

吗啉核苷类似物及其磺胺衍生物的合成及初步抗牛病毒性腹泻病毒(BVDV)活性研究

华迎春^{a,b} 贺斌^{a,b} 秦之焱^{a,b} 王松^{a,b}
刘慧萍^{a,b} 刘丰五^{*,a,b}

(^a 郑州大学药学院 郑州 450001)

(^b 新药创制与安全性评价河南省协同创新中心 郑州 450001)

摘要 以核糖核苷为原料, 通过糖环的结构转化合成了系列吗啉核苷类似物, 再与磺胺类药物的母核偶联得到吗啉核苷磺胺衍生物. 所得化合物均经 HRMS、¹H NMR 和 ¹³C NMR 谱分析确证. 以牛病毒性腹泻病毒(BVDV)感染的牛肾细胞为模型对目标化合物抗病毒活性进行筛选, 结果显示此类化合物无明显抗病毒活性.

关键词 核苷类似物; 吗啉核苷; 磺胺类衍生物; 抗 BVDV 活性

Synthesis and Preliminary Anti-bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV) Activity Evaluation of Morpholine Nucleoside Analogues and Their Sulfonamide Derivatives

Hua, Yingchun^{a,b} He, Bin^{a,b} Qin, Zhiyan^{a,b} Wang, Song^{a,b}
Liu, Huiping^{a,b} Liu, Fengwu^{*,a,b}

(^a School of Pharmaceutical Sciences, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001)

(^b Collaborative Innovation Center of Henan New Drug Research and Safety Evaluation, Zhengzhou 450001)

Abstract A series of morpholine nucleoside analogues were synthesized starting from ribonucleosides, and then the morpholine nucleoside sulfonamide derivatives were obtained by treated with *N*-acetylsulfanilyl chloride. The obtained compounds were confirmed by HRMS, ¹H NMR and ¹³C NMR spectral analysis. The bovine kidney cells infected with bovine viral diarrhea virus (BVDV) were used as models to screen the antiviral activity of the target compounds. But the results did not show desired potent antiviral activity.

Keywords nucleoside analogue; morpholine nucleoside; sulfonamides derivative; anti-BVDV activity

随着现代社会生活节奏的加快, 癌症、病毒性疾病时刻威胁着人类的健康, 研制高效、低毒、低耐药性的药物成为当今医药领域科研人员刻不容缓的使命. 核苷类药物目前用于治疗多种病毒性感染疾病如乙肝病毒(HBV)、丙肝病毒(HCV)和艾滋病病毒(HIV)等, 一些核苷也用于治疗肿瘤^[1,2]. 磺胺类药物是以对氨基苯磺酰胺(简称磺胺)为基本结构的衍生物的总称^[3,4], 是应用最早的一类化学合成抗菌药物. 随着人们对磺胺类药物的深入研究, 发现修饰磺胺母体的磺酰胺基、苯胺基可以

改善磺胺类药物的理化性质, 增强其潜在生物活性, 同时还可赋予其一些新的生物功能. 其中含氮杂环尤其是嘧啶环修饰的磺胺类药物显示出卓越的药用价值. 例如治疗敏感脑膜炎奈瑟菌导致的脑膜炎的磺胺嘧啶(Sulfadiazine)、磺胺地索辛(Sulfadimethoxypyrimidine)(图1); 以及将碱基(尿嘧啶)连上磺胺基团得到的新型衍生物A(图1), 对流感病毒等具有显著抑制作用, 且毒副作用小^[5].

* Corresponding author. E-mail: fwliu@zzu.edu.cn

Received December 8, 2017; revised January 10, 2018; published online January 26, 2018.

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 21372207).

国家自然科学基金(No. 21372207)资助项目.

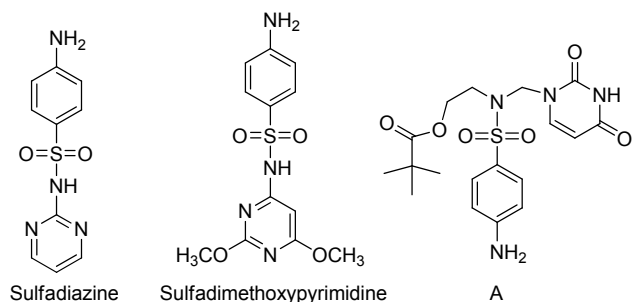


图1 磺胺类药物结构式
Figure 1 Structures of Sulfa drugs

传统核苷糖环修饰或改造是开发新型高效低毒核苷的有效方法之一。通过六元吗啉环取代核糖核苷的五元糖环可得到六元环吗啉核苷。进一步利用吗啉环中氨基,对磺胺类化合物的苯磺酰基进行取代,将两个活性药效团拼接可合成新型吗啉核苷磺胺衍生物。

本工作以核苷为原料,通过氧化、氨化及还原首先得到系列吗啉核苷,再以吗啉环的氮原子和对乙酰氨基苯磺酰氯发生取代反应合成了新型吗啉核苷磺胺衍生物。测定了目标化合物的体外抗牛病毒性腹泻病毒(BVDV)病毒活性。进一步抗病毒活性筛选正在进行中。

1 结果与讨论

1.1 吗啉核苷类似物的合成

根据文献[6~11]报道,设计了一条简洁合理的吗啉核苷类似物合成方法:经过高碘酸钠氧化、硼酸铵氨化、氰基硼氢化钠还原,得到目标化合物。以尿苷为起始物,通过薄层层析法检测对三步反应条件进行了优化。

氧化开环反应条件优化见表1。(1)溶剂的选择:考虑到原料及 NaIO_4 的溶解性,初步选择丙酮/水、二氯甲烷/甲醇、四氢呋喃、甲醇为溶剂进行筛选,发现保持温度(室温)不变、高碘酸钠用量(1.1 equiv.)相同时,用甲醇作溶剂时,反应时间短且反应完全(Entry 4),因此选择甲醇为最佳溶剂。(2)温度的选择:实验发现温度升至50℃时,反应时间明显缩短(Entry 6),温度升高至70℃时,有杂质产生(Entry 7),因此选择50℃为最佳反应温度。

氨化反应条件优化见表2,初步探索氨化反应时发现,中间体 $3a$ 可能不稳定导致体系复杂,为减少副反应,选择室温(25℃)条件下,优化硼酸铵用量。当硼酸铵为1 equiv.时,上一步的氧化产物反应不完全,增加用量至1.5 equiv.,氧化产物反应完全,且反应时间有所缩短(Entry 2),继续增加至2 equiv.时,反应速度无明显变化,因此为避免原料浪费,选择1.5 equiv.为硼酸铵的最佳用量。

表1 氧化反应条件优化

Table 1 Screening for oxidation reaction conditions

Entry	Solvent	$\text{NaIO}_4/\text{equiv.}$	Temp./℃	Time/h	Phenomenon
1	Acetone/ H_2O	1.1	25	24	体系复杂
2	DCM/ CH_3OH	1.1	25	6	反应较少
3	THF	1.1	25	4	体系复杂
4	CH_3OH	1.1	25	6	反应完全
5	CH_3OH	1.1	40	5	反应完全
6	CH_3OH	1.1	50	2	反应完全
7	CH_3OH	1.1	70	1.5	体系复杂

表2 氨化反应条件优化

Table 2 Screening for amination reaction conditions

Entry	$(\text{NH}_4)_2\text{B}_4\text{O}_7/\text{equiv.}$	Time/h	Phenomenon
1	1.0	5	反应不完全
2	1.5	3	反应完全
3	2.0	3	反应完全

还原反应条件优化见表3,室温条件下,优化氰基硼氢化钠用量。实验发现氰基硼氢化钠用量为3.5 equiv.时,氨化产物反应完全,反应时间缩短(Entry 4)。继续增加至4 equiv.,杂质增多。

表3 还原反应条件优化

Table 3 Screening for reduction reaction conditions

Entry	$\text{NaCNBH}_3/\text{equiv.}$	Time/h	Phenomenon
1	2.0	5	反应不完全
2	2.5	5	反应不完全
3	3.0	5	反应不完全
4	3.5	3	反应完全
5	4.0	3	反应完全

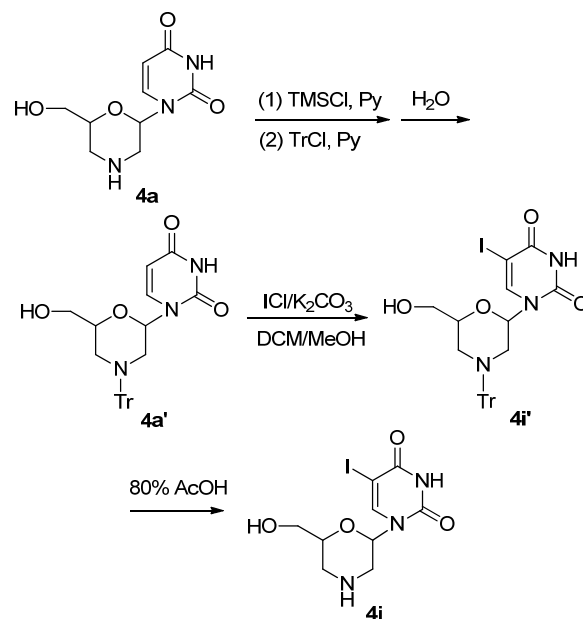
因此确定最佳反应条件:甲醇为溶剂;投料物质的量比为核苷: NaIO_4 : $(\text{NH}_4)_2\text{B}_4\text{O}_7$: NaCNBH_3 =1:1.1:1.5:3.5;氧化开环反应温度为50℃,氨化反应和还原反应的温度为室温。在此反应条件下,反应时间短且杂质较少,收率较高。以此最佳条件,采用不同的起始核苷合成了一系列吗啉核苷类似物 $4a\sim 4h$ (表4)。

但是由表4可见,以相同方法合成5-碘-尿嘧啶吗啉核苷时只有少量5-碘-尿嘧啶吗啉核苷产物(表4, Entry 9),而有大量副产物 $4a$ 生成。推测是由于反应过程中,氰基硼氢化钠同时会还原5位I。为避免此副反应的发生,拟采用最后碘代的方法制备。因此,以 $4a$ 为原料,对其碱基的5位用碘取代。合成路线如Scheme 1。

为避免吗啉环氨基对反应造成干扰,首先选择性保护氨基。以吡啶(Py)作为溶剂,用三甲基氯硅烷(TMSCl)对6'-OH进行临时保护,再加入三苯基氯甲烷保护3'-NH。在碘代^[12]时,选择氯化碘(ICI)作为碘代试剂^[13],碳酸钾(K_2CO_3)提供碱性环境,最后以80%冰醋酸(体积分数)水溶液脱去保护基,得到最终产物 $4i$,此路线五步反应最终的总产率为65%。

表 4 吗啉核苷类似物的合成收率
Table 4 Yields of morpholine nucleoside analogues

Entry	B	Product	Yield/%
1		4a	75
2		4b	80
3		4c	76
4		4d	67
5		4e	59
6		4f	56
7		4g	45
8		4h	52
9		4i	12



图式 1 5-碘-尿嘧啶吗啉核苷的合成

Scheme 1 Synthesis of 5-iodo-uridine-morpholine nucleosides

1.2 基于吗啉核苷的磺胺衍生物的合成

1.2.1 3'-对乙酰氨基苯磺酰基-吗啉核苷的合成

对乙酰胺基苯磺酰氯作为磺酰化试剂, 利用吗啉环上胺基和 6'位羟甲基亲核性的不同, 控制反应试剂的比例和反应温度, 使吗啉杂环氮原子与磺胺母核链接, 得到吗啉核苷类磺胺衍生物. 以吡啶作为溶剂和缚酸剂, 吗啉核苷在低温下(−20 °C)与对乙酰胺基苯磺酰氯反应过夜, 得到目标化合物 **5**(表 5).

1.2.2 6'-氨基-3'-对乙酰胺基苯磺酰基吗啉核苷的合成

为了比较 6'位取代基对此类磺胺类衍生物的生物活性的影响, 将 6'-CH₂OH 转化为 6'-CH₂NH₂^[14-16]. 因此分别以合成的吗啉核苷 **4a** 和 **4b** 为原料, 室温条件下, 直接用对乙酰胺基苯磺酰氯进行磺酰化反应, 得到 6'-羟甲基及吗啉环胺基双磺酰化产物 **6a**, **6b**; 利用磺酸酯基团较强的离去能力, 以叠氮基进行取代, 得到 6'-叠氮甲基化合物 **7a**, **7b**; 经过还原^[17-21]得到 6'-氨基甲基取代的吗啉核苷磺胺衍生物 **8a** 和 **8b** (Scheme 2).

1.3 目标化合物的体外抗病毒活性初步研究

采用噻唑蓝(MTT)法, 测定部分目标化合物的体外抗 BVDV 病毒活性, 以利巴韦林为阳性对照, 作用时间 4 d. 结果表明, 所合成的大部分吗啉核苷及其磺胺衍生物无明显抗 BVDV 病毒活性(EC₅₀ 均大于 100 μmol/L), 只有 2-氨基腺嘌呤吗啉核苷 **4g** (EC₅₀=12.5 μmol/L)及其磺酰化衍生物 **5g** (EC₅₀=50 μmol/L)显示出微弱的抗病毒活性, 并且磺酰化使母体核苷抗病毒活性降低.

表 5 4'-对乙酰氨基苯磺酰基-吗啉核苷的合成收率

Table 5 Yields of 4'-(*N*-acetylsulfamyl)morpholine nucleosides

Entry	B	Product	Yield/%
1		5a	75
2		5b	65
3		5c	72
4		5e	53
5		5g	50
6		5h	52

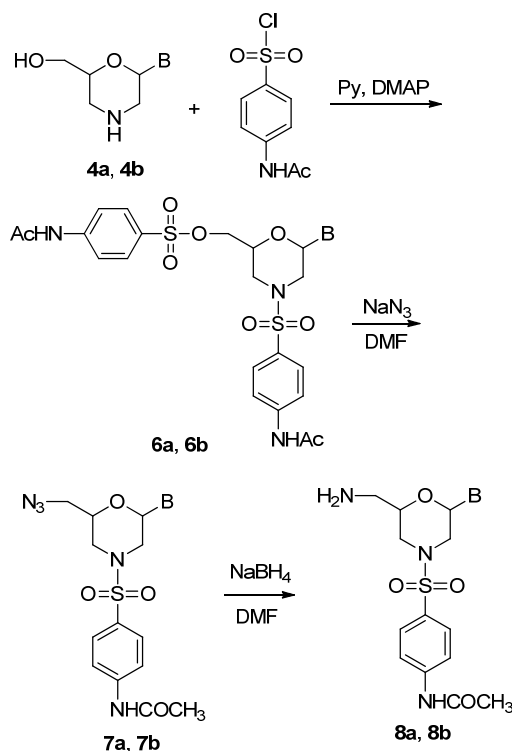
2 结论

以核苷为原料,合成了一系列吗啉核苷类化合物;并以所合成的吗啉核苷为原料,制备了一系列吗啉核苷类磺胺衍生物,所有化合物均经过 ^1H NMR 和 ^{13}C NMR 和 HRMS 确证. 所合成化合物体外抗 BVDV 病毒活性较弱. 进一步的抗病毒活性筛选正在进行中.

3 实验部分

3.1 仪器与试剂

^1H NMR 和 ^{13}C NMR 谱使用瑞典 Bruker 公司



图式 2 6'-氨基甲基-4'-对乙酰氨基苯磺酰基-吗啉核苷的合成

Scheme 2 Synthesis of 6'-aminomethyl-4'-(*N*-acetylsulfamyl)morpholine nucleosides

AVANCE III-400 型超导核磁共振仪测定, TMS 为内标;高分辨质谱使用美国 Waters-Micromass 公司 Q-TofMicro 高分辨四极杆-飞行时间串联质谱仪测定.

3.2 实验方法

3.2.1 目标化合物 4a~4h 的合成

将 1 g 尿嘧啶核糖核苷(**1a**)溶于 50 mL 甲醇中,加入 963 mg (1.1 equiv.)高碘酸钠, 50 °C 搅拌 2 h, 薄层色谱(TLC)监测反应. 反应完全后, 降至室温, 过滤白色不溶物. 加入硼酸铵 1 g (1.5 equiv.), 室温搅拌 3 h, TLC 监测反应, 反应完全后滤去不溶物. 分批加入氰基硼氢化钠 900 mg (3.5 equiv.)时, 室温搅拌 5 h, TLC 监测反应. 反应完全后, 浓缩反应液, 硅胶柱层析分离[*V*(二氯甲烷):*V*(甲醇)=5:1]得到 697 mg 白色固体 1-[6-(羟甲基)吗啉-2-基]嘧啶-2,4(1*H*,3*H*)-二酮(**4a**), 产率 75%. m.p. 240~242 °C; ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 11.37 (s, 1H), 7.68 (d, $J=8.1$ Hz, 1H), 5.61 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 5.52 (dd, $J=10.0, 2.5$ Hz, 1H), 4.72 (s, 1H), 3.71~3.54 (m, 1H), 2.83 (dd, $J=12.2, 2.3$ Hz, 1H), 2.76 (dd, $J=12.6, 1.8$ Hz, 1H), 2.58 (dd, $J=12.1, 10.3$ Hz, 1H), 2.37 (dd, $J=12.5, 10.9$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 162.8, 150.50, 140.9, 101.4, 79.7, 78.9, 62.0, 48.1, 45.9;

HRMS calcd for $C_9H_{14}N_3O_4$ $[M+H]^+$ 228.0979, found 228.0982.

化合物 **4b**~**4h** 的制备方法及投料比同化合物 **4a**.

1-[6-(羟甲基)吗啉-2-基]-1*H*-1,2,4-三唑-3-甲酰胺 (**4b**): 淡黄色固体粉末, 产率 80%. m.p. 179~182 °C; 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 8.85 (s, 1H), 7.84 (s, 1H), 7.61 (s, 1H), 5.60 (dd, $J=9.1, 3.2$ Hz, 1H), 4.76 (t, $J=5.7$ Hz, 1H), 3.72 (dd, $J=5.1, 3.2$ Hz, 1H), 3.39 (dd, $J=11.9, 5.9$ Hz, 2H), 3.04 (dd, $J=17.9, 8.1$ Hz, 2H), 2.84 (d, $J=11.1$ Hz, 2H), 2.46~2.37 (m, 1H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ : 160.3, 156.8, 144.8, 124.4, 83.8, 78.5, 61.9, 48.2, 46.3; HRMS calcd for $C_8H_{14}N_3O_3$ $[M+H]^+$ 228.1091, found 228.1095.

1-[6-(羟甲基)吗啉-2-基]-5-甲基嘧啶-2,4(1*H*,3*H*)-二酮(**4c**): 黄色粉末, 产率 76%. m.p. 197~199 °C; 1H NMR (400 MHz, DMSO) δ : 7.55 (s, 1H), 5.53 (d, $J=8.5$ Hz, 1H), 3.64 (d, $J=4.9$ Hz, 1H), 3.40 (dd, $J=11.4, 7.7$ Hz, 2H), 2.78 (t, $J=10.5$ Hz, 2H), 2.68~2.60 (m, 1H), 2.44~2.33 (m, 1H), 1.89 (s, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ : 163.6, 150.1, 136.5, 109.2, 79.6, 78.9, 62.1, 47.9, 46.0, 11.9; HRMS calcd for $C_{10}H_{16}N_3O_4$ $[M+H]^+$ 242.1135, found 242.1132.

4-氨基-1-[6-(羟甲基)吗啉-2-基]嘧啶-2(1*H*)-酮(**4d**): 黄色粉末, 产率 67%. m.p. 210~214 °C; 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 7.64 (d, $J=7.3$ Hz, 1H), 7.24 (d, $J=51.5$ Hz, 2H), 5.83~5.74 (m, 1H), 5.62 (d, $J=9.6$ Hz, 1H), 4.07 (s, 1H), 3.65 (t, $J=14.3$ Hz, 1H), 3.46 (dd, $J=10.6, 4.2$ Hz, 1H), 2.85 (t, $J=12.8$ Hz, 2H), 2.52~2.44 (m, 1H), 2.40 (t, $J=11.6$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO) δ : 165.5, 154.55, 141.3, 93.8, 80.4, 78.8, 62.2, 48.6, 46.3; HRMS calcd for $C_9H_{15}N_4O_3$ $[M+H]^+$ 227.1139, found 227.1135.

9-[6-(羟甲基)吗啉-2-基]-3*H*-嘌呤-6(9*H*)-酮(**4e**): 白色固体, 产率 59%. m.p. 199~202 °C; 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 8.23 (d, $J=37.6$ Hz, 1H), 8.09 (d, $J=8.5$ Hz, 1H), 5.67 (dd, $J=10.0, 2.3$ Hz, 1H), 3.73 (dd, $J=5.1, 3.1$ Hz, 1H), 3.44~3.39 (m, 1H), 3.38~3.34 (m, 1H), 3.17~3.09 (m, 1H), 3.06~2.97 (m, 1H), 2.86 (d, $J=11.4$ Hz, 1H), 2.49~2.41 (m, 1H); HRMS calcd for $C_{10}H_{14}N_5O_3$ $[M+H]^+$ 252.1091, found 252.1087.

2-氨基-9-[6-(羟甲基)吗啉-2-基]-3*H*-嘌呤-6(9*H*)-酮(**4f**): 白色固体, 产率 56%. m.p. 236~239 °C; 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 7.75 (s, 1H), 6.53 (s, 2H), 5.34 (d, $J=9.5$ Hz, 1H), 4.62 (s, 1H), 4.03 (s, 1H), 3.52 (s, 1H), 3.10 (dd, $J=21.8, 7.5$ Hz, 2H), 2.97~2.89 (m, 1H),

2.87~2.78 (m, 1H), 2.72 (d, $J=12.6$ Hz, 1H), 2.35~2.26 (m, 1H); HRMS calcd for $C_{10}H_{15}N_6O_3$ $[M+H]^+$ 267.1200, found 267.1204.

[6-(2,6-二氨基-9*H*-嘌呤-9-基)吗啉-2-基]甲醇(**4g**): 黄色固体, 产率 45%. m.p. 234~236 °C; 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 7.87 (s, 1H), 6.71 (s, 2H), 5.84 (s, 2H), 5.48 (d, $J=8.6$ Hz, 1H), 4.69 (s, 1H), 3.64 (s, 1H), 3.36 (s, 2H), 3.07 (t, $J=10.7$ Hz, 1H), 2.94 (d, $J=11.4$ Hz, 1H), 2.84 (d, $J=12.6$ Hz, 1H), 2.4 (d, $J=10.1$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ : 165.6, 161.4, 156.6, 140.3, 117.9, 84.1, 83.9, 67.4, 53.9, 51.7; HRMS calcd for $C_{10}H_{16}N_7O_2$ $[M+H]^+$ 266.1360, found 266.1357.

[6-(6-氨基-9*H*-嘌呤-9-基)吗啉-2-基]甲醇(**4h**): 黄色固体, 产率 52%. m.p. 225~229 °C; 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 8.32 (s, 1H), 8.16 (s, 1H), 7.29 (s, 2H), 5.69 (dd, $J=10.1, 2.2$ Hz, 1H), 4.35 (dd, $J=41.7, 34.7$ Hz, 1H), 3.77~3.68 (m, 1H), 3.38 (t, $J=5.2$ Hz, 2H), 3.21~3.12 (m, 2H), 3.01 (d, $J=12.2$ Hz, 1H), 2.86 (d, $J=11.3$ Hz, 1H), 2.49~2.41 (m, 1H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO) δ : 155.9, 152.7, 148.9, 138.8, 118.4, 79.5, 78.7, 62.1, 48.6, 46.3; HRMS calcd for $C_{10}H_{15}N_6O_2$ $[M+H]^+$ 251.1251, found 251.1247.

3.2.2 1-[6-(羟甲基)-4-三苯甲基吗啉-2-基]嘧啶-2,4(1*H*,3*H*)-二酮(**4a'**)的合成

取尿嘧啶吗啉核苷(**4a**) 200 mg, 用干燥吡啶带水三次, 溶于 5 mL 无水吡啶, 加入 550 μ L (5 equiv.)三甲基氯硅烷, 氮气保护反应 1 h, 加入 294 mg (1.2 equiv.)三苯基氯甲烷, 搅拌 5 h 后, 加入 5 mL 冰水猝灭, 搅拌 10 min. 用二氯甲烷萃取三次, 合并有机相, 无水硫酸钠干燥过夜, 硅胶柱层析纯化[V (二氯甲烷): V (甲醇)=20:1], 得 351 mg 白色固体 **4a'**, 产率 85%. 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 8.91 (s, 1H), 7.46 (s, 6H), 7.29 (t, $J=7.5$ Hz, 6H), 7.19 (d, $J=7.9$ Hz, 3H), 6.17 (d, $J=7.7$ Hz, 1H), 5.59 (d, $J=8.1$ Hz, 1H), 4.37~4.21 (m, 1H), 3.71~3.51 (m, 3H), 3.36 (d, $J=11.2$ Hz, 1H), 3.09 (d, $J=11.8$ Hz, 1H), 2.16 (s, 1H), 1.72 (s, 1H), 1.43 (dd, $J=21.9, 11.2$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ : 162.8, 149.6, 139.8, 129.2, 127.9, 126.6, 102.2, 80.6, 77.6, 63.6, 52.1, 50.8, 48.8, 29.7; HRMS calcd for $C_{28}H_{28}N_3O_4$ $[M+H]^+$ 470.2074, found 470.2071.

3.2.3 1-[6-(羟甲基)-4-三苯甲基吗啉-2-基]-5-碘嘧啶-2,4(1*H*,3*H*)-二酮(**4i'**)的合成

将 200 mg 化合物 **4a'**、碳酸钾 88 mg (1.5 equiv.)加入 10 mL 甲醇和二氯甲烷($V:V=2:1$)的混合溶剂中, 冰浴搅拌, 避光加入氯化碘 65 μ L (3 equiv.), 搅拌 15

min后,移至40℃,TLC监测反应,约1.5h后反应完毕。冷却至室温,加入二氯甲烷20 mL、饱和硫代硫酸钠10 mL搅拌分层,再用20 mL二氯甲烷萃取二次,合并有机层,无水硫酸钠干燥过夜,硅胶柱层析分离[V(石油醚):V(乙酸乙酯)=2:1],得到215 mg白色固体**4i'**,产率85%。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 7.59 (s, 1H), 7.46 (d, *J*=2.8 Hz, 6H), 7.30 (t, *J*=7.6 Hz, 6H), 7.19 (t, *J*=7.1 Hz, 3H), 6.12 (dd, *J*=9.5, 2.2 Hz, 1H), 4.29 (dd, *J*=6.2, 4.3 Hz, 1H), 3.61 (s, 2H), 3.39 (d, *J*=11.3 Hz, 1H), 3.10 (d, *J*=11.9 Hz, 1H), 2.14 (s, 1H), 1.68 (s, 1H); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ: 162.6, 159.9, 149.4, 144.3, 129.2, 127.9, 126.6, 81.1, 78.1, 68.3, 63.5, 52.9, 52.3, 48.8, 45.7; HRMS calcd for C₂₈H₂₇IN₃O₄ [M+H]⁺ 596.1041, found 596.1045.

3.2.4 1-[6-(羟甲基)吗啉-2-基]-5-碘嘧啶-2,4(1*H*,3*H*)-二酮(**4i**)的合成

取100 mg化合物**4i'**溶于5 mL体积分数为80%的醋酸水溶液,50℃搅拌,TLC监测,约2h反应完毕,浓缩,硅胶柱层析分离[V(二氯甲烷):V(甲醇)=5:1],得到65 mg白色粉末**4i**,产率90%。m.p. 186~189℃; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 7.98 (s, 1H), 5.40 (dd, *J*=9.9, 2.4 Hz, 1H), 4.63 (s, 1H), 4.00 (s, 1H), 3.63~3.48 (m, 1H), 3.33~3.29 (m, 2H), 2.75~2.68 (m, 1H), 2.63 (d, *J*=11.0 Hz, 1H), 2.57~2.48 (m, 1H), 2.38~2.30 (m, 1H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 160.3, 149.7, 144.9, 80.1, 79.2, 69.6, 62.0, 48.2, 45.7; HRMS calcd for C₉H₁₃IN₃O₄ [M+H]⁺ 353.9945, found 353.9942.

3.2.5 化合物**5a**~**5h**的合成

取化合物**4a** 200 mg干燥吡啶带水三次,溶于5 mL无水吡啶,N₂保护,-20℃下搅拌10 min,加入对乙酰氨基苯磺酰氯165 mg (0.8 equiv.), TLC监测反应,反应结束后,加入水、乙酸乙酯萃取,合并有机层,无水硫酸钠干燥过夜,硅胶柱层析分离[V(二氯甲烷):V(甲醇)=20:1],得到279 mg淡黄色固体*N*-(4-((2-(2,4-二氧代-3,4-二氢嘧啶-1(2*H*)-基)-6-(羟甲基)吗啉基)磺酰基)苯基)乙酰胺(**5a**),产率75%。m.p. 198~201℃; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 11.41 (s, 1H), 10.45 (s, 1H), 7.77 (dd, *J*=59.4, 8.6 Hz, 4H), 7.63 (d, *J*=8.1 Hz, 1H), 5.65 (d, *J*=8.1 Hz, 1H), 5.58 (d, *J*=7.7 Hz, 1H), 4.87 (s, 1H), 3.83 (s, 1H), 3.70 (d, *J*=10.9 Hz, 1H), 3.59 (d, *J*=11.2 Hz, 1H), 3.46 (dd, *J*=9.2, 4.8 Hz, 2H), 2.33 (t, *J*=10.7 Hz, 1H), 2.20 (t, *J*=11.1 Hz, 1H), 2.10 (s, 3H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 169.2, 162.9, 149.8, 143.8, 140.7, 128.9, 127.8, 118.8, 101.9, 78.5, 76.1, 61.2, 47.7, 46.2, 24.1; HRMS calcd for C₁₇H₂₁N₄O₇S [M+H]⁺ 425.1125,

found 425.1129.

化合物**5b**~**5h**的制备方法及投料比同化合物**5a**。

1-(4-((4-乙酰氨基苯基(磺酰基)-6-(羟甲基)吗啉-2-基)-1*H*-1,2,4-三唑-3-甲酰胺(**5b**)):白色固体,产率65%。m.p. 173~175℃; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 10.68 (s, 1H), 8.84 (s, 1H), 7.91 (d, *J*=8.8 Hz, 2H), 7.89 (s, 1H), 7.73 (d, *J*=8.7 Hz, 2H), 7.63 (s, 1H), 5.94 (dd, *J*=9.7, 2.1 Hz, 1H), 5.01 (s, 1H), 3.90 (t, *J*=9.4 Hz, 2H), 3.67 (d, *J*=11.1 Hz, 1H), 3.51~3.44 (m, 2H), 2.74 (t, *J*=10.6 Hz, 1H), 2.19 (t, *J*=11.2 Hz, 1H), 2.12 (s, 3H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 176.3, 169.3, 160.1, 157.1, 145.6, 144.0, 128.9, 127.5, 118.8, 81.7, 75.8, 61.1, 48.5, 47.6, 46.5, 24.1. HRMS calcd for C₁₆H₂₁N₆O₆S [M+H]⁺ 425.1238, found 425.1233.

N-(4-((6-(羟甲基)-2-(5-甲基-2,4-二氧代-3,4-二氢嘧啶-1(2*H*)-基)吗啉基)磺酰基)苯基)乙酰胺(**5c**):白色固体**5c**,产率72%。m.p. 178~180℃; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 11.41 (s, 1H), 10.41 (s, 1H), 7.77 (dd, *J*=53.8, 8.7 Hz, 4H), 7.52 (s, 1H), 5.65 (dd, *J*=9.8, 2.4 Hz, 1H), 4.98~4.69 (m, 1H), 3.89~3.73 (m, 1H), 3.66 (d, *J*=10.9 Hz, 1H), 3.60 (d, *J*=11.2 Hz, 1H), 3.50~3.43 (m, 2H), 2.38 (t, *J*=10.7 Hz, 1H), 2.20 (t, *J*=11.1 Hz, 1H), 2.10 (s, 3H), 1.72 (s, 3H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 169.1, 163.5, 149.8, 143.7, 136.1, 128.9, 128.1, 118.8, 109.5, 78.3, 76.1, 61.3, 47.6, 46.2, 24.1, 11.9; HRMS calcd for C₁₈H₂₃N₄O₇S [M+H]⁺ 439.1282, found 439.1285.

N-(4-((6-(羟甲基)-2-(6-氧代-3*H*-嘌呤-9-(6*H*)-基)吗啉基)磺酰基)苯基)乙酰胺(**5e**):淡黄色固体,产率53%。m.p. 192~196℃; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 10.54 (s, 1H), 8.24 (s, 1H), 8.09 (d, *J*=12.5 Hz, 1H), 7.86 (d, *J*=8.7 Hz, 2H), 7.72 (d, *J*=8.7 Hz, 2H), 5.85 (d, *J*=7.8 Hz, 1H), 4.97 (s, 1H), 3.87 (d, *J*=9.5 Hz, 1H), 3.72~3.60 (m, 2H), 3.17 (s, 1H), 2.94 (d, *J*=10.9 Hz, 1H), 2.89 (d, *J*=6.3 Hz, 1H), 2.24 (t, *J*=11.2 Hz, 1H), 2.10 (s, 3H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO) δ: 169.3, 156.5, 147.6, 146.1, 143.8, 139.5, 138.5, 128.8, 126.1, 118.9, 117.9, 78.8, 76.09, 61.2, 47.9, 46.4, 24.1, 23.9; HRMS calcd for C₁₈H₂₁N₆O₆S [M+H]⁺ 449.1238, found 449.1231.

N-(4-((2-(2,6-二氨基-9*H*-嘌呤-9-基)-6-(羟甲基)吗啉基)磺酰基)苯基)乙酰胺(**5g**):黄色固体87 mg,产率50%。m.p. 210~214℃; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 10.47 (d, *J*=10.7 Hz, 1H), 7.87 (s, 1H), 7.85 (d, *J*=4.4 Hz, 2H), 7.74 (d, *J*=8.7 Hz, 2H), 6.79 (s, 2H), 5.92 (s, 2H), 5.66 (dd, *J*=10.0, 2.3 Hz, 1H), 4.90 (d, *J*=34.4 Hz, 1H), 3.83 (dd, *J*=11.1, 8.4 Hz, 1H), 3.79 (d, *J*=10.6 Hz,

1H), 3.71~3.61 (m, 2H), 2.85 (t, $J=10.8$ Hz, 1H), 2.26 (dd, $J=20.3, 9.1$ Hz, 1H), 2.12 (s, 3H); HRMS calcd for $C_{18}H_{23}N_8O_5S$ $[M+H]^+$ 463.1507, found 463.1511.

N-(4-((2-(6-氨基-9H-嘌呤-9-基)-6-(羟甲基)吗啉基)磺酰基)苯基)乙酰胺(**5h**): 白色固体, 产率 52%. m.p. 208~210 °C; 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 10.59 (s, 1H), 8.37 (s, 1H), 8.22 (s, 1H), 7.88 (dd, $J=56.2, 8.8$ Hz, 4H), 7.41 (s, 2H), 5.95 (dd, $J=10.1, 2.5$ Hz, 1H), 5.00 (t, $J=5.7$ Hz, 1H), 3.99 (s, 1H), 3.95 (d, $J=12.1$ Hz, 1H), 3.76 (d, $J=11.2$ Hz, 1H), 3.54 (dd, $J=11.9, 6.0$ Hz, 2H), 3.09 (t, $J=10.7$ Hz, 1H), 2.33 (t, $J=11.1$ Hz, 1H), 2.19 (s, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO) δ : 169.2, 156.0, 152.8, 148.8, 143.9, 139.0, 128.9, 128.0, 118.8, 118.5, 78.6, 76.0, 61.2, 47.7, 46.5, 24.2. HRMS calcd for $C_{18}H_{22}N_7O_5S$ $[M+H]^+$ 448.1398, found 448.1393.

3.2.6 1-(4-((4-乙酰氨基苯基(磺酰基)-6-((4-乙酰氨基苯基)磺酰氧甲基)吗啉-2-基)-1H-1,2,4-三唑-3-甲酰胺(6b)的合成

取 100 mg 化合物 **4b** 干燥吡啶带水三次, 溶于 5 mL 无水吡啶, 氮气保护, 室温搅拌 10 min, 加入 411 mg (4 equiv.) 对乙酰氨基苯磺酰氯, 少量 4-二甲氨基吡啶(DMAP)催化, 室温反应, TLC 监测, 约 5 h 反应完毕, 加水, 二氯甲烷萃取, 合并有机层, 无水硫酸钠干燥过夜, 浓缩, 得到粗产物 **6b** 约 199 mg, 直接用于下一步反应.

3.2.7 1-(4-((4-乙酰氨基苯基(磺酰基)-6-(叠氮甲基)吗啉-2-基)-1H-1,2,4-三唑-3-甲酰胺(7b)的合成

取如上所得粗产物 **6b**、叠氮化钠 104 mg (5 equiv.) 溶于 10 mL 无水 *N,N*-二甲基甲酰胺, 100 °C 搅拌, TLC 监测, 2 h 反应结束. 减压浓缩, 硅胶柱层析分离 [*V*(二氯甲烷): *V*(甲醇)=20:1], 得 113 mg 淡黄色固体 **7b** (以从 **4a** 计算两步), 产率 57%. 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 10.45 (s, 1H), 8.80 (s, 1H), 7.88 (d, $J=8.4$ Hz, 2H), 7.86~7.59 (m, 4H), 5.99 (d, $J=8.5$ Hz, 1H), 4.11 (s, 1H), 3.93 (d, $J=10.5$ Hz, 1H), 3.68 (d, $J=10.7$ Hz, 1H), 3.55 (d, $J=10.7$ Hz, 1H), 3.44 (dd, $J=12.9, 5.9$ Hz, 1H), 2.78 (d, $J=10.8$ Hz, 1H), 2.29~2.20 (m, 1H), 2.11 (s, 3H); HRMS calcd for $C_{16}H_{20}N_9O_5S$ $[M+H]^+$ 450.1303, found 450.1306.

3.2.8 1-(4-((4-乙酰氨基苯基(磺酰基)-6-(氮甲基)吗啉-2-基)-1H-1,2,4-三唑-3-甲酰胺(8b)的合成

取 100 mg 化合物 **7b**, 硼氢化钠 16 mg (2 equiv.) 溶于无水 *N,N*-二甲基甲酰胺, 室温搅拌, TLC 监测反应, 反应完毕后浓缩反应液, 硅胶柱层析分离 [*V*(二氯甲烷): *V*(甲醇)=10:1], 得到 70 mg 白色固体 **8b**, 产率 75%. m.p. 205~207 °C; 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6)

δ : 10.43 (s, 1H), 8.80 (s, 1H), 7.89 (s, 2H), 7.74 (dd, $J=52.8, 44.1$ Hz, 4H), 6.06~5.92 (m, 1H), 4.17~4.06 (m, 1H), 3.93 (d, $J=10.4$ Hz, 1H), 3.68 (d, $J=11.0$ Hz, 1H), 3.55 (dd, $J=13.3, 3.4$ Hz, 1H), 3.44 (dd, $J=13.3, 6.2$ Hz, 1H), 2.79 (d, $J=10.8$ Hz, 1H), 2.25 (t, $J=11.1$ Hz, 1H), 2.11 (s, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ : 169.2, 160.1, 157.2, 145.6, 144.0, 128.9, 127.6, 118.9, 81.7, 74.1, 50.9, 47.3, 24.1; HRMS calcd for $C_{16}H_{22}N_7O_5S$ $[M+H]^+$ 424.1398, found 424.1392.

3.2.9 *N*-(4-((2-(2,4-二氧代-3,4-二氢嘧啶-1(2H)-基)-6-(氮甲基)吗啉基)磺酰基)苯基)乙酰胺(8a)的合成

制备方法与从 **4b** 制备 **8b** 相同, 得白色固体, 产率 47%. m.p. 196~198 °C; 1H NMR (400 MHz, DMSO) δ : 10.63 (s, 1H), 7.77 (dd, $J=62.2, 8.8$ Hz, 4H), 7.58~7.51 (m, 1H), 5.64 (dd, $J=9.8, 2.4$ Hz, 1H), 5.48 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 3.82 (s, 1H), 3.64 (d, $J=12.2$ Hz, 2H), 2.65~2.55 (m, 2H), 2.31~2.22 (m, 1H), 2.16 (d, $J=11.3$ Hz, 1H), 2.11 (d, $J=5.1$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ : 169.2, 165.0, 151.2, 143.8, 140.0, 128.8, 127.9, 118.8, 102.0, 78.6, 77.2, 48.6, 47.9, 43.5, 24.1; HRMS calcd for $C_{17}H_{22}N_5O_6S$ $[M+H]^+$ 424.1285, found 424.1289.

3.2.10 体外抗病毒活性实验

将牛肾(MDBK)细胞以每孔 2×10^4 的密度接种在含有 1640 培养基的 96 孔板中, 在温度 37 °C, CO_2 浓度 5% 的环境中培养 24 h 后, 弃去上清液, 并向每孔中加入 100 μ L 含 2% 胎牛血清(FBS)的经维持培养基稀释的 BVDV 病毒悬液, 感染 2 h 后取出接种物, 加入磷酸缓冲盐溶液洗涤两次, 并立即加入 200 μ L 已经稀释为 12.5、25、50 和 100 μ mol/L 的目标化合物, 阳性对照为利巴韦林, 37 °C 培养四天. 然后每孔加入 20 μ L MTT 溶液继续培养 4 h. 小心倒掉上清液, 每孔加入 150 μ L 二甲基亚砜(DMSO)溶解, 酶标仪测定 490 nm 处吸光度, 计算药物的 EC_{50} 值.

辅助材料(Supporting Information) 化合物 **4a**~**8b** 的 1H NMR 和 ^{13}C NMR 谱图. 这些材料可以免费从本刊网站(<http://sioc-journal.cn/>)上下载.

References

- [1] Gao, Y. X.; Hu, J.; Ju, Y. *Acta Chim. Sinica* **2016**, 74, 312 (in Chinese). (高玉霞, 胡君, 巨勇, 化学学报, **2016**, 74, 312.)
- [2] Nie, B.; Jin, C. F.; Zhong, W. H.; Ren, Q. Y.; Zhang, Y. J.; Zhang, J. *Chin. J. Org. Chem.* **2017**, 37, 2818 (in Chinese). (聂彪, 金传飞, 钟文和, 任青云, 张英俊, 张霁, 有机化学, **2017**, 37, 2818.)
- [3] Ilardi, E. A.; Vitaku, E.; Njardarson, J. T. *J. Med. Chem.* **2014**, 57, 2832.

- [4] Wulf, N. R.; Matuszewski, K. A. *Am. J. Health-Syst. Pharm.* **2013**, *70*, 1483.
- [5] Gawin, R.; De, C. E.; Naesens, L.; Koszytkowska-Stawinska, M. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 8379.
- [6] Zhang, N.; Tan, C.; Cai, P.; Jiang, Y.; Zhang, P.; Zhao, Y. *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 3570.
- [7] Pattanayak, S.; Paul, S.; Sinha, N. B. S. *Nucleosides, Nucleotides Nucleic Acids* **2012**, *31*, 763.
- [8] Hickman, D. T.; Sreenivasachary, N.; Lehn, J.-M. *Helv. Chim. Acta* **2008**, *91*, 1.
- [9] Nicolaou, K. C.; Adsool, V. A.; Hale, C. R. *Org. Lett.* **2010**, *12*, 1552.
- [10] Ermolinskiĭ, B. S.; Mikhailov, S. N. *Russ. J. Bioorg. Chem.* **2000**, *26*, 429.
- [11] Tronchet, J. M. J.; Zsély, M.; Cabrini, D.; Jorand, C.; Barbalat-Rey, F.; Komaromi, I.; Ricca, A.; Geoffroy, M. *Nucleosides Nucleotides* **2006**, *12*, 615.
- [12] Hudson, R. H. E.; Li, G.; Tse, J. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 1381.
- [13] Paul, S.; Pattanayak, S.; Sinha, S. *Tetrahedron Lett.* **2014**, *55*, 1072.
- [14] Tichenor, M. S.; Trzupek, J. D.; Kastrinsky, D. B.; Hwang, I.; Shiga, F.; Boger, D. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 15683.
- [15] Bialecki, J. B.; Yuan, L. H.; Gong, B. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 5460.
- [16] Wang, X. J.; Hou, M. L.; Chen, L. G.; Meng, Y.; Li, Y. *Chemistry* **2004**, *67*, 418 (in Chinese).
(王晓季, 侯曼玲, 陈立功, 孟祎, 李阳, 化学通报, **2004**, *67*, 418.)
- [17] Li, J.; Lowary, T. L. *Org. Lett.* **2008**, *10*, 881.
- [18] Vasina, V. A.; Korovina, D. Y.; Razin, V. V. *Russ. J. Org. Chem.* **2016**, *52*, 932.
- [19] Fringuelli, F.; Pizzo, F.; Rucci, M.; Vaccaro, L. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 7041.
- [20] Salunkhel, A. M.; Brown, H. C. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 7987.
- [21] Loos, M. D.; Esch, J. H. V.; Kellogg, R. M.; Feringa, B. L. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 7285.

(Cheng, F.)