



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101328169 B

(45) 授权公告日 2011.05.25

(21) 申请号 200810125723.9

(22) 申请日 2008.06.18

(66) 本国优先权数据

200710119017.9 2007.06.18 CN

(73) 专利权人 张中能

地址 523871 广东省东莞市长安镇上沙第五  
工业区东阳光科技园

(72) 发明人 S·戈尔德曼 李静 刘遗松

(74) 专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限公司 11002

代理人 王朋飞

(51) Int. Cl.

*C07D 417/04* (2006.01)

*A61K 31/506* (2006.01)

*A61K 31/5377* (2006.01)

*A61P 1/16* (2006.01)

*A61P 31/12* (2006.01)

审查员 冯清伟

权利要求书 3 页 说明书 11 页

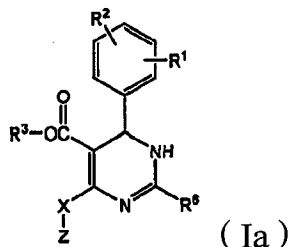
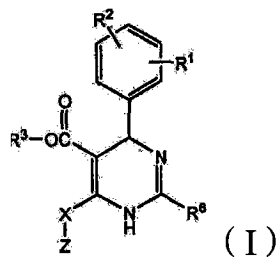
(54) 发明名称

一种乙氧碳酰基-取代噻唑二氢嘧啶

(57) 摘要

本发明涉及一种适于对抗 B 型肝炎病毒 (HBV) 感染的新型乙氧碳酰基-取代噻唑二氢嘧啶, 及其与其他抗病毒剂的组合物。

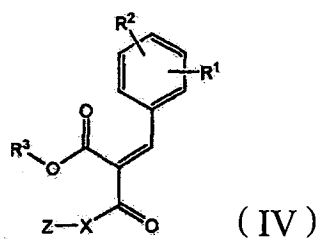
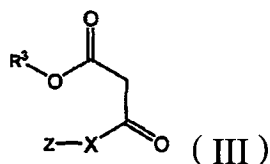
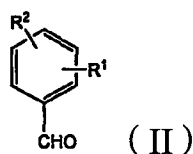
1. 通式 (I) 及其同分异构体 (Ia) 所示的化合物以及它们的盐：



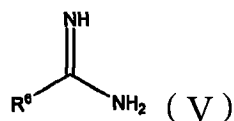
其中： $R^1$  是邻-氯， $R^2$  是对-氯， $R^3$  是  $C_2$  烷基， $R^6$  是噻唑基-2-基，X 是亚甲基，以及 Z 是吗啉基。

2. 制备权利要求 1 所述化合物的方法，其采用如下步骤：

[A] 首先将通式 (II) 所示取代苯甲醛与通式 (III) 所示  $\beta$ -酮酯反应生成通式 (IV) 所示的苯亚甲基化合物：



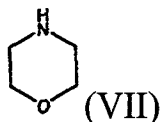
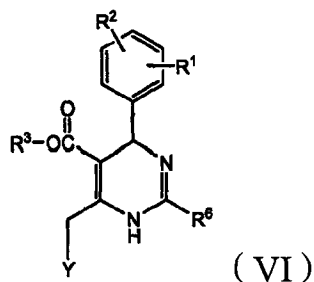
其中： $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、X 和 Z 具有权利要求 1 中所述的含义，且然后将通式 (IV) 所示苯亚甲基化合物与通式 (V) 所示的脒或其盐反应，



其中  $R^6$  具有权利要求 1 中所述的含义；或

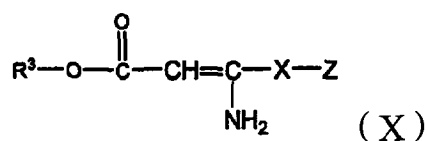
[B] 将通式 (III) 所示化合物同醛 (II) 和脒 (V) 或其盐通过一步法进行反应；或

[C] 将通式 (VI) 所示化合物和吗啉 (VII) 或其盐反应：



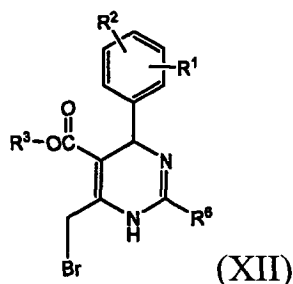
其中,  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$  和  $R^6$  具有上述的含义,  $Y$  是亲核取代基;或

[D] 将通式 (II) 所示醛与通式 (X) 所示化合物及通式 (V) 所示的脒或其盐反应:



其中,  $R^3$ 、 $X$  和  $Z$  具有权利要求 1 中所述的含义。

3. 通式 (XII) 所示的化合物:



其中,  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$  和  $R^6$  具有权利要求 1 中所述的含义, 并且所述化合物用作合成权利要求 1 所述化合物 (I) 或 (Ia) 的中间体。

4. 一种药物, 该药物含有至少一种权利要求 1 所述的化合物。

5. 权利要求 1 所述的化合物在制备治疗病毒性疾病的药物中的用途, 其特征在于, 所述疾病为肝硬化或肝细胞癌变。

6. 权利要求 1 所述的化合物在制备治疗和预防乙型肝炎感染的药物中的用途。

7. 一种药物制剂, 其包含一种或多种权利要求 1 所述的化合物及一种药学上可接受的载体。

8. 一种组合物由下列组分组成:

A) 至少一种如权利要求 1 所述的化合物,

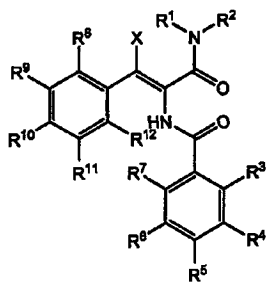
B) 至少一种不同于 A 的 HBV 抗病毒剂, 和

C) 至少一种免疫调节剂。

9. 如权利要求 8 所述的组合物, 其中组分 B 是 HBV 聚合酶抑制剂。

10. 如权利要求 8 所述的组合物, 其中组分 B 是拉米夫定。

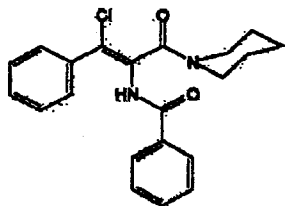
11. 如权利要求 8 所述的组合物, 其中组分 B 选自下述通式所示的化合物及其盐:



其中,  $R^1$  和  $R^2$ , 分别独立地为  $C_1-C_4$ -烷基, 或者与其所在位置上的氮原子一起, 形成具有 5-6 个环原子包括碳和 / 或氧原子的环,

$R^3$  至  $R^{12}$ , 分别独立地为氢, 卤素,  $C_1-C_4$ -烷基,  $C_1-C_4$  烷氧基, 硝基, 氰基或三氟甲基; 且  $X$  是卤素或  $C_1-C_4$ -烷基。

12. 如权利要求 11 所述的组合物, 其中组分 B 具有如下结构:



13. 如权利要求 8 至 12 之任一所述的组合物, 其中免疫调节剂 C 选自干扰素。

14. 一种组合物, 其由下述物质组成:

- A) 权利要求 1 所述的化合物,
- B) 拉米夫定, 和
- C) 干扰素。

15. 一种如权利要求 8 至 14 之任一所述的组合物的制备方法, 其特征在于, 组合或混合组分 A、B 和组分 C。

16. 如权利要求 8 至 14 之任一所述的组合物在制备治疗和预防乙型肝炎感染的药物中的用途。

## 一种乙氧碳酰基 - 取代噻唑二氢嘧啶

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种新的乙氧碳酰基 - 取代噻唑二氢嘧啶,其制备方法及其作为药物,尤其是作为治疗和预防乙型肝炎病毒感染的药物的用途。本发明还涉及这些二氢嘧啶同其他抗病毒剂和,适当情况下,免疫调节剂的组合物,以及含有这些组合物尤其是治疗和预防 HBV 感染诸如乙型肝炎的组合物药物。

### 背景技术

[0002] 乙型肝炎病毒属于肝病毒科。它可引起急性的和或持续 / 渐进的慢性病。B 型肝炎病毒还引起病理形态中的许多其他的临床病征——尤其是肝脏的慢性炎症、肝硬化和肝细胞的癌变。另外,与丁型肝炎的共同感染在疾病的发展过程中会产生不利影响。

[0003] 干扰素和拉米夫定 (lamivudine) 是批准用于治疗慢性肝炎治疗的常规药物。然而,干扰素只具有中等的活性,并具有有害的副反应;虽然拉米夫定 (lamivudine) 具有良好的活性,但其在治疗中抗性发展迅速,并在停止治疗之后常常出现反弹效应,拉米夫定 (lamivudine) (3-TC) 的  $IC_{50}$  值为 300nM (Science, 299 (2003), 893-896)。

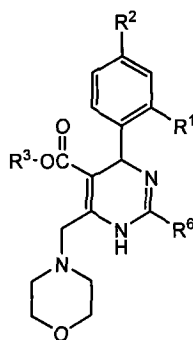
[0004] US 7074784 公开了 6- 胺基烷基二氢嘧啶及其作为药物的应用,尤其是用于治疗 and 预防乙型肝炎病毒感染。

[0005] 该专利公布了 54 个不同的实施例,它们几乎全部 (50 个) 都是在 R6 的位置具有氟取代 2- 吡啶残基的化合物。该专利的所有实施例 (54 个) 中 R3 均为甲基。

[0006] 该专利指出具有较长的烷基连 (如乙基) 的化合物是弱活性或甚至是惰性的。

[0007] 该专利中的具有下述结构的 9 个化合物 (实施例 1, 5, 7, 9, 12, 24, 31, 34, 45) 其中八个具有 6 位的氟取代 2- 吡啶残基。只有一个实施例 (实施例 45) 的  $R^6$  = 噻唑 -2- 基。

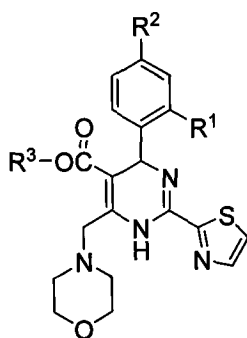
[0008]



### 发明内容

[0009] 我们惊人地发现了具有噻唑 -2- 基取代基 ( $R^6$  = 噻唑 -2- 基) 乙酯 ( $R^3$  = 乙基) 的该专利的实施例 45 ( $R^1$  = 邻 - 氯和  $R^2$  = 对 - 氯), 产生了 3 倍高活性的衍生物, 即  $IC_{50}$  低于 1nM。 (见表 1)

[0010]



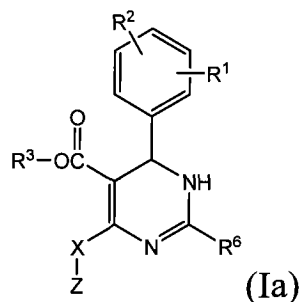
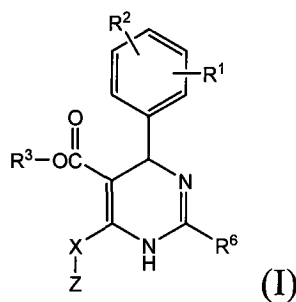
[0011] 表 1

[0012]

实施例	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	IC <sub>50</sub> (nM)
1	Cl	Cl	CH <sub>3</sub>	2
2	Cl	Cl	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub>	0.6

[0013] 因此,本发明涉及通式 (I) 所示的化合物及其同分异构体 (Ia)

[0014]



[0015] 其中

[0016] R<sup>1</sup> 是邻-氯, R<sup>2</sup> 是对-氯, R<sup>3</sup> 是 C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub> 烷基, R<sup>6</sup> 是噻唑-2-基, X 是亚甲基, 和 Z 是吗啉基。

[0017] 优选地,在本发明的通式 (I) 和 (Ia) 所示的化合物中:

[0018] R<sup>1</sup> 是邻-氯, R<sup>2</sup> 是对-氯, R<sup>3</sup> 是乙基, R<sup>6</sup> 是噻唑-2-基, X 是亚甲基, 以及 Z 是吗啉基。

[0019] 本发明还涉及上述化合物的对映异构体及其各自的混合物。外消旋体能够通过已知的手段分离出来,本质上说它是立体异构体中的均一成分。

[0020] 本发明的化合物包含通式 (I) 和 (Ia) 的异构体及其混合物。本发明的化合物也

可以是盐的形式。在本发明中,生理上可接受的盐是优选的。

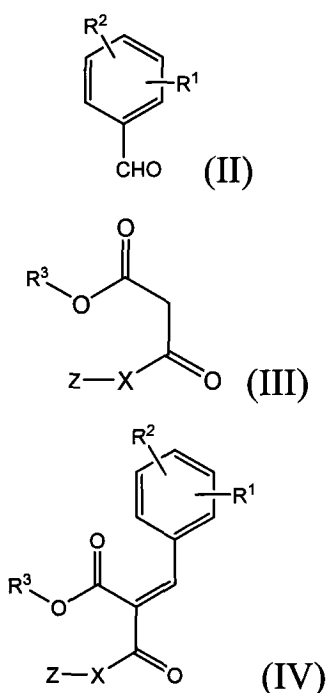
[0021] 生理上可接受的盐可以是无机酸盐或者有机酸盐。优选的是无机酸的盐,诸如,例如盐酸、氢溴酸、磷酸或硫酸等,或者有机羧酸或磺酸,例如醋酸、马来酸、反丁烯二酸、苹果酸、柠檬酸、酒石酸、乳酸、苯甲酸或甲磺酸、乙磺酸、苯磺酸、甲苯磺酸或萘-二磺酸等形成的盐。

[0022] 生理上可接受的盐还可以是本发明化合物的金属盐或者铵盐。尤其优选的实例是钠、钾、镁、或钙盐,以及由氨或有机胺,诸如乙胺,二-或三乙胺,二-或三乙醇胺,二环己基胺,二甲基氨基乙醇,精氨酸,赖氨酸,乙二胺,或 2-苯乙胺等生成的铵盐。

[0023] 本发明的化合物 (I) 可由下述方法制备:

[0024] [A] 首先将苯甲醛 (II) 与通式 (III) 所示的  $\beta$ -酮酯在加入或不加入碱或酸,适当时在惰性有机溶剂存在下进行反应转化成通式 (IV) 所示的苯亚甲基化合物:

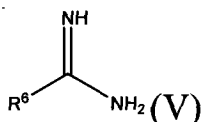
[0025]



[0026] 其中  $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $X$  和  $Z$  的含义如前所述。

[0027] 然后,将后者与通式 (V) 所示的脒或者其盐(诸如,例如盐酸盐或醋酸盐),在加入或不加入碱或酸,适当时在存在惰性有机溶剂的情况下,进行反应

[0028]

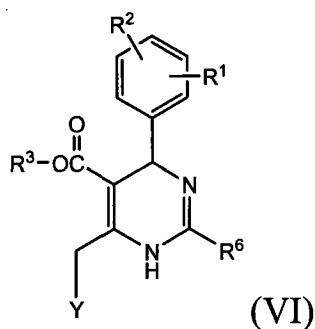


[0029] 其中  $R^6$  含义如前所述,或

[0030] [B] 将通式 (III) 所示化合物同醛 (II) 和脒 (V) 或它们的盐(诸如,盐酸盐或醋酸盐)在加入或不加入碱或酸,适当时在存在惰性有机溶剂的情况下,进行一步反应;或

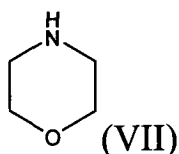
[0031] [C] 当通式 (I) 中的  $X$  是亚甲基,将通式 (VI) 所示化合物

[0032]



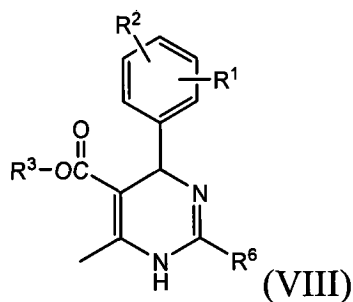
[0033] 其中  $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$  和  $R^6$  含义如前所述, Y 是亲核取代基团, 诸如氯化物, 溴化物, 碘化物, 甲磺酰基或甲苯磺酰基, 与吗啉 (VII)

[0034]



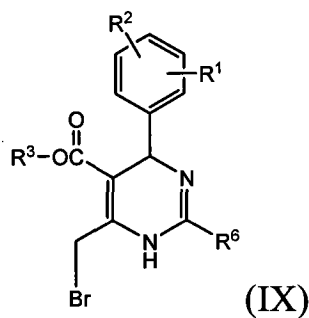
[0035] 在加入或不加入碱, 适当存在惰性溶剂的条件下进行反应。化合物 (VI) 的制备可以通过, 例如, 用通式 (VIII) 所示化合物

[0036]



[0037] 其中  $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$  和  $R^6$  含义如前所述, 和溴化剂诸如, N-溴琥珀酰亚胺, 优选在惰性溶液中进行反应, 得到通式 (IX) 所示化合物

[0038]

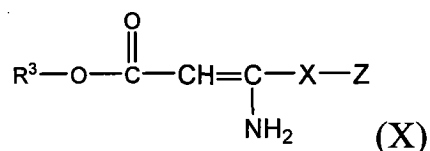


[0039] 将具有亲核取代基团的后者直接或者按照文献中所述的常规方法进一步转变之后, 与吗啉 (VII) 反应。

[0040] [D] 通式 (II) 所示的醛与通式 (X) 所示的化合物, 当适合时在惰性溶剂中反应,

[0041]

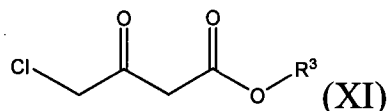




[0042] 其中 R<sup>3</sup>, X 和 Z 含义如前所述, 通式 (V) 所示的脞带有或不带有碱基加成物。

[0043] 为制备本发明的通式 (I) 所示化合物, 其中 X 是亚甲基, Z 是吗啉基, 可将通式 (XI) 所示的氯乙酸酯与吗啉 (VII) 反应来制备相应的 β-酮羧酸酯 (III)

[0044]



[0045] 其中 R<sup>3</sup> 含义如前所述。

[0046] 作为起始原料的 2-氯-4-氟-苯甲醛 (II) 可通过商业途径获得。

[0047] 用作起始原料的 β-酮羧酸酯 (III) 是公知的, 或者是能够从文献公布的已知方法中类推制得的 [如, D. Borrmann, "Umsetzung von Diketen mit Alkoholen, Phenolen und Mercaptanen", in "Methoden der organischen Chemie" (Houben-Weyl), vol. VII/4, 230ff (1968); Y. Oikawa, K. Sugano und O. Yonemitsu, J. Org. Chem. 43, 2087 (1978)]。

[0048] 化合物 (V) 是已知的, 并可根据 WO-A-99/54326 和 WO-A-99/54329 的描述来制备。

[0049] 吗啉 (VII) 可通过商业途径获得。

[0050] 化合物 (VIII) 和 (X) 可根据 WO-A-99/54326 中描述的步骤 [A] 或 [B] 制得。

[0051] 所有的情性有机溶剂都适用于 A、B、C 和 D 步骤。其中优选的包括醇如, 甲醇、乙醇、异丙醇, 醚如二恶烷、二乙醚、四氢呋喃、乙二醇单甲醚, 乙二醇二甲醚, 羧酸诸如冰醋酸、或二甲基甲酰胺、二甲基亚砷、乙腈、吡啶和六甲基磷酰三胺。

[0052] 反应温度可以在相当宽的范围内变化。通常使用 20 到 150°C 之间的温度, 但优选的是在所选溶剂的沸点温度。

[0053] 反应可以在大气压下进行, 也可以在高压下进行。通常在大气压下进行。

[0054] 反应可以在加入或者不加入酸或者碱的环境下进行; 但是, 在弱酸诸如醋酸或者蚁酸等的存在下进行反应是较好的。

[0055] 本发明的一种实施方案涉及含有 A) 至少一种上述的二氢嘧啶, B) 至少一种与 A) 不同的其他抗病毒剂的组合物。

[0056] 本发明的一个详细的实施方案涉及含有 A) 上述二氢嘧啶, B) HBV 聚合酶抑制剂和, 和合适的情况下, C) 免疫调节剂的组合物。

[0057] 优选的免疫调节剂 C) 包括, 例如, 所有的干扰素诸如 α-, β- 和 γ- 干扰素, 尤其是 α-2a- 和 α-2b- 干扰素, 白细胞介素诸如白细胞介素-2, 多肽诸如胸腺素-α-1 和胸腺托南 (thymoctonan), 咪唑喹啉衍生物诸如®左咪唑, 免疫球蛋白和治疗疫苗。

[0058] 因此, 本发明还涉及用于治疗 and 预防 HBV 感染的这些组合物及其在治疗 HBV 引发的疾病上的用途。

[0059] 相对于单一化合物的单一治疗, 本发明组合物的使用对治疗 HBV 引发的疾病是有益的, 主要是协同的抗病毒活性, 以及相对于单个成分的 Tox-50 (有 50% 的细胞存活的毒

性范围)来说,本发明的组合物具有良好的耐受性。

[0060] 用于实现本发明目的的 HBV 聚合酶抑制剂 B 为在 Ph. A. Furman 等在《抗微生物制剂与化疗方法》(Antimicrobial Agents and Chemotherapy) Vol. 36 (No. 12), 2688 (1992) 中的内生聚合酶实验中揭示的那些物质,以及那些在下文中描述的,抑制 HBV DNA 双链的形成,从而导致最大 50% 活性值为零的那些物质。

[0061] 来自培养悬浮液的 HBV 毒粒在体外将核苷 5' - 三磷酸盐整合到 HBV 的 DNA 正链中。通过使用琼脂糖凝胶电泳,发现其中存在 [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-脱氧核苷 5' - 三磷酸盐掺入到病毒 3.2kb DNA 中的产物,不存在具有潜在 HBV 聚合酶-抑制性质的物质。从 HepG2. 2.15 细胞的细胞培养悬浮物中,用聚乙二醇沉淀、浓缩得到 HBV 毒粒。1 体积份的澄清细胞培养悬浮物与 1/4 体积份的含有 50% (重量) 聚乙二醇 8000 和 0.6M 氯化钠的水溶液混合。2500×g 离心沉淀 15 分钟,沉淀物用 2ml 含有 0.05M tris-HCl M (pH 7.5) 的缓冲液再悬浮,用含有 100mM 氯化钾的该缓冲液透析。样品在 -80℃ 时冷冻。每个反应混合物 (100  $\mu$ l) 含有至少 10<sup>5</sup> HBV 毒粒、50mM tris-HCl (p. sub. H 7.5)、300mM 氯化钾、50mM 氯化镁、0.1%  $\text{®}$  Nonident P-40 (非离子型洗涤剂, Boehringer Mannheim)、10  $\mu$  M dATP, 10  $\mu$  M dGTP, 10  $\mu$  M dTTP; 10  $\mu$  Ci [<sup>32</sup>P]dCTP (3000Ci/mmol; 最终浓度为 33nM) 和 1  $\mu$  M 三磷酸形式的聚合酶潜在抑制剂。样品在 37℃ 下培养一个小时,然后加入 50mM EDTA 中止反应。加入 10% 重量/体积 SDS 溶液 (每 90ml 水含有 10g SDS) 到终浓度为 1% (体积) (基于溶液总体积),加入蛋白酶 K 至最终浓度为 1mg/ml。然后在 37℃ 温育 1 小时,用等体积的苯酚/氯仿/异戊醇 (体积比为 25 : 24 : 1) 溶液提取, DNA 从含有乙醇的水相中沉淀出来。将 DNA 小球悬浮在 10  $\mu$ l 凝胶缓冲液 (1 升水中含有 10.8g tris、5.5g 硼酸和 0.75g EDTA (= TBE buffer)) 中,并用琼脂糖凝胶电泳分离。将其中的凝胶干燥或者采用 Southern 转化技术将其中的核酸转变成膜。然后与阴性对照 (= 与空白或惰性对照物进行 endo-pol 反应) 比较来检测生成的标记 DNA 双链的量。如果存在对照组的最大 50% 浓度则表明存在 HBV 聚合酶抑制剂。

[0062] 优选的 HBV 聚合酶抑制剂 B) 包括,例如, 3TC = 拉米夫定 (lamivudine) = 4-氨基 -1-[ (2R- 顺式) -2-( 羟甲基) -1.3- 氧硫茂 -5- 基 ] - 嘧啶 -2(1H) - 酮, cf. EP-B 382 526 (= U. S. Pat. No. 5, 047, 407) 和 W091/11186 (= U. S. Pat. No. 5, 204, 466);

[0063] 阿德福韦酯 (Adefovir dipivoxil) = 9-[2-[双(特戊酰羟甲氧基)磷酰甲氧基]乙基]腺嘌呤, cf. EP-B 481 214 (= U. S. Pat. Nos. 5, 663, 159 和 5, 792, 756), U. S. Pat. Nos. 4, 724, 233 和 4, 808, 716;

[0064] BMS 200475 = [1S-(1..alpha., 3..alpha., 4..beta.)]-2-氨基 -1.9- 二氢 -9-[4-羟基 -3-(羟甲基) -2-亚甲基 -环戊基] -6H- 嘌呤 -6- 酮, cf. EP-B 481754 (= U. S. Pat. Nos. 5, 206, 244 和 5, 340, 816), W0 98/09964 和 99/41275;

[0065] 阿巴卡韦 (Abacavir) = (-)-(1S- 顺式) -4-[2-氨基 -6-(环丙胺) -9H- 嘌呤 -9- 基] -2-基 -环戊烯 -1- 甲醇, cf. EP-B 349242 (= U. S. Pat. No. 5, 049, 671) 和 EP-B 434450 (= U. S. Pat. No. 5, 034, 394);

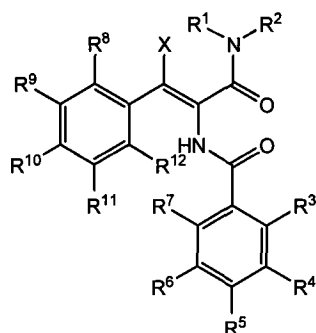
[0066] FTC = (2R- 顺式) -4-氨基 -5-氟 -1-[2-(羟甲基) -1.3- 氧硫茂 -5- 基] -p- 嘧啶 -2(1H) - 酮, cf. W0 92/14743 (= U. S. Pat. Nos. 5, 204, 466; 5, 210, 085; 5, 539, 116; 5, 700, 937; 5, 728, 575; 5, 814, 639; 5, 827, 727; 5, 852, 027; 5, 892, 025; 5, 914, 331; 5, 914, 400) 和 W0 92/18517;

[0067]  $\beta$ -L-FDDC = 5-(6-氨基-2-氟-9H-嘌呤-9-基)-四氢-2-呋喃甲醇, cf. WO 94/27616 (= U. S. Pat. Nos. 5, 627, 160 ; 5, 561, 120 ; 5, 631, 239 和 5, 830, 881) ; L-FMAU = 1-(2-脱氧-2-氟-.beta.-L-阿拉伯呋喃糖)-5-甲基-嘧啶 e--2.4(1H, 3H)-二酮, cf. WO 99/05157, WO 99/05158 和 U. S. Pat. No. 5, 753, 789.

[0068] 本发明的一个更优选的实施方案涉及含有 A) 上述二氢嘧啶 (I) 和 (Ia) 及 B) 拉米夫定 (lamivudine) 的组合物。

[0069] 另一个优选的 HBV 抗病毒剂 B 含有, 例如, 下述通式所示的苯基丙烯酰胺

[0070]

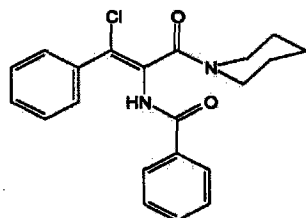


[0071] 其中

[0072]  $R^1$  和  $R^2$ , 分别独立地为,  $C_1-C_4$ -烷基或者, 与其所在位置上的氮原子一起, 形成具有 5-6 个环原子包括碳和 / 或氧原子的环。  $R^3$  至  $R^{12}$ , 分别独立地为氢, 卤素,  $C_1-C_4$ -烷基, 任意的取代  $C_1-C_4$ -烷氧基, 硝基, 氰基或三氟甲基。  $R^{13}$  是氢,  $C_1-C_4$ -烷基,  $C_1-C_7$ -酰基或芳烷基, 且 X 是卤素或任意的取代  $C_1-C_4$ -烷基。

[0073] 这些苯基丙烯酰胺及其制备方法已在 WO 98/33501 中公开, 这里提及是为了公开的目的。 AT-61 是化合物

[0074]



[0075] 优选的免疫调节剂 C) 包括例如, 所有的干扰素,  $\alpha$ -、 $\beta$ - 和  $\gamma$ -干扰素, 尤其还可以是  $\alpha$ -2a- 和  $\alpha$ -2b-干扰素, 白细胞介素如白细胞介素-2, 多肽如胸腺素- $\alpha$ -1 和胸腺托南 (thymoctonan), 咪唑啉衍生物如左咪唑, 免疫球蛋白和治疗疫苗。

[0076] 本发明的另一个优选的实施方式涉及含有 A) 上述二氢嘧啶 (I) 和 (Ia) ; B) 拉米夫定 (lamivudine) ; 以及合适的情况下 C) 干扰素的组合物。

[0077] 实验描述

[0078] 基于 M. A. Sells Proc. Natl. Acad. Sci. 84, 10051009 (1987) 以及 B. E. Korba 等., Antiviral Research 19, 5570 (1992) 等描述的方法研究本发明的化合物对乙型肝炎病毒的抗病毒作用。

[0079] 抗病毒测试在 96-孔微量滴定板上进行。第一直列只接受培养基和 HepG2. 2. 15 细胞, 作为病毒对照。

[0080] 将测试化合物的母液 (50mM) 先溶解在 DMSO 中, 然后用 HepG2. 2. 15 培养基稀释。通常每次用移液管移取 100  $\mu$  M 测试浓度 (1st 测试浓度) 的本发明化合物到微量滴定板的第二测试列, 然后在加入 2% 重量胎牛血清 (体积 25  $\mu$  l) 的培养基中分两步稀释 210 倍。

[0081] 微量滴定板的每个加入了 2% 重量胎牛血清的培养基的孔中都含有 225  $\mu$  l HepG2. 2. 15 细胞悬浮液 ( $5 \times 10^4$  cells/ml)。37°C、5% CO<sub>2</sub>(v/v) 培养测试混合物 4 天。

[0082] 然后将表面悬浮物吸出丢弃, 向孔中加入 225  $\mu$  l 新制备的培养基。重新加入 25  $\mu$  l 体积的 1/10 浓度的本发明化合物的溶液。混合物继续培养 4 天。

[0083] 在收集悬浮物测试抗病毒效果之前, 先在光学显微镜下或者通过生物化学检测方法 (例如 Alamar Blue stain 或 Trypan Blue stain) 检测 HepG2. 2. 15 细胞细胞毒素的变化。

[0084] 收集表面悬浮物和 / 或细胞并用抽真空的方法在 96-孔斑点室上覆盖一层尼龙膜 (根据制造商的信息)

[0085] 细胞毒素的测定

[0086] 检测 HepG2. 2. 15 细胞中物质引发的细胞毒素或抑制细胞的变化, 例如, 在光学显微镜下细胞形态的改变。HepG2. 2. 15 细胞的这些物质引发的变化与未处理过的细胞相比起来是明显的, 例如, 细胞溶解, 液泡或者细胞形态的改变。50% 毒性 (Tox. -50) 是指与相应的对照细胞相比 50% 的细胞表现出一种形态学。

[0087] 通过其他的宿主细胞诸如, 例如 HeLa 细胞, 初级人外周造血细胞或转化细胞系如 H-9 细胞上测试本发明的一些化合物的耐受性。

[0088] 在本发明的化合物浓度 > 10  $\mu$  M 时没有检测到细胞毒素的改变。

[0089] 抗病毒作用的测定

[0090] 在将表面悬浮物或溶解的细胞转移到点装置 (如上述) 的尼龙膜上之后, 将 HepG2. 2. 15 细胞的胞内或胞外悬浮物变性 (1.5M NaCl/0.5N NaOH), 中和 (3M NaCl/0.5M Tris HCl, pH 7.5), 然后冲洗 (2 $\times$ SSC)。通过在 120°C 下温育过滤器 2-4 小时, 将 DNA 烘干至膜上。

[0091] DNA 杂交

[0092] 通常通过非放射性, 地高辛 - 标记的乙型肝炎 - 特异性 DNA 探针检测来自尼龙过滤器上已处理的 HepG2. 2. 15 细胞的病毒 DNA, DNA 探针用地高辛标记, 并且根据制造商的说明书进行纯化和杂交。

[0093] 预杂交和杂交在 5 $\times$ SSC, 1 $\times$  封闭试剂, 0.1% (重量) N-月桂酰肌氨酸, 0.02% (重量) SDS 和 100  $\mu$  g 鲑鱼精 DNA 中进行。预杂交在 60°C 进行 30 分钟, 然后与 20 至 40ng/ml 地高辛标记的、变性的 HBV- 特异性 DNA (14 小时, 60°C) 进行特定杂交。洗涤过滤器。

[0094] 用地高辛抗体检测 HBV-DNA

[0095] 按照造制造商的说明进行地高辛 - 标记 DNA 的免疫检测:

[0096] 洗涤过滤器在封闭试剂中杂交 (依照制造商的说明)。然后利用与碱性磷酸酶耦合的抗 -DIG 抗体杂交 30 分钟。在洗涤步骤之后, 加入碱性磷酸酶的底物, CSPD, 与过滤器一起温育 5 分钟, 然后包上塑料膜, 37°C 下另外 15 分钟。将过滤器曝光在 X 射线层下, 可看见乙型肝炎 DNA 的发光信号 (温育取决于信号强度: 10 分钟至 2 小时)。

[0097] 最大半抑制浓度 (IC<sub>50</sub>, 50% 抑制浓度) 为与未处理样本相比本发明化合物降低

50%胞内或胞外乙肝病毒群的浓度。

[0098] 本发明的化合物表现出  $IC_{50}$  低于 1nM 的有效的抗病毒作用,这是没有预料到的。因此,本发明的化合物适用于病毒引发的疾病尤其是急性和慢性持续的 HBV 病毒感染的治疗。HBV 引发的慢性病毒病可能导致病态变得严重,慢性乙型肝炎病毒感染在许多情况下可导致肝硬化和 / 或肝细胞癌变。

[0099] 对本发明的化合物来说,可能被提及的指示区域是,例如:可能导致传染性肝炎的急性和慢性病毒感染的治疗,例如,乙肝病毒感染。本发明的化合物尤其适合治疗慢性乙肝感染和急性和慢性乙肝病毒感染。

[0100] 本发明包括药物制剂,除了无毒,惰性的制药学上合适的载体之外,还含有一种或多种本发明的化合物 (I) 或 (Ia) 或组合物或含有一种或多种活性成分 (I) 或 (Ia) 或本发明的组合物。

[0101] 用于上述药物制剂中的活性成分 (I) 和 (Ia),其浓度相对于整个混合物约为 0.1 至 99.5% (重量),优选约为 0.5 至 95% (重量)。

[0102] 上述药物制剂也可以包含化合物 (I) 和 (Ia) 以外的其他活性药物成分。

[0103] 本发明的组合物中组分 A、B 和合适的 C 的含量比例可以在较宽的限制范围内变化,优选 5-500mg 的 A/10-1000mg 的 B,尤其是 10-200mg 的 A/20-400mg 的 B。

[0104] 组分 C,适当的时候也可使用,其用量优选 1 至 10 百万,更优选 2 至 7 百万, I. U. (国际单位),在超过一年的时期内每周 3 次。

[0105] 用于上述药物制剂的本发明的化合物或组合物,其浓度相对于整个混合物通常为约 0.1% 至 99.5%,优选约 0.5% 至 95%, (重量百分比)。

[0106] 上述药物制剂可以通过公知的常规方法来制备,例如将活性成分和载体混合。

[0107] 无论是在人体还是在兽医学上每 24 小时服用总剂量为约 0.05 至约 500,优选 0.1 至 100mg/kg 体重的活性成分已经被普遍证明是有益的,合适单剂量的多次服用,可以达到理想的效果。单剂量含有的活性成分优选在总量约 0.1 至约 80,优选 0.1 至 30mg/kg 体重。无论如何,尤其是根据待治疗受试者的种类和体重,病症的特性和严重程度,制剂的类型,药物服用的方式以及药物服用的时间或间隔来改变上述的剂量是必要的。

[0108] 因此,本发明还涉及用于控制疾病的上述化合物和组合物。

[0109] 本发明还涉及至少含有一种上述化合物或组合物和适当的情况下,含有一种或几种其他活性药物成分的药物。

[0110] 本发明还涉及,用于上述化合物和组合物用于制备治疗和预防上述疾病尤其是病毒性疾病特别是乙型肝炎的药物的用途。

[0111] 除特别指明的外,下述实施例中的百分数均是重量百分数。混合溶液中溶剂的比例均指体积比。

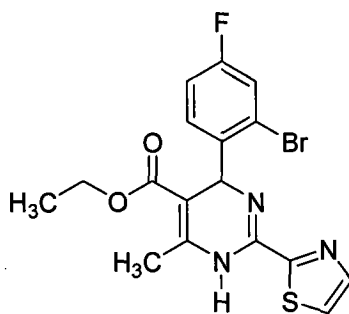
[0112] 实施例

[0113] A. 中间体

[0114] 实施例 1

[0115] 乙基 4-(2,4-二氯苯基)-2-(噻唑-2-基)-6-甲基-1,4-二氢嘧啶-5-羧酸酯

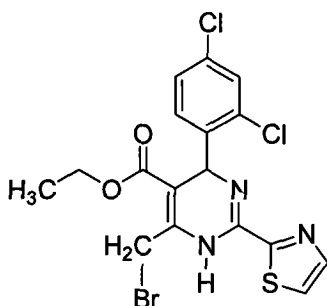
[0116]



[0117] 将 10.0g(57.1mmol) of 2,4-二氯苯甲醛, 7.4g(57.1mmol) 乙基乙酰乙酸, 9.3g(57.1mmol) 2-脞基-噻唑盐酸盐和 5.7g(69.5mmol) 醋酸钠溶解或悬浮于 500ml 乙醇中沸腾回流 16 小时。冷却至室温, 抽气过滤, 水洗残渣去除无机盐。得产物 11.8g(52.5%) 熔点: 164-166°C。

[0118] 实施例 2

[0119] 乙基 6-溴甲基 4-(2,4-二氯苯基)-2-(噻唑-2-基)-1,4-二氢嘧啶-5-羧酸酯  
[0120]



[0121] 将实施例 1 制得的 8.0g(20.2mmol) 乙基 4-(2,4-二氯苯基)-2-(噻唑-2-基)-6-甲基-1,4-二氢嘧啶-5-羧酸酯加入到 140ml 四氯化碳中, 氩气氛围下加热至 50°C, 得到澄清溶液。在此温度, 加入 4.36g(24.2mmol) N-溴琥珀酰亚胺, 保持在该温度混合 10 分钟。立刻冷却, 室温下抽气过滤, 减压浓缩。HPLC 检测产物纯度高于 90%, 并作为下一步的原料。

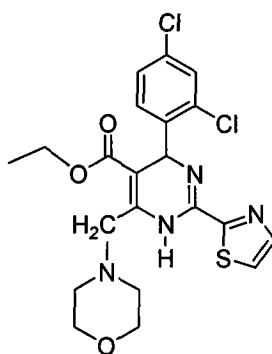
[0122]  $R_f = 0.68$  (石油醚 / 乙酸乙酯 = 8 : 2)

[0123] B. 制备实施例

[0124] 实施例 3

[0125] 乙基 4-(2,4-二氯苯基)-2-(噻唑-2-基)-6-(4-吗啉甲基)-1,4-二氢嘧啶-5-羧酸酯

[0126]



[0127] 将 5.0g 实施例 2 新制备的乙基-6-溴甲基-4-(2-氯 4-氯苯基)-2-(噻

唑-2-基)-1,4-二氢嘧啶-5-羧酸酯加入到 60ml 甲醇中形成溶液,同 5 倍量的吗啉混合,室温下搅拌 30 分钟。溶液用水稀释,乙酸乙酯萃取。

[0128] 产量:4.1g

[0129] 熔点:155-157°C。

[0130]  $R_f = 0.48$  (石油醚 / 乙酸乙酯 = 8 : 2)

[0131] 实施例 3 制得的对映异构体在手性柱 (Daicel Chiralpak AS-H, 流动相:正己烷 / 乙醇 = 99/1) 上分离

[0132] 实施例 3 中的抗-HBV 活性化合物均是保留时间较长的对映体。

[0133] 本发明的化合物的活性数据列表如下:

	实施例 No.	IC <sub>50</sub> (nM)
[0134]	3	0.6
	(-)-3	0.3

[0135] 使用本发明的化合物治疗乙型肝炎病毒产生的 HepG2. 2. 15 细胞导致了胞内和 / 或胞外病毒 DNA 的减少。