

· 论 文 ·

取代非环核苷混膦酸酯类衍生物的合成及生物活性

欧 瑜¹, 傅晓钟^{2*}, 查雨锋², 张 顺², 苏 航², 董永喜²(¹贵阳市妇幼保健院药剂科, 贵阳 550001; ²贵阳医学院药学院, 民族药与中药开发应用教育部工程研究中心, 贵阳 550004)

摘 要 为寻找抗乙肝病毒(HBV)取代非环核苷混膦酸酯有效的结构优化策略。以阿德福韦单 L-氨基酸酯和单非甾体药物羧酸酯为先导化合物, 结合核苷类似物阿巴卡韦与阿拉莫韦的结构特征, 采用亚结构拼合原理设计并合成了 6-取代嘌呤非环核苷混膦酸单 L-氨基酸酯、单非甾体药物羧酸酯前药(**9a~9l**), 其结构经 ¹H NMR, ESI-MS, ESI-HRMS 确证。采用 HepG2 2.2.15 细胞株、HK-2 细胞株进行了目标化合物抗 HBV 活性以及肾细胞毒性评价。结果表明, 化合物 **9a** 具有较强的抗病毒活性与作用选择性(EC₅₀ 0.48 μmol/L, SI 763.72), 具有较低的肾细胞毒性以及较高的化学与酶学稳定性, 值得进一步深入研究。

关键词 非环核苷混膦酸; 阿巴卡韦; 阿拉莫韦; 非甾体抗炎药; 合成; 抗病毒活性

中图分类号 R914.5; R965 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2014)06-0649-08

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20140605

Synthesis and biological evaluation of mixed phosphonate derivatives of substituted acyclonucleoside phosphonates

OU Yu¹, FU Xiaozhong^{2*}, ZHA Yufeng², ZHANG Shun², SU Hang², DONG Yongxi²

¹Department of Pharmacy, Maternal and Child Health Hospital of Guiyang City, Guiyang 550001; ²Engineering Research Center for the Development and Application of Ethnic Medicine and TCM(Ministry of Education), School of Pharmacy, Guiyang Medical College, Guiyang 550004, China

Abstract In order to find structural optimization strategy for substituted mixed phosphonates of acyclonucleoside phosphonates, mono L-amino acid ester, mono NSAID carboxylic ester prodrugs of adefovir was used as lead compound. Based on the structural features of abacavir and alamifovir, *sub*-structure combination method was used to introduce substituted phenylthio or amino fragments at 6-position of purine ring. Therefore, purine ring substituted acyclonucleoside phosphonate mixed phosphonate ester derivatives(**9a-9l**) were designed and synthesized, and their structures were confirmed by ¹H NMR, ESI-MS, and ESI-HRMS. HepG2.2.2.15 and HK-2 cell line were used for *in vitro* anti-HBV activity and renal cell toxicity evaluation models, respectively. Several compounds exhibited anti-HBV activity, of which compound **9a** displayed the most potent antiviral activity with higher selectivity index (EC₅₀ 0.48 μmol/L, SI 763.72), lower renal cell toxicity, and higher chemical and enzymatic stability, making it a potential anti-HBV candidate for further investigation.

Key words acyclonucleoside phosphonate; abacavir; alamifovir; non-steroidal anti-inflammatory drugs; synthesis; antiviral activity

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81460523); the Excellent Youth Scientific Talents Foundation of Guizhou Province (No. 2013-45) and Projects of Guizhou Science and Technology Department (No. 2013-3031)

基于作用机制的药物设计是发现先导化合物的有效途径, 对其结构优化是促其向成药性发展的

关键环节^[1]。阿德福韦酯(adeфовir dipivoxil)是目前用于临床的抗乙肝病毒非环核苷混膦酸类药物, 该

* 收稿日期 2014-08-14 * 通信作者 Tel:0851-6908568 E-mail:xiaozhong_fu@sohu.com

基金项目 国家自然科学基金资助项目(No. 81460523); 贵州省优秀青年科技人才培养对象专项基金资助项目(No. 2013-45); 贵州省社会发展攻关计划项目资助(No. 2013-3031)

药物对拉米夫定 (lamivudine)、泛昔洛维 (famciclovir) 以及恩曲他滨 (emtricitabine) 耐药的乙肝病毒 (HBV) 具有较好的抑制作用^[2], 但是 adefovir dipivoxil 临床应用中出现的剂量依赖性肾毒性以及原药释放过程中产生的毒性载体基团使其临床使用受到较大的限制^[3-4]。前期研究中, 发现核苷 L-氨基酸酯前药能借助于小肠黏膜上皮细胞寡肽转运体 1 (hPepT1) 介导的主动转运机制提高被修饰药物口服生物利用度, 以及非甾体抗炎药 (NSAIDs) 能通过有效抑制肾小管基底膜上的有机阴离子转运体 1 (hOAT1) 介导的阿德福韦磷酸双负离子跨肾小管基底膜转运过程, 从而降低后者产生的肾细胞毒性的研究报道^[5-6], 设计、合成了一系列具有较低肾细胞毒性与较高抗 HBV 活性的阿德福韦单 L-氨基酸酯、单非甾体药物羧酸酯前药^[7]。研究结果提示, 该前药设计策略对于提高阿德福韦抗病毒活性、降低其肾细胞毒性具有潜在应用价值。

阿巴卡韦 (abacavir) 与阿拉莫韦 (alamifovir) 分别是由 GSK 公司与 Mitsubishi-Lilly 公司研制的上市及进入 II 期临床的抗病毒药物。研究发现两者结构中嘌呤环 6-位上具有的环丙胺基与 4-甲氧苯硫基, 在体内能分别通过氧化脱氨与氧-去甲基化代谢转化为其活性代谢产物, 从而使得两种药物具有明显高于其原形结构的抗病毒效果^[8-9]。

为探索取代嘌呤环结构的改变能否适用于抗 HBV 非环核苷磷酸类化合物的结构修饰, 以期发现具有较强抗病毒活性与较低肾细胞毒性的新型抗 HBV 非环核苷磷酸前药, 以阿德福韦单 L-氨基酸酯、单非甾体药物羧酸酯为先导化合物, 结合具有较高抗病毒活性的阿巴卡韦 (abacavir) 与阿拉莫韦 (alamifovir) 的结构特征, 应用药物设计上的亚结构拼合原理 (sub-structure combination method), 设计、合成了 6-取代嘌呤非环核苷磷酸单 L-氨基酸酯和单非甾体药物羧酸酯前药 (图 1)。

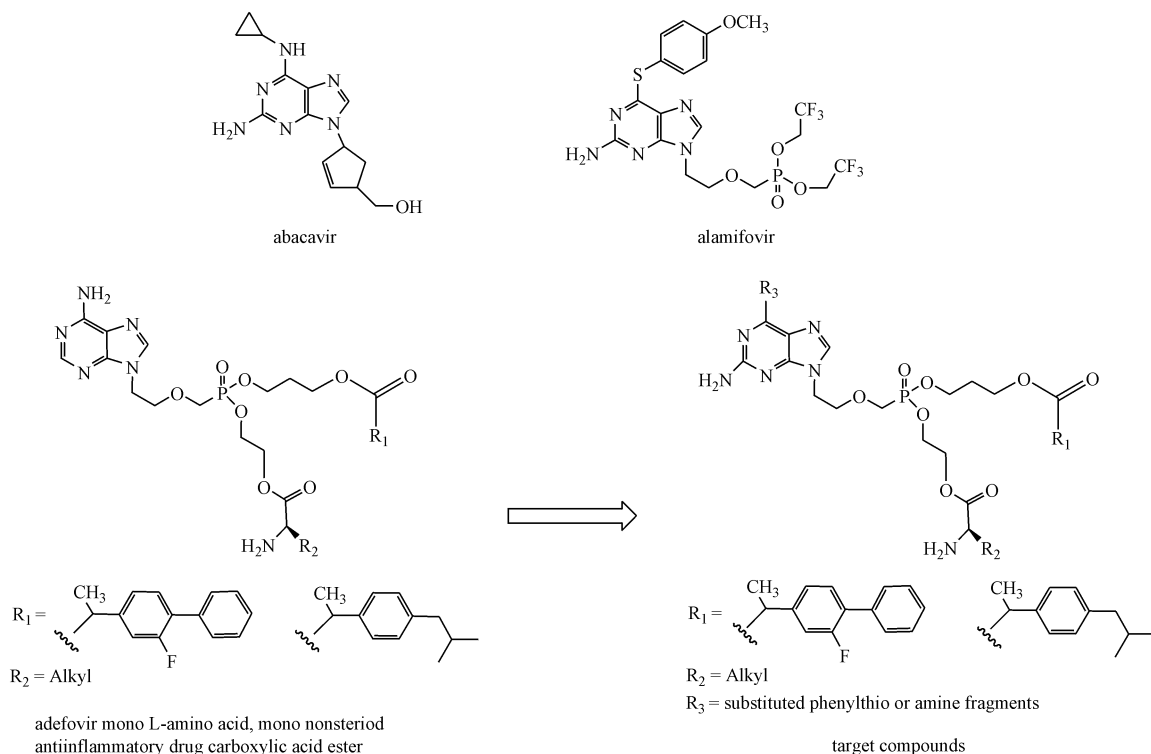


Figure 1 Designed the target compounds as anti-HBV agents

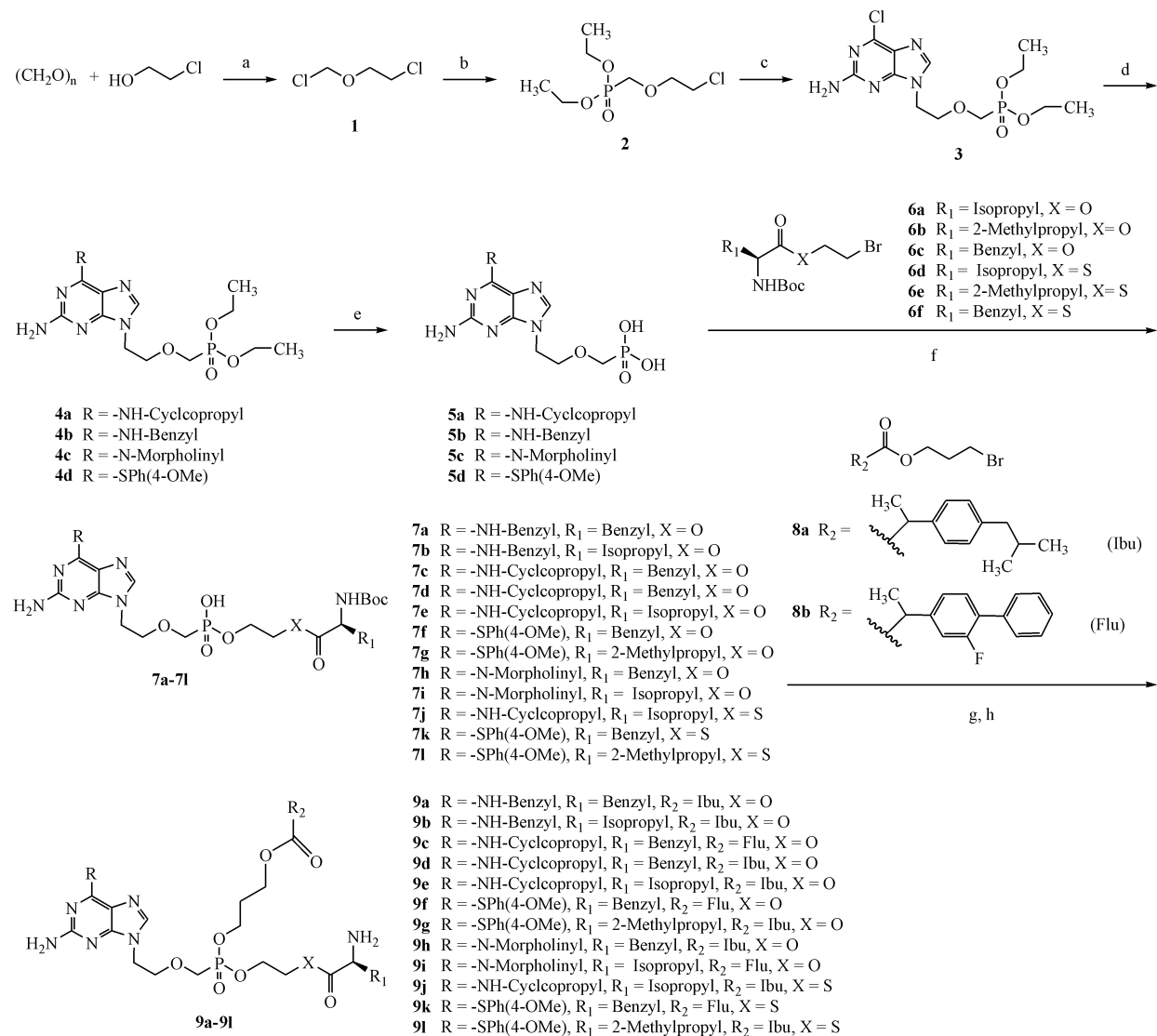
通过对 HepG2 2.2.15 细胞系分泌的 HBV-DNA 的抑制作用, 评价设计化合物抗 HBV 活性与细胞毒性; 通过比较化合物作用 HK-2 细胞后的细胞活力及 LDH 释放率, 评价目标化合物肾细

胞毒性, 同时评价了目标化合物的体外稳定性。目标化合物的结构鉴定数据与药理活性实验结果见表 1~4。

1 目标化合物合成路线

成路线参见合成路线1。

目标化合物合成参考文献[10]报道方法,合

**Scheme 1** Synthetic route of the target compounds **9a-9l**

Reagents and conditions: (a) HCl (gas), 0 °C-r. t., 12 h; (b) triethyl phosphate, 110 °C, 7 h; (c) 2-amino-6-chloropurine, Cs₂CO₃, anhydrous DMF, 80 °C, 12 h; (d) substituted arylthiol, cyclopropylamine, benzylamine or morpholine, Et₃N, anhydrous DMF, 80-100 °C; (e) (CH₃)₃SiBr, 80 °C, 12 h; (f) *N,N*-dicyclohexyl-4-morpholine carboxamidate (DCMC), anhydrous DMF, 60 °C, 24 h; (g) DCMC, anhydrous DMF, 80-90 °C, 48 h; (h) 85% H₃PO₄/CHCl₃ r. t., 6 h

2 合成实验

核磁共振光谱采用 Varian Mercury 400 型核磁共振仪测定, TMS 内标; 质谱用 Hewlett-Packard 公司 LC-MSD 型高效液相色谱-质谱联用仪测定; 高分辨质谱采用傅里叶变换离子回旋共振质谱仪、FT-ICRMS 高分辨质谱仪 (APEX II, Bruker) 测定; 分离用硅胶为 200 ~ 300 目, 其余试剂为分析纯。

N-Boc L-(硫代)氨基酸-2-溴乙基酯, 布洛芬/氟比洛芬-3-溴-1-丙基酯参考文献[11]报道方法合成。

2.1 2-氯乙基-氯甲基酯(**1**)

将多聚甲醛 (6.3 g, 210 mmol) 与氯乙醇 (16 g, 200 mmol) 置于干燥三颈瓶内, 体系升温至 40 °C 至多聚甲醛溶散后置于冰浴 (-5 ~ 0 °C) 条件下, 通入干燥氯化氢气体至体系澄清后, 静置分取有机层, 无水 MgSO₄ 干燥、滤过, 所得物经常压蒸馏, 收集沸点为 147 °C 馏分, 得到无色透明液体 17 g, 收率: 66.3%。¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ: 5.54 (s,

2H), 3.95 (t, *J* = 10.8 Hz, 2H), 3.68 (t, *J* = 11.2 Hz, 2H)。ESI- MS(*m/z*): 128.3, 130.3 [M + H]⁺。

2.2 2-氯乙氧甲基膦酸二乙酯(2)

将2-氯乙基-氯甲基醚(13 g, 101 mmol)加入干燥三颈瓶中,滴入亚磷酸三乙酯(17.1 g, 103 mmol),体系加热至110℃,反应8 h后停止反应,自然冷却至室温,减压蒸馏,收集132~134℃/13 Pa馏分,得无色透明液体20.09 g,收率:86%。¹H NMR(CDCl₃, 400 MHz) δ: 4.18 (q, *J* = 6.8 Hz, 4H), 3.85 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 3.80 (t, *J* = 9.6 Hz, 2H), 3.65 (t, *J* = 9.6 Hz, 2H), 1.36 (t, *J* = 7.2 Hz, 6H)。ESI- MS(*m/z*): 231.1, 233.1 [M + H]⁺。

2.3 2-氨基-6-氯-9-[2-(二乙氧基膦酰甲氧基)乙基]嘌呤(3)

将2-氨基-6-氯嘌呤(3 g, 17.7 mmol), Cs₂CO₃(2.88 g, 8.8 mmol)以及化合物(2)(4.9 g, 21.3 mmol)加入干燥*N,N*-二甲基甲酰胺(DMF)60 mL中, N₂保护下体系搅拌下加热至105℃,反应至TLC检测反应进行完全后,体系冷却至室温,过滤沉淀,滤液减压蒸出溶剂,残余物硅胶柱色谱分离纯化(洗脱剂:乙酸乙酯-甲醇, 20:1),得油状目标物5.03 g,收率:78.3%。所得物用乙酸乙酯-乙醚-石油醚(1:2:1)结晶,得无色粒状晶体, mp: 108~110℃。¹H NMR(CDCl₃, 400 MHz) δ: 7.91 (s, 1H), 5.33 (br, 2H), 4.30 (t, *J* = 10.0 Hz, 2H), 4.11 (m, 4H), 3.92 (t, *J* = 10.0 Hz, 2H), 3.81 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 1.30 (t, *J* = 14.0 Hz, 6H)。ESI- MS(*m/z*): 364.6 [M + H]⁺。

2.4 2-氨基-6-苄胺基-9-[2-(膦酰甲氧基)乙基]嘌呤二乙酯(4a)

将化合物3(0.1 g, 0.257 mmol)加入无水乙醇20 mL中搅拌至溶液澄清后,加入苄胺(0.239 g, 2.57 mmol), N₂保护下体系回流反应6 h,反应毕,体系减压蒸出溶剂,残余物中加入乙酸乙酯40 mL搅拌30 min,过滤,滤液蒸干后残余物硅胶柱色谱分离纯化(洗脱剂:乙酸乙酯-甲醇, 15:1),得类白色固体0.093 g,收率81.5%。mp: 152~154℃。¹H NMR(CDCl₃, 400 MHz) δ: 7.59 (s, 1H), 7.38~7.27 (m, 5H), 5.97 (br, 1H), 4.77 (br, 2H), 4.24 (t, *J* = 9.6 Hz, 2H),

4.10 (m, 4H), 3.89 (t, *J* = 9.6 Hz, 2H), 3.79 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 1.96 (br, 2H), 1.30 (t, *J* = 14.0 Hz, 6H)。ESI- MS(*m/z*): 435.1 [M + H]⁺。

2.5 2-氨基-6-苄胺基-9-[2-(膦酰甲氧基)乙基]嘌呤(5a)

将化合物4a(1 g, 2.3 mmol)加入乙腈60 mL搅拌溶解完全后,加入三甲基溴硅烷(2.13 mL, 16.1 mmol), N₂保护下体系回流反应9 h,反应毕,减压蒸出溶剂,残余物用乙酸乙酯超声洗涤两次,离心得到类白色固体,向该固体中加入蒸馏水5 mL搅拌至溶解,后将体系置于冰浴条件下,搅拌下加入丙酮至有大量白色固体析出,将上清液吸出,固体物质再用丙酮洗涤2~3次,蒸出溶剂得到白色固体0.66 g,收率:76%, mp 236~238℃。¹H NMR(DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ: 7.81 (s, 1H), 7.33~7.17 (m, 5H), 5.85 (br, 1H), 4.62 (br, 2H), 4.09 (t, *J* = 9.6 Hz, 2H), 3.71 (t, *J* = 9.6 Hz, 2H), 3.69 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H)。ESI- MS(*m/z*): 379.2 [M + H]⁺。

2.6 9-[2-(膦酰基甲氧基)乙基]-2-苄氨基-6-取代嘌呤单L-氨基酸酯, 单非甾体药物羧酸酯(9a~9l)的合成通法

干燥反应瓶中加入中间体5a~5d(0.476 mmol), 二环己基4-吗啉基-脒(DCMC)(0.273 g, 0.952 mmol), DMF 25 mL,搅拌溶解后滴加中间体6(1.41 mmol)的DMF溶液10 mL, N₂保护下,控制温度在60℃反应24 h。TLC监测反应至单酯点(7a~7l)转化充分并且体系中原料最少时,向体系中加入中间体8a~8b(0.952 mmol),控制温度在80~90℃反应48 h, TLC监测发现双酯点再无明显增多后,减压蒸除溶剂,残余物加入乙酸乙酯50 mL,冰箱内(4~6℃)冷藏静置12 h。过滤,滤液依次以1% HCl、饱和NaCl溶液洗涤、无水Na₂SO₄干燥。过滤,减压蒸除溶剂,残余物硅胶柱色谱分离纯化(洗脱剂:乙酸乙酯-甲醇, 15:1),将所得物溶于氯仿,搅拌下滴加85% H₃PO₄至有大量气泡产生,室温剧烈搅拌下反应6 h。反应毕,加水稀释后,用10% NaOH溶液调节pH 6.5~7.0,氯仿萃取3次,合并氯仿层,无水MgSO₄干燥,过滤,减压蒸除溶剂,残余物硅胶柱色谱分离纯化(洗脱剂:乙酸乙酯-甲醇, 10:1),得无色油状目标产物,合成的12个目标化合物的收率、核磁共振氢谱及质谱数据见表1。

Table 1 Yields, ¹H NMR and MS data of target compounds 9a-9l

Compd.	Total yield/ %	¹ H NMR (CDCl ₃ , 400 MHz) δ	ESI-MS (<i>m/z</i>)	HR-MS Calcd. (Found)
9a	4.1	7.56(s, 1H, 8-H), 7.32-7.20(m, 10H, Ar-H), 7.18(d, <i>J</i> = 7.2 Hz, 2H, Ar-H), 7.09(d, <i>J</i> = 8.0 Hz, 2H, Ar-H), 4.77(br. s, 2H, NH ₂), 4.28-3.99(m, 11H, NCH ₂ , 2 × CH ₂ OCO, 2 × P(O)OCH ₂ , CHNH ₂), 3.84-3.68(m, 7H, CH ₂ O, OCH ₂ P, NHCH ₂ , NHCH ₂), 3.09-3.05(m, 1H, CH ₂ [1H] Ar), 2.90-2.84(m, 1H, CH ₂ [1H] Ar), 2.43(d, <i>J</i> = 7.2 Hz, 2H, CH ₂ CH), 1.92-1.79(m, 3H, CH(CH ₃) ₂ , CH ₂ CH ₂ O), 1.47(d, <i>J</i> = 7.2 Hz, 3H, CHCH ₃), 0.88(d, <i>J</i> = 6.4 Hz, 6H, 2 × CH ₃)	816.38 [M + H] ⁺	816.385 0(816.3834) C ₄₂ H ₅₅ N ₇ O ₈ P [M + H] ⁺

(Continued)

Compd.	Total yield/ %	¹ H NMR (CDCl ₃ , 400 MHz) δ	ESI-MS (<i>m/z</i>)	HR-MS Calcd. (Found)
9b	8. 9	7. 52(s, 1H, 8-H), 7. 39-7. 37 (m, 2H, Ar-H), 7. 33-7. 30 (m, 3H, Ar-H), 7. 19 (d, <i>J</i> = 8. 0 Hz, 2H, Ar-H), 7. 09 (d, <i>J</i> = 8. 0 Hz, 2H, Ar-H), 4. 78 (br. s, 2H, NH ₂), 4. 28-4. 11 (m, 11H, NCH ₂ , 2 × CH ₂ OCO, 2 × P(O)OCH ₂ , CHNH ₂), 4. 04-3. 99 (m, 2H, CH ₂ O), 3. 86-3. 83 (m, 2H, OCH ₂ P), 3. 76-3. 65 (m, 3H, NHCH ₂ , NHCH ₂), 2. 43 (d, <i>J</i> = 7. 2 Hz, 2H, CH ₂ CH), 2. 05-2. 01 (m, 1H, CH(CH ₃) ₂), 1. 96-1. 92 (m, 2H, CH ₂ CH ₂ O), 1. 50 (d, <i>J</i> = 7. 2 Hz, 3H, CHCH ₃), 0. 96 (d, <i>J</i> = 7. 2 Hz, 3H, CHCH ₃), 0. 90-0. 87 (m, 9H, 3 × CH ₃)	768. 38 [M + H] ⁺	768. 384 4 (768. 385 9) C ₃₈ H ₅₅ N ₇ O ₈ P [M + H] ⁺
9c	15. 2	7. 56(s, 1H, 8-H), 7. 53-7. 51 (m, 2H, Ar-H), 7. 45-7. 33 (m, 4H, Ar-H), 7. 31-7. 21 (m, 3H, Ar-H), 7. 20-7. 09 (m, 4H, Ar-H), 4. 91 (br. s, 2H, NH ₂), 4. 29-4. 01 (m, 10H, NCH ₂ , 2 × P(O)OCH ₂ , 2 × CH ₂ OCO), 3. 83-3. 70 (m, 5H, CH ₂ O, CHNH ₂ , OCH ₂ P), 3. 10-3. 07 (m, 1H, CH ₂ [1H] Ar), 2. 90-2. 85 (m, 1H, CH ₂ [1H] Ar), 1. 94-1. 89 (m, 2H, CH ₂ CH ₂ O), 1. 48 (d, <i>J</i> = 7. 2 Hz, 3H, CHCH ₃), 1. 25 (m, 1H, NHCH), 0. 86 (m, 2H, CHCH ₂), 0. 62-0. 59 (m, 2H, CHCH ₂)	804. 32 [M + H] ⁺	804. 328 1 (804. 3243) C ₄₀ H ₄₈ FN ₇ O ₈ P [M + H] ⁺
9d	9. 8	7. 56(s, 1H, 8-H), 7. 31-7. 21 (m, 5H, Ar-H), 7. 19 (d, <i>J</i> = 8. 4 Hz, 2H, Ar-H), 7. 09 (d, <i>J</i> = 8. 0 Hz, 2H, Ar-H), 5. 38 (br. s, 2H, NH ₂), 4. 29-4. 01 (m, 10H, NCH ₂ , 2 × P(O)OCH ₂ , 2 × CH ₂ OCO), 3. 89-3. 70 (m, 5H, CH ₂ O, CHNH ₂ , OCH ₂ P), 3. 14-3. 02 (m, 1H, CH ₂ [1H] Ar), 3. 00-2. 96 (m, 1H, CH ₂ [1H] Ar), 2. 43 (d, <i>J</i> = 7. 2 Hz, 2H, CH ₂ CH), 2. 02-1. 81 (m, 3H, CH ₂ CH ₂ O, CH(CH ₃)), 1. 48 (d, <i>J</i> = 7. 2 Hz, 3H, CHCH ₃), 0. 94-0. 92 (m, 2H, CHCH ₂), 0. 89 (d, <i>J</i> = 6. 8 Hz, 6H, 2 × CH ₃), 0. 66-0. 60 (m, 2H, CHCH ₂)	766. 36 [M + H] ⁺	766. 368 8 (766. 366 1) C ₃₈ H ₅₃ N ₇ O ₈ P [M + H] ⁺
9e	10. 6	7. 54(s, 1H, 8-H), 7. 19 (d, <i>J</i> = 8. 0 Hz, 2H, Ar-H), 7. 09 (d, <i>J</i> = 8. 4 Hz, 2H, Ar-H), 4. 87 (br. s, 2H, NH ₂), 4. 27-4. 11 (m, 10H, NCH ₂ , 2 × P(O)OCH ₂ , 2 × CH ₂ OCO), 4. 05-4. 00 (m, 2H, CH ₂ O), 3. 85-3. 80 (m, 2H, OCH ₂ P), 3. 75-3. 67 (m, 3H, CHNH ₂ , NHCH, CHCH ₃), 2. 44 (d, <i>J</i> = 7. 2 Hz, 2H, CH ₂ CH), 1. 91-1. 79 (m, 3H, CH ₂ CH ₂ O, CH(CH ₃)), 1. 48 (d, <i>J</i> = 7. 2 Hz, 3H, CHCH ₃), 0. 89 (d, <i>J</i> = 6. 4 Hz, 12H, 4 × CH ₃), 0. 86-0. 83 (m, 2H, CHCH ₂), 0. 64-0. 60 (m, 2H, CHCH ₂)	718. 36 [M + H] ⁺	718. 368 8 (718. 3659) C ₃₄ H ₅₃ N ₇ O ₈ P [M + H] ⁺
9f	17. 8	7. 73(s, 1H, 8-H), 7. 53-7. 49 (m, 4H, Ar-H), 7. 44-7. 34 (m, 4H, Ar-H), 7. 30-7. 09 (m, 7H, Ar-H), 6. 94 (d, <i>J</i> = 8. 0 Hz, 2H, Ar-H), 4. 86 (br. s, 2H, NH ₂), 4. 29-4. 01 (m, 10H, NCH ₂ , 2 × P(O)OCH ₂ , 2 × CH ₂ OCO), 4. 01-3. 71 (m, 9H, OCH ₂ , OCH ₃ , OCH ₂ P, CHNH ₂ , CHCH ₃), 3. 11-3. 06 (m, 1H, CH ₂ [1H] Ar), 2. 91-2. 86 (m, 1H, CH ₂ [1H] Ar), 1. 96-1. 90 (m, 2H, CH ₂ CH ₂ O), 1. 53 (d, <i>J</i> = 7. 2 Hz, 3H, CHCH ₃)	887. 29 [M + H] ⁺	887. 2998 (887. 2967) C ₄₄ H ₄₉ FN ₆ O ₉ PS [M + H] ⁺
9g	9. 08	7. 57(s, 1H, 8-H), 7. 54 (d, <i>J</i> = 8. 8 Hz, 2H, Ar-H), 7. 19 (d, <i>J</i> = 8. 0 Hz, 2H, Ar-H), 7. 08 (d, <i>J</i> = 7. 6 Hz, 2H, Ar-H), 6. 96 (d, <i>J</i> = 8. 8 Hz, 2H, Ar-H), 4. 80 (br. s, 2H, NH ₂), 4. 28-4. 14 (m, 8H, NCH ₂ , 2 × P(O)OCH ₂ , CH ₂ OCO), 4. 04-4. 03 (m, 2H, CH ₂ OCO), 3. 84-3. 69 (m, 5H, OCH ₃ , OCH ₂ P), 3. 72-3. 67 (m, 2H, CHNH ₂ , CHCH ₃), 2. 42 (d, <i>J</i> = 7. 2 Hz, 2H, CH ₂ CH), 1. 95-1. 92 (m, 2H, CH ₂ CH ₂ O), 1. 85-1. 75 (m, 3H, CH ₂ CH, CH(CH ₃) ₂), 1. 55-1. 52 (m, 4H, CHCH ₃ , CH(CH ₃) ₂), 0. 94-0. 87 (m, 12H, 2 × CH ₃)	815. 35 [M + H] ⁺	815. 356 2 (815. 354 1) C ₃₉ H ₅₆ N ₆ O ₉ PS [M + H] ⁺
9h	6. 9	7. 54(s, 1H, 8-H), 7. 30 (d, <i>J</i> = 8. 0 Hz, 2H, Ar-H), 7. 24-7. 16 (m, 5H), 7. 08 (d, <i>J</i> = 8. 0 Hz, 2H, Ar-H), 4. 71 (br. s, 2H, NH ₂), 4. 26-4. 09 (m, 11H, NCH ₂ , 2 × CH ₂ OCO, 2 × P(O)OCH ₂ , CHNH ₂), 4. 05-4. 01 (m, 2H, CH ₂ O), 3. 85-3. 83 (m, 2H, OCH ₂ P), 3. 79-3. 72 (m, 8H, 2 × NCH ₂ , 2 × OCH ₂), 3. 11-3. 08 (m, 1H, CH ₂ [1H] Ar), 2. 92-2. 88 (m, 1H, NH ₂ CHCH ₂ [1H] Ar), 2. 90 (d, <i>J</i> = 8. 0 Hz, 2H, CH ₂ CH), 1. 91-1. 88 (m, 2H, CH ₂ CH ₂ O), 1. 84-1. 81 (m, 1H, CH(CH ₃) ₂), 1. 47 (d, <i>J</i> = 7. 2 Hz, 3H, CHCH ₃), 0. 89 (d, <i>J</i> = 6. 4 Hz, 6H, 2 × CH ₃)	796. 37 [M + H] ⁺	796. 3793 (796. 3814) C ₃₉ H ₅₅ N ₇ O ₉ P [M + H] ⁺

(Continued)

Compd.	Total yield/ %	¹ H NMR (CDCl ₃ , 400 MHz) δ	ESI-MS (<i>m/z</i>)	HR-MS Calcd. (Found)
9i	15. 8	7. 55-7. 51 (m, 3H, 8-H, Ar-H), 7. 39-7. 34 (m, 4H, Ar-H), 7. 15-7. 09 (m, 2H, Ar-H), 4. 71 (br. s, 2H, NH ₂), 4. 27-4. 15 (m, 11H, NCH ₂ , 2 × CH ₂ OCO, 2 × P(O)OCH ₂ , CHNH ₂), 4. 08-4. 03 (m, 2H, CH ₂ O), 3. 86-3. 82 (m, 2H, OCH ₂ P), 3. 79-3. 72 (m, 8H, 2 × NCH ₂ , 2 × OCH ₂), 2. 04-2. 02 (m, 1H, CH(CH ₃) ₂), 1. 97-1. 92 (m, 2H, CH ₂ CH ₂ O), 1. 55 (d, <i>J</i> = 7. 2 Hz, 3H, CHCH ₃), 0. 97 (d, <i>J</i> = 6. 8 Hz, 3H, CH ₃), 0. 91 (d, <i>J</i> = 6. 8 Hz, 3H, CH ₃)	784. 35 [M + H] ⁺	786. 338 6 (786. 3362) C ₃₇ H ₅₀ FN ₇ O ₉ P [M + H] ⁺
9j	10. 7	7. 59 (s, 1H, 8-H), 7. 29 (d, <i>J</i> = 8. 0 Hz, 2H, Ar-H), 7. 09 (d, <i>J</i> = 7. 6 Hz, 2H, Ar-H), 6. 08 (br. s, 2H, purine-NH ₂), 4. 35 (m, 2H, NCH ₂), 4. 12-4. 09 (m, 2H, CH ₂ OCO), 4. 06-4. 01 (m, 4H, 2 × P(O)OCH ₂ CH ₂), 3. 92-3. 89 (m, 2H, NCH ₂ CH ₂ O), 3. 74-3. 67 (m, 3H, OCH ₂ P, COCHCH ₃), 3. 36 (d, <i>J</i> = 4. 8 Hz, 1H, CHNH ₂), 2. 91-2. 87 (m, 2H, CH ₂ SCO), 2. 45 (d, <i>J</i> = 7. 2 Hz, 2H, ArCH ₂ CH), 2. 12-2. 07 (m, 5H, 2 × CH ₂ CH ₂ CH ₂ O, CH(CH ₃) ₂), 1. 48 (d, <i>J</i> = 6. 8 Hz, 3H, COCHCH ₃), 0. 97 (d, <i>J</i> = 6. 8 Hz, 3H, NH ₂ CHCH ₃), 0. 91-0. 87 (m, 9H, NH ₂ CHCH ₃ , 2 × CH(CH ₃) ₂), 0. 86-0. 83 (m, 2H, CHCH ₂), 0. 62-0. 59 (m, 2H, CHCH ₂)	733. 33 [M + H] ⁺	733. 338 7 (733. 332 9) C ₃₄ H ₅₂ N ₇ O ₇ PS [M + H] ⁺
9k	13. 6	7. 78 (s, 1H, 8-H), 7. 54 (d, <i>J</i> = 8. 8 Hz, 2H, Ar-H), 7. 53-7. 51 (m, 2H, Ar-H), 7. 45-7. 34 (m, 3H, Ar-H), 7. 32-7. 24 (m, 4H, Ar-H), 7. 22-7. 20 (m, 4H, Ar-H), 6. 96 (d, <i>J</i> = 8. 8 Hz, 2H, Ar-H), 5. 76 (br. s, 2H, purine-NH ₂), 4. 39-4. 37 (m, 2H, NCH ₂), 4. 23-4. 20 (m, 2H, CH ₂ CH ₂ O), 4. 17-4. 13 (m, 4H, 2 × OPOCH ₂ CH ₂), 4. 08-4. 03 (m, 2H, CH ₂ OCO), 3. 88-3. 74 (m, 4H, OCH ₂ P, NCH ₂ CH ₂), 3. 46 (m, 1H, CHNH ₂), 3. 15-3. 11 (m, 1H, NH ₂ CHCH ₂ [1H]Ar), 2. 89-2. 85 (m, 2H, CH ₂ SCO), 2. 80-2. 74 (m, 1H, NH ₂ CHCH ₂ [1H]Ar), 1. 98-1. 91 (m, 2H, CH ₂ CH ₂ O), 1. 54 (d, <i>J</i> = 7. 2 Hz, 3H, COCHCH ₃)	903. 27 [M + H] ⁺	903. 276 9 (903. 2794) C ₄₄ H ₄₉ FN ₆ O ₈ PS ₂ [M + H] ⁺
9l	9. 4	7. 57 (s, 1H, 8-H), 7. 54 (d, <i>J</i> = 8. 8 Hz, 2H, Ar-H), 7. 19 (d, <i>J</i> = 8. 0 Hz, 2H, Ar-H), 7. 08 (d, <i>J</i> = 7. 6 Hz, 2H, Ar-H), 6. 97 (d, <i>J</i> = 8. 8 Hz, 2H, Ar-H), 5. 82 (br. s, 2H, purine-NH ₂), 4. 38 (m, 2H, NCH ₂), 4. 17-4. 12 (m, 2H, CH ₂ OCO), 4. 09-4. 03 (m, 4H, 2 × P(O)OCH ₂ CH ₂), 3. 92-3. 89 (m, 2H, NCH ₂ CH ₂ O), 3. 77-3. 68 (m, 3H, OCH ₂ P, COCHCH ₃), 3. 39 (d, <i>J</i> = 4. 8 Hz, 1H, CHNH ₂), 2. 93-2. 89 (m, 2H, CH ₂ SCO), 2. 43 (d, <i>J</i> = 7. 2 Hz, 2H, ArCH ₂ CH), 1. 92-1. 79 (m, 3H, CH ₂ CH ₂ O, CH(CH ₃) ₂), 1. 84-1. 75 (m, 3H, CH ₂ CH, CH(CH ₃) ₂), 1. 55-1. 52 (m, 4H, CHCH ₃ , CH(CH ₃) ₂), 0. 96-0. 87 (m, 12H, 4 × CH ₃)	831. 33 [M + H] ⁺	831. 333 3 (831. 337 9) C ₃₉ H ₅₆ N ₆ O ₈ PS ₂ [M + H] ⁺

3 活性评价

3.1 抗 HBV 活性评价

参考文献[12]方法,将 HepG2. 2. 15 细胞消化为单个细胞悬液,计数后调整细胞浓度为每毫升 5×10^4 个细胞加入 96 孔培养板中,每孔 100 μL,置 37 ℃,5% CO₂ 细胞培养箱中培养过夜。第 2 天吸弃上清液,加入含有不同药物浓度(1 000,100,10 和 0 mol/L)的 DMEM 培养基,每组 3 复孔。放入培养箱中继续培养,48 h 后弃上清液,各孔加入培养液(含 10 LCCK-8 试剂)100 μL 并继续培养 2 h,用酶标仪检测 450 nm 处各孔的吸收度,计算化合物对细胞的半数毒性浓度(CC₅₀)。将 HepG2. 2. 15 细胞消

化为单个细胞悬液,调整细胞密度为每毫升 2×10^4 个,接种于 96 孔板(每孔 100 μL),37 ℃,5% CO₂ 培养箱培养过夜。第 2 天吸弃上清液,加入含有不同药物浓度(10,1,0. 1 和 0 mol/L)的 DMEM 培养基,每组 3 复孔。每次作用 2 d 后换同样药物浓度的细胞培养液,并于第 10 天,收集各孔上清液至 1. 5 mL 离心管中,-20 ℃冻存备用。取待测样品 100 μL,用 HBV 荧光定量 PCR 试剂盒测定其 HBV DNA 含量。以 GraphPad Prism 5. 0 软件计算受试各化合物的 CC₅₀、EC₅₀,以及作用选择性指数(SI)SI = CC₅₀/EC₅₀,以阿德福韦酯(adeфовir dipivoxil)为阳性对照。

由实验结果(表 2)可知:合成的 12 个目标化

合物除化合物 **9i** 与 **9l** 外其余化合物均具有 HBV-DNA 抑制活性 (EC_{50} 0.48 ~ 56.14 $\mu\text{mol/L}$), 其中化合物 **9a** ~ **9h** 具有较强抗 HBV 活性 (EC_{50} 0.48 ~ 12.62 $\mu\text{mol/L}$), 化合物 **9a** 的抗病毒活性与作用选择性指数最高 (EC_{50} 0.48 $\mu\text{mol/L}$, SI 763.72)。化合物 (**9j** ~ **9l**) 其抗病毒活性 (EC_{50} 35.91, 56.14 $\mu\text{mol/L}$) 与作用选择性指数 (SI 4.11, 2.27) 相对于化合物 **9a** ~ **9h** 均明显降低。

Table 2 Anti-HBV evaluation results of target compounds **9a-9l**

Compd.	$EC_{50}/(\mu\text{mol/L})$	$CC_{50}/(\mu\text{mol/L})$	SI
9a	0.48	366.59	763.72
9b	1.27	600.07	472.99
9c	1.83	628.33	343.34
9d	6.91	655.96	94.92
9e	12.62	618.46	49.00
9f	8.41	882.00	104.88
9g	12.14	631.47	52.02
9h	10.61	618.73	58.37
9i	— ^a	596.96	— ^b
9j	35.91	147.68	4.11
9k	56.14	127.82	2.27
9l	— ^a	126.39	— ^b
Adefovir dipivoxil	0.96	471.10	490.73

EC_{50} : Concentrations of compounds achieving 50% inhibition of cytoplasmic HBV-DNA synthesis; CC_{50} : Concentrations of compounds required for 50% extinction of HepG2 2.2.15 cells; SI: Selective index, CC_{50}/EC_{50} ;
^aNo activity on HBV-DNA inhibition; ^bSI can not be calculated

3.2 HK-2 肾细胞毒性评价

参考文献[13]方法, 将 HK-2 细胞培养于含

15% 胎牛血清、2.0 g/L NaHCO_3 、100 U/mL 青霉素和 100 U/mL 链霉素的 DMEM/F-12 培养基中, 于培养箱中培养, 当细胞铺满培养瓶底面积 70% ~ 80% 时, 用 0.25% 胰酶消化后制备成单细胞悬液, 调整细胞浓度至每毫升 1×10^5 个, 种植于 96 孔培养板中, 每孔 100 μL , 将培养板置 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中孵育 24 h。吸去培养液, 换液加药, 实验共分 3 组: 正常对照组、阳性对照组、样品组。正常对照组每孔加入 DMEM/F-12 培养液 100 μL ; 阳性对照组每孔加入含有 100 $\mu\text{mol/L}$ 阿德福韦酯的培养液 100 μL ; 在样品组中, 将受试化合物稀释至不同浓度 (1, 10, 100 $\mu\text{mol/L}$), 每孔加入 100 μL , 作用 HK-2 细胞 24, 48 h 后, 按照试剂盒标示方法测定细胞 CC_{50} 与乳酸脱氢酶 (LDH) 释放率, $\text{LDH 释放率}(\%) = \frac{\text{上清液 LDH}}{\text{上清液 LDH} + \text{裂解液 LDH}} \times 100$, 以阿德福韦酯 (adefovir dipivoxil) 为阳性对照。

试验结果 (表 3) 表明, 化合物 **9a** ~ **9d** 细胞毒性 ($CC_{50} > 1\,000 \mu\text{mol/L}$) 低于阿德福韦酯 ($CC_{50} = 488.05 \mu\text{mol/L}$), 化合物 **9j** 和 **9k** 细胞毒性 ($CC_{50} = 511.72, 476.49 \mu\text{mol/L}$) 与阳性对照药相当。化合物在 1, 10, 100 $\mu\text{mol/L}$ 浓度条件下作用细胞 24 h 后, LDH 释放率测试结果表明, 化合物 **9a** ~ **9d** LDH 释放率均低于阿德福韦酯, 而化合物 **9j** 和 **9k** LDH 释放率与阳性对照药接近。

Table 3 *In vitro* nephrotoxicity of compounds **9a-9d** and **9j-9k** on HK-2 cell ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Compd.	^a MTT assay $CC_{50}/(\mu\text{mol/L})$	^b Release rate of LDH(%) on HK-2 cell		
		1	10	100 $\mu\text{mol/L}$
9a	> 1 000	31.79 $\pm$ 0.23	34.24 $\pm$ 0.34	36.51 $\pm$ 0.51
9b	> 1 000	33.47 $\pm$ 0.32	36.19 $\pm$ 0.29	41.22 $\pm$ 0.56
9c	> 1 000	35.13 $\pm$ 0.47	36.77 $\pm$ 0.25	40.62 $\pm$ 0.81
9d	> 1 000	35.94 $\pm$ 1.28	36.73 $\pm$ 1.13	42.46 $\pm$ 1.26
9j	511.72	41.67 $\pm$ 2.19	46.31 $\pm$ 2.27	50.44 $\pm$ 1.62
9k	476.49	44.85 $\pm$ 1.56	47.92 $\pm$ 1.12	51.31 $\pm$ 1.09
Adefovir dipivoxil	488.05	42.32 $\pm$ 2.83	47.49 $\pm$ 1.67	50.02 $\pm$ 3.23

^a CC_{50} : Concentrations of compounds required for 50% extinction of HK-2 cells
^bLDH leakage assay of the tested compounds on HK-2 cells treated with the defined concentrations for 24 h

3.3 体外稳定性评价

将目标化合物 (**9a** ~ **9d**, **9j** ~ **9k**) 溶解于 DMSO 1 mL 后制备的浓度为 1 mmol/L 的储备液, 分别用 pH 2.0 与 pH 7.4 磷酸缓冲液稀释定容至 10 mL, 所得溶液置于 (37 $\pm$ 0.5) $^{\circ}\text{C}$ 水浴条件下孵育, 于不同时间点将样品取出并采用 HPLC 方法对目标化合物进行定量检测, 考察其降解率。将目标化合物

(**9a** ~ **9d**, **9j** ~ **9k**) 0.5 mg 置于水 1.0 mL 中, 超声、离心, 制备其水饱和溶液, 将所得溶液加入肝素化大鼠血浆中, 并于 (37 $\pm$ 0.5) $^{\circ}\text{C}$ 水浴条件下孵育, 于不同时间将血浆取出, 采用 CH_3CN 沉淀, EtOAc 萃取, 去溶剂后 MeOH 溶解并经 HPLC 定量分析, 考察其血浆半衰期 ($t_{1/2}$)。

实验结果 (表 4) 表明, 目标化合物均具有较好

的化学稳定性,在 pH 2.0 与 pH 7.4 磷酸缓冲液中孵育 24 h 后的降解率分别为 12.4% ~ 32.1% 与 10.3% ~ 26.5%。目标化合物在血浆条件下易降解释放出原药($t_{1/2}$ 0.59 ~ 2.24 h),其中化合物 **9b** 血浆半衰期较长(2.24 h)。

Table 4 *In vitro* stability of compounds **9a-9d** and **9i-9k** in pH 2.0, 7.4 buffer and rat plasma

Compd.	Chemical hydrolysis/% ^a		Plasmatic hydrolysis ^b $t_{1/2}/h$
	pH 2.0	pH 7.4	
9a	12.4 ^c	19.7 ^c	1.65
9b	13.8	10.3	2.24
9c	21.2	16.8	0.67
9d	15.6	20.7	1.58
9j	28.7	24.7	0.59
9k	32.1	26.5	ND
Adefovir dipivoxil	27.9	31.5	0.52

^a At pH 2.0 and pH 7.4 phosphate buffer at (37 ± 0.5) °C; ^b In rat plasma, and ND indicates not determined; ^c Percent of decomposition after 24 h of incubation

4 结果与讨论

抗 HBV 活性研究发现,目标化合物结构中嘌呤环 6-位取代基能够对抗病毒活性产生影响,初步构效关系研究发现,嘌呤环 6-位上为苄胺基取代的化合物(**9a, 9b**)抗 HBV 活性与作用选择性指数(SI)优于嘌呤环 6-位为环丙胺基取代的化合物(**9c ~ 9e**),而后者抗病毒活性与选择性指数又优于嘌呤环 6-位为 4-甲氧苯硫基或吗啉基取代的目标化合物(**9f ~ 9g, 9h ~ 9i**),该活性特点的产生可能是由于化合物在细胞内活化代谢方式不同,嘌呤环 6-位上为苄胺基取代的化合物相对于其他类型化合物更易被代谢活化形成活性代谢产物,从而产生较强抗病毒活性。HK-2 肾细胞毒性研究提示,目标化合物 **9a ~ 9d** 肾细胞毒性优于阳性对照药,而将化合物结构中的 L-氨基酸酯替换为其相应的硫代 L-氨基酸酯获得的目标化合物 **9j ~ 9k** 肾细胞毒性明显增加。体外稳定性研究结果提示,合成的目标化合物具有较 adefovir dipivoxil 更高的化学与酶学稳定性,同时其能够被血浆水解酶迅速分解产生抗病毒活性的原药。

鉴于目标化合物 **9a** 具有较好的抗 HBV 活性、较低的肾细胞毒性以及较高的化学及酶学稳定性,其可作为先导化合物进行下一步的研究。

参考文献

- [1] Trippier PC, Jansen Labby K, Hawker DD, *et al.* Target- and mechanism-based therapeutics for neurodegenerative diseases: strength in numbers[J]. *J Med Chem*, 2013, **56**(8): 3 121 - 3 147.
- [2] Raney AK, Hamatake RK, Hong Z. Agents in clinical development for the treatment of chronic hepatitis B[J]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2003, **12**(8): 1 281 - 1 295.
- [3] Nozomu T, Kurenai T, Neeraja KH, *et al.* Adefovir nephrotoxicity: possible role of mitochondrial DNA depletion[J]. *Human Pathology*, 2001, **32**(7): 734 - 740.
- [4] Sweet DH, Bush KT, Nigam SK. The organic anion transporter family: from physiology to ontogeny and the clinic[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2001, **281**(2): F 197 - 205.
- [5] Rubio-Aliaga I, Daniel H. Mammalian peptide transporters as targets for drug delivery[J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2002, **23**(9): 434 - 440.
- [6] Mulato AS, Ho ES, Cihlar T. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs efficiently reduce the transport and cytotoxicity of adefovir mediated by the human renal organic anion transporter 1[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2000, **295**(1): 10 - 15.
- [7] Fu XZ, Ou Y, Pei JY, *et al.* Synthesis, anti-HBV activity and renal cell toxicity evaluation of mixed phosphonate prodrugs of adefovir[J]. *Eur J Med Chem*, 2012, **49**: 211 - 218.
- [8] Ono-Nita SK, Kato N, Shiratori Y, *et al.* Novel nucleoside analogue MCC-478 (LY582563) is effective against wild-type or lamivudine resistant hepatitis B virus[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2002, **46**(8): 2 602 - 2 605.
- [9] Murakami E, Bao H, Mosley RT, *et al.* Adenosine deaminase-like protein 1 (ADAL1): characterization and substrate specificity in the hydrolysis of *N* (6)- or *O* (6)-substituted purine or 2-aminopurine nucleoside monophosphates[J]. *J Med Chem*, 2011, **54**(16): 5 902 - 5 914.
- [10] Fu XZ, Ou Y, Xin J, *et al.* Design, synthesis and *in vitro* evaluation of mono(2,2,2-trifluoro-ethyl) esters, mono L-amino acid ester prodrugs of acyclic nucleoside phosphonates as anti-HBV agents[J]. *Chin Chem Lett*, 2011, **22**(12): 1 387 - 1 389.
- [11] Fu XZ, Jiang SH, Yang YS, *et al.* Design, synthesis and anti-HBV activity of L-amino acid ester prodrugs of acyclic nucleoside phosphonates[J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2008, **43**(5): 495 - 503.
- [12] Sells MA, Chen ML, Acs G. Production of hepatitis B virus particles in HepG2 cells transfected with cloned hepatitis B virus DNA[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1987, **84**(4): 1 005 - 1 009.
- [13] Ryan MJ, Johnson G, Kirk J, *et al.* HK-2: an immortalized proximal tubule epithelial cell line from normal adult human kidney[J]. *Kidney Int*, 1994, **45**(1): 48 - 57.