

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[ 51 ] Int. Cl<sup>7</sup>

A61K 31/7068



[12] 发明专利申请公开说明书

A61K 31/7072 A61K 31/7076

A61K 31/708 C07H 19/06

C07H 19/16 A61P 31/14

[21] 申请号 02811848.0

[43] 公开日 2004 年 7 月 28 日

[11] 公开号 CN 1516590A

[22] 申请日 2002. 6. 7 [21] 申请号 02811848. 0

[30] 优先权

[32] 2001. 6. 12 [33] GB [31] 0114286. 8

[86] 国际申请 PCT/EP2002/006256 2002. 6. 7

[87] 国际公布 WO2002/100415 英 2002. 12. 19

[85] 进入国家阶段日期 2003. 12. 12

[71] 申请人 弗·哈夫曼 - 拉罗切有限公司

地址 瑞士巴塞尔

[72] 发明人 R·R·德沃斯 C·J·霍布斯

W-R·蒋 J·A·马丁

J·H·梅里特 I·纳杰拉

真间信雄 卓夫佃

[74] 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

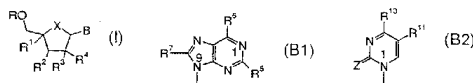
代理人 黄革生 隗永良

权利要求书 4 页 说明书 44 页

[54] 发明名称 4'-取代的核苷

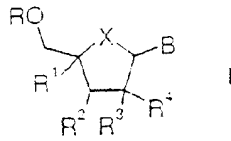
[57] 摘要

本发明涉及其中 B 表示式 (B1) 的 9-嘌呤基 B1 或式 (B2) 的 1-嘧啶基 B2、其中各符号如说明书所定义的式 (I) 核苷衍生物及其可药用的盐的用途, 其用于治疗受丙型肝炎病毒 (HCV) 介导的疾病和制备用于这类治疗的药物, 还涉及含有这类化合物的药物组合物。



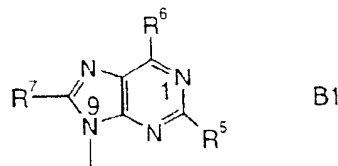
I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1、式 I 化合物及其可药用的盐的用途，其用于治疗受丙型肝炎病毒（HCV）介导的疾病和用于制备用于这类治疗的药物，



其中，

- R** 是氢或  $-[P(O)(OH)-O]_nH$ ，且  $n$  是 1、2 或 3；
- R<sup>1</sup>** 是烷基、链烯基、炔基、卤代烷基、烷基羰基、烷氧基羰基、羟基烷基、烷氧基烷基、烷氧基、氰基、叠氮基、胍基甲基、烷氧基亚氨基甲基、卤素、烷基羰基氨基、烷基氨基羰基、叠氮基烷基、氨基甲基、烷基氨基甲基、二烷基氨基甲基或杂环基；
- R<sup>2</sup>** 是氢、羟基、氨基、烷基、羟基烷基、烷氧基、卤素、氰基或叠氮基；
- R<sup>3</sup> 和 R<sup>4</sup>** 是氢、羟基、烷氧基、卤素或羟基烷基，条件是 **R<sup>3</sup>** 和 **R<sup>4</sup>** 至少有一个是氢；或者
- R<sup>3</sup> 和 R<sup>4</sup>** 一起代表  $=CH_2$  或  $=N-OH$ ，或者
- R<sup>3</sup> 和 R<sup>4</sup>** 都代表氟；
- X** 是 O、S 或  $CH_2$ ；
- B** 表示式 B1 的 9-嘌呤基，



其中，

- R<sup>5</sup>** 是氢、羟基、烷基、烷氧基、烷硫基、 $NHR^8$ 、卤素或 SH；
- R<sup>6</sup>** 是羟基、 $NHR^8$ 、 $NHOR^9$ 、 $NHNR^8$ 、 $-NHC(O)OR^9$  或 SH；
- R<sup>7</sup>** 是氢、羟基、烷基、烷氧基、烷硫基、 $NHR^8$ 、卤素、SH 或氟

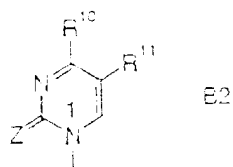
基;

$R^8$  是氢、烷基、羟基烷基、芳基羰基或烷基羰基;

$R^9$  是氢或烷基;

$R^{9'}$  是烷基; 或

B 表示式 B2 的 1-嘧啶基,



其中,

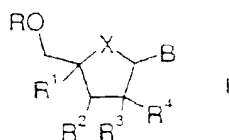
Z 是 O 或 S;

$R^{10}$  是羟基、 $NHR^8$ 、 $NHOR^9$ 、 $NHNR^8$ 、 $-NHC(O)OR^9$  或 SH;

$R^{11}$  是氢、烷基、羟基、羟基烷基、烷氧基烷基、卤代烷基或卤素;

$R^8$ 、 $R^9$  和  $R^{9'}$  如上所定义。

2、式 I 化合物的根据权利要求 1 的用途,



其中,

R 是氢;

$R^1$  是烷基、链烯基、炔基、卤代烷基、烷基羰基、烷氧基、羟甲基、氰基、叠氮基、烷氧基亚氨基甲基、烷基羰基氨基、烷基氨基甲基或二烷基氨基甲基;

$R^2$  是氢、羟基、烷氧基或卤素;

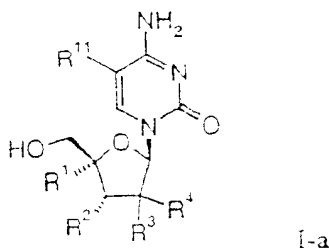
$R^3$  和  $R^4$  是氢、羟基、烷氧基、卤素或羟基烷基, 条件是  $R^3$  和  $R^4$  至少有一个是氢; 或者

$R^3$  和  $R^4$  代表氟;

X 是 O 或  $CH_2$ ; 且

B 表示如权利要求 1 所定义的 9-嘌呤基 B1 或 1-嘧啶基 B2。

3、式 I-a 化合物及其可药用盐的根据权利要求 1 或权利要求 2 的用途，



其中，

$R^1$  是烷基、链烯基、炔基、卤代烷基、烷基羰基、烷氧基、羟甲基、氰基、叠氮基、烷氧基亚氨基甲基、烷基羰基氨基、烷基氨基甲基或二烷基氨基甲基；

$R^2$  是氢、羟基、烷氧基或卤素；

$R^3$  和  $R^4$  是氢、羟基、烷氧基、卤素或羟基烷基，条件是  $R^3$  和  $R^4$  至少有一个是氢；或者

$R^3$  和  $R^4$  代表氟。

4、根据权利要求 3 的化合物的用途，其中的化合物是 4'-C-乙炔基胞苷盐酸盐 (1:1)、4'-C-乙氧基胞苷、4'-C-乙酰基胞苷。

5、根据权利要求 3 的化合物的用途，其中的化合物是 4'-C-叠氮基胞苷。

6、权利要求 1 至 5 的任一项所定义的化合物或其可药用的盐，其用于治疗受丙型肝炎病毒 (HCV) 介导的疾病。

7、权利要求 1 至 5 的任一项所定义的化合物或其可药用的盐，其用于制备用来治疗受丙型肝炎病毒 (HCV) 介导的疾病的药物。

8、药物组合物，其基于药学上有效量的、如权利要求 1 至 5 的任一项所定义的式 I 或 I-a 化合物或其可药用的盐，用于治疗受丙型肝炎

病毒（HCV）介导的疾病或者用于制备用于这类治疗的药物。

9、基于药学上有效量的、如权利要求 1 至 5 的任一项所定义的式 I 或 I-a 化合物或其可药用盐的药物组合物的用途，其用于治疗受丙型肝炎病毒（HCV）介导的疾病。

10、如上文所描述的发明。

## 4'-取代的核苷

本发明涉及作为 HCV 复制子 RNA 复制抑制剂的核苷衍生物。确切而言，本发明涉及嘌呤与嘧啶核苷衍生物作为亚基因组丙型肝炎病毒（HCV）RNA 复制抑制剂的用途和含有这类化合物的药物组合物。

丙型肝炎病毒是世界范围内慢性肝脏疾病的主导原因。被 HCV 感染的患者面临发展为肝硬化和随后的肝细胞癌的危险，因此 HCV 是肝移植的主要适应症。目前仅有两种经过批准的疗法可用于治疗 HCV 感染（R. G. Gish, *Sem. Liver. Dis.*, 1999, 19, 35）。它们是干扰素- $\alpha$ 单一疗法和近期的核苷类似物利巴韦林（Virazole）与干扰素- $\alpha$ 的联合疗法。

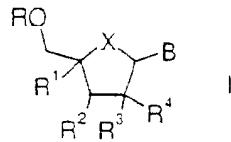
很多被批准用于治疗病毒感染的药物是核苷或核苷类似物，大多数这些核苷类似物药物在转化为对应的三磷酸酯之后，通过抑制病毒聚合酶可抑制病毒的复制。这种向三磷酸酯的转化通常受到细胞激酶的介导，因此仅仅使用基于细胞的测定法才可方便地对作为 HCV 复制抑制剂的核苷进行直接评价。但对于 HCV，缺乏真正的基于细胞的病毒复制测定法或动物感染模型。

丙型肝炎病毒属于黄病毒家族。它是一种 RNA 病毒，编码大型多蛋白的 RNA 基因组在加工后可产生必要的复制机构，以确保子代 RNA 的合成。据信大多数被 HCV RNA 基因组编码的非结构性蛋白质都参与 RNA 的复制。Lohmann 等人（V. Lohmann 等人, *Science*, 1999, 285, 110-113）已经描述了人肝细胞瘤（Huh7）细胞系的构建，其中亚基因组 HCV RNA 分子被引入并且显示可高效复制。据信 RNA 在这些细胞系中的复制机理等同于全长 HCV RNA 基因组在被感染的肝细胞中的复制。用于分离这些细胞系的亚基因组 HCV cDNA 克隆体已经成为开发用于鉴别核苷类似物 HCV 复制抑制剂、基于细胞的测定法的基础。

式 I 化合物已显示是亚基因组丙型肝炎病毒在肝细胞瘤细胞系中复制的抑制剂。这些化合物具有作为用于治疗人类 HCV 感染的有效抗病

毒药物的潜力。

本发明涉及式 I 化合物及其可药用盐用于治疗受丙型肝炎病毒 (HCV) 介导的疾病或者用于制备用于这类治疗的药物的用途，



其中，

**R** 是氢或  $-\text{P}(\text{O})(\text{OH})-\text{O}]_n\text{H}$ ，且  $n$  是 1、2 或 3；

**R<sup>1</sup>** 是烷基、链烯基、炔基、卤代烷基、烷基羰基、烷氧基羰基、羟基烷基、烷氧基烷基、烷氧基、氰基、叠氮基、胍基甲基、烷氧基亚氨基甲基、卤素、烷基羰基氨基、烷基氨基羰基、叠氮基烷基、氨基甲基、烷基氨基甲基、二烷基氨基甲基或杂环基；

**R<sup>2</sup>** 是氢、羟基、氨基、烷基、羟基烷基、烷氧基、卤素、氰基或叠氮基；

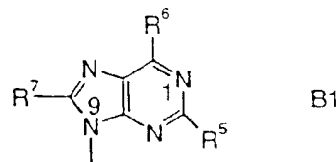
**R<sup>3</sup> 和 R<sup>4</sup>** 是氢、羟基、烷氧基、卤素或羟基烷基，条件是 **R<sup>3</sup> 和 R<sup>4</sup>** 至少有一个是氢；或者

**R<sup>3</sup> 和 R<sup>4</sup>** 一起代表  $=\text{CH}_2$  或  $=\text{N}-\text{OH}$ ，或者

**R<sup>3</sup> 和 R<sup>4</sup>** 都代表氟；

**X** 是 O、S 或  $\text{CH}_2$ ；

**B** 表示式 B1 的 9-嘌呤基，



其中，

**R<sup>5</sup>** 是氢、羟基、烷基、烷氧基、烷硫基、 $\text{NHR}^8$ 、卤素或  $\text{SH}$ ；

**R<sup>6</sup>** 是羟基、 $\text{NHR}^8$ 、 $\text{NHOR}^9$ 、 $\text{NHN}^8$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{OR}^9$  或  $\text{SH}$ ；

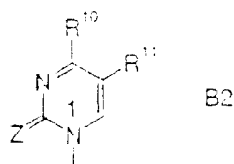
**R<sup>7</sup>** 是氢、羟基、烷基、烷氧基、烷硫基、 $\text{NHR}^8$ 、卤素、 $\text{SH}$  或氰基；

$R^8$  是氢、烷基、羟基烷基、芳基羰基或烷基羰基；

$R^9$  是氢或烷基；

$R^{9'}$  是烷基；或

B 表示式 B2 的 1-嘧啶基，



其中，

Z 是 O 或 S；

$R^{10}$  是羟基、 $NHR^8$ 、 $NHOR^9$ 、 $NHNR^8$ 、 $-NHC(O)OR^9$  或 SH；

$R^{11}$  是氢、烷基、羟基、羟基烷基、烷氧基烷基、卤代烷基或卤素；

$R^8$ 、 $R^9$  和  $R^{9'}$  如上所定义。

在其中 R 是磷酸酯基- $[P(O)(OH)-O]_nH$  的化合物中，n 优选为 1。磷酸酯基可以是稳定化的一磷酸酯前体药物或其它在体内施用时能够提供其中 R 是一磷酸酯的化合物的可药用的离去基团的形式。这些“前核苷酸”能够提高母体核苷酸的性质如活性、生物利用度或稳定性。

能够代替磷酸酯部分中的一个或多个氢的取代基的实例在 C. R. Wagner 等人, *Medicinal Research Reviews*, 2000, 20 (6), 417 或 R. Jones 和 N. Bischofberger, *Antiviral Research* 1995, 27, 1 中述及。这类前核苷酸包括烷基与芳基磷酸二酯、类固醇磷酸二酯、烷基与芳基磷酸三酯、环状烷基磷酸三酯、cyclosaligenyl (CycloSal) 磷酸三酯、S-酰基-2-硫代乙基 (SATE) 衍生物、二硫代乙基 (DTE) 衍生物、新戊酰氧基甲基磷酸酯、对-酰氧基苄基 (PAOB) 磷酸酯、甘油脂质 (glycerolipid) 磷酸二酯、糖基脂质 (glycosyl lipid) 磷酸三酯、二核苷基磷酸二酯、二核苷磷酸三酯、二氨基磷酸酯、环状氨基磷酸酯、氨基磷酸一酯和氨基磷酸二酯。

本发明还包括母体核苷的前体药物或生物前体，它们在体内被转化为其中 R 是氢或者  $R^2$ 、 $R^3$  和  $R^4$  至少有一个是羟基的式 I 化合物。优选



的前体药物衍生物包括羧酸酯，其中酯基的非羰基部分选自直链或支链烷基（例如甲基、正丙基、正丁基或叔丁基）、烷氧基烷基（例如甲氧基甲基）、芳烷基（例如苄基）、芳氧基烷基（例如苯氧基甲基）、芳基（例如任选被卤素、 $C_{1-4}$ 烷基或 $C_{1-4}$ 烷氧基或氨基取代的苯基）；磺酸酯如烷基磺酰基或芳基磺酰基（例如甲磺酰基）；氨基酸酯（例如L-缬氨酰或L-异亮氨酰），或其可药用的盐。制备是按照本领域已知的方法进行的，例如从有机化学教科书（例如J. March (1992), "高等有机化学：反应、机理和结构"，第四版, John Wiley & Sons）获知的方法。

本文所用的术语“烷基”表示含有1至12个碳原子的直链或支链烃基。优选地，术语“烷基”表示含有1至7个碳原子的直链或支链烃基。最优选的是甲基、乙基、丙基、异丙基、正丁基、异丁基、叔丁基或戊基。烷基可以是未取代的或取代的。取代基选自环烷基、硝基、氨基、烷基氨基、二烷基氨基、烷基羰基和环烷基羰基中的一个或多个。

本文所用的术语“环烷基”表示任选被取代的含有3至7个碳原子的环烷基，例如环丙基、环丁基、环戊基、环己基或环庚基。

本文所用的术语“烷氧基”表示任选被取代的直链或支链烷基-氧基，其中“烷基”部分如上所定义，如甲氧基、乙氧基、正丙氧基、异丙氧基、正丁氧基、异丁氧基、叔丁氧基、戊氧基、己氧基、庚氧基，包括它们的异构体。

本文所用的术语“烷氧基烷基”表示与如上所定义的烷基键合的如上所定义的烷氧基。实例有甲氧基甲基、甲氧基乙基、甲氧基丙基、乙氧基甲基、乙氧基乙基、乙氧基丙基、丙氧基丙基、甲氧基丁基、乙氧基丁基、丙氧基丁基、丁氧基丁基、叔丁氧基丁基、甲氧基戊基、乙氧基戊基、丙氧基戊基，包括它们的异构体。

本文所用的术语“链烯基”表示未取代或取代的烯链基团，其具有2至7个碳原子、优选2至4个碳原子，并且具有一个或两个烯属双键、优选一个烯属双键。实例有乙烯基、1-丙烯基、2-丙烯基（烯丙基）或2-丁烯基（巴豆基）。

本文所用的术语“炔基”表示未取代或取代的炔链基团，其具有2

至 7 个碳原子、优选 2 至 4 个碳原子，并且具有一个或可能的话两个叁键、优选一个叁键。实例有乙炔基、1-丙炔基、2-丙炔基、1-丁炔基、2-丁炔基或 3-丁炔基。

本文所用的术语“羟基烷基”表示如上所定义的直链或支链烷基，其中 1、2、3 或多个氢原子被羟基取代。实例有羟甲基、1-羟基乙基、2-羟基乙基、1-羟基丙基、2-羟基丙基、3-羟基丙基、羟基异丙基、羟基丁基等。

本文所用的术语“卤代烷基”表示如上所定义的直链或支链烷基，其中 1、2、3 或多个氢原子被卤素取代。实例有 1-氟甲基、1-氯甲基、1-溴甲基、1-碘甲基、三氟甲基、三氯甲基、三溴甲基、三碘甲基、1-氟乙基、1-氯乙基、1-溴乙基、1-碘乙基、2-氟乙基、2-氯乙基、2-溴乙基、2-碘乙基、2,2-二氟乙基、3-溴丙基或 2,2,2-三氟乙基等。

本文所用的术语“烷硫基”表示直链或支链(烷基)S-基团，其中“烷基”部分如上所定义。实例有甲硫基、乙硫基、正丙硫基、异丙硫基、正丁硫基、异丁硫基或叔丁硫基。

本文所用的术语“芳基”表示任选被取代的苯基和萘基（例如 1-萘基、2-萘基或 3-萘基）。适宜的芳基的取代基可以选自被称为烷基的那些取代基，不过除此之外可以选择的取代基有卤素、羟基和任选被取代的烷基、卤代烷基、链烯基、炔基和芳氧基。

本文所用的术语“杂环基”表示任选被取代的饱和、部分不饱和或芳香族的单环、双环或三环的杂环系统，其含有一个或多个选自氮、氧和硫的杂原子，也可以与任选被取代的饱和、部分不饱和或芳香族的单环碳环或杂环稠合。

适合的杂环的实例有咪唑基、异咪唑基、呋喃基、四氢呋喃基、1,3-二氧戊环基、二氢吡喃基、2-噻吩基、3-噻吩基、吡嗪基、异噻唑基、二氢噻唑基、嘧啶基、四唑基、1-吡咯烷基、2-吡咯烷基、3-吡咯烷基、吡咯烷酮基 (pyrrolidinoyl)、(N-氧化物)-吡啶基、1-吡咯基、2-吡咯基、三唑基（例如 1,2,3-三唑基或 1,2,4-三唑基）、1-吡唑基、2-吡唑基、4-吡唑基、哌啶基、吗啉基（例如 4-吗啉基）、硫代吗啉基（例如 4-硫代

吗啉基)、噻唑基、吡啶基、二氢噻唑基、咪唑烷基、吡唑啉基、哌嗪基、1-咪唑基、2-咪唑基、4-咪唑基、噻二唑基(例如1,2,3-噻二唑基)、4-甲基哌嗪基、4-羟基哌啶-1-基。

适宜的杂环基的取代基可以选自被称为烷基的那些取代基,不过除此之外可以选择的取代基有任选被取代的烷基、链烯基、炔基、氧代基(=O)或氨基磺酰基。

本文所用的术语“酰基”(“烷基羰基”)表示式  $C(=O)R$  基团,其中  $R$  是氢、未取代或取代的含有1至7个碳原子的直链或支链烷基,或苯基。最优选的酰基是那些其中  $R$  是氢、未取代的含有1至4个碳原子的直链或支链烷基或苯基的酰基。

术语卤素代表氟、氯、溴或碘,优选氟、氯、溴。

本发明中的术语“ $X$ ”代表  $O$ 、 $S$  或  $CH_2$ , 优选  $O$  或  $CH_2$ 。最优选的“ $X$ ”代表  $O$ 。

本发明中的术语“ $Z$ ”代表  $O$  或  $S$ , 优选  $O$ 。

在本申请所给出的化合物图示中,渐粗锥形线(——)表示位于不对称碳所属环平面之上的取代基,渐粗虚线(……)表示位于不对称碳所属环平面之下的取代基。

式 I 化合物可表现立体异构现象。这些化合物可以是式 I 化合物的任意异构体或这些异构体的混合物。具有一个或多个不对称碳原子的本发明化合物和中间体可以以其立体异构体的外消旋混合物形式获得,并可以对其进行拆分。

式 I 化合物可表现互变异构现象,这意味着本发明的化合物可以作为两种或多种能够灵活互变的化学上的化合物存在。在很多情况下,这仅表示氢原子在两个其它原子之间的交换,所述氢原子与这两个其它原子之一形成共价键。互变异构化合物彼此间存在动态平衡,所以制备各别物质的尝试通常导致混合物的生成,该混合物显示所有基于各组分结构的预期的化学与物理性质。

互变异构现象的最常见类型涉及羰基或酮类化合物和不饱和羟基化合物或烯醇。结构上的变化是氢原子在碳原子与氧原子之间的转移,

伴有键的重排。例如，在很多脂肪族醛和酮如乙醛中，酮形式占主导地位；在酚中，烯醇形式是主要的组分。

碱性的式 I 化合物可以与无机酸和有机酸生成可药用的盐，无机酸如氢卤酸（例如盐酸和氢溴酸）、硫酸、硝酸和磷酸等，有机酸例如乙酸、酒石酸、琥珀酸、富马酸、马来酸、苹果酸、水杨酸、枸橼酸、甲磺酸和对-甲苯磺酸等。这类盐的生成和分离可以按照本领域已知的方法进行。

优选的是这样的式 I 化合物的用途，其中

R 是氢；

R<sup>1</sup> 是烷基、链烯基、炔基、卤代烷基、烷基羰基、烷氧基、羟甲基、氰基、叠氮基、烷氧基亚氨基甲基、烷基羰基氨基、烷基氨基甲基或二烷基氨基甲基；

R<sup>2</sup> 是氢、羟基、烷氧基或卤素；

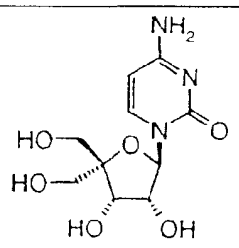
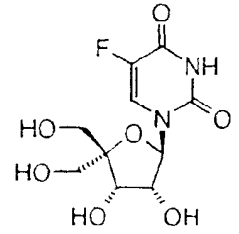
R<sup>3</sup> 和 R<sup>4</sup> 是氢、羟基、烷氧基、卤素或羟基烷基，条件是 R<sup>3</sup> 和 R<sup>4</sup> 至少有一个是氢；或者

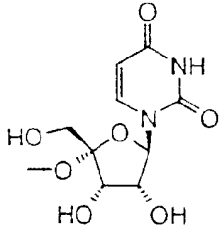
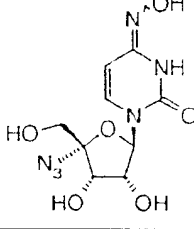
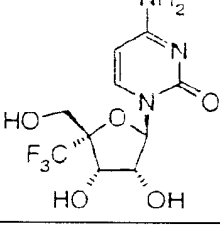
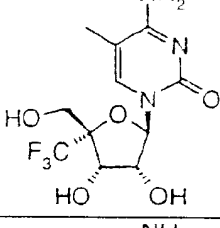
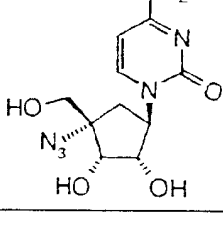
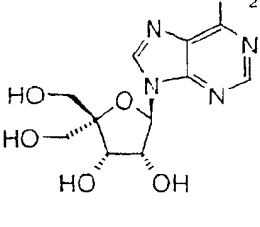
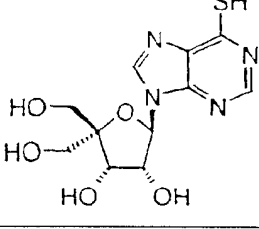
R<sup>3</sup> 和 R<sup>4</sup> 代表氟；

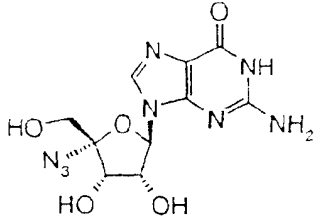
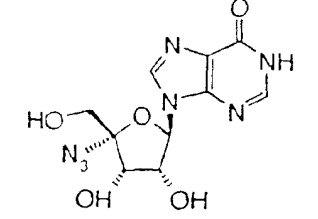
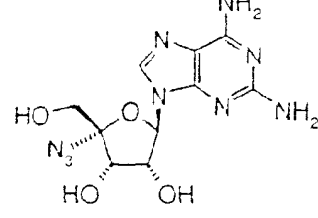
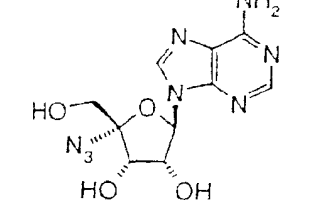
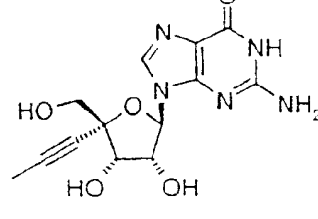
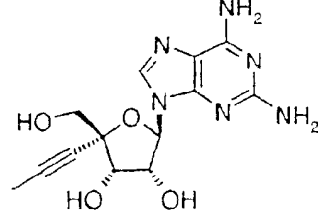
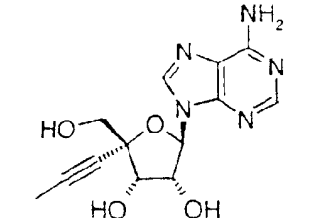
X 是 O 或 CH<sub>2</sub>；

B 表示如上所定义的 9-嘌呤基 B1 或 1-嘧啶基 B2。

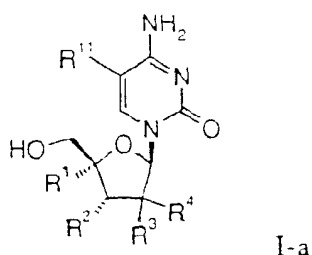
优选的化合物的实例列于下表。

化合物编号	结构	名称
化合物 6		4'-C-(羟甲基)胞苷
化合物 7		5-氟-4'-C-(羟甲基)尿苷

化合物 8		4'-C-甲氧基尿苷
化合物 10		(E 和/或 Z)-4'-C-叠氮基尿苷 4-肟
化合物 11		4'-C-(三氟甲基)胞苷
化合物 12		4'-C-(三氟甲基)-5-甲基胞苷
化合物 13		1-[4(S)-叠氮基-2(S),3(R)-二羟基-4-(羟甲基)-1(R)-环戊基]胞苷
化合物 14		4'-C-(羟甲基)腺苷
化合物 15		9-[4-C-(羟甲基)-β-D-呋喃核糖基]-6-巯基嘧啶

化合物 16		4'-C-叠氮基鸟苷
化合物 16-1		4'-C-叠氮基肌苷 (9-(5-叠氮基-3,4-二羟基-5-羟甲基-四氢呋喃-2-基)-1,9-二氢嘌呤-6-酮)
化合物 17		2-氨基-4'-C-叠氮基腺苷
化合物 18		4'-C-叠氮基腺苷
化合物 19		4'-C-(1-丙炔基)鸟苷
化合物 20		2-氨基-4'-C-(1-丙炔基)腺苷
化合物 21		4'-C-(1-丙炔基)腺苷

一组尤其优选的治疗 HCV 的化合物是那些式 I-a 的化合物和可药用的盐:



其中,

$R^1$  是烷基、链烯基、炔基、卤代烷基、烷基羰基、烷氧基、羟甲基、氰基、叠氨基、烷氧基亚氨基甲基、烷基羰基氨基、烷基氨基甲基或二烷基氨基甲基;

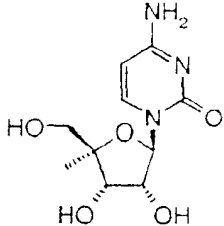
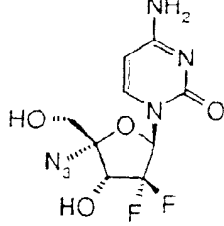
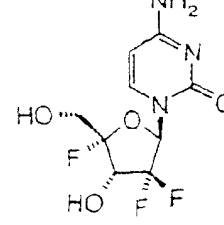
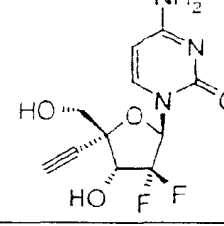
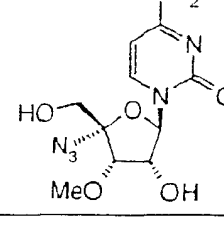
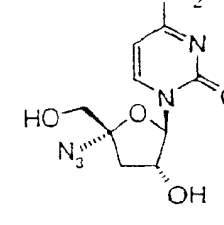
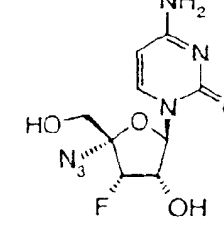
$R^2$  是氢、羟基、烷氧基或卤素;

$R^3$  和  $R^4$  是氢、羟基、烷氧基、卤素或羟基烷基, 条件是  $R^3$  和  $R^4$  至少有一个是氢; 或者

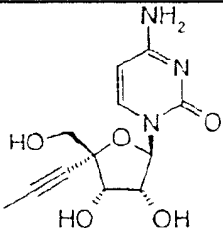
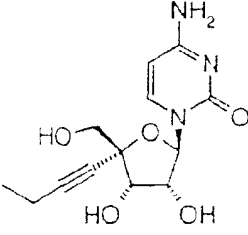
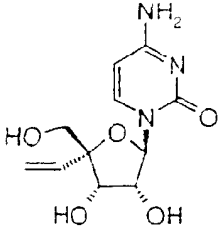
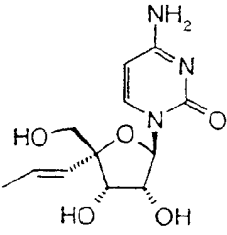
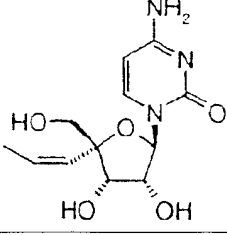
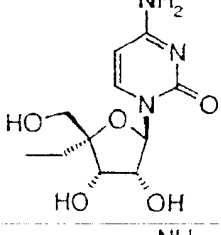
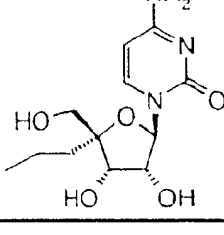
$R^3$  和  $R^4$  代表氟。

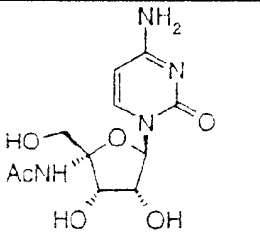
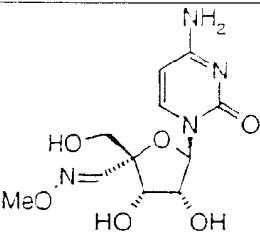
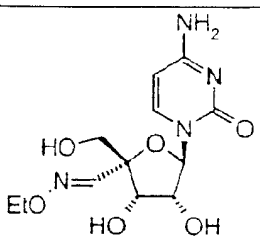
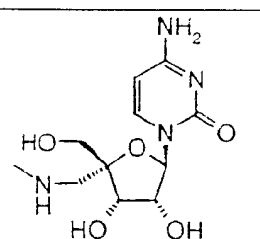
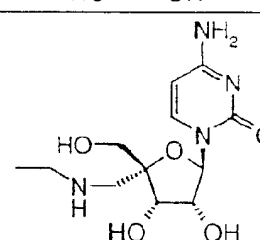
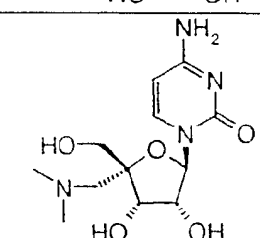
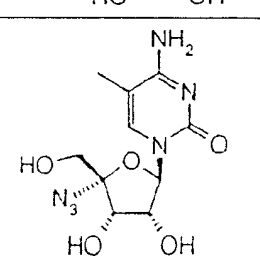
这类尤其优选的化合物的实例列于下表。

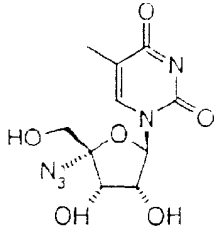
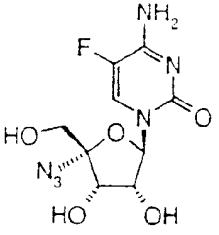
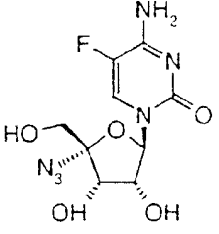
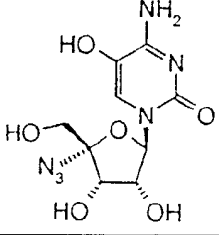
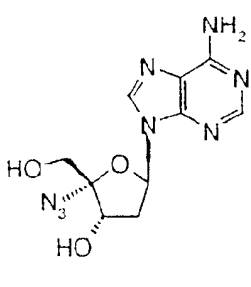
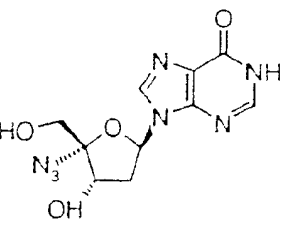
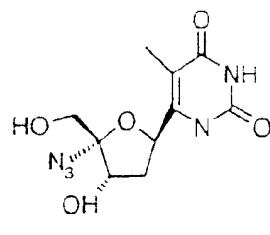
化合物编号	结构	名称
化合物 9		4'-C-甲氧基胞苷
化合物 22		4'-C-(氟甲基)胞苷

化合物 23		4'-C-甲基胞苷
化合物 24		4'-C-叠氮基-2'-脱氧-2',2'-二氟胞苷
化合物 25		2'-脱氧-4'-C-氟-2',2'-二氟胞苷
化合物 26		2'-脱氧-4'-C-乙炔基-2',2'-二氟胞苷
化合物 27		4'-C-叠氮基-3'-O-甲基胞苷
化合物 28		4'-C-叠氮基-3'-脱氧胞苷
化合物 29		4'-C-叠氮基-3'-脱氧-3'-氟胞苷

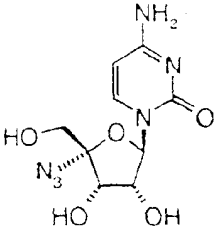
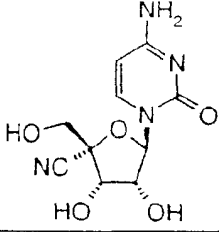
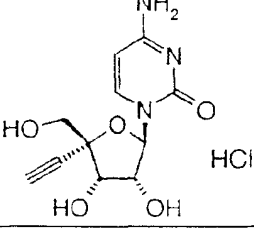
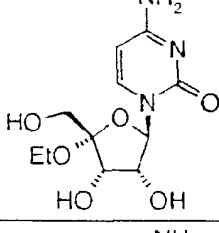
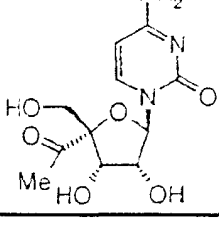


化合物 30		4'-C-(1-丙炔基)胞苷
化合物 31		4'-C-(1-丁炔基)胞苷
化合物 32		4'-C-乙炔基胞苷
化合物 33		(E)-4'-C-(1-丙烯基)胞苷
化合物 34		(Z)-4'-C-(1-丙烯基)胞苷
化合物 35		4'-C-乙基胞苷
化合物 36		4'-C-丙基胞苷

化合物 37	 <p>The structure shows a cytosine base attached to a ribose sugar at the 4' position. The cytosine has an amino group (NH<sub>2</sub>) at the 4-position and a carbonyl group (C=O) at the 2-position. The ribose sugar has hydroxyl groups (OH) at the 2' and 3' positions and an acetamido group (AcNH) at the 4' position.</p>	4'-C-乙酰氨基胞苷
化合物 38	 <p>The structure shows a cytosine base attached to a ribose sugar at the 4' position. The cytosine has an amino group (NH<sub>2</sub>) at the 4-position and a carbonyl group (C=O) at the 2-position. The ribose sugar has hydroxyl groups (OH) at the 2' and 3' positions and a methoxyamino group (MeO-N=) at the 4' position.</p>	(E)-4'-C-(甲氧基亚氨基)胞苷
化合物 39	 <p>The structure shows a cytosine base attached to a ribose sugar at the 4' position. The cytosine has an amino group (NH<sub>2</sub>) at the 4-position and a carbonyl group (C=O) at the 2-position. The ribose sugar has hydroxyl groups (OH) at the 2' and 3' positions and an ethoxyamino group (EtO-N=) at the 4' position.</p>	(E)-4'-C-(乙氧基亚氨基)胞苷
化合物 40	 <p>The structure shows a cytosine base attached to a ribose sugar at the 4' position. The cytosine has an amino group (NH<sub>2</sub>) at the 4-position and a carbonyl group (C=O) at the 2-position. The ribose sugar has hydroxyl groups (OH) at the 2' and 3' positions and a methylamino group (NH-CH<sub>3</sub>) at the 4' position.</p>	4'-C-[(甲氨基)甲基]胞苷
化合物 41	 <p>The structure shows a cytosine base attached to a ribose sugar at the 4' position. The cytosine has an amino group (NH<sub>2</sub>) at the 4-position and a carbonyl group (C=O) at the 2-position. The ribose sugar has hydroxyl groups (OH) at the 2' and 3' positions and an ethylamino group (NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) at the 4' position.</p>	4'-C-[(乙氨基)甲基]胞苷
化合物 42	 <p>The structure shows a cytosine base attached to a ribose sugar at the 4' position. The cytosine has an amino group (NH<sub>2</sub>) at the 4-position and a carbonyl group (C=O) at the 2-position. The ribose sugar has hydroxyl groups (OH) at the 2' and 3' positions and a dimethylamino group (N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) at the 4' position.</p>	4'-C-[(二甲氨基)甲基]胞苷
化合物 43	 <p>The structure shows a cytosine base attached to a ribose sugar at the 4' position. The cytosine has an amino group (NH<sub>2</sub>) at the 4-position and a carbonyl group (C=O) at the 2-position. The ribose sugar has hydroxyl groups (OH) at the 2' and 3' positions and an azido group (N<sub>3</sub>) at the 4' position. A methyl group (CH<sub>3</sub>) is attached to the 5-position of the cytosine ring.</p>	4'-C-叠氨基-5-甲基胞苷

化合物 43-1		4'-C-叠氮基-5-甲基尿苷
化合物 44		4'-C-叠氮基-5-氟胞苷
化合物 44-1		4'-C-叠氮基-5-氟尿苷
化合物 45		4'-C-叠氮基-5-羟基胞苷
化合物 46		4'-C-叠氮基-2'-脱氧腺苷
化合物 47		4'-C-叠氮基-2'-脱氧肌苷
化合物 48		4'-C-叠氮基-5-甲基尿苷

最优选的治疗 HCV 的化合物列于下表:

化合物编号	结构	名称
化合物 1 (实施例 1)		4'-C-叠氨基胞苷
化合物 2 (实施例 2)		4'-C-氰基胞苷
化合物 3 (实施例 3)		4'-C-乙炔基胞苷盐酸盐(1:1)
化合物 4		4'-C-乙氧基胞苷
化合物 5		4'-C-乙酰基胞苷

式 I 化合物可以通过通常为有机化学领域、尤其是核苷类似物合成领域已知的各种方法加以制备。合成原料易于从商业来源获得、或者是已知的、或者本身可以借助本领域已知的技术制备。核苷类似物制备的综述包括在下列出版物中:

A M Michelson "核苷和核苷酸的化学 (The Chemistry of Nucleosides 和 Nucleotides)", Academic Press, 纽约, 1963。

L Goodman "核酸化学的基本原理 (Basic Principles in Nucleic Acid Chemistry)" Ed P O P Ts'O, Academic Press, 纽约, 1974, 第1卷, 第2章。

"核酸化学的合成方法 (Synthetic Procedures in Nucleic acid Chemistry)" W W Zorbach 和 R S Tipson 编辑, Wiley, 纽约, 1973, 第1和2卷。

碳环核苷的合成已于 L Agrofoglio 等人, Tetrahedron, 1994, 50, 10611 中评述。

可用于合成式 I 化合物的方法包括:

- 1、有关核苷的修饰或互变; 或者
- 2、在糖基化之后构建杂环碱; 或者
- 3、被保护的呋喃糖、硫代呋喃糖或环戊烷衍生物与嘧啶 (B2) 或嘌呤 (B1) 碱的缩合。

这些方法进一步讨论如下:

- 1、有关核苷的修饰或互变。

这类方法一方面包括 9-嘌呤基或 1-嘧啶基的修饰, 或在另一方面包括碳水化合物部分的修饰。

A、嘌呤基或嘧啶基部分的修饰:

- a) 使氨基嘌呤或氨基嘧啶核苷脱氨基, 如 J. R. Tittensor 和 R. T. Walker, European Polymer J., 1968, 4, 39 和 H. Hayatsu, 核酸研究和分子生物学进展 (Progress in Nucleic Acid Research 和 Molecular Biology), 1976, 第16卷, 75页所述。
- b) 将 4-羟基嘧啶核苷的 4-羟基转化为离去基团, 再用亲核试剂置换。这类离去基团包括卤素, 如 J. Brokes 和 J. Beranek, Col. Czech. Chem. Comm., 1974, 39, 3100 所述, 或 1,2,4-三唑, 如 K. J. Divakar 和 C. B. Reece, J. Chem. Soc. Perkin Trans. I, 1982, 1171 所述。
- c) 利用 5-金属衍生物如 5-汞或 5-钡, 已经实现了嘧啶核苷的 5-取代, 例如 D. E. Bergstrom 和 J. L. Ruth, J. Amer. Chem. Soc., 1976, 98,

- 1587 所述。利用试剂如三氟甲基次氟酸酯可以在嘧啶核苷的 5-位引入氟, 如 M. J. Robins, *Ann New York Acad. Sci.* 1975, 255, 104 所述。
- d) 经过修饰的嘌呤核苷可以从对应的嘌呤核苷衍生物制备, 所述衍生物中的 2-、6-或 8-取代基是适宜的离去基团如卤素或磺酸酯或 1,3,4-三唑。6-取代的嘌呤核苷可以这样制备: 将适当的 6-卤代嘌呤或 6-(1,2,4-三唑-4-基)-嘌呤核苷衍生物用适当的亲核试剂处理, 如 V Nair 和 A. J. Fassbender, *Tetrahedron*, 1993, 49, 2169 和 V Samano, R. W. Miles 和 M. J. Robins, *J. Am. Chem. Soc.*, 1994, 116, 9331 所述。类似地, 8-取代的嘌呤核苷可以这样制备: 将对应的 8-卤代嘌呤核苷用适当的亲核试剂处理, 如 L. Tai-Shun、C. Jia-Chong、I. Kimiko 和 A. C. Sartorelli, *J. Med. Chem.*, 1985, 28, 1481; Nandan 等人, *J. Med. Chem.*, 1999, 42, 1625; J. Jansons、Y. Maurinsh 和 M. Lidaks, *Nucleosides Nucleotides*, 1995, 14, 1709 所述。8-氟基取代基的引入可以借助使用金属氟化物的置换作用完成, 如 I.-L. Gundersen, *Acta. Chem. Scand.* 1996, 50, 58 所述。2-修饰的嘌呤核苷可以以相似的方式制备, 如 T. Steinbrecher、C. Wamelung、F. Oesch 和 A. Seidl, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1993, 32, 404 所述。
- e) 若嘌呤核苷的 2-或 8-位取代基是经由碳-碳键连接的, 例如烷基, 则可以采用金属催化的交叉偶联工艺、从适当的 2-或 8-卤代嘌呤核苷类似物开始, 如 A. A. Van Aerschott 等人, *J. Med. Chem.*, 1993, 36, 2938; V. Nair 和 G. S. Buenger, *J. Am. Chem. Soc.*, 1989, 111 (22), 8502; C. Tu、C. Keane 和 B. E. Eaton, *Nucleosides Nucleotides*, 1995, 14, 1631 所述。

#### B、碳水化合物部分的修饰:

在引入与进一步的化学反应相容的保护基团之后:

- 可以将 4',5'-二脱氢核苷用叠氮化碘处理而在 4'-位引入叠氮化物, 例如 H. Maag 等人, *J. Med. Chem.*, 1992, 35, 1440 所述。将 4',5'-二脱氢核苷用碘处理、然后用醇和碳酸铅处理可在 4'-位引入醇化物, 例如 J. P. Verheyden 和 J. G. Moffatt, *J. Am. Chem. Soc.*, 1975, 97 (15),

4386 所述。将 4',5'-二脱氢核苷用碘处理,然后用氟化银(I)处理可在 4'-位引入氟化物,如 G. R. Owen 等人, *J. Org. Chem.*, 1976, 41 (8), 3010 或 A. Maguire 等人, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, 1993, 1 (15), 1795 所述。可以引入 4'-乙酰基,随后将其转化为多种取代基,包括但不限于 4'-卤代烷基、4'-乙炔基、4'-胍基甲基和 4'-氰基,例如 M. Nomura 等人, *J. Med. Chem.*, 1999, 42, 2901 所述。

- 可以对核苷类似物中 2'-羟基取代基或 3'-羟基取代基进行修饰。
- 通过与例如三苯基膦和四卤代烷烃的反应可将 3-羟基转化为离去基团如卤素,如例如 L. De Napoli 等人, *Nucleosides Nucleotides*, 1993, 12, 981 所述,然后通过还原得到 3-脱氧糖衍生物,如 D. G. Norman 和 C. B. Reese, *Synthesis* 1983, 304 所述。
- 通过转化为三氟甲磺酸酯基可将 3-羟基衍生化,然后用硼氢化钠还原,如 S. A. Surzhykov 等人, *Nucleosides Nucleotides*, 1994, 13 (10), 2283 所述。利用氟化剂如三氟化二乙氨基硫,可以完成氟取代基的直接引入,如 P. Herdewijn、A. Van Aerschot 和 L. Kerremans, *Nucleosides Nucleotides*, 1989, 8, 65 所述。
- 羟基取代基向离去基团如卤素或磺酸酯的转化也允许使用亲核试剂如氟化四丁铵、叠氮化锂或金属氟化物进行置换,例如 H. Hrebabecky、A. Holy 和 E. de Clercq, *Collect. Czech. Chem. Comm.* 1990, 55, 1800; K. E. B. Parkes 和 K. Taylor, *Tet. Lett.*, 1988, 29, 2995; H. M. Pfundheller 等人, *Helv. Chim. Acta*, 2000, 83, 128 所述。
- 2'-酮基核苷与氟化剂如三氟化二乙氨基硫的反应可以用于制备 2',2'-二氟核苷,如 D. Bergstrom、E. Romo 和 P. Shum, *Nucleosides Nucleotides*, 1987, 6, 53 所述。

## 2、在糖基化之后构建杂环碱。

- a) 那些例如利用呋喃糖基胺衍生物的方法,如 N. J. Cusack、B. J. Hildick、D. H. Robinson、P. W. Rugg 和 G. Shaw, *J. Chem. Soc. Perkin Trans., I*, 1973, 1720 或 G. Shaw、R. N. Warrenner、M. H.

Maguire 和 R. K. Ralph, *J. Chem. Soc.*, 1958, 2294 所述。

- b) 那些利用例如呋喃糖基脲合成嘧啶核苷的方法, 如 J. Šmejkal, J. Farkas 和 F. Šorm, *Coll. Czech. Chem. Comm.*, 1966, 31, 291 所述。
- c) 从咪唑核苷制备嘌呤核苷的方法参见 L. B. Townsend, *Chem. Rev.*, 1967, 67, 533。
- d) 其中 X 是  $\text{CH}_2$  的式 I 化合物的制备可以从 1-羟甲基-4-氨基环戊烷衍生物完成, 如 Y. F. Shealy 和 J. D. Clayton, *J. Am. Chem. Soc.*, 1969, 91, 3075; R. Vince 和 S. Daluge, *J. Org. Chem.*, 1980, 45, 531; R. C. Cermak 和 R. Vince, *Tet. Lett.*, 1981, 2331; R. D. Elliott 等人, *J. Med. Chem.*, 1994, 37, 739 所述。

### 3、被保护的呋喃糖、硫代呋喃糖或环戊烷衍生物与嘌呤或嘧啶衍生物的缩合。

被保护的呋喃糖、硫代呋喃糖或环戊烷衍生物与适当的嘌呤或嘧啶衍生物的缩合可以利用标准方法进行, 包括在溶剂如乙腈、1,2-二氯乙烷、二氯甲烷、氯仿或甲苯中, 在低温、环境温度或高温下, 使用路易斯酸催化剂如溴化汞或氯化锡或三甲基甲硅烷基三氟甲磺酸酯。被保护的呋喃糖或硫代呋喃糖

- 与嘌呤或嘧啶衍生物的重金属衍生物(例如氯汞基衍生物)的缩合反应的实例如 J Davoll 和 B. A. Lowry, *J. Am. Chem. Soc.*, 1951, 73, 1650; J. J. Fox, N. Yung, J. Davoll 和 G. B. Brown, *J. Am. Chem. Soc.*, 1956, 78, 2117 所述。
- 与烷氧基嘧啶的缩合反应的实例如 K. A. Watanabe, D. H. Hollenberg 和 J. J. Fox., *碳水化合物, 核苷和核苷酸 (Carbohydrates. Nucleosides and Nucleotides)*, 1974, 1, 1 所述。
- 与嘌呤或嘧啶的甲硅烷基衍生物的缩合反应的实例如 U. Niedballa 和 H. Vorbruggen, *J. Org. Chem.*, 1976, 41, 2084; U. Niedballa 和 H. Vorbruggen, *J. Org. Chem.*, 1974, 39, 3672; A. J. Hubbard, A. S. Jones 和 R. T. Walker, *Nucleic Acids Res.*, 1984, 12, 6827 所述。



此外,

- 全酰化糖与嘌呤在真空下、在对-甲苯磺酸存在下的稠合如 T. Simadate、Y. Ishudo 和 T. Sato, Chem. Abs., 1962, 56, 11 692 和 W. Pfleiderer、R. K. Robins, Chem. Ber. 1965, 98, 1511 所述。
- 缩合反应已经如 K. A. Watanabe、D. H. Hollenberg 和 J. J. Fox, 碳水化合物、核苷和核苷酸 (Carbohydrates Nucleosides and Nucleotides), 1974, 1, 1 所述。

被保护的环戊烷衍生物与适当的嘌呤衍生物或嘧啶衍生物的缩合反应的实例参见 H. Kapeller、H. Baumgartner 和 H. Griengl, Monatsh Chem., 1997, 128, 191 和 P. Wang 等人, Tet. Lett., 1997, 38, 4207, 或 T. Jenny 等人, Helv. Chim. Acta, 1992, 25, 1944。

这类方法经常生成端基异构核苷衍生物的混合物, 其可以借助本领域已知的标准技术如重结晶、柱色谱、高效液相色谱或超临界流体色谱进行分离。

用于上述缩合反应的嘌呤衍生物和嘧啶衍生物可以从商业来源获得或者可以通过本领域已知的工艺制备。

嘌呤衍生物的制备参见 G. Shaw "广义杂环化学 (Comprehensive Heterocyclic Chemistry)", Pergamon 出版社出版, 第 5 卷, 第 4.09 章, 499 页和"广义杂环化学 II", Pergamon 出版社出版, 第 7 卷, 第 7.11 章, 397 页。

嘧啶衍生物的制备参见 D. J. Brown "杂环化合物化学-嘧啶 (The Chemistry of Heterocyclic Compounds-The Pyrimidines)" 1962 和增刊 1, 1970, John Wiley 和 Sons 出版, 纽约; D. J. Brown, "广义杂环化学", Pergamon 出版社出版, 第 5 卷, 第 4.09 章, 499 页和 K. Unheim 和 T. Benneche, "广义杂环化学 II", Pergamon 出版社出版, 第 6 卷, 第 6.02 章, 第 93 页。

呋喃糖衍生物可以从市售可得的碳水化合物原料, 例如 D 型核糖、阿拉伯糖、木糖或来苏糖, 在引入化学上相容的保护基团后制得。

具有附着于呋喃糖 4-位的含碳取代基的 4-取代的呋喃糖可以从对应的 4-甲酰基呋喃糖制备, 所述取代基例如烷基、链烯基、炔基、卤代烷基、酰基、烷氧基羰基、羟基烷基、烷氧基烷基、氰基、胍基甲基、烷氧基亚氨基甲基、烷基氨基羰基和酰基。一种这类 4-甲酰基呋喃糖的制备在 H. Ohri 等人, *J. Med. Chem.*, 2000, 43, 5416 中述及。4-卤代烷基呋喃糖可以从对应的 4-羟甲基呋喃糖制备 (例如 K. Kitano 等人, *Tetrahedron*, 1997, 53 (39), 13315)。4-甲基呋喃糖可以通过 T. Waga 等人, *Biosci. Biotech. Biochem.* 1993, 19 (7), 408 所述的方法加以制备。

2,2-二氟呋喃糖衍生物可以从 D-葡萄糖或 D-甘露糖制备, 如 R. Fernandez, M. I. Mateu, R. Echarri 和 S. Castillon, *Tetrahedron*, 1998, 54, 3523 所述。硫代呋喃糖衍生物可以按照文献工艺如 L. Bellon, J. L. Barascut, J. L. Imbach, 核苷与核苷酸 (Nucleosides and Nucleotides), 1992, 11, 1467 所述工艺制备, 并且按照与上述呋喃糖类似物相似的方式加以修饰。

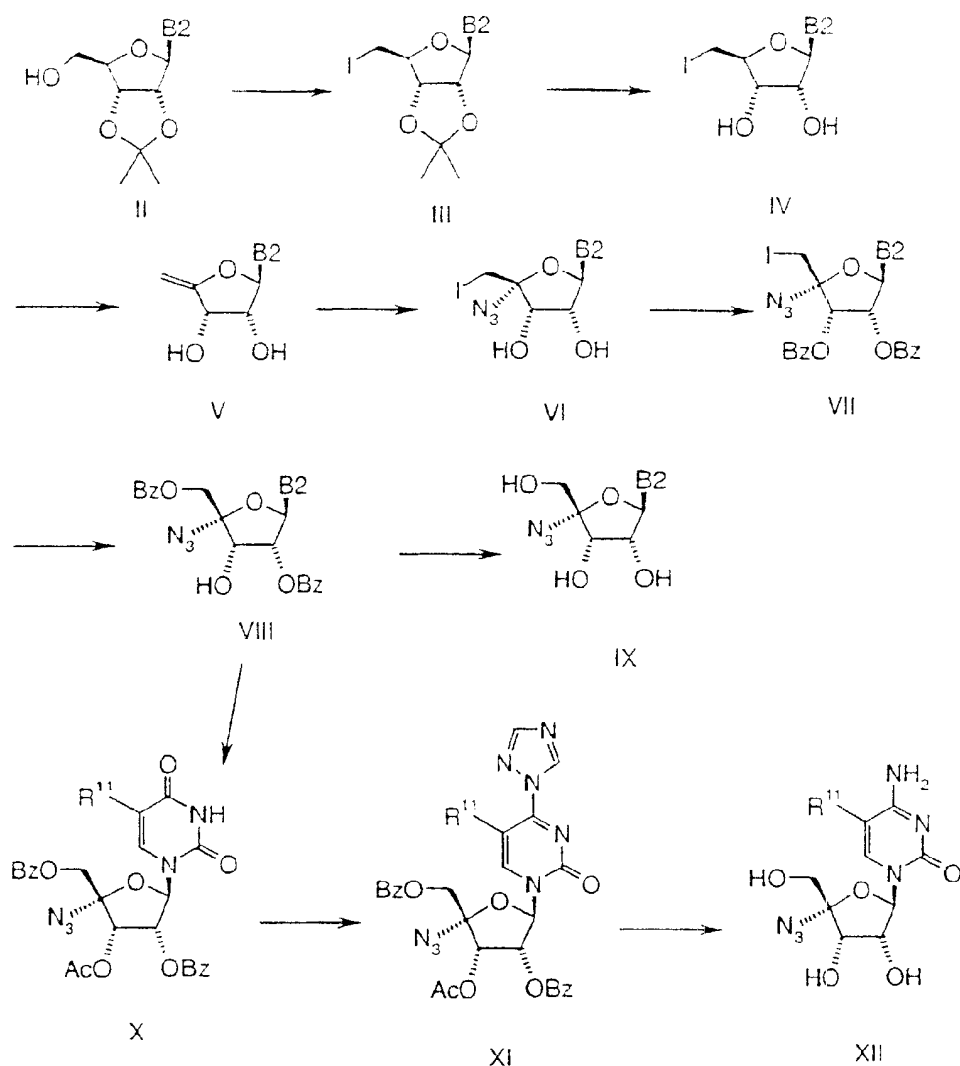
环戊烷衍生物可以通过有机化学领域已知的方法和 L. Agrofolio 等人, *Tetrahedron*, 1994, 50, 10611 中包括的方法和参考文献加以制备。

所研究的核苷衍生物为市售可得或者可按照上述方法合成。

以下更详细地描述了以上所讨论的方法:

其中  $R^1$  是  $N_3$ 、 $R^2$  和  $R^3$  是羟基且 B 是 B2 的式 I 化合物可以按照反应流程 A 制备:

## 流程 A



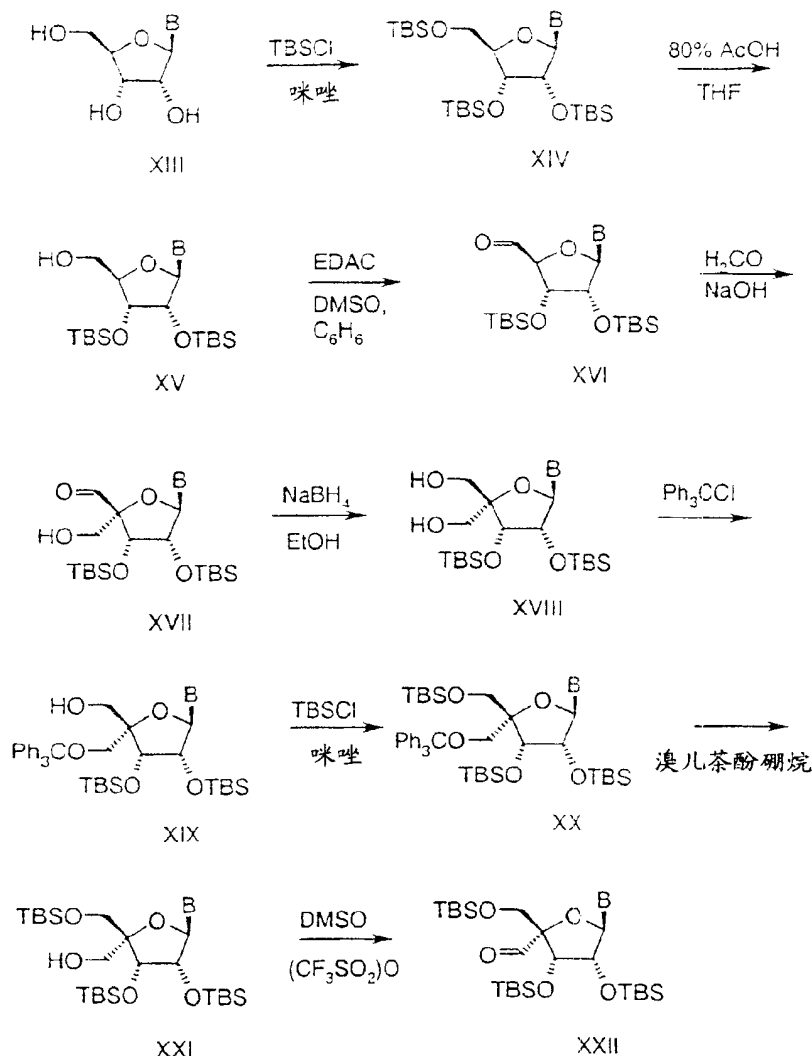
其中 Ac 是乙酰基，Bz 是苯甲酰基，R<sup>11</sup> 如上所定义。

式 II 化合物可以用三苯基膦、碘与吡啶的混合物碘化，例如 H. Maag 等人, *J. Med. Chem.*, 1992, 35, 1440 所述。丙酮化物保护基团可以通过用酸例如乙酸处理而除去，如 J. P. Verheyden 等人, *J. Org. Chem.*, 1970, 35 (7), 2319 所述，以得到式 III 的核苷。如 J. P. Verheyden 等人, *J. Org. Chem.*, 1974, 39 (24), 3573 所述，用乙酸酐和吡啶保护 2' 与 3' 羟基、用例如氟化银的吡啶溶液消除碘化氢和用氨的甲醇溶液除去

乙酰基保护基团之后，得到式 V 的 4',5'-二脱氢核苷。将叠氮化碘加成于双键可以通过用氯化碘和叠氮化钠在 N,N-二甲基甲酰胺中的混合物对 V 进行处理而完成，如 H. Maag 等人, *J. Med. Chem.*, 1992, 35, 1440 所述，以得到式 VI 的核苷。VI 中羟基的保护可以通过用苯甲酰氯的吡啶溶液对 VI 进行处理而完成，得到式 VII 的核苷，然后通过用间氯过苯甲酸的二氯甲烷溶液处理可以将其转化为式 VIII 的 5'-苯甲酰基核苷，然后可以用碱如甲醇钠的甲醇溶液脱保护，得到式 IX 的核苷，这些都如 H. Maag 等人, *J. Med. Chem.*, 1992, 35, 1440 所述。在其中式 VIII 化合物的 B2 是尿嘧啶或 5'-取代的尿嘧啶的情况下，在用乙酸酐和吡啶将 3'-羟基保护之后，可以按照 A. D. Borthwick 等人, *J. Med. Chem.*, 1990, 33 (1), 179 所述方法完成向对应的式 XII 胞苷的转化，其中可以用二氯磷酸 4-氯苯基酯和三唑处理式 X 的核苷，得到式 XI 的 4-三唑基核苷，然后将核苷 XI 用氨水处理，得到式 XII 的 5-取代的胞苷。

其中  $R^1$  是  $-C\equiv CH$ 、 $-CH=CHCl$ 、 $-CH=N-OH$ 、 $-CN$ ， $R^2$  和  $R^3$  是羟基且 B 是 B1 或 B2 的式 I 化合物可以按照反应流程 B 制备：

## 流程 B

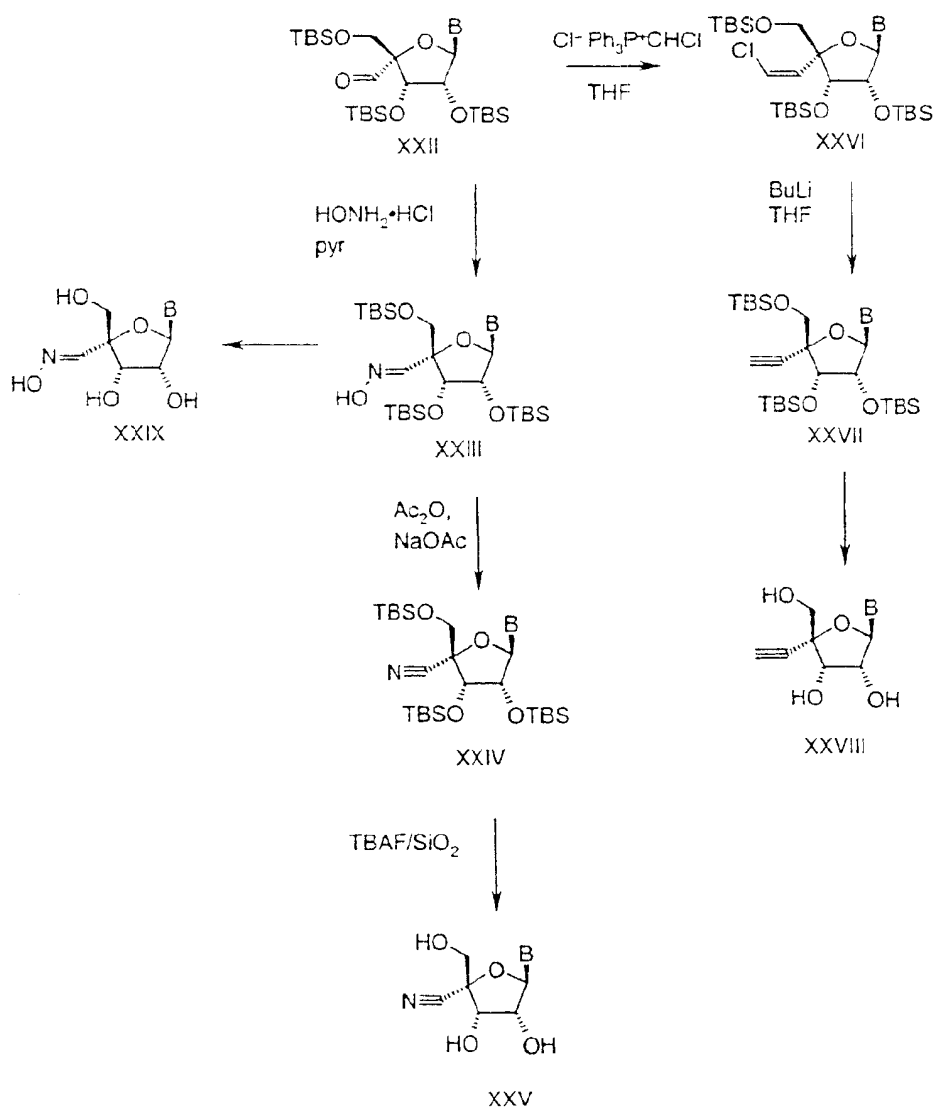


可以用氯化叔丁基二甲基甲硅烷 ( $\text{TBSCl}$ ) 和咪唑将式 XIII 化合物甲硅烷基化, 以得到式 XIV 的三叔丁基二甲基甲硅烷基化合物。5'-叔丁基二甲基甲硅烷基醚可以用 80% 乙酸脱保护, 得到 5'-羟基核苷 XV, 然后可以用 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 ( $\text{EDAC}$ ) 与二甲氧基亚砷 ( $\text{DMSO}$ ) 在适宜的溶剂例如苯中的混合物将其氧化为 5'-甲酰基核苷 XVI。用甲醛和氢氧化钠将 XVI 烷基化, 得到 4'-羟甲基化合物 XVII, 其可被还原为 4'-二羟甲基化合物 XVIII。用三苯甲基氯的吡

啶溶液选择性地保护核苷 $\alpha$ -平面上的羟甲基，得到 4'-三苯甲基化合物 XIX，然后用氯化叔丁基二甲基甲硅烷 (TBSCl) 和咪唑保护核苷 $\beta$ -平面上的羟甲基，得到式 XX 化合物。将三苯甲基用溴儿茶酚硼烷脱保护，得到 4'-羟甲基化合物 XXI，其可以用三氟甲磺酸酐和二甲基亚砷氧化以得到式 XXII 的 4'-甲酰基化合物。

式 XXII 的醛可以用作多种 4'-取代的核苷的原料，如流程 C 所述：

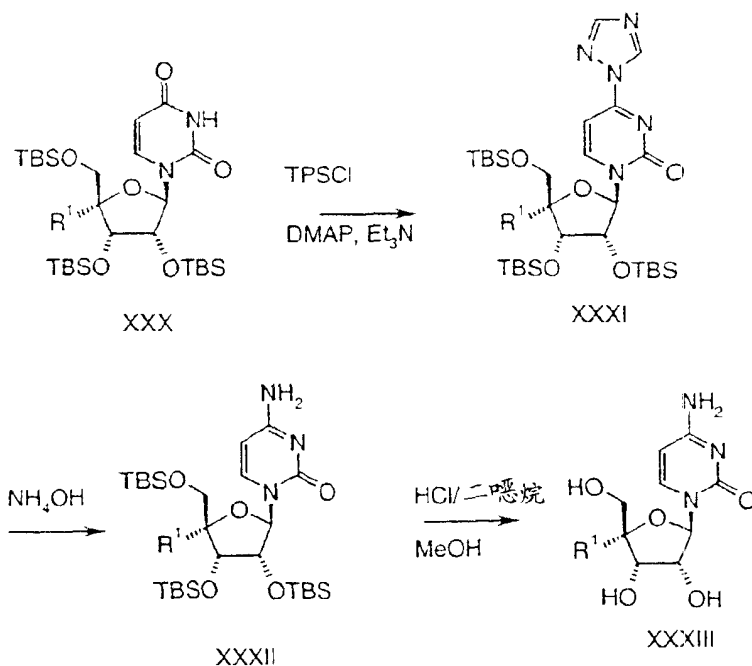
### 流程 C



将醛 XXII 用盐酸羟胺和吡啶处理，得到式 XXIII 的 4'-羟基亚胺。从化合物 XXIII 中除去水，得到式 XXIV 的 4'-氰基化合物。用氯化氯甲基磷和丁基锂处理式 XXII 的 4'-甲酰基化合物，得到 4'-(2-氯乙烯基)化合物 XXVI。用丁基锂处理化合物 XXVI，可导致氯化氢的消除，得到式 XXVII 的 4'-乙炔基化合物。从被氯化三叔丁基二甲基甲硅烷保护的化合物 XXIII、XXVII 和 XXIV 中除去甲硅烷基保护基团，可以利用氟化物源如氟化铵的甲醇溶液或者吸附在四氢呋喃中的硅胶上的氟化四丁铵，得到各自的 4'-取代的核苷 XXV、XXVIII 和 XXIX。

被适当保护的 4'-取代的尿苷（例如 XXIV 和 XXVII）可以按照反应流程 D 转化为对应的 4'-取代的胞苷：

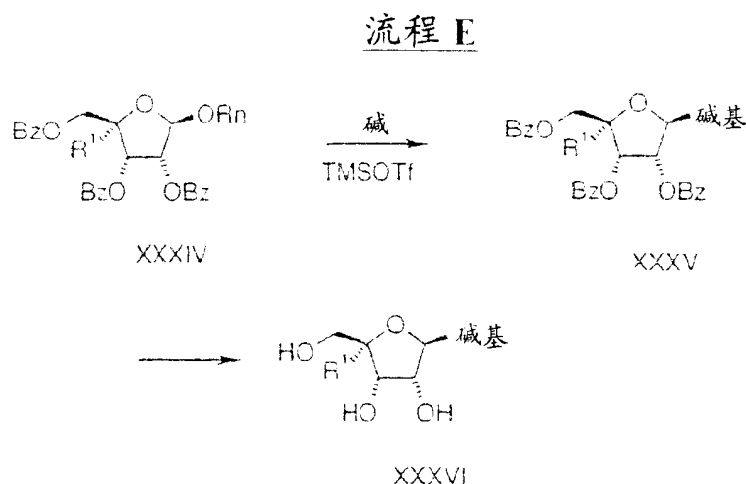
#### 流程 D



可以将式 XXX 的被三叔丁基二甲基甲硅烷基 (TBS) 保护的尿苷用三异丙基苯磺酰氯、三乙胺和二甲氨基吡啶处理，得到 4-三唑基核苷 XXXI。4-三唑基化合物 XXXI 可以用氨水转化为 4-氨基化合物 XXXII。将甲硅烷基用甲醇与盐酸在二噁烷中的混合物脱保护，得到胞苷衍生物 XXXIII。

其中  $R^1$  是烷氧基、 $R^2$  和  $R^3$  是羟基、B 是 9-嘌呤基 B1 或 1-嘧啶基 B2 的式 I 化合物可以按照 J. P. Verheyden 等人的美国专利 No. 3910885 所述工艺进行制备。

其中  $R^1$  是三氟甲基、甲基或乙炔基的式 II 化合物可以如反应流程 E 所述制备：



例如在路易斯酸例如三氟甲磺酸三甲基甲硅烷基酯 (TMSOTf) 或四氯化锡的存在下、在适当的溶剂例如乙腈或 1,2-二氯乙烷中, 使适当保护的 4'-取代的呋喃核糖苷 XXXIV 与甲硅烷基化的碱偶联, 得到式 XXXV 化合物。保护基团可以通过用碱例如甲醇钠、在相容性溶剂例如甲醇中对 XXXV 进行处理, 得到式 XXXVI 化合物。

L A Slotin, *Synthesis*, 1977, 737 已经综述了包括核苷在内的有机化合物的一磷酸化方法。最近, 其它核苷的磷酸化工艺已在 M Uchiyama 等人, *J. Org. Chem.*, 1993, 58, 373; R Caputo 等人, *Synlett.*, 1997, 739 和 M Taktakishvili 和 V Nair, *Tet. Lett.* 2000, 41, 7173 中描述。其它可用于核苷的一磷酸化工艺在 C E McKenna 和 J Schmidhauser, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1979, 739 以及 J K Stowell 和 T S Widlanski, *Tet. Lett.*, 1995, 1825 中述及。二与三磷酸酯衍生物的合成参见 K H Scheit, *Nucleotide Analogues*, 1980, Wiley Interscience 以及 K Burgess 和 D Cook, *Chemical Reviews*, 2000, 100, 2047。

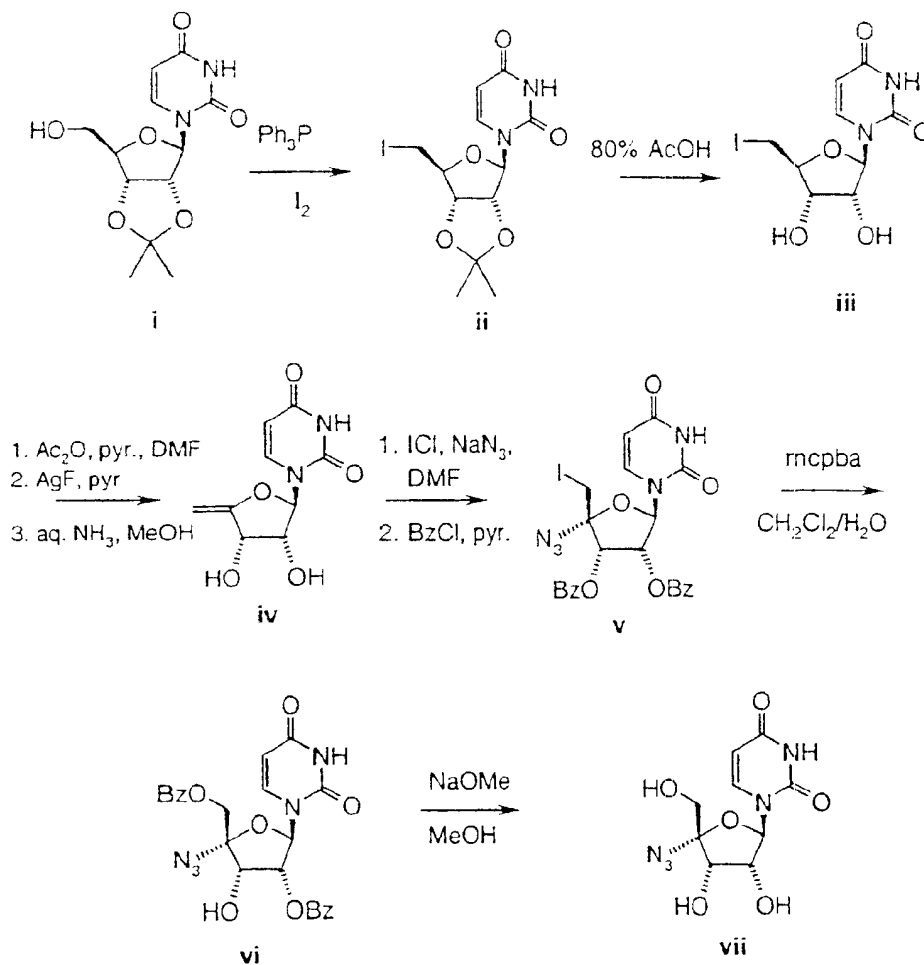


下列实施例阐述了式 I 化合物的制备方法:

### 实施例 1

按照流程 1 和 1a 的方法制备了化合物 1,

#### 流程 1



#### 1.1 化合物(i)

化合物(i)购自 Lancaster (Cat. no.: 206-647-7, CAS 362-43-6)。

#### 1.2 化合物(ii)

向含有吡啶 (0.65ml, 8.0mmol) 的化合物(i) (1.14g, 4.0mmol) 的二噁烷 (20ml) 溶液中加入三苯基膦 (1.57g, 6.0mmol) 和碘 (1.52g, 6.0mmol)。将混合物搅拌过夜并用甲醇 (1ml) 猝灭。在真空中蒸发溶剂。将残余物溶于乙酸乙酯 (200ml), 用水 (100ml)、10% 硫代硫酸钠

水溶液 (100ml)、盐水 (100ml) 洗涤并用无水硫酸镁干燥。过滤除去硫酸镁, 在真空中蒸发滤液。残余物经过硅胶快速柱色谱纯化、用 1:1 乙酸乙酯/汽油洗脱, 得到化合物(ii), 为无色的油状物, 其缓慢固化为无色蜡状固体 (1.5g); 质谱 (CI)  $m/z$  395  $[M+H]^+$ 。

### 1.3 化合物(iii)

化合物(iii)是从化合物(ii)制备的, 如 J. P. Verheyden 等人, *J. Org. Chem.*, 1970, 35 (7), 2319 所述。

### 1.4 化合物(iv)

化合物(iv)是从化合物(iii)制备的, 如 J. P. Verheyden 等人, *J. Org. Chem.*, 1974, 39 (24), 3573 所述。

### 1.5 化合物(v)

化合物(v)是从化合物(iv)制备的, 如 H. Maag 等人, *J. Med. Chem.*, 1992, 35, 1440-1451 所述。

### 1.6 化合物(vi)

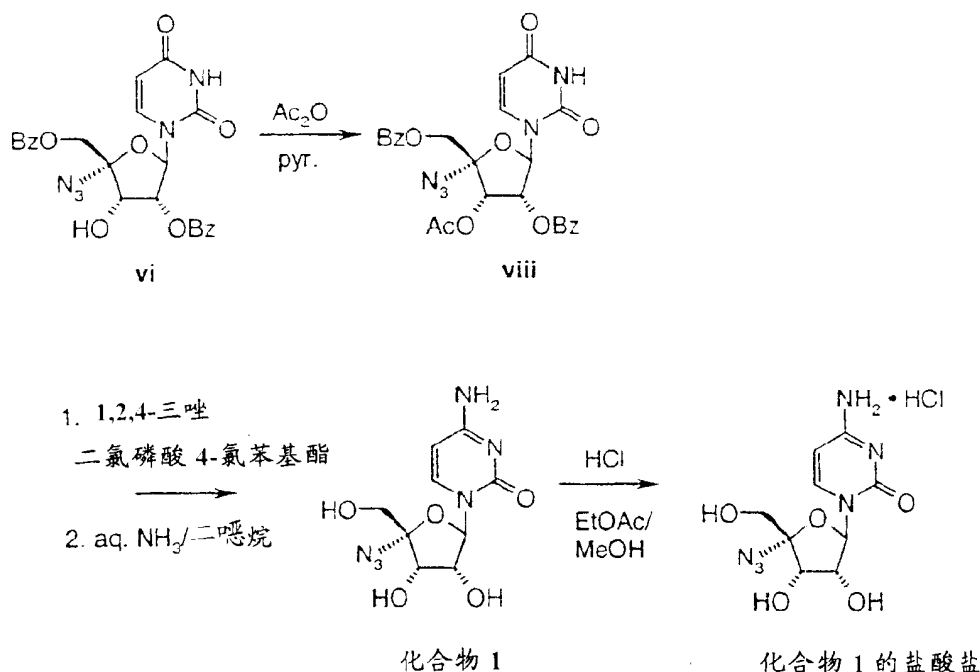
向化合物(v) (482mg, 0.80mmol) 的水饱和二氯甲烷溶液 (10ml) 中加入 55% 间氯过苯甲酸 (1.0g, 4.95mmol)。将混合物搅拌 2 小时。加入另外的间氯过苯甲酸 (0.50g), 将混合物继续搅拌 3 小时。加入乙酸乙酯 (100ml), 将溶液用 10% 偏亚硫酸氢钠溶液 (50ml)、然后用饱和碳酸氢钠溶液 (50ml) 洗涤。乙酸乙酯层经无水硫酸镁干燥。过滤除去硫酸镁并在真空中蒸发滤液。残余物经过快速色谱纯化、用 1:1 乙酸乙酯/汽油洗脱, 得到化合物(vi), 为无色玻璃状物质 (200mg); 质谱 (ESI)  $m/z$  535  $[M+H+CH_3CN]^+$ 。

### 1.7 化合物(vii)

向化合物(vi) (170mg, 0.35mmol) 的甲醇 (2ml) 溶液中加入甲醇钠的甲醇溶液 (0.5M, 0.5ml)。将溶液在室温下搅拌 2 小时。用离子交换树脂 (Amberlite IRC 50 ( $H^+$ ), Aldrich, cat. no. 42, 883-3) 中和溶液并搅拌 10 分钟。过滤除去树脂。在真空中蒸发滤液并使残余物经快速色谱纯化、用 1:1 乙酸乙酯/丙酮洗脱, 得到无色油状物。用乙酸乙酯研磨, 得到化合物(vii), 为无色固体 (35mg); 质谱 (CI)  $m/z$  286  $[M+H]^+$ 。

叠氮基尿苷衍生物向对应的叠氮基胞苷衍生物（化合物 1）及其盐酸盐的转化如流程 1a 所述。

### 流程 1a



### 1.8 化合物(viii)

向化合物(vi) (460mg, 0.93mmol) 的吡啶 (3ml) 溶液中加入乙酸酐 (1ml) 并将混合物搅拌 4 小时。加入乙酸乙酯 (100ml), 将混合物用 2N HCl (50ml)、然后用饱和碳酸氢钠溶液 (50ml) 洗涤。溶液经无水硫酸镁干燥。过滤除去硫酸镁并在真空中蒸发滤液。残余物经过快速色谱纯化、用 1:1 乙酸乙酯/汽油洗脱, 得到化合物(viii), 为无色的胶状物 (350mg); 质谱 (ESI)  $m/z$  536  $[M+H]^+$ 。

### 1.9 化合物 1

向化合物(viii) (1.5g, 2.8mmol) 的吡啶 (20ml) 溶液中加入 1,2,4-三唑 (0.97g, 14mmol)。然后在搅拌下滴加二氯磷酸 4-氯苯基酯 (1.36ml, 8.4mmol)。将混合物搅拌 16 小时。加入乙酸乙酯 (300ml) 并用饱和碳酸氢钠溶液 (200ml) 洗涤混合物。溶液经无水硫酸镁干燥。过滤除去硫酸镁并在真空中蒸发滤液。残余物经过快速色谱纯化、用 2:1 乙酸乙酯/汽油洗脱, 得到黄色泡沫 (850mg)。将泡沫用二噁烷 (8ml)、然后

用氨水溶液 (16ml) 处理并搅拌 16 小时。在真空中蒸发滤液, 并使残余物经过快速色谱纯化、用 90:18:3:2 的二氯甲烷/甲醇/乙酸/水洗脱, 得到化合物 1, 为浅褐色泡沫 (350mg); 质谱 (FAB)  $m/z$  285  $[M+H]^+$ 。

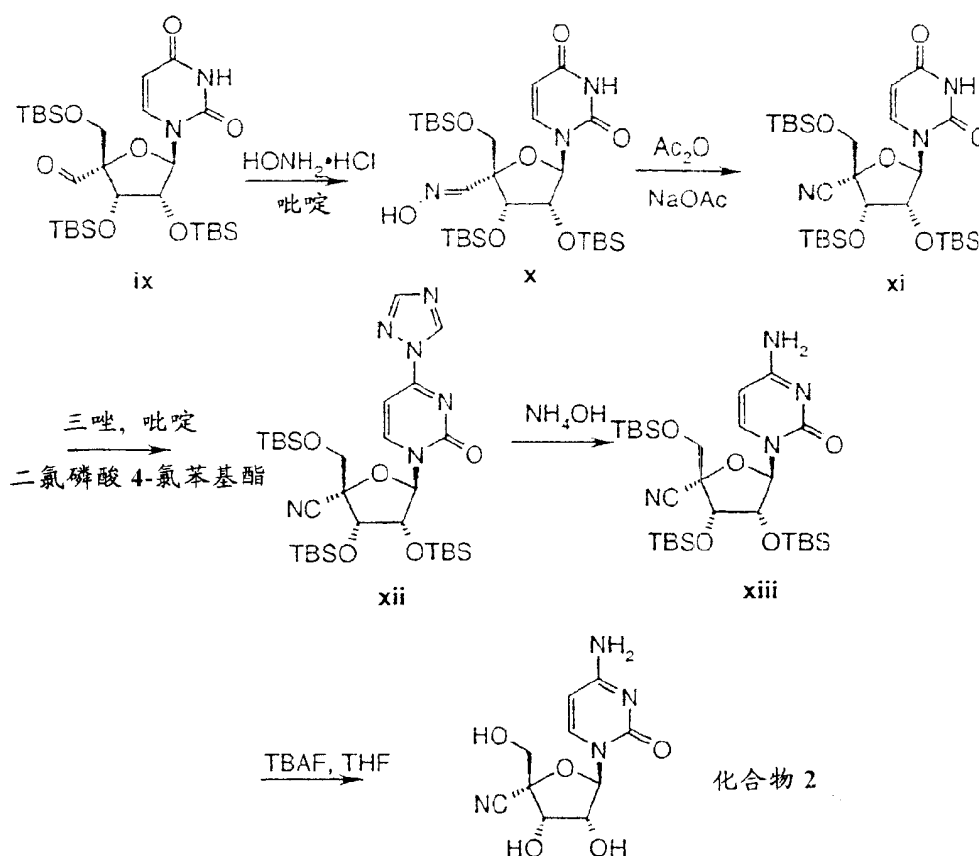
### 1.10 化合物 1 的盐酸盐

将化合物 1 (0.40g) 溶于甲醇并用氯化氢的乙酸乙酯溶液处理。分离产物, 为微晶固体, 过滤收集并在真空中干燥, 得到化合物 1 的盐酸盐 (0.22g); 质谱 (ESI)  $m/z$  285  $[M+H]^+$ 。

## 实施例 2

化合物 2 的制备按照流程 2 的方法进行。

### 流程 2



### 2.1 化合物(ix)

化合物(ix)是从化合物(xiv)制备的, 见实施例 3, 如 M. Nomura 等人, J. Med. Chem., 1999, 42, 2901-2908 所述。

## 2.2 化合物(x)

将(ix) (600mg, 0.98mmol) 与盐酸羟胺 (140mg, 1.95mmol) 在吡啶中的混合物在室温下搅拌 2 小时。在真空中蒸发反应混合物并使残余物在乙酸乙酯 (30ml) 与水 (30ml) 之间分配。分离乙酸乙酯层并用无水硫酸镁干燥。过滤除去硫酸镁并在真空中蒸发滤液, 得到化合物(x), 为白色泡沫 (615mg); 质谱 (ESI)  $m/z$  630  $[M+H]^+$ 。

## 2.3 化合物(xi)

将化合物(x) (550mg, 0.87mmol) 与乙酸钠 (720mg, 5.25mmol) 的混合物悬浮于乙酸酐中, 然后在 130°C 下加热 3 小时。在真空中蒸发反应混合物并使残余物在乙酸乙酯 (30ml) 与饱和碳酸氢钠 (30ml) 之间分配。分离乙酸乙酯层并用无水硫酸镁干燥。过滤除去硫酸镁, 在真空中蒸发滤液。残余物经硅胶快速柱色谱纯化、用 1:2 二乙醚/己烷洗脱。合并含有产物的部分并在真空中蒸发, 得到化合物(xi), 为无色固体 (285mg); 质谱 (ESI)  $m/z$  612  $[M+H]^+$ 。

## 2.4 化合物(xii)

向化合物(xi) (200mg, 0.33mmol) 与 1,2,4-三唑 (115mg, 1.63mmol) 的无水吡啶 (5ml) 溶液中滴加二氯磷酸 4-氯苯基酯 (160 $\mu$ l, 0.98mmol), 然后在室温下搅拌 16 小时。在真空中蒸发反应混合物并使残余物在乙酸乙酯 (30ml) 与 2M 盐酸 (30ml) 之间分配。分离乙酸乙酯层, 用饱和碳酸氢钠 (30ml) 洗涤并用无水硫酸镁干燥。过滤除去硫酸镁并在真空中蒸发。残余物经过硅胶快速柱色谱纯化、用 1:1 二乙醚/己烷、然后用 2:1 二乙醚/己烷洗脱。合并含有产物的部分并在真空中蒸发, 得到 (xii), 为膏状固体 (65mg); 质谱 (ESI)  $m/z$  663  $[M+H]^+$ 。

## 2.5 化合物(xiii)

将化合物(xii) (60mg, 0.09mmol) 与氨水 (2ml) 的乙腈溶液在室温下搅拌 16 小时。在真空中蒸发反应混合物并使残余物在乙酸乙酯 (10ml) 与 2M 盐酸 (10ml) 之间分配。分离乙酸乙酯层并用硫酸镁干燥。过滤除去硫酸镁并在真空中蒸发, 得到化合物(xiii), 为淡黄色固体 (45mg); 质谱 (ESI)  $m/z$  611  $[M+H]^+$ 。

## 2.6 化合物 2

向搅拌状态下的化合物(xiii) (40mg, 0.06mmol) 的干燥四氢呋喃 (10ml) 溶液中加入氟化四丁铵 (1M THF 溶液, 0.3ml) 并在室温下搅拌 2 小时。在真空中蒸发除去溶剂。将残余物用吡啶 (1ml)、然后用乙酸酐 (0.3ml) 处理并在室温下搅拌 4 小时。在真空中蒸发除去溶剂。将残余物用乙酸乙酯 (50ml) 处理, 用稀盐酸 (30ml)、然后用 5% 碳酸氢钠水溶液洗涤。乙酸乙酯层经无水硫酸镁干燥。过滤除去硫酸镁并在真空中蒸发滤液。残余物经快速柱色谱纯化、用乙酸乙酯洗脱, 得到油状物。将油溶于甲醇 (1ml) 并用甲醇钠 (0.5M 甲醇溶液, 0.05ml) 处理, 在室温下放置 3 小时。混合物用离子交换树脂 (Amberlite IRC 50 (H<sup>+</sup>)) 中和。过滤除去树脂并在真空中蒸发滤液。将残余物溶于水, 冷冻干燥, 得到化合物 2, 为无定形固体 (7mg)。

## 2.7 通过化合物(xi)的脱保护, 可以制备对应的 4'-氟基尿苷。

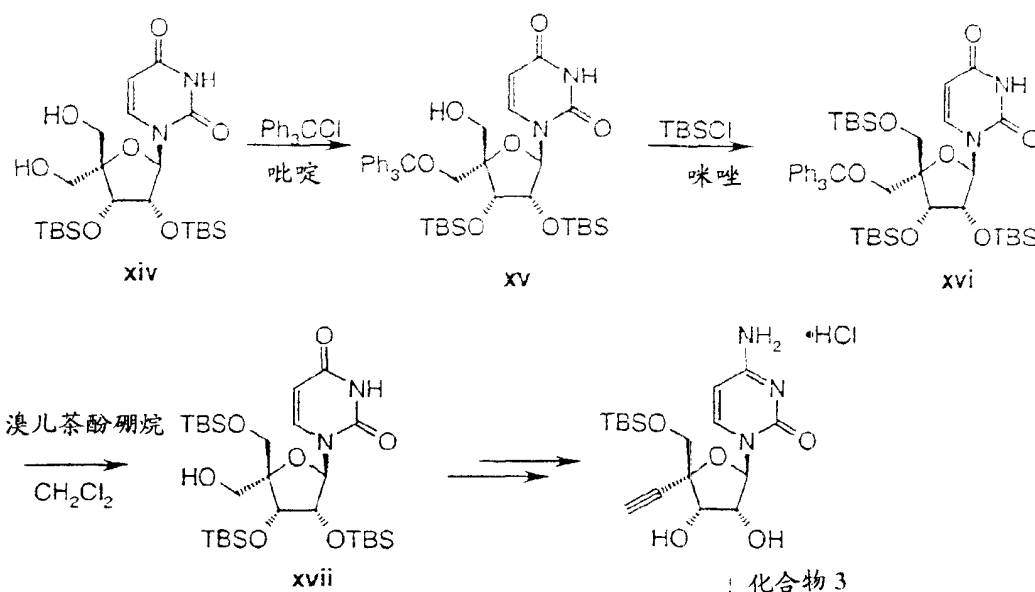
脱保护可以如下进行:

将化合物(xi) (50mg, 82 $\mu$ mol) 溶于四氢呋喃, 用带有氟化四丁铵的硅胶处理, 然后在室温下搅拌 16 小时。使反应混合物通过 Hyflo Super Cel (Fluka, cat no. 56678) 进行过滤, 在真空中蒸发, 然后经硅胶快速柱色谱纯化、用二氯甲烷/甲醇/乙酸/水 (240:24:3:2)、然后用二氯甲烷/甲醇/乙酸/水 (90:18:3:2) 洗脱。合并含有产物的部分并使之蒸发。将残余物溶于甲醇/水 (5:1), 用 Duolite C225 离子交换树脂 (H<sup>+</sup>型, BDH, cat. no. 56678) 处理并搅拌 15 分钟。过滤除去树脂并在真空中蒸发滤液至小体积。过滤收集产物, 在真空中干燥, 得到 4'-氟基尿苷, 为白色结晶性固体 (15mg); 质谱 (ESI) m/z 270 [M+H]<sup>+</sup>。

## 实施例 3

化合物 3 的制备, 按照流程 3 的方法进行。

### 流程 3



#### 3.1 化合物(xiv)

该化合物按照 M. Nomura 等人, *J. Med. Chem.*, 1999, 42, 2901-2908 所述方法制备。

#### 3.2 化合物(xv)

向化合物(xiv) (3.0g, 6.0mmol) 的吡啶 (20ml) 溶液中加入三苯甲基氯 (3.2g, 11.5mmol), 在室温下搅拌 16 小时。在真空中蒸发溶剂并使残余物在乙酸乙酯 (50ml) 与 2M 盐酸 (50ml) 之间分配。分离乙酸乙酯层, 用盐水 (50ml) 洗涤并用无水硫酸镁干燥。过滤除去硫酸镁, 在真空中蒸发滤液。粗产物经硅胶快速柱色谱纯化、用 2:1 二乙醚/己烷洗脱。合并含有产物的部分并在真空中蒸发, 得到化合物(xv), 为白色固体 (2.75g); 质谱 (ESI)  $m/z$  767  $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

#### 3.3 化合物(xvi)

向搅拌状态下的化合物(xv) (2.75g, 3.7mmol) 的二甲基甲酰胺 (20ml) 溶液中加入氯化叔丁基二甲基甲硅烷 (0.67g, 4.4mmol) 和咪唑 (0.91g, 13.3mmol)。将反应物加热至  $45^\circ\text{C}$  达 16 小时。加入另外的氯化叔丁基二甲基甲硅烷 (0.67g, 4.4mmol) 和咪唑 (0.91g, 13.3mmol) 并将混合物加热至  $60^\circ\text{C}$  达 4 小时。在真空中蒸发除去溶剂并使残余物在乙酸乙酯与盐水之间分配。分离乙酸乙酯层, 用更多的盐水洗涤并用

无水硫酸镁干燥。过滤除去硫酸镁，在真空中蒸发滤液。残留的无色泡沫经硅胶快速柱色谱纯化、用 1:2 二乙醚/己烷洗脱。合并含有产物的部分并在真空中蒸发，得到化合物(xvi)，为白色固体 (3.1g)。

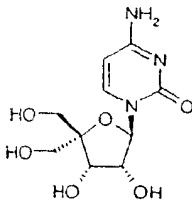
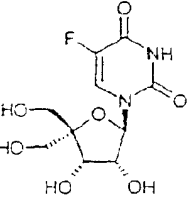
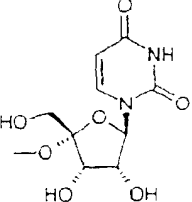
### 3.4 化合物(xvii)

在 0°C、氮气氛下，向搅拌着的化合物(xvi) (1.5g, 1.77mmol) 的无水二氯甲烷 (50ml) 溶液中加入溴儿茶酚硼烷 (355mg, 1.77mmol)。将反应物搅拌 15 分钟，用二氯甲烷 (50ml) 稀释，然后用饱和碳酸氢钠 (100ml) 和盐水 (100ml) 洗涤。二氯甲烷层经无水硫酸镁干燥。过滤除去硫酸镁，在真空中蒸发滤液。残余物经过硅胶快速柱色谱纯化，用 1:1 二乙醚/己烷洗脱。合并含有产物的部分，在真空中蒸发，得到化合物(xvii)，为白色固体 (930mg)。

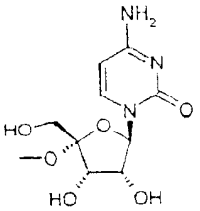
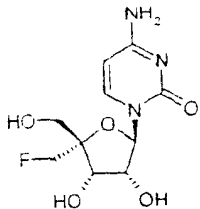
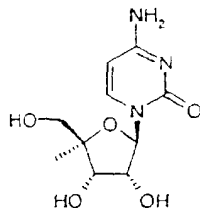
### 3.5 化合物 3

化合物 3 是从化合物(xvii)制备的，如 M. Nomura 等人, *J. Med. Chem.*, 1999, 42, 2901-2908 所述。

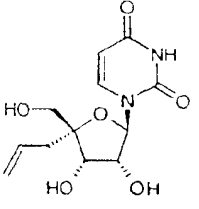
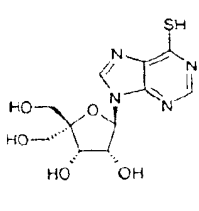
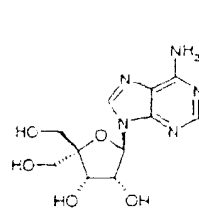
按照本领域所述方法可以制备其它化合物，例如：

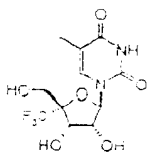
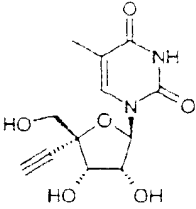
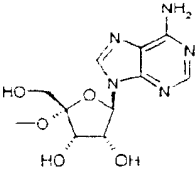
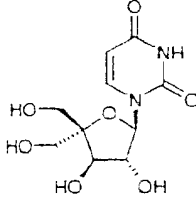
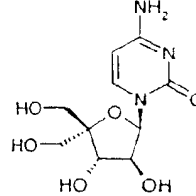
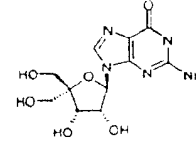
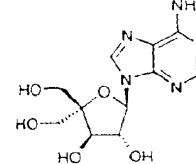
化合物编号	结构	名称和制备方法
化合物 6		4'-C-(羟甲基)胞苷 G. H. Jones 等人, <i>J. Org. Chem.</i> , 1979, 44(8), 1309
化合物 7		5-氟-4'-C-(羟甲基)尿苷 Youssefyeh 等人, <i>J. Org. Chem.</i> , 1979, 44, 1301
化合物 8		4'-C-甲氧基尿苷 J. A. Cook 和 J. L. Secrist, <i>J. Am. Chem. Soc.</i> , 1979, 101, 1554

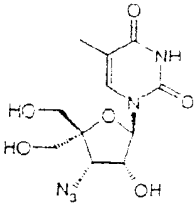
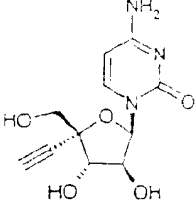
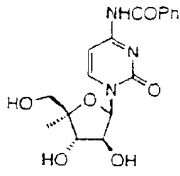
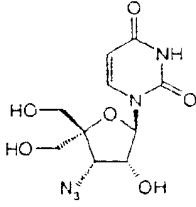
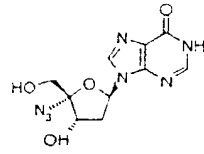


化合物 9		4'-C-甲氧基胞苷 J. G. Moffatt 和 J. P. Verheyden, 美国 专利 No. 3910885
化合物 22		4'-C-(氟甲基)胞苷 K. Kitano 等人, Tetrahedron, 1997, 53(39), 13315
化合物 23		4'-C-甲基胞苷 T. Waga 等人, J. Biosci. Biotechnol. Biochem., 1993, 57(9), 1433

按照与以下所述现有技术中的方法类似的方法, 可以制备另外的式  
I 化合物:

	4'-C-烯丙基尿苷 J. Secrist 等人, J. Am. Chem. Soc., 1978, 100, 2554
	9-[4-C-(羟甲基)-β-D-呋喃核糖基]-6-巯基嘌呤 Youssefyeh 等人, J. Org. Chem., 1979, 44, 1301
	4'-C-(羟甲基)腺苷 A. Rosenthal 和 M. Ratcliffe, Carbohydr. Res., 1977, 54, 61

	<p>4'-C-(三氟甲基)-5-甲基尿苷 J. Kozak 和 C. R. Johnson, 1998, 17(12), 2221</p>
	<p>4'-C-(乙炔基)-5-甲基尿苷 R. Yamaguchi 等人, J. Biosci. Biotechnol. Biochem., 1999, 63(4), 736</p>
	<p>4'-C-甲氧基腺苷 C. M. Richards 等人, Carbohydr. Res., 1982, 100, 315</p>
	<p>1-[4-(C-(羟甲基)-β-D-呋喃木糖基]尿嘧啶 G. H. Jones 等人, J. Org. Chem., 1979, 44(8), 1309-1317</p>
	<p>1-[4-(C-(羟甲基)-β-D-呋喃阿拉伯糖基]胞苷 T. Waga 等人, Nucleosides Nucleotides, 1996, 15(1-3), 287-304</p>
	<p>4'-C-(羟甲基)鸟苷 J. C. Martin 和 J. P. Verheyden, Nucleosides Nucleotides, 1988, 7(3), 365</p>
	<p>9-[4-C-(羟甲基)-β-D-呋喃木糖基]腺苷 D. L. Lelland 和 M. P. Kotick, Carbohydr. Res., 1974, 38, C9-C11</p>

	<p>3'-叠氮基-3'-脱氧-4'-C-(羟甲基)-5-甲基尿苷 A. G. Olsen 等人, <i>J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1</i>, 2000, 21, 3610</p>
	<p>1-(4-C-乙炔基-β-D-呋喃阿拉伯糖基)胞苷 H. Ohri 等人, <i>J. Med. Chem.</i>, 2000, 43(23), 4516 或 S. Kohgo 等人, <i>Biosci. Biotechnol. Biochem.</i>, 1999, 63(6), 1146</p>
	<p>N4-苯甲酰基-1-[4-C-甲基-β-D-呋喃阿拉伯糖基]胞苷 T. Yamaguchi 等人, <i>Nucleosides Nucleotides</i>, 1997, 16(7), 1347</p>
	<p>3'-叠氮基-3'-脱氧-4'-C-(羟甲基)尿苷 S. A. Surzhikov 和 N. B. Dyatkina <i>Russ. J. Biorg. Chem. (Engl. Transl.)</i>, 1993, 19(7), 408</p>
	<p>2'-脱氧-4'-叠氮基核苷的制备 H. Maag 等人, 欧洲专利申请 EP 371366 A1</p>

下列测定方法证明了式 I 化合物抑制 HCV RNA 复制的能力, 因此证明了它们治疗 HCV 感染的潜在实用性。

### Renilla 荧光素酶测定

本测定法基于使用报道基因作为细胞内 HCV 复制子 RNA 水平的简单读数的想法。出于这种目的, 将 Renilla 荧光素酶基因引入复制子构建体 NK5.1 的第一开放阅读框 (Krieger 等人, *J. Virol.* 75: 4614), 紧

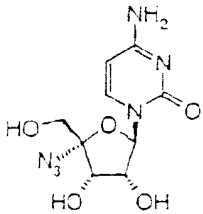
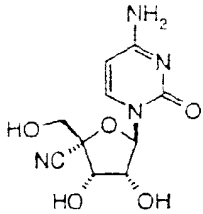
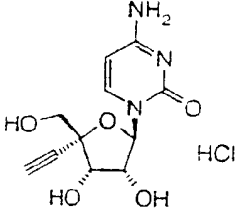
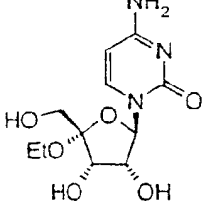
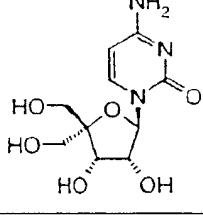
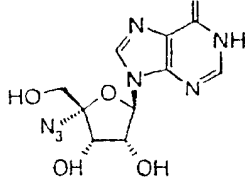
邻内部核糖体入口位点 (IRES) 序列之后, 再经由口蹄疫病毒自裂解肽 2A 与新霉素磷酸转移酶 (NPTII) 基因融合 (Ryan & Drew, EMBO 13 卷: 928-933)。体外转录后, 将 RNA 电穿孔至人肝细胞瘤 Huh7 细胞内, 分离和扩增对 G418 具有耐受性的集落。经过稳定选择的细胞系 2209-23 显示出含有复制型 HCV 亚基因组 RNA, 并且被复制子表达的 Renilla 荧光素酶的活性反映了它在细胞内的 RNA 水平。

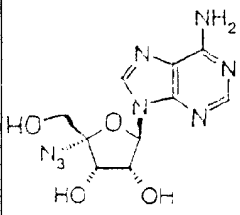
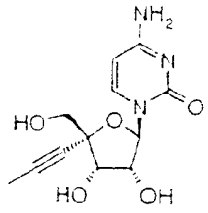
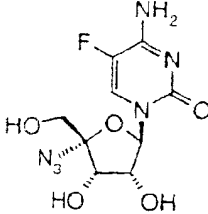
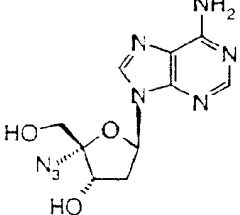
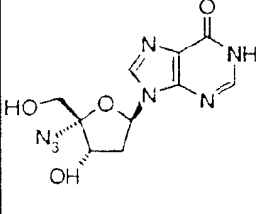
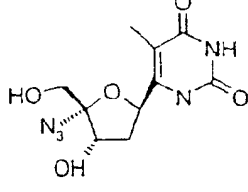
关于测定方法, 将培养于含有 5% 胎牛血清 (FCS, GibcoBRL cat. no. 10106-169) 的 Dulbecco's MEM (GibcoBRL cat no. 31966-021) 中的 Renilla 荧光素酶 HCV 复制子细胞 (2209-23) 以每孔 5000 个细胞接种于 96 孔平板上并培育过夜。24 小时后, 向细胞加入化合物在生长培养基中的不同稀释液, 然后在 37°C 下继续培育三天。测定于一式两份的平板上进行, 一块为乳白色, 另一块是透明的, 目的是平行测量化合物的活性和细胞毒性, 以确保所观测到的活性不是由细胞增殖的减少所引起的。

在培育期结束时, 收集白色平板中的细胞, 并利用双荧光素酶报道基因测定系统 (Promega cat no. E1960) 测量荧光素酶的活性。以下段落所述的所有试剂都包括在厂商的试剂盒中, 按照厂商的指导准备试剂。简而言之, 将细胞用 200 $\mu$ l 磷酸盐缓冲的盐水 (pH 7.0) (PBS) 每孔洗涤两次, 并用 25 $\mu$ l 1x 无作用的溶解缓冲液溶解, 然后在室温下培育 20 分钟。向每孔加入 100 $\mu$ l LAR II 试剂。然后将平板插入到 LB 96V 微量平板发光计 (MicroLumatPlus, Berthold) 中, 利用机器向每孔内注射 100X Stop & Glo 试剂, 利用 2-秒延迟、10-秒测量程序测量信号。从荧光素酶活性减少百分比-药物浓度图可以计算 IC<sub>50</sub>, 其是将复制子水平相对于未经处理的细胞对照值减少达 50% 所需的药物浓度。结果见下。

关于细胞毒性测定, 使用来自 Roche Diagnostic 的 WST-1 试剂 (cat no. 1644807)。向每孔、包括仅含有介质作为空白的孔中加入 10 $\mu$ l WST-1 试剂。然后将细胞在 37°C 下培育 1 至 1.5 小时, 利用 96 孔平板读数器测量 450nm 下的 OD 值 (参照滤光器的波长为 650nm)。仍然从

WST-1 值减少百分比-药物浓度图可以计算 CC50，其是将细胞增殖相对于未经处理的细胞对照值减少达 50%所需的药物浓度。

化合物编号	结构	名称	IC50 ( $\mu\text{M}$ )	CC50 ( $\mu\text{M}$ ) WST-1
化合物 1		4'-C-叠氮基胞苷	1.2	0% (100 $\mu\text{M}$ )
化合物 2		4'-C-氰基胞苷	99 (20 $\mu\text{M}$ )	100% (20 $\mu\text{M}$ )
化合物 3		4'-C-乙炔基胞苷 盐酸盐(1:1)	3% (20 $\mu\text{M}$ )	0% (20 $\mu\text{M}$ )
化合物 4		4'-C-乙氧基胞苷	11% (20 $\mu\text{M}$ )	0% (20 $\mu\text{M}$ )
化合物 6		4'-C-(羟甲基)胞苷	13% (20 $\mu\text{M}$ )	2% (20 $\mu\text{M}$ )
化合物 16-1		4'-C-叠氮基肌苷	>500 $\mu\text{M}$	

化合物 18		4'-C-叠氮基腺苷	57	
化合物 30		4'-C-(1-丙炔基) 胞苷	15% (20 $\mu$ M)	2% (20 $\mu$ M)
化合物 44		4'-C-叠氮基-5-氟 胞苷	108	
化合物 46		4'-C-叠氮基-2'- 脱氧腺苷	13	0% (20 $\mu$ M)
化合物 47		4'-C-叠氮基-2'- 脱氧肌苷	37	12% (20 $\mu$ M)
化合物 48		4'-C-叠氮基-5-甲 基尿苷	8	0% (20 $\mu$ M)

如上表所示，式 I 化合物具有有效作为抗病毒药用于治疗人 HCV 感染的潜能，或者可被代谢为表现这类活性的化合物。

在本发明的另一个实施方案中，活性化合物或其衍生物或盐可以与另一种抗病毒剂联合施用，如抗肝炎剂，包括式 I 的那些抗病毒剂。当

将活性化合物或其衍生物或盐与另一种抗病毒剂联合施用时，可以使活性增加超过母体化合物。这可以容易地通过按照本文所述方法制备衍生物并测试它的抗 HCV 活性进行评估。

活性化合物的施用可以从连续施用（静脉内滴注）到每天若干次口服施用（例如 Q. I. D.），其它施用途径可包括口服、局部、胃肠外、肌内、静脉内、皮下、透皮（其可以包括渗透增强剂）、口含和栓剂施用。

4'-取代的核苷衍生物以及它们的可药用盐可以以任何药物制剂的形式作为药物使用。药物制剂可以经肠内施用，即可以口服例如以片剂、包衣片、锭剂、硬与软明胶胶囊剂、溶液剂、乳剂、糖浆剂或混悬剂的形式施用，或经直肠例如以栓剂的形式施用。它们还可以经胃肠外（经肌内、经静脉内、经皮下或胸骨内注射或输注技术）例如以注射溶液形式施用；经鼻例如以鼻用喷雾剂或者吸入喷雾剂形式施用；局部施用等。

关于药物制剂的制备，可以将 4'-取代的核苷衍生物以及它们的可药用盐与治疗上惰性的无机或有机赋形剂一起配制，以制成片剂、包衣片、锭剂、硬与软明胶胶囊剂、溶液剂、乳剂或混悬剂。

式 I 化合物可以与可药用的载体混合配制。例如，本发明化合物可以以药理学上可接受的盐形式经口服施用。由于大部分本发明的化合物是水溶性的，所以它们可以在生理盐水溶液（例如缓冲至 pH 约 7.2 至 7.5）中经静脉内施用。为此可以使用常规的缓冲剂如磷酸盐、碳酸氢盐或枸橼酸盐。当然，本领域普通技术人员可以在说明书的教导范围内调整制剂，以提供大量用于特定施用途径的制剂，只要不会使本发明的组合物不稳定或者降低它们的治疗活性即可。确切而言，为使它们在水或其它载体中的溶解性增加而对本发明化合物所进行的修饰例如可以通过微小的调整（成盐、酯化等）来完成，这些都完全在本领域的普通技能范围内。调整特定化合物的施用途径和剂量方案以控制本发明化合物的药动学而使对患者的有益效果最大化也完全处于本领域的普通技能范围内。

对于胃肠外制剂，载体通常可包括无菌的水或氯化钠水溶液，不过也可以包括那些有助于分散的其它成分。当然，当使用无菌水并保持无

菌时，组合物和载体也必须是无菌的。还可以制备注射用混悬剂，在这种情况下可以采用适当的液体载体、助悬剂等。

适合于片剂、包衣片、锭剂和硬明胶胶囊剂的赋形剂有例如乳糖、玉米淀粉及其衍生物、滑石和硬脂酸或其盐。

如果需要的话，片剂或胶囊剂可以通过标准技术制备的肠溶包衣或者缓释制剂。

适合于软明胶胶囊剂的赋形剂有例如植物油、蜡、脂肪、半固体与液体多元醇。

适合于注射溶液的赋形剂有例如水、盐水、醇、多元醇、甘油或植物油。

适合于栓剂的赋形剂有例如天然油与硬化油、蜡、脂肪、半液体或液体多元醇。

适合于肠用溶液和糖浆剂的赋形剂有例如水、多元醇、蔗糖、转化糖和葡萄糖。

本发明的药物制剂也可以以缓释制剂或其它适当的制剂提供。

药物制剂还可以含有防腐剂、增溶剂、稳定剂、润湿剂、乳化剂、甜味剂、着色剂、矫味剂、调节渗透压的盐、缓冲剂、掩蔽剂或抗氧化剂。

药物制剂还可以含有本领域已知的其它治疗活性剂。

剂量可以在宽泛的限度内变化，当然，在每种特定情况下可根据个体需要加以调整。对于口服施用，每天约 0.01 至约 100mg/kg 体重的日剂量应当适合用于单一疗法和/或联合疗法。优选的日剂量为约 0.1 至约 500mg/kg 体重、更优选 0.1 至约 100mg/kg 体重且最优选为 1.0 至约 100mg/kg 体重。典型的制剂可含有约 5% 至约 95% 的活性化合物(w/w)。日剂量可以以单剂量或分剂量施用，通常每天 1 至 5 次施用。

在一些药物剂型中，化合物的前体药物形式是优选的，尤其包括本发明化合物的酰化（乙酰化或其它）衍生物、吡啶酯和各种盐形式。本领域普通技术人员可找到易于将本发明化合物修饰为前体药物形式的方法，以促进活性化合物向宿主生物或患者内目标部位的释放。本领域



普通技术人员也可利用前体药物形式的可取的药动学参数—适用的话—将本发明化合物递送至宿主生物或患者内的靶向部位，以使化合物的预期效果最大化。

核苷衍生物或其药物可以用于单一疗法或联合疗法中，即治疗可以与一种或多种其它治疗活性物质的施用结合进行，例如免疫系统调制剂如干扰素、白介素、肿瘤坏死因子或集落刺激因子；抗病毒剂或抗炎剂。当治疗是联合疗法时，这类施用可以与 4'-取代的核苷衍生物并行或相继进行。本文所用的并行施用因而包括在相同时间或不同时间施用各药物。

应该知道，本文对治疗的称谓可延及预防以及对现有病症的治疗，并且对动物的治疗包括对人类以及其它哺乳动物的治疗。此外，本文所用的治疗丙型肝炎病毒（HCV）感染也包括治疗或预防与丙型肝炎病毒（HCV）感染有关或受其介导的疾病或病症，或其临床症状。

本说明书中，“包含”意味着“包括或由...组成”。

上述说明书或下列权利要求书或附图所公开的特征是以它们的具体形式或以实现所公开的功能的手段或用于达到所公开的结果的方法或过程来表示的，这些特征可以酌情以单独地或以这类特征的任意组合形式用于以不同方式实现本发明。