5-FU磷酰胺酯双前药合成及其抗肝肿瘤活性研究

李 宁[1#], 代兴隆[2#], 郝 杰[2], 杨 名[3], 万升标[2*]

(1. 哈励逊国际和平医院肝胆胰外科, 河北 衡水 053000; 2. 中国海洋大学医药学院, 山东 青岛 266003;
3. 首都医科大学公共卫生学院, 北京 100069)

摘要: 本研究基于ProTide技术, 对2′-脱氧-5-氟尿苷 (FdUR) 的3′-羟基进行结构修饰, 设计合成了一系列新型5-FU磷酰胺酯双前药**A1**～**A10**。所有化合物结构经波谱技术确证, 并采用MTT法评价其抗肝癌活性。结果表明, 多个化合物表现出显著抗肝肿瘤活性, 其中**A6**对HepG2和Huh7细胞的IC_{50}分别达0.15和0.34 μmol·L^{-1}, 优于阳性对照**11b**, 且对正常细胞具有良好选择性。机制研究显示, ^{31}P NMR监测证实**A6**遵循经典ProTide活化途径, 可在羧肽酶Y作用下脱去羧酸酯。体外代谢稳定性研究表明, **A6**在大鼠血浆中可保持稳定长达48 h, 而在肝脏匀浆中则迅速被激活。体内实验进一步证实, 在Huh7细胞小鼠肝原位移植瘤模型中, **A6** (每两天45 mg·kg^{-1}) 的肿瘤抑制率达55.84%, 显著优于索拉非尼对照组 (38.98%), 且未引起明显体重变化。本研究涉及的所有动物实验均已获得首都医科大学动物实验伦理委员会的批准 (批准编号: AEEI-2025-536), 且实验操作均严格遵循实验动物福利与伦理相关准则。本研究成功开发出一类具有显著抗肝癌活性的5-FU双前药候选化合物, 其中**A6**展现出优异的体外活性、代谢稳定性及体内抑瘤效果, 其活化机制符合预设途径, 为抗肝癌药物研发提供了有价值的先导化合物和理论支持。

关键词: 5-氟尿嘧啶; 前药设计; ProTide技术; 磷酸酯; 抗肝癌活性

中图分类号: R914 **文献标识码**: A **文章编号**: 0513-4870(2026)04-1283-11

Synthesis and anti-hepatocellular carcinoma activity evaluation of 5-fluorouracil dual-modified 5-FU phosphoramidate prodrugs

LI Ning[1#], DAI Xing-long[2#], HAO Jie[2], YANG Ming[3], WAN Sheng-biao[2*]

(*1. Department of Hepatobiliary and Pancreatic Surgery, Harrison International Peace Hospital, Hengshui 053000, China; 2. School of Medicine and Pharmacy, Ocean University of China, Qingdao 266003, China; 3. School of Public Health, Capital Medical University, Beijing 100069, China*)

Abstract: Based on the ProTide technology, structural modification was performed on the 3′-hydroxyl group of 2′-deoxy-5-fluorouridine (FdUR) to design and synthesize a series of novel 5-FU phosphoramidate diester dual prodrugs (**A1**−**A10**). The structures of all compounds were confirmed by spectroscopic techniques, and their anti-hepatocellular carcinoma activity was evaluated using the MTT assay. The results indicated that several compounds exhibited significant anti-liver tumor activity. Among them, compound **A6** showed the most potent activity with IC_{50} values of 0.15 μmol·L^{-1} (against HepG2 cells) and 0.34 μmol·L^{-1} (against Huh7 cells), which were superior to the positive control **11b**. It also demonstrated good selectivity towards normal cells. Mechanistic studies revealed that ^{31}P NMR monitoring confirmed that A6 follows the classic ProTide activation pathway and can be hydrolyzed by carboxypeptidase Y to remove the carboxylate ester. *In vitro* metabolic stability studies indicated that A6 remained stable in rat plasma for up to 48 h, whereas it underwent rapid activation in liver homogenate. Further *in vivo* experiments confirmed that in a mouse orthotopic Huh7 xenograft model, **A6** (45 mg·kg^{-1}, administered every

收稿日期: 2025-12-04; 修回日期: 2026-01-22.

#共同第一作者.

*通讯作者 E-mail: biaowan@ouc.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2025-1443

2 days) achieved a tumor inhibition rate of 55.84%, which was significantly higher than that of the sorafenib control group (38.98%), without causing significant changes in body weight. The animal protocols were approved by the Animal Ethics Committee of Capital Medical University (No. AEEI-2025-536). This study successfully developed a class of 5-FU dual prodrug candidates with significant anti-HCC activity. Among them, A6 exhibited excellent *in vitro* activity, metabolic stability, and *in vivo* antitumor efficacy. Its activation mechanism aligned with the designed pathway, providing a valuable lead compound and theoretical support for anti-HCC drug development.

Key words: 5-fluorouracil; prodrug design; ProTide technology; phosphonate; anti-hepatocellular carcinoma activity

5-氟尿嘧啶 (5-fluorouracil, 5-FU) 作为嘧啶类抗代谢药物, 在临床上广泛用于消化道肿瘤、乳腺癌及泌尿生殖系统上皮源性肿瘤等多种实体瘤的治疗[1-3]。然而, 该药物存在血浆半衰期短、肿瘤组织分布差等问题, 易引发胃肠道反应与骨髓抑制等严重毒不良反应, 限制了其临床应答率及患者生存期的提升[4,5]。研究表明, 超过80%的5-FU在肝脏中被二氢嘧啶脱氢酶代谢为无活性的*α*-氟-*β*-丙氨酸并经肾脏排泄, 导致其生物利用度降低, 这是其疗效受限的重要原因[6-9]。此外, 5-FU需经细胞内激酶催化磷酸化, 转化为5-氟-2′-脱氧尿苷-5′-单磷酸 (5-fluoro-2′-deoxyuridine 5′-monophosphate, FdUMP) 等活性代谢产物才能发挥作用。FdUMP与胸苷酸合酶 (thymidylate synthase, TS) 共价结合, 导致TS不能游离出来, 通过抑制TS的活性这一途径来抑制胸腺嘧啶的合成[4,10]。其中核苷激酶介导的5-FU单磷酸化步骤是活化过程的限速环节, 效率较低[11]。

为克服上述缺陷, 磷酰胺酯前药策略——即ProTide技术 (源于PROdrug + nucleoTIDE) 应运而生[12,13]。该技术通过芳香基团与氨基酸酯结构掩蔽核苷单磷酸的极性基团, 提高药物亲脂性, 从而增强其细胞膜穿透能力[14,15]。并在细胞内经酶促水解 (如羧酸酯酶、磷酰胺酶等) 逐步释放活性单磷酸代谢物, 绕过激酶依赖的磷酸化限速步骤, 实现靶向活化, 提高药物的生物利用度, 降低毒性, 提高治疗效果, 即提高药物的安全性[16-18]。目前, 多个基于ProTide技术的药物已成功上市或进入临床研究阶段, 展现出良好的应用前景[19-21], 索非布韦 (sofosbuvir)、丙酚替诺福韦 (tenofovir alafenamide) 等抗病毒药物已成功上市; 此外, NUC-3373等一系列抗肿瘤候选药物正处于临床评价阶段 (图1)[22-24]。

本课题组前期基于ProTide策略对2′-脱氧-5-氟尿苷 (5-fluorouridine, FdUR) 的5′-羟基进行结构修饰, 获得了化合物**10**。该化合物相较于5-FU表现出显著增强的抗肝癌活性。在此基础上, 进一步在FdUR的3′-羟基引入不同氨基酸或二肽结构, 构建了一系列衍生物 (图2)。其中, 化合物**11b**和**18**展现出显著的肿瘤细胞抑制活性, 尤其**11b**高剂量组在体内实验中抑瘤率达到75.1%, 表明3′-羟基的酯化修饰是开发抗肝癌候选药物的有效策略[25]。

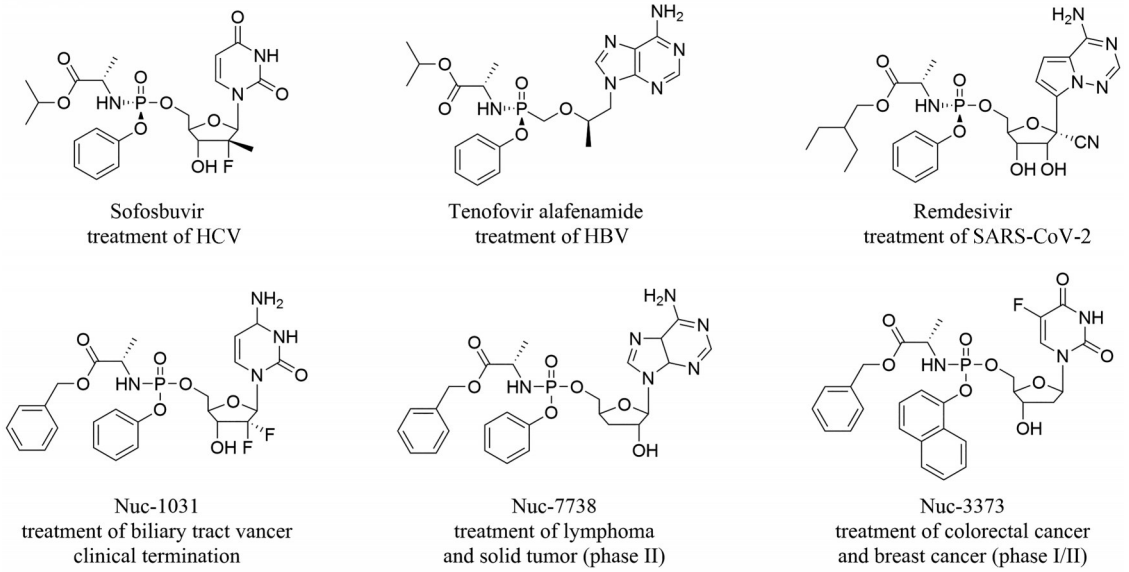
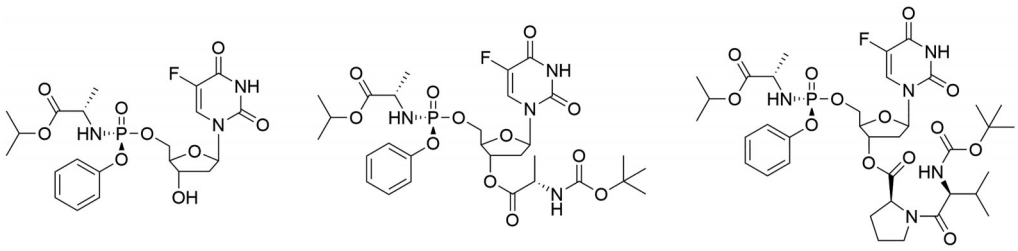


Figure 1 Chemical structures of representative marketed and clinical-stage ProTide prodrugs



10　　**11b**　　**18**

Figure 2　Structures of the antitumor-active 5-fluorouracil (5-FU) prodrugs reported by our group

文献[26]研究表明, 将有机酸与核苷类药物侧链羟基通过酯化反应构建羧酸酯前药, 能够显著改善母体药物的细胞膜穿透性、水溶解性、酶稳定性、生物利用度及半衰期等理化性质。基于此, 本研究在FdUR的3′-羟基引入多种脂肪羧酸, 设计合成了一系列新型前药化合物, 并系统评价其抗肝癌活性, 旨在筛选出具有开发潜力的先导化合物。

结果与讨论

1　化合物的合成

如合成路线1所示, 以5-氟-2′-脱氧尿苷为起始原料, 经多步反应合成目标前药分子**A1**～**A10**。首先, 其5′-羟基在DMAP及咪唑存在下与叔丁基二甲基氯硅烷发生硅烷化反应, 得到5′-*O*-叔丁基二甲基硅基保护的中间体**2**。中间体**2**的3′-羟基随后在三乙胺存在下与二碳酸二叔丁酯 (Boc_2O) 发生酰化反应, 生成3′-*O*-叔丁氧羰基-5′-*O*-叔丁基二甲基硅基双保护中间体**3**。采用四丁基氟化铵选择性脱除5′-位的硅基保护基, 得到3′-*O*-叔丁氧羰基-5-氟-2′-脱氧尿嘧啶核苷**4**。该中间体**4**在叔丁基氯化镁促进下, 与磷酰氯化合物**5**发生亲核取代反应, 得到关键磷酸三酯中间体3′-*O*-叔丁氧羰基-5-氟-2′-脱氧尿苷-5′-*O*-(苯基(异丙氧基-*L*-丙氨酰))磷酸酯**6**。**6**经三氟乙酸处理脱除Boc保护基, 暴露出3′-羟基, 得到5-氟-2′-脱氧尿苷-5′-*O*-(苯基(异丙氧基-*L*-丙氨酰))磷酸酯**7**。最后, 中间体**7**的3′-羟基在EDCI和DMAP催化下, 与一系列脂肪羧酸发生酯化反应, 从而获得最终目标产物5-FU前药分子**A1**～**A10**。

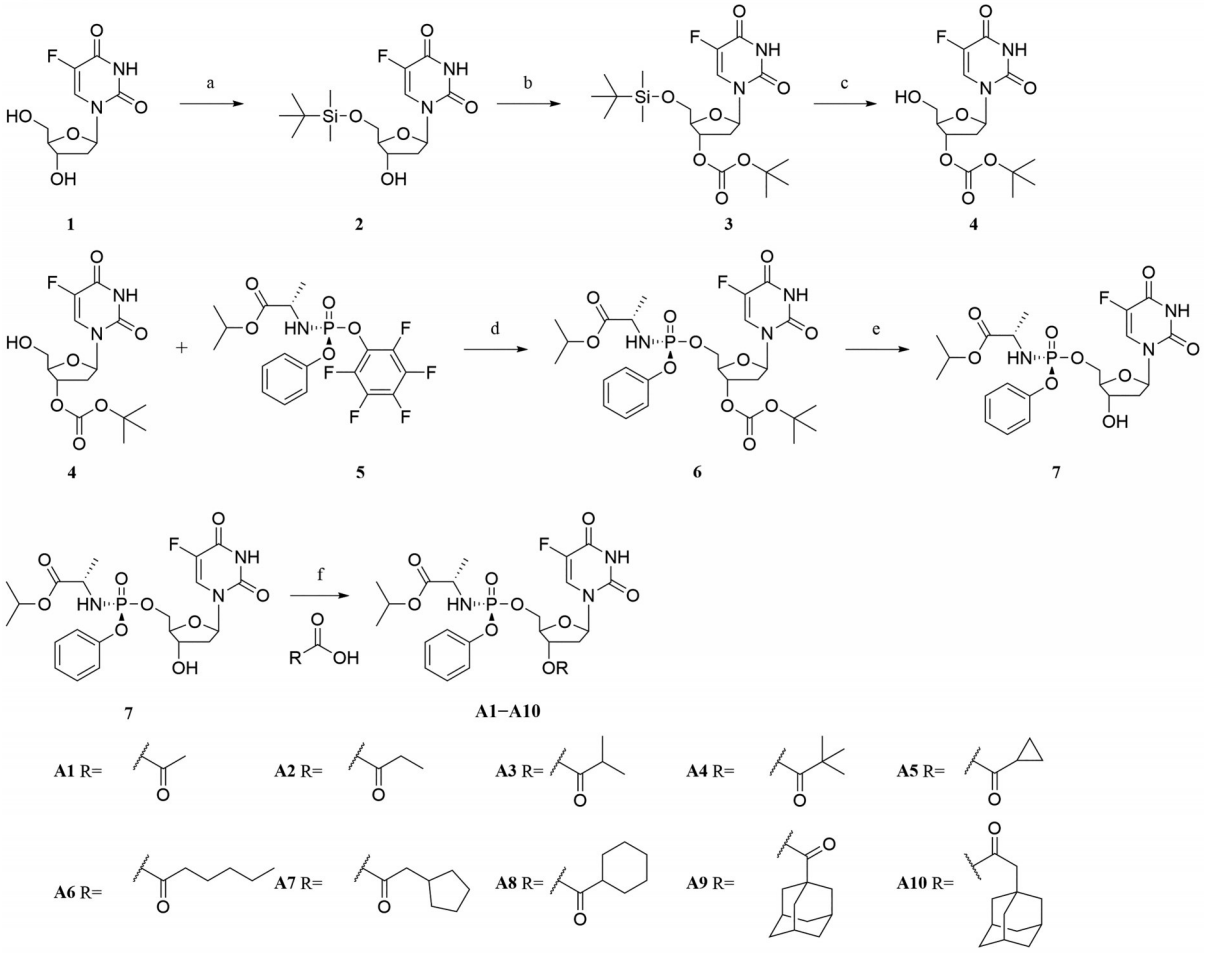
2　目标化合物抗肝肿瘤活性

为评估目标化合物的抗肿瘤活性及选择性, 本研究HepG2肝癌细胞系对化合物活性进行初筛, 然后将活性较好的化合物选用Huh7肝癌细胞系进一步验证, 并设人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cells, HUVEC) 作为正常细胞对照, 采用3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基四氮唑溴盐 [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2, 5-diphenyltetrazolium bromide, MTT] 法检测化合物对细胞增殖的抑制作用, 结果汇总于表1。

体外抗肿瘤活性评价结果 (表1) 显示, 阳性对照药**11b**对HepG2和Huh7肝癌细胞表现出强效的增殖抑制活性, 其半数抑制浓度 (half maximal inhibitory concentration, IC_{50}) 值分别为0.42和0.84 μmol·L^{-1}。同时, **11b**对正常HUVEC细胞的毒性较低 (IC_{50} = 40.97 μmol·L^{-1}), 选择性指数 (selection index, SI) 均大于48, 表现出良好的肿瘤特异性。针对本研究合成的5-FU磷酰胺酯双前药, 3′-位羟基的酯化修饰显著影响了其抗肿瘤活性表现。初步构效关系分析发现, 直链脂肪酰基的碳链长度与活性密切相关: 随着链长从丙酰基 (**A1**, IC_{50} = 7.18 μmol·L^{-1}) 增加至正己酰基 (**A6**, IC_{50} = 0.15 μmol·L^{-1}), 活性呈现明显的递增趋势, 且**A6**对HepG2的抑制效价约为**11b**的2.8倍。然而, 3′-位取代基对空间位阻表现出高度敏感性, 在羰基邻位引入分支结构 (如叔丁基乙酰基**A4**, IC_{50} > 100 μmol·L^{-1}) 或大位阻环状基团 (如金刚烷基**A9**、**A10**) 均导致活性大幅下降或丧失, 这可能是由于过大的位阻干扰了胞内酯酶对3′-位酯键的识别及其后续活性组分的释放过程。此外, 环状取代基的体积也遵循类似规律, 小体积的环丙基 (**A5**) 活性明显优于大位阻的环己基 (**A8**)。在安全性评价中, 最具潜力的化合物**A6**对正常细胞HUVEC的毒性较低 (IC_{50} = 35.06 μmol·L^{-1}), 其针对HepG2细胞的SI高达233.7, 显著优于阳性对照物, 显示出开发为高效低毒抗肝癌药物的良好前景。

3　化合物A6体外稳定性及活化机制研究

为评估目标化合物的体外代谢特性, 本研究首先考察了化合物**A6**在羧肽酶Y作用下的转化过程。正如本课题组前期所报道的[25], 5-FU ProTide前药的活化始于羧肽酶介导的酯键水解, 将羧酸基团释放出来 (图3A-a); 随后羧酸氧负离子亲核进攻磷中心, 取代芳基部分, 自发环化生成混合酸酐; 然后水分子亲核进攻不稳定的五元环, 开环释放出下一步磷酰胺中间体



Scheme 1 Synthetic route of all the target compounds. Reagents and conditions: (a) *tert*-Butyldimethylsilyl chloride, imidazole, DMAP, DMF, RT, 12 h. (b) Boc_2O, DMAP, TEA, DCM, RT, 5 h. (c) Tetrabutylammonium fluoride (1 mol·L^{-1} in THF), THF, RT, 3 h. (d) 4, *t*-BuMgCl/THF, 0 ℃ to RT, 12 h. (e) Trifluoroacetic acid, 0 ℃, 5 min. (f) DMAP, EDCI, DCM, RT, 8 h. DMAP: 4-Dimethylaminopyridine; DMF: *N*,*N*-Dimethylformamide; RT: Room temperature; Boc_2O: Di-*tert*-butyl dicarbonate; TEA: Triethylamine; DCM: Dichloromethane; THF: Tetrahydrofuran; *t*-BuMgCl: *tert*-Butylmagnesium chloride; EDCI: *N*-(3-Dimethylaminopropyl)-*N*′-ethylcarbodiimide hydrochloride

Table 1 Cytotoxic activity of compounds **A1**−**A10**, and **11b**

Compd.	HepG2 IC_{50}/μmol·L^{-1}	Huh7 IC_{50}/μmol·L^{-1}	HUVEC IC_{50}/μmol·L^{-1}
11b	0.42	0.84	40.97
A1	7.18	–	–
A2	44.69	–	–
A3	6.20	–	–
A4	> 100	–	–
A5	3.89	–	–
A6	0.15	0.34	35.06
A7	> 100	–	–
A8	43.92	–	–
A9	53.58	–	–
A10	40.88	–	–

(图 3A-b); 最后 P-N 键在磷酰胺型酶 [如三联组氨酸结合蛋白 1 (histidine triad nucleotide-binding protein 1, HINT1)] 的催化下发生断裂得到具有抗肿瘤活性的单磷酸形式 FdUMP (图 3A), 且该类前药在血浆中通常具备良好稳定性。作者推测 **A6** 亦遵循类似活化路径 (图 3A)。

为验证上述推测, 在羧肽酶 Y 存在下对 **A6** 进行酶解实验, 并利用 ^{31}P NMR 监测反应进程。如图 3B 所示, **A6** 在 20 min 内迅速转化为两种代谢产物 (代谢物 **a** 和 **b**), 其化学位移分别出现在 *δ*5.23 和 7.34 ppm 处, 且均呈单峰。反应至 40 min 时, *δ*4.35 ppm 处归属于 **A6** 的单峰完全消失, 表明 **A6** 已全部转化为代谢中间体。

进一步的, 作者评价了 **A6** 在大鼠血浆及肝匀浆中的代谢稳定性。在大鼠血浆孵育实验中 (图 3C), 化合物 **A6** 表现出良好的稳定性。在孵育 48 h 后, 血浆中仍保留较高比例的原药水平。与血浆稳定性结果形成鲜明对比的是, **A6** 在大鼠肝匀浆中表现出极快的代谢特征。如图 3D 所示, **A6** 的峰面积在 1 h 内迅速下降并接近基线水平, 证实了肝脏中丰富的羧基酯酶和磷酰胺

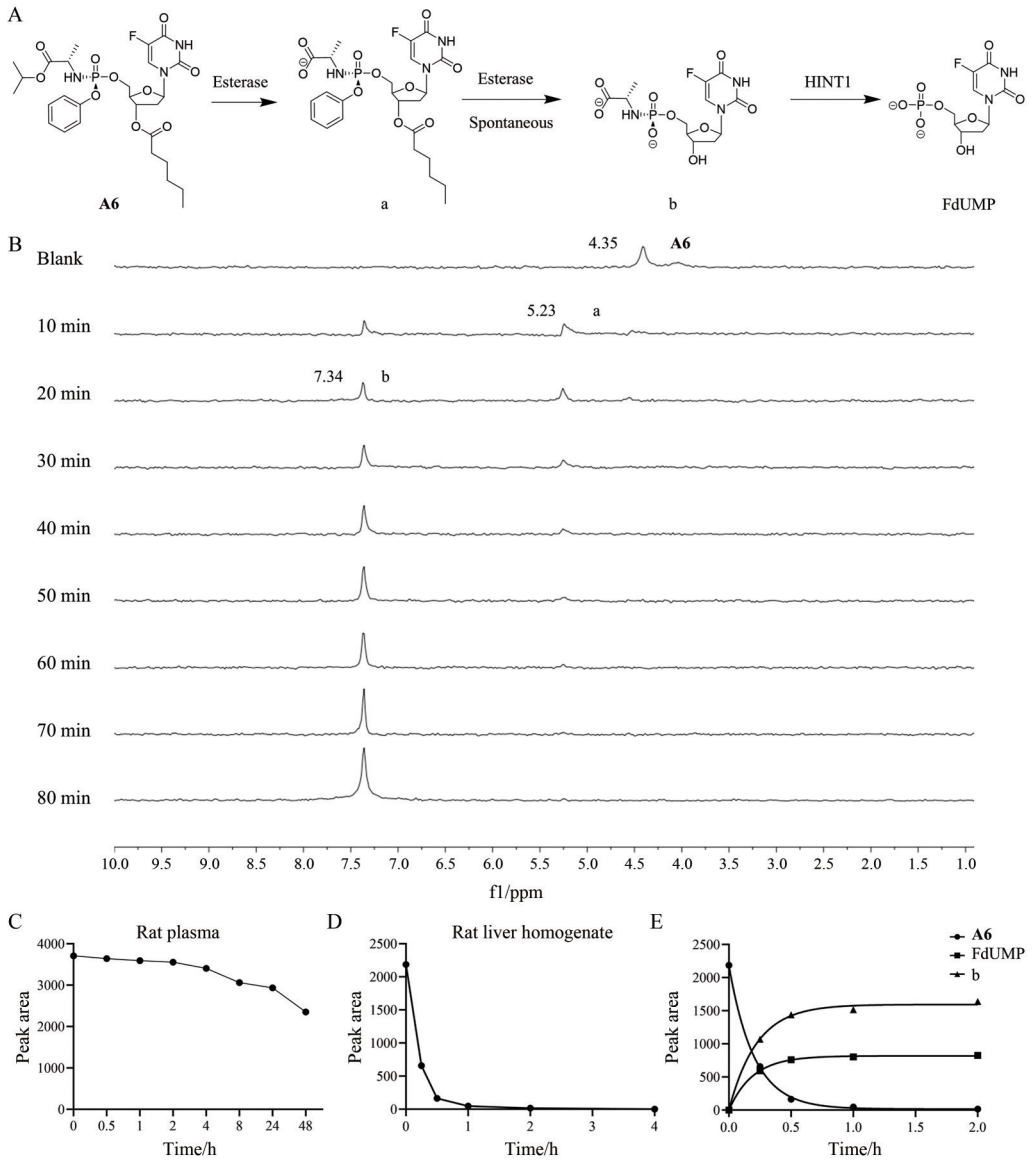


Figure 3　Metabolic activation mechanism and *in vitro* stability of compound **A6**. A: Proposed intracellular metabolic activation pathway of compound **A6**; B: ^{31}P NMR spectra of compound **A6** incubated with carboxypeptidase Y over time; C: Metabolic stability curve of compound **A6** in rat plasma (0−48 h); D: Metabolic stability curve of compound **A6** in rat liver homogenate (0−4 h); E: Time-dependent concentration curves of **A6**, intermediate b, and the active metabolite FdUMP in rat liver homogenate

酶可介导该ProTide前药的高效触发活化。基于作者提出的**A6**在肝脏内的假设活化途径, 作者监测了**A6**及其代谢产物在大鼠肝匀浆中的代谢过程 (图3E)。实验结果显示, 随着**A6**浓度的迅速下降, 中间体**b**快速生成并在约0.5 h内达到浓度峰值。与此同时, 最终活性组分FdUMP的水平随时间显著升高并最终达到平台期。证明了化合物**A6**能够在肝组织中特异性且高效地转化为生物活性产物FdUMP, 从而发挥抗肿瘤作用。

4　化合物A6体内抗肝肿瘤活性评价

本研究通过植入Huh7肝癌细胞建立的原位肝癌小鼠模型, 评价了化合物**A6**的安全性及体内抗肿瘤活性。在安全性方面, 整个实验期间, 各给药组小鼠的体重变化曲线与对照组基本重合, 未见显著差异 (图4A)。动物体重是反映其整体健康状况和药物耐受性的重要指标。**A6**组小鼠体重保持稳定, 未出现明显下降, 初步表明在该给药剂量下, 化合物**A6**未产生显著的全身性毒性, 具有良好的耐受性。

药效学评价结果 (图4B) 表明, 经过25天的给药干预, **A6**治疗组的最终肿瘤体积显著小于对照组 (P < 0.000 1), 其肿瘤生长抑制率 (tumor growth inhibition, TGI) 高达55.84%, 显著优于阳性对照药索拉非尼

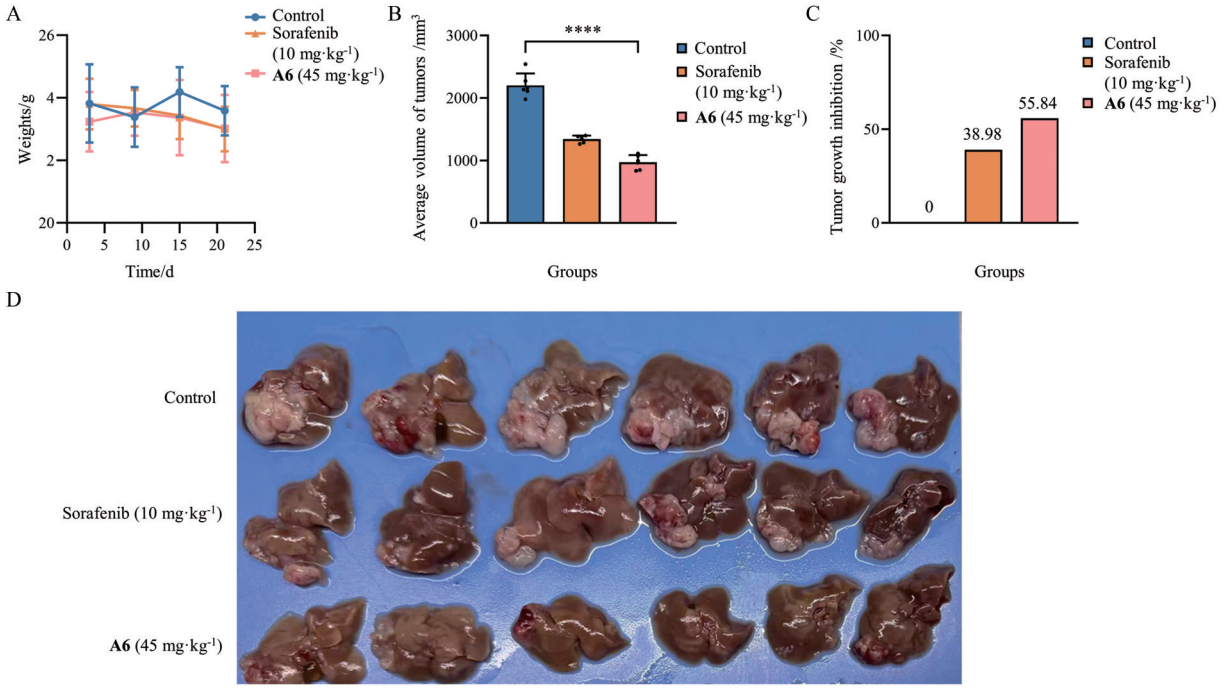


Figure 4 Evaluation of the antitumor activity of compound **A6** in orthotopic Huh7 mouse model. A: Body weight changes of mice during the experiment; B: Final tumor volumes in each group; C: Tumor growth inhibition (TGI) rates calculated based on the final tumor volume; D: Representative photographs of tumors harvested from mice at the end of the study. $n = 5$, $\bar{x} \pm s$. $^{****}P < 0.000\ 1$

(10 mg·kg^{-1}, TGI = 38.98%) (图 4C)。该结果有力地证明了化合物**A6**在体内环境下具有强效的抗肝癌活性。此外, 从剥离的实体肿瘤照片 (图 4D) 可以直观地发现, **A6**组肿瘤体积最小, 为上述定量数据提供了直观的形态学支持。

5 结论

本研究基于 ProTide 策略对 FdUR 进行了系统性结构修饰, 在 3′-OH 位引入多种脂肪羧酸, 合成了一系列新型 5-FU 前药化合物 **A1**～**A10**。活性评价结果表明, 多数化合物表现出显著的抗肝癌活性, 其中化合物 **A6** 对 HepG2 和 Huh7 细胞的 IC_{50} 值分别达到 0.15 和 0.34 μmol·L^{-1}, 优于阳性对照化合物 **11b**, 且对正常肝细胞表现出良好选择性。初步的构效关系分析揭示, 脂肪羧酸侧链的长度和疏水性对活性具有重要影响。机制研究表明, 化合物 **A6** 在羧肽酶 Y 作用下能够快速水解并启动经典的 ProTide 前药活化途径, 同时在大鼠血浆中表现出良好的代谢稳定性, 且在肝匀浆中能迅速代谢活化。进一步的体内药理实验证实, **A6** 在肝癌原位移植瘤模型中抑瘤率达到 55.84%, 显著优于索拉非尼对照组 (38.98%), 且实验过程中小鼠体重保持稳定, 表明其具有良好的体内安全性。该研究不仅为肝癌治疗提供了有前景的候选化合物, 也为核苷类药物的前药设计策略提供了新的思路和实验依据, 具有重要的理论意义和潜在的应用价值。

实验部分

1 化学合成

本文化合物的 ^{1}H NMR 及 ^{13}C NMR 使用 JEOL JNM-EPC400 NMR 型核磁共振波谱仪 (400 MHz, 捷欧路北京科贸有限公司) 测定; 在 Waters xevo g2 型液质联用仪 (美国 Waters 公司) 上记录高分辨率质谱 (HRMS); 薄层层析 (TLC) 采用 Merck F_{254} (德国 Merck 公司); 柱层析用 200～300 目硅胶粉 (青岛美高集团有限公司); 紫外检测用紫外检测灯 (ZF-1, 上海宝山顾村电光仪器厂)。

所用试剂 5-氟-2′-脱氧尿苷 (Lc0313008)、咪唑 (L827644)、叔丁基二甲基氯硅烷 (L777573)、四丁基氟化铵 (L634381)、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 (L735033) 及二碳酸二叔丁酯 (L918341) 购自上海皓鸿生物医药科技有限公司; 四氢呋喃 (P3731147)、*N*,*N*-二甲基甲酰胺 (P3431071) 及三氟乙酸 (P3536565) 购自上海泰坦科技有限公司; 叔丁基氯化镁 (K2306027) 及 4-二甲氨基吡啶 (G1713044) 购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 所有化学试剂和溶剂均从商业来源获得并且无需进一步纯化即可使用。

1.1 5′-*O*-叔丁基二甲基硅基-5-氟-2′-脱氧尿嘧啶核苷 (2) 的合成

在氩气氛围、0 ℃条件下, 向 5-氟-2′-脱氧尿苷 (**1**) (2.00 g, 8.12 mmol) 的干燥 DMF (40 mL) 溶液中, 分批次添加叔丁基二甲基氯硅烷 (1.47 g, 9.75 mmol), 搅拌

0.5 h后, 将混合物由0 ℃缓慢升至室温, 继续搅拌10 h。向反应液中加入饱和氯化铵溶液 (50 mL), 使用乙酸乙酯 (50 mL×3) 萃取混合物, 有机相用无水硫酸镁干燥, 过滤并减压蒸发溶剂。粗产物经硅胶柱层析纯化 (二氯甲烷/甲醇 = 80∶1, *v*/*v*), 得到白色固体化合物**2** (2.21 g, 6.46 mmol), 产率为75.16%。^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ_H: 11.92 (s, 1H), 7.95 (d, J = 6.8 Hz, 1H), 6.11 (td, J = 7.1, 6.6, 1.9 Hz, 1H), δ 5.31～5.26 (m, 2H), 4.20～4.03 (m, 1H), 3.82～3.75 (m, 2H), 2.42～2.20 (m, 2H), 0.88 (s, 9H), 0.10 (s, 6H)。

1.2　3′-*O*-叔丁氧羰基-5′-*O*-叔丁基二甲基硅基-5-氟-2′-脱氧尿嘧啶核苷 (3) 的合成

将化合物**2** (1.68 g, 4.66 mmol) 溶于1,4-二氧六环 (20 mL), 加入三乙胺 (0.97 mL, 6.99 mmol), 随后加入DMAP (0.57 g, 4.66 mmol) 和二碳酸二叔丁酯 (1.22 g, 5.59 mmol), 室温下继续搅拌5 h。TLC监测反应完成, 向反应体系加入水稀释, 混合物使用乙酸乙酯 (30 mL×3) 萃取, 有机相用无水硫酸镁干燥, 过滤并减压蒸发溶剂。粗产物经硅胶柱层析纯化 (石油醚/乙酸乙酯 = 4∶1, *v*/*v*), 得到白色固体化合物**3** (2.12 g, 4.56 mmol), 产率为97.84%。^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ_H: 11.92 (s, 1H), 7.95 (d, J = 6.8 Hz, 1H), 6.11 (td, J = 7.1, 6.6, 1.9 Hz, 1H), 5.05 (d, J = 6.0 Hz, 1H), 4.20～4.03 (m, 1H), 3.84 (qd, J = 11.5, 3.2 Hz, 2H), 2.42～2.20 (m, 2H), 0.88 (s, 9H), 0.10 (s, 6H)。

1.3　3′-*O*-叔丁氧羰基-5-氟-2′-脱氧尿嘧啶核苷 (4) 的合成

将化合物**3** (2.00 g, 4.56 mmol) 溶解在THF (30 mL) 中, 随后加入1 mol·L^{-1}四丁基氟化铵 (6.84 mL, 6.84 mmol) 的THF溶液, 室温下搅拌反应4 h。减压蒸发多余溶剂, 得到浅黄色油状物, 经硅胶柱层析纯化 (二氯甲烷/甲醇 = 70∶1, *v*/*v*), 得到白色固体化合物**4** (1.50 g, 4.33 mmol), 产率94.99%。^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ_H: 11.89 (s, 1H), 8.20 (d, J = 7.1 Hz, 1H), 6.12 (td, J = 7.2, 1.9 Hz, 1H), 5.39～5.29 (m, 1H), 4.09～3.99 (m, 1H), 3.68～3.58 (m, 2H), 2.34～2.24 (m, 2H), 1.43 (s, 9H)。

1.4　3′-*O*-叔丁氧羰基-5-氟-2′-脱氧尿苷-5′-*O*-(苯基(异丙氧基-*L*-丙氨酰))磷酸酯 (6) 的合成

在氩气环境下向三颈烧瓶中加入**4** (500 mg, 1.44 mmol) 和干燥THF (10 mL), 随后在0 ℃条件下向反应液中添加1 mol·L^{-1}的叔丁基氯化镁THF溶液 (2.16 mL, 2.16 mmol), 出现灰白色悬浮物。将反应液在相同温度下搅拌30 min, 随后在0 ℃条件下, 向反应混合液中滴加化合物**5** (907 mg, 2.88 mmol) 的干燥THF (10 mL) 溶液。室温搅拌12 h。向混合物中加入饱和氯化铵溶液淬灭, 乙酸乙酯 (30 mL×3) 萃取, 收集有机相, 无水硫酸镁干燥, 过滤, 减压浓缩。粗产物硅胶柱层析纯化 (二氯甲烷/甲醇 = 70∶1, *v*/*v*), 得到白色固体化合物**6** (753 mg, 1.22 mmol), 产率84.72%。^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ_H: 9.02 (s, 1H), 7.82 (d, J = 6.2 Hz, 1H), 7.36～7.28 (m, 2H), 7.25～7.13 (m, 3H), 6.28～6.20 (m, 1H), 5.13 (d, J = 6.5 Hz, 1H), 5.02 (hept, J = 6.3 Hz, 1H), 4.46～4.32 (m, 2H), 4.29～4.24 (m, 1H), 4.05～3.90 (m, 1H), 3.89～3.78 (m, 1H), 2.52～2.42 (m, 1H), 1.93～1.80 (m, 1H), 1.50 (s, 9H), 1.38 (d, J = 7.0 Hz, 3H), 1.24 (dd, J = 6.3, 1.3 Hz, 6H)。

1.5　5-氟-2′-脱氧尿苷-5′-*O*-(苯基(异丙氧基-*L*-丙氨酰))磷酸酯 (7) 的合成

在0 ℃条件下, 将化合物**6** (750 mg, 1.22 mmol) 溶解于三氟乙酸 (5 mL) 中并搅拌5 min。然后, 向混合物中添加二氯甲烷并在减压下浓缩。所得油状物经硅胶柱层析纯化粗产物 (二氯甲烷/甲醇 = 40∶1, *v*/*v*), 得到白色固体化合物**7** (505 mg, 0.98 mmol), 产率为80.34%。^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ_H: 11.86 (s, 1H), δ 7.90 (d, J = 6.9 Hz, 1H), 7.41～7.31 (m, 2H), 7.24～7.13 (m, 3H), 6.18～6.09 (m, 1H), 4.86 (hept, J = 6.3 Hz, 1H), 4.29～4.14 (m, 2H), 4.16～4.05 (m, 1H), 3.98～3.90 (m, 1H), 3.86～3.71 (m, 1H), 2.14～2.05 (m, 2H), 1.21 (d, J = 7.1 Hz, 3H), 1.15 (d, J = 6.3 Hz, 6H)。

1.6　5-FU磷酸酯前药 (A1～A10) 的合成

室温条件下, 向化合物**7** (300 mg, 0.58 mmol), 羧酸 (0.87 mmol) 的无水二氯甲烷 (10 mL) 溶液中加入EDCI (222 mg, 1.16 mmol)、DMAP (71 mg, 0.58 mmol) 搅拌4 h, TLC监测反应完成, 将反应液用水稀释, 使用二氯甲烷 (20 mL×3) 萃取, 有机相使用无水硫酸镁干燥, 过滤, 减压浓缩。使用二氯甲烷/甲醇 (50∶1, *v*/*v*) 作为洗脱剂, 粗产物通过硅胶柱层析纯化 (二氯甲烷/甲醇 = 50∶1, *v*/*v*), 得到目标前药。

1.6.1　化合物A1的合成　产率90%。^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ_H: 7.83 (d, J = 6.2 Hz, 1H), 7.34～7.28 (m, 2H), 7.22 (dt, J = 7.5, 1.3 Hz, 2H), 7.15 (ddt, J = 8.2, 7.3, 1.1 Hz, 1H), 6.21 (ddd, J = 9.1, 5.2, 1.7 Hz, 1H), 5.24 (dt, J = 6.6, 1.7 Hz, 1H), 5.01 (p, J = 6.3 Hz, 1H), 4.42～4.30 (m, 2H), 4.17 (p, J = 2.5 Hz, 1H), 4.00～3.90 (m, 1H), 3.76 (dd, J = 11.4, 9.4 Hz, 1H), 2.39 (ddd, J = 14.1, 5.3, 1.4 Hz, 1H), 2.09 (s, 3H), 1.86 (ddd, J = 14.0, 9.1, 6.5 Hz, 1H), 1.36 (d, J = 7.0 Hz, 3H), 1.22 (dd, J = 6.3, 1.2 Hz, 6H); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ_C: 172.94 (d, J = 7.2 Hz), 170.54, 157.08, 156.82, 150.40 (d, J = 6.7 Hz),

149.02, 141.95, 139.58, 129.90, 125.44, 124.12, 123.78, 120.37 (d, *J* = 4.7 Hz), 85.17, 83.34 (d, *J* = 7.6 Hz), 74.28, 69.60, 66.23 (d, *J* = 5.3 Hz), 50.51, 37.54, 21.71 (d, *J* = 4.6 Hz), 21.26～20.84 (m); HRMS (ESI) *m*/*z* Calcd. for $C_{23}H_{29}FN_3NaO_{10}P$ $[M+Na]^+$ 580.146 7, found 580.145 9。

1.6.2 化合物 A2 的合成 产率 90%。^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ_H: 7.83 (d, *J* = 6.2 Hz, 1H), 7.34～7.28 (m, 2H), 7.22 (dt, *J* = 8.6, 1.2 Hz, 2H), 7.15 (dddd, *J* = 8.5, 7.1, 2.3, 1.1 Hz, 1H), 6.21 (ddd, *J* = 9.1, 5.2, 1.7 Hz, 1H), 5.25 (dt, *J* = 6.6, 1.7 Hz, 1H), 5.01 (hept, *J* = 6.2 Hz, 1H), 4.36 (tq, *J* = 5.3, 2.4 Hz, 2H), 4.16 (p, *J* = 2.6 Hz, 1H), 3.96 (tq, *J* = 9.0, 7.1 Hz, 1H), 3.76 (dd, *J* = 11.4, 9.4 Hz, 1H), 2.39 (ddd, *J* = 8.8, 5.3, 1.3 Hz, 1H), 2.37～2.32 (m, 2H), 1.86 (ddd, *J* = 14.1, 9.1, 6.5 Hz, 1H), 1.62 (s, 1H), 1.37 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H), 1.22 (dd, *J* = 6.2, 1.2 Hz, 6H), 1.14 (t, *J* = 7.5 Hz, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ_C: 174.05, 172.94 (d, *J* = 7.3 Hz), 157.12, 156.86, 150.41 (d, *J* = 6.7 Hz), 149.04, 141.95, 139.58, 129.89, 125.43, 124.13, 123.79, 120.38 (d, *J* = 4.6 Hz), 85.18, 83.43 (d, *J* = 7.6 Hz), 74.15, 69.59, 66.26 (d, *J* = 5.1 Hz), 50.51, 37.58, 27.46, 21.70 (d, *J* = 4.6 Hz), 21.08 (d, *J* = 4.8 Hz), 8.94; HRMS (ESI) *m*/*z* Calcd. for $C_{24}H_{31}FN_3NaO_{10}P$ $[M+Na]^+$ 594.160 3, found 594.159 9。

1.6.3 化合物 A3 的合成 产率 90%。^{1}H NMR (400 MHz, methanol-d_4) δ_H: 7.81 (d, *J* = 6.5 Hz, 1H), 7.33 (t, *J* = 7.9 Hz, 2H), 7.26～7.21 (m, 2H), 7.19～7.14 (m, 1H), 6.18～6.12 (m, 1H), 5.26 (dt, *J* = 6.7, 2.0 Hz, 1H), 4.96 (p, *J* = 6.3 Hz, 1H), 4.34 (dd, *J* = 6.0, 3.1 Hz, 2H), 4.20 (q, *J* = 2.8 Hz, 1H), 3.90 (dq, *J* = 10.1, 7.2 Hz, 1H), 2.59 (p, *J* = 7.0 Hz, 1H), 2.37 (ddd, *J* = 14.3, 5.6, 1.7 Hz, 1H), 2.10 (ddd, *J* = 14.7, 8.7, 6.6 Hz, 1H), 1.32 (dd, *J* = 7.1, 1.0 Hz, 3H), 1.20 (dd, *J* = 6.3, 1.5 Hz, 6H), 1.16 (dd, *J* = 7.0, 1.2 Hz, 6H); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ_C: 176.75, 172.95 (d, *J* = 7.2 Hz), 157.21, 156.94, 150.41 (d, *J* = 6.5 Hz), 149.06, 141.94, 139.57, 129.88, 125.42, 124.13, 123.79, 120.38 (d, *J* = 4.7 Hz), 85.18, 83.52 (d, *J* = 7.4 Hz), 74.11, 69.58, 66.30 (d, *J* = 5.2 Hz), 50.50, 37.57, 33.77, 21.70 (d, *J* = 4.8 Hz), 21.06 (d, *J* = 4.8 Hz), 18.85; HRMS (ESI) *m*/*z* Calcd. for $C_{25}H_{33}FN_3NaO_{10}P$ $[M+Na]^+$ 608.178 0, found 608.177 1。

1.6.4 化合物 A4 的合成 产率 90%。^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ_H: 7.83 (d, *J* = 6.1 Hz, 1H), 7.34～7.27 (m, 2H), 7.21 (dt, *J* = 8.5, 1.4 Hz, 2H), 7.14 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H), 6.20 (ddd, *J* = 9.1, 5.3, 1.7 Hz, 1H), 5.21 (dt, *J* = 6.6, 1.6 Hz, 1H), 5.00 (p, *J* = 6.2 Hz, 1H), 4.38 (dt, *J* = 6.2, 1.6 Hz, 2H), 4.10 (p, *J* = 2.4 Hz, 1H), 3.99～3.86 (m, 2H), 2.38 (ddd, *J* = 14.1, 5.3, 1.3 Hz, 1H), 1.88 (ddd, *J* = 14.1, 9.1, 6.6 Hz, 1H), 1.36 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H), 1.23～1.19 (m, 15H); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ_C: 178.16, 172.97 (d, *J* = 7.2 Hz), 157.29, 157.02, 150.41 (d, *J* = 6.7 Hz), 149.08, 141.92, 139.55, 129.88, 125.41, 124.16, 123.82, 120.38 (d, *J* = 4.6 Hz), 85.21, 83.56 (d, *J* = 7.6 Hz), 74.21, 69.57, 66.33 (d, *J* = 5.2 Hz), 53.53, 50.50, 38.69, 37.58, 27.11 (d, *J* = 12.5 Hz), 21.69 (d, *J* = 4.8 Hz), 21.04 (d, *J* = 4.9 Hz); HRMS (ESI) *m*/*z* Calcd. for $C_{26}H_{35}FN_3NaO_{10}P$ $[M+Na]^+$ 622.193 6, found 622.192 5。

1.6.5 化合物 A5 的合成 产率 90%。^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ_H: 7.83 (d, *J* = 6.2 Hz, 1H), 7.30 (dd, *J* = 8.6, 7.2 Hz, 2H), 7.23～7.20 (m, 2H), 7.15 (ddd, *J* = 8.2, 7.1, 1.1 Hz, 1H), 6.23 (ddd, *J* = 9.1, 5.2, 1.7 Hz, 1H), 5.24 (dt, *J* = 6.5, 1.6 Hz, 1H), 5.01 (h, *J* = 6.3 Hz, 1H), 4.42～4.30 (m, 2H), 4.18 (p, *J* = 2.4 Hz, 1H), 3.96 (ddt, *J* = 16.1, 9.0, 7.0 Hz, 1H), 3.74 (dd, *J* = 11.4, 9.4 Hz, 1H), 2.44～2.37 (m, 1H), 1.84 (ddd, *J* = 14.1, 9.1, 6.5 Hz, 1H), 1.64 (dd, *J* = 7.9, 4.6 Hz, 1H), 1.36 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H), 1.22 (d, *J* = 6.2 Hz, 6H), 1.01 (tt, *J* = 4.3, 2.3 Hz, 2H), 0.96～0.91 (m, 2H); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ_C: 174.54, 172.92 (d, *J* = 7.3 Hz), 157.07, 156.80, 150.41 (d, *J* = 6.7 Hz), 149.00, 141.94, 139.57, 129.89, 125.42, 124.15, 123.81, 120.39 (d, *J* = 4.6 Hz), 85.20, 83.40 (d, *J* = 7.5 Hz), 74.29, 69.58, 66.27 (d, *J* = 5.2 Hz), 50.50, 37.60, 21.71 (d, *J* = 4.5 Hz), 21.11 (d, *J* = 4.8 Hz), 12.79, 9.19 (d, *J* = 5.7 Hz); HRMS (ESI) *m*/*z* Calcd. for $C_{25}H_{31}FN_3NaO_{10}P$ $[M+Na]^+$ 606.162 3, found 606.161 9。

1.6.6 化合物 A6 的合成 产率 90%。^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ_H: 7.83 (d, *J* = 6.2 Hz, 1H), 7.31 (t, *J* = 7.9 Hz, 2H), 7.21 (dt, *J* = 7.5, 1.3 Hz, 2H), 7.19～7.11 (m, 1H), 6.21 (ddd, *J* = 9.2, 5.2, 1.7 Hz, 1H), 5.26～5.22 (m, 1H), 5.01 (p, *J* = 6.3 Hz, 1H), 4.37 (pd, *J* = 5.2, 2.3 Hz, 2H), 4.15 (p, *J* = 2.4 Hz, 1H), 4.01～3.91 (m, 1H), 3.80 (dd, *J* = 11.4, 9.4 Hz, 1H), 2.38 (ddd, *J* = 14.1, 5.2, 1.3 Hz, 1H), 2.32 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 1.85 (ddd, *J* = 14.1, 9.1, 6.5 Hz, 1H), 1.61 (p, *J* = 7.4 Hz, 2H), 1.36 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H), 1.29 (td, *J* = 8.5, 7.5, 4.3 Hz, 4H), 1.22 (dd, *J* = 6.3, 1.2 Hz, 6H), 0.89 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ_C: 173.43, 173.04, 172.97, 157.36, 157.10, 150.44, 150.37, 149.19, 141.94, 139.58, 129.86, 125.38, 124.10, 123.76, 120.38, 120.33, 85.15, 83.44, 83.37, 74.10, 69.53, 66.30, 66.25, 53.55, 50.48, 37.53,

34.06, 31.26, 24.47, 22.31, 21.70, 21.65, 20.98, 20.93, 13.93; HRMS (ESI) *m/z* Calcd. for $C_{27}H_{37}FN_3NaO_{10}P$ $[M+Na]^+$ 636.209 3, found 636.207 7。

1.6.7　化合物A7的合成　产率90%。^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ_H: 7.84 (d, J = 6.2 Hz, 1H), 7.33～7.28 (m, 2H), 7.22 (dt, J = 8.7, 1.3 Hz, 2H), 7.15 (ddq, J = 8.4, 7.1, 1.1 Hz, 1H), 6.21 (ddd, J = 9.0, 5.2, 1.7 Hz, 1H), 5.24 (dt, J = 6.5, 1.7 Hz, 1H), 5.00 (h, J = 6.3 Hz, 1H), 4.41～4.33 (m, 2H), 4.15 (p, J = 2.5 Hz, 1H), 4.02～3.92 (m, 1H), 3.74 (dd, J = 11.4, 9.4 Hz, 1H), 2.38 (ddd, J = 14.0, 5.2, 1.3 Hz, 1H), 2.34 (d, J = 7.7 Hz, 2H), 2.20 (dt, J = 15.5, 7.6 Hz, 1H), 1.91～1.84 (m, 1H), 1.68～1.50 (m, 6H), 1.37 (d, J = 7.0 Hz, 3H), 1.22 (dd, J = 6.3, 1.1 Hz, 6H), 1.19～1.10 (m, 2H); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ_C: 172.93 (d, J = 5.5 Hz), 157.12, 156.86, 150.41 (d, J = 6.8 Hz), 149.02, 141.93, 139.57, 129.89, 125.43, 124.14, 123.80, 120.38 (d, J = 4.7 Hz), 85.21, 83.49 (d, J = 7.6 Hz), 74.03, 69.59, 66.28 (d, J = 5.3 Hz), 50.51, 40.20, 37.59, 36.43, 32.49, 25.04, 21.71 (d, J = 4.7 Hz), 21.09 (d, J = 4.8 Hz); HRMS (ESI) *m/z* Calcd. for $C_{28}H_{37}FN_3NaO_{10}P$ $[M+Na]^+$ 648.209 3, found 648.208 2。

1.6.8　化合物A8的合成　产率90%。^{1}H NMR (400 MHz, methanol-d_4) δ_H: 7.81 (d, J = 6.5 Hz, 1H), 7.37～7.30 (m, 2H), 7.23 (dt, J = 7.5, 1.3 Hz, 2H), 7.19～7.11 (m, 1H), 6.14 (ddd, J = 8.8, 5.5, 1.7 Hz, 1H), 5.25 (dt, J = 6.6, 2.0 Hz, 1H), 4.96 (p, J = 6.3 Hz, 1H), 4.33 (dd, J = 6.0, 3.1 Hz, 2H), 4.19 (p, J = 2.8 Hz, 1H), 3.90 (dq, J = 10.0, 7.1 Hz, 1H), 2.36 (dddd, J = 9.8, 8.0, 4.6, 3.0 Hz, 2H), 2.09 (ddd, J = 14.7, 8.8, 6.6 Hz, 1H), 1.89 (d, J = 12.8 Hz, 2H), 1.74 (dt, J = 11.9, 3.6 Hz, 2H), 1.65 (dd, J = 8.8, 4.8 Hz, 1H), 1.44 (dd, J = 12.6, 9.4 Hz, 2H), 1.37 (dd, J = 6.0, 2.4 Hz, 1H), 1.34～1.33 (m, 2H), 1.31 (t, J = 2.4 Hz, 3H), 1.20 (dd, J = 6.2, 1.4 Hz, 6H); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ_C: 175.68, 172.96 (d, J = 7.2 Hz), 157.21, 156.94, 150.41 (d, J = 6.7 Hz), 149.09, 141.94, 139.57, 129.88, 125.41, 124.13, 123.79, 120.38 (d, J = 4.7 Hz), 85.18, 83.56 (d, J = 7.6 Hz), 73.96, 69.57, 66.31 (d, J = 5.1 Hz), 53.53, 50.50, 42.87, 37.58, 28.90, 25.67, 25.34, 21.70 (d, J = 4.8 Hz), 21.06 (d, J = 4.8 Hz); HRMS (ESI) *m/z* Calcd. for $C_{28}H_{37}FN_3NaO_{10}P$ $[M+Na]^+$ 648.209 3, found 648.208 3。

1.6.9　化合物A9的合成　产率90%。^{1}H NMR (400 MHz, methanol-d_4) δ_H: 7.81 (d, J = 6.5 Hz, 1H), 7.33 (t, J = 7.9 Hz, 2H), 7.23 (dt, J = 8.6, 1.3 Hz, 2H), 7.19～7.13 (m, 1H), 6.14 (ddd, J = 8.8, 5.5, 1.6 Hz, 1H), 5.23 (dt, J = 6.7, 1.9 Hz, 1H), 4.96 (p, J = 6.3 Hz, 1H), 4.33 (dd, J = 6.0, 3.1 Hz, 2H), 4.18～4.14 (m, 1H), 3.90 (dq, J = 10.0, 7.1 Hz, 1H), 2.34 (ddd, J = 14.3, 5.6, 1.7 Hz, 1H), 2.10 (ddd, J = 14.7, 8.8, 6.5 Hz, 1H), 1.99 (q, J = 3.2 Hz, 3H), 1.90 (d, J = 2.9 Hz, 6H), 1.74 (qd, J = 12.2, 6.3 Hz, 6H), 1.34～1.31 (m, 3H), 1.20 (dd, J = 6.3, 1.6 Hz, 5H); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ_C: 177.28, 172.96 (d, J = 7.2 Hz), 157.22, 156.96, 150.42 (d, J = 6.7 Hz), 149.03, 141.92, 139.56, 129.88, 125.41, 124.17, 123.83, 120.39 (d, J = 4.7 Hz), 85.22, 83.66 (d, J = 7.6 Hz), 73.95, 69.57, 66.36 (d, J = 5.3 Hz), 50.50, 40.63, 39.28, 38.69, 37.60, 36.40, 27.83, 21.71 (d, J = 5.2 Hz), 21.09 (d, J = 4.7 Hz); HRMS (ESI) *m/z* Calcd. for $C_{32}H_{41}FN_3NaO_{10}P$ $[M+Na]^+$ 700.240 6, found 700.239 9。

1.6.10　化合物A10的合成　产率90%。^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ_H: 7.84 (d, J = 6.2 Hz, 1H), 7.33～7.27 (m, 2H), 7.22 (dt, J = 8.7, 1.2 Hz, 2H), 7.17～7.12 (m, 1H), 6.21 (ddd, J = 9.0, 5.2, 1.7 Hz, 1H), 5.23 (dt, J = 6.5, 1.7 Hz, 1H), 5.01 (p, J = 6.3 Hz, 1H), 4.43～4.32 (m, 2H), 4.17 (p, J = 2.5 Hz, 1H), 3.96 (tq, J = 9.0, 7.1 Hz, 1H), 3.78 (dd, J = 11.4, 9.3 Hz, 1H), 2.39 (ddd, J = 14.0, 5.3, 1.4 Hz, 1H), 2.09 (s, 2H), 2.00～1.95 (m, 4H), 1.87 (ddd, J = 14.0, 9.0, 6.4 Hz, 1H), 1.75～1.67 (m, 4H), 1.64 (d, J = 3.1 Hz, 4H), 1.59 (d, J = 2.9 Hz, 8H), 1.37 (d, J = 7.0 Hz, 3H), 1.23 (d, J = 1.5 Hz, 3H), 1.22 (d, J = 1.4 Hz, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ_C: 172.91 (d, J = 7.4 Hz), 171.35, 157.08, 156.81, 150.40 (d, J = 6.7 Hz), 148.93, 139.53, 129.90, 125.44, 124.18, 123.83, 120.38 (d, J = 4.7 Hz), 85.29, 83.55 (d, J = 7.5 Hz), 73.88, 69.61, 66.27, 50.52, 48.48, 42.50, 37.68, 36.71, 33.13, 28.60, 21.72 (d, J = 5.3 Hz), 21.12 (d, J = 4.7 Hz); HRMS (ESI) *m/z* Calcd. for $C_{33}H_{43}FN_3NaO_{10}P$ $[M+Na]^+$ 714.256 2, found 714.254 8。

2　MTT试验

HepG2、Huh7和HUVEC细胞购自中国科学院细胞库。HepG2和Huh7是人肝细胞癌细胞系, 而HUVEC是正常人脐静脉内皮细胞。所有3种细胞系均维持在补充了10%胎牛血清 (FBS)、50 IU青霉素和50 μg·mL^{-1}链霉素的杜氏改良Eagle培养基 (DMEM) 或Roswell Park Memorial Institute1640培养基中。细胞在37 ℃、5% CO_2的湿润环境中培养。

使用3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基四氮唑溴化物 (MTT) 法评估所有化合物对细胞活力的抗增殖活性。将肿瘤细胞或正常细胞接种到96孔板中并

孵育过夜。随后, 将每种测试化合物 [溶解在二甲基亚砜 (DMSO) 中并用培养基稀释] 以一系列浓度加入孔中, 每孔最终体积为200 μL。然后将培养板在37 ℃下孵育48或72 h。孵育期结束后, 向每孔加入20 μL MTT溶液, 并将细胞在37 ℃下继续孵育4 h。孵育后, 吸去上清液, 并将形成的甲臜晶体溶解在DMSO中。使用SpectraMax酶标仪在490 nm处记录吸光度值。抑制率使用以下公式计算:

$$IRs\ (\%) = [1 - (A_{药物} - A_{空白}) / (A_{对照} - A_{空白})] \times 100$$

3 体外稳定性试验

将化合物**A6** (1 mg·mL^{-1}乙腈溶液) 分别于37 ℃下与大鼠血浆及肝匀浆共同孵育, 并同步设置空白对照组与标准样品组。其中, 血浆样本的孵育时间设定为0、0.5、1、2、4、8、24及48 h; 肝匀浆样本的孵育时间点则设定为0、0.25、0.5、1、2及4 h。在每个时间点, 每个样品溶液用600 μL乙腈淬灭稀释, 振荡30 s, 20 ℃温度下以12 000 r·min^{-1}离心15 min后过滤 (0.22 μm)。样品采用Agilent 1260高效液相色谱仪分析, 配备C18色谱柱 (2.1 mm × 100 mm, 3.5 μm), 化合物**A6**的HPLC分析条件: 流动相体系为甲醇/磷酸盐缓冲液 (含8 mmol·L^{-1} KH_2PO_4和2 mmol·L^{-1} K_2HPO_4), 流速设定为1 mL·min^{-1}, 并在210 nm紫外波长下检测。化合物**A6**的梯度条件: 0～12 min, 甲醇维持80%, 磷酸盐缓冲液维持20%

4 羧肽酶Y测定实验

化合物**A6** (5 mg) 溶解在氘代丙酮 (0.15 mL) 中, 然后加入0.30 mL Trizma缓冲液 (pH 7.6), 记录^{31}P NMR空白对照。然后, 在溶液中加入羧肽酶Y (0.1 mg溶解在0.15 mL Trizma中)。在25 ℃的温度下, 记录前药**A6**的^{31}P NMR数据作为对照。对于化合物**A6**在90 min内每隔十分钟记录一次^{31}P NMR, 每个^{31}P NMR扫描128次。^{31}P NMR记录的数据使用MNova软件进行处理分析。

5 体内抗肝肿瘤活性试验

本研究涉及的所有动物实验均已获得首都医科大学动物实验伦理委员会的批准 (批准编号: AEEI-2025-536), 且实验操作均严格遵循实验动物福利与伦理相关准则。

选取4～6周龄、体重18～22 g的C57BL/6雄性小鼠 [斯贝福 (北京) 生物技术有限公司, 动物质量合格证号: 110324251108276218, 许可证号: SCXK (京) 2024-0001], 在SPF级动物实验屏障环境中适应性饲养一周后用于实验。Huh7细胞在含10%胎牛血清的DMEM高糖培养基中, 于37 ℃、5% CO_2培养箱中常规培养。取对数生长期的细胞, 经胰酶消化、PBS重悬计数后, 调整细胞密度至每毫升5×10^{7}个。采用三氟乙醇腹腔注射麻醉小鼠, 于左侧肋弓下腹部作一小切口, 暴露肝脏左叶。使用微量注射器将50 μL (约2×10^{5}个) Huh7细胞悬液缓慢注入肝包膜下。缝合切口, 待小鼠苏醒后放回饲养笼, 常规饲养至成瘤。

待操作3天后, 将荷瘤小鼠随机分为3组 (n = 6): 模型对照组 (给予等体积溶剂)、索拉非尼对照组 (10 mg·kg^{-1}) 及**A6**治疗组 (45 mg·kg^{-1})。给药载体由8% Tween 80, 2% DMSO和90%生理盐水组成。索拉非尼经口服灌胃给予, **A6**通过尾静脉注射给药, 给药方案均为每2天一次, 共给药9次。期间每2天使用游标卡尺测量肿瘤长径 (a) 和短径 (b), 根据公式$V = a \times b^2 / 2$计算肿瘤体积, 并每日观察记录小鼠体重及行为状态。末次给药24 h后, 采用颈椎脱臼法处死小鼠, 完整剥离带瘤肝脏, 称重并拍照。肿瘤生长抑制率 (TGI) 按以下公式计算: $TGI\ (\%) = [1 - (T_n - T_0) / (C_n - C_0)] \times 100$, 其中$T_n$、$T_0$分别为治疗组终末和初始平均肿瘤体积, C_n、C_0为对照组终末和初始平均肿瘤体积。实验数据以mean ± SEM表示, 采用GraphPad Prism 10.4.1软件进行统计分析, 组间比较采用单因素方差分析 (ANOVA), $P < 0.05$认为差异具有统计学意义。

作者贡献: 李宁负责文章初稿的撰写及动物实验的设计; 代兴隆负责合成路线的确证及部分目标化合物的合成; 郝杰负责部分目标化合物的合成; 杨名负责细胞活性测试工作及动物实验; 万升标对实验过程中出现的问题及论文撰写提供了有益的指导, 并负责实验设计和把关、稿件修改等工作。

利益冲突: 本文所有作者声明不存在利益冲突关系。

References

[1] Grem JL. 5-Fluorouracil: Forty-plus and still ticking. A review of its preclinical and clinical development [J]. Invest New Drugs, 2000, 18: 299-313.

[2] Chao YH, Yang GJ, Qi LJ, et al. Research progress on the antitumor effect of 5-fluorouracil and its derivatives [J]. Oncol Prog (癌症进展), 2019, 17: 9-12.

[3] Alzahrani SM, Al Doghaither HA, Al-Ghafari AB, et al. 5-Fluorouracil and capecitabine therapies for the treatment of colorectal cancer (Review) [J]. Oncol Rep, 2023, 50: 175.

[4] Longley DB, Harkin DP, Johnston PG. 5-fluorouracil: Mechanisms of action and clinical strategies [J]. Nat Rev Cancer, 2003, 3: 330-338.

[5] Yang H, Dan YY, Cao F, et al. Synthesis and antitumor activity of novel 5-fluorouracil prodrugs [J]. Northwest Pharm J (西北药学杂志), 2016, 31: 613-615.

[6] Soong R, Shah N, Salto-Tellez M, et al. Prognostic significance of thymidylate synthase, dihydropyrimidine dehydrogenase and

thymidine phosphorylase protein expression in colorectal cancer patients treated with or without 5-fluorouracil-based chemotherapy [J]. Ann Oncol, 2008, 19: 915-919.

[7] Ochiai T, Umeki M, Miyake H, et al. Impact of 5-fluorouracil metabolizing enzymes on chemotherapy in patients with resectable colorectal cancer [J]. Oncol Rep, 2014, 32: 887-892.

[8] Diasio RB, Harris BE. Clinical pharmacology of 5-fluorouracil [J]. Clin Pharmacokinet, 1989, 16: 215-237.

[9] Read OJ, Bré J, Zhang Y, et al. A phosphoramidate modification of FUDR, NUC-3373, causes DNA damage and DAMPs release from colorectal cancer cells, potentiating lymphocyte-induced cell death [J]. PLoS One, 2025, 20: e0331567.

[10] Shelton J, Lu X, Hollenbaugh JA, et al. Metabolism, biochemical actions, and chemical synthesis of anticancer nucleosides, nucleotides, and base analogs [J]. Chem Rev, 2016, 116: 14379-14455.

[11] Wohlhueter RM, McIvor RS, Plagemann PG. Facilitated transport of uracil and 5-fluorouracil, and permeation of orotic acid into cultured mammalian cells [J]. J Cell Physiol, 1980, 104: 309-319.

[12] Cahard D, McGuigan C, Balzarini J. Aryloxy phosphoramidate triesters as pro-tides [J]. Mini Rev Med Chem, 2004, 4: 371-381.

[13] Serpi M, Pertusati F. An overview of Protide technology and its implications to drug discovery [J]. Expert Opin Drug Discov, 2021, 16: 1149-1161.

[14] Mehellou Y. The Protides boom [J]. ChemMedChem, 2016, 11: 1114-1116.

[15] Kirby SA, Dowd CS. Phosphoryl prodrugs: Characteristics to improve drug development [J]. Med Chem Res, 2022, 31: 207-216.

[16] Li WB, Dong FH, Sun CJ. Application of prodrug design in research and development of oral drugs [J]. Prog Pharm Sci (药学进展), 2012, 36: 347-355.

[17] Hostetler KY. Alkoxyalkyl prodrugs of acyclic nucleoside phosphonates enhance oral antiviral activity and reduce toxicity: Current state of the art [J]. Antiviral Res, 2009, 82: A84-98.

[18] Parang K, Wiebe LI, Knaus EE. Novel approaches for designing 5′-*O*-ester prodrugs of 3′-azido-2′, 3′-dideoxythymidine (AZT) [J]. Curr Med Chem, 2000, 7: 995-1039.

[19] Nie B, Jin CF, Zhong WH, et al. Phosphoramidate prodrug strategy and application of ProTide technology in drug research and development [J]. Chin J Org Chem (有机化学), 2017, 37: 2818-2840.

[20] Sun XB, Miao ZW. Application of phosphoramidate prodrug strategy and ProTide technology in antiviral drug research and development [J]. Univ Chem (大学化学), 2020, 35: 35-43.

[21] Brown DG, Park H. Current and emerging prodrug strategies [J]. J Med Chem, 2025, 68: 12369-12391.

[22] Bré J, Dickson AL, Read OJ, et al. The novel anti-cancer fluoropyrimidine NUC-3373 is a potent inhibitor of thymidylate synthase and an effective DNA-damaging agent [J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2023, 91: 401-412.

[23] Li YP, Yang B, Quan YN, et al. Advancement of prodrug approaches for nucleotide antiviral agents [J]. Curr Top Med Chem, 2021, 21: 2909-2927.

[24] Bakheit AH, Darwish H, Darwish IA, et al. Remdesivir [J]. Profiles Drug Subst Excip Relat Methodol, 2023, 48: 71-108.

[25] Jiang LL, Pan T, Lv Q, et al. Novel Protide prodrugs of 5-fluoro-2′-deoxyuridine for the treatment of liver cancer [J]. Eur J Med Chem, 2023, 260: 115763.

[26] Li WB, Dong FH, Sun CJ. Prodrugs of nucleoside drugs and their recent research and development [J]. Prog Pharm Sci (药学进展), 2012, 36: 300-307.