

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.



# [12] 发明专利说明书

C07H 19/06 (2006.01)

C07H 19/14 (2006.01)

C07H 19/16 (2006.01)

专利号 ZL 200710137548.0

[45] 授权公告日 2009年8月26日

[11] 授权公告号 CN 100532388C

[22] 申请日 2007.8.7

[21] 申请号 200710137548.0

[30] 优先权

[32] 2007.7.16 [33] CN [31] 200710054781.2

[73] 专利权人 郑州大学

地址 450052 河南省郑州市大学北路 75 号

共同专利权人 河南省分析测试研究中心

[72] 发明人 常俊标 包新洪 王 强 郭晓河  
王 威 祁秀香

[56] 参考文献

CN1712409A 2005.12.28

Synthesis and antiviral activity of fluoro sugar nucleosides. 1: Studies on 4'-azido-2'-deoxy-2'-fluoro-arabinofuranosyl nucleosides. Jin, Yun. Ho, et al. Archives of Pharmacal Research, Vol. 18 No. 5. 1995

审查员 刘姝晶

[74] 专利代理机构 郑州联科专利事务所(普通合伙)

代理人 时立新

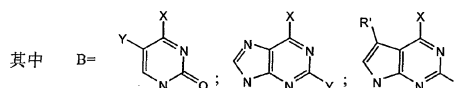
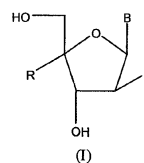
权利要求书 8 页 说明书 22 页

[54] 发明名称

2'-氟-4'-取代-核苷类似物、其制备方法及应用

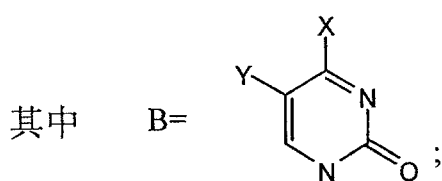
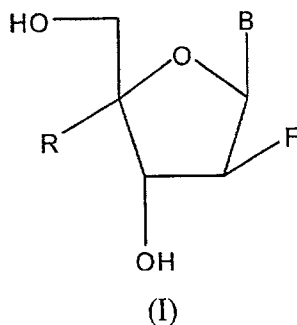
[57] 摘要

本发明公开了核苷类似物、其制备方法及其应用,具体涉及含2'-氟-4'-取代核苷类似物或其潜药或其5'-磷酸酯(包括5'-磷酸酯的潜药)、其制备方法及其应用,该化合物有如下通式:见右下式。其可以通过活性化合物(I)与有机酸或无机酸反应形成盐,以盐的形式存在。将其应用于治疗病毒感染,尤其是HBV, HCV 或 HIV 的感染。



R = CH<sub>3</sub>, CN, N<sub>3</sub>, C≡CH;  
R' = H, F;  
X = F, OH, NH<sub>2</sub>;  
Y = H, CH<sub>3</sub>, F, OH, NH<sub>2</sub>.

1、具有通式 (I) 结构的 2'-氟-4'-取代-核苷类似物, 或其与有机酸或无机酸反应形成的盐, 或其 5'-磷酸酯, 其特征在于, 通式 (I) 结构如下:

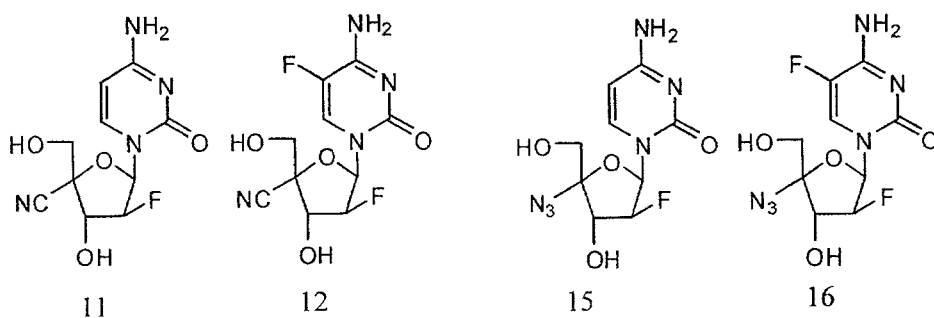
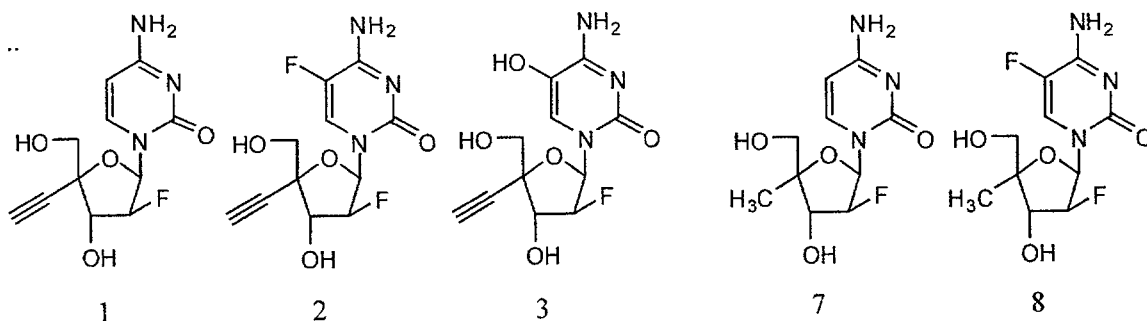


R = CH<sub>3</sub>, CN, N<sub>3</sub>, C≡CH;

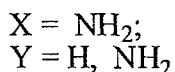
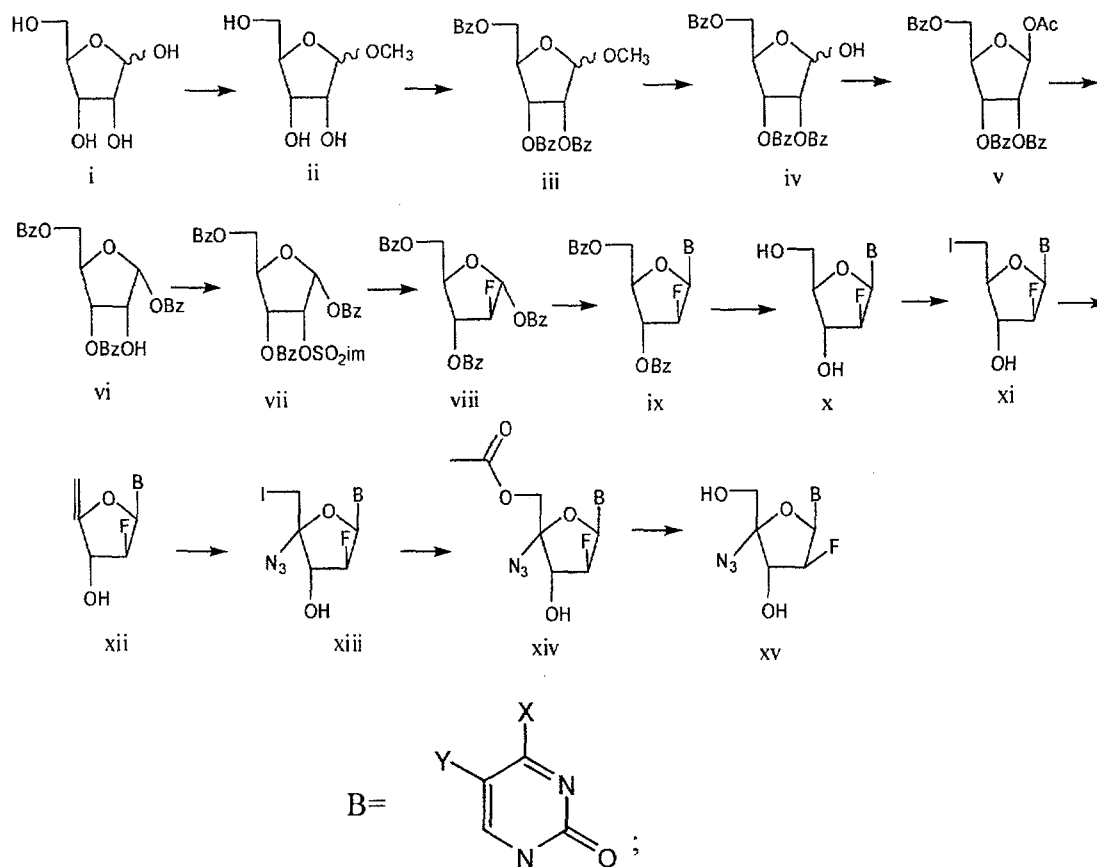
X = F, NH<sub>2</sub>;

Y = H, CH<sub>3</sub>, F, OH, NH<sub>2</sub>。

2、如权利要求 1 所述的 2'-氟-4'-取代核苷类似物, 其特征在于, 所述化合物是以下化合物之一:



3、如权利要求1所述的核苷类似物的制备方法，其特征在于，包括下列步骤：



化合物 ii 的合成：将化合物 i D-核糖或 L-核糖溶于 HCl/MeOH 中，在水浴下保温密闭搅拌，加入吡啶终止反应，减压抽干，得浅黄色糖浆状物质化合物 ii；

化合物 iii 的合成：将化合物 ii 溶于干燥的吡啶中，冰盐浴下缓慢滴加苯甲酰氯，室温下搅拌反应，反应完毕后将反应液倒入冰水中，氯仿提取，有机层用冰水、预冷的硫酸、饱和碳酸氢钠依次洗涤至水层呈弱碱性，再用冰水洗至水层呈中性，无水硫酸钠干燥，减压抽干得浅黄色糖浆状物质化合物 iii；

化合物 iv 的合成：将苯甲酰化物化合物 iii 溶于氯仿中，加入红磷，冰水浴搅拌下缓慢滴加溴，搅拌 30min 左右，缓慢滴加冰水，室温搅拌，然后加入碎冰搅融，再将反应液倒入冰水中，氯仿提取。有机层饱和碳酸氢钠洗至水层呈弱碱性，冰水洗至水层呈中性，无水硫酸钠干燥，减压抽干得深黄色糖浆，用硅胶柱分离得白色干糖浆化合物 iv；

化合物 v 的合成：将化合物 iv 溶解在干燥的吡啶中，冰水浴下缓慢滴加醋酐，搅拌 30min 左右，撤去冰水浴，室温搅拌约 7h，升温到 40℃保持约 1h；加入碎冰搅融后，将反应液倒入冰水中，氯仿提取；有机层用冰水、预冷的硫酸、饱和碳酸氢钠依次洗至水层呈弱碱性，冰水洗至水层呈中性，无水硫酸钠干燥，减压抽干得浅黄色糖浆状化合物 v；

化合物 vi 的合成：将化合物 v 溶于干燥的二氯甲烷中，冰水浴下缓慢通入干燥的 HCl 气体，加入冰水洗涤，分出有机层，用饱和碳酸氢钠洗至水层呈弱碱性，冰水洗至水层呈中性，无水硫酸钠干燥，减压抽干得浅黄色糖浆；重结晶得白色固体化合物 vi；

化合物 vii 的合成：将化合物 vi 溶于干燥的二氯甲烷中和干燥的 DMF 中，-15℃左右搅拌下缓慢加入 SO<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>，-15℃搅拌 30min 左右，自然升至室温反应，在 0℃下分 3 次加入咪唑，混合液室温搅拌，反应完毕后向反应液加入 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 稀释，用冰水洗涤，水层用 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 提取，有机层合并后用无水硫酸钠干燥，减压抽干溶剂得浅黄色糖浆，用硅胶柱分离纯化得白色固体化合物 vii；

化合物 viii 的合成：将化合物 vii 溶于乙酸乙酯中，搅拌下加入 Et<sub>3</sub>N·3HF，升温至 60℃左右搅拌约 3h，70℃搅拌约 1.5h，加入冰盐水终止反应，然后用二氯甲烷提取，有机层合并后依次用盐水、水、饱和碳酸氢钠洗涤，无水硫酸钠干燥，减压抽干溶剂得深黄色糖浆，纯化得浅黄色糖浆，粗品结晶得白色晶体化合物 viii；

化合物 ix 的合成：将化合物 viii 溶解于无水二氯甲烷中，加入 HBr-AcOH 的混合溶液，室温搅拌反应。反应完毕后将混合物蒸干，用二氯甲烷溶解剩余物，并用碳酸氢钠洗涤二氯甲烷溶液，将二氯甲烷蒸去，得到糖浆状物。同时，将保护过的胞嘧啶和(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>在 HMDS 中氮气保护下回流反应，反应完毕，减压蒸去溶剂，得到甲硅烷基化的胞嘧啶；将上述反应中得到的糖浆状物溶于二氯乙烷中，加入到甲硅烷基化的胞嘧啶中，混合物在 N<sub>2</sub> 保护下回流反应，用冰终止反应，二氯甲烷萃取，二氯甲烷层依次用饱和碳酸氢钠和盐水洗涤，无水硫酸钠干燥，干燥后蒸除溶剂，得到白色固体，柱色谱分离纯化，得到化合物 ix；

化合物 x 的合成：将化合物 ix 溶于饱和的 NH<sub>3</sub>-CH<sub>3</sub>OH，室温搅拌反应，反应完毕后将溶剂蒸干，所得剩余物通过柱色谱纯化，得到化合物 x；

化合物 xi 的合成：将化合物 x，咪唑、三苯基磷，溶解在四氢呋喃中，向其中缓慢加入溶解有碘的四氢呋喃溶液，室温搅拌反应，反应完毕后蒸除溶剂，向剩余物中加入乙酸乙酯，过滤，蒸除乙酸乙酯，剩余物柱色谱分离得到化合物 xi；

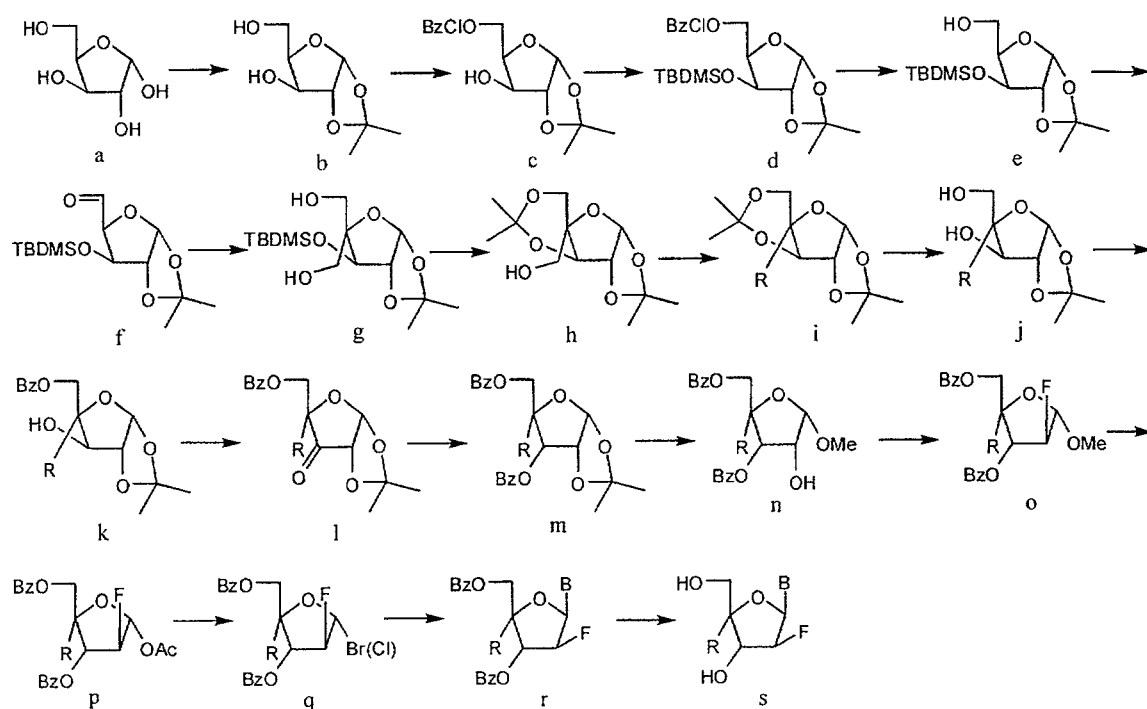
化合物 xii 的合成：将化合物 xi 溶解在四氢呋喃中，向其中加入 DBU，在 60℃左右搅拌反应，反应完毕后蒸干溶剂，剩余物柱色谱分离得到化合物 xii；

化合物 xiii 的合成：在 0℃左右，将溶有 ICl 的 DMF 溶液加入到溶有 NaN<sub>3</sub> 的 DMF 溶液中，冰点搅拌约 10 分钟，将溶有化合物 xii 的 DMF 缓慢加入到上述溶液，继续反应；反应完毕后向混合溶液中加入亚硫酸钠，直到碘的颜色完全消失，减压蒸除溶剂，剩余物用柱色谱分离纯化，得到化合物 xii；

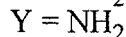
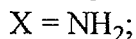
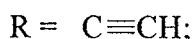
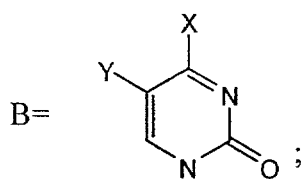
化合物 xiv 的合成：将化合物 xiii 溶于 DMF 中，搅拌下加入醋酸银，室温反应，反应完毕后过滤，在减压下移除溶剂，剩余物用柱色谱纯化，得到化合物 xiv；

化合物 xv 的合成：将化合物 xiv 溶于三乙胺甲醇溶液中，室温搅拌反应，反应结束后蒸除溶剂，剩余物用柱色谱纯化，得到化合物 xv。

4、如权利要求 1 所述的核苷类似物的制备方法，其特征在于，包括下列步骤：



TBDMS 为叔丁基二甲基硅烷，



化合物 b 的合成：取化合物 a，加入丙酮，搅拌条件下慢慢加入浓硫酸，室温下搅拌反应，TLC 检测反应结束后，用浓氨水调节 pH 值，过滤，减压蒸去大部分丙酮，在搅拌条件下加入 0.4%稀盐酸，在丙酮回流条件下反应，化合物 a 全部水解成化合物 b；用固体 NaHCO<sub>3</sub> 中和反应液，过滤，滤液在减压下蒸去溶剂，剩余物用二氯甲烷溶解，用无水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 干燥过夜，过滤，蒸去溶剂后，得到黄色粘稠油状物 b；

化合物 c 的合成：将化合物 b 和三乙胺溶于二氯甲烷，冰盐浴下慢慢滴加对氯苯甲酰氯，保持 0℃ 以下机械搅拌反应；反应完毕后加入饱和 NaHCO<sub>3</sub> 水溶液，二氯甲烷层用水、饱和食盐水洗涤，无水 MgSO<sub>4</sub> 干燥，过滤，减压蒸去溶剂，并重结晶剩余物，得白色晶体化合物 c；

化合物 d 的合成：化合物 c 溶解到无水二氯甲烷中，在氮气保护下，加入咪唑和叔丁基二甲基氯化硅，室温反应，反应结束后，用盐酸中和反应，分出两层，有机层分别用水和饱和食盐水洗涤后，用无水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 干燥，蒸除溶剂，剩余物通过柱色谱进行分离纯化，得到化合物 d；

化合物 e 的合成：化合物 d 加入到甲醇钠-甲醇的混合物液中，室温反应；反应结束后用稀醋酸中和，过滤，用甲醇洗涤，减压蒸除溶剂，剩余物用柱色谱分离纯化，得化合物 e；

化合物 f 的合成：在约 -60℃ 条件下向草酰氯的二氯甲烷溶液中逐滴滴加 DMSO，在相同的温度下，搅拌约 15 分钟后，滴加化合物 e 的二氯甲烷溶液；在约 -65℃ 搅拌反应约 30 分钟，加入三乙胺，室温搅拌反应，反应结束后向反应液中加入水，分出有机层，有机层用无水硫酸镁干燥。蒸除溶剂，剩余物用柱色谱分离纯化得化合物 f；

化合物 g 的合成：在反应瓶中放入氢氧化钠和水，搅拌均匀后，加入甲醛水溶液、95%乙醇，然后再加入化合物 f，约 35℃ 下搅拌反应；反应结束后，边搅

拌边用冰水冷却反应瓶，直至产物完全析出，抽滤，固体用水洗涤至中性并烘干，所得固体溶解到无水甲醇中，再加入硼氢化钠，回流反应，反应结束后用稀盐酸中和反应液，用二氯甲烷萃取反应液，无水  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  干燥后蒸除溶剂，得化合物 g；

化合物 h 的合成：化合物 g 溶解到甲醇中，加入用甲醇洗涤过的 Dowex  $\text{H}^+$ ，室温反应，反应完毕后将树脂过滤除去，并用甲醇反复洗涤树脂，溶液蒸干得固体；将所得固体溶于丙酮中，搅拌条件下慢慢加入浓硫酸，室温搅拌反应，用浓氨水调节 pH 值，过滤，减压蒸去丙酮，得到化合物 h；

化合物 i 的合成：在约  $-60^\circ\text{C}$  下向草酰氯的二氯甲烷溶液中逐滴滴加 DMSO，滴完后搅拌约 15 分钟，滴加化合物 h 的二氯甲烷溶液，滴完后约  $-60^\circ\text{C}$  反应约 30 分钟，加入三乙胺，室温反应约 30 分钟后加入水终止反应，分出有机层，有机层用无水  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  干燥，蒸除溶剂，剩余物用柱色谱分离纯化得固体；将  $\text{ClCH}_2\text{P}(\text{C}_6\text{H}_5)_3\text{Cl}$  加入到无水四氢呋喃中，冷却到约  $-78^\circ\text{C}$ ，加入 n-BuLi 的正己烷溶液搅拌反应约 1h，然后加入所得固体的干燥四氢呋喃溶液，温度逐渐升高到  $0^\circ\text{C}$  左右，继续反应，反应完毕后小心滴加饱和的  $\text{NH}_4\text{Cl}$  溶液，用乙酸乙酯萃取，有机层用盐水洗涤两次，最后用无水  $\text{MgSO}_4$  干燥，减压蒸除溶剂，得到的剩余物溶解到无水四氢呋喃中，冷却到  $-78^\circ\text{C}$  左右，慢慢滴加 n-BuLi 的正己烷溶液，搅拌反应 2h 左右，小心地用饱和  $\text{NH}_4\text{Cl}$  溶液终止反应，有机层用饱和食盐水洗涤，无水  $\text{MgSO}_4$  干燥，减压蒸除溶剂，剩余物用快速硅胶柱分离纯化，得化合物 i；

化合物 j 的合成：将化合物 i 加入到稀盐酸溶液中，室温搅拌反应，反应完毕后用固体  $\text{NaHCO}_3$  中和，过滤，滤液在减压条件下蒸去溶剂，剩余物用二氯甲烷溶解，并用无水  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  干燥后过滤，蒸去溶剂，得化合物 j；

化合物 k 的合成：将化合物 j 溶解到吡啶中，滴加  $\text{BzCl}$ ，室温反应，反应完毕后蒸干溶剂，剩余物纯化后得化合物 k；

化合物 l 的合成：将化合物 k 和 2,2,6,6-四甲基哌啶-N-氧溶于二氯甲烷中，冷至  $0^\circ\text{C}$  左右，将混合的次氯酸钠溶液、 $\text{NaHCO}_3$  和水混合溶液加入到反应液， $0^\circ\text{C}$  左右反应约 30 分钟，加入异丙醇，室温搅拌。分出的二氯甲烷层用水洗涤 2 次，无水  $\text{MgSO}_4$  干燥，过滤，蒸去溶剂得到的剩余物进行重结晶，得到化合物

l;

化合物 m 的合成: 将化合物 l 加入到无水乙醇和乙酸乙酯的混合液中, 冷至 0℃左右, 分批加入硼氢化钠, 搅拌反应, 反应完毕后用稀醋酸中和, 过滤, 滤液蒸干, 剩余物再用二氯甲烷溶解, 然后水洗, 二氯甲烷层用无水  $MgSO_4$  干燥, 过滤, 减压蒸去二氯甲烷, 剩余物用二氯甲烷和石油醚的混合溶剂重结晶, 得到固体物; 将所得固体物溶于吡啶中, 在 0℃左右滴加  $BzCl$ , 滴加完毕后, 室温反应, 反应完毕后蒸除溶剂, 剩余物用乙酸乙酯萃取, 饱和  $NaHCO_3$  溶液洗涤, 无水  $Na_2SO_4$  干燥, 过滤, 蒸去溶剂, 剩余物柱色谱分离纯化得化合物 m;

化合物 n 的合成: 将化合物 m 溶于甲醇中, 加入浓盐酸/二氧六环的混合溶液, 室温反应, 反应完毕后用  $NaHCO_3$  中和反应液, 过滤, 滤液减压蒸馏除去溶剂, 剩余物溶于适量二氯甲烷中, 用无水  $Na_2SO_4$  干燥过夜, 滤液蒸干, 用柱色谱分离纯化得化合物 n;

化合物 o 的合成: 化合物 n 溶解在二氯甲烷中, 室温条件下加入 DAST 搅拌反应, 反应完毕后将混合物倒入饱和  $NaHCO_3$  溶液中, 分出有机层, 并用饱和  $NaHCO_3$  溶液洗涤, 无水  $Na_2SO_4$  干燥, 柱色谱分离纯化得到化合物 o;

化合物 p 的合成: 将化合物 o 加入到甲酸溶液中, 在室温下搅拌反应, 反应完毕后减压蒸去溶剂, 剩余物与甲苯共蒸得固体物, 将所得固体物溶于干燥吡啶和醋酸酐溶液, 室温反应, 反应完毕后将反应液浓缩, 然后与甲苯共蒸, 得到化合物 p;

化合物 q 的合成: 化合物 p 溶于无水二氯甲烷中, 将其冷至 0℃左右, 然后慢慢通  $HCl$  气体至饱和, 室温下真空蒸去溶剂, 剩余物真空干燥得到化合物 q;

化合物 r 的合成: 2,6 二氨基嘌呤与六甲基硅氮烷, 在  $(NH_4)_2SO_4$  存在下加热回流至得到透明溶液, 真空下蒸去溶剂得到白色固体, 将该固体溶于 1,2-二氯乙烷中, 再加入化合物 q 的 1,2-二氯乙烷溶液及分子筛, 在氮气保护下室温搅拌反应, TLC 检测反应完全后, 在反应液中加入二氯甲烷, 并用硅藻土过滤, 滤液分别用饱和  $NaHCO_3$  和食盐水洗涤, 有机层用无水  $Na_2SO_4$  干燥过夜, 蒸去溶剂得到的剩余物用减压硅胶柱分离得到化合物 r;

化合物 s 的合成: 将化合物 r 溶解在  $NH_3-CH_3OH$  饱和的溶液中, 室温搅拌反应, 反应完毕后蒸除溶剂, 剩余物通过柱色谱分离纯化得到化合物 s。



5、如权利要求 1 或 2 中所述的 2'-氟-4'-取代核苷类似物在制备药物中的应用，其特征在于，将其应用于制备抗 HBV 病毒药物或抗 HCV 病毒药物或抗 HIV 病毒药物。

6、如权利要求 5 中所述的 2'-氟-4'-取代-核苷类似物在制备药物中的应用，其特征在于，HBV 病毒药物为抗乙肝药物，HCV 病毒药物为抗丙肝药物，HIV 病毒药物为抗艾滋病药物。

## 2'-氟-4'-取代-核苷类似物、其制备方法及应用

### 技术领域

本发明涉及核苷类似物、其制备方法及其应用，尤其涉及 2'-氟-4'-取代核苷类似物、其制备方法及应用。

### 背景技术

1981 年美国发现第一例艾滋病患者，到 1983 年科学家即分离鉴定出了艾滋病病毒 (HIV)，发现 HIV 属于逆转录病毒科的慢病毒亚科，仅由 9749 个核苷酸组成。目前对 HIV 复制循环过程已经基本搞清，研究发现其繁殖过程大致分为以下步骤：吸附、侵入和脱壳、逆转录、整合、病毒 RNA 和蛋白质的合成、装配、释放和成熟，其中每个环节均可作为筛选 HIV 药物的靶点，其中蛋白质的合成和病毒基因组核酸复制是最关键的步骤。目前筛选抗 HIV 药物的焦点集中于寻找这些特异性酶的抑制剂，包括逆转录酶 (RT) 抑制剂、蛋白质合成酶抑制剂和逆转录酶启动因子抑制剂等。HIV 的逆转录酶是一种多功能酶，同时具有依赖 RNA 的 DNA 聚合酶、依赖 DNA 的 DNA 聚合酶和 RNase H 活性。HIV 首先以病毒基因组的 RNA 为模板，以宿主细胞的运转 RNA 为引物，进行 (-) 链 DNA 的合成，然后以同样的方式合成 (+) 链 DNA。当逆转录结束以后，HIV 所携带的全部遗传信息从单链 RNA 转化为双链 mDNA。逆转录酶抑制剂可以阻止 mDNA 的延长，干扰 HIV 的逆转录过程，从而成为化学治疗艾滋病的药物。根据抑制剂的作用机理不同，可以把它们分为两类：1) 核苷类逆转录酶抑制剂，其作用于 HIV DNA 逆转录过程中，通过嵌入到病毒 DNA 中，促使其成为缺陷 DNA 而使 HIV 的宿主细胞的 DNA 整合后无法复制，从而达到抗 HIV 的作用，现有药物为齐多夫定 (AZT)、去羟肌苷 (ddI)、扎西他滨 (ddC)、司他夫定 (d4T)、拉米夫定 (3TC)、阿巴卡韦 (Abacavir)；2) 非核苷类逆转录酶抑制剂，其作用机制是阻止 HIV RNA 直接连接到 RT，不使其编码成 DNA。现有药物奈韦拉平 (Nevirapine)、Delavirdine 和 Efavirenz。

1987 年第一个上市的抗 HIV 药物齐多夫定即为核苷类逆转录酶抑制剂，虽

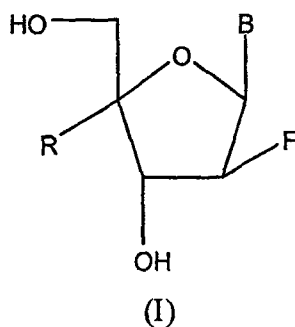
然该药物毒性很大，并且未能治愈一例病人，但是它可以减轻症状，延长患者的生命。随后又有几个核苷类似物抗 HIV 药物上市，因此，核苷类似物是一类重要的可能具有抗 HIV 活性的化合物。目前这些药物都存在一定的缺陷，一方面是药效有限，另一方面是长期服用有严重的毒副作用，并且会产生抗性。因此，新型核苷类似物的合成依然是一个重要的研究方向。为了发现更有效的核苷类抗病毒药物，人们对核苷进行了各种各样的修饰，其中含有氟的核苷类似物即为其中的一类。(Clark, J. PCT Patent Appl., WO 2005003174; Ismaili, H.M.A. PCT Patent Appl., WO 0160315A22001)。研究表明该类化合物都有不同程度的抗病毒活性，是一类新型的具有抗病毒活性的化合物。但是在现有的文献中，迄今尚未见到本发明之含 2'-氟-4'-取代-D-和 L-核苷类似物的合成，以及将其用于制备抗 HIV 和抗 HBV 及 HCV 病毒药物的相关报道。

#### 发明内容

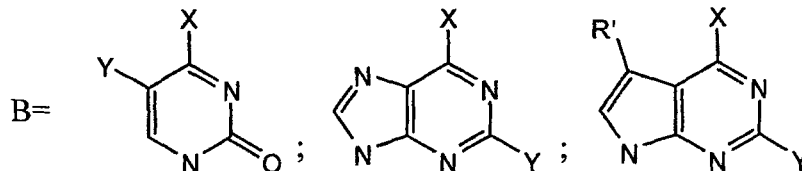
本发明的主要目的在于提供一种含 2'-氟-4'-取代核苷类似物；另一目的在于提供该类化合物的合成方法；又一目的在于提供该类化合物在药物方面的应用。

为实现本发明目的，技术方案如下实现：

该本发明 2'-氟-4'-取代核苷类似物，具有通式 (I) 结构：



其中



R = CH<sub>3</sub>, CN, N<sub>3</sub>, C≡CH;

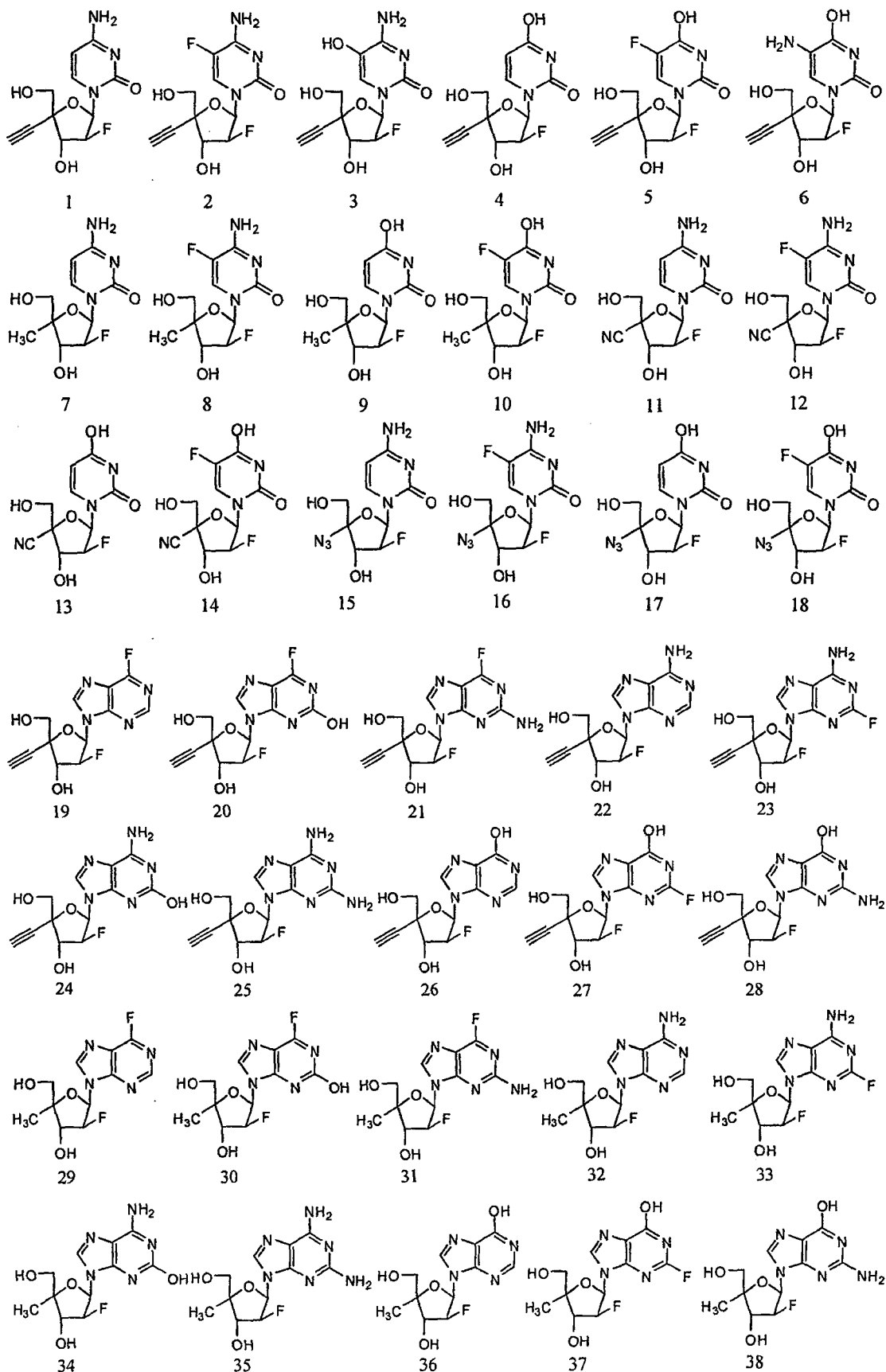
R' = H, F;

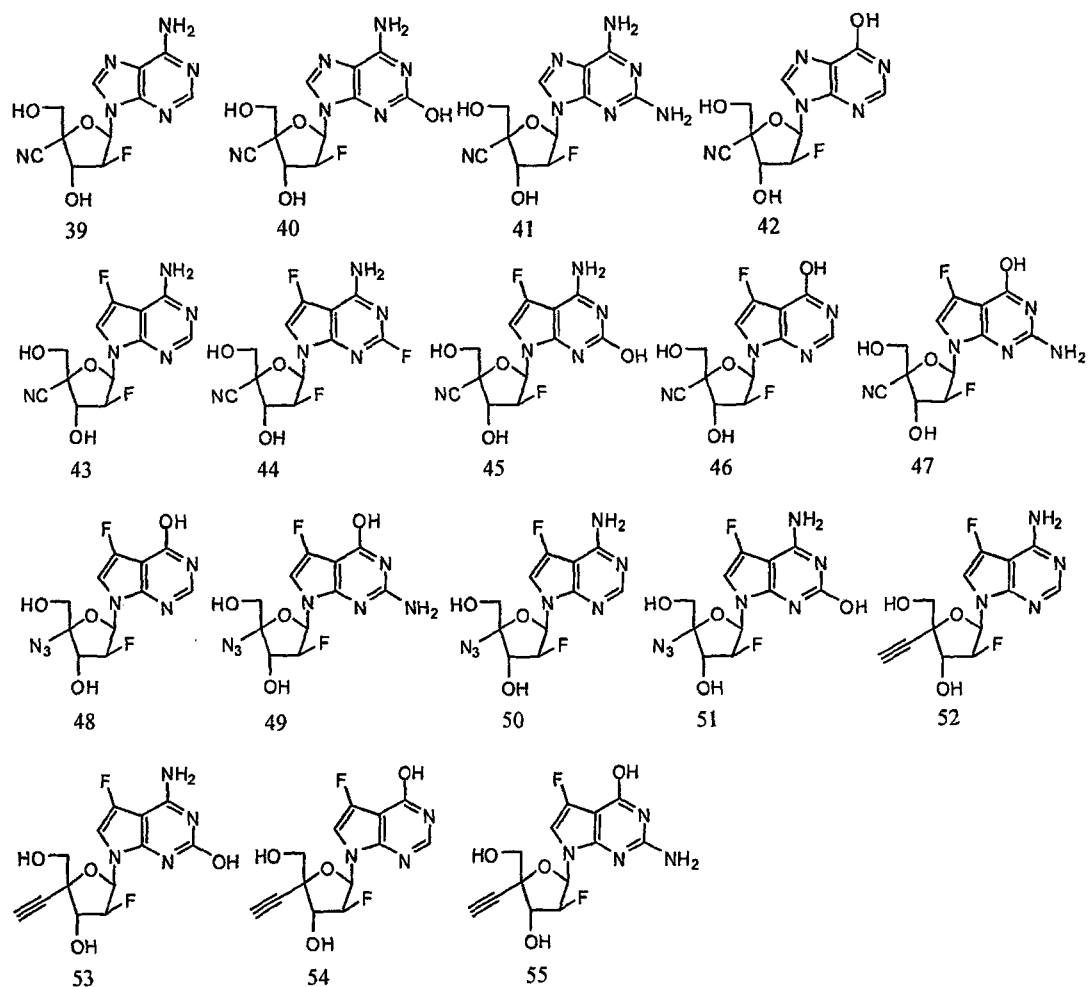
X = F, OH, NH<sub>2</sub>;

Y = H, CH<sub>3</sub>, F, OH, NH<sub>2</sub>。

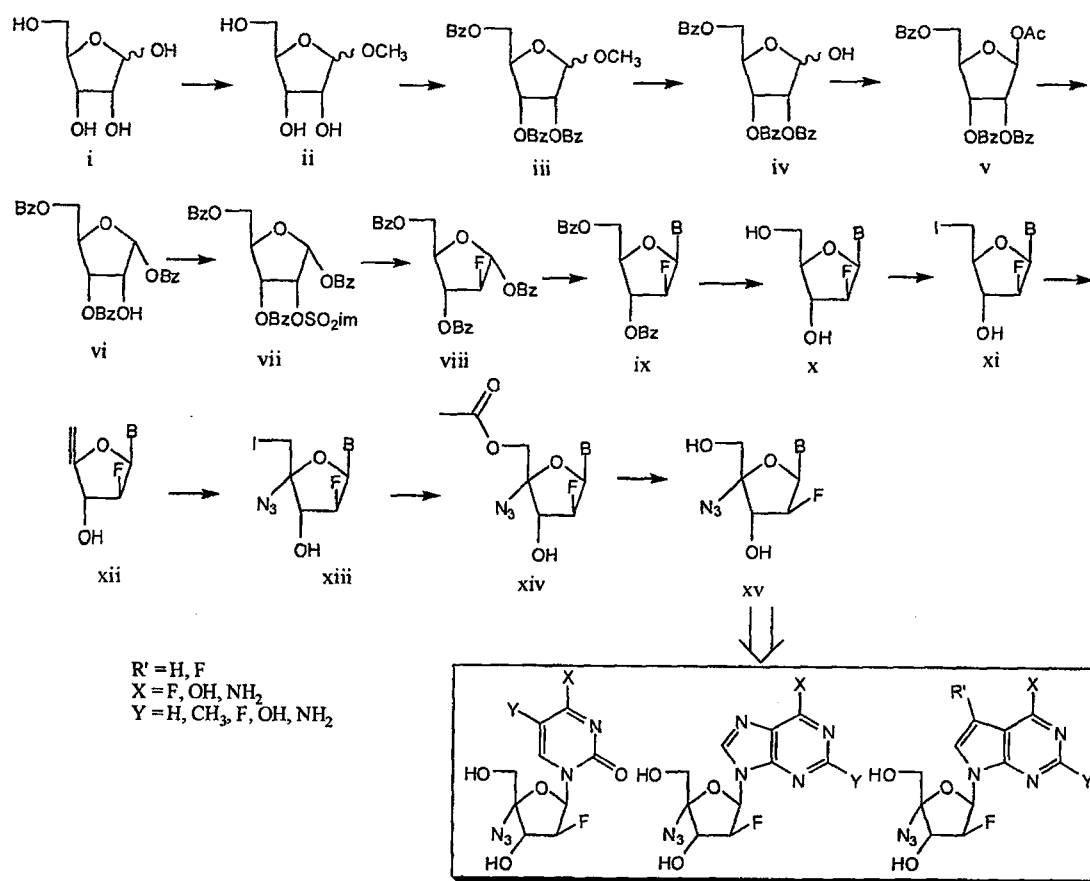
其可以通过活性化合物 (I) 或其潜药或其 5'-磷酸酯与有机酸或无机酸反应形成盐，以盐的形式存在。

其可以是如下化合物之一但不限于这些化合物：





本发明含 2'-氟-4'-取代-核苷类似物在制备药物中的应用, 将其应用于制备抗 HBV 或抗 HCV 或抗 HIV 病毒药物中, 所述抗 HBV 病毒药物为抗乙肝药物; 所述抗 HCV 病毒药物为抗丙肝药物; 所述抗 HIV 病毒药物为抗艾滋病药物。本发明含 2'-氟-4'-取代核苷类似物的制备反应, 当  $R=N_3$  时路径如下:



化合物 ii 的合成：将化合物 i (D-核糖或 L-核糖) 溶于 HCl/MeOH 中，在水浴下保温密闭搅拌，加入吡啶终止反应，减压抽干，得浅黄色糖浆状物质化合物 ii；

化合物 iii 的合成：将化合物 ii 溶于干燥的吡啶中，冰盐浴下缓慢滴加苯甲酰氯，室温下搅拌反应，反应完毕后将反应液倒入冰水中，氯仿提取。有机层用冰水、预冷的硫酸、饱和碳酸氢钠依次洗涤至水层呈弱碱性，再用冰水洗至水层呈中性，无水硫酸钠干燥，减压抽干得浅黄色糖浆状物质化合物 iii。

化合物 iv 的合成：将苯甲酰化物化合物 iii 溶于氯仿中，加入红磷，冰水浴搅拌下缓慢滴加溴，搅拌 30min 左右，缓慢滴加冰水，室温搅拌，然后加入碎冰搅融，再将反应液倒入冰水中，氯仿提取。有机层饱和碳酸氢钠洗至水层呈弱碱性，冰水洗至水层呈中性，无水硫酸钠干燥，减压抽干得深黄色糖浆，用硅胶柱分离得白色干糖浆化合物 iv。

化合物 v 的合成：将化合物 iv 溶解在干燥的吡啶中，冰水浴下缓慢滴加醋酐，搅拌 30min 左右，撤去冰水浴，室温搅拌约 7h，升温到 40℃ 保持约 1h。加入碎冰搅融后，将反应液倒入冰水中，氯仿提取。有机层用冰水、预冷的硫酸、

饱和碳酸氢钠依次洗至水层呈弱碱性，冰水洗至水层呈中性，无水硫酸钠干燥，减压抽干得浅黄色糖浆状化合物 v。

化合物 vi 的合成：将化合物 v 溶于干燥的二氯甲烷中，冰水浴下缓慢通入干燥的 HCl 气体，加入冰水洗涤，分出有机层，用饱和碳酸氢钠洗至水层呈弱碱性，冰水洗至水层呈中性，无水硫酸钠干燥，减压抽干得浅黄色糖浆。重结晶得白色固体化合物 vi。

化合物 vii 的合成：将化合物 vi 溶于干燥的二氯甲烷中和干燥的 DMF 中，-15℃左右搅拌下缓慢加入 SO<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>，-15℃搅拌 30min 左右，自然升至室温反应，在 0℃下分 3 次加入咪唑，混合液室温搅拌，反应完毕后向反应液加入 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 稀释，用冰水洗涤，水层用 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 提取，有机层合并后用无水硫酸钠干燥，减压抽干溶剂得浅黄色糖浆。用硅胶柱分离纯化得白色固体化合物 vii。

化合物 viii 的合成：将化合物 vii 溶于乙酸乙酯中，搅拌下加入 Et<sub>3</sub>N·3HF，升温至 60℃左右搅拌约 3h，70℃搅拌约 1.5h。加入冰盐水终止反应，然后用二氯甲烷提取，有机层合并后依次用盐水、水、饱和碳酸氢钠洗涤，无水硫酸钠干燥，减压抽干溶剂得深黄色糖浆。纯化得浅黄色糖浆，粗品结晶得白色晶体化合物 viii。

化合物 ix 的合成：将化合物 viii 溶解于无水二氯甲烷中，加入 HBr-AcOH 的混合溶液，室温搅拌反应。反应完毕后将混合物蒸干，用二氯甲烷溶解剩余物，并用碳酸氢钠洗涤二氯甲烷溶液，将二氯甲烷蒸去，得到糖浆状物。同时，将保护过的胞嘧啶和(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 在 HMDS 中氮气保护下回流反应，反应完毕，减压蒸去溶剂，得到甲硅烷基化的胞嘧啶。将上述反应中得到的糖浆状物溶于二氯乙烷中，加入到甲硅烷基化的胞嘧啶中，混合物在 N<sub>2</sub> 保护下回流反应。用冰终止反应，二氯甲烷萃取，二氯甲烷层依次用饱和碳酸氢钠和盐水洗涤，无水硫酸钠干燥。干燥后蒸除溶剂，得到白色固体，柱色谱分离纯化，得到化合物 ix。

化合物 x 的合成：将化合物 ix 溶于饱和的 NH<sub>3</sub>-CH<sub>3</sub>OH，室温搅拌反应。反应完毕后将溶剂蒸干，所得剩余物通过柱色谱纯化，得到化合物 x。

化合物 xi 的合成：将化合物 x，咪唑、三苯基膦，溶解在四氢呋喃中，向其中缓慢加入溶解有碘的四氢呋喃溶液。室温搅拌反应。反应完毕后蒸除溶剂，向剩余物中加入乙酸乙酯，过滤。蒸除乙酸乙酯，剩余物柱色谱分离得到化合物

xi.

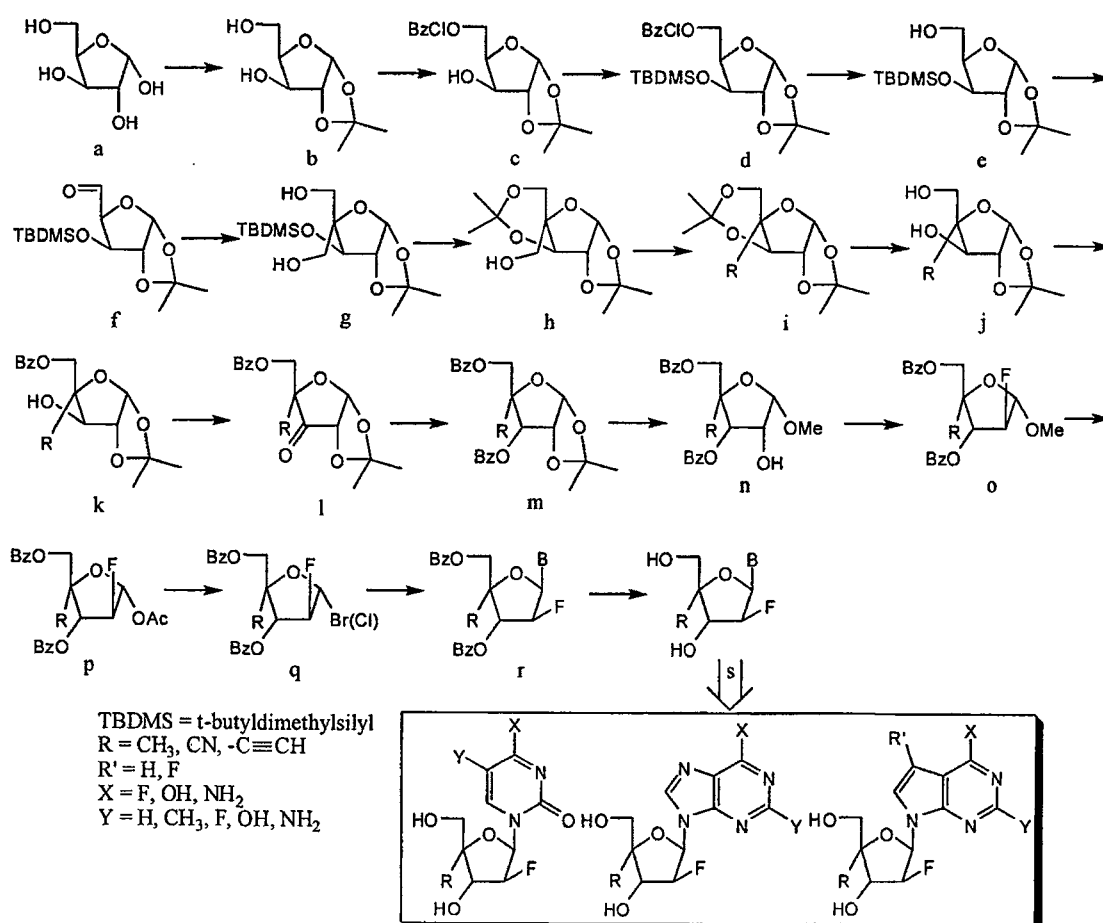
化合物 xii 的合成：将化合物 xi 溶解在四氢呋喃中，向其中加入 DBU。在 60℃ 左右搅拌反应。反应完毕后蒸干溶剂，剩余物柱色谱分离得到化合物 xii。

化合物 xiii 的合成：在 0℃ 左右，将溶有 ICl 的 DMF 溶液加入到溶有 NaN<sub>3</sub> 的 DMF 溶液中，冰点搅拌约 10 分钟，将溶有化合物 xii 的 DMF 缓慢加入到上述溶液，继续反应。反应完毕后向混合溶液中加入亚硫酸钠，直到碘的颜色完全消失。减压蒸除溶剂，剩余物用柱色谱分离纯化，得到化合物 xii

化合物 xiv 的合成：将化合物 xiii 溶于 DMF 中，搅拌下加入醋酸银，室温反应，反应完毕后过滤。在减压下移除溶剂，剩余物用柱色谱纯化，得到化合物 xiv。

化合物 xv 的合成：将化合物 xiv 溶于三乙胺甲醇溶液中，室温搅拌反应，反应结束后蒸除溶剂，剩余物用柱色谱纯化，得到化合物 xv。

本发明含 2'-氟-4'-取代核苷类似物的制备反应，当 R=CH<sub>3</sub>,CN,C≡CH 时路径如下：





TBDMS 为叔丁基二甲基硅烷。

化合物 b 的合成：取化合物 a，加入丙酮，搅拌条件下慢慢加入浓硫酸，室温下搅拌反应，TLC 检测反应结束后，用浓氨水调节 pH 值，过滤，减压蒸去大部分丙酮，在搅拌条件下加入 0.4%稀盐酸，在丙酮回流条件下反应，化合物 a 全部水解成化合物 b。用固体  $\text{NaHCO}_3$  中和反应液，过滤，滤液在减压下蒸去溶剂，剩余物用二氯甲烷溶解，用无水  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  干燥过夜，过滤，蒸去溶剂后，得到黄色粘稠油状物 b。

化合物 c 的合成：将化合物 b 和三乙胺溶于二氯甲烷，冰盐浴下慢慢滴加对氯苯甲酰氯，保持  $0^\circ\text{C}$  以下机械搅拌反应。反应完毕后加入饱和  $\text{NaHCO}_3$  水溶液，二氯甲烷层用水、饱和食盐水洗涤，无水  $\text{MgSO}_4$  干燥，过滤，减压蒸去溶剂，并重结晶剩余物，得白色晶体化合物 c。

化合物 d 的合成：化合物 c 溶解到无水二氯甲烷中，在氮气保护下，加入咪唑和叔丁基二甲基氯化硅 (TBDMS-Cl)。室温反应，反应结束后，用盐酸中和反应，分出两层，有机层分别用水和饱和食盐水洗涤后，用无水  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  干燥，蒸除溶剂，剩余物通过柱色谱进行分离纯化，得到化合物 d。

化合物 e 的合成：化合物 d 加入到甲醇钠-甲醇的混合物液中，室温反应。反应结束后用稀醋酸中和，过滤，用甲醇洗涤，减压蒸除溶剂，剩余物用柱色谱分离纯化，得化合物 e。

化合物 f 的合成：在约  $-60^\circ\text{C}$  条件下向草酰氯的二氯甲烷溶液中逐滴滴加 DMSO，在相同的温度下，搅拌约 15 分钟后，滴加化合物 e 的二氯甲烷溶液。在约  $-65^\circ\text{C}$  搅拌反应约 30 分钟，加入三乙胺，室温搅拌反应。反应结束后向反应液中加入水，分出有机层，有机层用无水硫酸镁干燥。蒸除溶剂，剩余物用柱色谱分离纯化得化合物 f。

化合物 g 的合成：在反应瓶中放入氢氧化钠和水，搅拌均匀后，加入甲醛水溶液、95%乙醇，然后再加入化合物 f。约  $35^\circ\text{C}$  下搅拌反应。反应结束后，边搅拌边用冰水冷却反应瓶，直至产物完全析出。抽滤，固体用水洗涤至中性并烘干，所得固体溶解到无水甲醇中，再加入硼氢化钠，回流反应，反应结束后用稀盐酸中和反应液，用二氯甲烷萃取反应液，无水  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  干燥后蒸除溶剂，得化合物 g。

化合物 h 的合成：化合物 g 溶解到甲醇中，加入 Dowex H<sup>+</sup>（事先用甲醇洗涤），室温反应，反应完毕后将树脂过滤除去，并用甲醇反复洗涤树脂，溶液蒸干得固体。将所得固体溶于丙酮中，搅拌条件下慢慢加入浓硫酸（催化量），室温搅拌反应，用浓氨水调节 pH 值，过滤，减压蒸去丙酮，得到化合物 h。

化合物 i 的合成：在约-60℃下向草酰氯的二氯甲烷溶液中逐滴滴加 DMSO，滴完后搅拌约 15 分钟，滴加化合物 h 的二氯甲烷溶液，滴完后约-60℃反应约 30 分钟，加入三乙胺，室温反应约 30 分钟后加入水终止反应，分出有机层，有机层用无水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 干燥。蒸除溶剂，剩余物用柱色谱分离纯化得固体。将 ClCH<sub>2</sub>P(C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>)<sub>3</sub>Cl 加入到无水四氢呋喃中，冷却到约-78℃，加入 n-BuLi 的正己烷溶液搅拌反应约 1h，然后加入所得固体的干燥四氢呋喃溶液。温度逐渐升高到 0℃左右，继续反应。反应完毕后小心滴加饱和的 NH<sub>4</sub>Cl 溶液，用乙酸乙酯萃取，有机层用盐水洗涤两次，最后用无水 MgSO<sub>4</sub> 干燥，减压蒸除溶剂，得到的剩余物溶解到无水四氢呋喃中，冷却到-78℃左右，慢慢滴加 n-BuLi 的正己烷溶液。搅拌反应 2h 左右，小心地用饱和 NH<sub>4</sub>Cl 溶液终止反应。有机层用饱和食盐水洗涤，无水 MgSO<sub>4</sub> 干燥，减压蒸除溶剂，剩余物用快速硅胶柱分离纯化，得化合物 i。

化合物 j 的合成：将化合物 i 加入到稀盐酸溶液中，室温搅拌反应，反应完毕后用固体 NaHCO<sub>3</sub> 中和，过滤，滤液在减压条件下蒸去溶剂，剩余物用二氯甲烷溶解，并用无水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 干燥后过滤，蒸去溶剂，得化合物 j。

化合物 k 的合成：将化合物 j 溶解到吡啶中，滴加 BzCl，室温反应，反应完毕后蒸干溶剂，剩余物纯化后得化合物 k。

化合物 l 的合成：将化合物 k 和 2,2,6,6-四甲基哌啶-N-氧溶于二氯甲烷中，冷至 0℃左右，将混合的次氯酸钠溶液、NaHCO<sub>3</sub> 和水混合溶液加入到反应液，0℃左右反应约 30 分钟，加入异丙醇，室温搅拌。分出的二氯甲烷层用水洗涤 2 次，无水 MgSO<sub>4</sub> 干燥，过滤，蒸去溶剂得到的剩余物进行重结晶，得到化合物 l。

化合物 m 的合成：将化合物 k 加入到无水乙醇和乙酸乙酯的混合液中，冷至 0℃左右，分批加入硼氢化钠，搅拌反应，反应完毕后用稀醋酸中和，过滤，滤液蒸干，剩余物再用二氯甲烷溶解，然后水洗，二氯甲烷层用无水 MgSO<sub>4</sub> 干

燥，过滤，减压蒸去二氯甲烷，剩余物用二氯甲烷和石油醚的混合溶剂重结晶，得到固体物。将所得固体物溶于吡啶中，在 0℃左右滴加 BzCl，滴加完毕后，室温反应，反应完毕后蒸除溶剂，剩余物用乙酸乙酯萃取，饱和 NaHCO<sub>3</sub> 溶液洗涤，无水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 干燥，过滤，蒸去溶剂，剩余物柱色谱分离纯化得化合物 m。

化合物 n 的合成：将化合物 m 溶于甲醇中，加入浓盐酸/二氧六环的混合溶液，室温反应，反应完毕后用 NaHCO<sub>3</sub> 中和反应液，过滤，滤液减压蒸馏除去溶剂，剩余物溶于适量二氯甲烷中，用无水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 干燥过夜，滤液蒸干，用柱色谱分离纯化得化合物 n。

化合物 o 的合成：化合物 n 溶解在二氯甲烷中，室温条件下加入 DAST 搅拌反应，反应完毕后将混合物倒入饱和 NaHCO<sub>3</sub> 溶液中，分出有机层，并用饱和 NaHCO<sub>3</sub> 溶液洗涤，无水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 干燥，柱色谱分离纯化得到化合物 o。

化合物 p 的合成：将化合物 o 加入到甲酸溶液中，在室温下搅拌反应，反应完毕后减压蒸去溶剂，剩余物与甲苯共蒸得固体物，将所得固体物溶于干燥吡啶和醋酸酐溶液，室温反应，反应完毕后将反应液浓缩，然后与甲苯共蒸，得到化合物 p。

化合物 q 的合成：化合物 p 溶于无水二氯甲烷中，将其冷至 0℃左右，然后慢慢通 HCl 气体至饱和，室温下真空蒸去溶剂，剩余物真空干燥得到化合物 q。

化合物 r 的合成：2,6-二氨基嘌呤与六甲基硅氮烷 (HMDS) 在 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 存在下加热回流至得到透明溶液，真空下蒸去溶剂得到白色固体，将该固体溶于 1,2-二氯乙烷中，再加入化合物 q 的 1,2-二氯乙烷溶液及分子筛，在氮气保护下室温搅拌反应，TLC 检测反应完全后，在反应液中加入二氯甲烷，并用硅藻土过滤，滤液分别用饱和 NaHCO<sub>3</sub> 和食盐水洗涤，有机层用无水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 干燥过夜，蒸去溶剂得到的剩余物用减压硅胶柱分离得到化合物 r。

化合物 s 的合成：将化合物 r 溶解在 NH<sub>3</sub>-CH<sub>3</sub>OH 饱和的溶液中，室温搅拌反应，反应完毕后蒸除溶剂，剩余物通过柱色谱分离纯化得到化合物 s。

本发明有益效果在于，通过对糖基和碱基的修饰，使该 D-和 L-核苷类似物含氟基团、炔基、叠氮、氰基等特殊结构弥补目前 D-和 L-核苷类似物毒副作用大、活性较小的不足；且该合成方法简便可行，收率较高，将其应用于制备抗 HBV 或抗 HCV 或抗 HIV 病毒药物，具有较好的应用价值。

## 具体实施方式

根据本发明通式化合物 I 的合成路线并结合实施例对发明进行进一步说明，但并非限制本发明的范围。

### 实施例 1 当碱基为胞嘧啶时化合物 15 的合成

化合物 ii 的合成：将化合物 i (D-核糖或 L-核糖) (8.66mmol) 溶于 31.2ml HCl/MeOH (0.2mmol/L) 中，在 27℃ 水浴下保温密闭搅拌 3h，加入 7.8ml 吡啶终止反应，减压抽干，得浅黄色糖浆状物质化合物 ii (96%)；

化合物 iii 的合成：将化合物 ii (7.92mmol) 溶于 21ml 干燥的吡啶中，冰盐浴下缓慢滴加 5.2ml 苯甲酰氯(0.0447mol)，室温下搅拌 17h 后将反应液倒入 39ml 冰水中，氯仿提取。有机层用冰水、预冷的 3mol/L 硫酸、饱和碳酸氢钠依次洗涤至水层呈弱碱性，再用冰水洗至水层呈中性，无水硫酸钠干燥 4h 以上，减压抽干得浅黄色糖浆状物质化合物 iii (80.0%)。<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ ppm: 7.28~8.10(m, 15H, OBz), 5.87(m, 1H, H-3), 5.68(d, 1H, H-2), 5.16(s, 1H, H-1), 4.72(m, 2H, H-5), 4.52(q, 1H, H-4), 3.42(s, 3H, OCH<sub>3</sub>)。

化合物 iv 的合成：将苯甲酰化物化合物 iii (0.0027mmol) 溶于 13mol 氯仿中，加入红磷(390mg, 0.0126mol)冰水浴搅拌下缓慢滴加溴(1.3ml, 0.025mmol)，搅拌 30min 后，缓慢滴加冰水 1.3ml，室温搅拌 4h，然后加入 7g 碎冰搅融，再将反应液倒入 14ml 冰水中，氯仿提取。有机层饱和碳酸氢钠洗至水层呈弱碱性，冰水洗至水层呈中性，无水硫酸钠干燥 4h 以上，减压抽干得深黄色糖浆，用硅胶柱分离(石油醚：丙酮梯度洗脱)得白色干糖浆化合物 iv (64.2%)。<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ ppm: 7.32~8.10(m, 15H, OBz), 5.90(m, 1H, H-3), 5.70(d, 1H, H-2), 5.63(s, 1H, H-1), 4.55~4.79(m, 3H, H-5, H-4)。

化合物 v 的合成：将化合物 iv (2.73mmol) 溶解在 5ml 干燥的吡啶中，冰水浴下缓慢滴加醋酐 (0.0276mol)，搅拌 30min 后，撤去冰水浴，室温搅拌 7h，升温到 40℃ 保持 1h。加入 6.5g 碎冰搅融后，将反应液倒入 13ml 冰水中，氯仿提取。有机层用冰水、预冷的 3mol/L 硫酸、饱和碳酸氢钠依次洗至水层呈弱碱性，冰水洗至水层呈中性，无水硫酸钠干燥 4h 以上，减压抽干得浅黄色糖浆状化合物 v (92.1%)。<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ ppm: 7.30~8.10(m, 15H, OBz), 6.43(s, 1H, H-1), 5.90(m, 1H, H-3), 5.80(d, 1H, H-2), 4.50~4.80(m, 2H, H-5), 2.00(s, 3H,

CH<sub>3</sub>COO-).

化合物 vi 的合成: 将化合物 v (2.57mmol) 溶于 26ml 干燥的二氯甲烷中, 冰水浴下缓慢通入干燥的 HCl 气体 2.5h, 加入冰水 19.5ml 洗涤, 分出有机层, 用饱和碳酸氢钠洗至水层呈弱碱性, 冰水洗至水层呈中性, 无水硫酸钠干燥 4h 以上, 减压抽干得浅黄色糖浆。用正己烷、二氯甲烷混合溶剂重结晶得白色固体化合物 vi (65.1%)。<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ ppm: 7.36~8.14(m, 15H, OBz), 6.68(d, *J*=4.4Hz, 1H, H-1), 5.59(dd, 1H, H-3), 4.64~4.80(m, 4H, H-2, H-4 and H-5)。M.p.139~140°C。

化合物 vii 的合成: 将化合物 vi (2.81mmol) 溶于 13ml 干燥的二氯甲烷中和 3.5ml 干燥的 DMF 中, -15°C 搅拌下缓慢加入 SO<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (0.0079mmol), -15°C 搅拌 30min 后, 自然升至室温, 反应 3h, 在 0°C 下分 3 次加入咪唑 (0.0407mmol), 混合液室温搅拌 15h, 反应液加入 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (26ml) 稀释, 用冰水 (35ml) 洗涤, 水层用 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 提取, 有机层合并后用无水硫酸钠干燥 4h 以上, 减压抽干溶剂得浅黄色糖浆。用硅胶柱分离纯化 (石油醚: 丙酮梯度洗脱) 得白色固体化合物 vii (76.0%)。<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ ppm: 7.00~8.10(m, 15H, OBz), 6.71(d, *J*=4.4Hz, 1H, H-1), 5.59(dd, 1H, H-3), 5.25(dd, 1H, H-2), 4.56~4.81(m, 3H, H-4, H-5)。M.p.128~129°C。

化合物 viii 的合成: 将化合物 vii (2.2mmol) 溶于乙酸乙酯 (54ml) 中, 搅拌下加入 Et<sub>3</sub>N·3HF (2.08ml, 0.013mmol), 升温至 60°C 搅拌 3h, 70°C 搅拌 1.5h。加入冰盐水 (10ml) 终止反应, 然后用二氯甲烷提取, 有机层合并后依次用盐水、水、饱和碳酸氢钠洗涤, 无水硫酸钠干燥 4h 以上, 减压抽干溶剂得深黄色糖浆。用硅胶漏斗 (5cm×5cm) 纯化 (二氯甲烷洗脱) 得浅黄色糖浆 (86.8%), 粗品在 95% 的乙醇溶液中结晶得白色晶体化合物 viii (66.4%)。<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ ppm: 7.31~8.10 (m, 15H, OBz), 6.71(d, *J*=9.0Hz, 1H, H-1), 5.68(dd, *J*=19.44Hz, 1H, H-3), 5.32(d, *J*=48.2Hz, 1H, H-2), 4.65~4.77(m, 3H, H-4, H-5)。M.p.80~82°C。

化合物 ix 的合成: 将化合物 viii (6.0mmol) 溶解于无水二氯甲烷 (20ml) 中, 加入 HBr-AcOH (45%, V/V, 4.6ml, 25mmol) 的混合溶液, 室温搅拌反应 20h。将混合物蒸干, 用二氯甲烷 (50ml) 溶解剩余物, 并用碳酸氢钠 (3×30ml) 洗涤二氯甲烷溶液, 将二氯甲烷蒸去, 得到糖浆状物。同时, 将保护过的胞嘧啶

(15mmol) 和  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (0.1g) 在 HMDS (30ml) 中氮气保护下回流反应 17h, 减压蒸去溶剂, 得到甲硅烷基化的胞嘧啶。将上述反应中得到的糖浆状物溶于二氯乙烷 (25ml) 中, 加入到甲硅烷基化的胞嘧啶中, 混合物在  $\text{N}_2$  保护下回流反应 15h。用冰终止反应, 用二氯甲烷 ( $3 \times 45\text{ml}$ ) 萃取, 二氯甲烷层依次用饱和碳酸氢钠和盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥。干燥后蒸除溶剂, 得到白色固体, 柱色谱分离 (1% MeOH- $\text{CHCl}_3$ ) 纯化, 得到化合物 ix (71%)。 $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm: 8.07(d,  $J=9.86\text{Hz}$ , 1H), 7.45(d,  $J=9.82\text{Hz}$ , 1H), 7.26~8.10 (m, 10H, OBz), 6.03(d,  $J=9.0\text{Hz}$ , 1H, H-1), 5.64(dd,  $J=19.44\text{Hz}$ , 1H, H-3), 5.26(d,  $J=48.2\text{Hz}$ , 1H, H-2), 4.65~4.77(m, 3H, H-4, H-5)。

化合物 x 的合成: 将化合物 ix (3.60mmol) 溶于饱和的  $\text{NH}_3\text{-CH}_3\text{OH}$  (30ml) 室温搅拌反应 15h。将溶剂蒸干, 所得剩余物通过柱色谱 (15: 1  $\text{CHCl}_3\text{-MeOH}$ ) 纯化, 得到化合物 x (80%)。 $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm: 8.10(d,  $J=9.86\text{Hz}$ , 1H), 7.40(d,  $J=9.82\text{Hz}$ , 1H), 6.03(d,  $J=9.0\text{Hz}$ , 1H, H-1), 5.64(dd,  $J=19.44\text{Hz}$ , 1H, H-3), 5.26(d,  $J=48.2\text{Hz}$ , 1H, H-2), 4.50(m, 1H, H-4), 3.70~3.77(m, 2H, H-5)。

化合物 xi 的合成: 将化合物 x (9.46mmol), 咪唑 (18.93mmol)、三苯基磷 (14.19mmol), 溶解在四氢呋喃 (50ml) 中, 向其中缓慢加入溶解有碘 (14.18mmol) 的四氢呋喃溶液 15ml。室温搅拌反应 3h。蒸除溶剂, 向剩余物中加入乙酸乙酯 (100ml), 过滤。蒸除乙酸乙酯, 剩余物柱色谱分离得到化合物 xi (83.9%)。 $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm: 8.06 (d,  $J=9.86\text{Hz}$ , 1H), 7.43(d,  $J=9.82\text{Hz}$ , 1H), 6.01(d,  $J=9.0\text{Hz}$ , 1H, H-1), 5.66(dd,  $J=19.44\text{Hz}$ , 1H, H-3), 5.22(d,  $J=48.2\text{Hz}$ , 1H, H-2), 4.57(m, 1H, H-4), 3.58~3.69(m, 2H, H-5)。

化合物 xii 的合成: 将化合物 xi (5.88mmol) 溶解在四氢呋喃 (50ml) 中, 向其中加入 DBU (6.44mmol)。在  $60^\circ\text{C}$  搅拌 3h。蒸干溶剂, 剩余物柱色谱分离得到化合物 xii (75.1%)。直接用于下一步反应。

化合物 xiii 的合成: 在  $0^\circ\text{C}$ , 将溶有  $\text{ICl}$  (13.9mmol) 的 15ml DMF 溶液加入到溶有  $\text{NaN}_3$  (9.75mmol) 的 DMF (15ml) 溶液中,  $0^\circ\text{C}$  搅拌 10 分钟, 将溶有化合物 xii (6.8mmol) 的 DMF (20ml) 缓慢加入到上述溶液。 $0^\circ\text{C}$  反应 1 小时。向混合溶液中加入亚硫酸钠, 直到碘的颜色完全消失。减压蒸除溶剂, 剩余物用柱色谱分离纯化, 得到化合物 xii (77.6%)。直接用于下一步反应。

化合物 xiv 的合成: 将化合物 xiii (5mmol) 溶于 DMF(15ml)中, 搅拌下加入醋酸银 (6mmol), 室温反应 8h, 过滤。在减压下移除溶剂 (50°C 以下), 剩余物用柱色谱纯化, 得到化合物 xiv (71.3%)。<sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 300 MHz) δ: 8.12(d, 1H), 7.40(d, 1H), 7.26(br, 2H), 6.12(dd, 1H), 5.87(d, 1H), 5.09(t, 1H), 4.90(dt, 1H), 4.18(dt, 1H), 3.74-3.87(m, 2H), 2.12(s, 3H, CH<sub>3</sub>)。

化合物 xv 的合成: 将化合物 xiv(5mmol)溶于 5%的三乙胺甲醇溶液(100ml)中, 室温搅拌 12h, 蒸除溶剂, 剩余物用柱色谱纯化, 得到化合物 xv (89.0%)。ESI-MS: 287[M+H]。<sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 300 MHz) δ: 8.14(d, 1H), 7.32(d, 1H), 7.21(br, 2H), 6.08(dd, 1H), 5.82(d, 1H), 5.11(t, 1H), 4.92(dt, 1H), 4.16(dt, 1H), 3.62-3.69(m, 2H)。

实施例 2 当 4'-位取代基为炔基, 碱基为 1,6-二氨基嘌呤时化合物 25 的合成

化合物 b 的合成: 取化合物 a (60g), 加入丙酮 (2L), 搅拌条件下慢慢加入浓硫酸 (40ml), 室温下搅拌反应 40 分钟, TLC 检测反应结束, 用浓氨水调节 pH=7~8, 过滤, 减压蒸去大部分丙酮, 剩余丙酮和水约 150ml, 在搅拌条件下加入 0.4%稀盐酸 (150ml), 在丙酮回流条件下反应 20 分钟, 化合物 a 全部水解成化合物 b。用固体 NaHCO<sub>3</sub> 中和反应液至 pH=7~8, 过滤, 滤液在减压下蒸去溶剂, 剩余物用二氯甲烷溶解 (200ml), 用无水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 干燥过夜, 过滤, 蒸去溶剂后, 得到黄色粘稠油状物 b (73g, 95%), ESI-MS: 191[M+H]。

化合物 c 的合成: 将化合物 b (154g, 0.81mol) 和三乙胺 (339ml, 2.43mol) 溶于二氯甲烷 (1.50L) 中, 冰盐浴冷至 0°C, 慢慢滴加对氯苯甲酰氯 (113ml, 0.891mol), 保持 0°C 以下机械搅拌反应 4h, 加入饱和 NaHCO<sub>3</sub> 水溶液 (500ml), 二氯甲烷层用水、饱和食盐水洗涤, 无水 MgSO<sub>4</sub> 干燥, 过滤, 减压蒸去溶剂, 并重结晶剩余物, 得白色晶体化合物 c (196g, 74.6%), ESI-MS: 330[M+H]。

化合物 d 的合成: 化合物 c (0.114mol) 溶解到无水二氯甲烷 (600ml) 中, 在氮气保护下, 加入咪唑 (15.5g, 0.228mol) 和叔丁基二甲基氯化硅 (TBDMSCl) (18.9g, 0.125mol)。室温反应 3h 后, 用 1N 盐酸中和反应, 分出两层, 有机层分别用水和饱和食盐水洗涤后, 用无水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 干燥, 蒸除溶剂, 剩余物通过柱色谱进行分离纯化, 得到化合物 d, 产率 69.2%, ESI-MS: 444[M+H]。

化合物 e 的合成: 化合物 d (0.64mmol) 加入到 0.2N 甲醇钠-甲醇 (15ml)

的混合物液中，室温反应 4h，用稀醋酸中和，过滤，用甲醇洗涤，减压蒸除溶剂，剩余物用柱色谱分离纯化，得化合物 e，产率 75%，ESI-MS: 305[M+H]。

化合物 f 的合成：-60℃下向草酰氯 (3.4ml, 38.7mmol) 的二氯甲烷 (80.0ml) 溶液中逐滴滴加 DMSO (5.5ml, 77.5mmol)，在相同的温度下，搅拌 15 分钟后，滴加化合物 e (25.7mmol) 的二氯甲烷 (100ml) 溶液。在-65℃搅拌反应 30 分钟，加入三乙胺 (10.9ml, 78.2mmol)，室温搅拌反应 30 分钟。反应混合物中加入水，分出有机层，有机层用无水硫酸镁干燥。蒸除溶剂，剩余物用柱色谱分离醇化得化合物 f，产率 94.6%，ESI-MS: 303[M+H]。

化合物 g 的合成：在反应瓶中放入氢氧化钠(1.3g)和水(11.5ml)，搅拌均匀后加入 30%的甲醛水溶液、7.2ml 95%乙醇，然后加入化合物 f (25mmol)。控制反应温度在 30~35℃下搅拌 2h。反应结束后，边搅拌边用冰水冷却反应瓶，直至产物完全析出。抽滤，固体用水洗涤至中性并烘干，所得固体溶解到无水甲醇中，再加入硼氢化钠 (0.925g, 25mmol)，回流反应 1h，用稀盐酸中和反应液，二氯甲烷萃取(3×50ml)，加入无水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 干燥，蒸除溶剂，得化合物 g，产率 90.5%，ESI-MS: 335[M+H]。

化合物 h 的合成：化合物 g (9.7mmol) 溶解到甲醇 (260ml) 中，加入 Dowex H<sup>+</sup> (40ml，事先用甲醇洗涤)，室温反应 4h，将树脂过滤除去，并用甲醇反复洗涤树脂，溶液蒸干得固体。将所得固体溶于丙酮 (200ml) 中，搅拌条件下慢慢加入浓硫酸 (催化量, 2ml)，室温搅拌反应约 0.5h，用浓氨水调节 pH=7~8，过滤，减压蒸去大部分丙酮，再加入 0.4%稀盐酸 (40ml)，丙酮回流条件下反应 20 分钟，用 NaHCO<sub>3</sub> 中和反应液至 pH=7~8，过滤，减压下蒸除溶剂，剩余物用适量二氯甲烷溶解，用无水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 干燥后，蒸去溶剂，得到化合物 h，产率 80.2%，ESI-MS: 261[M+H]。

化合物 i 的合成：-60℃向草酰氯 (3.4ml, 38.7mmol) 的二氯甲烷 (80ml) 溶液中逐滴滴加 DMSO (5.5ml, 77.5mmol)，滴完搅拌 15 分钟后，滴加化合物 h (25.7mmol) 的二氯甲烷 (100ml) 溶液，滴完后-60℃反应 30 分钟，加入三乙胺 (10.9ml, 78.2mmol)，室温反应 30 分钟后加入水终止反应，分出有机层，有机层用无水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 干燥。蒸除溶剂，剩余物用柱色谱分离纯化得固体。将 ClCH<sub>2</sub>P(C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>)<sub>3</sub>Cl (2.15g, 6.19mmol) 加入到无水四氢呋喃 (50ml) 中，冷却到



-78℃, 加入 n-BuLi 的正己烷溶液 (1.6M, 4.0ml) 搅拌反应 1h, 然后加入所得固体 (1.51mmol) 的干燥四氢呋喃溶液 (50ml)。冷却温度逐渐升高到 0℃, 继续反应 3h。小心滴加饱和的 NH<sub>4</sub>Cl 溶液 (10ml), 用乙酸乙酯萃取 (2×100ml), 有机层用盐水洗涤两次 (2×75ml), 最后用无水 MgSO<sub>4</sub> 干燥, 减压蒸除溶剂, 得到的剩余物溶解到无水四氢呋喃 (40ml) 中, 冷却到-78℃, 慢慢滴加 n-BuLi 的正己烷溶液 (1.6M, 20ml)。搅拌反应 2h, 小心地用饱和 NH<sub>4</sub>Cl 溶液 (20ml) 终止反应。有机层用饱和食盐水洗涤, 无水 MgSO<sub>4</sub> 干燥, 减压蒸除溶剂, 剩余物用快速硅胶柱分离纯化, 得化合物 i, 产率 48.5%, ESI-MS: 255[M+H]。

化合物 j 的合成: 将化合物 i (10mmol) 加入到 0.2% 的盐酸溶液 (50ml) 中, 室温搅拌反应 6h, 用固体 NaHCO<sub>3</sub> 中和反应至 pH=7~8, 过滤, 滤液在减压条件下蒸去溶剂, 剩余物用二氯甲烷溶解, 并用无水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 干燥后过滤, 蒸去溶剂, 得化合物 j, 产率 99.0%, ESI-MS: 215[M+H]。

化合物 k 的合成: 将化合物 j (5mmol) 溶解到吡啶 (20ml) 中, 滴加 BzCl (5mmol), 室温反应 6h, 蒸干, 剩余物纯化后得化合物 k, 产率 85.3%, ESI-MS: 319[M+H]。

化合物 l 的合成: 将化合物 k (59.3mmol) 和 2,2,6,6-四甲基哌啶-N-氧 (0.059mmol) 溶于二氯甲烷 (99ml) 中, 冷至 0℃, 将次氯酸钠溶液 (33.6ml, 8.5~13.5%有效氯)、NaHCO<sub>3</sub> (11.2g) 和水 (190ml) 混合溶液加入到反应液, 0℃反应 30 分钟, 加入异丙醇 (1.95ml), 室温反应 10 分钟, 分出的二氯甲烷层用水洗涤 2 次, 无水 MgSO<sub>4</sub> 干燥, 过滤, 蒸去溶剂得到的剩余物进行重结晶, 得到化合物 l, 产率 87.8%, ESI-MS: 317[M+H]。

化合物 m 的合成: 将化合物 k (0.05mol) 加入到无水乙醇 (60ml) 和乙酸乙酯 (30ml) 的混合液中, 冷至 0℃, 分批加入硼氢化钠 (23.3g, 612mmol), 然后在 0℃搅拌反应 1h, 用稀醋酸中和至 pH=7~8, 过滤, 滤液蒸干, 剩余物再用二氯甲烷溶解, 然后水洗, 二氯甲烷层用无水 MgSO<sub>4</sub> 干燥, 过滤, 减压蒸去二氯甲烷, 剩余物用二氯甲烷和石油醚的混合溶剂重结晶, 得到固体物。将所得固体物溶于吡啶中, 在 0℃条件下, 滴加 BzCl (50mmol), 滴加完毕后, 室温反应 3h, 蒸除溶剂, 剩余物用乙酸乙酯萃取, 饱和 NaHCO<sub>3</sub> 溶液洗涤, 无水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 干燥, 过滤, 蒸去溶剂, 剩余物柱色谱分离纯化得化合物 m, 产率 89.7%, ESI-MS:

423[M+H]。

化合物 n 的合成：将化合物 m (4mmol) 溶于甲醇 (22ml) 中，加入 4.0M 的盐酸/二氧六环混合溶液 (20ml)，室温反应 10h，用  $\text{NaHCO}_3$  中和反应液至 pH=7~8，过滤，滤液减压蒸馏除去溶剂，剩余物溶于适量二氯甲烷中，用无水  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  干燥过夜，滤液蒸干，用柱色谱分离纯化得化合物 n，产率 89.5%，ESI-MS: 397[M+H]。

化合物 o 的合成：化合物 n (1.76mmol) 溶解在二氯甲烷中，室温条件下加入 DAST (0.4ml, 3.03mmol) 搅拌 12h，将混合物倒入 10ml 饱和  $\text{NaHCO}_3$  溶液中，分出有机层，并用饱和  $\text{NaHCO}_3$  溶液洗涤，无水  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  干燥，柱色谱分离纯化得到化合物 o，产率 11.5%，ESI-MS: 399[M+H]。

化合物 p 的合成：将化合物 o (10mmol) 加入到 20ml 浓度为 80% 的甲酸溶液中，在室温下搅拌反应 12h，减压蒸去溶剂，剩余物与甲苯共蒸得固体物，将所得固体物溶于干燥吡啶和醋酸酐溶液，室温反应 4h，反应液浓缩后与甲苯共蒸，得到化合物 p，产率 90.3%，ESI-MS: 427[M+H]。 $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta$ : 2.07(s, 3H), 2.85(s, 1H), 4.62-4.77(m, 2H), 4.89-5.07(m, 3H), 7.32-8.17(m, 10H)。

化合物 q 的合成：化合物 p (4.76mmol) 溶于无水二氯甲烷 (40ml) 中，将其冷至 0°C，然后慢慢通 HCl 气体至饱和 (约 3h)，室温下真空蒸去溶剂，剩余物真空干燥 2 小时得到化合物 q，产率 87.1%，化合物 q 直接用于下一步反应。

化合物 r 的合成：2,6-二氨基嘌呤 (4.78mmol) 与六甲基硅氮烷 (HMDS, 9ml) 在  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (50mg) 存在下加热回流至得到透明溶液 (约 5h)，真空下蒸去溶剂得到白色固体，将该固体溶于 1,2-二氯乙烷 (35ml) 中，再加入化合物 q 的 1,2-二氯乙烷溶液 (4.56mmol, 30ml) 及 0.4nm 分子筛 (2.6g)，在氮气保护下室温搅拌 6 天，TLC 检测反应完全后，在反应液中加入二氯甲烷 (80ml)，并且用硅藻土过滤，滤液分别用饱和  $\text{NaHCO}_3$  和食盐水洗涤，有机层用无水  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  干燥过夜，蒸去溶剂得到的剩余物用减压硅胶柱分离得到化合物 r，产率 78.5%，ESI-MS: 517[M+H]。 $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta$ : 2.85(s, 1H), 4.67-4.79(m, 2H), 4.92-5.13(m, 3H), 5.79(br, 1H), 7.32-8.17(m, 9H), 8.35(s, 1H)。

化合物 25 的合成：将化合物 r (3.60mmol) 溶解在饱和的  $\text{NH}_3$ -甲醇溶液 (30ml) 中，室温搅拌反应 15h，蒸除溶剂，剩余物通过柱色谱分离纯化得到化合物 25，

产率 78.9%，ESI-MS: 309[M+H]。<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) δ: 2.85(s, 1H), 3.69-3.79(m, 2H), 4.79-5.07(m, 3H), 5.60(br, 1H), 5.79(br, 1H), 7.32-8.17(m, 4H), 8.35(s, 1H)。

本发明体外抗 HIV 活性实验:

化合物 1、15、19、36、39、46、50、52 在细胞培养内的抗 HIV-1 活性

## 1. 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 药物:

待试药物: 化合物 1、9、15、19、36、39、46、50、52, 无批号, 水不溶, DMSO 可溶解, 实验时用 DMSO 溶解配成适当浓度后用培养基稀释, 立即加入细胞培养。

#### 阳性对照药:

(1)齐多夫定(Zidovudine, AZT) 为临床应用的已知核苷类 HIV-1 逆转录酶抑制剂, 为白色粉末, 购自上海迪赛诺化学制药有限公司, 批号: 040201b,

(2)奈韦拉平(nevirapine, NVP)购自南京泽众医化信息研究中心(批号: 0301001), 为临床应用的已知非核苷类逆转录酶抑制剂。

#### 1.1.2 病毒

HIV-1 IIB 实验病毒株, 为美国 Mount Sinai Medical Center 蒋建东博士赠予, 在 H9 细胞中扩增, -196℃冻存。

#### 1.1.3 细胞

传代人 T 淋巴细胞 MT-4, 为美国科罗拉多大学医学研究中心张兴权教授赠送, 本室传代, -196℃保存。细胞培养基: RPMI Medium 1640 培养基, 加 10% 胎牛血清、100IU/ml 青霉素、100μg/ml 链霉素和卡那霉素及含 L-谷氨酰胺。37℃, 5%CO<sub>2</sub> 培养箱中培养, 每三天传代一次。

#### 1.1.4 主要试剂

RPMI Medium 1640 培养基为美国 GIBCO 公司产品;

胎牛血清(Fetal Bovine Serum)为天津市川页生化制品有限公司产品;

青霉素和链霉素为华北制药厂产品; 卡那霉素为上海旭东海普药业有限公司产品;

四氮唑蓝(Thiazolyl blue, MTT), 柠檬酸为美国 Sigma 公司产品;

Triton X-100 为瑞典 KEBO AB STOCKHOLM 公司产品;

N,N 二甲基甲酰胺(N,N-Dimethyl Formamide)为北京化工厂产品;

HIV-1 P24 抗原检测试剂盒: 用荷兰 BioMerieux 公司产品。

### 1.1.5 主要仪器

Emax™ 酶标仪为美国 MollCular Devices 公司产品;

实验在 3 级生物安全实验室中进行。

### 1.2 实验方法

96 孔培养板, 设药物及阳性对照药抑制病毒实验组, 每孔加入待测药物的不同浓度 DMSO 溶液 100ul 或阳性对照药 AZT 和 NVP 或大鼠口服药物不同剂量组后不同时间取血不同稀释组, 每孔 100ul, 同时设细胞对照和病毒对照组阳性药 AZT 和 NVP 对照组。MT-4 细胞用 100TCID<sub>50</sub> HIV-1 IIIB 感染 1.5 小时后, 用培养基洗涤 1 次后, 配成 2×10<sup>5</sup> 细胞/ml 接种于药物抑制病毒实验组和阳性对照药物组及病毒对照组的 96 孔培养板中。细胞对照组加等量培养液, 培养 4 天后。用显微镜观察细胞病变, 同时用 MTT 染色测定毒性, 上清液按说明书方法测定 P24 抗原。分别计算抑制率、半数有毒浓度 (CC<sub>50</sub>) 和半数有效浓度 (IC<sub>50</sub>) 及 SI。

## 2 结果

### 2.1 化合物 1,9,15,19,36,39,46,50,52 在 MT-4 细胞培养内对 HIV-1 的抑制作用

用 MTT 法测定化合物 1,9,15,19,36,39,46,50,52 对细胞的毒性和抗 HIV-1 活性, 并比较药物用 HIV-1 感染细胞和未感染细胞测定细胞毒性对 CC<sub>50</sub> 和 SI 的影响。结果见表 1。

表 1 化合物 1,9,15,19,36,39,46,50,52 及阳性药物 AZT 和 NVP 在 MT-4 细胞培养内抗 HIV-1 活性

药物	CC <sub>50</sub> (μg/ml)*		IC <sub>50</sub> (μg/ml)	SI	
	感染 HIV	未感染 HIV		感染 HIV	未感染 HIV
AZT	>0.625	>0.625	0.000182	>3434	>3434
NVP	>12.5	>12.5	0.00364	>3434	>3434
1	43.6	40.9	0.101	432	405

9	31.23	30.05	0.162	298	291
15	26.22	23.23	<0.001	>2622	>2323
19	43.8	39.8	0.09	487	422
36	35.12	37.54	0.127	276	296
39	38.26	36.77	1.49	26	25
46	48.52	55.35	0.131	370	423
50	28.3	27.9	2.30	12	12
52	41.3	38.6	0.133	311	290

\*: 细胞毒性: MTT 法

化合物 1、15 和 19 用野生型 HIV-1 复制药理模型进行药理筛选结果

表 2 化合物 1、15 和 19 用野生型 HIV-1 复制药理模型进行药理筛选结果表

化合物	药理模型	细胞	给药途径	剂量(mol/L)	抑制率(%)	溶剂	备注
1	VSVG/HIV-luc	293 细胞	感染前加药	$1 \times 10^{-5}$	99.4±0.3	DMSO	IC <sub>50</sub> : 0.5μM
				$1 \times 10^{-6}$	90±0	DMSO	
				$1 \times 10^{-7}$	28±0	DMSO	
				$1 \times 10^{-8}$	0±3	DMSO	
15	VSVG/HIV-luc	293 细胞	感染前加药	$1 \times 10^{-5}$	100	DMSO	IC <sub>50</sub> : 1.5 nM
				$1 \times 10^{-6}$	100	DMSO	
				$1 \times 10^{-7}$	100	DMSO	
				$1 \times 10^{-8}$	72±6	DMSO	
19	VSVG/HIV-luc	293 细胞	感染前加药	$1 \times 10^{-5}$	92.7±0.9	DMSO	IC <sub>50</sub> : 1μM
				$1 \times 10^{-6}$	48±0	DMSO	
				$1 \times 10^{-7}$	4±1	DMSO	
				$1 \times 10^{-8}$	0±2	DMSO	
AZT	VSVG/HIV-luc	293 细胞	感染前加药	$1 \times 10^{-7}$	97.2±1.1	DMSO	
				$1 \times 10^{-8}$	54.1±2.0	DMSO	
3TC	VSVG/HIV-luc	293 细胞	感染前加药	$1 \times 10^{-6}$	86.3±4.3	DMSO	
				$1 \times 10^{-7}$	50.9±2.4	DMSO	

d4T	VSVG/HIV-luc	293 细胞	感染前加药	$1 \times 10^{-6}$	92.9±1.6	DMSO	
				$1 \times 10^{-7}$	24.0±1.1	DMSO	
EFV	VSVG/HIV-luc	293 细胞	感染前加药	$1 \times 10^{-8}$	100	DMSO	
				$1 \times 10^{-9}$	55.2±0.6	DMSO	
NVP	VSVG/HIV-luc	293 细胞	感染前加药	$1 \times 10^{-7}$	73.1±5.2	DMSO	
				$1 \times 10^{-8}$	18.8±2.8	DMSO	

由表 1 和表 2 可知, 新型 2'-氟-4'-取代-核苷均具有良好的抗 HIV 活性, 尤其化合物 1、化合物 15 和化合物 19 具有很好的应用开发前景。该类化合物的开发, 将为艾滋病患者带来福音。

本发明体外抗 HCV 活性实验

## 1. 材料及方法

### 1.1 细胞培养

HCV 复制细胞(Avva.5)在 Dulbecco's 改进的包含 10%牛胎儿血清和 1mg/mL 的 G418 的 Eagle 介质中培养。293-Sip-L 细胞在 Dulbecco's 改进的含 10%牛胎儿血清和 250  $\mu$ g/mL 的 G418 及 150  $\mu$ g/mL 的潮霉素 B 的 Eagle 介质中培养。

### 1.2 HCV 感染测定方法 (RT-PCR 方法)

用 60mm 直径的 Petri 培养皿中的细胞在包含 100  $\mu$ L 的 HCV 阳性的培养基中培育 12 小时。然后细胞在不包含 HCV 的新鲜介质中培育并且每天更换一次。细胞在感染 7 天后检测 HCV-RNA 时, 细胞需要胰蛋白酶化并用离心法用 Dulbecco's 改进的 Eagle 介质清洗两次。第二次洗涤的上层部分 (作为对照) 和洗过的细胞成对收集来进行 RNA 提取和 RT-PCR 检测。 $\beta$ -肌动蛋白 mRNA 同时测定以做对照。

### 1.3 HCV-RNA 的定量检测

采用全自动 PCR 酶联免疫法来定量测定 HCV-RNA (2.0 版, Roche Diagnostics, Branchburg, NJ)。

## 2. 结果

化合物 17 在 6, 0.6 和 0.06  $\mu$ g/mL 时有抑制效果(见下表)。HCV-RNA 水平用全自动 PCR 酶联免疫法来测定。

	培养液中的化合物 17 的浓度			
	0 $\mu$ g/mL	0.06 $\mu$ g/mL	0.6 $\mu$ g/mL	6 $\mu$ g/mL
实验 1	$5.1 \times 10^2$	$4.9 \times 10^2$	$0.92 \times 10^2$	$1.1 \times 10^2$
实验 2	$4.4 \times 10^2$	$4.1 \times 10^2$	$0.78 \times 10^2$	$0.81 \times 10^2$

由此看来，化合物 17 对 HCV 有较强的抑制作用。