

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.



[12] 发明专利说明书

C07H 19/14 (2006.01)
A61K 31/7064 (2006.01)
A61P 31/14 (2006.01)

专利号 ZL 02806977.3

[45] 授权公告日 2006 年 8 月 2 日

[11] 授权公告号 CN 1267446C

[22] 申请日 2002.1.18 [21] 申请号 02806977.3

[30] 优先权

[32] 2001. 1. 22 [33] US [31] 60/263,313

[32] 2001. 4. 6 [33] US [31] 60/282,069

[32] 2001. 6. 19 [33] US [31] 60/299,320

[32] 2001.10.25 [33] US [31] 60/344,528

[86] 国际申请 PCT/US2002/003086 2002.1.18

[87] 国际公布 WO2002/057287 英 2002.7.25

[85] 进入国家阶段日期 2003.9.22

[71] 专利权人 默克公司

地址 美国新泽西州

共同专利权人 埃西斯药品公司

[72] 发明人 S·S·卡洛尔 M·麦科斯

D·B·奥尔森 B·巴特

N·巴特 P·D·库克

A·B·埃尔德鲁普

T·P·普拉卡斯 M·普尔哈夫克

宋全来

审查员 林琳

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 张广育

权利要求书 4 页 说明书 78 页

[54] 发明名称

作为依赖于 RNA 的 RNA 病毒聚合酶的抑制剂的核苷衍生物

[57] 摘要

本发明提供为依赖于 RNA 的 RNA 病毒聚合物抑制剂的核苷化合物及其某些衍生物。这些化合物是依赖于 RNA 的 RNA 病毒复制的抑制剂，可用于治疗依赖于 RNA 的 RNA 病毒感染。它们作为丙型肝炎病毒(HCV) NS5B 聚合酶的抑制剂、作为 HCV 复制的抑制剂和/或用于治疗丙型肝炎感染特别有用。本发明还描述了药物组合物，该药物组合物含有单独的或者与其它有效对抗依赖于 RNA 的 RNA 病毒感染的试剂相结合的这些核苷化合物。还公开了用本发明的核苷化合物抑制依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶，抑制依赖于 RNA 的 RNA 病毒复制和/或治疗依赖于 RNA 的 RNA 病毒感染的方法。

1. 选自下列的化合物或其药学上可接受的盐:

- 1) 4-氨基-7-(2-C-甲基- β -D-阿糖呋喃基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶,
- 5 2) 4-氨基-7-(2-C-甲基- β -D-呋喃核糖基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶,
- 3) 4-甲基氨基-7-(2-C-甲基- β -D-呋喃核糖基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶,
- 4) 4-二甲基氨基-7-(2-C-甲基- β -D-呋喃核糖基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶,
- 10 5) 4-环丙基氨基-7-(2-C-甲基- β -D-呋喃核糖基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶,
- 6) 4-氨基-7-(2-C-乙烯基- β -D-呋喃核糖基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶,
- 7) 4-氨基-7-(2-C-羟基甲基- β -D-呋喃核糖基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶,
- 15 8) 4-氨基-7-(2-C-氟甲基- β -D-呋喃核糖基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶,
- 9) 4-氨基-5-甲基-7-(2-C-甲基- β -D-呋喃核糖基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶,
- 10) 4-氨基-7-(2-C-甲基- β -D-呋喃核糖基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-5-羧酸,
- 20 11) 4-氨基-5-溴-7-(2-C-甲基- β -D-呋喃核糖基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶,
- 12) 4-氨基-5-氯-7-(2-C-甲基- β -D-呋喃核糖基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶,
- 13) 2,4-二氨基-7-(2-C-甲基- β -D-呋喃核糖基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶,
- 25 14) 2-氨基-7-(2-C-甲基- β -D-呋喃核糖基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶,
- 15) 2-氨基-4-环丙基氨基-7-(2-C-甲基- β -D-呋喃核糖基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶,

- 16) 2-氨基-7-(2-C-甲基- β -D-呋喃核糖基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4(3H)-酮,
- 17) 4-氨基-7-(2-C-乙基- β -D-呋喃核糖基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶,
- 18) 4-氨基-7-(2-C,2-O-二甲基- β -D-呋喃核糖基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶,
- 5
- 19) 7-(2-C-甲基- β -D-呋喃核糖基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4(3H)-酮,
- 20) 2-氨基-5-甲基-7-(2-C,2-O-二甲基- β -D-呋喃核糖基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4(3H)-酮,
- 21) 4-氨基-7-(3-脱氧-2-C-甲基- β -D-呋喃核糖基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶,
- 10
- 22) 4-氨基-7-(3-脱氧-2-C-甲基- β -D-阿糖呋喃基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶,
- 23) 4-氨基-7-(2,4-二-C-甲基- β -D-呋喃核糖基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶, 和
- 15 24) 4-氨基-7-(3-脱氧-3-氟-2-C-甲基- β -D-呋喃核糖基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶;

以及对应的 5'-三磷酸酯。

2. 权利要求 1 的化合物或其药学上可接受的盐, 其选自:

- 1) 4-氨基-7-(2-C-甲基- β -D-阿糖呋喃基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶,
- 20 2) 4-氨基-7-(2-C-甲基- β -D-呋喃核糖基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶,
- 3) 4-氨基-7-(2-C-氟甲基- β -D-呋喃核糖基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶,
- 4) 4-氨基-5-甲基-7-(2-C-甲基- β -D-呋喃核糖基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶,
- 25 5) 4-氨基-5-溴-7-(2-C-甲基- β -D-呋喃核糖基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶,
- 6) 4-氨基-5-氯-7-(2-C-甲基- β -D-呋喃核糖基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶, 和
- 7) 4-氨基-7-(2-C,2-O-二甲基- β -D-呋喃核糖基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶

啉,

以及对应的 5'-三磷酸酯。

3. 权利要求 2 的化合物或其药学上可接受的盐, 该化合物为 4-氨基-7-(2-C-甲基- β -D-阿糖呋喃基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶。

5 4. 权利要求 2 的化合物或其药学上可接受的盐, 该化合物为 4-氨基-7-(2-C-甲基- β -D-呋喃核糖基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶。

5. 权利要求 2 的化合物或其药学上可接受的盐, 该化合物为 4-氨基-7-(2-C-氟甲基- β -D-呋喃核糖基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶。

6. 权利要求 2 的化合物或其药学上可接受的盐, 该化合物为 4-氨基-5-氯-7-(2-C-甲基- β -D-呋喃核糖基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶。

7. 权利要求 2 的化合物或其药学上可接受的盐, 该化合物为 4-氨基-5-溴-7-(2-C-甲基- β -D-呋喃核糖基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶。

8. 权利要求 1 的化合物或其药学上可接受的盐, 该化合物为 2-氨基-7-(2-C-甲基- β -D-呋喃核糖基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4(3H)-酮。

15 9. 权利要求 1 的化合物或其药学上可接受的盐, 该化合物为 2,4-二氨基-7-(2-C-甲基- β -D-呋喃核糖基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶。

10. 一种药物组合物, 该组合物含有权利要求 1 的化合物和药学上可接受的载体。

11. 权利要求 1 的化合物在制造用于抑制哺乳动物的依赖于 RNA 的 RNA 病毒聚合酶或抑制哺乳动物的依赖于 RNA 的 RNA 病毒复制的药物中的用途。

12. 权利要求 11 的用途, 其中所述依赖于 RNA 的 RNA 病毒聚合酶为 HCV NS5B 聚合酶, 所述依赖于 RNA 的 RNA 病毒复制为 HCV 病毒复制。

13. 权利要求 1 的化合物在制造用于治疗哺乳动物的依赖于 RNA 的 RNA 病毒感染的药物中的用途。

14. 权利要求 13 的用途, 其中将权利要求 1 的化合物与治疗有效量的另一种有效对抗 HCV 的试剂相结合。

15. 权利要求 14 的用途, 其中所述有效对抗 HCV 的试剂为利巴韦林、左旋韦林、胸腺素 α -1、NS3 丝氨酸蛋白酶抑制剂、肌苷一磷酸脱氢酶抑制剂、单独或者与利巴韦林或左旋韦林相结合的干扰素 α 或加入聚乙二醇的干扰素 α 。

- 5 16. 权利要求 15 的用途, 其中所述有效对抗 HCV 的试剂为单独或者与利巴韦林相结合的干扰素 α 或加入聚乙二醇的干扰素 α 。

17. 权利要求 13 的用途, 其中所述依赖于 RNA 的 RNA 病毒感染为丙型肝炎感染。

作为依赖于 RNA 的 RNA 病毒聚合酶的抑制剂的核苷衍生物

5 发明领域

本发明涉及核苷化合物及其某些衍生物、它们的合成、以及它们作为依赖于 RNA 的 RNA 病毒聚合酶的抑制剂的用途。本发明化合物是依赖于 RNA 的 RNA 病毒复制的抑制剂，可用于治疗依赖于 RNA 的 RNA 病毒感染。它们作为丙型肝炎病毒(HCV)NS5B 聚合酶的抑制剂、作为 HCV 复制的抑制剂以及用于治疗丙型肝炎感染特别有用。

发明背景

丙型肝炎病毒(HCV)感染是导致大量受感染个体，估计占世界人口的 2-15% 的人患上慢性肝病，如肝硬化和肝细胞癌的主要健康问题。据美国疾病控制中心的数据，估计仅美国就有 450 万受感染人群。根据世界卫生组织的数据，全世界有超过 2 亿受感染个体，每年至少有 3-4 百万人群被感染。感染后，大约 20% 的人可以清除病毒，而其余的人此后将终身携带 HCV。10% 到 20% 慢慢受感染的个体最后将发展成毁坏肝的肝硬化或癌症。病毒性疾病通过被污染的血液和血液产品、被污染的针头非肠道传染或者经由性途径直接从受感染的母体或携带病原的母体传染给其后代。目前对于 HCV 感染的治疗限制于只用重组体干扰素- α 或者与核苷类似物利巴韦林结合进行的免疫疗法，该疗法具有有限的临床效果。而且，没有确定的 HCV 疫苗。所以，迫切需要可有效对抗慢性 HCV 感染的改进的治疗剂。综述治疗 HCV 感染的现有技术水平，参考了下列资料：B. Dymock 等，"Novel approaches to the treatment of hepatitis C virus infection (治疗丙型肝炎病毒感染的新方法)"，Antiviral Chemistry & Chemotherapy,

11: 79-96 (2000); H. Rosen 等,"Hepatitis C virus: current understanding and prospects for future therapies (丙型肝炎病毒: 对现状的认识和对将来治疗的展望)",Molecular Medicine Today, 5: 393-399 (1999); D. Moradpour 等,"Current and evolving therapies for hepatitis C (治疗丙型肝炎的现状和进展)",European J. Gastroenterol. Hepatol., 11: 1189-1202 (1999); R. Bartenschlager, "Candidate Targets for Hepatitis C Virus-Specific Antiviral Therapy (丙型肝炎病毒-特异性抗病毒疗法的候选目标)",Intervirology, 40: 378-393 (1997); G. M. Lauer 和 B. D. Walker, "Hepatitis C Virus Infection (丙型肝炎病毒感染)",N. Engl. J. Med., 345: 41-52 (2001); B. W. Dymock, "Emerging therapies for hepatitis C virus infection (丙型肝炎病毒感染的新兴疗法)",Emerging Drugs, 6: 13-42 (2001); 以及 C. Crabb, "Hard-Won Advances Spark Excitement about Hepatitis C",Science: 506-507 (2001); 将所有这些文献的内容全文引用结合进本文。

15 已采取了治疗 HCV 的不同方法, 包括抑制病毒的丝氨酸蛋白酶(NS3 蛋白酶)、解旋酶和依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶(NS5B)以及发展疫苗。

HCV 病毒体是具有约 9600 个碱基的单一寡核糖核苷酸基因组序列的有包膜正链 RNA 病毒, 所述基因组序列编码约 3010 个氨基酸的多蛋白。HCV 基因的蛋白产品由结构蛋白 C、E1 和 E2 以及非结构蛋白 NS2、NS3、NS4A 和 NS4B、NS5A 和 NS5B 构成。人们相信非结构(NS)蛋白可以提供病毒复制的催化机器。NS3 蛋白酶从多蛋白链释放 NS5B, 这是依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶。由在 HCV 复制循环中作为模板的单链病毒的 RNA 合成双链 RNA 需要 HCV NS5B 聚合酶。因此, NS5B 聚合酶被认为是 HCV 复制复合体中必不可少的成分[参见 K. Ishi 等,"Expression of Hepatitis C Virus NS5B Protein: Characterization of Its RNA Polymerase Activity and RNA Binding (丙型肝炎病毒 NS5B 蛋白的表达: 其 RNA 聚合酶活性和 RNA 结合的

特性描述)", *Hepatology*, 29: 1227-1235 (1999)和 V. Lohmann 等,"Biochemical and Kinetic Analyses of NS5B RNA-Dependent RNA Polymerase of the Hepatitis C Virus(丙型肝炎病毒的NS5B依赖于RNA的RNA聚合酶的生物化学和动力学分析)", *Virology*, 249: 108-118 (1998)]. 抑制 HCV NS5B 聚合酶可防止形成双链 HCV RNA, 由此构建一条开发 HCV 特异性抗病毒疗法的颇具吸引力的途径。

现在发现, 本发明的核苷化合物及其某些衍生物是依赖于 RNA 的 RNA 病毒复制, 特别是 HCV 复制的有效的抑制剂。这些核苷化合物的 5'-三磷酸酯衍生物是依赖于 RNA 的 RNA 病毒聚合酶, 特别是 HCV NS5B 聚合酶的抑制剂。因此, 本发明的核苷化合物及其衍生物可用于治疗依赖于 RNA 的 RNA 病毒感染, 特别是 HCV 感染。

因此, 本发明的目的在于提供核苷化合物及其某些衍生物, 它们可用作依赖于 RNA 的 RNA 病毒聚合酶的抑制剂, 特别是用作 HCV NS5B 聚合酶的抑制剂。

本发明的另一目的在于提供核苷化合物及其某些衍生物, 它们可用作依赖于 RNA 的 RNA 病毒复制的抑制剂, 特别是用作丙型肝炎病毒复制的抑制剂。

本发明的另一目的在于提供核苷化合物及其某些衍生物, 它们可用于治疗依赖于 RNA 的 RNA 病毒感染, 特别是用于治疗 HCV 感染。

本发明的另一目的在于提供包含本发明的核苷化合物和药学上可接受的载体的药物组合物。

本发明的另一目的在于提供包含本发明的核苷化合物及其衍生物的药物组合物, 该组合物可用作依赖于 RNA 的 RNA 病毒聚合酶的抑制剂, 特别是用作 HCV NS5B 聚合酶的抑制剂。

本发明的另一目的在于提供包含本发明的核苷化合物及其衍生物的药物组合物, 该组合物可用作依赖于 RNA 的 RNA 病毒复制的抑制剂, 特别是用作 HCV 复制的抑制剂。

本发明的另一目的在于提供包含本发明的核苷化合物及其衍生物的药物组合物，该组合物可用于治疗依赖于 RNA 的 RNA 病毒感染，特别是用于治疗 HCV 感染。

5 本发明的另一目的在于提供药物组合物，该组合物包含本发明的核苷化合物及其衍生物和其它有效对抗依赖于 RNA 的 RNA 病毒，特别是对抗 HCV 的试剂。

本发明的另一目的在于提供抑制依赖于 RNA 的 RNA 病毒聚合酶，特别是抑制 HCV NS5B 聚合酶的方法。

10 本发明的另一目的在于提供抑制依赖于 RNA 的 RNA 病毒复制，特别是抑制 HCV 复制的方法。

本发明的另一目的在于提供治疗依赖于 RNA 的 RNA 病毒感染，特别是治疗 HCV 感染的方法。

15 本发明的另一目的在于提供与其它有效对抗依赖于 RNA 的 RNA 病毒的试剂结合治疗依赖于 RNA 的 RNA 病毒感染的方法，特别是与其它有效对抗 HCV 的试剂结合治疗 HCV 感染的方法。

本发明的另一目的在于提供用作药物的核苷化合物及其某些衍生物和它们的药物组合物，所述药物用于抑制依赖于 RNA 的 RNA 病毒复制和/或治疗依赖于 RNA 的 RNA 病毒感染，特别是用于抑制 HCV 复制和/或治疗 HCV 感染。

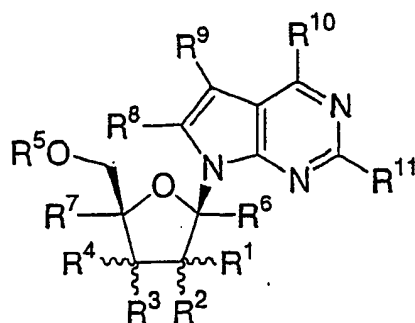
20 本发明的另一目的在于提供本发明的核苷化合物及其某些衍生物和它们的药物组合物在制造药物中的用途，所述药物用于抑制依赖于 RNA 的 RNA 病毒复制和/或治疗依赖于 RNA 的 RNA 病毒感染，特别是用于抑制 HCV 复制和/或治疗 HCV 感染。

通过下面的详细描述，这些和其它目的将是显而易见的。

25

本发明概述

本发明涉及所示立体化学构型的结构式 I 的化合物或其药学上可接受的盐，



(I)

其中 R^1 为 C_{2-4} 链烯基、 C_{2-4} 炔基或 C_{1-4} 烷基，其中烷基为未取代的或者被羟基、氨基、 C_{1-4} 烷氧基、 C_{1-4} 烷硫基或 1-3 个氟原子取代；

R^2 为氢、氟、羟基、巯基、 C_{1-4} 烷氧基或 C_{1-4} 烷基；或者 R^1 和 R^2 同与其相连的碳原子一起形成任选含有一个选自 O、S 和 NC_{0-4} 烷基的杂原子的 3-6 元饱和单环系；

R^3 和 R^4 各自独立选自氢、氟基、叠氮基、卤素、羟基、巯基、氨基、 C_{1-4} 烷氧基、 C_{2-4} 链烯基、 C_{2-4} 炔基和 C_{1-4} 烷基，其中烷基为未取代的或者被羟基、氨基、 C_{1-4} 烷氧基、 C_{1-4} 烷硫基或 1-3 个氟原子取代；

R^5 为氢、 C_{1-10} 烷基羰基、 $P_3O_9H_4$ 、 $P_2O_6H_3$ 或 $P(O)R^{13}R^{14}$ ；

R^6 和 R^7 各自独立为氢、甲基、羟基甲基或氟甲基；

R^8 为氢、 C_{1-4} 烷基、 C_{2-4} 炔基、卤素、氟基、羧基、 C_{1-4} 烷氧基羰基、叠氮基、氨基、 C_{1-4} 烷基氨基、二(C_{1-4} 烷基)氨基、羟基、 C_{1-6} 烷氧基、 C_{1-6} 烷硫基、 C_{1-6} 烷基磺酰基、(C_{1-4} 烷基) $_{0-2}$ 氨基甲基或 C_{4-6} 环状杂烷基，它们是未取代的或者被 1-2 个独立选自卤素、羟基、氨基、 C_{1-4} 烷基和 C_{1-4} 烷氧基的基团取代；

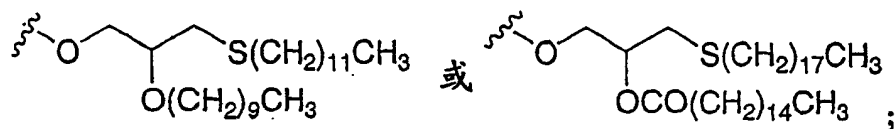
R^9 为氢、氟基、硝基、 C_{1-3} 烷基、 $NHCONH_2$ 、 $CONR^{12}R^{12}$ 、 $CSNR^{12}R^{12}$ 、 $COOR^{12}$ 、 $C(=NH)NH_2$ 、羟基、 C_{1-3} 烷氧基、氨基、 C_{1-4} 烷基氨基、二(C_{1-4} 烷基)氨基、卤素、(1,3-噁唑-2-基)、(1,3-噻唑-2-基)或(咪唑-2-基)；其中烷基为未取代的或者被 1-3 个独立选自卤素、氨基、羟基、羧基和 C_{1-3} 烷氧基的基团取代；

R^{10} 和 R^{11} 各自独立为氢、羟基、卤素、 C_{1-4} 烷氧基、氨基、 C_{1-4}

烷基氨基、二(C₁₋₄烷基)氨基、C₃₋₆环烷基氨基、二(C₃₋₆环烷基)氨基或 C₄₋₆环状杂烷基，它们是未取代的或者被 1-2 个独立选自卤素、羟基、氨基、C₁₋₄烷基和 C₁₋₄烷氧基的基团取代；

各 R¹² 独立为氢或 C₁₋₆烷基；并且

- 5 R¹³ 和 R¹⁴ 各自独立为羟基、OCH₂CH₂SC(=O)C₁₋₄烷基、OCH₂O(C=O)OC₁₋₄烷基、NHCHMeCO₂Me、OCH(C₁₋₄烷基)O(C=O)C₁₋₄烷基、



- 10 条件是当 R¹ 为 β-甲基且 R⁴ 为氢或者 R⁴ 为 β-甲基且 R¹ 为氢，R² 和 R³ 为 α-羟基，R¹⁰ 为氨基，R⁵、R⁶、R⁷、R⁸ 和 R¹¹ 为氢时，R⁹ 不为氰基或 CONH₂。

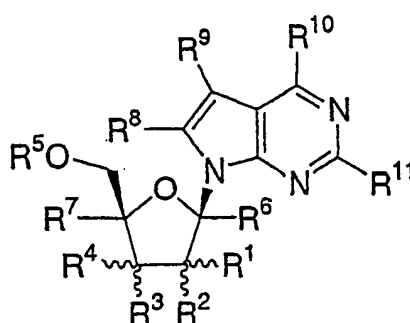
- 15 式 I 化合物可用作依赖于 RNA 的 RNA 病毒聚合酶，特别是 HCV NS5B 聚合酶的抑制剂。它们也是依赖于 RNA 的 RNA 病毒复制，特别是 HCV 复制的抑制剂，可用于治疗依赖于 RNA 的 RNA 病毒感染，特别是用于治疗 HCV 感染。

也包括在本发明范围内的还有：只含有所述化合物或者含有所述化合物和其它可有效对抗依赖于 RNA 的 RNA 病毒，特别是对抗 HCV 的试剂的药物组合物，以及抑制依赖于 RNA 的 RNA 病毒复制的方法和治疗依赖于 RNA 的 RNA 病毒感染的方法。

20

本发明详述

本发明涉及所示立体化学构型的结构式 I 的化合物或其药学上可接受的盐，



(I)

其中 R^1 为 C_{2-4} 链烯基、 C_{2-4} 炔基或 C_{1-4} 烷基，其中烷基为未取代的或者被羟基、氨基、 C_{1-4} 烷氧基、 C_{1-4} 烷硫基或 1-3 个氟原子取代；

R^2 为氢、氟、羟基、巯基、 C_{1-4} 烷氧基或 C_{1-4} 烷基；或者 R^1 和 R^2 同与其相连的碳原子一起形成任选含有一个选自 O、S 和 NC_{0-4} 烷基的杂原子的 3-6 元饱和单环系；

R^3 和 R^4 各自独立选自氢、氟基、叠氮基、卤素、羟基、巯基、氨基、 C_{1-4} 烷氧基、 C_{2-4} 链烯基、 C_{2-4} 炔基和 C_{1-4} 烷基，其中烷基为未取代的或者被羟基、氨基、 C_{1-4} 烷氧基、 C_{1-4} 烷硫基或 1-3 个氟原子取代；

R^5 为氢、 C_{1-10} 烷基羰基、 $P_3O_9H_4$ 、 $P_2O_6H_3$ 或 $P(O)R^{13}R^{14}$ ；

R^6 和 R^7 各自独立为氢、甲基、羟基甲基或氟甲基；

R^8 为氢、 C_{1-4} 烷基、 C_{2-4} 炔基、卤素、氟基、羰基、 C_{1-4} 烷氧基羰基、叠氮基、氨基、 C_{1-4} 烷基氨基、二(C_{1-4} 烷基)氨基、羟基、 C_{1-6} 烷氧基、 C_{1-6} 烷硫基、 C_{1-6} 烷基磺酰基、 $(C_{1-4} \text{ 烷基})_{0-2}$ 氨基甲基或 C_{4-6} 环状杂烷基，它们是未取代的或者被 1-2 个独立选自卤素、羟基、氨基、 C_{1-4} 烷基和 C_{1-4} 烷氧基的基团取代；

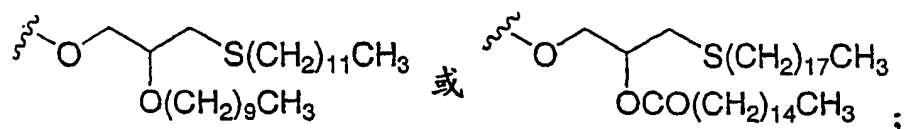
R^9 为氢、氟基、硝基、 C_{1-3} 烷基、 $NHCONH_2$ 、 $CONR^{12}R^{12}$ 、 $CSNR^{12}R^{12}$ 、 $COOR^{12}$ 、 $C(=NH)NH_2$ 、羟基、 C_{1-3} 烷氧基、氨基、 C_{1-4} 烷基氨基、二(C_{1-4} 烷基)氨基、卤素、(1,3-噁唑-2-基)、(1,3-噻唑-2-基)或(咪唑-2-基)；其中烷基为未取代的或者被 1-3 个独立选自卤素、氨基、羟基、羰基和 C_{1-3} 烷氧基的基团取代；

R^{10} 和 R^{11} 各自独立为氢、羟基、卤素、 C_{1-4} 烷氧基、氨基、 C_{1-4}

烷基氨基、二(C₁₋₄烷基)氨基、C₃₋₆环烷基氨基、二(C₃₋₆环烷基)氨基或 C₄₋₆ 环状杂烷基，它们是未取代的或者被 1-2 个独立选自卤素、羟基、氨基、C₁₋₄ 烷基和 C₁₋₄ 烷氧基的基团取代；

各 R¹² 独立为氢或 C₁₋₆ 烷基；并且

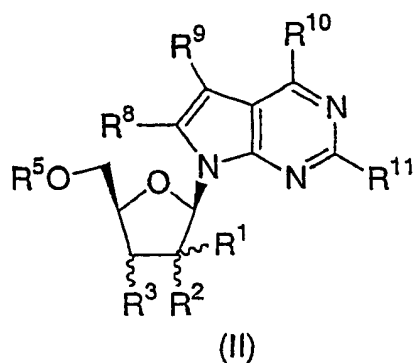
- 5 R¹³ 和 R¹⁴ 各自独立为羟基、OCH₂CH₂SC(=O)C₁₋₄ 烷基、OCH₂O(C=O)OC₁₋₄ 烷基、NHCHMeCO₂Me、OCH(C₁₋₄ 烷基)O(C=O)C₁₋₄ 烷基、



- 10 条件是当 R¹ 为 β-甲基且 R⁴ 为氢或者 R⁴ 为 β-甲基且 R¹ 为氢，R² 和 R³ 为 α-羟基，R¹⁰ 为氨基，R⁵、R⁶、R⁷、R⁸ 和 R¹¹ 为氢时，R⁹ 不为氰基或 CONH₂。

式 I 化合物可用作依赖于 RNA 的 RNA 病毒聚合酶的抑制剂。它们也是依赖于 RNA 的 RNA 病毒复制的抑制剂，可用于治疗依赖于 RNA 的 RNA 病毒感染。

- 15 具有结构式 I 的化合物的一个实施方案是结构式 II 的化合物或其药学上可接受的盐，



其中

- 20 R¹ 为 C₁₋₃ 烷基，其中烷基为未取代的或者被羟基、氨基、C₁₋₃ 烷氧基、C₁₋₃ 烷硫基或 1-3 个氟原子取代；
 R² 为羟基、氟或 C₁₋₃ 烷氧基；

R^3 为氢、卤素、羟基、氨基或 C_{1-3} 烷氧基;

R^5 为氢、 $P_3O_9H_4$ 、 $P_2O_6H_3$ 或 PO_3H_2 ;

R^8 为氢、氨基或 C_{1-4} 烷基氨基 ;

R^9 为氢、氰基、甲基、卤素或 $CONH_2$; 并且

5 R^{10} 和 R^{11} 各自独立为氢、卤素、羟基、氨基、 C_{1-4} 烷基氨基、二
(C_{1-4} 烷基)氨基或 C_{3-6} 环烷基氨基;

条件是当 R^1 为 β -甲基, R^2 和 R^3 为 α -羟基, R^{10} 为氨基, R^5 、 R^8
和 R^{11} 为氢时, R^9 不为氰基或 $CONH_2$ 。

10 结构式 I 的化合物的第二个实施方案是结构式 II 的化合物, 其
中:

R^1 为甲基、氟甲基、羟基甲基、二氟甲基、三氟甲基或氨基甲
基;

R^2 为羟基、氟或甲氧基;

R^3 为氢、氟、羟基、氨基或甲氧基;

15 R^5 为氢或 $P_3O_9H_4$;

R^8 为氢或氨基;

R^9 为氢、氰基、甲基、卤素或 $CONH_2$; 并且

R^{10} 和 R^{11} 各自独立为氢、氟、羟基或氨基;

20 条件是当 R^1 为 β -甲基, R^2 和 R^3 为 α -羟基, R^{10} 为氨基, R^5 、 R^8
和 R^{11} 为氢时, R^9 不为氰基或 $CONH_2$ 。

可用作依赖于 RNA 的 RNA 病毒聚合酶的抑制剂的具有结构式 I
的本发明化合物的例举性而非限制性例子如下:

1. 4-氨基-7-(2-C-甲基- β -D-阿糖呋喃基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶,
2. 4-氨基-7-(2-C-甲基- β -D-呋喃核糖基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶,
- 25 3. 4-甲基氨基-7-(2-C-甲基- β -D-呋喃核糖基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧
啶,
4. 4-二甲基氨基-7-(2-C-甲基- β -D-呋喃核糖基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧
啶,

5. 4-环丙基氨基-7-(2-C-甲基- β -D-呋喃核糖基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶,
6. 4-氨基-7-(2-C-乙烯基- β -D-呋喃核糖基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶,
7. 4-氨基-7-(2-C-羟基甲基- β -D-呋喃核糖基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶,
- 5 8. 4-氨基-7-(2-C-氟甲基- β -D-呋喃核糖基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶,
9. 4-氨基-5-甲基-7-(2-C-甲基- β -D-呋喃核糖基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶,
- 10 10. 4-氨基-7-(2-C-甲基- β -D-呋喃核糖基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-5-羧酸,
11. 4-氨基-5-溴-7-(2-C-甲基- β -D-呋喃核糖基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶,
12. 4-氨基-5-氯-7-(2-C-甲基- β -D-呋喃核糖基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶,
- 15 13. 4-氨基-5-氟-7-(2-C-甲基- β -D-呋喃核糖基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶,
14. 2,4-二氨基-7-(2-C-甲基- β -D-呋喃核糖基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶,
15. 2-氨基-7-(2-C-甲基- β -D-呋喃核糖基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶,
16. 2-氨基-4-环丙基氨基-7-(2-C-甲基- β -D-呋喃核糖基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶,
- 20 17. 2-氨基-7-(2-C-甲基- β -D-呋喃核糖基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4(3H)-酮,
18. 4-氨基-7-(2-C-乙基- β -D-呋喃核糖基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶,
19. 4-氨基-7-(2-C,2-O-二甲基- β -D-呋喃核糖基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶,
- 25 20. 7-(2-C-甲基- β -D-呋喃核糖基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4(3H)-酮,
21. 2-氨基-5-甲基-7-(2-C,2-O-二甲基- β -D-呋喃核糖基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4(3H)-酮,

22. 4-氨基-7-(3-脱氧-2-C-甲基- β -D-呋喃核糖基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶,
23. 4-氨基-7-(3-脱氧-2-C-甲基- β -D-阿糖呋喃基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶,
- 5 24. 4-氨基-2-氟-7-(2-C-甲基- β -D-呋喃核糖基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶,
25. 4-氨基-7-(3-C-甲基- β -D-呋喃核糖基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶,
26. 4-氨基-7-(3-C-甲基- β -D-呋喃木糖基(xylofuranosyl))-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶,
- 10 27. 4-氨基-7-(2,4-二-C-甲基- β -D-呋喃核糖基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶, 和
28. 4-氨基-7-(3-脱氧-3-氟-2-C-甲基- β -D-呋喃核糖基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶;
- 以及对应的 5'-三磷酸酯;
- 15 或其药学上可接受的盐。
- 本发明的进一步的例子是选自下列的化合物:
1. 4-氨基-7-(2-C-甲基- β -D-阿糖呋喃基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶,
2. 4-氨基-7-(2-C-甲基- β -D-呋喃核糖基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶,
3. 4-氨基-7-(2-C-氟甲基- β -D-呋喃核糖基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶,
- 20 4. 4-氨基-5-甲基-7-(2-C-甲基- β -D-呋喃核糖基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶,
5. 4-氨基-5-溴-7-(2-C-甲基- β -D-呋喃核糖基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶,
6. 4-氨基-5-氯-7-(2-C-甲基- β -D-呋喃核糖基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶,
- 25 7. 4-氨基-5-氟-7-(2-C-甲基- β -D-呋喃核糖基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶, 和
8. 4-氨基-7-(2-C,2-O-二甲基- β -D-呋喃核糖基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶

啶, 和对应的 5'-三磷酸酯;

或其药学上可接受的盐。

在本发明的一个实施方案中, 本发明的核苷化合物可用作依赖于正义单链 RNA 的 RNA 病毒聚合酶的抑制剂, 依赖于正义单链 RNA 的 RNA 病毒复制的抑制剂, 和/或用于治疗依赖于正义单链 RNA 的 RNA 病毒感染。在一类实施方案中, 依赖于正义单链 RNA 的 RNA 病毒是黄病毒科 (*Flaviviridae*) 病毒或小核糖核酸病毒科 (*Picornaviridae*) 病毒。在该类的亚类中, 小核糖核酸病毒科病毒是鼻病毒、脊髓灰质炎病毒或甲型肝炎病毒。在该类的第二亚类中, 黄病毒科病毒选自丙型肝炎病毒、黄热病毒、登革病毒、西尼罗病毒、日本脑炎病毒、班齐病毒和牛病毒性腹泻病毒(BVDV)。在该亚类的子集中, 黄病毒科病毒为丙型肝炎病毒。

本发明的另一方面涉及一种抑制依赖于 RNA 的 RNA 病毒聚合酶的方法, 一种抑制依赖于 RNA 的 RNA 病毒复制的方法, 和/或一种治疗需要这种治疗的哺乳动物的依赖于 RNA 的 RNA 病毒感染的方法, 该方法包括给予哺乳动物治疗有效量的结构式 I 的化合物。

在本发明的这一方面的实施方案中, 依赖于 RNA 的 RNA 病毒聚合酶是依赖于正义单链 RNA 的 RNA 病毒。在一类这种实施方案中, 依赖于正义单链 RNA 的 RNA 病毒聚合酶是黄病毒科病毒聚合酶或小核糖核酸病毒科病毒聚合酶。在该类的亚类中, 小核糖核酸病毒科病毒聚合酶是鼻病毒聚合酶、脊髓灰质炎病毒聚合酶或甲型肝炎病毒聚合酶。在该类的第二亚类中, 黄病毒科病毒聚合酶选自丙型肝炎病毒聚合酶、黄热病毒聚合酶、登革病毒聚合酶、西尼罗病毒聚合酶、日本脑炎病毒聚合酶、班齐病毒聚合酶和牛病毒性腹泻病毒(BVDV)聚合酶。在该亚类的子集中, 黄病毒科病毒聚合酶为丙型肝炎病毒聚合酶。

在本发明的这一方面的第二实施方案中, 依赖于 RNA 的 RNA 病毒复制是依赖于正义单链 RNA 的 RNA 病毒复制。在一类这种实

5 施方案中，依赖于正义单链 RNA 的 RNA 病毒复制是黄病毒科病毒复制或小核糖核酸病毒科病毒复制。在该类的亚类中，小核糖核酸病毒科病毒复制是鼻病毒复制、脊髓灰质炎病毒复制或甲型肝炎病毒复制。在该类的第二亚类中，黄病毒科病毒复制选自丙型肝炎病毒复制、黄热病毒复制、登革病毒复制、西尼罗病毒复制、日本脑炎病毒复制、班齐病毒复制和牛病毒复制性腹泻病毒复制。在该亚类的子集中，黄病毒科病毒复制为丙型肝炎病毒复制。

10 在本发明的这一方面的第三实施方案中，依赖于 RNA 的 RNA 病毒感染是依赖于正义单链 RNA 的病毒感染。在一类这种实施方案中，依赖于正义单链 RNA 的 RNA 病毒感染是黄病毒科病毒感染或小核糖核酸病毒科病毒感染。在该类的亚类中，小核糖核酸病毒科病毒感染是鼻病毒感染、脊髓灰质炎病毒感染或甲型肝炎病毒感染。在该类的第二亚类中，黄病毒科病毒感染选自丙型肝炎病毒感染、黄热病毒感染、登革病毒感染、西尼罗病毒感染、日本脑炎病毒感染、班齐病毒感染和牛病毒性腹泻病毒感染。在该亚类的子集中，
15 黄病毒科病毒感染为丙型肝炎病毒感染。

在本申请中，下列术语贯穿始终具有指出的含意：

上述烷基包括直链或支链构型的指定长度的那些烷基。这样的烷基的例子有甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、仲丁基、叔丁基、
20 戊基、异戊基、己基、异己基等。

术语“链烯基”指总碳原子数为 2-6 或该范围内任何数字的直链或支链烯烃(例如乙烯基、丙烯基、丁烯基、戊烯基等)。

术语“炔基”指总碳原子数为 2-6 或者该范围内任何数字的直链或支链炔烃(例如乙炔基、丙炔基、丁炔基、戊炔基等)。

25 术语“环烷基”指总碳原子数为 3-8 或者该范围内任何数字的环状烷烃(例如环丙基、环丁基、环戊基、环己基、环庚基或环辛基)。

术语“环状杂烷基”包括含有 1 或 2 个选自氮、氧和硫的杂原子的非芳族杂环。4-6 元环状杂烷基的例子包括氮杂环丁烷基、吡咯烷基、

哌啶基、吗啉基、硫吗啉基(thiamorpholiny)、咪唑烷基、四氢呋喃基、四氢吡喃基、四氢噻吩基、哌嗪基等。

5 术语“烷氧基”指碳原子数为指定数字(例如 C_{1-4} 烷氧基)或者该范围内任何数字的直链或支链烷基氧(alkoxide)[即甲氧基($MeO-$)、乙氧基、异丙氧基等]。

术语“烷硫基”指碳原子数为指定数字(例如 C_{1-4} 烷硫基)或者该范围内任何数字的直链或支链烷基硫[即甲硫基($MeS-$)、乙硫基、异丙硫基等]。

10 术语“烷基氨基”指碳原子数为指定数字(例如 C_{1-4} 烷基氨基)或者该范围内任何数字的直链或支链烷基胺[即甲基氨基、乙基氨基、异丙基氨基、叔丁基氨基等]。

术语“烷基磺酰基”指碳原子数为指定数字(例如 C_{1-6} 烷基磺酰基)或者该范围内任何数字的直链或支链烷基磺[即甲基磺酰基($MeSO_2-$)、乙基磺酰基、异丙基磺酰基等]。

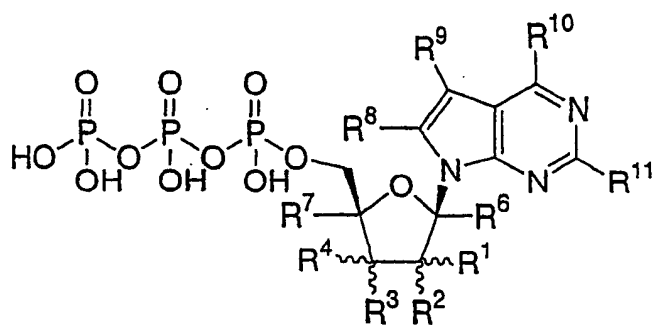
15 术语“烷氧基羰基”指碳原子数为指定数字(例如 C_{1-4} 烷氧基羰基)或该范围内任何数字的本发明羧酸衍生物的直链或支链酯[即甲氧基羰基($MeOCO-$)、乙氧基羰基或丁氧基羰基]。

20 术语“芳基”包括苯基、萆基和吡啶基。所述芳基任选被 1-3 个独立选自 C_{1-4} 烷基、卤素、氰基、硝基、三氟甲基、 C_{1-4} 烷氧基和 C_{1-4} 烷硫基的基团取代。

术语“卤素”包括卤素原子氟、氯、溴和碘。

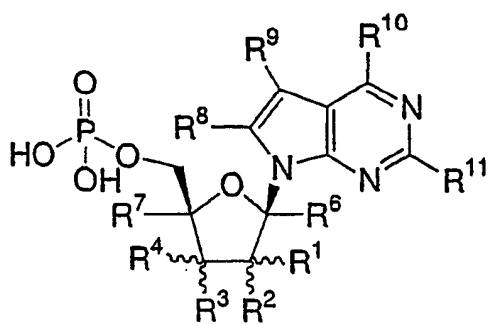
术语“取代的”应被认为包括被指名取代基多重取代。当多重取代部分被公开了或者被要求保护时，所述取代化合物可以独立被一个或多个公开的或者被要求保护的取代基部分单一或者多处取代。

25 术语“5'-三磷酸酯”指具有下述通用结构式 III 的本发明核苷化合物的 5'-羟基的三磷酸酯衍生物：

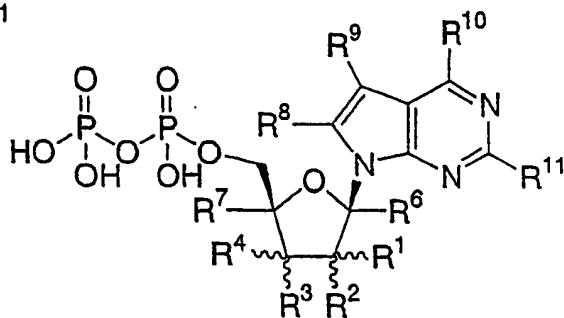


(III)

其中 R^1 - R^{11} 如上定义。本发明化合物还包括三磷酸酯的药学上可接受的盐和分别具有结构式 IV 和 V 的 5'-一磷酸酯和 5'-二磷酸酯衍生物的药学上可接受的盐。



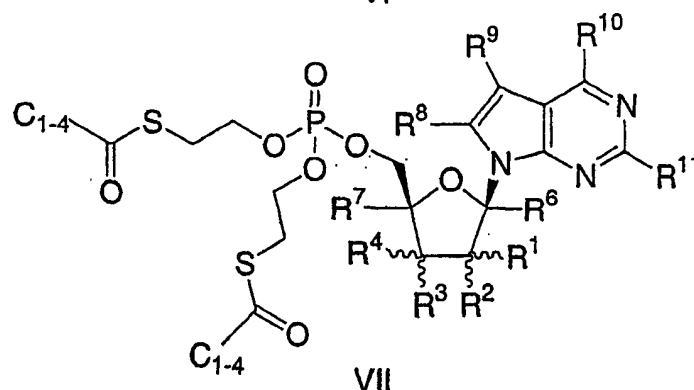
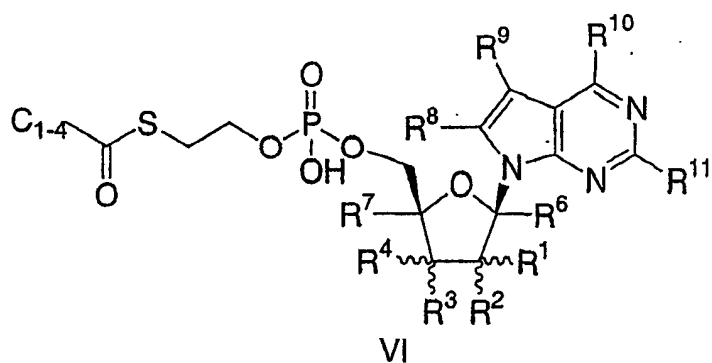
(IV)



(V)

5

术语“5'-(S-酰基-2-硫代乙基)磷酸酯”或“SATE”指分别具有结构式 VI 和 VII 的本发明 5'-一磷酸酯核苷衍生物的一酯或二酯衍生物以及一酯的药学上可接受的盐。



“药物组合物”中的术语“组合物”包括包含活性成分和形成载体的惰性成分的产物，以及由任何两种或多种成分混合、复合或聚集，或者由一种或多种成分分离解，或者由一种或多种成分的其它类型反应或相互作用而直接或间接得到的任何产物。相应地，本发明药物组合物包括通过混合本发明化合物与药学上可接受的载体制成的任何组合物。

术语“给药”和“给予”化合物应理解为是指向有需要的个体提供本发明化合物或本发明化合物的前药。

本发明的另一方面涉及一种抑制 HCV NS5B 聚合酶的方法，一种抑制 HCV 复制的方法，或者一种用本发明化合物与一种或多种可用于治疗 HCV 感染的试剂结合治疗 HCV 感染的方法。这样的可有效对抗 HCV 的试剂包括但不限于利巴韦林、左旋韦林(levovirin)、viramidine、胸腺素 α -1、干扰素 α 、加入聚乙二醇的(pegylated)干扰素 α (peginterferon- α)、干扰素- α 与利巴韦林的组合、peginterferon- α 与利巴韦林的组合、干扰素 α 与左旋韦林的组合、peginterferon- α 与左旋韦林的组合。干扰素 α 包括但不限于重组体干扰素 α 2a (如新泽

西州纳特利 Hoffmann-LaRoche 出售的 Roferon interferon)、加入聚乙二醇的干扰素 α 2a (Pegasys™)、干扰素 α 2b (如新泽西州 Kenilworth 的 Schering Corp.出售的 Intron-A interferon)、加入聚乙二醇的干扰素 α 2b (PegIntron™)、重组体共有干扰素 (如干扰素 alphacon-1)和纯化的干扰素 α 产品。Amgen 的重组体共有干扰素具有商标名称 Infergen®。左旋韦林是利巴韦林的 L-对映异构体, 其显示出近似于利巴韦林的免疫调节活性。Viramidine 表示 WO 01/60379 (转让给 ICN Pharmaceuticals)中所公开的利巴韦林类似物。根据本发明的方法, 可将并用药物的各成分在治疗期间内的不同时间分别给药, 或者以分开的或单一并用药物形式同时给药。因此, 应将本发明理解为包括所有这些同时或交替治疗的疗法, 术语“给药”也作相应解释。应当理解, 本发明化合物与其它可用于治疗 HCV 感染的试剂并用的范围原则上包括与任何用于治疗 HCV 感染的药物组合物的任何并用。当将本发明化合物或其药学上可接受的盐与可有效对抗 HCV 的第二种治疗试剂并用时, 各化合物的剂量可以与单独使用化合物时的剂量相同或不同。

为治疗 HCV 感染, 也可将本发明化合物与 HCV NS3 丝氨酸蛋白酶抑制剂的试剂联合给药。HCV NS3 丝氨酸蛋白酶是必需的病毒酶, 并被描述为是抑制 HCV 复制的优良目标。HCV NS3 蛋白酶抑制剂的底物和非底物基抑制剂都公开在 WO 98/22496、WO 98/46630、WO 99/07733、WO 99/07734、WO 99/38888、WO 99/50230、WO 99/64442、WO 00/09543、WO 00/59929 和 GB2337262 中。B. W. Dymock, "Emerging therapies for hepatitis C virus infection," Emerging Drugs, 6: 13-42 (2001)中讨论了作为开发 HCV 复制抑制剂和治疗 HCV 感染的目标的 HCV NS3 蛋白酶。

利巴韦林、左旋韦林和 viramidine 可通过经由抑制胞内酶肌苷一磷酸脱氢酶(IMPDH)调节鸟嘌呤核苷酸细胞内池(pool)发挥其抗 HCV 作用。IMPDH 是从头鸟嘌呤核苷酸生物合成中生物合成途径的限速

酶。利巴韦林容易被细胞内磷酸化，一磷酸衍生物是 IMPDH 的抑制剂。因此，IMPDH 的抑制代表发现 HCV 复制抑制剂的另一有效目标。从而，本发明化合物也可与下述物质联合给药：IMPDH 抑制剂，如 WO 97/41211 和 WO 01/00622 (转让给 Vertex) 中公开的 VX-497；
5 另一 IMPDH 抑制剂，如 WO 00/25780 (转让给 Bristol-Myers Squibb) 中所公开的物质；或者麦考酚酸吗乙酯[参见 A. C. Allison 和 E. M. Eugui, Agents Action, 44 (Suppl.): 165 (1993)]。

为治疗 HCV 感染，可将本发明化合物与抗病毒剂金刚烷胺(1-氨基基金刚烷)联合给药[该药剂的综述参见 J. Kirschbaum, Anal. Profiles Drug Subs. 12: 1-36 (1983)]。
10 Drug Subs. 12: 1-36 (1983)]。

“药学上可接受的”意指载体、稀释剂或赋形剂必须与其它制剂成分相容，并且对其接受者无害。

也包括在本发明范围内的有包含本发明核苷化合物及其衍生物和药学上可接受的载体的药物组合物。本发明的另一个例子是通过
15 结合任何上述化合物和药学上可接受的载体而制成的药物组合物。本发明的另一例子是一种制备药物组合物的方法，该方法包括结合任何上述化合物和药学上可接受的载体。

还包括在本发明范围内的有可用于抑制依赖于 RNA 的 RNA 病毒聚合酶，特别是 HCV NS5B 聚合酶的药物组合物，该组合物包含
20 有效量的本发明化合物和药学上可接受的载体。可用于治疗依赖于 RNA 的 RNA 病毒感染，特别是 HCV 感染的药物组合物也包括在本发明范围内，还有抑制依赖于 RNA 的 RNA 病毒聚合酶，特别是 HCV NS5B 聚合酶的方法，以及治疗依赖于 RNA 的 RNA 病毒复制，特别是 HCV 复制的方法也都包括在本发明范围内。此外，本发明涉及一
25 种药物组合物，该组合物包含治疗有效量的本发明化合物和治疗有效量的可有效对抗依赖于 RNA 的 RNA 病毒，特别是对抗 HCV 的另一药剂。有效对抗 HCV 的药剂包括但不限于利巴韦林、左旋韦林、viramidine、胸腺素 α -1、HCV NS3 丝氨酸蛋白酶抑制剂、干扰素 α 、

加入聚乙二醇的干扰素 α (peginterferon- α)、干扰素- α 与利巴韦林的组合、peginterferon- α 与利巴韦林的组合、干扰素 α 与左旋韦林的组合、peginterferon- α 与左旋韦林的组合。干扰素 α 包括但不限于重组体干扰素 α 2a (如新泽西州纳特利 Hoffmann-LaRoche 出售的 Roferon interferon)、干扰素 α 2b (如新泽西州 Kenilworth 的 Schering Corp. 出售的 Intron-A interferon)、共有干扰素和纯化的干扰素 α 产品。对利巴韦林及其对抗 HCV 的活性的讨论参见 J. O. Saunders 和 S. A. Raybuck, "Inosine Monophosphate Dehydrogenase: Consideration of Structure, Kinetics, and Therapeutic Potential," Ann. Rep. Med. Chem., 35: 201-210 (2000)。

本发明的另一方面提供所述核苷化合物及其衍生物和它们的药物组合物在制造药物中的用途, 所述药物用于抑制依赖于 RNA 的 RNA 病毒复制, 特别是 HCV 复制, 和/或治疗依赖于 RNA 的 RNA 病毒感染, 特别是 HCV 感染。本发明的再一方面提供可用作药物的核苷化合物及其衍生物和它们的药物组合物, 所述药物用于抑制依赖于 RNA 的 RNA 病毒复制, 特别是 HCV 复制, 和/或治疗依赖于 RNA 的 RNA 病毒感染, 特别是 HCV 感染。

本发明的药物组合物包含作为有效成分的结构式 I 的化合物或其药学上可接受的盐, 还可包含药学上可接受的载体和任选的其它治疗成分。

所述组合物包括适于经口、直肠、局部、非肠道(包括皮下、肌肉和静脉内)、经眼(眼用)、经肺(经鼻或口腔吸入)或者经鼻给药的组合物, 尽管在任何情况下最合适的给药途径将取决于待治疗病症的性质和严重程度以及活性成分的性质。它们可方便地以单剂形式存在, 通过药剂学领域内已知的任何方法制备。

在实际应用中, 可将结构式 I 的化合物作为活性成分与药用载体通过常规制药混合技术紧密掺混并用。根据给药所需制剂, 例如经口或非肠道(包括静脉内)给药所需制剂的形式, 所述载体可以采用各种形式。制备经口剂型用组合物时, 在口服液制剂例如混悬液、酏

剂和溶液的情况下，可以使用任何常用制药介质，例如水、乙二醇、油、醇、调味剂、防腐剂、着色剂等；或者在经口固体制剂例如粉末、硬和软胶囊剂以及片剂的情况下，可以使用载体如淀粉、糖、微晶纤维素、稀释剂、粒化剂、润滑剂、粘结剂、崩解剂等，固体经口制剂比液体制剂更优选。

由于给药容易，因而片剂和胶囊是最好的经口单元剂型，这时明显是采用固体制药载体。如果需要，可以用标准水性或非水性工艺对片剂进行包衣。这样的组合物和制剂应含有至少 0.1% 活性化合物。当然，这些组合物中活性化合物的百分比可以改变，适宜在该单元的约 2% 至约 60% 重量范围内。活性化合物在这类可用于治疗的组合物中的量是可以获得有效剂量的量。所述活性化合物也可以经鼻内给药，例如作为液滴或喷雾给药。

片剂、丸剂、胶囊等也可包含粘结剂如西黄蓍胶、阿拉伯胶、玉米淀粉或明胶；赋形剂如磷酸二钙；崩解剂如玉米淀粉、马铃薯淀粉、海藻酸；润滑剂如硬脂酸镁；和甜味剂如蔗糖、乳糖或糖精。当单元剂型为胶囊时，它除了上述类型的材料外，还可以包含液体载体如脂肪油。

也可以存在各种其它材料作为包衣剂或用于改变单元剂量的物理形态。例如，可以用虫胶、糖或两种一起对片剂进行包衣。糖浆剂或酏剂除了活性成分外，还可以包含蔗糖作为甜味剂、包含对羟基苯甲酸甲酯和对羟基苯甲酸丙酯作为防腐剂、包含染料和调味剂作为樱桃味或橙味香料。

结构式 I 的化合物也可以非肠道给药。这些活性化合物的溶液或混悬液可以通过在水中与表面活性剂如羟丙基纤维素适当混合来制备。分散体也可以在乙二醇、液态聚乙二醇及其油中混合物中制备。在普通的储存和使用条件下，这些制剂含有防腐剂以防止微生物生长。

适于注射用途的药用剂型包括灭菌水溶液或分散体以及即时制

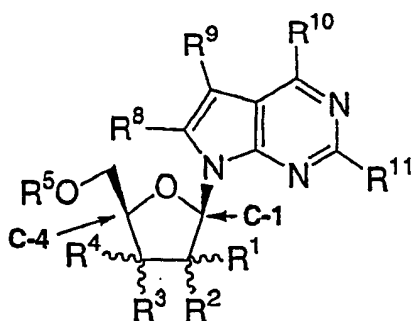
备灭菌注射溶液或分散体的灭菌粉末。在各种情况下，所述剂型必须是灭菌的，并且必须是易于注射程度上的液态。在制造和储存条件下必须是稳定的，并且必须防止被微生物如细菌和真菌污染。所述载体可以是溶剂或含有例如水、乙醇、多元醇(例如丙三醇、丙二醇和液态聚乙二醇)、其稳定的混合物和植物油的分散介质。

可以采用任何适合的给药途径，以向哺乳动物，特别是人提供有效剂量的本发明化合物。例如，可以采用经口、直肠、局部、非肠道、眼、肺、鼻等。剂型包括片剂、锭剂、分散体、混悬液、溶液、胶囊、乳膏、软膏、气雾剂等。优选经口给予结构式I的化合物。

对人经口给药时，分份剂量的剂量范围为 0.01-1000 mg/kg 体重。在一个实施方案中，分份剂量的剂量范围为 0.1-100 mg/kg 体重。在另一个实施方案中，分份剂量的剂量范围为 0.5-20 mg/kg 体重。对于经口给药，优选将所述组合物以含 1.0-1000 mg 活性成分，特别是 1、5、10、15、20、25、50、75、100、150、200、250、300、400、500、600、750、800、900 和 1000 mg 活性成分的片剂或胶囊的形式给药，用以调节待治疗患者的症状。

所用活性成分的有效剂量可以随所采用的具体化合物、给药方式、待治疗病症和待治疗病症的严重程度而变化。本领域技术人员可以容易地确定这样的剂量。可以调节该剂量方案以提供最佳治疗反应。

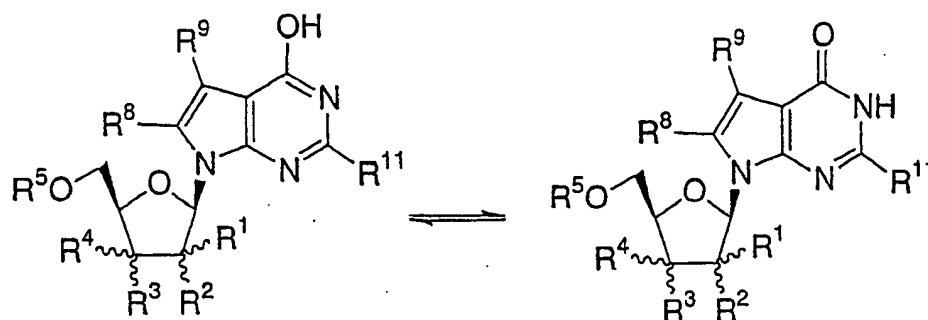
本发明化合物包含一个或多个非对称中心，因此可以作为外消旋体和外消旋混合物、单一的对映体、非对映体混合物和单独的非对映体存在。本发明包括具有下述结构式的五元呋喃糖环为 β -D 立体化学构型的核苷化合物，即，其中五元呋喃糖环的 C-1 和 C-4 上的取代基具有 β -立体化学构型的核苷化合物(以粗线表示的“向上”方向)。



β -D-

本文所述的一些化合物包含烯属双键，除非另外指明，否则意指包括E和Z两种几何异构体。

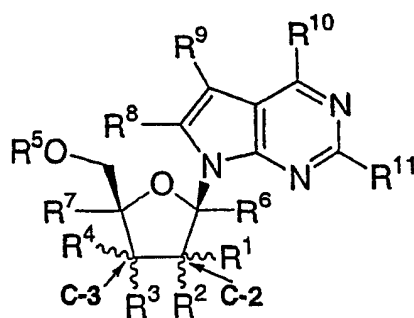
5 本文所述的一些化合物可以作为互变异构体如酮-烯醇互变异构体存在。各种互变异构体及其混合物包括在结构式I的化合物中。包括在本发明化合物范围内的酮-烯醇互变异构体的例子如下：



10 可以通过例如分级结晶从适当的溶剂例如甲醇或乙酸乙酯或其混合物中或者经由用有旋光力的固定相的手性层析将结构式I的化合物分离为它们的单独的非对映体。

或者，可以通过用已知构型的光学纯原料或试剂进行的立体有择合成得到结构式I的化合物的任何立体异构体。

15 具有结构式I的本发明化合物的呋喃糖环的C-2和C-3位取代基的立体化学用波形曲线表示，这表示取代基R¹、R²、R³和R⁴可具有彼此独立的 α (取代基“向下”)或 β (取代基“向上”)构型。呋喃糖环的C-1和C-4位粗线的立体化学符号表示取代基具有 β 构型(取代基“向上”)。



(I)

本发明化合物可以以药学上可接受的盐的形式给药。术语“药学上可接受的盐”指由药学上可接受的非毒性碱或酸包括无机或有机碱和无机或有机酸所制成的盐。包括在术语“药学上可接受的盐”范围内的碱性化合物的盐指本发明化合物的非毒性盐，它通常通过游离碱与适当的有机或无机酸的反应制备。本发明碱性化合物的具有代表性的盐包括但不限于下列盐：乙酸盐、苯磺酸盐、苯甲酸盐、碳酸氢盐、硫酸氢盐、酒石酸氢盐、硼酸盐、溴化物、樟磺酸盐、碳酸盐、氯化物、克拉维酸盐、柠檬酸盐、二盐酸盐、依地酸盐、乙二磺酸盐、依托酸盐、乙磺酸盐、富马酸盐、葡庚糖酸盐、葡糖酸盐、谷氨酸盐、乙醇酰对氯苯基胍酸盐、己基间苯二酚盐 (hexylresorcinate)、海巴明、氢溴酸盐、盐酸盐、羧基甲酸盐、碘化物、异硫代硫酸盐(isothionate)、乳酸盐、乳糖酸盐、月桂酸盐、苹果酸盐、马来酸盐、扁桃酸盐、甲磺酸盐、甲基溴化物、甲基硝酸盐、硫酸二甲酯、粘酸盐、萘磺酸盐、硝酸盐、N-甲基葡萄糖胺铵盐、油酸盐、草酸盐、扑姆酸盐(恩波酸盐)、棕榈酸盐、泛酸盐、磷酸盐/二磷酸盐、聚半乳糖醛酸盐、水杨酸盐、硬脂酸盐、硫酸盐、碱式乙酸盐、琥珀酸盐、单宁酸盐、酒石酸盐、茶氯酸盐、甲苯磺酸盐、三乙基碘和戊酸盐。此外，当本发明化合物带有酸性部分时，其适当的药学上可接受的盐包括但不限于衍生自无机碱的盐，包括铝、铵、钙、铜、铁、亚铁、锂、镁、锰、mangamous、钾、钠、锌等。特别优选的是铵、钙、镁、钾和钠盐。衍生自药学上可接受的有机非毒性碱的盐包括伯、仲和叔胺、环胺的盐以及碱性离子交换树脂，

如精氨酸、甜菜碱、咖啡碱、胆碱、N,N-二苄基乙二胺、二乙胺、2-二乙基氨基乙醇、2-二甲基氨基乙醇、乙醇胺、乙二胺、N-乙基吗啉、N-乙基哌啶、葡萄糖胺、壳糖胺、组氨酸、海巴明、异丙基胺、赖氨酸、甲葡萄糖胺、吗啉、哌嗪、哌啶、聚胺树脂、普鲁卡因、嘌呤、可可碱、三乙胺、三甲胺、三丙胺、氨丁三醇等。

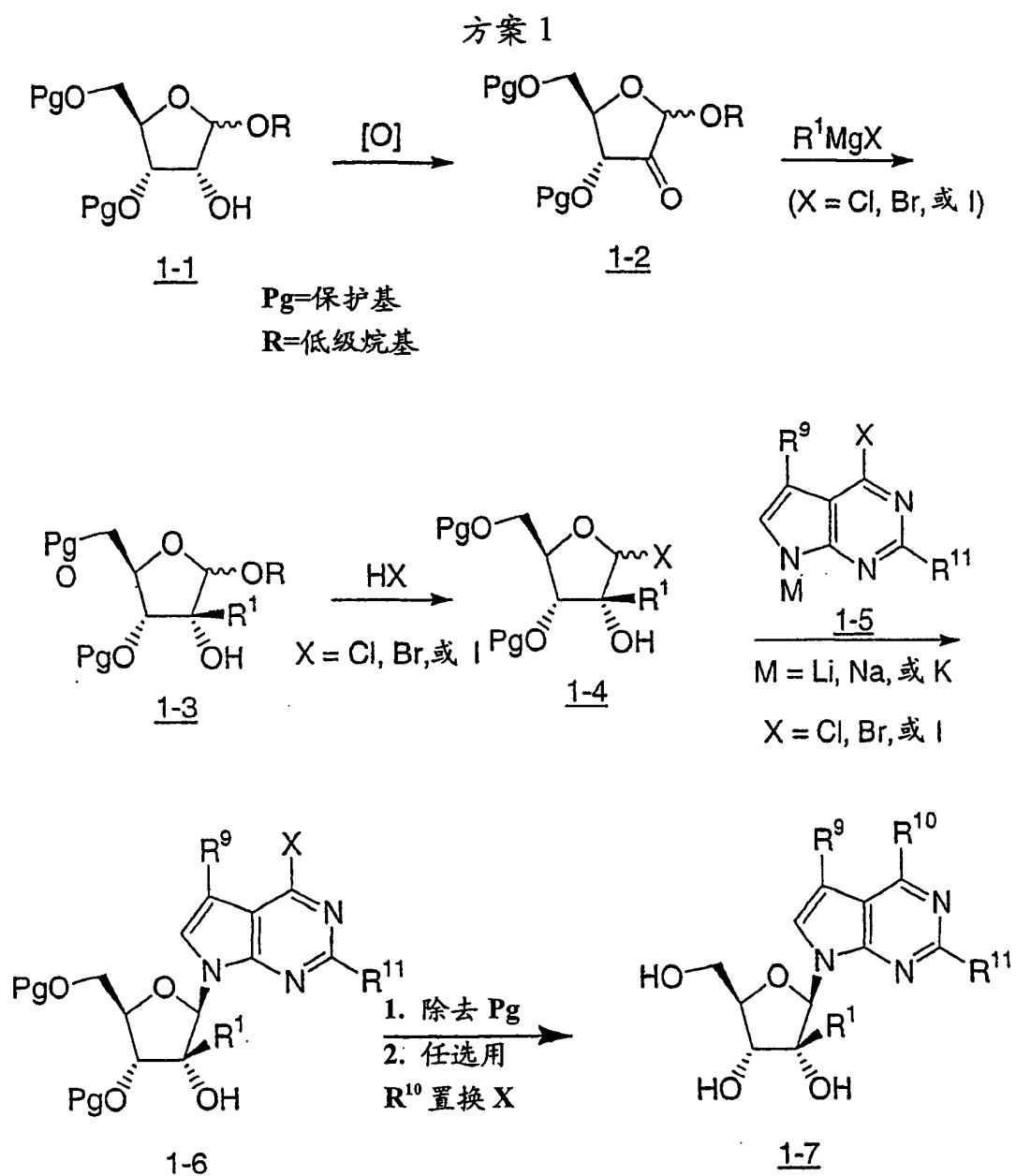
还有，在本发明化合物中存在羧酸(-COOH)或醇基的情况下，可以使用羧酸衍生物的药学上可接受的酯，如醇的甲基、乙基或新戊酰氧基甲基或酰基衍生物，如乙酸酯或马来酸酯。包括在内的有本领域已知用于改进用作缓释或前药制剂的溶解性或水解特性的那些酯和酰基。

本发明的核苷化合物和衍生物的制备

本发明的核苷化合物及其衍生物可以按照实际操作中完善建立起来的核苷和核苷酸化学合成工艺进行制备。制备本发明化合物时，参考下述描述合成方法的文献：“Chemistry of Nucleosides and Nucleotides,” L. B. Townsend 编辑，卷 1-3, Plenum Press, 1988, 将其全文结合在此以作参考。

制备本发明化合物的一个具有代表性的通用方法如下面方案 1 所述。该方案例举了其中呋喃糖环具有 β -D-核糖构型的结构式 1-7 的的本发明化合物的合成。起始原料为结构式 1-1 的 3,5-二-O-被保护的烷基呋喃糖苷，如甲基呋喃糖苷。然后用适当的氧化剂如三氧化铬或铬酸盐试剂、Dess-Martin periodinane 或者通过 Swern 氧化作用氧化 C-2 羟基，得到结构式 1-2 的 C-2 酮。加入格利雅试剂如烷基、烯基或炔基卤化镁(例如 MeMgBr、EtMgBr、乙烯基 MgBr、烯丙基 MgBr 和乙炔基 MgBr)或者烷基、烯基或炔基锂如 MeLi，在适当的有机溶剂如四氢呋喃、二乙醚等中穿过(across)1-2 的羰基双键，得到结构式 1-3 的 C-2 叔醇。然后通过用在适当有机溶剂中的卤化氢如溴化氢的乙酸溶液中处理式 1-3 的呋喃糖苷，在呋喃糖糖衍生物的 C-

1(端基)位上引进良好的离去基团(如 Cl、Br 和 I), 得到中间体卤化呋喃糖 1-4。C-1 磺酸盐, 如甲磺酸盐($\text{MeSO}_2\text{O}-$)、三氟甲磺酸盐($\text{CF}_3\text{SO}_2\text{O}-$)或对甲苯磺酸盐($-\text{OTs}$)也可以在随后的反应中作为有用的离去基团以生成配糖(核苷)键。通过用适当取代的 1*H*-吡咯并[2,3-*d*]嘧啶 1-5, 如适当取代的 4-卤代-1*H*-吡咯并[2,3-*d*]嘧啶的金属盐(如锂、钠或钾)处理结构式 1-4 的中间体构建核苷键, 其中所述 4-卤代-1*H*-吡咯并[2,3-*d*]嘧啶可通过用碱金属氢化物(如氢化钠)、碱金属氢氧化物(如氢氧化钾)、碱金属碳酸盐(如碳酸钾)或碱金属六甲基二硅氮化物(hexamethyldisilazide)(如 NaHMDS)在适当的无水有机溶剂如乙腈、四氢呋喃、1-甲基-2-吡咯烷酮或 *N,N*-二甲基甲酰胺(DMF)中处理而原位生成。置换反应可用相转移催化剂如 TDA-1 或三乙基苄基氯化铵在两相体系(固-液或液-液)中进行催化。然后根据既定的脱保护方法, 如 T. W. Greene 和 P. G. M. Wuts 在 "Protective Groups in Organic Synthesis," 第 3 版, John Wiley & Sons, 1999 中所描述的方法脱掉结构式 1-6 的被保护的核苷中的任选保护基。通过用适当的胺如酒精氨或液态氨处理 4-卤代中间体 1-6, 在吡咯并[2,3-*d*]嘧啶核的 4-位上任选引进氨基, 生成 C-4 位($-\text{NH}_2$)伯胺, 用烷基胺处理生成仲胺($-\text{NHR}$), 或者用二烷基胺处理生成叔胺($-\text{NRR}'$)。可以通过用含水碱如含水氢氧化钠水解 1-6, 得到 7*H*-吡咯并[2,3-*d*]嘧啶-4(3*H*)酮化合物。醇解(如甲醇分解)1-6 可得到 C-4 醇化物($-\text{OR}$), 而用烷基硫醇处理则得到 C-4 烷硫基($-\text{SR}$)衍生物。随后需要进行有机/医药化学领域内普通技术人员已知的化学操作, 以获得所需的本发明化合物。

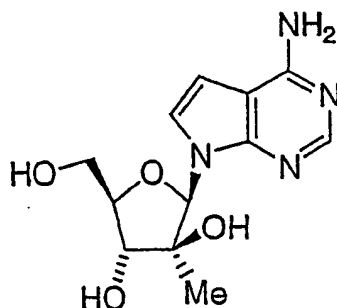


5 下面的实施例提供对文献出版物的引用，这些文献包含制备最终化合物或在制备本发明最终化合物时所用中间体的细节。本发明的核苷化合物按照下述实施例中的程序制备。实施例无意以任何方式限制本发明的范围，也不应对其作如是解释。核苷和核苷酸合成领域的技术人员将容易地意识到可对下述实施例中的条件和工艺作

10 众所周知的变更，以制备本发明的这些和其它化合物。除非另有说明，否则所有的温度都是摄氏度。

实施例 1

4-氨基-7-(2-C-甲基-β-D-阿糖呋喃基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶

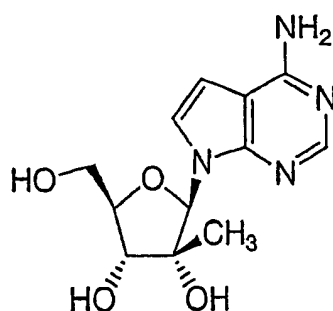


在 0℃，向三氧化铬(1.57 g, 1.57 mmol)的二氯甲烷(DCM)(10 mL)溶液中加入乙酸酐(145mg, 1.41 mmol)，然后加入吡啶(245 mg, 3.10 mmol)。将该混合物搅拌 15 分钟，然后加入 7-[3,5-O-[1,1,3,3-四(1-甲基乙基)-1,3-二硅氧烷二基]-β-D-呋喃核糖基]-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-胺[其制备参见 *J. Am. Chem. Soc.* 105: 4059 (1983)](508 mg, 1.00 mmol)的 DCM (3 mL)溶液。将所得溶液搅拌 2 小时，然后倒入乙酸乙酯(10 mL)中，随后通过硅胶过滤，用乙酸乙酯作洗脱剂。将合并的滤液真空蒸发，导进二乙醚/THF(1:1)(20 mL)中，冷却至-78℃，然后滴加溴化甲基镁(3M, THF 溶液)(3.30 mL, 10 mmol)。将该混合物在-78℃搅拌 10 分钟，然后使其回复至室温(rt)，通过加入饱和氯化铵水溶液(10 mL)猝灭，用 DCM(20 mL)萃取。真空蒸发有机相，将粗产品通过硅胶提纯，用 5% 甲醇的二氯甲烷溶液作洗脱剂。收集含产物的流分，真空蒸发。将所得油导进 THF (5mL) 中，并加入二氧化硅上的氟化四丁基铵(TBAF)(1.1 mmol/g 在二氧化硅上)(156 mg)。将该混合物在室温下搅拌 30 分钟，过滤，真空蒸发。用 10% 甲醇的二氯甲烷溶液作洗脱剂，经硅胶提纯所得粗产物。收集含产物的流分，真空蒸发，得到为无色固体状的所需化合物(49 mg)。

¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ 1.08 (s, 3H), 3.67 (m, 2H), 3.74 (m, 1H), 3.83 (m, 1H), 5.19 (m, 1H), 5.23 (m, 1H), 5.48 (m, 1H), 6.08 (1H, s), 6.50 (m, 1H), 6.93 (bs, 2H), 7.33 (m, 1H), 8.02 (s, 1H).

实施例 2

4-氨基-7-(2-C-甲基-β-D-呋喃核糖基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶



5 步骤 A: 3,5-二-O-(2,4-二氯苯基甲基)-1-O-甲基-α-D-呋喃核糖

将 2-O-乙酰基-3,5-二-O-(2,4-二氯苯基甲基)-1-O-甲基-α-D-呋喃核糖[其制备参见 *Helv. Chim. Acta* 78: 486 (1995)](52.4 g, 0.10 mol)的甲醇 K₂CO₃(500 mL, 在室温下饱和)溶液在室温下搅拌 45 分钟, 然后减压浓缩。将油状残余物悬浮于 CH₂Cl₂ (500 mL)中, 用水(300 mL + 10 5 x 200 mL)和盐水(200 mL)洗涤, 干燥(Na₂SO₄), 过滤, 浓缩, 得到为无色油状物的标题化合物(49.0 g), 将其直接用于下面的步骤 B, 无需进一步提纯。

¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ 3.28 (s, 3H, OCH₃), 3.53 (d, 2H, *J*_{5,4} = 4.5 Hz, H-5a, H-5b), 3.72 (dd, 1H, *J*_{3,4} = 3.6 Hz, *J*_{3,2} = 6.6 Hz, H-3), 3.99 (ddd, 1H, *J*_{2,1} = 4.5 Hz, *J*_{2,OH-2} = 9.6 Hz, H-2), 4.07 (m, 1H, H-4), 4.50 (s, 2H, CH₂Ph), 4.52, 4.60 (2d, 2H, *J*_{gem} = 13.6 Hz, CH₂Ph), 4.54 (d, 1H, OH-2), 4.75 (d, 1H, H-1), 7.32-7.45, 7.52-7.57 (2m, 10H, 2Ph).

¹³C NMR (DMSO-*d*₆): δ 55.40, 69.05, 69.74, 71.29, 72.02, 78.41, 81.45, 103.44, 127.83, 127.95, 129.05, 129.28, 131.27, 131.30, 133.22, 133.26, 133.55, 133.67, 135.45, 135.92.

15 步骤 B: 3,5-二-O-(2,4-二氯苯基甲基)-1-O-甲基-α-D-赤藓-呋喃戊-2-酮糖

在氩气(Ar)下, 用 0.5 小时向冰冷的 Dess-Martin periodinane(50.0 g, 118 mmol)的无水 CH₂Cl₂ (350 mL)溶液中滴加步骤 A 所得化合物(36.2 g, 75 mmol)的无水 CH₂Cl₂ (200 mL)溶液。将该反应混合物在 0℃ 搅

拌 0.5 小时, 然后在室温下搅拌 3 天。用无水 Et₂O (600 mL) 稀释所得混合物, 并倒进 Na₂S₂O₃·5H₂O (180 g) 在饱和含水 NaHCO₃ (1400 mL) 中的冰冷混合物中。分离各层, 用饱和含水 NaHCO₃ (600 mL)、水 (800 mL) 和盐水 (600 mL) 洗涤有机层, 干燥 (MgSO₄), 过滤并蒸发, 得到
5 为无色油状物的标题化合物 (34.2 g), 将其用于下面的步骤 C, 无需进一步提纯。

¹H NMR (CDCl₃): δ 3.50 (s, 3H, OCH₃), 3.79 (dd, 1H, J_{5a,5b} = 11.3 Hz, J_{5a,4} = 3.5 Hz, H-5a), 3.94 (dd, 1H, J_{5b,4} = 2.3 Hz, H-5b), 4.20 (dd, 1H, J_{3,1} = 1.3 Hz, J_{3,4} = 8.4 Hz, H-3), 4.37 (ddd, 1H, H-4), 4.58, 4.69 (2d, 2H, J_{gem} = 13.0 Hz, CH₂Ph), 4.87 (d, 1H, H-1), 4.78, 5.03 (2d, 2H, J_{gem} = 12.5 Hz, CH₂Ph), 7.19-7.26, 7.31-7.42 (2m, 10H, 2Ph).

¹³C NMR (DMSO-*d*₆): δ 55.72, 69.41, 69.81, 69.98, 77.49, 78.00, 98.54, 127.99, 128.06, 129.33, 129.38, 131.36, 131.72, 133.61, 133.63, 133.85, 133.97, 134.72, 135.32, 208.21.

步骤 C: 3,5-二-O-(2,4-二氯苯基甲基)-2-C-甲基-1-O-甲基-α-D-呋喃核糖
10

在 -55℃, 向 MeMgBr 的无水 Et₂O (0.48 M, 300 mL) 溶液中滴加步骤 B 所得化合物 (17.40 g, 36.2 mmol) 的无水 Et₂O (125 mL) 溶液。将反应混合物升温至 -30℃, 并在 -30℃ 至 -15℃ 搅拌 7 小时, 然后倒进冰冷的水 (500 mL) 中, 在室温下剧烈搅拌该混合物 0.5 小时。将混
15 合物通过硅藻土垫 (10 × 5 cm) 过滤, 并用 Et₂O 充分洗涤。将有机层干燥 (MgSO₄), 过滤并浓缩。将残余物溶于己烷 (~30 mL) 中, 经用己烷和己烷/EtOAc (9/1) 洗脱的硅胶柱 (10 × 7 cm, 预先填充己烷), 得到为无色糖浆状的标题化合物 (16.7 g)。

¹H NMR (CDCl₃): δ 1.36 (d, 3H, J_{Me,OH} = 0.9 Hz, 2C-Me), 3.33 (q, 1H, OH), 3.41 (d, 1H, J_{3,4} = 3.3 Hz), 3.46 (s, 3H, OCH₃), 3.66 (d, 2H, J_{5,4} = 3.7 Hz, H-5a, H-5b), 4.18 (表观 q, 1H, H-4), 4.52 (s, 1H, H-1), 4.60 (s, 2H, CH₂Ph), 4.63, 4.81 (2d, 2H, J_{gem} = 13.2 Hz, CH₂Ph), 7.19-7.26, 7.34-7.43 (2m, 10H, 2Ph).

¹³C NMR (CDCl₃): δ 24.88, 55.45, 69.95, 70.24, 70.88, 77.06, 82.18, 83.01, 107.63, 127.32, 129.36, 130.01, 130.32, 133.68, 133.78, 134.13, 134.18, 134.45, 134.58.

20

步骤 D: 4-氯-7-[3,5-二-O-(2,4-二氯苯基甲基)-2-C-甲基-β-D-呋喃核糖基]-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶

在 0℃, 向步骤 C 所得化合物(9.42 g, 19 mmol)的无水二氯甲烷(285 mL)溶液中滴加 HBr(5.7 M 乙酸溶液, 20 mL, 114 mmol)。将所得溶液在 0℃搅拌 1 小时, 然后在室温下搅拌 3 小时, 真空蒸发, 并用无水甲苯(3 × 40 mL)共蒸发。将油状残余物溶于无水乙腈(50 mL)中, 将其加入到 4-氯-1H-吡咯并[2,3-d]嘧啶的钠盐的乙腈溶液[由 4-氯-1H-吡咯并[2,3-d]嘧啶[其制备参见: *J. Chem. Soc.*: 131 (1960)](8.76 g, 57 mmol)的无水乙腈(1000 mL)溶液和 NaH (60%, 在矿物油中, 2.28 g, 57 mmol)经 4 小时在室温下的剧烈搅拌后原位生成]。将合并的混合物在室温下搅拌 24 小时, 然后蒸发至干燥。将残余物悬浮于水(250 mL)中, 用 EtOAc(2 × 500 mL)萃取。将合并的萃取物用盐水(300 mL)洗涤, 经 NaSO₄ 干燥, 过滤并蒸发。将粗制产品通过硅胶柱(10 cm × 10 cm)提纯, 用乙酸乙酯/己烷(1:3 和 1:2)作洗脱剂。合并含产物的流分, 真空蒸发, 得到为无色泡沫状的所需产物(5.05 g)。

¹H NMR (CDCl₃): δ 0.93 (s, 3H, CH₃), 3.09 (s, 1H, OH), 3.78 (dd, 1H, *J*_{5',5''} = 10.9 Hz, *J*_{5',4} = 2.5 Hz, H-5'), 3.99 (dd, 1H, *J*_{5'',4} = 2.2 Hz, H-5''), 4.23-4.34 (m, 2H, H-3', H-4'), 4.63, 4.70 (2d, 2H, *J*_{gem} = 12.7 Hz, CH₂Ph), 4.71, 4.80 (2d, 2H, *J*_{gem} = 12.1 Hz, CH₂Ph), 6.54 (d, 1H, *J*_{5,6} = 3.8 Hz, H-5), 7.23-7.44 (m, 10H, 2Ph).

¹³C NMR (CDCl₃): δ 21.31, 69.10, 70.41, 70.77, 79.56, 80.41, 81.05, 91.11, 100.57, 118.21, 127.04, 127.46, 127.57, 129.73, 129.77, 130.57, 130.99, 133.51, 133.99, 134.33, 134.38, 134.74, 135.21, 151.07, 151.15 152.47.

步骤 E: 4-氯-7-(2-C-甲基-β-D-呋喃核糖基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶

在 -78℃, 向步骤 D 所得化合物(5.42 g, 8.8 mmol)的二氯甲烷(175 mL)溶液中滴加三氯化硼(1M 二氯甲烷溶液, 88 mL, 88 mmol)。将该混合物在 -78℃搅拌 2.5 小时, 然后在 -30℃至 -20℃搅拌 3 小时。通过加入甲醇/二氯甲烷(1:1)(90 mL)猝灭反应, 并将所得混合物在 -15℃搅拌 30 分钟, 然后在 0℃用氨水中和, 并在室温下搅拌 15 分钟。过

滤固体，用 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (1/1, 250 mL) 洗涤。将合并的滤液蒸发，通过硅胶快速层析提纯残余物，用 CH_2Cl_2 和 $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ (99:1, 98:2, 95:5 和 90:10) 梯度作洗脱液，得到为无色泡沫状的所需化合物(1.73 g)，用 MeCN 处理后将其转化成无定形固体。

^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$): δ 0.64 (s, 3H, CH_3), 3.61-3.71 (m, 1H, H-5'), 3.79-3.88 (m, 1H, H-5''), 3.89-4.01 (m, 2H, H-3', H-4'), 5.15-5.23 (m, 3H, 2'-OH, 3'-OH, 5'-OH), 6.24 (s, 1H, H-1'), 6.72 (d, 1H, $J_{5,6} = 3.8$ Hz, H-5), 8.13 (d, 1H, H-6), 8.65 (s, 1H, H-2).

^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$): δ 20.20, 59.95, 72.29, 79.37, 83.16, 91.53, 100.17, 117.63, 128.86, 151.13, 151.19, 151.45.

5

步骤 F: 4-氨基-7-(2-C-甲基- β -D-呋喃核糖基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶

向步骤 E 所得化合物(1.54 g, 5.1 mmol)中加入甲醇氨(在 0℃ 饱和; 150 mL)。将该混合物在 85℃、不锈钢高压釜中加热 14 小时，然后冷却并真空蒸发。将粗制混合物通过硅胶柱提纯，用 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (9/1) 作洗脱剂，得到为无色泡沫的题述化合物(0.8 g)，用 MeCN 处理后将其分离成无定形固体。从甲醇/乙腈中重结晶该无定形固体; m.p. 222℃。

10

^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$) δ 0.62 (s, 3H, CH_3), 3.57-3.67 (m, 1H, H-5'), 3.75-3.97 (m, 3H, H-5'', H-4', H-3'), 5.00 (s, 1H, 2'-OH), 5.04 (d, 1H, $J_{3'\text{OH},3'} = 6.8$ Hz, 3'-OH), 5.06 (t, 1H, $J_{5'\text{OH},5'',5''} = 5.1$ Hz, 5'-OH), 6.11 (s, 1H, H-1'), 6.54 (d, 1H, $J_{5,6} = 3.6$ Hz, H-5), 6.97 (br s, 2H, NH_2), 7.44 (d, 1H, H-6), 8.02 (s, 1H, H-2).

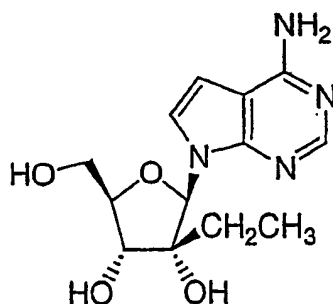
^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$) δ 20.26, 60.42, 72.72, 79.30, 82.75, 91.20, 100.13, 103.08, 121.96, 150.37, 152.33, 158.15.

LC-MS: 实测值: 279.10 ($\text{M}-\text{H}^+$); 计算值 $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_4+\text{H}^+$: 279.11.

15

实施例 3

4-氨基-7-(2-C-乙基-β-D-呋喃核糖基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶



5 步骤 A: 3,5-二-O-(2,4-二氯苯基甲基)-2-C-乙基-1-O-甲基-α-D-呋喃核糖

在-78℃, 向二乙醚(300 mL)中缓慢加入 EtMgBr (3.0 M, 16.6 mL), 然后滴加实施例 2 步骤 B 所得化合物(4.80 g, 10.0 mmol)的无水 Et₂O (100 mL)溶液。将该反应混合物在-78℃搅拌 15 分钟, 使其
10 升温至-15℃, 再搅拌 2 小时, 然后倒进经搅拌的水(300 mL)中 Et₂O(600 mL)的混合物中。分离有机相, 干燥(MgSO₄), 真空蒸发。将粗产物通过硅胶提纯, 用乙酸乙酯/己烷(1:2)作洗脱剂。收集含产物的流分, 真空蒸发, 得到为无色油状的所需产物(3.87 g)。

15 步骤 B: 4-氯-7-[3,5-二-O-(2,4-二氯苯基甲基)-2-C-乙基-β-D-呋喃核糖基]-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶

在 0℃向步骤 A 所得化合物(1.02 mg, 2.0 mmol)的二氯甲烷(40 mL)溶液中滴加 HBr(5.7 M 乙酸溶液)(1.75 mL, 10.0 mmol)。将所得溶液在室温下搅拌 2 小时, 真空蒸发, 并与甲苯(10 mL)共蒸发两次。
20 将油状残余物溶于乙腈(10 mL)中, 并加入到 4-氯-1H-吡咯并[2,3-d]嘧啶(307 mg, 2.0 mmol)、氢氧化钾(337 mg, 6.0 mmol)和三[2-(2-甲氧基乙氧基)乙基]胺(130 mg, 0.4 mmol)在乙腈(10 mL)中的经剧烈搅拌的混合物中。将所得混合物在室温下搅拌过夜, 然后倒进饱和氯化铵(100 mL)和乙酸乙酯(100 mL)的经搅拌的混合物中。分离有机层, 用盐水

(100 mL)洗涤, 经 MgSO_4 干燥, 过滤并真空蒸发。将粗产物通过硅胶提纯, 用乙酸乙酯/己烷(1:2)作洗脱剂, 得到为无色泡沫状的所需产物(307 mg)。

5 步骤 C: 4-氯-7-(2-C-乙基- β -D-呋喃核糖基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶

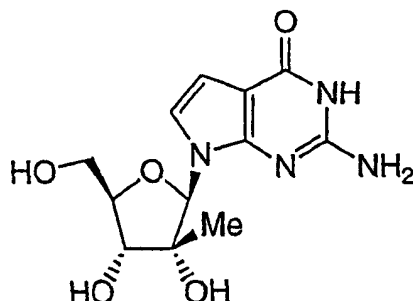
在-78℃, 向步骤 B 所得化合物(307 mg, 0.45 mmol)的二氯甲烷(8 mL)溶液中加入三氯化硼(1M 二氯甲烷溶液)(4.50 mL, 4.50 mmol)。将该混合物在-78℃搅拌 1 小时, 然后在-10℃搅拌 3 小时。通过加入甲
10 醇/二氯甲烷(1:1)(10 mL)猝灭反应, 并在-15℃搅拌 30 分钟, 加入氢氧化铵水溶液中和。减压蒸发该混合物, 将所得油通过用甲醇/二氯甲烷(1:9)作洗脱剂的硅胶提纯。收集含产物的流分, 真空蒸发, 得到为无色泡沫状的所需产物(112 mg)。

15 步骤 D: 4-氨基-7-(2-C-乙基- β -D-呋喃核糖基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶

向步骤 C 所得化合物(50 mg, 0.16 mmol)中加入饱和氨的甲醇(4 mL)。将该混合物在 75℃、封闭容器中搅拌 72 小时, 冷却并真空蒸发。将粗制混合物通过用甲醇/二氯甲烷(1:9)作洗脱剂的硅胶提纯。
20 收集含产物的流分, 真空蒸发, 得到为无色粉末的所需产物(29 mg)。

^1H NMR (200 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 0.52 (t, 3H), 1.02 (m, 2H), 4.01-3.24 (m, 6H), 5.06 (m, 1H), 6.01 (s, 1H), 6.51 (d, 1H), 6.95 (s br, 2H), 6.70 (d, 1H), 7.99 (s, 1H).
LC-MS: 实测值: 295.2 ($\text{M}+\text{H}^+$); 计算值 $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_4+\text{H}^+$: 295.14.

实施例 4

2-氨基-7-(2-C-甲基- β -D-呋喃核糖基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4(3H)-酮

5

步骤 A: 2-氨基-4-氯-7-[3,5-二-O-(2,4-二氯苯基甲基)-2-C-甲基- β -D-呋喃核糖基]-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶

向实施例 2 步骤 C 所得产物(1.27 g, 2.57 mmol)的 CH_2Cl_2 (30 mL) 冰冷溶液中滴加 HBr (5.7 M 乙酸溶液; 3 mL)。将反应混合物在室温下搅拌 2 小时, 减压浓缩, 与甲苯(2 x 15 mL)共蒸发。将所得油溶于乙腈(MeCN)(15 mL)中, 并滴加到充分搅拌的 2-氨基-4-氯-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶[其制备参见: *Heterocycles* 35: 825 (1993)](433 mg, 2.57 mmol)、KOH (85%, 粉碎成粉末)(0.51 g, 7.7 mmol)、三[2-(2-甲氧基乙氧基)乙基]胺(165 μL , 0.51 mmol)在乙腈(30 mL)的混合物中。将所得混合物在室温下搅拌 1 小时, 过滤并蒸发。将残余物通过用己烷/EtOAc, 5/1, 3/1 和 2/1 作洗脱剂的硅胶柱提纯, 得到为无色泡沫状的标题化合物(0.65 g)。

步骤 B: 2-氨基-4-氯-7-(2-C-甲基- β -D-呋喃核糖基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶

在 -78°C , 向步骤 A 所得产物(630 mg, 1.0 mmol)的 CH_2Cl_2 (20 mL) 溶液中加入三氯化硼(1M 二氯甲烷溶液)(10 mL, 10 mmol)。将该混合物在 -78°C 搅拌 2 小时, 然后在 -20°C 搅拌 2.5 小时。用 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (1: 1)(10 mL)猝灭反应, 并在 -20°C 搅拌 0.5 小时, 在 0°C 用氨水中和。

过滤固体，用 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (1:1) 洗涤，将合并的滤液真空蒸发。将残余物通过硅胶柱提纯，用 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ ，50/1 和 20/1 作洗脱剂，得到为无色泡沫状的标题化合物(250 mg)。

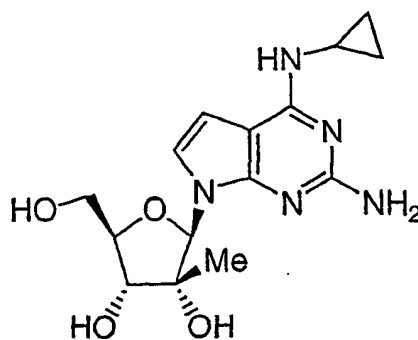
5 步骤 C: 2-氨基-7-(2-*C*-甲基- β -D-呋喃核糖基)-7*H*-吡咯并[2,3-*d*]嘧啶-4(3*H*)-酮

将步骤 B 所得产物 (90 mg, 0.3 mmol) 在含水 NaOH (2N, 9 mL) 中的混合物在回流温度下加热 5 小时，然后在 0℃ 用 2N 含水 HCl 中和，蒸发至干燥。通过用 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 5/1 作洗脱剂的硅胶柱提纯，
10 得到为白色固体状的标题化合物(70 mg)。

^1H NMR (200 MHz, CD_3OD): δ 0.86 (s, 3H), 3.79 (m 1H), 3.90-4.05 (m, 3H), 6.06 (s, 1H), 6.42 (d, $J = 3.7$ Hz, 1H), 7.05 (d, $J = 3.7$ Hz, 1H).

实施例 5

15 2-氨基-4-环丙基氨基-7-(2-*C*-甲基- β -D-呋喃核糖基)-7*H*-吡咯并[2,3-*d*]嘧啶

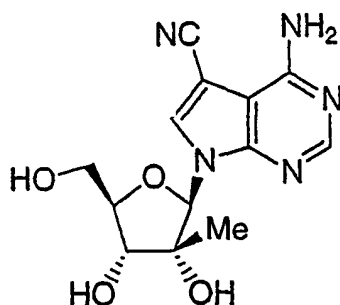


将 2-氨基-4-氯-7-(2-*C*-甲基- β -D-呋喃核糖基)-7*H*-吡咯并[2,3-*d*]嘧啶(实施例 4, 步骤 B)(21 mg, 0.07 mmol)的环丙胺(0.5 mL)溶液在 70℃ 加热 2 天，然后将其蒸发至成为油状残余物，通过硅胶柱提纯，
20 用 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 20/1 作洗脱剂，得到为白色固体状的标题化合物(17 mg)。

^1H NMR (200 MHz, CD_3CN): δ 0.61 (m, 2H), 0.81 (m, 2H), 0.85 (s, 3H), 2.83 (m, 1H), 3.74-3.86 (m, 1H), 3.93-4.03 (m, 2H), 4.11 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H), 6.02 (s, 1H), 6.49 (d, $J = 3.7$ Hz, 1H), 7.00 (d, $J = 3.7$ Hz, 1H).

实施例 6

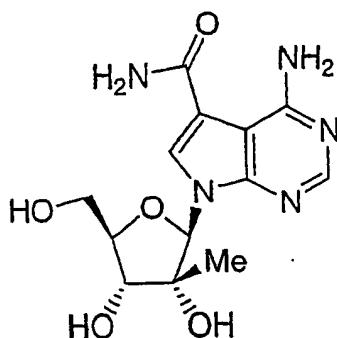
4-氨基-7-(2-C-甲基-β-D-呋喃核糖基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-5-腈



按照 Y.Murai 等人在 Heterocycles 33: 391-404 (1992)中所述的方法制备该化合物。

实施例 7

4-氨基-7-(2-C-甲基-β-D-呋喃核糖基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-5-酰胺



按照 Y.Murai 等人在 Heterocycles 33: 391-404 (1992)中所述的方法制备该化合物。

实施例 8

制备 SATE 前药部分的通用工序

C. R. Wagner, V. V. Iyer, 和 E. J. McIntee, "Pronucleotides : Toward the In Vivo Delivery of Antiviral and Anticancer Nucleotides," Med. Res. Rev., 20: 1-35 (2000)中讨论了 S-酰基-2-硫代乙基(SATE)原核苷酸 (pronucleotide), 将其全文结合进本文以作参考。美国专利号 5,770,725、5,849,905 和 6,020,482 中也公开了核苷的 SATE 衍生物,

将其全文结合进本文以作参考。

二(S-乙酰基-2-硫代乙基)-N,N-二异丙基亚磷酰胺

将 2-巯基乙醇(5 g, 64 mmol)溶于 CH_2Cl_2 (50 mL)中。向该溶液中加入三乙胺(7.67 mL, 57.6 mmol), 并将该反应混合物在冰浴中冷却至 0°C。在 10 分钟内滴加乙酸酐(4.54 mL, 48 mmol), 将该反应混合物在 0°C 搅拌 1 小时。然后使反应混合物在 2 小时内回复至室温。将该反应混合物用 CH_2Cl_2 (50 mL)稀释, 用水(75 mL)、5% 含水 NaHCO_3 (75 mL)和盐水(75 mL)洗涤。将有机相用无水 Na_2SO_4 干燥并真空浓缩, 得到油。然后将油溶于无水 THF(40 mL)中, 并加入无水三乙胺(7.76 mL)。向该混合物中加入活化分子筛(4Å), 并在室温下保持 10 分钟。将反应混合物在冰浴中冷却至 0°C, 并加入二氯-N,N-二异丙基亚磷酰胺 (diisopropylphosphoramidous dichloride) (6.47 g, 32.03 mmol)。将反应混合物在 0°C、惰性气氛下搅拌 2 小时。将己烷(40 mL)加入到反应混合物中, 过滤形成的沉淀。将滤液浓缩至原体积的 1/4, 通过硅胶填充柱层析提纯, 用含 3% 三乙胺和增量的乙酸乙酯(0-7%)的己烷洗脱, 得到为油状的标题化合物(2.36 g)。

^1H NMR (CDCl_3): δ 1.17 (s, 6H), 1.21 (s, 6H), 2.36 (s, 6H), 3.14 (t, $J = 6.44$ Hz), 3.51-3.84 (m, 6H); ^{13}C NMR (CDCl_3): δ 24.47, 24.61, 30.48, 42.85, 43.1, 61.88, 62.23, 195.26; ^{31}P NMR (CDCl_3): δ 146.96.

20 实施例 9

5'-三磷酸酯衍生物

按照 Chem. Rev. 100: 2047 (2000)中所述的通用步骤制备本发明的核苷 5'-三磷酸酯。

25 实施例 10

5'-三磷酸酯衍生物的纯化和纯度分析

将所得三磷酸酯衍生物通过用具有 pH8 的 50 mM Tris 缓冲体系

的 30 × 100 mm Mono Q 柱(Pharmacia)进行阴离子交换(AX)层析提纯。洗脱梯度通常在两柱体积内为 40 mM NaCl 至 0.8 M NaCl, 6.5 mL/分钟。收集阴离子交换层析得到的适当的流分;通过使用 Luna C18 250 × 21 mm 柱(Phenomenex), 流速 10 mL/分钟的反相(RP)层析除去盐分。洗脱梯度通常为 1 %-95 % 甲醇, 14 分钟, 5 mM 乙酸三乙铵(TEAA)的恒定浓度。

在 Hewlett-Packard (Palo Alto, CA)MSD 1100 上用联机 HPLC 质谱法测定纯化后的三磷酸酯的质谱。RP HPLC 用 Phenomenex Luna (C18(2)), 150 x 2 mm, 加 30 x 2 mm 保护柱, 3-μm 粒度。在负离子化模型中实施乙腈的 20 mM TEAA(乙酸三乙铵) pH7 溶液的 0-50%线性梯度(15 分钟)。用氮气和充气式喷雾器产生电雾化。以 150-900 的分子量范围为样本。用 HP Chemstation 分析程序包测定分子量。

纯化后的三磷酸酯的纯度通过分析用 RP 和 AX HPLC 测定。具有 Phenomenex Luna 或 Jupiter 柱(250 × 4.6 mm), 5μm 粒度的 RP HPLC 通常用在 100 mM TEAA, pH7 中的 15 分钟内 2-70 % 乙腈梯度运转。AX HPLC 在 1.6 × 5 mm Mono Q 柱(Pharmacia)上进行。以 50 mM Tris 的恒定浓度, pH8, 0-0.4 M NaCl 梯度洗脱三磷酸酯。三磷酸酯的纯度一般 >80 %。

20 实施例 11

5'-一磷酸衍生物

按照 Tetrahedron Lett. 50: 5065 (1967)中所述的通用程序制备本发明的 5'-一磷酸核苷。

25 实施例 12

5'-三磷酸酯衍生物的质谱特征

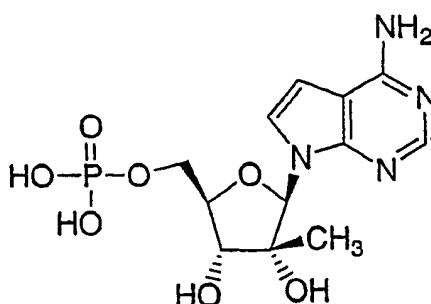
如实施例 10 中所述, 测定本发明化合物的 5'-三磷酸酯的质谱。列在下表中的是按照实施例 9 制备的具有代表性的 5'-三磷酸酯的计

算值和实验值。实施例编号对应于 5'-三磷酸酯的母体化合物。

实施例	计算值	实测值
1	520.0	519.9
2	520.0	520.0
3	534.0	534.0
4	536.0	536.0

实施例 13

5 [4-氨基-7-(2-C-甲基-β-D-呋喃核糖基)-7H-吡咯并[2,3-d]-嘧啶]-5'-一磷酸酯

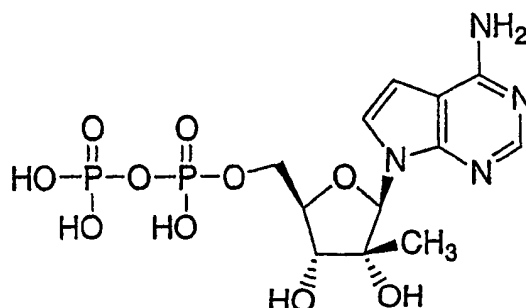


向实施例 2 步骤 F 所得化合物(14 mg, 0.05 mmol)(通过与吡啶共蒸发, 并与甲苯共蒸发几次被干燥)中加入磷酸三甲酯(0.5 mL)。将该混合物在密闭容器中搅拌过夜。然后冷却至 0℃, 并经注射器加入磷酸酐氯(0.0070 mL, 0.075 mmol)。将该混合物在 0℃搅拌 3 小时, 然后加入碳酸氢四乙铵(TEAB)(1 M)(0.5 mL)和水(5 mL)使反应猝灭。按照实施例 10 中所述程序纯化并分析该反应混合物。

15 电喷雾质谱 (ES-MS): 实测值 359.2 ($M-H^+$), 对 $C_{12}H_{17}N_4O_7P-H^+$ 的计算值: 359.1。

实施例 14

[4-氨基-7-(2-C-甲基-β-D-呋喃核糖基)-7H-吡咯并[2,3-d]-嘧啶]-5'-二磷酸酯

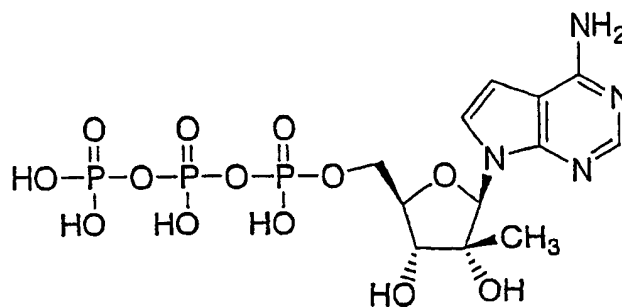


5 向实施例 2 步骤 F 所得化合物(56 mg, 0.20 mmol)(通过与吡啶共蒸发, 并与甲苯共蒸发几次被干燥)中加入磷酸三甲酯(储存于筛上)(1.0 mL)。将该混合物在密闭容器中搅拌过夜。然后冷却至 0℃, 并经注射器加入磷酸氯(0.023 mL, 0.25 mmol)。将该混合物在 0℃搅拌 2 小时, 然后加入三丁胺(0.238 mL, 1.00 mmol)和磷酸三丁铵(通过
10 磷酸与三丁胺在吡啶中反应, 并与吡啶和乙腈共沸蒸发而获得)(1.0 mmol, 在 3.30 mL 乙腈中)。将该混合物在 0℃再搅拌 30 分钟, 然后打开密闭管, 加入 TEAB(1M)(1.0 mL)和水(5 mL)使反应猝灭。按照实施例 10 中所述程序纯化并分析该反应混合物。

ES-MS: 实测值 439.0 ($M-H^+$), 对 $C_{12}H_{18}N_4O_{10}P_2-H^+$ 的计算值 :
15 439.04。

实施例 15

[4-氨基-7-(2-C-甲基-β-D-呋喃核糖基)-7H-吡咯并[2,3-d]-嘧啶]-5'-三磷酸酯



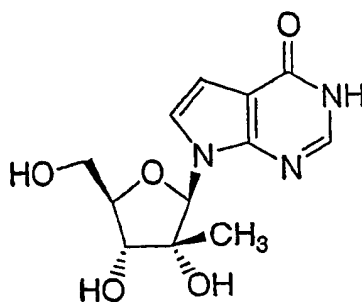
20

向实施例 2 步骤 F 所得化合物(20 mg, 0.07 mmol)(通过与吡啶共蒸发, 并与甲苯共蒸发几次被干燥)中加入磷酸三甲酯(储存于筛上)(0.4 mL)。将该混合物在密闭容器中搅拌过夜。然后冷却至 0℃, 并经注射器加入磷酰氯(0.0070 mL, 0.075 mmol)。将该混合物在 0℃ 搅拌 3 小时, 然后加入三丁胺(0.083 mL, 0.35 mmol)和焦磷酸三丁铵(127 mg, 0.35mmol)和乙腈(储存于筛上)(0.25 mL)。将该混合物在 0℃ 再搅拌 30 分钟, 然后打开密闭管, 加入 TEAB(1M)(0.5 mL)和水(5 mL)使反应猝灭。按照实施例 10 中所述程序纯化并分析该反应混合物。

ES-MS: 实测值 519.0 ($M-H^+$), 对 $C_{12}H_{19}N_4O_{13}P_3-H^+$ 的计算值 : 519.01。

实施例 16

7-(2-C-甲基-β-D-呋喃核糖基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4(3H)-酮

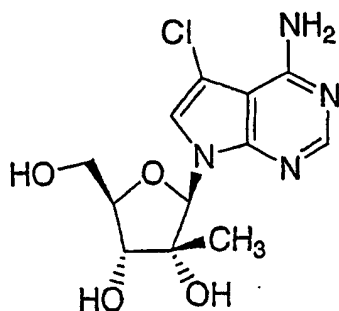


向实施例 2 步骤 E 所得化合物(59 mg, 0.18 mmol)中加入氢氧化钠水溶液(1 M)。将该混合物加热回流 1 小时, 冷却, 用含水 HCl(2 M)中和, 并真空蒸发。将残余物用二氯甲烷/甲醇(4:1)作洗脱剂在硅胶上纯化。收集含产物的流分, 真空蒸发, 得到为无色油状的所需产物(53 mg)。

1H NMR (CD_3CN): δ 0.70 (s, 3H), 3.34-4.15 (重叠 m, 7H), 6.16 (s, 1H), 6.57 (d, 3.6 Hz, 1H), 7.37 (d, 3.6 Hz, 1H), 8.83 (s, 1H)。

实施例 17

4-氨基-5-氯-7-(2-C-甲基-β-D-呋喃核糖基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶



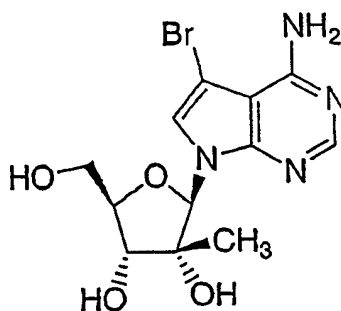
向实施例2步骤F所得化合物(140 mg, 0.50 mmol)的DMF (2.5 mL) 5
预冷却溶液(0℃)中滴加 N-氯代丁二酰亚胺(0.075 g, 0.55 mmol)的
DMF (0.5 mL)溶液。将该溶液在室温下搅拌 1 小时, 加入甲醇(4 mL)
猝灭反应, 并真空蒸发。将粗产物用甲醇/二氯甲烷(1:9)作洗脱剂在
硅胶上纯化。收集含产物的流分, 真空蒸发, 得到为无色固体状的
所需产物(55 mg)。

10 $^1\text{H NMR}$ (CD_3CN): δ 0.80 (s, 3H), 3.65-4.14 (重叠 m, 7H), 5.97 (s br, 2H), 6.17 (s, 1H), 7.51 (s, 1H), 8.16 (s, 1H)。

ES-MS: 实测值 315.0 ($\text{M}+\text{H}^+$), 对 $\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{ClN}_4\text{O}_4 + \text{H}^+$ 的计算值:
315.09。

15 实施例 18

4-氨基-5-溴-7-(2-C-甲基-β-D-呋喃核糖基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶



向实施例2步骤F所得化合物(28 mg, 0.10 mmol)的DMF (0.5 mL)
预冷却溶液(0℃)中滴加 N-氯代丁二酰亚胺(0.018 g, 0.10 mmol)的
20 DMF (0.5 mL)溶液。将该溶液在 0℃ 搅拌 20 分钟, 然后在室温下搅

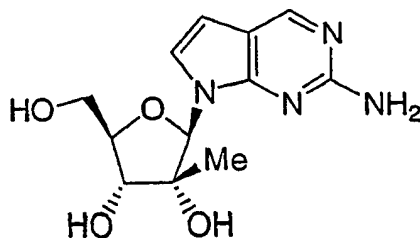
拌 10 分钟。加入甲醇(4 mL)猝灭反应, 并真空蒸发。将粗产物在硅胶上用甲醇/二氯甲烷(1:9)作洗脱剂纯化。收集含产物的流分, 真空蒸发, 得到为无色固体状的所需产物(13.0 mg)。

^1H NMR (CD_3CN): δ 0.69 (s, 3H), 3.46-4.00 (重叠 m, 7H), 5.83 (s br, 2H), 6.06 (s, 1H), 7.45 (s, 1H), 8.05 (s, 1H)。

ES-MS: 实测值 359.1 ($\text{M}+\text{H}^+$), 对 $\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{BrN}_4\text{O}_4 + \text{H}^+$ 的计算值: 359.04。

实施例 19

2-氨基-7-(2-C-甲基- β -D-呋喃核糖基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶

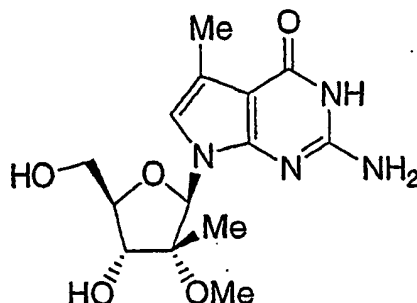


将 2-氨基-4-氯-7-(2-C-甲基- β -D-呋喃核糖基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶(实施例 4, 步骤 B)(20 mg, 0.07 mmol)在 EtOH (1.0 mL)、吡啶(0.1 mL)和 10% Pd/C (6 mg)中的混合物在 H_2 气氛(大气压)、室温下搅拌过夜。将该混合物用经 EtOH 彻底洗涤过的硅藻土垫过滤。蒸发合并的滤液, 并在硅胶柱上用 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 20/1 和 10/1 作洗脱剂进行纯化, 得到为白色固体状的标题化合物(16 mg)。

^1H NMR (200 MHz, CD_3OD): δ 0.86 (s, 3H, 2'-C-Me), 3.82 (dd, $J_{5',4'} = 3.6$ Hz, $J_{5',5''} = 12.7$ Hz, 1H, H-5'), 3.94-4.03 (m, 2H, H-5', H-4'), 4.10 (d, $J_{3',4'} = 8.8$ Hz, 1H, H-3'), 6.02 (s, 1H, H-1'), 6.41 (d, $J_{5,6} = 3.8$ Hz, 1H, H-5), 7.39 (d, 1H, H-6), 8.43 (s, 1H, H-4). ES MS: 281.4 (MH^+).

实施例 20

2-氨基-5-甲基-7-(2-C,2-O-二甲基-β-D-呋喃核糖基)-7H-吡咯并
[2,3-d]嘧啶-4(3H)-酮



5

步骤 A: 2-氨基-4-氯-7-[3,5-二-O-(2,4-二氯苯基甲基)-2-C-甲基-β-D-呋喃核糖基]-5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶

向实施例 2 步骤 C 所得产物(1.57 g, 3.16 mmol)的 CH₂Cl₂(50 mL)冰冷溶液中滴加 HBr (5.7 M 乙酸溶液; 3.3 mL)。将该反应混合物在
10 0℃搅拌 1 小时, 然后在室温下搅拌 2 小时, 真空浓缩, 并与甲苯(2 × 20 mL)共蒸发。将残余的油溶于 MeCN(20 mL)中, 并滴加到 2-氨基-4-氯-5-甲基-1H-吡咯并[2,3-d]嘧啶钠盐的乙腈溶液[由 2-氨基-4-氯-5-甲基-1H-吡咯并[2,3-d]嘧啶[其制备参见 *Liebigs Ann. Chem.* 1984: 708-721](1.13 g, 6.2 mmol)在无水乙腈(150 mL)和 NaH (60%, 在矿物
15 油中, 248 mg, 6.2 mmol)中的溶液经过在室温下 2 小时的剧烈搅拌而原位生成]中。将合并的混合物在室温下搅拌 24 小时, 然后蒸发至干燥。将残余物悬浮于水(100 mL)中, 并用 EtOAc(300+150 mL)萃取。将合并的萃取液用盐水(100 mL)洗涤, 经 Na₂SO₄干燥, 过滤并蒸发。将粗产物在硅胶柱(5 × 7 cm)上用乙酸乙酯/己烷(0-30% EtOAc, 5%步
20 骤梯度)作洗脱剂进行纯化。将含有产物的流分合并, 真空蒸发, 得到为无色泡沫状的所需产物(0.96 g)。

步骤 B: 2-氨基-4-氯-7-[3,5-二-O- (2,4-二氯苯基甲基)-2-C,2-O- 二甲基-β-D-呋喃核糖基]-5-甲基-7-吡咯并[2,3-d]嘧啶

向步骤 A 所得产物(475 mg, 0.7 mmol)的 THF (7 mL)冰冷混合物中加入 NaH (60%, 在矿物油中, 29 mg), 并在 0℃ 搅拌 0.5 小时。然后加入 MeI (48 μL), 将该反应混合物在室温下搅拌 24 小时。用 MeOH 猝灭反应, 然后蒸发混合物。将粗产物在硅胶柱(5 × 3.5 cm)上用己烷/乙酸乙酯(9/1, 7/1, 5/1 和 3/1)作洗脱剂进行纯化。将含有产物的流分合并, 真空蒸发, 得到为无色泡沫状的所需产物(200 mg)。

10 步骤 C: 2-氨基-7-[3,5-二-O- (2,4-二氯苯基甲基)-2-C, 2-O-二甲基-β-D-呋喃核糖基]-5-甲基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4(3H)-酮

将步骤 B 所得产物(200 mg, 0.3 mmol)在 1,4-二噁烷(15 mL)和 NaOH 水溶液(2N, 15 mL)在耐压瓶中于 135℃ 加热过夜。然后将该混合物冷却至 0℃, 用 2N 含水 HCl 中和, 蒸发至干燥。将粗产物悬浮于 MeOH 中, 过滤, 并用 MeOH 充分洗涤该固体。将合并后的滤液浓缩, 将残余物在硅胶柱(5 × 5 cm)上用 CH₂Cl₂/MeOH (40/1, 30/1 和 20/1)作洗脱剂进行纯化, 得到为无色泡沫状的所需化合物(150 mg)。

20 步骤 D: 2-氨基-5-甲基-7-(2-C,2-O-二甲基-β-D-呋喃核糖基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4(3H)-酮

将步骤 C 所得产物(64 mg, 0.1 mmol)在 MeOH (5 mL)和 Et₃N (0.2 mL)以及 10% Pd/C (24 mg)中的混合物在 Parr 氢化器上 50 psi、室温下氢化 1.5 天, 然后通过经 MeOH 充分洗涤的硅藻土垫过滤。蒸发合并后的滤液, 并将残余物在硅胶柱(3 × 4 cm)上用 CH₂Cl₂/MeOH (30/1, 20/1)作洗脱剂进行纯化, 得到 2-氨基-5-甲基-7-(5-O-苄基-2-C,2-O-二甲基-β-D-呋喃核糖基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4 (3H)-酮。将该化合物(37 mg)在 EtOH(2 mL)中、大气压的氢气气氛下用 10% Pd/C 进一步氢化。在室温下搅拌 2 天后, 将反应混合物通过硅藻土过滤,

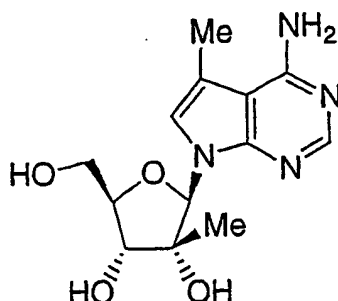
蒸发滤液, 并将粗产物通过硅胶柱(1 × 7 cm)用 CH₂Cl₂/MeOH (30/1, 20/1 和 10/1)作洗脱剂进行纯化, 冷冻干燥后得到标题化合物(12 mg)。

¹H NMR (200 MHz, CD₃OD): δ 0.81 (s, 3H, 2'-C-Me), 2.16 (d, *J*_{H-6,C5-Me} = 1.3 Hz, 3H, C5-Me), 3.41 (s, 3H, 2'-OMe), 3.67 (dd, *J*_{5',4'} = 3.4 Hz, *J*_{5',5''} = 12.6 Hz, 1H, H-5'), 3.81-3.91 (m, 3H, H-5'', H-4', H-3'), 6.10 (s, 1H, H-1'), 6.66 (d, 1H, H-6).

ES MS: 323.3 (M-H)⁺.

5 实施例 21

4-氨基-5-甲基-7-(2-C-甲基-β-D-呋喃核糖基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶



10 步骤 A: 4-氯-7-[3,5-二-O-(2,4-二氯苯基甲基)-3-C-甲基-β-D-呋喃核糖基]-5-甲基-7H 吡咯并[2,3-d]嘧啶

向实施例 2 步骤 C 所得产物(1.06 g, 2.1 mmol)的 CH₂Cl₂(30 mL)冰冷溶液中滴加 HBr (5.7 M 乙酸溶液; 2.2 mL)。将该反应混合物在 0℃ 搅拌 1 小时, 然后在室温下搅拌 2 小时, 真空浓缩, 并与甲苯(2 × 15 mL)共蒸发。将所得的油溶于 MeCN(10 mL)中, 并滴加到 4-氯-5-甲基-1H-吡咯并[2,3-d]嘧啶钠盐的乙腈溶液[由 4-氯-5-甲基-1H-吡咯并[2,3-d]嘧啶[其制备参见 *J. Med. Chem.* 33: 1984 (1990)](0.62 g, 3.7 mmol)在无水乙腈(70 mL)和 NaH (60%, 在矿物油中, 148 mg, 3.7 mmol)中的溶液经过在室温下 2 小时的剧烈搅拌而原位生成]中。将合并的混合物在室温下搅拌 24 小时, 然后蒸发至干燥。将残余物悬浮于水(100 mL)中, 并用 EtOAc(250+100 mL)萃取。将合并后的萃取液用盐水(50 mL)洗涤, 经 Na₂SO₄ 干燥, 过滤并蒸发。将粗产物在硅胶柱(5

× 5 cm)上用己烷/乙酸乙酯(9/1, 5/1, 3/1)作洗脱剂进行纯化。将含有产物的流分合并, 真空蒸发, 得到为无色泡沫状的所需产物(0.87 g)。

5 步骤 B: 4-氯-5-甲基-7-(2-C-甲基-β-D-呋喃核糖基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶

在-78℃, 向步骤 A 所得化合物(0.87 g, 0.9 mmol)的二氯甲烷(30 mL)溶液中滴加三氯化硼(1M 二氯甲烷溶液, 9.0 mL, 9.0 mmol)。将该混合物在-78℃搅拌 2.5 小时, 然后在-30℃至-20℃搅拌 3 小时。加入
10 甲醇/二氯甲烷(1:1)(9 mL)猝灭反应, 然后将所得混合物在-15℃搅拌 30 分钟, 再在 0℃用氨水中和, 并在室温下搅拌 15 分钟。过滤固体, 用 CH₂Cl₂/MeOH (1/1, 50 mL)洗涤。蒸发合并后的滤液, 将残余物在硅胶柱(5 × 5 cm)上用 CH₂Cl₂ 和 CH₂Cl₂/MeOH(40/1 和 30/1)梯度作洗脱剂进行纯化, 得到为无色泡沫状的所需化合物(0.22 g)。

15

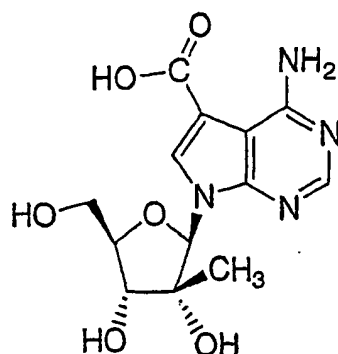
 步骤 C: 4-氨基-5-甲基-7-(2-C-甲基-β-D-呋喃核糖基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶

向步骤 B 所得化合物(0.2 g, 0.64 mmol)中加入甲醇氨(在 0℃饱和; 40 mL)。将该混合物在不锈钢高压釜中、100℃加热 14 小时,
20 然后冷却并真空蒸发。将粗混合物在硅胶柱(5 × 5 cm)上用 CH₂Cl₂/MeOH (50/1, 30/1, 20/1)梯度作洗脱剂进行纯化, 得到为白色固体状的标题化合物(0.12 g)。

¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ 0.60 (s, 3H, 2'-C-Me), 2.26 (s, 3H, 5C-Me), 3.52-3.61 (m, 1H, H-5'), 3.70-3.88 (m, 3H, H-5'', H-4', H-3'), 5.00 (s, 1H, 2'-OH), 4.91-4.99 (m, 3H, 2'-OH, 3'-OH, 5'-OH), 6.04 (s, 1H, H-1'), 6.48 (br s, 2H, NH₂), 7.12 (s, 1H, H-6), 7.94 (s, 1H, H-2). ES MS: 295.2 (MH⁺).

实施例 22

4-氨基-7-(2-C-甲基-β-D-呋喃核糖基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-5-羧酸



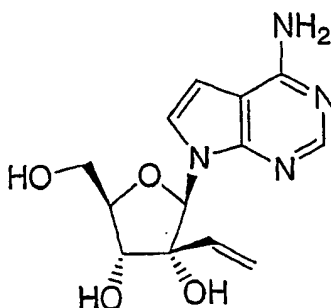
- 5 将实施例 6 的化合物(0.035 g, 0.11 mmol)溶解于氨水(4 mL, 30 wt %)和饱和甲醇氨(2 mL)的混合物中, 加入 H₂O₂ 的水溶液(2 mL, 35 wt %)。将反应混合物在室温下搅拌 18 小时。减压除去溶剂, 将所得残余物通过 HPLC 在反相柱(Altech Altima C-18, 10x 299 mm, A = 水, B = 乙腈, 10-60 % B, 50 分钟, 流速 2 mL/分钟)上提纯, 得到为白色固
- 10 体状的标题化合物(0.015 g, 41 %)。

¹H NMR (CD₃OD): δ 0.85 (s, 3H, Me), 3.61 (m, 1H), 3.82 (m, 1H) 3.99-4.86 (m, 2H), 6.26 (s, 1H), 8.10 (s, 2H) 8.22(s, 1H); ¹³C NMR (CD₃OD): 20.13, 61.37, 73.79, 80.42, 84.01, 93.00, 102.66, 112.07, 130.07, 151.40, 152.74, 159.12, 169.30.

HRMS (FAB) 对 C₁₃H₁₇N₄O₆⁺的计算值 325.1148, 实测值 325.1143。

实施例 23

- 15 4-氨基-7-(2-C-乙烯基-β-D-呋喃核糖基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶



步骤 A: 3,5-二-O-(2,4-二氯苯基甲基)-2-C-乙烯基-1-O-甲基- α -D-呋喃核糖

氯化铯七水合物(50 g, 134.2 mmol)在经过预热的研钵中仔细碾碎, 并移至装备有机械搅拌器的圆底烧瓶中。将该烧瓶在高真空下、
5 160℃加热过夜。在氩气下释放真空, 并将烧瓶冷却至室温。将无水 THF(300 mL)插套管加入烧瓶中。将所得悬浮液在室温下搅拌 4 小时, 然后冷却至-78℃。加入溴化乙烯镁(1M 在 THF 中的溶液, 120 mL, 120 mmol), 并在-78℃继续搅拌 2 小时。向该悬浮液中加入 3,5-二-O-(2,4-二氯苯基甲基)-1-O-甲基- α -D-赤藓-呋喃戊-2-酮糖(14 g, 30 mmol)[由
10 实施例 2, 步骤 B 获得]在无水 THF (100 mL)中的溶液, 在恒定搅拌下滴加。将该反应物在-78℃搅拌 4 小时。用饱和氯化铵溶液猝灭反应, 并使其回复至室温。将该混合物通过硅藻土垫过滤, 并将残余物用 Et₂O(2 × 500 mL)洗涤。分离有机层, 并用 Et₂O(2 × 200 mL)萃取水层。将合并后的有机层经无水 Na₂SO₄干燥, 浓缩为粘稠的黄色油。
15 将该油通过快速层析(SiO₂, 10% EtOAc 的己烷溶液)纯化。得到为淡黄色油状的标题化合物(6.7 g, 13.2 mmol)。

步骤 B: 4-氯-7-[3,5-二-O-(2,4-二氯苯基甲基)-2-C-乙烯基- β -D-呋喃核糖基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶

20 在-20℃, 向步骤 A 所得化合物(6.4 g, 12.6 mmol)的无水二氯甲烷(150 mL)溶液中滴加 HBr (30% AcOH 溶液, 20 mL, 75.6 mmol)。将所得溶液在-10℃至 0℃搅拌 4 小时, 真空蒸发, 并与无水甲苯(3 × 40 mL)共蒸发。在-20℃, 将油状残余物溶解于无水乙腈(100 mL)中, 并加入到 4-氯-1H-吡咯并[2,3-d]嘧啶钠盐(5.8 g, 37.8 mmol)的乙腈溶液
25 [如实施例 2 中所述原位生成]中。使所得混合物回复至室温, 并在室温下搅拌 24 小时。然后将混合物蒸发至干燥, 溶于水中, 用 EtOAc (2 × 300 mL)萃取。将合并后的萃取液用 Na₂SO₄干燥, 过滤并蒸发。将粗混合物通过快速层析(SiO₂, 10% EtOAc 己烷溶液)提纯, 分离得到

为白色泡沫状的标题化合物(1.75 g)。

步骤 C: 4-氨基-7-[3,5-二-O-(2,4-二氯苯基甲基)-2-C-乙烯基-β-D-呋喃核糖基]-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶

- 5 将步骤 B 的化合物(80, mg)溶于最小量的 1,4-二噁烷中, 并放置在不锈钢高压气体贮罐中。将该罐冷却至-78℃, 并加入液态氨。将该罐密封, 并在 90℃加热 24 小时。使氨蒸发, 并将残余物浓缩成白色固体, 将其直接用于后续步骤, 无需进一步提纯。

- 10 步骤 D: 4-氨基-7-(2-C-乙烯基-β-D-呋喃核糖基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶

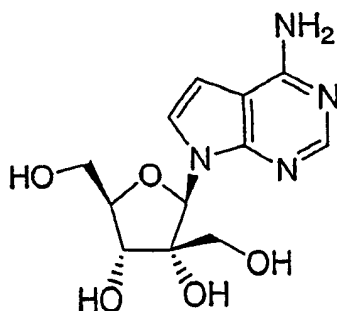
- 15 在-78℃, 向步骤 C 所得化合物(60 mg)的二氯甲烷溶液中滴加三氯化硼(1M 二氯甲烷溶液)。将该混合物在-78℃搅拌 2.5 小时, 然后在-30℃至-20℃搅拌 3 小时。通过加入甲醇/二氯甲烷(1:1)猝灭反应, 并将所得混合物在-15℃搅拌 0.5 小时, 然后在 0℃用氨水中和, 并在室温下搅拌 15 分钟。过滤固体, 用甲醇/二氯甲烷(1:1)洗涤。将合并的滤液蒸发, 通过快速层析(SiO₂, 10%甲醇的 EtOAc 溶液, 含有 0.1% 三乙胺)提纯残余物。将含有产物的流分蒸发, 得到为白色固体状的标题化合物(10 mg)。

¹H NMR (DMSO-d₆): δ 3.6 (m, 1H, H-5'), 3.8 (m, 1H, H-5''), 3.9 (m d, 1-H, H-4'), 4.3 (t, 1H, H-3'), 4.8-5.3(m, 6H, CH=CH₂, 2'-OH, 3'-OH, 5'-OH) 6.12 (s, 1H, H-1'), 6.59 (d, 1H, H-5), 7.1 (br s, 1H, NH₂), 7.43 (d, 1H, H-6), 8.01 (s, 1H, H-2).

- 20 ES-MS: 实测值: 291.1 (M-H⁻); 计算值 C₁₃H₁₆N₄O₄ - H⁻: 291.2.

实施例 24

4-氨基-7-(2-C-羟基甲基-β-D-呋喃核糖基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶



5 步骤 A: 4-氯-7-[3,5-二-O-(2,4-二氯苯基甲基)-2-C-羟基甲基-β-D-呋喃核糖基]-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶

向实施例 23 步骤 B 所得化合物(300 mg, 0.48 mmol)的 1,4-二噁
 烷(5 mL)溶液中加入 N-甲基吗啉-N-氧化物(300 mg, 2.56 mmol)和四
 氧化钼(4%水溶液, 0.3 mL)。将该混合物遮光搅拌 14 小时。通过硅藻
 土填料过滤移出沉淀, 用水(3 ×)稀释, 并用 EtOAc 萃取。将 EtOAc
 10 层 Na₂SO₄ 干燥, 真空浓缩。将油状残余物溶于二氯甲烷(5 mL)中,
 并在硅胶上经 NaIO₄(3 g, 10% NaIO₄)搅拌 12 小时。过滤除去硅胶,
 蒸发残余物, 收集进无水乙醇(5 mL)中。将溶液在冰浴中冷却, 并以
 小份加入硼氢化钠(300 mg, 8 mmol)。将所得混合物在室温下搅拌 4
 15 小时, 然后用 EtOAc 稀释。将有机层用水(2 × 20 mL)、盐水(20 mL)
 洗涤, 经 Na₂SO₄ 干燥。蒸发溶剂, 将残余物通过快速层析(SiO₂, 2:1
 己烷/EtOAc)提纯, 得到为白色小薄片状的标题化合物(160 mg, 0.25
 mmol)。

20 步骤 B: 4-氨基-7-[3,5-二-O-(2,4-二氯苯基甲基)-2-C-羟基甲基-β-D-呋喃核糖基]-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶

将步骤 A 的化合物 (150 mg, 0.23 mmol)溶于最小量的 1,4-二噁
 烷(10 mL)中, 并放置在不锈钢高压气体贮罐中。将该罐冷却至-78℃,
 并加入液态氨。将该罐密封, 并在 90℃加热 24 小时。使氨蒸发, 并

将残余物浓缩成白色固体，将其直接用于后续步骤，无需进一步提纯。

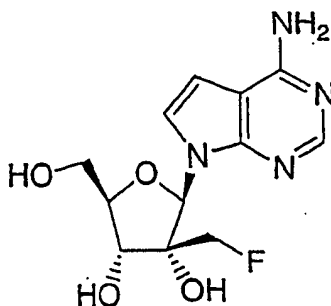
步骤 C: 4-氨基-7-(2-C-羟基甲基-β-D-呋喃核糖基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶

5 将步骤 B 所得化合物(120 mg, 0.2 mmol)溶于 1:1 甲醇/二氯甲烷中，加入 10 % Pd-C，并将该悬浮液在 H₂ 气氛下搅拌 12 小时。通过硅藻土垫过滤除去催化剂，用大量甲醇洗涤。真空蒸发合并后的滤液，将残余物通过快速层析(SiO₂, 10% 甲醇的 EtOAc 溶液，含有 0.1% 三乙胺)提纯，得到为白色粉末状的标题化合物(50 mg)。

10 ¹H NMR (CD₃OD): δ 3.12 (d, 1H, CH₂'), 3.33 (d, 1H, CH₂''), 3.82 (m, 1H, H-5'), 3.99-4.1(m, 2H, H-4', H-5''), 4.3 (d, 1H, H-3'), 6.2 (s, 1H, H-1'), 6.58 (d, 1H, H-5), 7.45 (d, 1H, H-6), 8.05 (s, 1H, H-2).
LC-MS: 实测值:297.2(M+H⁺); 对 C₁₂H₁₆N₄O₅+H⁺的计算值:297.3。

实施例 25

4-氨基-7-(2-C-氟甲基-β-D-呋喃核糖基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶



15 步骤 A: 4-氯-7-[3,5-二-O-(2,4-二氯苯基甲基)-2-C-氟甲基-β-D-呋喃核糖基]-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶

20 在氩气气氛下，向实施例 24 步骤 A 所得化合物 (63 mg, 0.1 mmol) 的无水二氯甲烷(5 mL)溶液中加入 4-二甲基氨基吡啶(DMAP)(2 mg, 0.015 mmol)和三乙胺(62 μL, 0.45 mmol)。将该溶液在冰浴中冷却，并加入对甲苯磺酰氯(30 mg, 0.15 mmol)。将反应物在室温下搅拌过夜，用 NaHCO₃ (2 x 10 mL)、水(10 mL)、盐水(10 mL)洗涤，并经 Na₂SO₄

- 干燥，真空浓缩成粉红色固体。将该固体溶于无水 THF (5 mL) 中，并在冰浴中冷却。加入氟化四丁铵(1M THF 溶液, 1 mL, 1 mmol)，将该混合物在室温下搅拌 4 小时。真空除去溶剂，将残余物收集进二氯甲烷中，并用 NaHCO₃ (2 x 10 mL)、水(10 mL) 和盐水(10 mL)洗涤。将二氯甲烷层经无水 Na₂SO₄ 干燥，真空浓缩，并经快速层析(SiO₂, 2:1 己烷/EtOAc)提纯，得到为白色固体状的标题化合物(20 mg)。

步骤 B: 4-氨基-7-[3,5-二-O-(2,4-二氯苯基甲基)-2-C-氟甲基-β-D-呋喃核糖基]-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶

- 10 将步骤 A 所得化合物(18 mg, 0.03 mmol)溶于最小量的 1,4-二噁烷中，并放置在不锈钢高压气体贮罐中。将该罐冷却至-78℃，并加入液态氨。将该罐密封，并在 90℃ 加热 24 小时。使氨蒸发，并将残余物浓缩成白色固体，将其直接用于后续步骤，无需进一步提纯。

- 15 步骤 C: 4-氨基-7-(2-C-氟甲基-β-D-呋喃核糖基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶

- 20 将步骤 B 所得化合物(16 mg)溶于 1:1 甲醇/二氯甲烷中，加入 10 % Pd-C，并将该悬浮液在 H₂ 气氛下搅拌 12 小时。通过硅藻土垫过滤除去催化剂，用大量甲醇洗涤。真空蒸发合并后的滤液，将残余物通过快速层析(SiO₂, 10% 甲醇的 EtOAc 溶液，含有 0.1% 三乙胺)提纯，得到为白色粉末状的标题化合物(8 mg)。

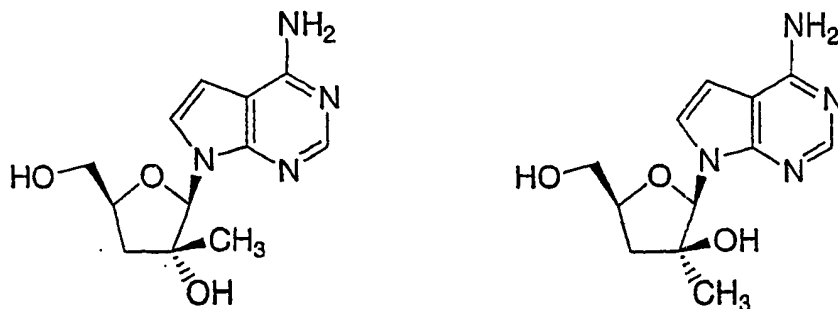
¹H NMR (DMSO-d₆): δ 3.6-3.7 (m, 1H, H-5'), 3.8 – 4.3 (m, 5H, H-5'', H-4', H-3', CH₂) 5.12 (t, 1H, 5'-OH), 5.35 (d, 1H, 3'-OH), 5.48 (s, 1H, 2'-OH), 6.21 (s, 1H, H-1'), 6.52 (d, 1H, H-5), 6.98 (br s, 2H, NH₂), 7.44 (d, 1 H, H-6), 8.02 (s, 1H, H-2).

¹⁹F NMR (DMSO-d₆): δ -230.2 (t).

ES-MS: 实测值: 299.1 (M+H⁺), 计算值 C₁₂H₁₅FN₄O₄ + H⁺: 299.27.

实施例 26 和 27

4-氨基-7-(3-脱氧-2-C-甲基-β-D-呋喃核糖基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶和 4-氨基-7-(3-脱氧-2-C-甲基-β-D-阿糖呋喃基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶



5

步骤 A: 7-[2,5-二-O-(叔丁基二甲基甲硅烷基)-β-D-呋喃核糖基]-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶和 7-[3,5-二-O-(叔丁基二甲基甲硅烷基)-β-D-呋喃核糖基]-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶

10 向杀结核菌素(5.0 g, 18.7 mmol)在吡啶(7.5 mL)和 DMF (18.5 mL)混合物中的经过搅拌的溶液中加入硝酸银(6.36 g, 38.8 mmol)。将该混合物在室温下搅拌 2 小时。将其在冰浴中冷却, 加入 THF (37.4 mL)和氯化叔丁基二甲基甲硅烷(5.6 g, 37 mmol), 并将该混合物在室温下搅拌 2 小时。然后通过硅藻土垫过滤该混合物, 并用 THF 洗涤。用
15 含少量氯仿的醚稀释滤液和洗涤液。用碳酸氢钠和水(3 × 50 mL)连续洗涤有机层, 经无水硫酸钠干燥, 浓缩。通过与甲苯共蒸发除去吡啶, 将残余物通过用 5-7% MeOH 的 CH₂Cl₂ 溶液作洗脱剂的硅胶快速层析提纯, 得到 3.0 g。

20

步骤 B: 7-[2,5-二-O-(叔丁基二甲基甲硅烷基)-β-D-呋喃核糖基]-4-[二-(4-甲氧基苯基)苯基甲基]氨基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶和 7-[3,5-二-O-(叔丁基二甲基甲硅烷基)-β-D-呋喃核糖基]-4-[二-(4-甲氧基苯基)苯基甲基]氨基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶

向步骤 A 所得化合物混合物(3.0 g, 6.0 mmol)的无水吡啶(30 mL)

溶液中加入 4,4'-二甲氧基三苯甲基氯(2.8 g, 8.2 mmol), 将反应混合物在室温下搅拌过夜。然后用含水吡啶研磨该混合物, 用乙醚萃取。用水洗涤有机层, 经无水硫酸钠干燥, 并浓缩成黄色泡沫(5.6 g)。将残余物通过用 20-25 % EtOAc 的己烷溶液作洗脱剂的硅胶快速层析提纯。收集适当的流分, 并浓缩得到为无色泡沫状的 2',5'-二-O-(叔丁基二甲基甲硅烷基)-和 3',5'-二-O-(叔丁基二甲基甲硅烷基)保护的核苷(分别为 2.2 g 和 1.0 g)。

步骤 C: 7-[2,5-二-O-(叔丁基二甲基甲硅烷基)-3-O-甲磺酰基-β-D-呋喃核糖基)]-4-[二-(4-甲氧基苯基)苯基甲基]氨基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶

向步骤 B 所得 2',5'-二-O-(叔丁基二甲基甲硅烷基)保护的核苷(2.0 g, 2.5 mmol)的吡啶(22 mL)冰冷却溶液中加入对甲苯磺酰氯(1.9 g, 9.8 mmol)。将反应混合物在室温下搅拌 4 天。然后用含水吡啶(50 %, 10 mL)研磨, 用含少量 CH₂Cl₂(10 mL)的乙醚(3 × 50 mL)萃取。用碳酸氢钠和水(3 × 30 mL)洗涤有机层。将有机层用无水 Na₂SO₄ 干燥并浓缩。通过与甲苯(3 × 25 mL)共蒸发除去吡啶。将残余的油通过硅胶垫过滤, 用己烷:乙酸乙酯(70:30)作洗脱剂, 得到 1.4 g。

步骤 D: 4-[二-(4-甲氧基苯基)苯基甲基]氨基-7-[3-O-甲磺酰基-β-D-呋喃核糖基]-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶

将步骤 C 所得化合物(1.0 g, 1.1 mmol)和 THF (10 mL)的溶液用氯化四丁铵(1M THF 溶液, 2.5 mL)搅拌 0.5 小时。将该混合物冷却, 并用乙醚(50 mL)稀释。用水(3 × 50 mL)洗涤溶液, 经无水硫酸钠干燥, 浓缩成油。使该残余物通过用己烷:乙酸乙酯(1:1)作洗脱剂的硅胶垫进行提纯, 得到 780 mg。

步骤 E: 4-氨基-7-(3-脱氧-2-C-甲基-β-D-呋喃核糖基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶和 4-氨基-7-(3-脱氧-2-C-甲基-β-D-阿糖呋喃基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶

5 将 CH₃MgI(3.0 M 乙醚溶液, 3.0 mL)的无水甲苯(3.75 mL)溶液在冰浴中冷却。向其中加入步骤 D 所得化合物(500 mg, 0.8 mmol)的无水甲苯(3.7 mL)溶液。将所得混合物在室温下搅拌 3.5 小时。将其冷却, 并用含水 NH₄Cl 溶液处理, 用乙醚(50 mL, 含 10 mLCH₂Cl₂)萃取。分离有机层, 用盐水(2 × 30 mL)和水(2 × 25 mL)洗涤, 经无水硫酸钠干燥, 并浓缩成油, 将该油通过用 4 % MeOH 的 CH₂Cl₂ 溶液作洗脱剂的硅胶快速层析提纯, 得到 2-C-α-甲基化合物(149 mg)和 2-C-β-甲基化合物(34 mg)。将这些衍生物分别用 80 % 乙酸处理, 并将反应混合物在室温下搅拌 2.5 小时。通过反复与乙醇和甲苯共蒸发除去乙酸。将残余物在氯仿和水之间分配。将水层用氯仿洗涤并浓缩。将蒸发后的残余物通过用 5-10 % MeOH 的 CH₂Cl₂ 溶液作洗脱剂的硅胶提纯, 得到为白色固体状的所需化合物。

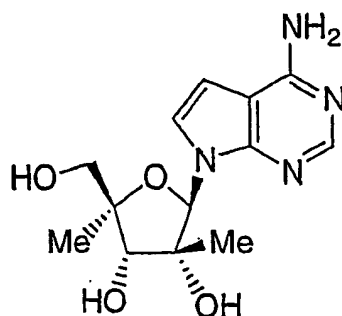
4-氨基-7-(3-脱氧-2-C-甲基-β-D-呋喃核糖基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶 (9.0 mg):

¹H NMR (DMSO-d₆): δ 0.74 (s, 3H, CH₃), 1.77 (dd, 1H, H-3'), 2.08 (t, 1H, H-3''), 3.59 (m, 1H, H-5'), 3.73 (m, 1H, H-5''), 4.15 (m, 1H, H-4'), 5.02 (t, 1H, OH-5'), 5.33 (s, 1H, OH-2'), 6.00 (s, 1H, H-1'), 6.54 (d, 1H, H-7), 6.95 (br s, 2H, NH₂), 7.47 (d, 1H, H-8), 8.00 (s, 1H, H-2); ES-MS: 263.1 [M-H].

20 4-氨基-7-(3-脱氧-2-C-甲基-β-D-阿糖呋喃基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶 (15 mg):

¹H NMR (DMSO-d₆): δ 1.23 (s, 3H, CH₃), 2.08 (ddd, 2H, H-3' 和 3''), 3.57 (m, 2H, H-5' 和 5''), 4.06 (m, 1H, H-4), 5.10 (s, 1H, OH-2'), 5.24 (t, 1H, OH-5'), 6.01 (s, 1H, H-1'), 6.49 (d, 1H, H-7), 6.89 (br s, 2H, NH₂), 7.35 (d, 1H, H-8), 8.01 (s, 1H, H-2). ES-MS: 265.2[M+H].

实施例 28

4-氨基-7-(2,4-*C*-二甲基- β -D-呋喃核糖基)-7H-吡咯并[2,3-*d*]嘧啶

5 步骤 A: 5-脱氧-1,2-*O*-异亚丙基-D-呋喃木糖(xylofuranose)

将 1,2-*O*-异亚丙基-D-呋喃木糖(38.4 g, 0.2 mol)、4-二甲基氨基吡啶(5 g)、三乙胺(55.7 mL, 0.4 mol)溶于二氯甲烷(300 mL)中。加入对甲苯磺酰氯(38.13 g, 0.2 mol), 将反应混合物在室温下搅拌 2 小时。然后将反应混合物倒进饱和碳酸氢钠水溶液(500 mL)中, 分离为两层。用柠檬酸水溶液(20%, 200 mL)洗涤有机层, 干燥(Na_2SO_4), 蒸发得到固体(70.0 g)。将该固体溶于无水 THF(300 mL)中, 在 30 分钟内分次加入 LiAlH_4 (16.0 g, 0.42 mol)。将该混合物在室温下搅拌 15。在 30 分钟内滴加乙酸乙酯(100 mL), 将混合物通过硅胶床过滤。浓缩滤液, 将所得油通过硅胶(EtOAc/己烷 1/4)层析, 得到为固体状的产物(32.5 g)。

步骤 B: 3,5-二-*O*-(2,4-二氯苯基甲基)-1-*O*-甲基-4-甲基- α -D-呋喃核糖

在冰-水浴中, 将氧化铬(50 g, 0.5 mol)、乙酸酐(50 mL, 0.53 mol)和吡啶(100 mL, 1.24 mol)加入到二氯甲烷(1 L)中, 将该混合物搅拌 15 分钟。加入 5-脱氧-1,2-*O*-异亚丙基-D-呋喃木糖(32 g, 0.18 mol)的二氯甲烷(200 mL)溶液, 将该混合物在相同温度下搅拌 30 分钟。用乙酸乙酯(1L)稀释反应溶液, 通过硅胶床过滤。浓缩滤液得到黄色油。将该油溶于 1,4-二噁烷(1 L)和甲醛(37%, 200 mL)中。将溶液冷却至 0

℃, 加入固体 KOH(50 g)。将该混合物在室温下搅拌过夜, 然后用乙酸乙酯(6 × 200 mL)萃取。浓缩后, 将残余物经硅胶(EtOAc)层析, 得到为油状物的产物(1.5 g)。将该油溶于 1-甲基-2-吡咯烷酮(20 mL)中, 加入 2,4-二氯苯基甲基氯(4 g, 20.5 mmol)和 NaH (60%, 0.8 g)。将该混合物搅拌过夜, 并用甲苯(100 mL)稀释。然后将混合物用饱和碳酸氢钠水溶液(3 × 50 mL)洗涤, 干燥(Na₂SO₄), 并蒸发。将残余物溶于甲醇(50 mL)中, 加入 HCl 的二噁烷(4M, 2mL)溶液。将溶液搅拌过夜并蒸发。将残余物经硅胶(EtOAc/己烷: 1/4)层析, 得到为油状物的产物(2.01 g)。

10

步骤 C: 3,5-二-O-(2,4-二氯苯基甲基)-2,4-二-C-甲基-1-O-甲基-α-D-呋喃核糖

将步骤 B 所得产物(2.0 g, 4.0 mmol)和 Dess-Martin periodinane (2.0 g)的二氯甲烷(30 mL)溶液在室温下搅拌过夜, 然后减压浓缩。将残余物用乙醚(50 mL)研磨并过滤。用 Na₂S₂O₃·5H₂O(2.5 g)在饱和碳酸氢钠水溶液(50 mL)中的溶液洗涤滤液, 干燥(MgSO₄), 过滤并蒸发。在-78℃, 将残余物溶于无水 Et₂O(20 mL)中, 并滴加到 MeMgBr 的 Et₂O 溶液(3 M, 10 mL)中。将反应混合物加热至-30℃, 并在-30℃至-15℃搅拌 5 小时, 然后倒进饱和氯化铵水溶液(50 mL)中。分离成两层, 干燥(MgSO₄)有机层, 过滤并浓缩。将残余物经硅胶层析(EtOAc/己烷: 1/9), 得到为糖浆状的标题化合物(1.40 g)。

20

步骤 D: 4-氯-7-[3,5-二-O-(2,4-二氯苯基甲基)-2,4-二-C-甲基-β-D-呋喃核糖基]-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶

向步骤 C 所得化合物(0.70 g, 1.3 mmol)中加入 HBr (5.7M 乙酸溶液, 2 mL)。将所得溶液在室温下搅拌 1 小时, 真空蒸发, 并与无水甲苯(3 × 10 mL)共蒸发。将 4-氯-1H-吡咯并[2,3-d]嘧啶(0.5 g, 3.3 mmol)和粉末状的 KOH (85%, 150 mg, 2.3 mmol)在 1-甲基-2-吡咯烷酮(5 mL)

25

中搅拌 30 分钟, 并将该混合物与甲苯(10 mL)共蒸发。将所得溶液倒进上面的溴糖残余物中, 并将该混合物搅拌过夜。用甲苯(50 mL)稀释该混合物, 用水(3×50 mL)洗涤, 减压浓缩。将残余物通过用 EtOAc/己烷(15/85)洗脱的硅胶层析, 得到固体(270 mg)。

5

步骤 E: 4-氨基-7-(2,4-C-二甲基- β -D-呋喃核糖基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶

在不锈钢高压釜中, 将步骤 D 所得化合物(270 mg)溶于二噁烷(2 mL)中, 加入液态氨(20 g)。将该混合物在 100°C 加热 15, 然后冷却并蒸发。将残余物通过硅胶层析(EtOAc), 得到固体(200 mg)。将固体(150 mg)和 Pd/C (10% 150 mg)在甲醇(20 mL)中、 H_2 (30 psi)气氛下振荡 3 小时, 过滤并蒸发。将残余物通过硅胶层析(MeOH/ CH_2Cl_2 : 1/9), 得到为固体状的所需产物(35 mg)。

10

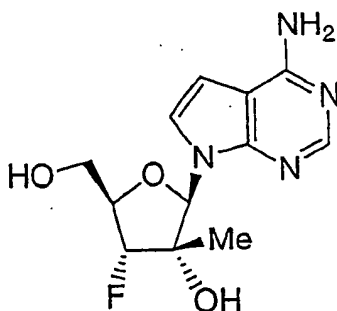
^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$): δ 0.65 (s, 3H), 1.18 (s, 3H), 3.43 (m, 2H), 4.06 (d, 1H, J 6.3 Hz), 4.87 (s, 1H), 5.26 (br, 1H), 5.08 (d, 1H, J 6.3 Hz), 5.25 (t, 1H, J 3.0 Hz), 6.17 (s, 1H), 6.54 (d, 1H, J 3.5 Hz), 6.97 (s, br, 2H), 7.54 (d, 1H, J 3.4 Hz), 8.02 (s, 1H).
 ^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$): δ 18.19, 21.32, 65.38, 73.00, 79.33, 84.80, 90.66, 99.09, 102.41, 121.90, 149.58, 151.48, 157.38.

LC-MS: 实测值: 295.1 ($\text{M}+\text{H}^+$); 计算值 $\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{N}_4\text{O}_4+\text{H}^+$: 295.1.

15

实施例 29

4-氨基-7-(3-脱氧-3-氟-2-C-甲基- β -D-呋喃核糖基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶



20

步骤 A: 3-脱氧-3-氟-1-O-甲基-5-O-甲苯酰基- α -D-呋喃核糖

1,2-O-异亚丙基-D-呋喃木糖(9.0 g, 50 mmol)和对甲苯酰氯(7.0 mL, 50 mmol)的吡啶(50 mL)溶液搅拌 30 分钟。加入水(10 mL), 减压浓缩混合物。将残余物溶于甲苯(500 mL)中, 并用水(200 mL)和饱和碳酸氢钠水溶液(200 mL)洗涤该溶液。两层分离, 蒸发有机层。将残余物溶于甲醇(100 mL)中, 加入 HCl 的二噁烷溶液(4M, 10 mL)。将该混合物在室温下搅拌过夜, 然后减压蒸发。将所得油通过硅胶层析(EtOAc/己烷: 1/1), 得到油(10.1 g)。将该油溶于二氯甲烷(100 mL)中, 加入三氟化二乙基氨基硫(DAST)(5.7 mL)。将该混合物搅拌过夜, 然后倒进饱和碳酸氢钠水溶液(100 mL)中。用甲苯(2 $\times$ 50 mL)萃取该混合物, 浓缩合并后的有机层。将残余物通过硅胶层析(EtOAc/己烷: 15/85), 得到为油状物的标题化合物(1.50 g)。

步骤 B: 3-脱氧-3-氟-2-C-甲基-1-O-甲基-5-O-甲苯酰基- α -D-呋喃核糖

将步骤 A 所得产物(1.0 g, 3.5 mmol)和 Dess-Martin periodinane (2.5 g)的二氯甲烷(20 mL)溶液在室温下搅拌过夜, 然后减压浓缩。将残余物用乙醚(50 mL)研磨并过滤。用 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (12.5 g)在饱和碳酸氢钠水溶液(100 mL)中的溶液洗涤滤液, 干燥(MgSO_4), 过滤并蒸发。将残余物溶于无水 THF(50 mL)中, 在 -78°C 加入 TiCl_4 (3 mL)和溴化甲基镁的乙醚溶液(3 M, 10 mL), 并将混合物在 -50°C 至 -30°C 搅拌 2 小时。将混合物倒进饱和碳酸氢钠水溶液(100 mL)中并经硅藻土过滤。用甲苯(100 mL)萃取该滤液, 蒸发。将残余物通过硅胶层析(EtOAc/己烷: 15/85), 得到为油状物的标题化合物(150 mg)。

步骤 C: 4-氨基-7-(3-脱氧-3-氟-2-C-甲基- β -D-呋喃核糖基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶

将步骤 B 所得产物(150 mg, 0.5 mmol)溶于 HBr (30%)的乙酸(2

mL)溶液中。1 小时后，减压蒸发该混合物，并与甲苯(10 mL)共蒸发。将 4-氯-1H-吡咯并[2,3-d]嘧啶(0.5 g, 3.3 mmol)和粉末状的 KOH (85%, 150 mg, 2.3 mmol)在 DMF(3 mL)中搅拌 30 分钟，并将该混合物与甲苯(2 mL)共蒸发。将所得溶液倒进上面的溴糖中，并将该混合物搅拌过夜。用甲苯(50 mL)稀释该混合物，用水(3 × 50 mL)洗涤，减压浓缩。将残余物通过硅胶层析(EtOAc/己烷: 15/85)，得到油(60 mg)。在不锈钢高压釜中，将该油溶于二噁烷(2 mL)中，并加入液态氨(20 g)。将该混合物在 85℃加热 18 小时，然后冷却并蒸发。将残余物通过硅胶层析(甲醇/二氯甲烷: 1/9)，得到为固体状的标题化合物(29 mg)。

$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6): δ 0.81 (s, 3H), 3.75 (m, 2H), 4.16 (m, 1H), 5.09 (dd, 1H, J 53.2, 7.8 Hz), 5.26 (br, 1H), 5.77 (s, 1H), 6.15 (d, 1H, J 2.9 Hz), 6.59 (d, 1H, J 3.4 Hz), 7.02 (s br, 2H), 7.39 (d, 1H, J 3.4 Hz), 8.06 (s, 1H).

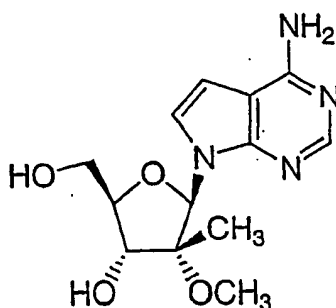
$^{13}\text{C NMR}$ (DMSO- d_6): 19.40, 59.56, 77.24, 79.29, 90.15, 91.92, 99.88, 102.39, 121.17, 149.80, 151.77, 157.47.

$^{19}\text{F NMR}$ (DMSO- d_6): δ 14.66 (m).

ES-MS: 实测值 283.1 ($\text{M}+\text{H}^+$); 对 $\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{FN}_4\text{O}_3+\text{H}^+$ 的计算值: 283.1.

实施例 30

4-氨基-7-(2-C,2-O-二甲基- β -D-呋喃核糖基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶



步骤 A: 4-氯-7-[3,5-二-O-(2,4-二氯苯基甲基)-2-C,2-O-二甲基- β -D-呋喃核糖基]-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶

向实施例 2 步骤 D 所得化合物(618 mg, 1.0 mmol)的 THF (8 mL)

预冷(0℃)溶液中加入甲基碘(709 mg, 5.0 mmol)和 NaH (60%, 在矿物油中)(44 mg, 1.1 mmol)。将所得混合物在室温下搅拌过夜, 然后倒进饱和氯化铵(50 mL)与二氯甲烷(50 mL)的经搅拌的混合物中。用水(50 mL)洗涤有机层, 干燥(MgSO₄), 真空蒸发。将所得粗产物通过用乙酸乙酯/己烷作洗脱剂的硅胶提纯。收集含有产物的流分, 真空蒸发, 得到为无色泡沫状的所需产物(735 mg)。

步骤 B: 4-氨基-7-[3,5-二-O-(2,4-二氯苯基甲基)-2-C,2-O-二甲基-β-D-呋喃核糖基]-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶

向步骤 A 所得化合物(735 mg, 1.16 mmol)中加入甲醇氨(在 0℃ 饱和)(20 mL)。将该混合物在不锈钢高压釜中、80℃ 加热过夜, 然后冷却, 并真空蒸发所得高压釜内物质。将粗混合物通过用乙酸乙酯/己烷作洗脱剂的硅胶提纯。收集含产物的流分, 真空蒸发, 得到为无色泡沫状的所需产物(504 mg)。

步骤 C: 4-氨基-7-(2-C, 2-O-二甲基-β-D-呋喃核糖基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶

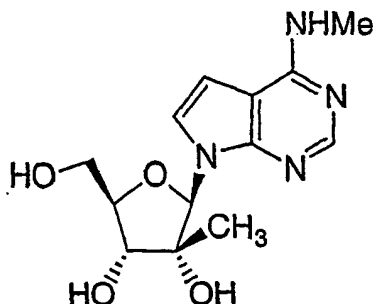
将步骤 C 所得产物(64 mg, 0.1 mmol)、MeOH (5 mL)和 Et₃N (0.2 mL)以及 10% Pd/C (61 mg)的混合物在 Parr 氢化器上 50 psi、室温下氢化过夜。将该混合物通过硅藻土过滤, 真空蒸发, 并通过硅胶垫过滤, 用 2% 甲醇的二氯甲烷溶液作洗脱剂。收集所需产物, 并真空蒸发。将该化合物再溶于甲醇(10 mL)中, 加入 10% Pd/C(61 mg)。将该混合物在 Parr 氢化器上 55 psi、室温下氢化两周。将该混合物通过硅藻土过滤, 真空蒸发, 并通过用 10% 甲醇的二氯甲烷溶液作洗脱剂的硅胶提纯。收集含产物的流分, 真空蒸发, 得到为无色泡沫状的所需产物(110 mg)。

¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ 0.68 (s, 3H), 3.40 (s, 3H), 3.52-3.99 (重复 m, 4H), 4.92 (d, 1H), 5.07 (t, 1H), 6.26 (s, 1H), 6.55 (d, 1H), 7.00s br, 2H), 7.46 (d, 1H), 8.05 (s, 1H).

LC-MS: 实测值 293.1 (M-H⁺); 对 C₁₂H₁₆N₄O₄-H⁺的计算值: 293.12。

实施例 31

4-甲基氨基-7-(2-C-甲基-β-D-呋喃核糖基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶



5

将实施例 2 步骤 E 所得化合物(200 mg, 0.67 mmol)加入到甲胺(5 mL, 在小不锈钢高压釜中浓缩)中, 并在 85℃加热 48 小时, 然后冷却, 真空蒸发。将粗混合物通过用乙醇作洗脱剂的硅胶提纯, 在用 MeCN 处理后, 分离出的无定形固体即为标题化合物。将该无定形

10

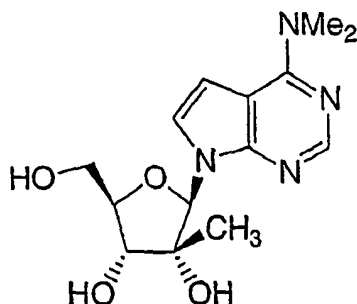
¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ 0.63 (s, 3H, CH₃), 3.32 (s, 3H, N CH₃), 3.58-3.67 (m, 1H, H-5'), 3.79-3.39 (m, 3H, H-5'', H-4', H-3'), 5.03 (s, 1H, 2'-OH), 5.04-5.11 (1H, 3'-OH, 1H, 5'-OH), 6.14 (s, 1H, H-1'), 6.58 (d, 1H, *J*_{5,6} = 3.6 Hz, H-5), 7.46 (d, 1H, H-6), 7.70 (br s, 1H, NH), 8.14 (s, 1H, H-2).

LC-MS: 实测值 295.1 (M-H⁺); 对 C₁₃H₁₈N₄O₄+H⁺的计算值: 294.3。

实施例 32

15

4-二甲基氨基-7-(2-C-甲基-β-D-呋喃核糖基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶



将实施例 2 步骤 E 所得化合物(200 mg, 0.67 mmol)加入到二甲胺

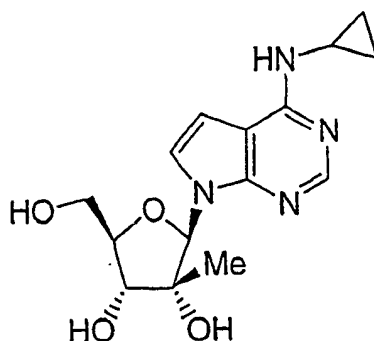
(5 mL 在小不锈钢高压釜中浓缩)中, 并在 85℃加热 48 小时, 然后冷却, 真空蒸发。将粗混合物通过用乙醇作洗脱剂的硅胶提纯, 在用 MeCN 处理后, 分离出的无定形固体即为标题化合物。将该无定形固体溶于水中, 冷冻干燥, 得到无色粉末(164 mg)。

$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6): δ 0.64 (s, 3H, CH₃), 3.29 (s, 3H, N CH₃), 3.32 (s, 3H, N CH₃), 3.60-3.66 (m, 1H, H-5'), 3.77-3.97 (m, 3H, H-5'', H-4', H-3'), 5.04 (s, 1H, 2'-OH), 5.06-5.11 (1H, 3'-OH, 1H, 5'-OH), 6.21 (s, 1H, H-1'), 6.69 (d, 1H, $J_{5,6} = 3.6$ Hz, H-5), 7.55 (d, 1H, H-6), 8.13 (s, 1H, H-2)。

LC-MS: 实测值 309.3 (M-H⁺); 对 C₁₄H₂₀N₄O₄+H⁺的计算值: 308.33。

实施例 33

4-环丙基氨基-7-(2-C-甲基-β-D-呋喃核糖基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶

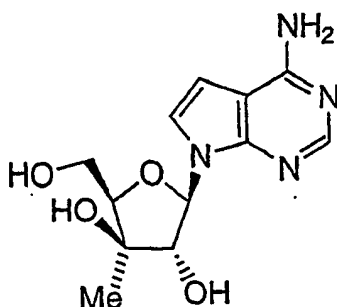


将实施例 2 步骤 E 所得化合物(200 mg, 0.67 mmol)加入到环丙胺(5 mL 在小不锈钢高压釜中浓缩)中, 并在 85℃加热 48 小时, 然后冷却, 真空蒸发。将粗混合物通过用乙醇作洗脱剂的硅胶提纯, 在用 MeCN 处理后, 分离出的无定形固体即为标题化合物。将该无定形固体溶于水中, 冷冻干燥, 得到无色粉末(148 mg)。

$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6): δ 0.51-0.58 (m, 2H), 0.64 (s, 3H, CH₃), 0.74-0.076 (m, 2H), 3.62-3.67 (m, 1H, H-5'), 3.79-3.82 (m, 3H, H-5'', H-4', H-3'), 3.92-3.96 (m, H-4', H-3'), 5.03 (s, 1H, 2'-OH), 5.05-5.10 (1H, 3'-OH, 1H, 5'-OH), 6.15 (s, 1H, H-1'), 7.48 (d, 1H, $J_{5,6} = 3.6$ Hz, H-5), 7.59 (d, 1H, H-6), 8.13 (s, 1H, H-2)。

LC-MS: 实测值 321.1 (M-H⁺); 对 C₁₅H₂₀N₄O₄+H⁺的计算值: 320.3。

实施例 34

4-氨基-7-(3-C-甲基- β -D-呋喃木糖基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶

- 5 步骤 A: 7-[2,5-二-O-(叔丁基二甲基甲硅烷基)- β -D-呋喃核糖基]-4-[(4-甲氧基苯基)二苯基甲基]氨基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶和 7-[3,5-二-O-(叔丁基二甲基甲硅烷基)- β -D-呋喃核糖基]-4-[(4-甲氧基苯基)二苯基甲基]氨基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶

- 10 向实施例 26 和 27 步骤 A 所得化合物的混合物(0.32 g, 0.65 mmol) 在无水吡啶(6 mL)的溶液中加入一甲氧基三苯甲基氯(0.30 g, 0.98 mmol), 将反应混合物在室温下搅拌过夜。然后浓缩该混合物, 并将残余物在 CH_2Cl_2 (70 mL)和水(20 mL)之间分配。用水和盐水洗涤有机层, 干燥(Na_2SO_4)并浓缩。将残余物通过用 5-13 % EtOAc 的己烷溶液作洗脱剂的硅胶柱提纯。收集适当的流分, 浓缩, 得到为无色泡沫状的 2',5'-二-O-(叔丁基二甲基甲硅烷基)-和 3',5'-二-O-(叔丁基二甲基甲硅烷基)保护的核苷(分别为 343 mg 和 84 mg)。
- 15

步骤 B: 7-[2,5-二-O-(叔丁基二甲基甲硅烷基)- β -D-赤藓-呋喃戊-3-酮糖基]-4-[(4-甲氧基苯基)二苯基甲基]氨基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶

- 20 在 0°C, 向三氧化铬(91 mg, 0.91 mmol)在 CH_2Cl_2 (4 mL)中的经充分搅拌的悬浮液中加入吡啶(147 μL , 1.82 mmol), 然后加入乙酸酐(86 μL , 0.91 mmol)。将该混合物在室温下搅拌 0.5 小时。然后加入步骤 A 所得 2',5'-二-O-(叔丁基二甲基甲硅烷基)保护的核苷(343 mg 0.45 mmol)的 CH_2Cl_2 (2.5 mL)溶液, 将该混合物在室温下搅拌 2 小

时。然后将混合物倒进冰冷的 EtOAc (10 mL) 中, 并通过用 EtOAc 作洗脱剂的短硅胶柱过滤。蒸发滤液, 将残余物通过用己烷和己烷/EtOAc (7/1) 作洗脱剂的硅胶柱提纯, 得到标题化合物(180 mg)。

- 5 步骤 C: 7-[2,5-二-O-(叔丁基二甲基甲硅烷基)-3-C-甲基-β-D-呋喃核糖基)-4-[(4-甲氧基苯基)二苯基甲基]氨基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶和 7-[2,5-二-O-(叔丁基二甲基甲硅烷基)-3-C-甲基-β-D-呋喃木糖基)-4-[(4-甲氧基苯基)二苯基甲基]氨基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶

- 10 在室温下, 向 MeMgBr (3.0 M 的乙醚溶液; 0.17 mL, 0.5 mmol) 在无己烷(1.5 mL)的混合物中滴加步骤 B 所得化合物(78 mg, 0.1 mmol)的无水己烷(0.5 mL)溶液。在室温下搅拌 2 小时后, 将该反应混合物倒进冰冷却的水(10 mL)中, 用 EtOAc (20 mL)稀释, 然后通过硅藻土过滤, 再将其用 EtOAc 充分洗涤。分离各层, 用盐水洗涤有机层, 干燥(Na_2SO_4)并浓缩。将残余物通过用 8-25 % EtOAc 的己烷溶
15 液作洗脱剂的硅胶柱提纯, 得到 3-C-甲基木(xylo)- (60 mg)和 3-C-甲基核(ribo)-异构体(20 mg)。

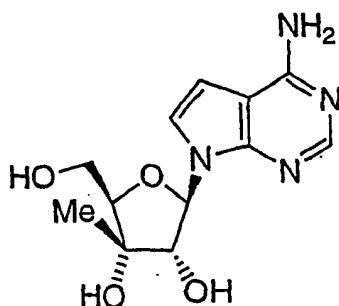
步骤 D: 4-氨基-7-(3-C-甲基-β-D-呋喃木糖基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶

- 20 向步骤 C 所得 3-C-甲基-木异构体(60 mg, 0.08 mmol)的 THF (2 mL)冰冷溶液中加入 TBAF (1 M 的 THF 溶液; 0.32 mL, 0.32 mmol)。将该反应混合物在室温下搅拌 5 小时, 然后用 CH_2Cl_2 (50 mL)稀释, 并用水(3 x 15 mL)洗涤, 干燥, 蒸发。将残余物溶于二噁烷(0.3 mL), 加入 80%乙酸(3 mL)。将反应混合物在室温下搅拌 1 天, 然后蒸发。
25 将残余物与二噁烷共蒸发, 收集进水(50 mL)中, 并用 CH_2Cl_2 (2 x 10 mL)洗涤。浓缩水层, 然后冷冻干燥。将残余物通过用 CH_2Cl_2 /MeOH (20/1 和 10/1)作洗脱剂的硅胶柱提纯, 冷冻干燥后得到为白色绒毛状化合物的标题化合物(10 mg)。

^1H NMR (CD_3CN): δ 1.28 (s, 3H, CH_3), 3.56 (br s, 1H, OH), 3.78 (m, 3H, H-4', H-5', H-5''), 4.10 (br s, 1H, OH), 4.44 (d, 1H, $J_{2,1'} = 3.9$ Hz, H-2'), 5.58 (d, 1H, H-1'), 5.85 (br s, 2H, NH_2), 6.15 (br s, 1H, OH), 6.48 (d, 1H, $J_{5,6} = 3.7$ Hz, H-5), 7.23 (d, 1H, H-6), 8.11 (s, 1H, H-2). ES-MS: 281 $[\text{MH}]^+$.

实施例 35

4-氨基-7-(3-C-甲基- β -D-呋喃核糖基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶



5

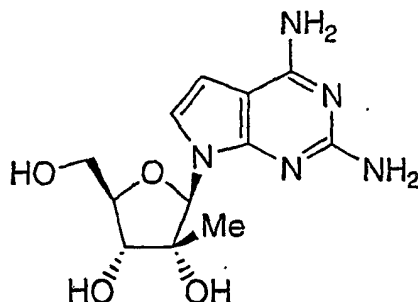
用实施例 32 步骤 D 中所述程序将实施例 32 步骤 C 中所得核-异构体(20 mg)脱保护, 得到标题化合物(4 mg)。

^1H NMR (CD_3CN): δ 1.43 (s, 3H, CH_3), 3.28 (br s, 1H, OH), 3.58 (m, 2H, H-5', H-5''), 3.99 (m, 1H, H-4'), 4.10 (br s, 1H, OH), 4.62 (d, 1H, $J_{2,1'} = 8.1$ Hz, H-2'), 5.69 (d, 1H, H-1'), 5.88 (br s, 3H, OH, NH_2), 6.45 (br s, 1H, OH), 6.51 (d, 1H, $J_{5,6} = 3.7$ Hz, H-5), 7.19 (d, 1H, H-6), 8.12 (s, 1H, H-2). ES-MS: 281 $[\text{MH}]^+$.

10

实施例 36

2,4-二氨基-7-(2-C-甲基- β -D-呋喃核糖基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶



将实施例 4 步骤 B 中所得产物(24 mg)在氨水(30%, 10 mL)的混合物在不锈钢高压釜中、100℃加热过夜, 然后冷却并蒸发。将残余物通过用 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (10/1 和 5/1)作洗脱剂的硅胶柱提纯, 得到标题化合物(15 mg)。

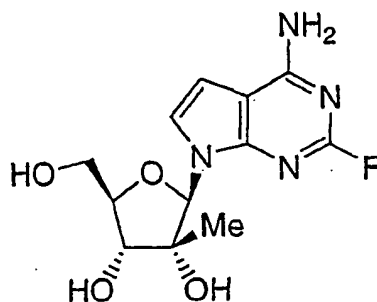
15

^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$): δ 0.68 (s, 3H, CH_3), 3.48-3.58 (m 1H, H-5'), 3.68-3.73 (m, 2H, H-5'', H-4'), 3.84 (m, 1H, H-3'), 4.72 (s, 1H, 2'-OH), 4.97-5.03 (m, 2H, 3'-OH, 5'-OH), 5.45 (br s, 2H, NH_2), 6.00 (s, 1H, H-1'), 6.28 (d, 1H, $J = 3.7$ Hz, H-5), 6.44 (br s, 2H, NH_2) 6.92 (d, 1H $J = 3.7$ Hz, H-6).

ES MS: 294.1 ($\text{M}-\text{H}^+$).

实施例 37

4-氨基-2-氟-7-(2-C-甲基- β -D-呋喃核糖基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶



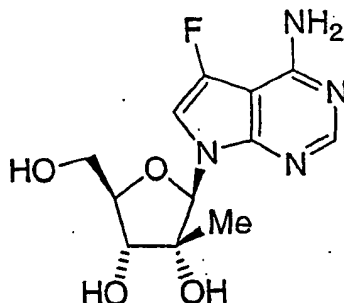
5

在 -30°C ，向用吡啶(1mL)稀释后 HF/吡啶(70%, 2 mL)中加入实施例 36 所得化合物(60 mg, 0.2 mmol)的 0.5 mL 吡啶溶液，随后加入亚硝酸叔丁酯(36 μL , 0.3 mmol)。在 -25°C 继续搅拌 5 分钟。然后将该溶液倒进冰-水(5 mL)中，用 2N 含水 NaOH 中和，蒸发至干燥。将残余物通过用 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (20/1 和 10/1)作洗脱剂的硅胶柱提纯，得到标题化合物。

10

实施例 38

4-氨基-5-氟-7-(2-C-甲基- β -D-呋喃核糖基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶



15

步骤 A: 4-乙酰基氨基-7-(2,3,5-三-O-乙酰基-2-C-甲基-β-D-呋喃核糖基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶

5 向实施例 2 步骤 F 所得化合物(280 mg, 1.00 mmol)的吡啶溶液中加入乙酸酐(613 mg, 6.0 mmol)。将所得溶液在室温下搅拌过夜，真空蒸发，将所得粗混合物通过用乙酸乙酯/己烷作洗脱剂的硅胶提纯。收集含有所需产物的流分，真空蒸发，得到所需产物。

步骤 B: 4-乙酰基氨基-5-溴-7-(2,3,5-三-O-乙酰基-2-C-甲基-β-D-呋喃核糖基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶

10 向步骤 A 所得化合物(460 mg, 1.00 mmol)的 DMF 预冷却(0℃)溶液中加入 N-溴代丁二酰亚胺(178 mg, 1.0 mmol)的 DMF 溶液。将所得溶液在 0℃搅拌 30 分钟，然后再在室温下搅拌 30 分钟。加入甲醇猝灭反应，真空蒸发。将所得粗混合物通过用乙酸乙酯/己烷作洗脱剂的硅胶提纯。收集含有所需产物的流分，真空蒸发，得到所需产物。

15

步骤 C: 4-氨基-5-氟-7-(2-C-甲基-β-D-呋喃核糖基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶

20 向步骤 B 所得化合物(529 mg, 1.00 mmol)的 THF 预冷却(-78℃)溶液中加入丁基锂(2M 的己烷溶液)(0.5 mL, 1.00 mmol)。将所得溶液在-78℃搅拌 30 分钟，然后用 N-氟代苯磺二酰亚胺(sulfonimide)(315 mg, 1.00 mmol)的 THF 溶液猝灭反应。使所得溶液非常慢地回复至室温，然后将其倒进饱和氯化铵水溶液和二氯甲烷的经搅拌的混合物中。真空蒸发有机相，并在密闭容器中、55℃用氢氧化铵处理过夜。

25 将所得粗混合物通过用二氯甲烷/甲醇作洗脱剂的硅胶提纯。收集含有所需产物的流分，真空蒸发，得到所需产物。

生物学分析

下面描述用于测定对 HCV NS5B 聚合酶和 HCV 复制的抑制的试验。

5 在下面的试验中测定本发明化合物作为 HCV NS5B 依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶(RdRp)的抑制剂的有效性。

A. 测试对 HCV NS5B 聚合酶的抑制:

10 本试验用于测定本发明核苷衍生物抑制丙型肝炎病毒(HCV)的依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶(NS5B)在异数 RNA 模板上的酶活性的能力。

程序:

试验缓冲条件: (50 μ L-总量/反应物)

20 mM Tris, pH 7.5

15 50 μ M EDTA

5 mM DTT

2 mM $MgCl_2$

80mM KCl

0.4 U/ μ L RNAsin (Promega, 含量(stock)为 40 单位/ μ L)

20 0.75 μ g t500 (一个用 T7 失控转录制成的 500-nt RNA, 具有来自丙型肝炎基因组的 NS2/3 区域的序列)

1.6 μ g 纯化丙型肝炎 NS5B (由 21 个 C-末端截短的氨基酸形成)

1 μ M A, C, U, GTP (核苷三磷酸混合物)

$[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-GTP}$ 或 $[\alpha\text{-}^{33}\text{P}]\text{-GTP}$

25 在最高达 100 μ M 最终浓度的各种浓度下测试所述化合物。

制备包括酶和模板 t500 的适当量的反应缓冲液。将本发明的核苷衍生物吸移到 96 孔板的孔中。制备包括放射性标记 GTP 的核苷三磷酸(NTP's)混合物, 并将其吸移到 96 孔板的孔中。加入酶-模板反应溶液引发反应, 并使反应在室温下进行 1-2 小时。

加入 20 μL 0.5M EDTA, pH8.0 猝灭反应。包括空白试验, 空白试验中将猝灭溶液在加入反应缓冲液之前加入到 NTPs 中。

将 50 μL 猝灭后的反应物点滴到 DE81 滤片(Whatman)上, 并使其干燥 30 分钟。用 0.3 M 甲酸铵, pH8 (每次洗涤用 150 mL, 直到 1 mL 洗液中的 cpm 小于 100, 通常洗 6 次)洗涤滤片。在闪烁计数器中, 在 5 mL 闪烁液中对滤片计数。

通过下述公式计算抑制百分比: 抑制 % = $[1 - (\text{测试反应中的 cpm} - \text{空白反应中的 cpm}) / (\text{对照反应中的 cpm} - \text{空白反应中的 cpm})] \times 100$ 。

在 HCV NS5B 聚合酶试验中测试的具有代表性的化合物显示出小于 100 微摩尔的 IC_{50} 值。

B. 测试对 HCV RNA 复制的抑制:

还评价本发明化合物在含有亚基因组 HCV 复制子的培养肝癌 (HuH-7) 细胞中对丙型肝炎病毒 RNA 复制的影响。试验的细节如下所述。本复制子试验是在 V.Lohmann, F. Korner, J-O. Koch, U. Herian, L. Theilmann 和 R. Bartenschlager, "Replication of a Sub-genomic Hepatitis C Virus RNAs in a Hepatoma Cell Line," Science 285: 110 (1999) 中所述内容的基础上经过修改而进行的。

20 实施方案:

本试验是原位核糖核酸酶保护、基于闪烁亲近的平板测定 (SPA)。将 10,000 - 40,000 个细胞加入到 96 孔 cytostar 板(Amersham) 中的 100-200 μL 含有 0.8 mg/mL G418 的培养基中。在 0 - 18 小时, 以在 1 % DMSO 中的最高达 100 μM 的各种浓度将化合物加入到细胞中, 然后培养 24-96 小时。将细胞固定(20 分钟, 10 % 福尔马林), 透化(20 分钟, 0.25 % Triton X-100/PBS)并与单链 ^{33}P RNA 探针杂交(一夜, 50 $^{\circ}\text{C}$), 所述单链 ^{33}P RNA 探针与 RNA 病毒基因组中所含的(+) 链 NS5B(或其它基因)互补。将细胞洗涤, 用 RNase 处理, 洗涤, 加

热至 65℃，并在 Top-Count 中计数。读取每分钟计数(cpm)的减少作为对复制的抑制。

被选择来含有亚基因组复制子的人 HuH-7 肝癌细胞带有细胞质 RNA，该细胞质 RNA 由 HCV 5'非翻译区(NTR)、新霉素选择性标记、
5 EMCV IRES(内部核糖体进入位点)和 HCV 非结构蛋白 NS3-NS5B 以及跟随其后的 3' NTR 构成。

在本复制试验中测试的具有代表性的化合物显示出小于 100 微摩尔的 EC₅₀ 值。

还在下述的 counterscreen 中评价了本发明核苷衍生物的细胞毒
10 性和抗病毒特异性。

C. COUNTERSCREENS:

在下面的试验中测试了本发明核苷衍生物对人 DNA 聚合酶的抑制能力。

15 a. 对人 DNA 聚合酶 α 和 β 的抑制:

反应条件:

50 μ L 反应容积

反应缓冲组分:

20 20 mM Tris-HCl, pH 7.5

200 μ g/mL 牛血清清蛋白

100 mM KCl

2 mM β -巯基乙醇

10 mM MgCl₂

25 1.6 μ M dA, dG, dC, dTTP

α -³³P-dATP

酶和模板:

0.05 mg/mL 缺口鱼精子 DNA 模板

0.01 U/ μ L DNA 聚合酶 α 或 β

缺口鱼精子 DNA 模板的制备

- 5 将 5 μ L 1M $MgCl_2$ 加入到 500 μ L 活化鱼精子 DNA (USB 70076) 中;
加热至 37 $^{\circ}C$, 并加入 30 μ L 65 U/ μ L 的外切核酸酶 III (GibcoBRL 18013-011);
在 37 $^{\circ}C$ 培育 5 分钟;
通过加热至 65 $^{\circ}C$ 10 分钟终止反应;
10 将 50-100 μ L 等分试样装到 Bio-spin 6 色谱柱(Bio-Rad 7326002) 中, 该色谱柱已用 20 mM Tris-HCl, pH 7.5 进行了平衡;
通过以 1,000Xg 离心 4 分钟进行洗脱;
收集洗出液, 并在 260 nm 测定吸光度, 以确定浓度。

- 15 将 DNA 模板稀释至 20 mM Tris-HCl, pH7.5 的适当体积, 将酶稀释至 20 mM Tris-HCl 的适当体积, 含有 2 mM β -巯基乙醇和 100 mM KCl。将模板和酶吸移至微量离心管或 96 孔板中。还分别用酶稀释缓冲液和测试化合物溶剂制备了排除酶的空白反应物和排除测试化合物的对照反应物。用具有上述组分的反应缓冲液引发反应。将反应物在 37 $^{\circ}C$ 培育 1 小时。加入 20 μ L 0.5M EDTA 猝灭反应。将 50 μ L 猝灭后的反应物点滴到 Whatman DE81 滤片上并风干。用 150 mL 0.3M pH8 的甲酸铵反复洗涤滤片, 直到 1 mL 洗液 < 100 cpm。将滤片用 150 mL 无水乙醇洗涤两次, 用 150 mL 无水乙醚洗涤一次, 干燥并在 5 mL 闪烁液中计数。

- 25 通过下述公式计算抑制的百分比: 抑制 % = $[1 - (\text{测试反应中的 cpm} - \text{空白反应中的 cpm}) / (\text{对照反应中的 cpm} - \text{空白反应中的 cpm})] \times 100$ 。

b. 对人 DNA 聚合酶 γ 的抑制:

在包含下述成分的反应中测试了对人 DNA 聚合酶 γ 的抑制能力: 0.5 ng/ μ L 酶; 10 μ M dATP, dGTP, dCTP 和 TTP; 2 μ Ci/反应[a-³³P]-dATP 和 0.4 μ g/ μ L 活化鱼精子 DNA (购自 US Biochemical), 在含有 20 mM Tris pH8, 2 mM β -巯基乙醇、50 mM KCl、10 mM MgCl₂ 和 0.1 μ g/ μ L BSA 的缓冲液中。使反应在 37°C 进行 1 小时, 然后通过加入 0.5 M EDTA 至 142 mM 的最终浓度猝灭反应。通过阴离子交换过滤结合和闪烁计数对所形成的产物定量。在最高达 50 μ M 的浓度测试化合物。

通过下述公式计算抑制的百分比: 抑制 % = [1-(测试反应中的 cpm-空白反应中的 cpm)/(对照反应中的 cpm-空白反应中的 cpm)] $\times$ 100。

在下述测试中, 测定了本发明核苷衍生物抑制 HIV 感染和 HIV 扩散的能力。

c. HIV 感染性测试

用表达 CXCR4 和 CCR5 的 HeLa Magi 细胞的变体进行本测试, 根据低背景 β -半乳糖苷酶(β -gal)表达进行选择。使细胞感染 48 小时, 用化学发光底物(Galactolight Plus, Tropix, Bedford, MA)对得自综合(integrated)HIV-1 LTR 启动子的 β -gal 产物进行定量。在开始于 100 μ M 的两倍连续稀释液中滴定(在重复试验中)抑制物; 计算相对于对照感染的各浓度下的抑制百分比。

d. 对 HIV 扩散的抑制

通过美国专利 5,413,999 号(1995 年 5 月 9 日)和 J. P. Vacca 等的 Proc. Natl. Acad. Sci., 91: 4096-4100 (1994)中所述的方法测试本发明化合物抑制人类免疫缺陷性病毒(HIV)扩散的能力, 将所述文献的内容全部引用结合进本文。

在下列测试中所述的基于 MTS 细胞的测试中，筛选了本发明核苷衍生物对含有亚基因组 HCV 复制子的培养肝癌(HuH-7)细胞的细胞毒性。在 H. Nakabayashi 等的 Cancer Res., 42: 3858 (1982)中描述了 HuH-7 细胞系。

5

e. 细胞毒性测试:

在适当的培养基中准备细胞培养物，浓度为大约 1.5×10^5 个细胞/mL 的用于 3 天培育中的悬浮培养，浓度为 5.0×10^4 个细胞/mL 的用于 3 天培育中的贴壁培养。将 99 μ L 细胞培养物转移至 96 孔组织培养处理板的孔中，加入 1 μ L 在 DMSO 中的 100 倍最终浓度的测试化合物。将平板在 37°C 和 5% CO₂ 条件下培育一段特定时间。培育期之后，向各孔中加入 20 μ L CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation 测试试剂(MTS)(Promega)，再将平板在 37°C 和 5% CO₂ 条件下培育最长为 3 小时的一段时间。振荡平板以使各孔混合，用平板读数器读取 490 nm 下的吸光度。用临添加 MTS 试剂前的已知细胞数制作悬浮培养细胞的标准曲线。代谢活性细胞将 MTS 分解为甲臍，甲臍在 490 nm 吸收。将化合物存在下 490nm 的吸光度与未添加任何化合物的细胞的吸光度相比。参考：Cory, A. H 等, "Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture," Cancer Commun. 3: 207 (1991)。

10

15

20

将下面的测试用于测定本发明化合物对其它依赖于 RNA 的 RNA 病毒的活性。

a. 测定化合物对鼻病毒的体外抗病毒活性(致细胞病变效应抑制测试) :

25

测试条件描述在 Sidwell and Huffman, "Use of disposable microtissue culture plates for antiviral and interferon induction studies," Appl. Microbiol. 22: 797-801 (1971)的文章中。

病毒:

如 Sidwell and Huffman 参考中所述, 使用 2 型鼻病毒(RV-2)HGP 毒株与 KB 细胞和培养基(0.1 % NaHCO₃, 无抗生素)。由 ATCC 获得的病毒取自具有轻微的急性发热上呼吸道疾病的成年男性的咽喉棉棒。

9 型鼻病毒(RV-9) 211 毒株和 14 型鼻病毒(RV-14)Tow 毒株也由 Rockville, MD 中的 American Type Culture Collection (ATCC) 获得。RV-9 取自人咽喉洗液, RV-14 取自具有上呼吸道疾病的年轻成人的咽喉棉棒。这两种病毒都采用人子宫颈上皮样癌细胞 HeLa Ohio-1 细胞(Dr. Fred Hayden, Univ. of VA)。用具有 5 % 胎牛血清(FBS)和 0.1 % NaHCO₃ 的 MEM (Eagle's 极限必需培养基)作为生长培养基。全部三种病毒类型的抗病毒测试培养基都是具有 5 % FBS、0.1 % NaHCO₃、50 μg 庆大霉素/mL 和 10 mM MgCl₂ 的 MEM。

2000 μg/mL 是用于测试本发明化合物的最高浓度。在加入受试化合物之后大约 5 分钟, 将病毒加入到测试板中。同时制作适当的对照试样。将测试板在潮湿空气、5 % CO₂、37℃ 条件下进行培养。通过显微镜观察对照细胞的形态变化来监测细胞毒性。病毒 CPE 数据和毒性对照数据的回归分析给出了 ED₅₀ (50 % 有效剂量)和 CC₅₀ (50 % 细胞毒性浓度)。通过式子: $SI = CC_{50} \div ED_{50}$ 计算选择性指数 (SI)。

b. 测定化合物对登革热、班齐和黄热病的体外抗病毒活性(CPE 抑制测试) :

测试详细内容给出在上述 Sidwell and Huffman 参考文献中。

25 病毒:

从疾病控制中心获取登革热 2 型病毒 New Guinea 毒株。用两行非洲绿猴肾细胞培养病毒(非洲绿猴肾细胞株系(Vero))并进行抗病毒测试(MA-104)。从 ATCC 获得自被感染的鼠脑制取的黄热病病毒 17D

毒株和分离自南非发热男孩的血清的班齐病毒 H336 毒株。这两种病毒的测试都使用 Vero 细胞。

细胞和培养基:

- 5 在具有 5 % FBS 和 0.1 % NaHCO_3 、没有抗生素的 199 培养基中使用 MA-104 细胞(Bio Whittaker, Inc., Walkersville, MD)和 Vero 细胞(ATCC)。用于登革热、黄热病和班齐病毒的测试培养基是 MEM、2 % FBS、0.18 % NaHCO_3 和 50 μg 庆大霉素/mL。

- 10 本发明化合物的抗病毒测试按照 Sidwell and Huffman 参考文献中所述进行，类似于上述鼻病毒抗病毒测试。对于各种病毒，在 5-6 天后获得适当的致细胞病变效应(CPE)记录。

c. 测定化合物对西尼罗病毒的体外抗病毒活性(CPE 抑制测试) :

- 15 测试详细内容给出在上述引用的 Sidwell and Huffman 参考文献中。从疾病控制中心获得取自鸭脑的西尼罗病毒 New York 分离物。使 Vero 细胞生长并如上使用。测试培养基为 MEM、1 % FBS、0.1 % NaHCO_3 和 50 μg 庆大霉素/mL。

- 20 本发明化合物的抗病毒测试按照 Sidwell and Huffman 参考文献中所述方法进行，类似于用于鼻病毒活性测试的那些方法。在 5-6 天后获得适当的致细胞病变效应(CPE)记录。

d. 测定化合物对鼻病毒、黄热病、登革热、班齐和西尼罗病毒的体外抗病毒活性(中心红摄取测试) :

- 25 如上进行 CPE 抑制测试后,再使用“Microtiter Assay for Interferon: Microspectrophotometric Quantitation of Cytopathic Effect,” Appl. Environ. Microbiol. 31: 35-38 (1976)中所述的细胞病变检测方法。用 EL309 型小平板读出器(Bio-Tek Instruments Inc.)对测试平板读数。如上计算出 ED50 值和 CD50 值。

药物制剂的实施例

作为本发明化合物的口服组合物的具体实施方案，用 50 mg 实施例 1 或实施例 2 的化合物与充分粉碎后的乳糖一起配制制剂，以提供 580-590 mg 的总量，将其装进 0 号硬质明胶胶囊中。

5

如上对本发明进行了描述并参照其具体实施方案进行了举例说明，本领域技术人员都将意识到在不背离本发明的精神和范围的前提下，可以对其进行各种变化、改进和替换。例如，根据需治疗 HCV 严重传染的人的反映的各种变化的推断，前文中列出的优选剂
10 量以外的有效剂量也是适用的。同样，所观察到的药理学反应也可根据并依赖所选择的具体活性化合物或者是否存在制药载体以及制剂类型和所用给药方式而变化，根据本发明的目的和实践注意到这些预期的变化或结果差异。因此，本发明仅由所附权利要求的范围限定，这些权利要求适当地保持较宽的范围。