.05-8.10(1H, d, 嘌呤环上的 H), 8.13(1H, s, 嘌呤环上的 H). ESI-MS: $[\text{M}+\text{H}]^+697.4$

[0163] 实施例 29： (R) -9-[2-[[十六烷氧丙基[(S)-1-(环己氧羰基)]乙基]氨基磷酸甲氧]丙基]腺嘌呤富马酸盐(FCOP135-114)的制备

[0164]

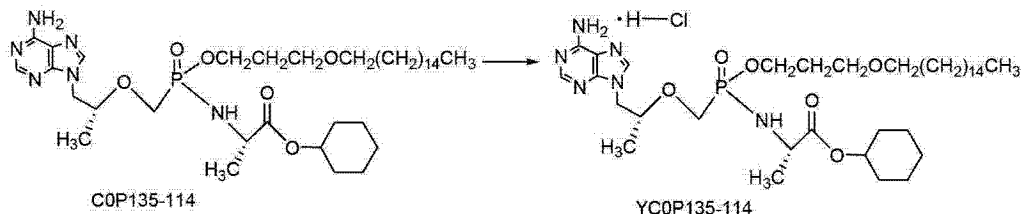


[0165] 以实施例 25 类似方法合成得到： (R) -9-[2-[[十六烷氧丙基[(S)-1-(环己氧羰基)]乙基]氨基磷酸甲氧]丙基]腺嘌呤富马酸盐(FCOP135-114)。 ^1H NMR(400MHz, DMSO) δ , (ppm): 0.85(3H, t, CH_3), 1.04(3H, t, CH_3), 1.16-1.52(37H, m, $13\times\text{CH}_2$, CH_2 , CH_3 and 环己基上的 $3\times\text{CH}_2$), 1.56-1.81(6H, m, CH_2 and 环己基上的 $2\times\text{CH}_2$), 3.26-3.38(4H, m, $2\times\text{OCH}_2$), ,

3.60-3.96 (6H, m, OCH₂P, NH, OCH₂ and OCH), 4.09-4.29 (2H, m, NCH₂), 4.58-4.70 (1H, m, 环己基上与氧相连的 CH), 5.01-5.15 (1H, m, NCH), 6.62 (2H, s, 富马酸双键上的氢), 7.18 (2H, s, NH₂), 8.05-8.09 (1H, d, 嘌呤环上的 H), 8.12 (1H, s, 嘌呤环上的 H). ESI-MS: [M+H]⁺723.4, [M+Na]⁺745.4

[0166] 实施例 30 : (R)-9-[2-[[十六烷氧丙基 [(S)-1-(环己氧羰基)] 乙基] 氨基磷酸甲氧] 丙基] 腺嘌呤盐酸盐 (YC0P135-114) 的制备

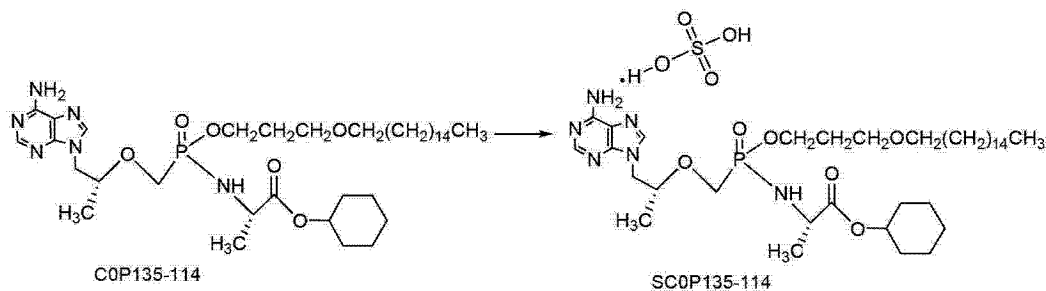
[0167]



[0168] 以实施例 25 类似方法合成得到 : (R)-9-[2-[[十六烷氧丙基 [(S)-1-(环己氧羰基)] 乙基] 氨基磷酸甲氧] 丙基] 腺嘌呤盐酸盐 (YC0P135-114)。

[0169] 实施例 31 : (R)-9-[2-[[十六烷氧丙基 [(S)-1-(环己氧羰基)] 乙基] 氨基磷酸甲氧] 丙基] 腺嘌呤硫酸盐 (SC0P135-114) 的制备

[0170]



[0171] 以实施例 25 类似方法合成得到 : (R)-9-[2-[[十六烷氧丙基 [(S)-1-(环己氧羰基)] 乙基] 氨基磷酸甲氧] 丙基] 腺嘌呤硫酸盐 (SC0P135-114)。

[0172] 实施例 32 : 本发明化合物抗 HIV-1 病毒活性的测定

[0173] 1. 实验材料

[0174] 1.1 供试品 : 化合物 C83P01。

[0175] 1.2 对照品 : 阳性对照品齐多夫定由检测单位提供。

[0176] 1.3 细胞株

[0177] 名称 : 293T 来源 : ATCC

[0178] 保存条件 : 液氮

[0179] 1.4 病毒株

[0180] 名称 : VSVG/HIV-1 (NL4-3) ; 来源 : 实验室

[0181] 自存

[0182] 保存条件 : -80° C

[0183] 1.5 培养基

[0184] 名称 : DMEM 培养基 来源 : 美国 Gibco 公司

[0185] RPMI-1640

- [0186] FBS
- [0187] 配制方法 :RPMI-1640/DMEM + 10%FBS
- [0188] 1.6 实验用介质
- [0189] 二甲基亚砷 (DMSO) 美国 Sigma。
- [0190] 1.7 主要仪器及试剂
- [0191] BS124S 电子天平 :德国 Sartorius 公司
- [0192] 离心机 :美国 Beckman 公司 ;
- [0193] CO₂ 细胞培养箱 :美国 ShellAB 公司 ;
- [0194] Sirius 化学发光检测仪 :德国 Berthold 公司 ;
- [0195] 胰蛋白酶 :美国 Invitrogen 公司 ;
- [0196] 青链霉素 :美国 Invitrogen 公司 ;
- [0197] 胎牛血清 :美国 Gibco 公司 ;
- [0198] 细胞裂解液及荧光素酶检测试剂盒 :美国 Promega 公司
- [0199] 2. 实验方法
- [0200] 2.1 供试品、对照品配制
- [0201] 受试样品 :称重化合物并溶解于 DMSO 中,贮液浓度为 10mmol/L ;
- [0202] 对照品 :称重齐多夫定溶解于 DMSO,贮液浓度为 10mmol/L.
- [0203] 2.2 实验步骤
- [0204] 2.2.1 野生型 HIV-1 重组假病毒的制备 :
- [0205] 转染前一天,按 2.2×10^6 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 0.45m 的滤膜过滤,生成野生型 HIV-1 重组病毒颗粒 VSVG/HIV_{-WT}。
- [0206] 2.2.2 HIV-1 重组假病毒的 p24 抗原测定 :
- [0207] 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 (ZeptoMetrix, Cat :0801111),测定并计算重组病毒原液的 p24 抗原浓度。
- [0208] 2.2.3 药物对 HIV-1 抑制性检测 :
- [0209] 感染前一天,将 293T 细胞按每孔 6×10^4 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 0.5ml 病毒液(根据 p24 浓度将病毒原液稀释至 0.1 - 0.5ng 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,检测数据见药理筛选结果表 1。
- [0210] 表 1 :药理筛选结果表
- [0211]

化合物	药理模型	细胞	给药途径	剂量 (mol/L)	抑制率 (%)	溶剂	备注
COP131	VSVG/HIV-luc	293T 细胞	感染前 加药	3×10^{-8}	99.9 ± 0.0	DMSO	IC ₅₀ =1.2nM 第一次实验
				1×10^{-8}	95.3 ± 0.2		
				3×10^{-9}	75.0 ± 1.6		
				1×10^{-9}	42.6 ± 2.6		
COP131	VSVG/HIV-luc	293T 细胞	感染前 加药	1×10^{-8}	94.9 ± 0.1	DMSO	IC ₅₀ =2.0nM 第二次实验
				3×10^{-9}	69.2 ± 0.7		
				1×10^{-9}	33.4 ± 0.6		
				3×10^{-10}	13.0 ± 1.0		
COP132	VSVG/HIV-luc	293T 细胞	感染前 加药	3×10^{-8}	99.7 ± 0.1	DMSO	IC ₅₀ =2.5nM 第一次实验
				1×10^{-8}	91.8 ± 0.6		
				3×10^{-9}	60.2 ± 1.7		
				1×10^{-9}	24.1 ± 2.0		
COP132	VSVG/HIV-luc	293T 细胞	感染前 加药	3×10^{-8}	99.4 ± 0.1	DMSO	IC ₅₀ =2.8nM 第二次实验
				1×10^{-8}	88.6 ± 0.3		
				3×10^{-9}	60.5 ± 2.9		
				1×10^{-9}	21.1 ± 1.9		
COP133	VSVG/HIV-luc	293T 细胞	感染前 加药	3×10^{-8}	98.5 ± 0.0	DMSO	IC ₅₀ =4.5nM 第一次实验
				1×10^{-8}	79.4 ± 0.8		
				3×10^{-9}	40.3 ± 3.8		
				1×10^{-9}	17.0 ± 1.0		
COP133	VSVG/HIV-luc	293T 细胞	感染前 加药	3×10^{-8}	97.0 ± 0.5	DMSO	IC ₅₀ =5.3nM 第二次实验
				1×10^{-8}	69.8 ± 1.3		
				3×10^{-9}	38.6 ± 2.6		
				1×10^{-9}	23.7 ± 2.7		
COP134	VSVG/HIV-luc	293T 细胞	感染前 加药	3×10^{-8}	98.5 ± 0.2	DMSO	IC ₅₀ =4.7nM 第一次实验
				1×10^{-8}	80.1 ± 1.7		
				3×10^{-9}	39.4 ± 1.0		
				1×10^{-9}	5.9 ± 2.1		
COP134	VSVG/HIV-luc	293T 细胞	感染前 加药	3×10^{-8}	98.3 ± 0.1	DMSO	IC ₅₀ =4.4nM 第二次实验
				1×10^{-8}	80.8 ± 1.2		
				3×10^{-9}	42.2 ± 0.2		
				1×10^{-9}	15.1 ± 2.5		

[0212] 续上药理筛选结果表

[0213]

化合物	药理模型	细胞	给药途径	剂量 (mol/L)	抑制率 (%)	溶剂	备注
COP135	VSVG/HIV-1uc	293T 细胞	感染前加药	3×10^{-8}	94.3 ± 0.4	DMSO	IC ₅₀ =7.7nM 第一次实验
				1×10^{-8}	63.8 ± 0.1		
				3×10^{-9}	19.5 ± 2.8		
				1×10^{-9}	0.0		
COP135	VSVG/HIV-1uc	293T 细胞	感染前加药	3×10^{-8}	91.3 ± 0.5	DMSO	IC ₅₀ =7.2nM 第二次实验
				1×10^{-9}	64.2 ± 1.5		
				3×10^{-9}	35.6 ± 5.8		
				1×10^{-9}	17.4 ± 2.7		
COP136	VSVG/HIV-1uc	293T 细胞	感染前加药	3×10^{-8}	91.9 ± 0.7	DMSO	IC ₅₀ =7.4nM 第一次实验
				1×10^{-8}	66.9 ± 0.9		
				3×10^{-9}	30.3 ± 2.1		
				1×10^{-9}	8.2 ± 6.2		
COP136	VSVG/HIV-1uc	293T 细胞	感染前加药	3×10^{-8}	82.6 ± 1.8	DMSO	IC ₅₀ =10.0nM 第二次实验
				1×10^{-8}	60.1 ± 1.7		
				3×10^{-9}	28.6 ± 2.5		
				1×10^{-9}	12.2 ± 1.0		
齐多夫定 (AZT)	VSVG/HIV-1uc	293T 细胞	感染前加药	1×10^{-7}	91.3 ± 1.4	DMSO	IC ₅₀ =24.3nM
				1×10^{-8}	46.9 ± 0.2		
				1×10^{-9}	2.7 ± 4.3		

[0214] 表 2 :表 1 化合物编号与本发明化合物编号的对应关系

[0215]

表 1 化合物编号	对应本发明的化合物编号	备注
COP131	COP131-114	
COP132	COP132-114	
COP133	COP133-114	
COP134	COP134-114	
COP135	COP135-114	
COP136		COP136 对应 CMX157

[0216] 注 :TDF [商品名 :韦瑞德 (Viread), 其 IC₅₀ 为 1.6 μM]

[0217] 2.2.4 应用 MTS 法检测化合物对细胞存活的影响

[0218] 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 100ul, 37°C, 5%CO₂ 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°C, 5%CO₂ 培养箱中继续培养 44 小时。向每孔中加入 20 μl MTS/PMS 现配的混合液, 37°C, 5%CO₂ 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。

[0219] 4、实验结论

[0220] 化合物 COP131-114、COP132-114、COP133-114、COP134-114、COP135-114 可有效抑制野生型 HIV-1 的复制, 其半数有效浓度分别为 :COP131-114 ($1.6 \pm 0.6 \text{ nmol/L}$); COP132-114 ($2.7 \pm 0.2 \text{ nmol/L}$); COP133-114 ($4.9 \pm 0.6 \text{ nmol/L}$); COP134-114 ($4.6 \pm 0.2 \text{ nmol/L}$); COP135-114 ($7.5 \pm 0.4 \text{ nmol/L}$); 在相同条件下平行测定的阳性对照 AZT 半数有效浓度为 24.3nM。所有化合物在终浓度 10 μmol/L 时均无细胞毒

性。

[0221] 上述本发明化合物抗 HIV 活性与细胞毒性的测定表明：本发明的化合物 COP131-114、COP132-114、COP133-114、COP134-11 或 COP135-114 比目前治疗艾滋病的首选药物齐多夫定(AZT)及正处于临床实验阶段的药物 CMX157 的抑制 HIV-1 野生型病毒复制的活性高得多。从 IC₅₀ 值看，COP131-114 的 IC₅₀ 是 CMX157 的 8.8 倍、是 AZT 的 20 倍，是 TDF 的 1000 倍，COP132-114 的 IC₅₀ 是 CMX157 的 2.9 倍、是 AZT 的 9.7 倍，COP133-114 的 IC₅₀ 是 CMX157 的 1.6 倍、是 AZT 的 5.4 倍，COP134-114 的 IC₅₀ 是 CMX157 的 1.7 倍、是 AZT 的 5.5 倍，COP135-114 的 IC₅₀ 是 CMX157 的 1.7 倍、是 AZT 的 3.3 倍。本发明化合物 COP131-114、COP132-114、COP133-114、COP134-114、COP135-114 的细胞毒性也是很低的。

[0222] 这些检测数据充分证明本发明化合物不仅具有超越 CMX157 抑制 HIV-1 病毒复制的活性、而且还具有很低的毒性。

[0223] 实施例 33：本发明化合物 COP131-114 与 CMX157 脂溶性大小的测定

[0224] 比较两种物质脂溶性大小的原理：

[0225] 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。

[0226] 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。

[0227] 本发明化合物 COP131-114 和 CMX157 脂溶性大小的比较就是根据上述的原理来进行的。

[0228] 在色谱条件：色谱柱，Agilent ZorBax SB-C18(250×4.6mm. id. 5 μm)；流动相，甲醇/水=98:2(v:v)；检测波长：254nm；流速：1.0ml/min；柱温：30℃下，CMX157 的保留时间为 2.962 分钟，化合物 COP131-114 的保留时间为 5.610 分钟。化合物 COP131-114 的保留时间比 CMX157 的保留时间延长了 2.648 分钟。

[0229] 根据上述检测，本发明化合物 COP131-114 的脂溶性比 CMX157 的脂溶性高出了许多。这也就是说本发明化合物 COP131-114 的膜透过性比 CMX157 膜透过性的高出了许多，从而提高了药物的治疗疾病的效果。

[0230] 实施例 34：本发明化合物抗 HBV 病毒活性的测定

[0231] 1. 体外细胞模型：HepG2 2. 215 细胞

[0232] 2. 药物对 HBV 病毒 DNA 抑制作用检测

[0233] HepG2 2. 2. 15 细胞在 24 孔细胞培养板中培养 48 小时后，加入所配不同浓度含药培养液，继续培养 9 天（每 3 天换液一次），收集上清液，用荧光探针法进行实时定量 PCR 检测

[0234] HBV 引物：HBV 上游引物：5' -TgT CCT ggT TAT CgC Tgg-3'

[0235] HBV 下游引物：5' -CAA ACg ggC AAC ATA CCT T-3'

[0236] HBV 荧光探针序列：5' (FAM)-TgT gTC TgC ggC gTT TTA TCA T-(TAMRA)3'

[0237] PCR：95℃预变性 5min；95℃变性 10s，60℃退火和延伸共 30s，40 个循环。

[0238] 3. 结果：见体外抗乙肝病毒活性筛选表

[0239] 4. 实验结论：

[0240] 化合物 COP131-114、COP132-114、COP133-114、COP134-114、COP135-114 可有效抑制 HBV 的复制,其半数有效浓度分别为:COP131-114(35.3 μ M);COP132-114(34.6 μ M);COP133-114(6.05 μ M);COP134-114(37.8 μ M);COP135-114(14.5 μ M);在相同条件下平行测定的阳性对照 TDF 半数有效浓度为 80.1 μ M。

[0241] 这充分表明:本发明化合物比目前销售额最大的抗艾滋病药物、同时又被专家誉为最好的抗乙肝药物抑制病毒复制的活性高出很多,有望成为治疗 HBV 感染的药物。

[0242] 表 3:体外抗乙肝病毒活性筛选表

[0243]

样品编号	分子量	IC50
COP131	668.44	23.6 μ g/mL(35.3 μ M)
COP132	696.47	24.1 μ g/mL(34.6 μ M)
COP133	710.48	4.6 μ g/mL(6.05 μ M)
COP134	696.47	26.3 μ g/mL(37.8 μ M)
COP135	722.48	10.5 μ g/mL(14.5 μ M)
COP22(阳性对照 TDF)	635.2	50.9 μ g/mL(80.1 μ M)

[0244] 表 4:表 3 化合物编号与本发明化合物编号的对应关系

[0245]

表 1 化合物编号	对应本发明的化合物编号
COP131	COP131-114
COP132	COP132-114
COP133	COP133-114
COP134	COP134-114
COP135	COP135-114

[0246] 实施例 35:本发明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,200mg 剂量的本发明化合物片剂或胶囊单位含量如下(mg/片,mg/粒)

本发明化合物 100mg

乳糖 65mg

淀粉 24mg

[0247]

微晶纤维素有 5mg

羧甲淀粉钠 5mg

硬脂酸镁 1mg

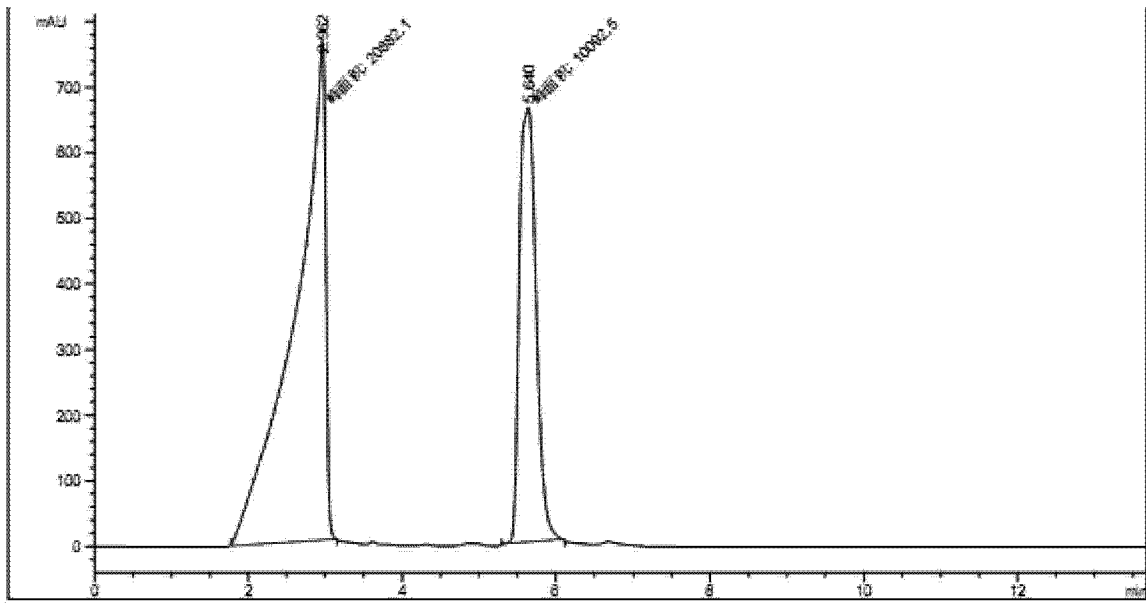


图 1