

# 取代腺嘌呤类化合物的合成及其抗病毒活性研究

吴广, 刘嘉, 牛春娟, 李科 (第二军医大学药学院药物化学教研室, 上海 200433)

**摘要** 目的: 修饰阿德福韦 (ADV) 结构, 设计合成新化合物, 研究其对乙型肝炎病毒 HBsAg HBeAg 的抑制活性。方法: 以 (ADV) 为原料, 经磷酸氯化、三氟乙醇酯化和氯甲酸酯缩合等反应, 设计合成了未见文献报道的 8 个嘌呤类目标化合物 1a-1h, 所有化合物经 <sup>1</sup>H NMR 谱等确证; 体外药理实验采用酶联免疫法 (ELISA), 阳性药物采用临床常用同类药物 ADV。结果: 设计合成的 8 个化合物, 对 HBsAg 和 HBeAg 都有一定的抑制作用, 其中化合物 1d 1e 1g 1h 对 HBsAg 抑制活性与 ADV 相当, 化合物 1g 对 HBeAg 抑制活性与 ADV 相当。所有目标化合物对 HBsAg 抑制活性好于对 HBeAg 抑制活性。结论: 在嘌呤环 N6 位引入较长碳链的 1g 活性最佳。

**关键词** 阿德福韦; 化学合成; 核苷类化合物; 抗乙型肝炎活性

中图分类号: R914.4 文献标识码: A 文章编号: 1006-0111(2009)06-0426-04

## Synthesis and antiviral activities of substituted adenine analogues on HBV

WU Guang LIU Jia NIU Chunjuan LI Ke (Department of Medicinal Chemistry, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

**ABSTRACT Objective** To study of design and synthesis of the new (ADV) derivatives and study their activities of inhibiting hepatitis B virus HBsAg and HBeAg. **Methods** Starting with ADV, we synthesized 8 firstly reported purine compounds 1a-1h, which have been verified by NMR and MS. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) was used to assess HBsAg and HBeAg. The positive control is ADV. **Results** The test results show the inhibitory rate of targeted purine compounds on HBsAg and HBeAg is correspond with ADV. **Conclusion** 1g introduced long carbon chain at N6 substituted of purine shows the best activity.

**KEY WORDS** ADV; chemical synthesis; nucleotide; anti-HBV activity

### 1 前言

慢性乙型肝炎是一种慢性、进展性、致死性疾病。我国为病毒性肝炎的高流行区, 其流行特点为 HBsAg 阳性率高, 约占全球的 1/3, 多数在婴幼儿感染, 易发展成慢性。自 1980 年人们发现开环核苷具有抗病毒作用以来, 开环核苷已成为抗病毒核苷类药物的重要一族。

阿德福韦 (adefovir, ADV) 作为开环核苷类抗病毒药物, 具有广泛的抗 RNA 和 DNA 及逆转录酶病毒活性。阿德福韦在细胞激酶作用下磷酸化为活性代谢产物二磷酸盐 ADV<sub>pp</sub>, 此产物与酶的自然底物三磷酸脱氧腺苷 (dATP) 竞争, 抑制 HBV DNA 聚合酶 (HBV 逆转录酶), 或通过整合到病毒 DNA 链后使其发生链终止; 阿德福韦本身也可直接整合到 HBV DNA 链中, 形成 DNA 链终结子, 因而阿德福韦具有较强的抑制 HBV DNA 复制的作用。由于 ADV 的磷

酸酯基带负电荷, 阿德福韦口服后在肠内吸收较差, 口服生物利用度很低<sup>[1]</sup>。为提高生物利用度, 对其结构中磷酸基团进行酯化, 成功得到阿德福韦酯 (adefovir dipivoxil), 已与 2002 年被 FDA 批准用于治疗成人慢性乙肝。但是, 阿德福韦酯在体内被酶水解释放出阿德福韦, 特戊酸和甲醛, 其中在服用高剂量阿德福韦酯时, 代谢产生的高浓度特戊酸可能会降低血清中的肉毒碱而产生肾毒性<sup>[2]</sup>。

本研究以 ADV 为先导化合物, 以易于代谢降解的三氟乙基取代阿德福韦酯的特戊酸基, 将 ADV 的磷酸基团部分修饰为三氟乙醇的酯化衍生物, 同时在嘌呤 6 位 N 上引入系列氯甲酸酯取代, 通过结构修饰, 以期降低阿德福韦酯大剂量应用产生的肾毒性, 增强 ADV 生物利用度, 改善药代动力学性质。以 ADV 为原料, 经氯代、三氟乙醇酯化、系列取代氯甲酸酯缩合等反应, 设计合成得到 8 个未见文献报道的开环嘌呤磷酸酯类化合物 6 取代酰胺-9-[双(2,2-三氟乙基)膦酰基甲氧基]-乙基]腺嘌呤 1a-1h 并对合成的目标化合物进行了初步的体外抗乙型肝炎病毒药理活性实验。路线如图 1 所示。

基金项目: 上海市 2004 年度重大科技攻关项目 (2004DZ19209)。

作者简介: 吴广 ((1979-), 男, 硕士生。

通讯作者: 李科, Tel (021) 81871237, E-mail proflk@sina.com。

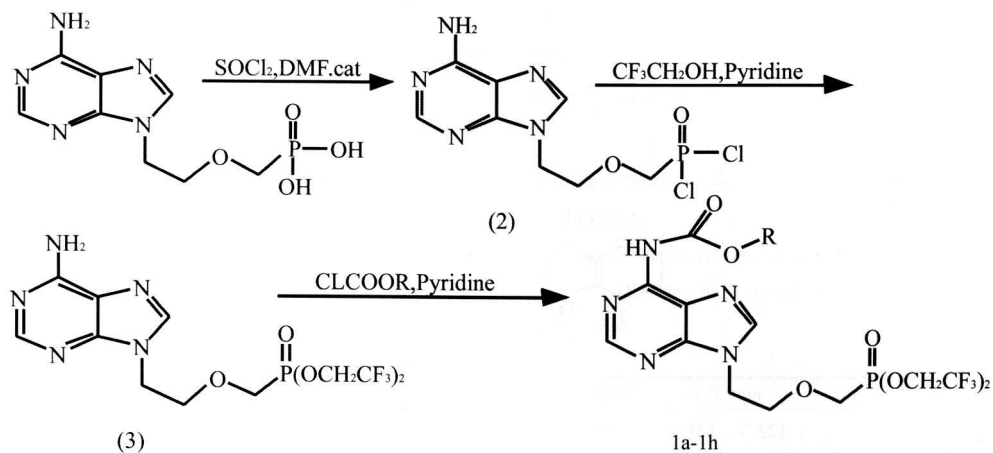


图 1 目标化合物的合成路线

1a R = CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>; 1b R = CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>; 1c R = CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>; 1d R = CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>; 1e R = CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>;  
1f R = CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>; 1g R = CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>; 1h R = CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>3</sub>

## 2 实验部分

**2.1 仪器和材料** RY-2型熔点仪, 温度未经过校正; 核磁共振氢谱用 Bruker AC-300P型仪器测定, 以 DM SO-d<sub>6</sub> 为溶剂, TMS为内标。药理实验采用酶联免疫法 (ELISA), 阳性对照药 ADV 由第二军医大学药学院药物化学教研室合成, 结构经过确证, HPLC 测试含量 ≥99%。目标化合物合成原料 PMEA 由第二军医大学药学院药物化学教研室合成, 所用试剂均为市售分析纯。

### 2.2 目标化合物的合成

**2.2.1 参照文献的方法合成氯甲酸酯<sup>[3]</sup>** 参照专利 CN1421450合成 PMEA<sup>[4]</sup>, 参考文献的方法合成目标化合物<sup>[5]</sup>。

**2.2.2 9-[双(2,2,2-三氟乙基)-膦酰基甲氧基]-乙基嘌呤(3)的制备** 9-(2-膦酰基甲氧基)腺嘌呤 (ADV) 5.4 g (19.8 mmol), 氯化亚砷 20 mL, 催化量的 DMF, 放入 100 mL三口瓶, 回流 3 h后减压蒸除氯化亚砷, 剩余油状物中加入干燥乙腈 15 mL, 搅拌溶解, 于 70 °C滴加由三氟乙醇 8 g (80 mmol)、无水吡啶 3.4 g (43.5 mmol)和无水乙腈 10 mL的混合液, 滴毕回流反应约 10 h。由薄层点板跟踪反应完成, 浓缩, 硅胶柱层析纯化, 二氯甲烷: 甲醇 = 30: 1淋洗, 浓缩冷却得浅黄色固体 1.03 g 即 9-[双(2,2,2-三氟乙基)-膦酰基甲氧基]-乙基嘌呤 (3)。m.p. 141.4~141.8 °C, 收率: 11.8%。R (cm<sup>-1</sup>): 3370.28, 3333.94, 3003.60, 2974.44, 1654.23, 1610.98, 1507.84, 1579.65。<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): 3.88-3.92 (m, 2H, 2-H), 4.09-4.12 (d, 2H, OCH<sub>2</sub>P), 4.31-4.34 (m, 2H, 1-H), 4.53-4.66 (m, 4H, OCH<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>), 7.39 (s, 1H, 2-H), 8.12

(s, 1H, 8H)。

**2.2.3 6-异丙氧基酰胺-9-[双(2,2,2-三氟乙基)-膦酰基甲氧基]-乙基嘌呤(1c)的制备** 9-[双(2,2,2-三氟乙基)-膦酰基甲氧基]-乙基嘌呤 1.32 g (3 mmol)溶于无水二氯甲烷 5 mL, 加入无水吡啶 0.26 mL (3.2 mmol), 搅拌, 于低温下滴加氯甲酸异丙酯 1 mL, 滴毕, 常温反应 3 h, 蒸除溶剂, 薄层点板跟踪反应完成, 浓缩, 硅胶柱层析纯化, 二氯甲烷: 甲醇 = 50: 1淋洗, 得白色固体 1.35 g 即 6-异丙氧基酰胺-9-[双(2,2,2-三氟乙基)-膦酰基甲氧基]-乙基嘌呤 (1c)。m.p. 115.3~116.4 °C, 收率: 92.3%。

目标化合物 1a~1b, 1d~1h按同法制备。8个目标化合物经光谱确证其结构, 理化性质即光谱数据见表 1。

### 2.3 药理实验

**2.3.1 受试药 溶剂及配制方法:** 试验时根据所设计剂量组浓度用 MEM 培养液配制。4 °C冰箱保存。

**2.3.2 阳性对照药 ADV (第二军医大学药学院药物化学教研室)。** 4 °C冰箱保存。

**2.3.3 体外细胞模型 乙型肝炎病毒 (HBV) DNA 克隆转染人肝癌细胞 (HepG2) 的 2.2.15 细胞 (HepG2 2.2.15 细胞)。**

**2.3.4 药物毒性试验 MTT 法检测样品对细胞的毒性, MTT (Aldrich)。**

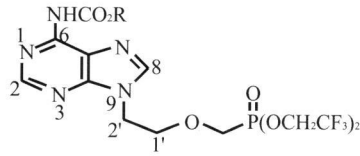
**2.3.5 HBV 抗原检测 酶联免疫法 (ELISA) 检测样品对 HBsAg 和 HBeAg 的抑制作用。**

用 DMEM 培养液 (GIBCO), 培养液添加 10% 胎牛血清, G418 100 μg/mL (GIBCO), 0.03% 谷氨酰胺, 用 0.23% HePes 调 pH 至 6.48, 称取适量样品加 0.2 mL DMSO, 完全溶解后补加 3.79 mL 2% DMEM 过滤,

除菌得含药培养液,用 0.06% 胰蛋白酶将 2.2.15 细胞分散成单个细胞悬液,按  $3 \times 10^4$  细胞/孔浓度接种于 96 孔板,2 d 后换用含药培养液。与细胞作用 12 d

后,吸上清液做 ELISA 测定 HBsAg、HBeAg 的抑制率,余下细胞用 MTT 法测定药物细胞毒性。实验结果见表 2。

表 1 目标化合物的结构、物理常数和  $^1\text{H-NMR}$



编号	R	mp(°C)	收率(%)	$^1\text{H-NMR}(\text{DMSO}-d_6)\delta$
1a	$-\text{CH}_2\text{CH}_3$	122.7~123.2	91.5	1.32~1.37(m, 3H, $\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 3.92~3.94(d, 2H, $\text{OCH}_2\text{P}$ ), 3.97~4.00(m, 2H, 2-H), 4.01~4.05(t, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 4.10~4.18(m, 2H, 1-H), 4.29~4.38(m, 4H, $\text{OCH}_2\text{CF}_3$ ), 7.99(s, 1H, 2-H), 8.71(s, 1H, 8-H)
1b	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$	115.3~116.4	92.3	0.94~0.99(m, 3H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 1.68~1.75(m, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 3.90~3.93(d, 2H, $\text{OCH}_2\text{P}$ ), 3.99~4.03(m, 2H, 2-H), 4.18~4.23(m, 2H, 1-H), 4.29~4.48(m, 4H, $\text{OCH}_2\text{CF}_3$ ), 4.46~4.50(m, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2$ ), 8.29(s, 1H, 2-H), 8.69(s, 1H, 8-H)
1c	$-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$	116.4~117.0	92.0	1.32~1.34(d, 6H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 3.91~3.94(d, 2H, $\text{OCH}_2\text{P}$ ), 4.00~4.04(m, 2H, 2-H), 4.30~4.41(m, 4H, $\text{OCH}_2\text{CF}_3$ ), 4.47~4.50(m, 2H, 1-H), 5.09~5.13(s, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 8.03(s, 1H, 2-H), 8.71(s, 1H, 8-H)
1d	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$	102.3~103.6	93.1	0.94~0.96(m, 3H, $\text{CH}_3$ ), 1.38~1.71(m, 4H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 3.91~3.94(d, 2H, $\text{OCH}_2\text{P}$ ), 4.00~4.04(m, 2H, 2-H), 4.24~4.28(m, 2H, 1-H), 4.30~4.41(m, 4H, $\text{OCH}_2\text{CF}_3$ ), 4.47~4.50(m, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 8.12(s, 1H, 2-H), 8.70(s, 1H, 8-H)
1e	$-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$	110.1~110.6	85.6	0.96~0.99(d, 6H, $\text{CH}_3$ ), 1.92~2.05(m, 1H, CH), 3.91~3.94(d, 2H, $\text{OCH}_2\text{P}$ ), 4.01~4.06(m, 2H, 2-H), 4.26~4.28(m, 2H, 1-H), 4.32~4.41(m, 4H, $\text{OCH}_2\text{CF}_3$ ), 4.47~4.51(m, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}$ ), 8.08~8.10(d, 1H, 2-H), 8.71(s, 1H, 8-H)
1f	$-\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$	97.8~99.2	86.3	1.32~1.59(m, 6H, 3'', 4''-H), 1.73~1.79(m, 4H, 2''-H), 3.92~3.95(d, 2H, $\text{OCH}_2\text{P}$ ), 4.02~4.05(m, 2H, 2-H), 4.24~4.26(m, 2H, 1-H), 4.48~4.52(m, 4H, $\text{OCH}_2\text{CF}_3$ ), 4.52~4.91(m, 1H, 1''-H), 7.90(s, 1H, 2-H), 8.70(s, 1H, 8-H)
1g	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$	102.4~103.5	84.7	0.97~0.99(d, 6H, $\text{CH}_3$ ), 1.55~1.62(t, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}$ ), 1.68~1.77(m, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 3.91~3.94(d, 2H, $\text{OCH}_2\text{P}$ ), 4.00~4.09(m, 2H, 2-H), 4.27(s, 2H, 1-H), 4.29~4.41(m, 2H, $\text{OCH}_2\text{CF}_3$ ), 4.47~4.51(m, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}$ ), 8.13(s, 1H, 2-H), 8.70(s, 1H, 8-H)
1h	$-\text{CH}_2(\text{CH}_3)_2\text{CH}_3$	134.4~134.8	82.7	0.87~0.94(m, 3H, $\text{CH}_3$ ), 1.14~1.66(m, 6H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 3.92~3.95(d, 2H, $\text{OCH}_2\text{P}$ ), 4.01~4.05(m, 2H, 2-H), 4.20~4.26(m, 2H, 1-H), 4.30~4.48(m, 4H, $\text{OCH}_2\text{CF}_3$ ), 4.51~4.85(m, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 7.90(s, 1H, 2-H), 8.71(s, 1H, 8-H)

表 2 目标化合物的抗 HBV 活性

化合物	HBsAg(%)		HBeAg(%)	
	100 $\mu\text{g/mL}$	50 $\mu\text{g/mL}$	100 $\mu\text{g/mL}$	50 $\mu\text{g/mL}$
1a	22.2	18.2	15.9	9.8
1b	24.5	20.9	15.2	10.3
1c	28.9	20.1	10.2	8.2
1d	31.7	22.3	20.4	16.7
1e	30.9	28.5	—	—
1f	12.9	10.1	11.7	5.0
1g	39.2	34.2	25.1	20.2
1h	36.0	35.5	19.8	14.2
ADV	37.5	35.3	28.1	20.0

### 3 结果和讨论

初步的抗病毒活性实验结果表明,设计合成的 8

个化合物,对 HBsAg 和 HBeAg 都有一定的抑制作用。化合物 1d、1e、1g、1h 的 HBsAg 抑制活性与 ADV 相当,化合物 1g 的 HBeAg 抑制活性与 ADV 相当。同样浓度下目标化合物对 HBsAg 抑制活性强于对 HBeAg 抑制活性,与核苷类抗病毒化合物的性质一致。

9-[2-(磷酰甲氧基)乙基]腺嘌呤(ADV)为化合物的基本药效基团,将 ADV 的磷酸基团部分修饰为三氟乙醇的酯化衍生物,同时在嘌呤 6 位 N 上引入系列氯甲酸酯取代,通过结构修饰的目标化合物保持抗 HBV 病毒活性。 $\text{N}^6$ 氯甲酸酯系列取代对活性有一定影响,其中,长链脂肪氯甲酸酯抗 HBV 病毒活性较强,柔性基团比刚性环状基团(如环己基)取代化合物

对抗 HBV 病毒活性更为有利。在 N6 位引入较长碳链的异戊氧基的 1g 活性最佳。由于化合物的数量有限, 深一步的构效关系, 有待于进一步的研究。

参考文献:

[1] John ES David J Tortolani R, et al. Synthesis, oral bioavailability determination and *in vitro* evaluation of prodrugs of the antiviral agent 9-[2-(Phosphonoethoxy)ethyl] adenine (PMEA) [J]. J Med Chem, 1994, 37: 1857  
 [2] Hwang JI, Choi JR. Novel phosphonate nucleosides as antiviral agents [J]. Drugs of the Future, 2004, 29(2): 163.

[3] Shi H, Hu WX, Sun YQ. Preparation of chlorobamates using bis (trichloromethyl) carbonate [J]. Journal of Chemical Research, 2004, 708.  
 [4] 李科, 汪元璋, 李庭华, 等. 9-[2-[[双(三甲基乙酰氧)甲基]氧磷基]甲氧基]-乙基腺嘌呤的制备方法 [P]. 中国专利, ZL02151028.8, 2004.4  
 [5] Kouichi S, Hideaki T, Naoko U, et al. 2-Amino-6-arylhio-9-[2-[phosphonoethoxy]] purine bis(2,2,2-trifluoroethyl) ester as novel HBV-specific antiviral reagents [J]. J Med Chem, 2002, 45: 3138

收稿日期: 2009-03-17

(上接第 410 页)

啡。③酸碱平衡。最初由于呼吸急促, 会出现呼吸性碱中毒。严重或长时间持续的休克由于组织灌注不足, 出现无氧代谢, 产生代谢性酸中毒。如果动脉血气测量指出存在酸中毒时, 可按每公斤体重 2~5 mL 迅速静滴 5% 碳酸氢钠注射液纠正。4~6 h 后, 测定血中二氧化碳结合力, 决定是否继续用药<sup>[18]</sup>。④骨髓输液。由于失血性休克患者周围循环衰竭, 末梢静脉塌陷<sup>[20]</sup>, 建立输液复苏的静脉通路比较困难。同时在时间紧迫各种条件有限的情况下, 无法通过紧急手术施行静脉插管。这种情况下, 可以采用骨髓输液技术, 进行输液复苏。目前, 多种抗生素、急救药品, 甚至全血都可经过骨髓内途径给入, 达到良好救治效果<sup>[20, 21]</sup>。

4 小结

失血是大多数战伤或创伤所致休克的原因。在评估伤员伤情时, 高度怀疑存在失血性休克是必要的。在控制出血的基础上, 积极开展输液复苏十分关键。尽管近年来新的抗休克药物并未面世, 但是, 如何选择、如何使用液体复苏药物的策略和方法愈益完善、趋于规范。

参考文献:

[1] 黎鳌主编. 现代创伤学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1998, 197.  
 [2] 赵克森. 创伤性休克的新概念 [J]. 中华创伤杂志, 2005, 21(1): 29.  
 [3] Demello WF, Hocking G. Battlefield trauma and pain [J]. J R Army Med Corps, 1997, 43(2): 129.  
 [4] Buckemaier C. Battlefield trauma and pain [J]. J R Nav Med serv, 2006, 92(2): 57.  
 [5] BATLS Training Team. Battlefield advanced trauma life support

(bats) chapter 5 [J]. J R Army Med Corps, 2001, 147(2): 187.  
 [6] 刘良明. 有关战(创)伤休克早期液体复苏的一些新概念 [J]. 创伤外科杂志, 2006, 8(2): 101.  
 [7] Smith JE, Hall MJ. Hypertonic saline [J]. J R Army Med Corps, 2004, 150(4): 239.  
 [8] Thompson RCC. Physiological 0.9% saline in the fluid resuscitation of trauma [J]. J R Army Med Corps, 2005, 151(3): 146.  
 [9] Greasley L, Russell RJ. Albumin and its role in trauma resuscitation [J]. J R Army Med Corps, 2005, 151(2): 65.  
 [10] Whitfield C. Gelatin colloids in the resuscitation of trauma [J]. J R Army Med Corps, 2006, 152(4): 197.  
 [11] Parkhouse D. Sugar solutions used in resuscitation [J]. J R Army Med Corps, 2005, 151(1): 5.  
 [12] Sapsford W. Hypertonic saline dextran—the fluid of choice in the resuscitation of haemorrhagic shock [J]. J R Army Med Corps, 2003, 149(2): 110.  
 [13] Thompson R, Greaves J. Hypertonic saline—hydroxyethyl starch in trauma resuscitation [J]. J R Army Med Corps, 2006, 152(1): 6.  
 [14] 陈惠孙. 创伤性休克研究进展 [J]. 中华创伤杂志, 1995, 11(5): 288.  
 [15] Aonasa S, Ono S, Mochizuki H, et al. Mechanism of the inhibitory effect of protease inhibitor on tumor necrosis factor alpha production of monocytes [J]. Shock, 2001, 15: 101.  
 [16] 张红金, 汤大明, 陈德昌. 大剂量维生素 C 对肠黏膜屏障的保护作用 [J]. 中国急救医学, 2003, 23: 80.  
 [17] 赵克森. 重症难治性休克的机制和治疗 [J]. 中华创伤杂志, 2003, 19(6): 325.  
 [18] 总后勤部卫生部. 战伤救治规则 (2006 版) [M]. 北京: 人民军医出版社, 2006.  
 [19] 王小芹, 李晓辉. 急救给药补液途径 [J]. 中华医学写作杂志, 2001, 8(20): 2409.  
 [20] 冯正权, 吴宝明. 骨髓输液技术的发展及应用 [J]. 医疗卫生装备, 2003, 2: 25.  
 [21] 张颖, 张志新, 史忠岗, 等. 骨髓输液抢救创伤失血性休克的急救护理体会 [J]. 中华医学写作杂志, 2001, 8(20): 2409.

收稿日期: 2009-11-03