2',2-双噻唑非核苷类化合物及其制备方法、药物组合物和作为肝炎病毒抑制剂的用途

技术领域

本发明属于药物化学领域，涉及一类 2',2-双噻唑非核苷类化合物及其制备方法，以及包含该类化合物的药物组合物，该类化合物同时具有抗乙型肝炎病毒和抗丙型肝炎病毒的活性，可用于治疗乙型肝炎和丙型肝炎。

背景技术

病毒感染性肝炎是当今国际公认的治疗学难题，也是最常见和危害性最大的一类肝炎，传染性很强。通常引起肝炎的病毒主要有甲、乙、丙、丁、戊五型。甲型和戊型肝炎病毒通过肠道传染，病毒污染水源或食物后可形成大流行，不过不会发展为慢性，也不会引起肝硬化，并且患病后有终身免疫力。乙、丙和丁型病毒性肝炎均通过血液传播，少数也可因密切接触病人的唾液、精液、乳汁等感染，如夫妻之间、母婴之间的相互传染。肝炎病毒中的乙型(HBV)、丙型(HCV)和丁型(HDV)在急性感染后有 80%以上会转为慢性，其中，20%若持续感染有可能发展成肝硬化，其中的 1%～5%转为肝癌。

我国是病毒性肝炎的高发区，仅乙型肝炎病毒携带者有 1.2 亿人，每年因病毒性肝炎导致直接经济损失 300 亿～500 亿人民币；而丙型肝炎呈全球性流行，是欧美及日本等国家终末期肝病的最主要原因。据世界卫生组织统计，全球 HCV 的感染率约为 3%，估计约 1.7 亿人感染了 HCV，每年新发丙型肝炎病例约 3.5 万例。根据全国血清流行病学调查资料显示，我国一般人群抗 HCV 阳性率为 3.2%。

HBV 和 HCV 虽然同属于肝炎病毒，并有着相似的传播途径，但它们却分属于不同的病毒属。HBV 属嗜肝 DNA 病毒科 (hepadnaviridae)，为部分双链环状 DNA，而 HCV 属黄病毒科（flaviviridae），为单股正链 RNA

病毒。目前临床上抗 HBV 药物较多且主要为核苷类药物，如拉米夫定（lamivudine）、泛昔洛韦（famciclovir）、洛布卡韦（lobucavir）、阿地福韦（adefovir dipivoxiil）、FTC（二脱氧氟硫代胞嘧啶）、FMAU（氟甲阿糖尿嘧啶）、FDDC（氟二脱氧胞嘧啶）、BMS 200475（环氧羟碳脱氧鸟苷）和恩替卡韦（enticavir）等。由于 HBV 和 HCV 的病毒类型不同，现有的 HBV 治疗药物并不能用于 HCV 的治疗。对于 HCV，临床上还未有有效的小分子药物，目前最有效的 HCV 治疗方案就是干扰素-广谱抗病毒药联合使用，如干扰素与病毒唑联合应用，但持续疗效低于 40%，且不良反应大。

因此，探索与开发病毒性肝炎治疗药物一直是国内外医药学家工作的重点。

国际申请 PCT/CN2007/001861 (国际公布号 WO 2007/147336)是本申请人先前的一篇国际专利申请，公开了一类杂环非核苷类化合物及其抗乙型肝炎病毒的生物活性，可用于治疗乙型肝炎。然而后续研究发现，该类化合物的某些药代参数，尤其是生物利用度很低，如化合物 W28F 在雄性大鼠（10 mg/kg）上的口服生物利用度仅为 2.80%。因此迫切需要对该类化合物结构进一步修饰，使这些化合物在保持其强抗病毒活性的同时，改善其生物利用度。

本发明人对其中的 2',2-双噻唑非核苷类化合物在原有化合物结构基础上在噻唑环的 5 位侧链上引入羟基、卤素原子或双键，所得化合物不仅保持了原化合物抗乙型肝炎病毒的生物活性，并有效改善了原化合物的生物利用度。深入研究还发现，这类新型的 2',2-双噻唑非核苷类化合物不仅具有抗乙肝病毒活性，还具有抗丙肝病毒的生物活性。

发明内容

因此，本发明的目的在于提供一类新型的 2',2-双噻唑非核苷类化合物；

本发明的另一目的在于提供本发明的 2',2-双噻唑非核苷类化合物的制备方法；

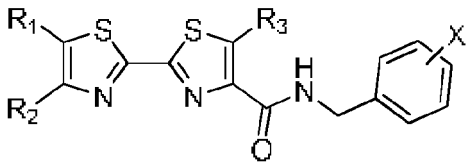
本发明的还一目的在于提供一种乙型和/或丙型肝炎病毒抑制剂的药物

组合物，其含有本发明的 2',2-双噻唑非核苷类化合物作为活性成分。

本发明的再一目的在于提供本发明的 2',2-双噻唑非核苷类化合物在制备治疗乙型和/或丙型病毒性肝炎的药物中的应用。

本发明的还一目的在于提供一种治疗乙型或丙型病毒性肝炎的方法。

根据本发明的一方面，本发明提供如下通式 I 所示的 2',2-双噻唑非核苷类化合物：



I

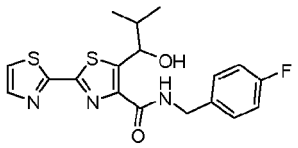
其中，R_1 和 R_2 各自独立地为 H 或 C1~C4 的烷基，并优选 R_1 为 H、甲基或乙基，R_2 为 H；

R_3 为至少一个羟基取代的 C1~C6 的烷基、至少一个 C1~C6 烷氧基取代的 C1~C6 的烷基、至少一个卤素原子取代的 C1~C6 的烷基、C2~C6 的链烯基、至少一个羟基取代的 C2~C6 的链烯基或者至少一个卤素原子取代的 C2~C6 的链烯基，并优选 R_3 为一个或两个羟基取代的 C1~C5 的烷基、一个或两个 C1~C4 烷氧基取代的 C1~C5 的烷基、一个氟、氯或溴原子取代的 C1~C5 的烷基、甲基丙烯基、羟甲基丙烯基或氟甲基丙烯基，最优选为一个或两个羟基取代的含 4 个碳原子的烷基、一个或两个 C1~C4 烷氧基取代的含 4 个碳原子的烷基、含 4 个碳原子的氟代烷基、2-甲基丙烯基、2-羟甲基丙烯基或 2-氟甲基丙烯基；

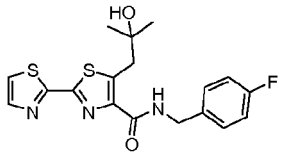
X 为卤素原子，并优选为 F，最优选为 4 位取代的 F。

在本发明中作如下定义，所述的烷基包括直链或支链的烷基，所述的链烯基包括直链或支链的链烯基，所述的卤素包括 F、Cl、Br 和 I。

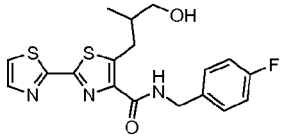
本发明的 2',2-双噻唑非核苷类化合物最优选选自如下化合物之中：



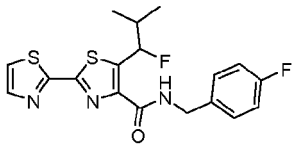
391-1、



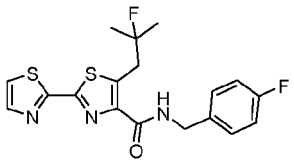
391-2、



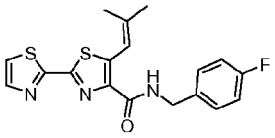
391-3、



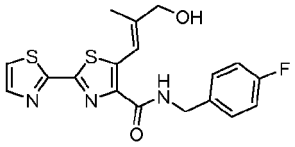
393-1、



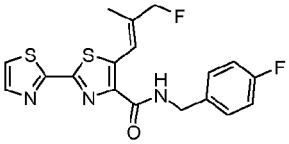
393-2、



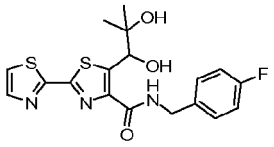
373、



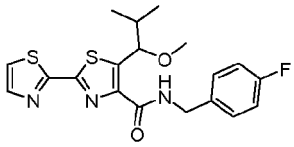
389、



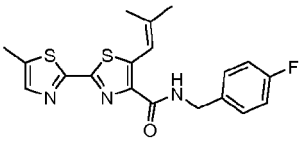
391-F、



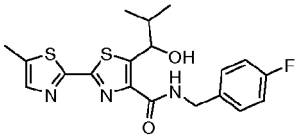
407、



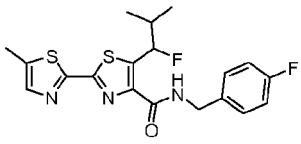
405-1、



Me-373、



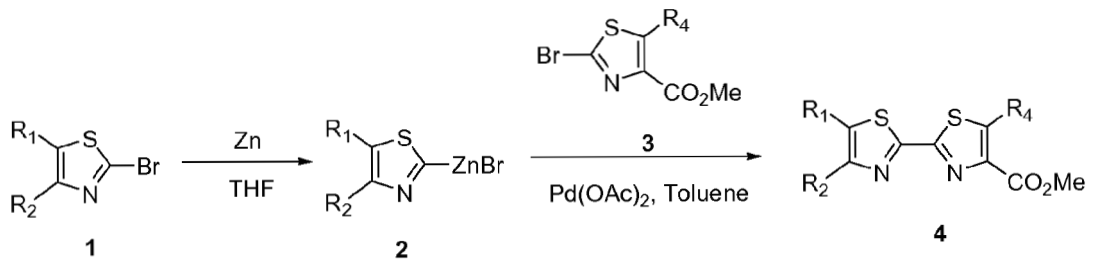
Me-391-1、



Me-393-1

和。

本发明的 2',2-双噻唑非核苷类化合物可以通过中间体 **4** 为原料合成得到，中间体 **4** 的合成可以参照国际申请 PCT/CN2007/001861 (国际公布号 WO 2007/147336)的方法由如下路线来实现***（路线一）***。



路线一

反应式中 R_1 和 R_2 定义如上所述，R_4 为 C1~C6 的烷基。

具体而言，中间体 2-溴代噻唑 **1** 与活化锌粉成锌试剂后，与另一 2-溴代噻唑中间体 **3** 在醋酸钯催化下经 Negishi 偶联反应，得到中间体 2',2-双噻唑甲酸甲酯 **4**。

以中间体 2',2-双噻唑甲酸甲酯 **4** 为原料，在侧链上通过一系列官能团转化，可以制备多种侧链被羟基、烷氧基或卤素原子（如氟原子）取代的中间体 2',2-双噻唑甲酸甲酯 **4a-4i**（以 R_4 为异丁基为例说明，不做具体限制）***(路线二)***。

如 5-异丁基-2',2-双噻唑甲酸甲酯 **4** 于溶剂四氯化碳中与 NBS（*N*-溴代丁二酰亚胺）反应，得到溴代物，该溴代物经硝酸银处理后得羟基取代中间体 **4a**；中间体 **4a 经** DAST (三氟化二乙氨基硫)处理后得到氟代中间体 **4b**。

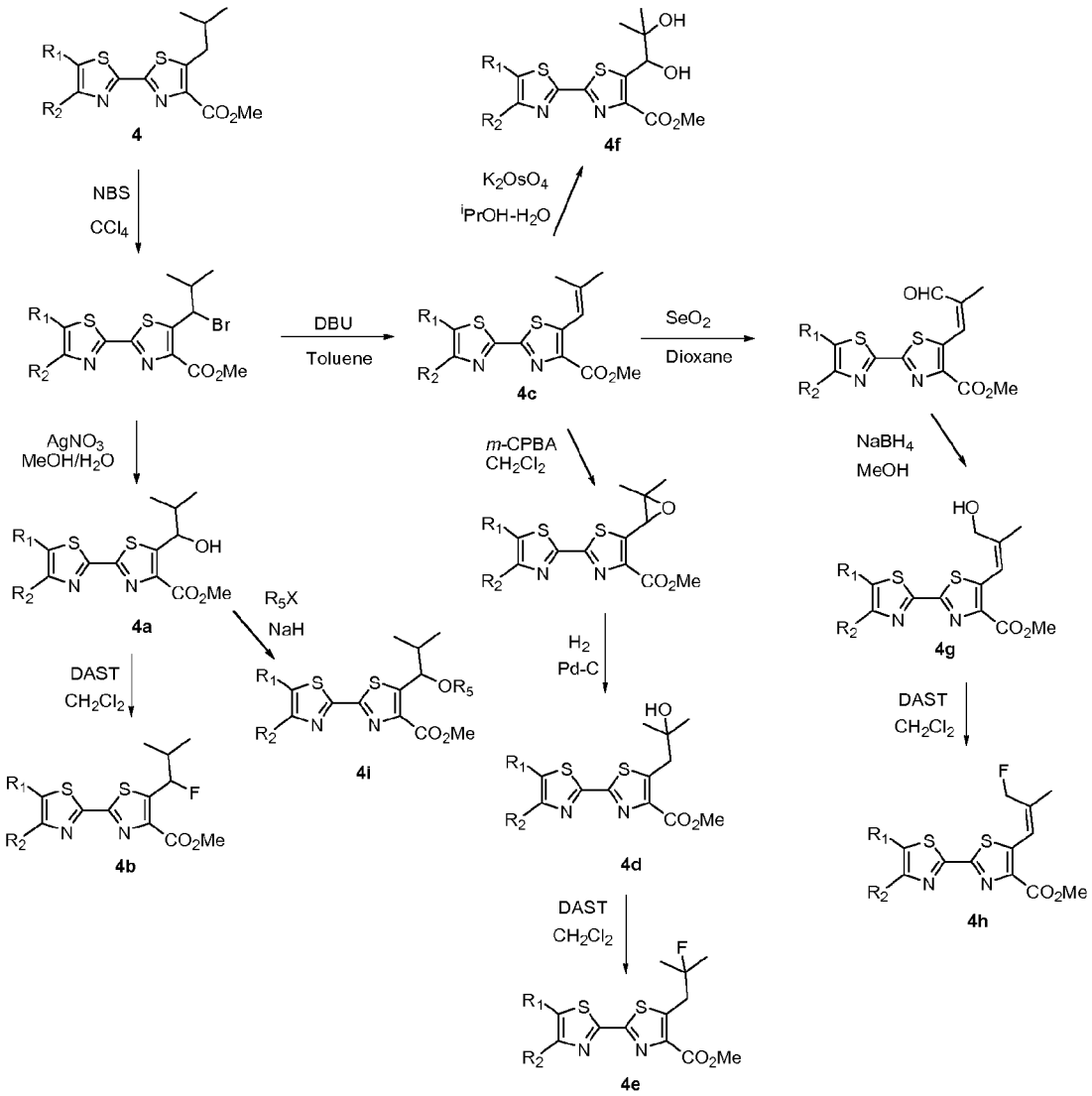
上述溴代物在甲苯中经碱 DBU（1,8-二氮杂环[5,4,0]十一烯-7）处理后，得中间体烯 **4c**；中间体烯 **4c** 在 *m*-CPBA 作用后进一步转化为环氧化合物，该环氧化合物经 Pd-C 氢化选择性打开环氧环，得到羟基取代中间体 **4d**；中间体 **4d 经** DAST 处理后得到氟代中间体 **4e**。

中间体烯 **4c** 在混合溶剂异丙醇/水体系中经锇酸钾催化发生双羟化反应得中间体双羟基化合物 **4f**。

中间体烯 **4c** 还可以于溶剂二氧六环中与二氧化硒反应后得到中间体醛，该中间体醛经硼氢化钠还原后，得到中间体羟基化合物 **4g**；化合物 **4g** 再经 DAST 处理后得到氟代中间体 **4h**。

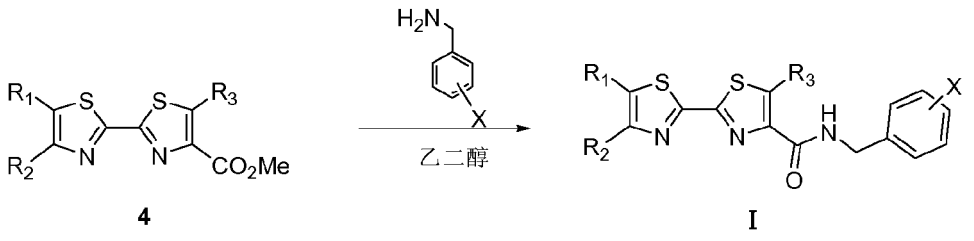
羟基取代中间体 **4a** 还可与卤代烃 R_5X（R_5 为 C1~C6 的烷基）在 NaH 作

用下烷基化，得到烷氧基取代中间体 **4i**。

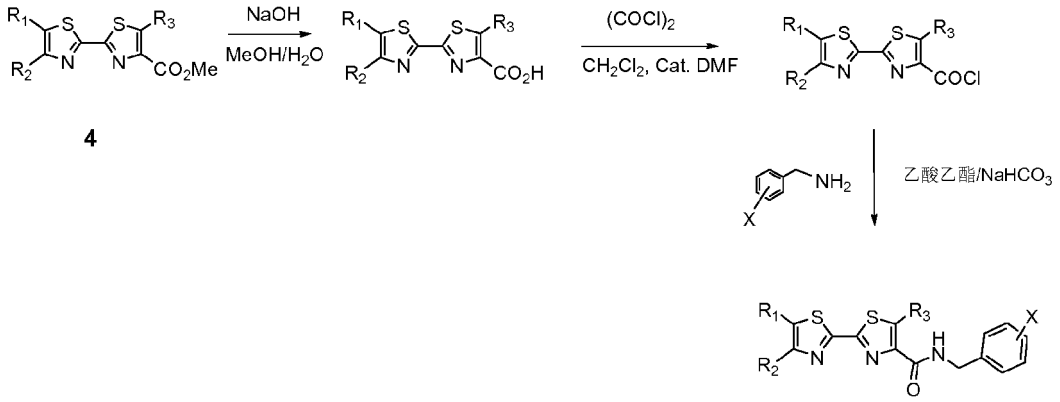


路线二

从中间体 **4** 出发，可以通过以下路线实现本发明所述的 2',2-双噻唑非核苷类化合物的合成（***路线三，路线四和路线五***）：



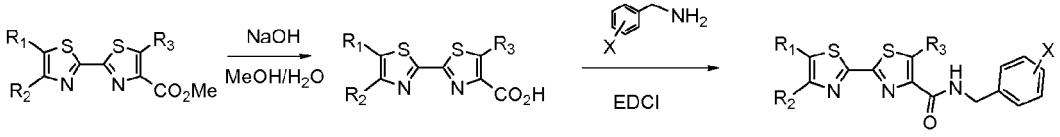
路线三



4

I

路线四



4

I

路线五

其中上述反应式中 R_1、R_2 和 R_3 定义如上所述。

具体而言，中间体 2',2-双噻唑甲酸甲酯 **4** 可以不经水解，直接在溶剂乙二醇和较高温度下，与亲核试剂卤代苄胺反应，得到本发明所述 2',2-双噻唑杂环化合物；

或者，中间体 2',2-双噻唑甲酸甲酯 **4** 也可以水解转化为相应的酸，该酸与草酰氯反应转化为酰氯，酰氯再与卤代苄胺作用得本发明所述 2',2-双噻唑系列杂环化合物；

或者，中间体 2',2-双噻唑甲酸甲酯 **4** 经水解转化为相应的酸，该酸在缩合剂如 EDCI（1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳化二亚胺盐酸盐）存在下与卤代苄胺作用得到本发明所述 2',2-双噻唑系列杂环化合物。

本发明提供的新型的 2',2-双噻唑系列杂环非核苷类化合物同时具有抗乙型肝炎病毒和抗丙型肝炎病毒的活性，可用于治疗乙型肝炎和丙型肝炎，药代学试验显示该类化合物具有良好的生物利用度，可用于制备治疗乙型肝炎和/或丙型肝炎的药物。

本发明提供一种治疗乙型肝炎或丙型肝炎的方法，包括向乙型肝炎或丙型肝炎患者给予治疗有效量的本发明的 2',2-双噻唑非核苷类化合物。

本发明提供一种抗乙型和/或丙型病毒性肝炎的药物组合物，该组合物包含治疗有效量的本发明上述 2',2-双噻唑非核苷类化合物中的一种或多种作为活性成分，并可进一步包含药学上常规的辅剂，例如分散剂、赋形剂、崩解剂、抗氧化剂、甜味剂、包衣剂等。该组合物可以按照药学领域常规的制备方法来制备，并可制成各种常规的剂型，例如片剂、包衣片剂、胶囊、粉剂等。

有益效果

本发明设计与合成了一类新型的 2',2-双噻唑非核苷类化合物，能有效抑制乙肝和丙肝病毒的复制，可用于治疗病毒性乙型肝炎和病毒性丙型肝炎。与发明人之前在国际申请 PCT/CN2007/001861 (国际公布号 WO 2007/147336) 中所公开的类似化合物相比，本发明所提供的新型的 2',2-双噻唑非核苷类化合物在保持了其抗乙型肝炎病毒活性的同时，该类化合物还具有抗丙型肝炎病毒的活性，且由于侧链上双键、羟基、烷氧基以及卤素原子等极性基团的引入，克服了原有化合物生物利用度低的缺陷，显示了更好的开发前景。

具体实施方式

下面结合具体实施例对本发明作进一步阐述，但本发明不局限于这些实施例。

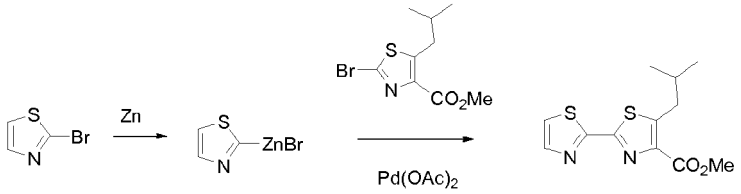
化合物制备实施例

在下述制备实施例中，NMR 用 Varian 生产的 Mercury-Vx 300M 仪器测定，NMR 定标：δ H 7.26 ppm（$CDCl_3$）；质谱用 Agilent 1200 Quadrupole LC/MS

液质联用仪；试剂主要由上海化学试剂公司提供；TLC 薄层层析硅胶板由山东烟台会友硅胶开发有限公司生产，型号 HSGF 254；化合物纯化使用的正相柱层析硅胶为山东青岛海洋化工厂分厂生产，型号 zcx-11，200-300 目。

制备实施例 1　中间体 2',2-双噻唑-4-甲酸甲酯的合成

(1) 5-异丁基-2',2-双噻唑-4-甲酸甲酯

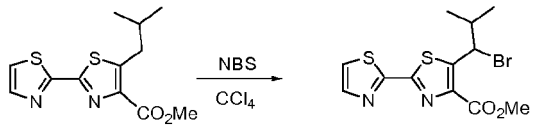


取活化 Zn 粉（84g）加入到 2L 三颈瓶中，加入新鲜 THF（600mL）。加热到内温 60℃左右，开始滴加 2-溴噻唑（200g）的干燥 THF（60mL）溶液，约 3～4h 加完，继续回流反应 1.5h。所得锌试剂转移到一溶有 2-溴-5-异丁基噻唑-4-甲酸甲酯（233g）、醋酸钯（9.4g）和三苯基膦（22g）的干燥甲苯（1.2L）溶液中，加热到 80℃～85℃保温反应 1～1.5h。冷却到室温后，向此反应体系中加入 5% HCl（2L），分出有机相，水相用乙酸乙酯萃取。合并有机相，5% HCl 洗涤，浓缩得到一棕黑色油状物，于甲醇中重结晶得一浅黄色固体（162g），即为 5-异丁基-2',2-双噻唑-4-甲酸甲酯，摩尔收率：69%。

^{1}HNMR($CDCl_3$): δ 1.00(s, 3H), 1.02(s, 3H), 2.03(m, 1H), 3.17-3.19(d, J = 7.2 Hz, 2H), 3.96(s, 3H), 7.46-7.47(d, J = 3.3 Hz, 1H), 7.87-7.88(d, J = 3.3 Hz, 1H)。

ESI-MS (*m/z*): 305.1 $(M+Na)^+$ ($C_{12}H_{14}N_2NaO_2S_2$ 理论值：305.04)。

(2) 5-(1-溴-2-甲基丙基)-2',2-双噻唑-4-甲酸甲酯

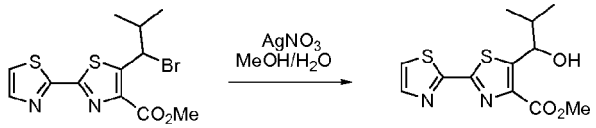


5-异丁基-2',2-双噻唑-4-甲酸甲酯（2.2g）溶于四氯化碳 (60mL) 和二氯

甲烷（20mL）中，加入 NBS (*N*-溴代丁二酰亚胺，1.8g)和 AIBN（偶氮二异丁腈，0.2g）后，加热回流 3h，TLC 检测反应完全，浓缩后所得残余物用乙酸乙酯稀释，用水洗涤有机相，干燥浓缩，所得残余物经硅胶柱层析纯化得一浅黄色固体 5-(1-溴-2-甲基丙基)-2',2-双噻唑-4-甲酸甲酯（2.8g），近定量收率。

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 1.03 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H), 1.23 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H), 2.24 (m, 1H), 3.98 (s, 3H), 6.11 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 7.51 (d, *J* = 3.3 Hz, 1H), 7.90 (d, *J* = 3.3 Hz , 1H)。

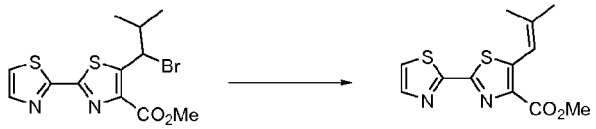
(3) 5-(1-羟基-2-甲基丙基) -2',2-双噻唑-4-甲酸甲酯



5-(1-溴-2-甲基丙基)-2',2-双噻唑-4-甲酸甲酯(235mg) 溶于甲醇（7mL）中，加入水（3mL）和 $AgNO_3$ (435mg)，室温下反应 48h，TLC 检测大部分原料反应完全。反应体系过滤，滤液浓缩后所得残余物用水稀释，乙酸乙酯充分萃取，合并有机相，干燥浓缩后所得粗产物经柱层析分离得一近白色固体 5-(1-羟基-2-甲基丙基)-2',2-双噻唑-4-甲酸甲酯（81mg），摩尔收率：42%。

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 1.00 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H), 1.20 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H), 2.21 (m, 1H), 3.96 (s, 3H), 5.32 (t, *J* = 5.4 Hz ,1H), 7.50 (d, *J* = 3.3 Hz , 1H), 7.90 (d, *J* = 3.3 Hz , 1H)。

(4) 5-[1-(2-甲基丙烯基)]-2',2-双噻唑-4-甲酸甲酯

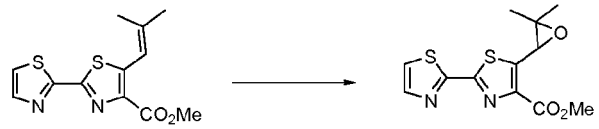


5-(1-溴-2-甲基丙基)-2',2-双噻唑-4-甲酸甲酯（1.2g）溶于甲苯（50mL）中，加入 DBU（1,8-二氮杂环[5,4,0]十一烯-7，1.5g），加热回流反应 3h，TLC 检测反应完全。反应体系用乙酸乙酯稀释后，分别用水、5%盐酸和饱和食盐

水洗涤，干燥浓缩，残余物经硅胶柱层析纯化后得一浅黄色固体 5-[1-(2-甲基丙烯基)]-2',2-双噻唑-4-甲酸甲酯（0.73g），摩尔收率：79%。

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 2.06 (s, 6H), 3.98 (s, 3H), 7.31 (t, J = 1.2 Hz, 1H), 7.47 (d, J = 3.0 Hz, 1H), 7.89 (d, J = 3.3 Hz, 1H)。

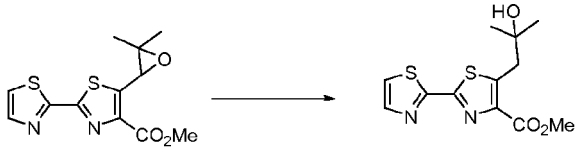
(5) 5-[2-(3,3-二甲基环氧乙烷基)]-2',2-双噻唑-4-甲酸甲酯



5-[1-(2-甲基丙烯基)]-2',2-双噻唑-4-甲酸甲酯（426mg）溶于氯仿（25mL）中，加入 *m*-CPBA（间氯过氧苯甲酸，600mg），室温反应 3h，TLC 检测反应完全。反应体系分别用饱和碳酸氢钠和饱和亚硫酸氢钠水溶液洗涤，分出有机层，干燥浓缩，所得粗产物经硅胶柱层析纯化，得到一白色结晶性粉末 5-[2-(3,3-二甲基环氧乙烷基)]-2',2-双噻唑-4-甲酸甲酯（300mg），摩尔收率：67%。

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 1.23 (s, 3H), 1.56 (s, 3H), 3.99 (s, 3H), 4.42 (s, 1H), 7.48 (d, J = 3.0 Hz, 1H), 7.89 (d, J = 3.3 Hz, 1H)。

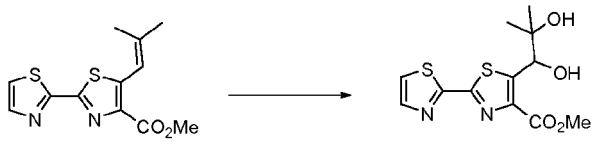
(6) 5-(2-羟基-2-甲基丙基)-2',2-双噻唑-4-甲酸甲酯



5-[2-(3,3-二甲基环氧乙烷基)]-2',2-双噻唑-4-甲酸甲酯（200mg）溶于甲醇（150mL）中，加入催化剂 Pd-C(10%, 10mg)，氢气充分置换后室温反应 5h，TLC 检测反应完全。N_2 置换后，反应体系过滤，滤液浓缩，残余物经硅胶柱层析，得一近白色固体 5-(2-羟基-2-甲基丙基)-2',2-双噻唑-4-甲酸甲酯（200mg），近定量收率。

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 1.34 (s, 6H), 3.51 (s, 2H), 3.97 (s, 3H), 7.47(d, J = 3.0 Hz, 1H), 7.89(d, J = 3.0 Hz, 1H)。

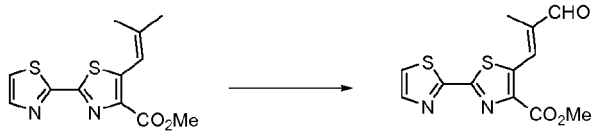
(7) 5-(1,2-二羟基-2-甲基丙基)-2',2-双噻唑-4-甲酸甲酯



5-[1-(2-甲基丙烯基)]-2',2-双噻唑-4-甲酸甲酯（500mg）溶于异丙醇（20mL）和水（15mL）的混合溶剂中，上述反应体系中加入锇酸钾（25mg），*N*-甲基-*N*-氧化吗啉（NMO，50%）（550mg），室温反应过夜，第二天 TLC 检测反应完全。体系用饱和亚硫酸氢钠水溶液淬灭，乙酸乙酯萃取，合并有机相，饱和食盐水洗涤后，干燥过滤浓缩，得一浅棕色油状物 5-(1,2-二羟基-2-甲基丙基)-2',2-双噻唑-4-甲酸甲酯（494mg），摩尔收率：87%。

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 1.21 (s, 3H), 1.53 (s, 3H), 3.89 (s, 3H), 4.32 (s, 1H), 7.49 (d, *J* = 3.0 Hz, 1H), 7.89 (d, *J* = 3.3 Hz, 1H)。

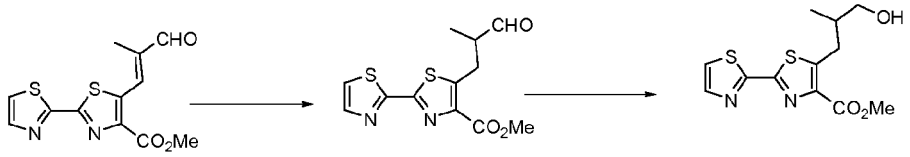
（8）5-[1-(2-甲酰丙烯基)]-2',2-双噻唑-4-甲酸甲酯



5-[1-(2-甲基丙烯基)]-2',2-双噻唑-4-甲酸甲酯（50mg）溶于二氧六环（5mL）中，加入二氧化硒（30mg），回流反应 3h，TLC 检测原料基本反应完全。反应体系浓缩，残余物用二氯甲烷溶解后转移至硅胶柱上（石油醚/乙酸乙酯 = 5/1(按体积比计)洗脱）进行纯化，得一黄色固体 5-[1-(2-甲酰丙烯基)]-2',2-双噻唑-4-甲酸甲酯（31mg），摩尔收率：60%。

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 2.10 (s, 3H), 3.97 (s, 3H), 7.57 (d, *J* = 3.0 Hz, 1H), 7.96 (d, *J* = 3.0 Hz, 1H), 8.49 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H), 9.69(s, 1H)。

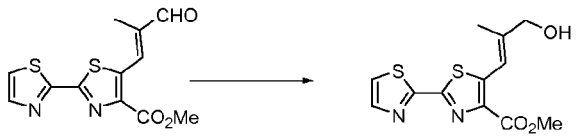
（9）5-(3-羟基-2-甲基丙基) -2',2-双噻唑-4-甲酸甲酯



5-[1-(2-甲酰丙烯基)]-2',2-双噻唑-4-甲酸甲酯（122mg）加入到甲醇（80mL）和 DMF（10mL）的混合溶剂中，加入催化剂 Pd-C(10%, 10mg)，氢气充分置换后室温反应过夜。第二天 TLC 检测反应完全，N_2 置换后，反应体系过滤，滤液浓缩，残余物用乙酸乙酯稀释后，水洗涤三次，饱和食盐水洗涤，干燥过滤浓缩得一近无色油状物 5-(2-甲酰基丙基)-2',2-双噻唑-4-甲酸甲酯（123mg），近定量收率。

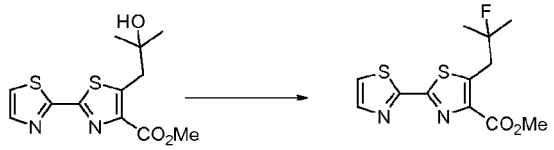
取上步产物（123mg）溶于甲醇（25mL）中，冰浴冷却下加入硼氢化钠（300mg），保温反应 15min 后，移去冰浴，室温反应 3h，TLC 检测反应完全。反应混合物浓缩后，残余物用水稀释，乙酸乙酯充分萃取，合并有机相，饱和食盐水洗涤后，干燥过滤浓缩，得一近无色油状物 5-(3-羟基-2-甲基丙基)-2',2-双噻唑-4-甲酸甲酯（32mg），摩尔收率：26%，不经纯化，直接用于后续反应。

（10）5-[1-(3-羟基-2-甲基丙烯基)]-2',2-双噻唑-4-甲酸甲酯



5-[1-(2-甲酰丙烯基)]-2',2-双噻唑-4-甲酸甲酯（300mg）溶于甲醇（300mL），冰浴冷却下加入硼氢化钠（200mg），保温反应 15min 后，移去冰浴，室温反应 1.5h，TLC 检测反应完全。反应混合物浓缩后，残余物用水稀释，乙酸乙酯充分萃取，合并有机相，饱和食盐水洗涤后，干燥过滤浓缩，得一浅黄色油状物 5-[1-(3-羟基-2-甲基丙烯基)]-2',2-双噻唑-4-甲酸甲酯（198mg），摩尔收率：66%，不经纯化，直接用于后续反应。

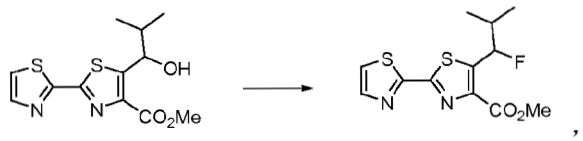
（11）5-(2-氟-2-甲基丙基)-2',2-双噻唑-4-甲酸甲酯



5-(2-羟基-2-甲基丙基)-2',2-双噻唑-4-甲酸甲酯（63mg）溶于二氯甲烷（5mL）中，冰浴冷却下向上述溶液中滴加三氟化二乙氨基硫（DAST，0.1mL），保温反应 1h，TLC 检测基本反应完全。反应用饱和碳酸氢钠水溶液淬灭，乙酸乙酯萃取，合并有机相，干燥过滤浓缩，残余物经硅胶柱层析纯化，得一浅黄色固体 5-(2-氟-2-甲基丙基)-2',2-双噻唑-4-甲酸甲酯（20mg），摩尔收率：33%。

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 1.39 (s, 3H), 1.46 (s, 3H), 3.69-3.77 (d, *J* = 23.1 Hz , 1H), 3.97 (s, 3H), 7.47 (d, *J* = 3.0 Hz, 1H), 7.90 (d, *J* = 3.0 Hz , 1H)。

（12）5-(1-氟-2-甲基丙基)-2',2-双噻唑-4-甲酸甲酯

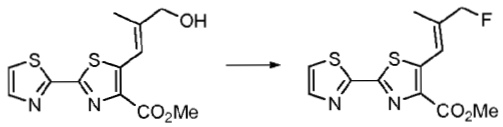


按照制备实施例 1（11）的方法，以 5-(1-羟基-2-甲基丙基)-2',2-双噻唑-4-甲酸甲酯为原料，得到 5-(1-氟-2-甲基丙基)-2',2-双噻唑-4-甲酸甲酯，摩尔收率：42%。

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 1.07 (d, *J* = 6.9 Hz, 6H), 2.24 (m, 1H), 3.99 (s, 3H), 6.21-6.39 (2d, *J* = 5.4, 17.1 Hz, 1H), 7.51 (d, *J* = 3.0 Hz, 1H), 7.92 (d, *J* = 3.3 Hz , 1H)。

ESI-MS (*m/z*): 323.1 $(M+Na)^+$ ($C_{12}H_{13}FN_2NaO_2S_2$，理论值：323.03)。

（13）5-[1-(3-氟-2-甲基丙烯基)]-2',2-双噻唑-4-甲酸甲酯



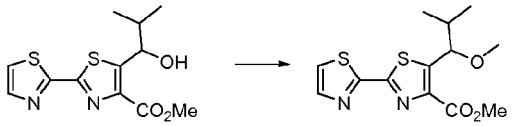
按照制备实施例 1（11）的方法，以 5-[1-(3-羟基-2-甲基丙烯基)]-2',2-双噻唑-4-甲酸甲酯为原料，得到 5-[1-(3-氟-2-甲基丙烯基)]-2',2-双噻唑-4-甲酸甲酯，摩尔收率：83%。

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 2.07 (s, 3H), 2.24 (m, 1H), 3.97 (s, 3H), 4.89-5.05

(d, *J* = 46.8 Hz, 1H), 7.51 (d, *J* = 3.0 Hz, 1H), 7.61 (s, 1H), 7.92 (d, *J* = 3.3 Hz , 1H)。

ESI-MS (*m/z*): 321.0 $(M+Na)^+$ ($C_{12}H_{11}FN_2NaO_2S_2$，理论值：321.01)。

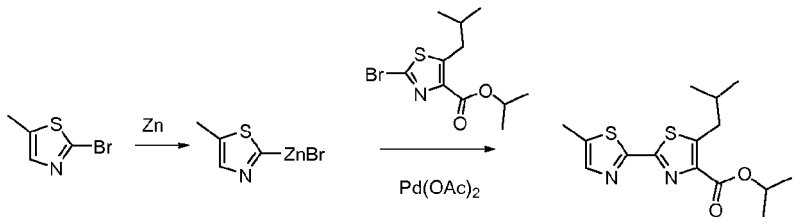
（14）5-(1-甲氧基-2-甲基丙基)-2',2-双噻唑-4-甲酸甲酯



5-(1-羟基-2-甲基丙基)-2',2-双噻唑-4-甲酸甲酯（55mg）和碘甲烷（0.3mL）溶于 DMF（10mL），冰浴冷却下向上述溶液中加入 NaH（60%，50mg），自然升温反应 6h，TLC 检测反应完全。反应体系用饱和氯化铵水溶液淬灭，乙酸乙酯萃取，合并有机相，分别用水和饱和食盐水洗涤。有机相经无水硫酸镁干燥，过滤浓缩，粗产物经硅胶柱层析（石油醚/乙酸乙酯=5/1）后，得无色油状物 5-(1-甲氧基-2-甲基丙基)-2',2-双噻唑-4-甲酸甲酯（52mg），摩尔收率：86%。

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 0.95 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H), 1.02 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H), 2.05 (m, 1H), 3.40 (s, 3H), 3.98 (s, 3H), 5.07 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H), 7.49 (d, *J* = 3.0 Hz , 1H), 7.91 (d, *J* = 3.0 Hz , 1H)。

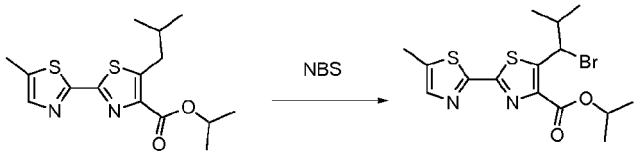
（15）5'-甲基-5-异丁基-2',2-双噻唑-4-甲酸异丙酯



按照制备实施例 1（1）的方法，以 2-溴-5-甲基噻唑和 2-溴-5-异丁基噻唑 4-甲酸异丙酯为原料，得一浅黄色固体 5'-甲基-5-异丁基-2',2-双噻唑-4-甲酸异丙酯，摩尔收率：66%。

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 0.99 (d, *J* = 6.6 Hz, 6H), 1.41 (d, *J* = 6.3 Hz, 6H), 1.98 (m, 1H), 2.53 (s, 3H)，3.10 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H), 5.28 (m, 1H), 7.51 (s, 1H)。

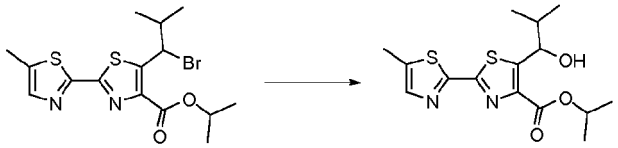
（16）5’-甲基-5-(1-溴-2-甲基丙基)-2’,2-双噻唑-4-甲酸异丙酯



按照制备实施例 1（2）的方法，以 5’-甲基-5-异丁基-2’,2-双噻唑-4-甲酸异丙酯为原料，得一浅黄色油状物 5’-甲基-5-(1-溴-2-甲基丙基)-2’,2-双噻唑-4-甲酸异丙酯，近定量收率，直接用于下步反应。

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 0.92 (d, J = 6.6 Hz, 3H), 1.20 (d, J = 6.6 Hz, 3H), 1.44 (m, 6H), 2.24 (m, 1H), 2.54 (s, 3H)，5.28 (m, 1H), 6.04 (d, J = 6.6 Hz, 3H)，7.54 (s, 1H)。

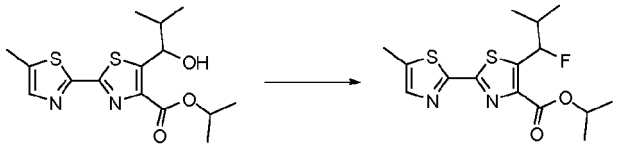
（17）5’-甲基-5-(1-羟基-2-甲基丙基)-2’,2-双噻唑-4-甲酸异丙酯



按照制备实施例 1（3）的方法，以 5’-甲基-5-(1-溴-2-甲基丙基)-2’,2-双噻唑-4-甲酸异丙酯为原料，得一浅黄色固体 5’-甲基-5-(1-羟基-2-甲基丙基)-2’,2-双噻唑-4-甲酸异丙酯，摩尔收率：13%。

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 0.97 (d, J = 6.6 Hz, 3H), 1.05 (d, J = 6.6 Hz, 3H), 1.44 (d, J = 6.3 Hz, 6H), 2.10 (m, 1H), 2.54 (s, 3H)，3.28 (d, J = 5.7 Hz, 1H), 5.26 (m, 1H), 7.53 (s, 1H)。

（18）5’-甲基-5-(1-氟-2-甲基丙基)-2’,2-双噻唑-4-甲酸异丙酯

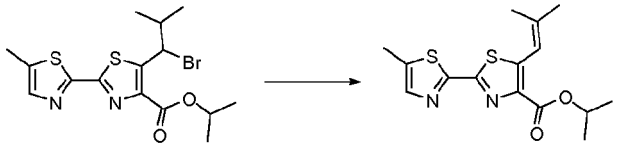


按照制备实施例 1（11）的方法，得一浅黄色固体 5’-甲基-5-(1-氟-2-甲基丙基)-2’,2-双噻唑-4-甲酸异丙酯，定量收率。

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 1.04 (d, J = 6.6 Hz, 6H), 1.25 (m, 6H), 2.20

(m, 1H), 2.55 (s, 3H)，5.28 (m, 1H), 6.15-6.33 (2d, *J* = 5.4, 17.1 Hz, 1H), 7.55 (s, 1H)。

（19）5’-甲基-5-[1-(2-甲基丙烯基)]-2’,2-双噻唑-4-甲酸异丙酯

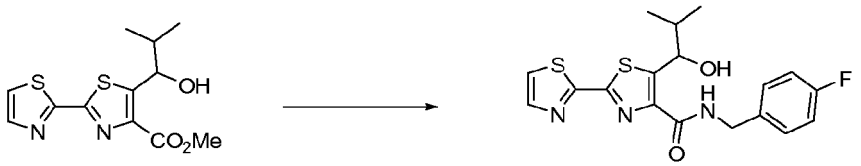


按照制备实施例 1（4）的方法，以 5’-甲基-5-(1-溴-2-甲基丙基)-2’,2-双噻唑-4-甲酸异丙酯为原料，得一黄色固体 5’-甲基-5-[1-(2-甲基丙烯基)]-2’,2-双噻唑-4-甲酸异丙酯，摩尔收率：40%。

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ1.55 (s, 6H), 2.03 (s, 6H), 2.54 (s, 3H)，5.27 (m, 1H), 7.20 (s, 1H)，7.54 (s, 1H)。

制备实施例 2　2’,2-双噻唑非核苷类化合物的合成

（1）*N*-对氟苄基-5-(1-羟基-2-甲基丙基)-2’,2-双噻唑-4-甲酰胺（**391-1**）



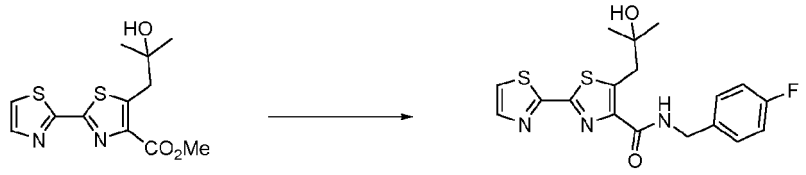
391-1

5-(1-羟基-2-甲基丙基)-2’,2-双噻唑-4-甲酸甲酯（30mg）溶于乙二醇（3mL）中，加入对氟苄胺（125mg），N_2 保护下于 150℃反应过夜，TLC 检测反应完全。反应体系用水稀释后，乙酸乙酯萃取，合并有机相，分别用水、5%盐酸和饱和食盐水洗涤后，干燥浓缩，粗产物进一步经硅胶柱层析纯化，得一浅黄色油状物即为 *N*-对氟苄基-5-(1-羟基-2-甲基丙基)-2’,2-双噻唑-4-甲酰胺（17mg），摩尔收率（50%）。

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 0.93 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H), 1.18 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H), 2.20 (m, 1H), 4.63 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H), 4.89 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 5.65 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.05(m, 2H), 7.34(m, 2H), 7.46(d, *J* = 3.0 Hz, 1H), 7.89(d, *J* = 3.0 Hz,

1H), 7.94(m, 1H)。

（2）*N*-对氟苄基-5-(2-羟基-2-甲基丙基)-2',2-双噻唑-4-甲酰胺（**391-2**）

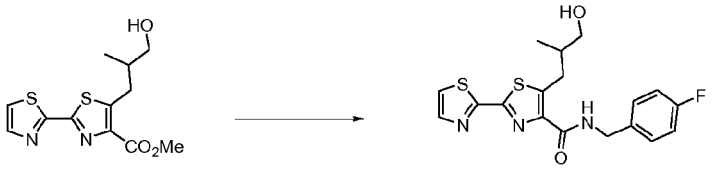


391-2

按照上述制备实施例 2（1）相同的方法，得 *N*-对氟苄基-5-(2-羟基-2-甲基丙基)-2',2-双噻唑-4-甲酰胺为一浅黄色油状物，摩尔收率：55%。

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 1.28 (s, 6H), 3.52 (s, 2H), 3.97 (s, 1H), 4.61 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H), 7.04 (m, 2H), 7.34 (m, 2H), 7.45 (d, *J* = 3.0 Hz, 1H), 7.88(d, *J* = 3.0 Hz, 1H), 7.89(s, 1H)。

（3）*N*-对氟苄基-5-(3-羟基-2-甲基丙基)-2',2-双噻唑-4-甲酰胺（**391-3**）

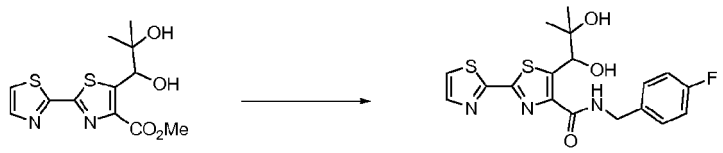


391-3

按照上述制备实施例 2（1）相同的方法，得 *N*-对氟苄基-5-(3-羟基-2-甲基丙基)-2',2-双噻唑-4-甲酰胺为一浅黄色油状物，摩尔收率：16%。

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 1.10 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H), 2.04 (br s, 1H), 3.24 (dd, *J* = 5.4, 14.4 Hz, 2H), 3.34 (m, 1H), 3.54 (m, 1H), 3.71 (dd, *J* = 6.0, 14.1 Hz, 2H), 3.67 (m, 2H), 7.05 (m, 2H), 7.35 (m, 2H), 7.46 (d, *J* = 3.3 Hz, 1H), 7.87 (s, 1H), 7.88(d, *J* = 3.3 Hz, 1H)。

（4）*N*-对氟苄基-5-(1,2-二羟基-2-甲基丙基)-2',2-双噻唑-4-甲酰胺（**407**）

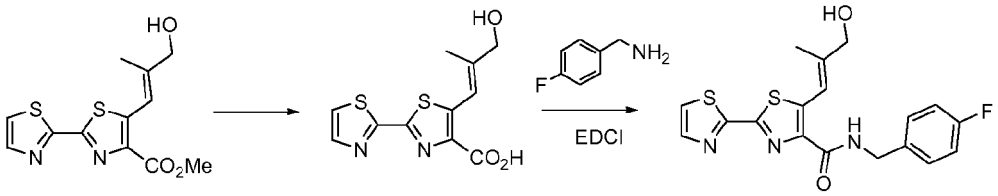


407

按照上述制备实施例 2（1）相同的方法，得 *N*-对氟苄基-5-(1,2-二羟基-2-甲基丙基)-2',2-双噻唑-4-甲酰胺为一浅黄色油状物，摩尔收率：26%。

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 1.32 (s, 6H), 4.61 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H), 5.69 (s, 1H), 7.07 (m, 2H), 7.37 (m, 2H), 7.45 (d, *J* = 3.0 Hz, 1H), 7.89 (d, *J* = 3.0 Hz, 1H), 7.90 (s, 1H)。

（5）*N*-对氟苄基-5-[1-(3-羟基-2-甲基丙烯基)]-2',2-双噻唑-4-甲酰胺（**389**）



389

5-[1-(3-羟基-2-甲基丙烯基)]-2',2-双噻唑-4-甲酸甲酯（120mg）溶于甲醇（20mL）和水（10mL）中，加入一水氢氧化锂（50mg），室温反应过夜。反应完全后，体系减压浓缩除去大部分甲醇，所得水相用 5%盐酸调至酸性，有浑浊出现。水相用二氯甲烷充分萃取，无水硫酸镁干燥，过滤浓缩，得一浅黄色固体 5-[1-(3-羟基-2-甲基丙烯基)]-2',2-双噻唑-4-甲酸（110mg），定量收率，直接用于下步反应。

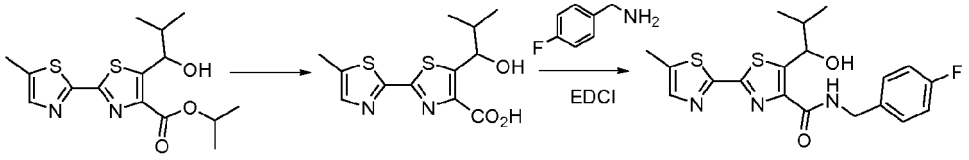
取上步所得 5-[1-(3-羟基-2-甲基丙烯基)]-2',2-双噻唑-4-甲酸（62mg），溶于 DMF（*N,N*-二甲基甲酰胺）（20mL），向此溶液中加入对氟苄胺（140mg）、EDCI（300mg）和对二甲胺基吡啶（DMAP，30mg），室温反应过夜。反应完全后，体系用水稀释，乙酸乙酯充分萃取，所得有机相分别用水、5%盐酸和饱和食盐水洗涤，无水硫酸镁干燥，过滤浓缩，硅胶柱层析（石油醚/丙酮

=4/1 洗脱）得一浅黄色固体 *N*-对氟苄基-5-[1-(3-羟基-2-甲基丙烯基)]-2',2-双噻唑-4-甲酰胺，摩尔收率：32 %。

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 2.05 (s, 3H), 4.28 (s, 2H), 4.62 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H), 7.04 (m, 2H), 7.38 (m, 2H), 7.48 (d, *J* = 3.0 Hz, 1H), 7.83 (m, 1H), 7.89 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H)，7.93 (s, 1H)。

ESI-MS (*m/z*): 412.0 $(M+Na)^+$ ($C_{18}H_{16}FN_3NaO_2S_2$，理论值：412.06)。

（6）*N*-对氟苄基-5'-甲基-5-(1-羟基-2-甲基丙基)-2',2-双噻唑-4-甲酰胺（**Me-391-1**）

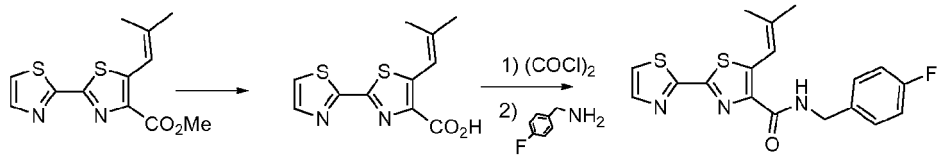


Me-391-1

按照上述制备实施例 2（5）相同的方法，以 5'-甲基-5-(1-羟基-2-甲基丙基)-2',2-双噻唑-4-甲酸异丙酯为原料，经水解、缩合，柱层析（石油醚/丙酮 = 5/1）后得一近无色油状物 *N*-对氟苄基-5'-甲基-5-(1-羟基-2-甲基丙基)-2',2-双噻唑-4-甲酰胺，摩尔收率：43%。

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 0.92 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H), 1.01 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H), 2.17 (m, 1H), 2.53 (s, 3H), 4.62 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H), 4.83 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 5.76 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.05 (m, 2H), 7.35 (m, 2H), 7.54 (s, 1H), 7.89 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H)，7.93 (m, 1H)。

（7）*N*-对氟苄基-5-[1-(2-甲基丙烯基)]-2',2-双噻唑-4-甲酰胺（**373**）



373

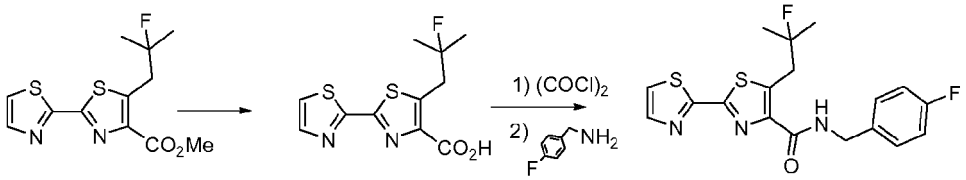
5-[1-(2-甲基丙烯基)]-2',2-双噻唑-4-甲酸甲酯（276mg）溶于甲醇（10mL）中，加入水（10mL）和一水氢氧化锂（100mg），混合物室温反应过夜。第

二天 TLC 检测反应完全，减压下浓缩除去大部分甲醇，所得水相用 5%盐酸调至酸性，二氯甲烷充分萃取，合并有机相，水洗后，干燥过滤浓缩，得 5-[1-(2-甲基丙烯基)]-2',2-双噻唑-4-甲酸为一浅黄色固体（257mg），定量收率，直接进行下步反应。

所得 5-[1-(2-甲基丙烯基)]-2',2-双噻唑-4-甲酸（257mg）溶于二氯甲烷（15mL）中，加入 1 滴 DMF，草酰氯（0.15mL），室温反应 3h，浓缩后得一浅黄色固体。所得固体溶于乙酸乙酯（15mL），并于冰浴冷却下滴加到对氟苄胺（180mg）的乙酸乙酯（15mL）溶液和碳酸氢钠（200mg）水（10mL）混合体系中，自然升至室温反应过夜。第二天 TLC 检测反应完全，分出有机层，水相再用乙酸乙酯萃取，合并有机相，并用 5%盐酸和饱和食盐水洗涤后，干燥过滤浓缩，残余物经硅胶柱层析纯化，得一黄色固体即为 *N*-对氟苄基-5-[1-(2-甲基丙烯基)]-2',2-双噻唑-4-甲酰胺（284mg），二步反应摩尔收率：77%。

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 2.06 (s, 6H), 4.62 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H), 7.04 (m, 2H), 7.37 (m, 2H), 7.45 (d, *J* = 3.0 Hz, 1H), 7.68 (s, 1H), 7.85 (m, 1H), 7.89 (d, *J* = 3.0 Hz, 1H)。

（8）*N*-对氟苄基-5-(2-氟-2-甲基丙基)-2',2-双噻唑-4-甲酰胺（**393-2**）



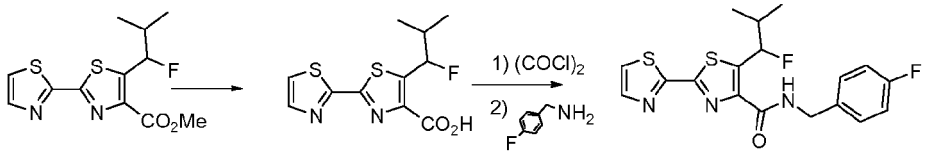
393-2

按照上述制备实施例 2（7）的方法，得 *N*-对氟苄基-5-(2-氟-2-甲基丙基)-2',2-双噻唑-4-甲酰胺为一浅黄色油状物，二步反应近定量收率。

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 1.40 (s, 3H), 1.47 (s, 3H), 3.90 (d, *J* = 24.0 Hz, 2H), 4.60 (d, *J* = 6.6 Hz, 2H), 7.07 (m, 2H), 7.34 (m, 2H), 7.44 (d, *J* = 3.0 Hz, 1H), 7.87 (m, 1H), 7.89 (d, *J* = 3.0 Hz, 1H)。

ESI-MS (*m/z*): 416.1 $(M+Na)^+$ ($C_{18}H_{17}F_2N_3NaOS_2$，理论值：416.07)。

（9）*N*-对氟苄基-5-(1-氟-2-甲基丙基)-2',2-双噻唑-4-甲酰胺（**393-1**）



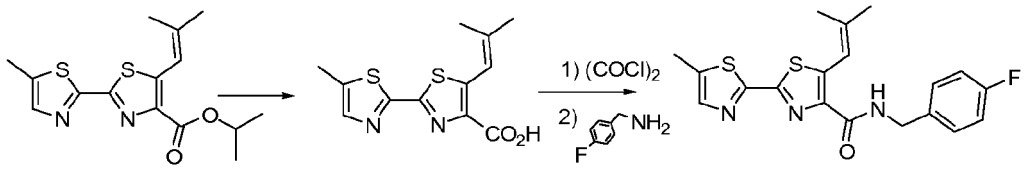
393-1

按照上述制备实施例 2（7）的方法，得 *N*-对氟苄基-5-(1-氟-2-甲基丙基)-2',2-双噻唑-4-甲酰胺为一近无色油状物，定量收率。

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 1.06 (t, *J* = 6.6 Hz, 6H), 2.26 (m, 1H), 4.63 (m, 2H), 6.47-6.65 (2d, *J* = 5.4, 46.5 Hz, 1H), 7.05 (m, 2H), 7.35 (m, 2H), 7.48 (d, *J* = 3.0 Hz, 1H), 7.77 (m, 1H), 7.91 (d, *J* = 3.0 Hz, 1H)。

ESI-MS (*m/z*): 416.1 $(M+Na)^+$ ($C_{18}H_{17}F_2N_3NaOS_2$，理论值：416.07)。

（10）*N*-对氟苄基-5'-甲基-5-[1-(2-甲基丙烯基)]-2',2-双噻唑-4-甲酰胺（**Me-373**）

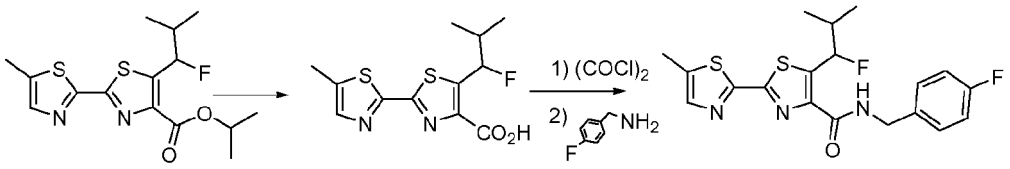


Me-373

按照上述制备实施例 2（7）的方法，得 *N*-对氟苄基-5'-甲基-5-[1-(2-甲基丙烯基)]-2',2-双噻唑-4-甲酰胺为一浅黄色固体，二步反应摩尔收率 93%。

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 2.04 (s, 6H), 2.53 (s, 3H), 4.62 (d, *J* = 6.3 Hz, 2H), 7.04 (m, 2H), 7.35 (m, 2H), 7.53 (s, 1H), 7.66 (s, 1H), 7.84 (m, 1H)。

（11）*N*-对氟苄基-5'-甲基-5-(1-氟-2-甲基丙基)-2',2-双噻唑-4-甲酰胺（**Me-393-1**）

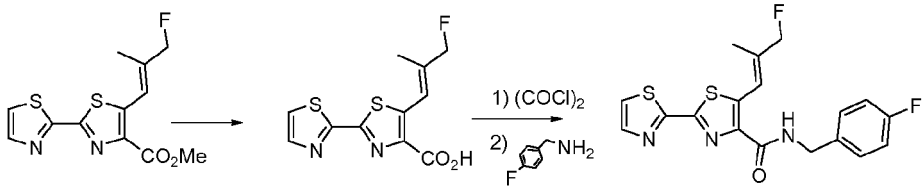


Me-393-1

按照上述制备实施例 2（7）的方法，得 *N*-对氟苄基-5'-甲基-5-(1-氟-2-甲基丙基)-2',2-双噻唑-4-甲酰胺为近无色油状物，二步反应摩尔收率 83%。

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 1.05 (m, 6H), 2.25 (m, 1H), 2.54 (s, 3H), 4.61 (m, 2H), 6.46-6.64 (2d, *J* = 5.4, 46.8 Hz, 1H), 7.05 (m, 2H), 7.33 (m, 2H), 7.55 (s, 1H), 7.76 (m, 1H)。

（12）*N*-对氟苄基-5-[1-(2-氟甲基丙烯基)]-2',2-双噻唑-4-甲酰胺（**391-F**）



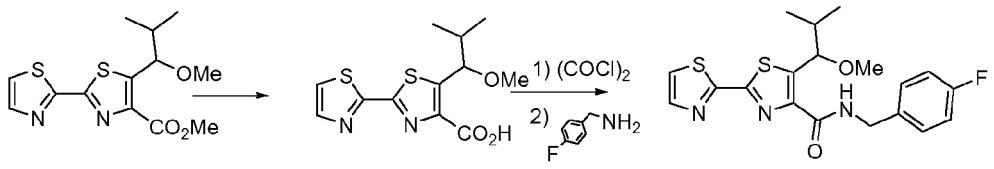
391-F

按照上述制备实施例 2（7）的方法，得 *N*-对氟苄基-5-[1-(2-氟甲基丙烯基)]-2',2-双噻唑-4-甲酰胺为一近白色固体，二步反应摩尔收率 68%。

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 2.09 (s, 3H), 4.63 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H), 4.89 (s, 1H), 5.05 (s, 1H), 7.05 (m, 2H), 7.36 (m, 2H), 7.50 (d, *J* = 3.0 Hz, 1H), 7.88 (m, 1H), 7.92 (d, *J* = 3.0 Hz, 1H), 8.00 (s, 1H)。

ESI-MS (*m/z*): 414.0 $(M+Na)^+$ ($C_{18}H_{15}F_2N_3NaOS_2$，理论值：414.05)。

（13）*N*-对氟苄基-5-(1-甲氧基-2-甲基丙基)-2',2-双噻唑-4-甲酰胺（**405-1**）



405-1

按照上述制备实施例 2（7）的方法，得 *N*-对氟苄基-5-(1-甲氧基-2-甲基丙基)-2',2-双噻唑-4-甲酰胺为一浅黄色固体，二步反应摩尔收率 73%。

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 0.97 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H), 1.02 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H), 2.07 (m, 1H), 3.42 (s, 3H), 4.62 (d, *J* = 6.3 Hz, 2H), 5.36 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H), 7.05 (m, 2H), 7.34 (m, 2H), 7.47 (d, *J* = 3.0 Hz, 1H), 7.79 (m, 1H), 7.90 (d, *J* = 3.3 Hz, 1H)。

抗肝炎病毒试验实施例

抗病毒试验实施例 1　抗乙型肝炎病毒（HBV）活性测试试验

1、试验目的：

在稳定转染了 HBV 全基因组的 HepG2.2.15 细胞中进行样品化合物抗 HBV 活性的测定。包括：样品化合物的细胞毒性（CC_{50}），以及对 HBV-DNA 复制水平（IC_{50}）的影响。

2、试验原理：

稳定转染了 HBV 全基因组的人肝癌细胞 HepG2.2.15 细胞株，在培养时能稳定分泌乙肝病毒颗粒（含 DNA）于培养上清中。在抗病毒药物的干预下，检测细胞分泌到培养上清中病毒 DNA 的含量，参照未加药对照组的含量，可以检测样品药物的抗病毒活性，同时检测样品药物的细胞毒性作用。运用实时荧光定量 PCR 法检测抑制 HBV-DNA 复制量达 50％时所需的浓度(IC_{50})，运用 MTT 法检测样品药物导致 50％细胞毒性所需的浓度（CC_{50}）。

3、实验样品：

临时配成实验所需样品药物浓度（400μM），每个样品药物共做 6 个稀释浓度的试验，并设临床抗乙肝病毒药物拉米夫定（lamivudine）作为试验的阳性对照药，检测每次试验反应的正常与否。

4、实验方法：

a) 实验方法及培养上清收集

将 HepG2.2.15 细胞（5×10^3/孔）接种于 96 孔板中，次日加入样品药物，

经定期更换培养液及同浓度的样品药物，于第八天收集培养上清待测。向 96 孔板中的细胞加 MTT（5mg/ml），4 小时后加 MTT 溶解液（100μl/孔），次日在酶标仪上测 OD_{570}。根据 OD 值计算出样品药物对 HepG2.2.15 细胞的毒性作用，影响细胞生长的状况，导致半数细胞死亡量所需的浓度(CC_{50})。

b) 荧光定量 PCR 法检测培养上清 HBV-DNA 含量

取适量的培养上清加入到等体积的病毒提取液中，混匀后煮沸，然后于室温 10,000rpm 离心 5 分钟，取适量的上清用于 PCR 扩增，同时设置 HBV-DNA 标准样品 4 个，做标准曲线。并根据检测所得的病毒 DNA 复制值，计算出每个样品药物各浓度时对 HBV-DNA 复制的抑制率，然后再进行样品药物半数抑制率计算，获得其（IC_{50}）。

试验用 PCR 引物为：

P1: 5'ATCCTGCTGCTATGCCTCATCTT3'

P2: 5' ACAGTGGGGAAAGCCCTACGAA3'.

试验用 PCR 探针为：

5'TGGCTAGTTTACTAGTGCCATTTTG3'

4、实验结果：

表 1 化合物抗乙型肝炎病毒（HBV）活性测试试验

化合物	IC_{50}(μM)	CC_{50}(μM)	SI
391-1	1.63	34	20.9
391-2	5.4	>100	>18.5
391-3	<0.41	>100	>243.9
393-1	<0.41	>33.3	>81
393-2	0.41~33.3	>33.3	<81
373	0.9	>100	>111.1
389	30.2	>100	>3.3
391-F	12.5	>100	>8
405-1	2.6	>33.3	>12.8
Me-373	1.1	>100	>90.9
Me-391-1	2.9	>33.3	>11.5
Me-393-1	0.2	>100	>500
W28F	2.6	>33.3	>12.8
Lamivudine	<0.16	>5	>32

注：CC_{50}为样品药物对 HepG2.2.15 细胞的生长的影响，半数 50%致死浓度。

IC_{50} 为样品对 HBV-DNA 复制的抑制达半数 50%时的浓度。

SI 为样品生物活性选择系数。SI 值>2 为有效，且越大越好。

5、结果与讨论：

阳性对照拉米夫定（lamivudine）的结果表明本测试方法和试验结果是可靠的。根据上述细胞水平测试结果，本发明所得化合物很好地保持了该类化合物抑制 HBV DNA 复制的生物活性，与 W28F（*N*-对氟苄基-5-异丁基-2',2-双噻唑-4-甲酰胺）的抗 HBV 复制活性基本相当，半数有效抑制常数 IC_{50}介于 0.2~33.3μM 之间。

抗病毒试验实施例 2　抗丙肝病毒（HCV）复制活性的测定

1、实验方法

利用插入了增强型绿色荧光蛋白（EGFP）的 HCV 病毒（J399E）感染 Huh7.5.1 细胞（武汉病毒所惠赠），进行抗 HCV 活性的测定。利用酶标仪检测绿色荧光的变化情况，同时测定细胞毒性，从而判定化合物对 HCV 复制活性的影响。

试验前将待测化合物溶于 DMSO，配制母液，使用时用含有 10%FBS【胎牛血清（fetal bovine serum，FBS）购自 Hyclone 公司（Logan，Utah，USA）】的 DMEM【Dulbecco's Modified Eagle Media，购自 GibcoBRL 公司（Life Technologies，Grand Island，NY，USA）】培养液稀释至所需浓度后使用。细胞培养时 DMSO 终浓度不超过 0.25%（V/V，Volume to Volume），该浓度 DMSO 对细胞生长无影响。

阳性对照药物：利巴韦林（病毒唑，ribavirin，购自 sigma/Aldrich），用 DMSO 配置成母液后，-20℃保存备用，使用前稀释到所需浓度。

Huh7.5.1 细胞（10% FBS，DMEM）以 10^5 个/ml 的浓度加入 96 孔板中

（Costar 3904），每孔 100μl；24 小时后，将培养上清吸出，加入 MOI=0.1 的病毒上清 50μl；8 小时后，加入 50μl 待检测药物，补加 100μl 培养液，培养 72 小时；吸出上清，荧光酶标仪读数（Ex=488nm，Em=516nm）；每孔加入 20μl MTT(5mg/ml)、补 50μl 培养液，4 小时后加入 100μl MTT 溶解液，6 小时后于波长 570nm 下读数。

2、实验结果：

表 2 化合物抗丙型肝炎病毒（HCV）活性测试试验

化合物	IC_{50}(μM)	CC_{50}(μM)	SI
391-1	10.2	48.6	4.8
391-2	21.3	134.3	6.3
391-3	9.9	28.1	2.8
393-1	7.4	40.9	5.5
393-2	1.5	>33.3	>22.2
373	5.7	85	14.9
389	6.6	76.5	11.6
391-F	6.5	84.7	13.0
405-1	3.7	21.4	5.8
Me-373	17.4	66.6	3.8
Me-391-1	3.7	>33.3	>9
Me-393-1	6.6	>100	>15.2
Ribavirin	72.4	>200	>2.8

注： CC_{50} 为样品药物对 Huh7.5.1 细胞的生长的影响，半数 50％致死浓度。
IC_{50} 为样品抑制 HCV 复制达半数 50％时的浓度。
SI 为样品生物活性选择系数。SI 值>2 为有效，且越大越好。

3、结果与讨论

结果显示，上述所选部分代表性化合物体外用药对感染了 HCV 的 Huh7.5.1 细胞中 HCV 病毒复制活性均具有显著抑制作用，其 IC_{50} 在 1.5~21.3μM 之间，所有测试化合物的抗 HCV 活性均优于阳性对照药利巴韦林。

药代动力学实验实施例 3　大鼠体内药动学试验研究

研究方案

灌胃给药：健康 SD 大鼠 3 只，雄性，体重 200 ~ 250 g，给药剂量为 20 mg/kg，给药容积为 10 ml/kg。给药前禁食 12 h，自由饮水，于给药后 0.25、0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、7.0、9.0 和 24 h 经大鼠眼球后静脉丛取静脉血 0.3 ml，置肝素化试管中，3500 rpm 离心 10 min，分离血浆，–20ºC 保存待测。

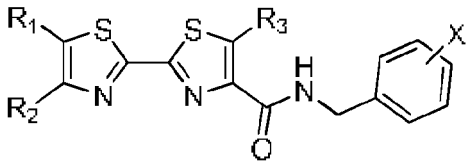
静脉注射：健康 SD 大鼠 3 只，雄性，体重 200 ~ 250 g。给药剂量为 10 mg/kg，给药容积为 5.0 ml/kg。给药前禁食 12 h，自由饮水，于给药后 5 min、15 min、0.5h、1.0h、2.0h、3.0h、4.0h、5.0h、7.0h、9.0h 和 24 h 经大鼠眼球后静脉丛取静脉血 0.3 ml，置肝素化试管中，3500 rpm 离心 10 min，分离血浆，–20ºC 保存待测。

研究结果

剂量标准化后，按 AUC_{0-t} 计，**W28F**（10 mg/kg）的口服生物利用度平均值为 2.80%；同样条件下，化合物 **373**（20 mg/kg）的口服生物利用度平均值为 6.9%，化合物 **391-2**（20 mg/kg）的口服生物利用度平均值为 76.5%，均优于侧链未取代化合物 **W28F**。

权 利 要 求

1、一种如下通式 I 所示的 2',2-双噻唑非核苷类化合物：



I

其中，R_1 和 R_2 各自独立地为 H 或 C1~C4 的烷基；

R_3 为至少一个羟基取代的 C1~C6 的烷基、至少一个 C1~C6 烷氧基取代的 C1~C6 的烷基、至少一个卤素原子取代的 C1~C6 的烷基、C2~C6 的链烯基、至少一个羟基取代的 C2~C6 的链烯基或者至少一个卤素原子取代的 C2~C6 的链烯基；

X 为卤素原子。

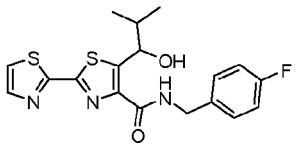
2、根据权利要求 1 所述的 2',2-双噻唑非核苷类化合物，其特征是，所述 R_1 为 H、甲基或乙基，R_2 为 H。

3、根据权利要求 1 或 2 所述的 2',2-双噻唑非核苷类化合物，其特征是，所述 R_3 为一个或两个羟基取代的 C1~C5 的烷基、一个或两个 C1~C4 烷氧基取代的 C1~C5 的烷基、一个氟、氯或溴原子取代的 C1~C5 的烷基、甲基丙烯基、羟甲基丙烯基或氟甲基丙烯基。

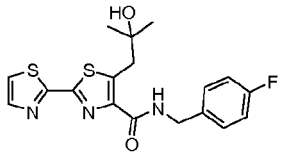
4、根据权利要求 1-3 中任一项所述的 2',2-双噻唑非核苷类化合物，其特征是，所述 R_3 为一个或两个羟基取代的含 4 个碳原子的烷基、一个或两个 C1~C4 烷氧基取代的含 4 个碳原子的烷基、含 4 个碳原子的氟代烷基、2-甲基丙烯基、2-羟甲基丙烯基或 2-氟甲基丙烯基。

5、根据权利要求 1-4 中任一项所述的 2',2-双噻唑非核苷类化合物，其特征是，所述 X 为 F，优选为 4 位取代的 F。

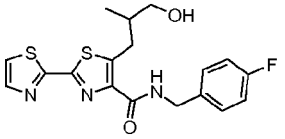
6、根据权利要求 1-5 中任一项所述的 2',2-双噻唑非核苷类化合物，其特征是，所述 2',2-双噻唑非核苷类化合物选自如下化合物之中：



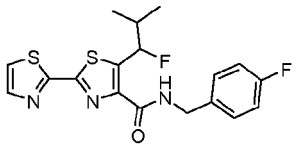
391-1、



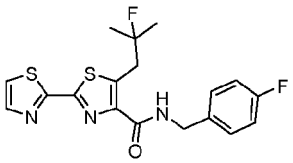
391-2、



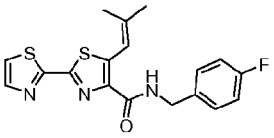
391-3、



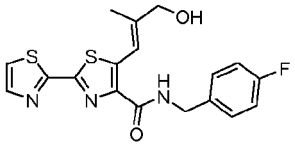
393-1、



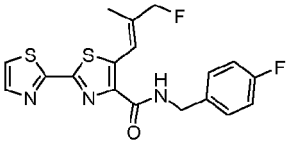
393-2、



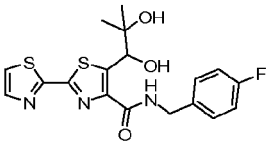
373、



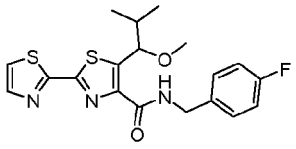
389、



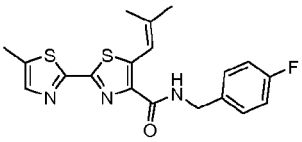
391-F、



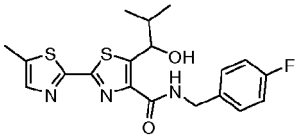
407、



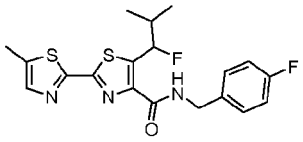
405-1、



Me-373、



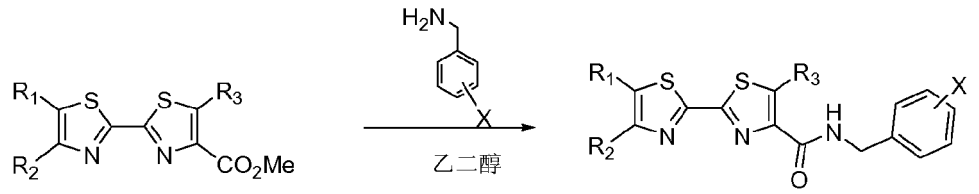
Me-391-1、



和 Me-393-1。

7、一种如权利要求 1-6 中任一项所述的 2',2-双噻唑非核苷类化合物的制备方法，按如下路线三、路线四或路线五制备：

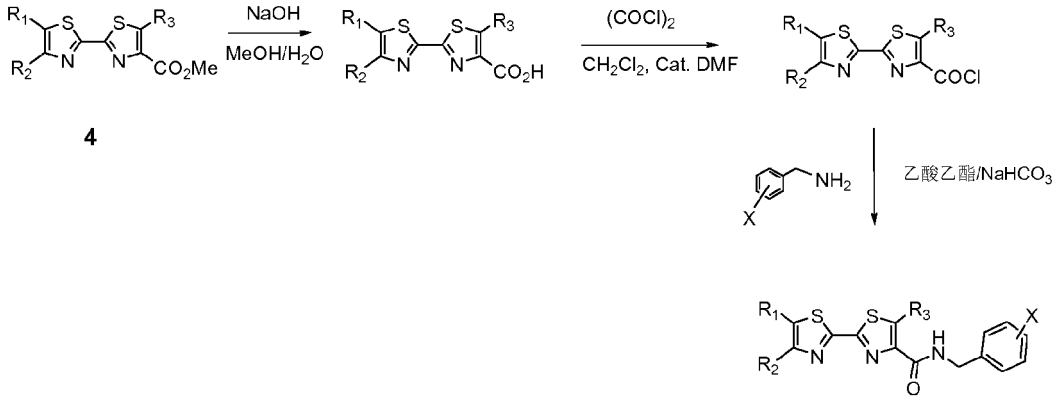
路线三



4 I

2',2-双噻唑甲酸甲酯 **4** 在溶剂乙二醇和较高温度下，与亲核试剂卤代苄胺反应，得到 2',2-双噻唑非核苷类化合物；

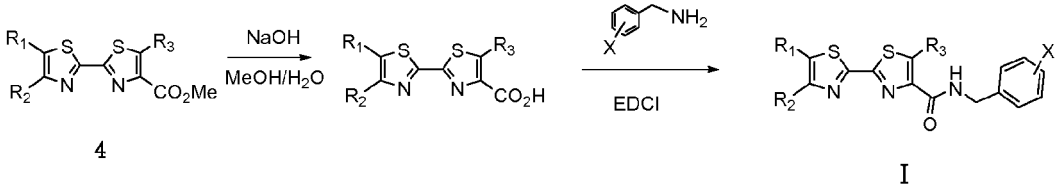
或者，路线四



4 I

2',2-双噻唑甲酸甲酯 **4** 水解转化为相应的酸，该酸与草酰氯反应转化为酰氯，而后该酰氯与卤代苄胺反应，得到 2',2-双噻唑非核苷类化合物；

或者，路线五



4 I

2',2-双噻唑甲酸甲酯 **4** 经水解转化为相应的酸，该酸在缩合剂 EDCI（1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳化二亚胺盐酸盐）存在下与卤代苄胺反应，得到 2',2-双噻唑非核苷类化合物；

其中上述反应式中 R_1、R_2、R_3 和 X 定义与所引用的权利要求中的定义相同。

8、一种抗乙型和/或丙型病毒性肝炎的药物组合物，该组合物包含治疗有效量的如权利要求 1-6 中任一项所述的 2',2-双噻唑非核苷类化合物中的一种或多种作为活性成分，并可进一步包含药学上常规的辅剂。

9、如权利要求 1-6 中任一项所述的 2',2-双噻唑非核苷类化合物在制备治疗乙型肝炎和/或丙型肝炎的药物中的用途。

10、一种治疗乙型肝炎或丙型肝炎的方法，包括向乙型肝炎或丙型肝炎患者给予治疗有效量的如权利要求 1-6 中任一项所述的 2',2-双噻唑非核苷类化合物。