



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101293830 B

(45) 授权公告日 2011.08.24

(21) 申请号 200810062547.9

(22) 申请日 2008.06.24

(73) 专利权人 温州医学院

地址 325035 浙江省温州市茶山高教园区

(72) 发明人 李校堃 张丽娟 李海波 董建勇

巫秀美 黄可新 赵昱 瞿佳

(51) Int. Cl.

C07C 69/65 (2006.01)

C07C 69/738 (2006.01)

C07D 307/54 (2006.01)

A61K 31/216 (2006.01)

A61K 31/341 (2006.01)

A61P 1/16 (2006.01)

A61P 31/12 (2006.01)

审查员 王加松

权利要求书 1 页 说明书 12 页

(54) 发明名称

1-氧-[3-芳基取代-烯丙酰]奎尼酸类化合物及用途

(57) 摘要

本发明涉及一种式(I)所示的1-氧-[3-芳基取代-烯丙酰]奎尼酸类化合物及用途,本发明还涉及这些化合物的制备方法及其中间体式(II)化合物即1-氧-[3-芳基取代-烯丙酰]-3,4-氧-异丙叉奎尼酸-1,5-内酯,本发明同时还涉及这些化合物的药物用途和含有该类化合物的药物组合物。本发明的式(I)和式(II)化合物及其可药用盐具有抑制乙型肝炎病毒DNA复制和降低乙肝病毒表面抗原表达的功能,因此,式(I)和式(II)化合物可以预期用于制备防治乙肝病毒感染性疾病的药物应用。

1. 一种 1-氧-[3-芳基取代-烯丙酰]-3,4-氧-异丙叉奎尼酸-1,5-内酯或其可药用盐,其特征为所述 1-氧-[3-芳基取代-烯丙酰]-3,4-氧-异丙叉奎尼酸-1,5-内酯是选自下列化合物:

II-a. 1-氧-[3-(2,6-二氯苯)-烯丙酰]-3,4-氧-异丙叉奎尼酸-1,5-内酯;

II b. 1-氧-[3-(2,4-二氯苯)-烯丙酰]-3,4-氧-异丙叉奎尼酸-1,5-内酯;

II-c. 1-氧-(3-苯甲酰基-烯丙酰)-3,4-氧-异丙叉奎尼酸-1,5-内酯;

II-d. 1-氧-[3-(2-呋喃基)烯丙酰]-3,4-氧-异丙叉奎尼酸-1,5-内酯。

2. 根据权利要求 1 的 1-氧-[3-芳基取代-烯丙酰]-3,4-氧-异丙叉奎尼酸-1,5-内酯或其可药用盐用于制备治疗乙型病毒性肝炎的药物用途,其特征为该类药物具有降低乙型肝炎病毒表面抗原表达的功效。

3. 一种用于制备治疗乙型病毒性肝炎药物的药物组合物,其含有治疗有效量的作为活性成分的根据权利要求 1 的化合物或者它们的混合物,以及它们的可药用盐和可药用辅料。

4. 根据权利要求 3 的药物组合物,其剂型是注射剂、片剂、胶囊剂、气雾剂、栓剂、膜剂、滴丸剂、外用搽剂,或控释或缓释或纳米制剂。

1-氧-[3-芳基取代-烯丙酰]奎尼酸类化合物及用途

技术领域

[0001] 本发明涉及有机化学、药物化学和药理学领域,具体而言,本发明涉及一类式(I)所示结构的1-氧-[3-芳基取代-烯丙酰]奎尼酸类化合物和其中间体式(II)化合物,即1-氧-[3-芳基取代-烯丙酰]-3,4-氧-异丙叉奎尼酸-1,5-内酯,和它们的可药用盐以及它们的制备方法和医药用途。该类化合物被发现具有降低乙肝病毒表面抗原(HBsAg)表达、抑制乙型肝炎病毒DNA(HBV DNA)复制的功能;可以预期用于制备治疗相关的乙肝病毒感染性疾病药物的用途。

背景技术

[0002] 病毒感染引起人和动物多种疾病,严重危害健康和生命,约60%的传染病是由病毒引起的。迄今,全世界发现的病毒已经达3000多种,新的病毒不断被发现。20世纪80年代医学家发现的人类免疫缺陷病毒(HIV)所致艾滋病是危害性极大,死亡率很高的传染病。2003年又发现了一种由新的冠状病毒所致严重急性呼吸道综合征(severe acute respiratory syndrome, SARS),具有高度传染性,致死率高。然而目前对病毒性疾病的治疗仍缺乏专属性强的药物,理想的抗病毒药物应是仅干扰病毒的复制而不影响正常细胞的代谢,但是由于病毒和宿主细胞相互作用的复杂性,大多数抗病毒的药物在发挥治疗作用时,对人体易产生毒性。或者药物本身抗病毒作用较低而无法达到抑制的作用。因此,寻找和发现新的选择性高的强效抗病毒药物是世界范围内的研究热点。我们也致力于抗病毒药物的研究。

[0003] 乙型病毒性肝炎(Hepatitis B)是中国多发和常见重型传染性疾病,其病原体是乙型肝炎病毒(HBV)。全国约1.2亿HBV携带者,每年死于原发性肝癌的15万人中,绝大多数与乙型肝炎感染有关。目前,临床上对HBV病患的治疗方案只能达到抑制HBV复制和继发感染,最主要药物仍是核苷类药物如拉米呋啶(3-TC)、恩替卡韦、阿德福韦(ADV)等,它们虽然能有效地控制病情,但一则售价昂贵,二则长期使用均可出现耐药性,以及不同程度的反跳,三是长期使用核苷类药物出现的较为明显的众所周知的不良作用。所以从民族民间长期使用的药物中发现新的非核苷类乙肝病毒抑制剂有着很大的意义,选择乙肝病毒抑制剂主要的判断指标在于该类新颖的非核苷类药物必须具有对乙肝病毒脱氧核糖核酸(HBV DNA)和/或乙肝表面抗原(HBsAg)的抑制活性。

[0004] 单咖啡酰奎尼酸类在植物界分布较广,最常见的是5-氧-咖啡酰奎尼酸,即氯原酸。另外在奎尼酸的1位,3位和4位被咖啡酰基单取代的咖啡酰奎尼酸类化合物也在植物中分离得到,此类化合物与氯原酸一样具有对HIV抑制等活性。5-氧-没食子酰奎尼酸(5-O-galloylquinic acid)是一类生理活性很强的化合物,其被陆续发现和报道出的活性包括:病毒转录酶抑制剂[*Medicinal Chemistry Research*(1997),7(3),168-179]、脂肪酶抑制剂[W02006022227]、对体外培养小鼠B-16黑色素瘤细胞株之黑色素生成的抑制活性[Saengyak Hakhoechi(2004),35(2),157-163]、抗氧化[*Free Radical Research*(2004),38(1),97-103; *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*(2003),67(2),

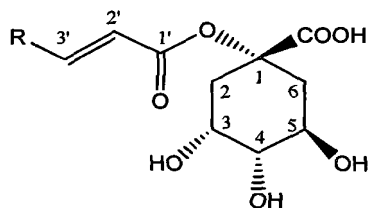
396-401 ;Phytotherapy Research(1998),12(3),159-162] 等。1-氧-咖啡酰奎尼酸(1-O-Caffeoylquinic acid) 近来也有报道从 *Foeniculumvulgare* 分离得到 [Parejo I 等, Separation and characterization of phenolic compounds in fennel(*Foeniculum vulgare*) using liquid chromatography-negative electrospray ionization tandem mass spectrometry, J Agric Food Chem, (2004),52(12),3679]。

[0005] 考虑到抗 HIV 药物和 HBV 药物的高同源性,并为寻找更多样的能对乙肝病毒复制产生抑制作用的 1-氧-取代酰基-奎尼酸及其类似物,本发明对上述化合物进行了合成和结构改造,即在奎尼酸 1 位引入与咖啡酰基类似的取代咖啡酰基,再引入五元杂环烯丙酰基和苯甲酰烯丙酰基等。由此制备出一系列 1-氧-[3-芳基取代-烯丙酰]奎尼酸类化合物,并测试了其对于 HBVDNA 和 HBsAg 的抑制活性,据此完成本发明。

发明内容

[0006] 本发明的目的在于提供一类新的抗乙肝病毒药物,具体而言,本发明提供了一类式 (I) 所示结构的 1-氧-[3-芳基取代-烯丙酰]奎尼酸类化合物及其可药用盐:

[0007]



[0008] 式 (I)

[0009] 其中 :R 是苯甲酰基,取代或未取代的苯环或五元芳杂环;所述苯环或五元芳杂环上的取代基可以相同或不同,分别选自氢,羟基,卤素,含 1~8 个碳的烷氧基,其条件是:

[0010] 当 R 为苯环时,苯环上的取代基不能全为氢,也不能是 4-羟基取代或 3,4-二羟基取代或 3,5-二羟基取代或 3,4-二甲氧基取代,还不能是 3-甲氧基-4-羟基取代。

[0011] 本发明的另一目的是提供了式 (I) 化合物的制备方法。

[0012] 本发明的又一目的是提供了式 (I) 化合物的用于制备抗乙肝病毒药物的用途。

[0013] 本发明的再一个目的是提供了一种含有式 (I) 化合物的用于抗乙肝病毒疾病的药物组合物。根据本发明,该药物组合物中可加入各种药用赋形剂,添加剂及载体。

[0014] 本发明优选的式 (I) 化合物列举如下:

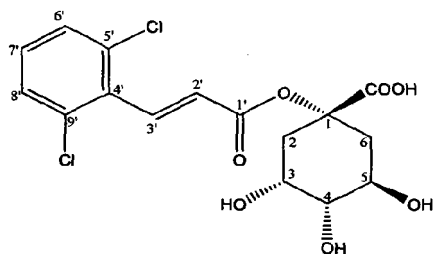
[0015] I-a. 1-氧-[3-(2,6-二氯苯)-烯丙酰]-奎尼酸;

[0016] I-B. 1-氧-[3-(2,4-二氯苯)-烯丙酰]-奎尼酸;

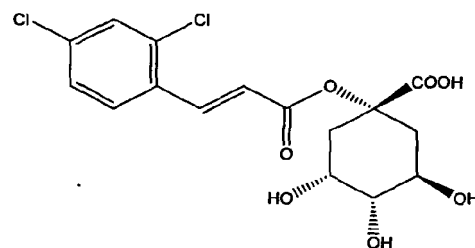
[0017] L-c. 1-氧-(3-苯甲酰基-烯丙酰)-奎尼酸;

[0018] I-d. 1-氧-[3-(2-呋喃基)-烯丙酰]-奎尼酸。

[0019]

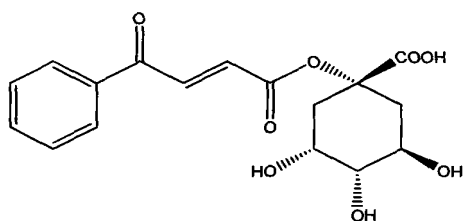


I-a

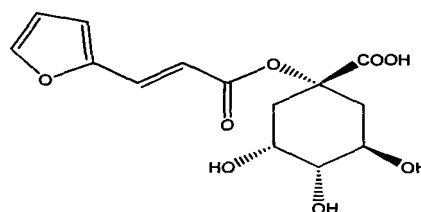


I-b

[0020]



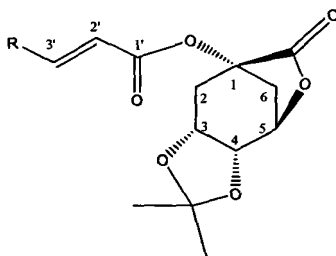
I-c



I-d

[0021] 此外,本发明提供了一种具有式(II)所示的制备式(I)化合物的关键中间体
1-氧-[3-芳基取代-烯丙酰]-3,4-氧-异丙叉奎尼酸-1,5-内酯及其可药用盐:

[0022]



[0023] 式(II)

[0024] 其中:R是苯甲酰基,取代或未取代的苯环或五元芳杂环;所述苯环或五元芳杂环上的取代基可以相同或不同,分别选自氢,羟基,卤素,含1~8个碳的烷氧基,其条件是:

[0025] 当R为苯环时,苯环上的取代基不能全为氢,也不能是4-羟基取代或3,4-二羟基取代或3,5-二羟基取代或3,4-二甲氧基取代,还不能是3-甲氧基-4-羟基取代。

[0026] 本发明优选的式(II)化合物选自:

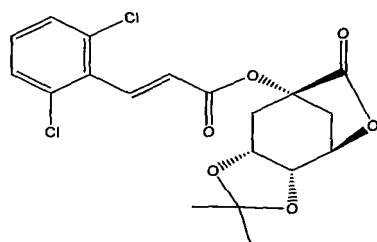
[0027] II-a. 1-氧-[3-(2,6-二氯苯)-烯丙酰]-3,4-氧-异丙叉奎尼酸-1,5-内酯;

[0028] VII-b. 1-氧-[3-(2,4-二氯苯)-烯丙酰]-3,4-氧-异丙叉奎尼酸-1,5-内酯;

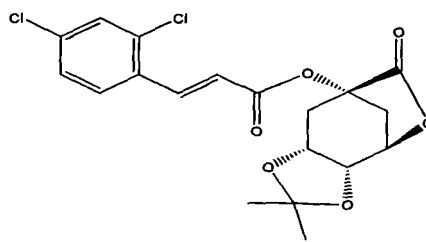
[0029] II-c. 1-氧-(3-苯甲酰基-烯丙酰)-3,4-氧-异丙叉奎尼酸-1,5-内酯;

[0030] VII-d. 1-氧-[3-(2-呋喃基)烯丙酰]-3,4-氧-异丙叉奎尼酸-1,5-内酯。

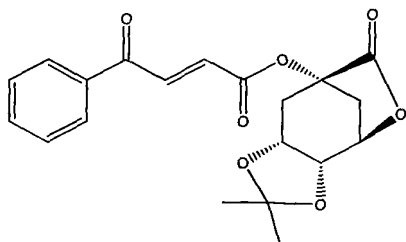
[0031]



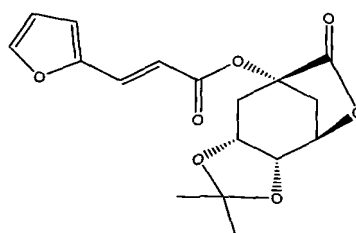
II-a



II-b



II-c



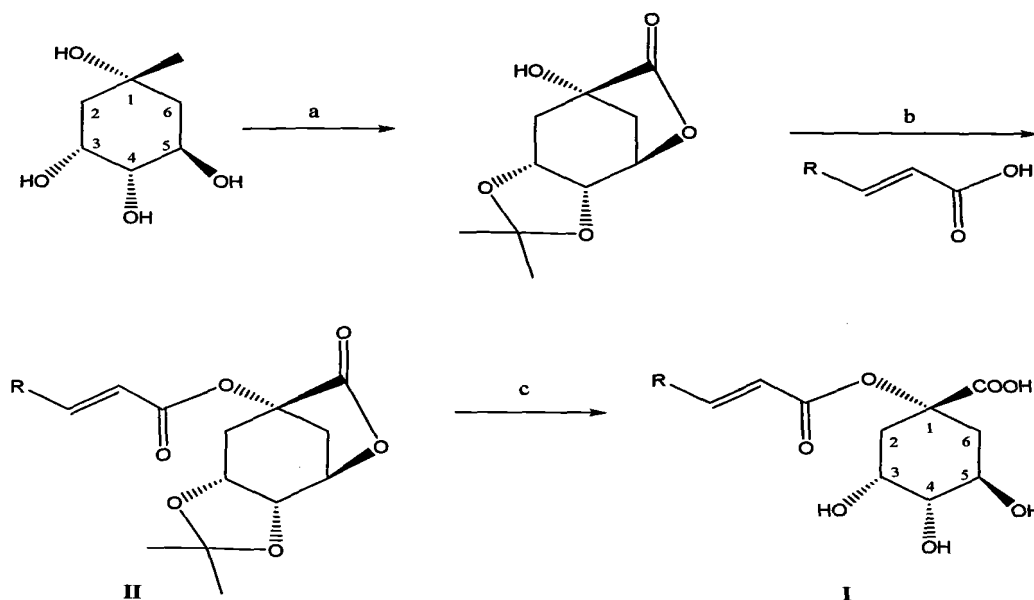
II-d

具体实施方式：

[0032] 本发明还提供了一种由中间体式 (II) 化合物制备式 (I) 化合物的方法, 其中, 由中间体式 (II) 化合物制备式 (I) 化合物的合成工艺路线特征是: 咖啡酰奎宁酸类化合物合成关键是得到合适的中间体, 要对除反应部位的其他羟基进行合理的保护, 使其与各种取代苯甲酸或苯丙烯酸缩合时, 反应能有较高的选择性, 然后再脱去保护基, 得到所需的化合物。

[0033] 制备 1 位取代的化合物, 我们需要的是除 1 位以外的其他羟基均被保护的中间体, 故先用丙酮与其缩合, 在酸性条件下 1 位羧酸与 5 位羟基同时也生成内酯环, 因此可得到 1 位羟基裸露的 3,4-氧-异丙叉奎尼酸内酯中间体, 将此中间体与各种不同取代的芳基取代烯丙酸在 N,N-二环己基羰二亚胺 (DCC) 和 4-二甲氨基吡啶 (DMAP) 存在下或在 1,1'-羰基二咪唑 (CDI) 和 1,8-二氮杂双环 [5,4,0] 11 烷-7-烯 (DBU) 存在下通过酯化反应制备得到。本发明中我们采用了 CDI, DBU 和 DCC, DMAP 两种体系。反应中使用了无水硫酸钠作除水剂, 丙酮必需作严格的无水处理。由于奎尼酸极性较大, 在丙酮等中等极性的溶剂中溶解性不好, 所以可适当延长反应时间, 运用以上改进的方法可使产率提高到 60% 左右。

[0034]

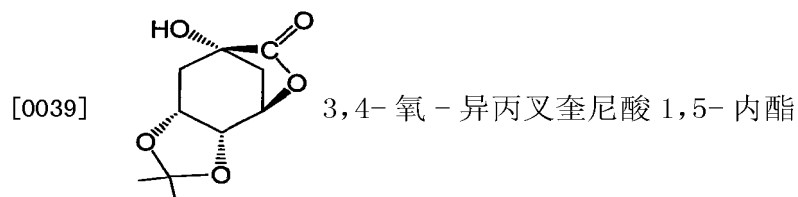


[0035] 反应条件及试剂:a) 无水丙酮, 浓硫酸, 回流, 65% ;b) N, N-二环己基羰二亚胺 DCC, 4-二甲氨基吡啶 DMAP, 二氯甲烷, 室温, 6 小时 ;1, 1'-羰基二咪唑 CDI, 1, 8-二氮杂双环 [5, 4, 0] 11 烷 -7-烯 DBU, 四氢呋喃, 45°C, 24 小时 ;c) 1.5N 盐酸, 甲醇, 回流 5 小时。

[0036] 本发明的式 (I) 化合物及其关键中间体式 (II) 化合物或其可药用盐对乙型肝炎病毒脱氧核糖核酸 (HBVDNA) 及乙型肝炎表面抗原 (HBsAg) 有良好的抑制作用。根据本发明, 该类化合物或其可药用盐可以与药学上常用的辅料或载体结合, 制备得到可以用于防治病毒引起的疾病的药物组合物。下面通过实施例进一步说明本发明。实施例给出了代表性化合物的合成及相关结构鉴定数据。必须说明, 下述实施例是用于说明本发明而不是对本发明的限制, 根据本发明的实质对本发明进行的简单改进都属于本发明要求保护的范

[0037] 实施例 1: 化合物 3, 4-氧-异丙叉奎尼酸 1, 5-内酯的制备

[0038] 反应瓶中, 加入奎尼酸 (500 毫克, 2.6 毫摩尔), 无水硫酸钠 (2.5 克, 17.6 毫摩尔), 15 毫升无水丙酮, 搅拌数分钟, 再向反应瓶中滴加 3 微升浓硫酸, 加热回流 5 小时。冷却到室温, 加入碳酸氢钠调节 pH 约为 7, 抽滤除去不溶物, 滤液浓缩。脱溶所得固体分散在 3 毫升氯仿和 3 毫升蒸馏水中, 水层再用氯仿萃取 3 次 (5 毫升 \times 3), 合并所有有机相, 用水洗, 饱和食盐水洗涤数次, 无水硫酸钠干燥。减压蒸馏除去溶剂得白色固体, 在乙酸乙酯中重结晶得白色粉末 350 毫克, 产率为 63.2%。



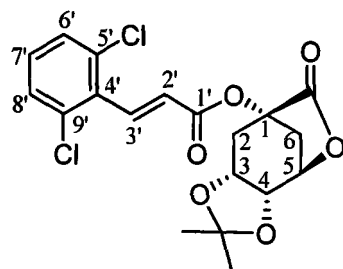
[0040] 熔点: 120 ~ 122°C ;核磁共振氢谱 (^1H NMR, 400MHz, 氘代甲醇): δ 1.29 (3H, 单峰), 1.46 (3H, 单峰), 2.00 ~ 2.49 (4H, 多重峰), 4.27 (1H, 双双峰), 4.50 (1H, 多重峰), 4.65 (1H, 双双峰)。

[0041] **实施例 2**: 化合物 II-a 即 1-氧-[3-(2,6-二氯苯)烯丙酰]-3,4-氧-异丙叉奎尼酸-1,5-内酯的制备

[0042] 方法一: 向反应瓶中加入 2,6-二氯苯-3-烯丙酸 (125 毫克, 0.58 毫摩尔), 羰基二咪唑 (190 毫克, 1.17 毫摩尔), 无水四氢呋喃 10 毫升, 加热回流反应 2 小时, 再向其中加入 3,4-氧-异丙叉奎尼酸-1,5-内酯 (83 毫克, 0.47 毫摩尔), 1,8-二氮杂双环 [5,4,0] 11 烷-7-烯 (DBU, 90 毫克, 0.58 毫摩尔), 整个溶液在回流条件下反应 8 小时。减压蒸除溶剂后得淡黄色粘稠状固体, 经柱层析纯化 (石油醚: 乙酸乙酯 = 10 : 1, 粗品: 硅胶 = 1 : 40) 分离得到黄色固体 73.6 毫克, 产率为 38%。

[0043] 方法二: 向反应瓶中加入 2,6-二氯苯-3-烯丙酸 (30.2 毫克, 0.14 毫摩尔), 二环己基碳二亚胺 (29 毫克, 0.14 毫摩尔), 无水二氯甲烷 8 毫升, 在室温下搅拌 20 分钟, 出现白色混浊后, 再向其中加入 3,4-丙酮叉奎尼酸 1,5-内酯 (20.5 毫克, 0.093 毫摩尔), 4-二甲氨基吡啶 (DMAP, 1.7 毫克, 0.014 毫摩尔), 整个溶液在室温下反应过夜, 抽滤除去不溶物, 蒸去溶剂, 脱溶得到白色固体, 柱层析纯化 (石油醚: 乙酸乙酯 = 10 : 1, 粗品 / 硅胶 = 1 : 40) 分离得到白色固体 17.6 毫克, 产率为 37%。

[0044]

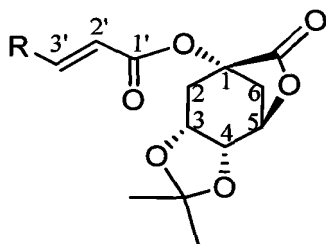


II-a

[0045] 化合物 II-a: 淡黄色固体, 熔点: $89 \sim 90^{\circ}\text{C}$, R_f (石油醚 / 乙酸乙酯: 3/1) : 0.35; 核磁共振氢谱 (^1H NMR, 400MHz, 氘代甲醇): δ 1.33 (3H, 单峰, CH_3), 1.45 (3H, 单峰, CH_3), 2.32 ~ 3.12 (4H, 多重峰, H-2, 6), 4.30 (1H, 双双峰, H-4), 4.57 (1H, 多重峰, H-5), 4.82 (1H, 双双双峰, H-3), 6.64 (1H, 双峰, $J = 16.0\text{Hz}$, H-2'), 7.36 (1H, 多重峰, H-7'), 7.53 (2H, 多重峰, H-6', H-8'), 7.98 (1H, $J = 16.0\text{Hz}$, H-3')。

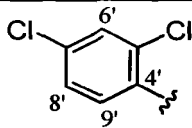
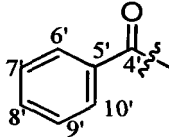
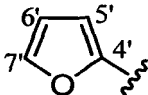
[0046] 根据实施例 2 相同的方法制备得到表一所示之实施例 3 ~ 5 化合物:

[0047]



[0048] 表一

[0049]

实施例号	化合物编号	R
3	II-b	
4	II-c	
5	II-d	

[0050] 下面列出表一中各化合物的理化数据：

[0051] 化合物 II-b：淡黄色固体，熔点：89 ~ 90℃， R_f （石油醚 / 乙酸乙酯：3/1）：0.31；核磁共振氢谱（ $^1\text{H NMR}$ ，400MHz，氘代甲醇）： δ 1.35(3H, 单峰, CH_3), 1.48(3H, 单峰, CH_3), 2.35 ~ 3.12(4H, 多重峰, H-2,6), 4.36(1H, 双双峰, H-4), 4.59(1H, 多重峰, H-5), 4.85(1H, 双双双峰, H-3), 6.57(1H, 双峰, $J = 16.0\text{Hz}$, H-2') , 7.35(1H, $J = 8.4\text{Hz}$, H-8') , 7.52(1H, 单峰, H-6') , 7.78(1H, 双峰, $J = 8.4\text{Hz}$, H-9') , 7.98(1H, $J = 16.0\text{Hz}$, H-3') 。

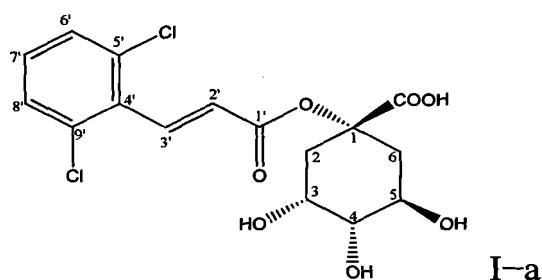
[0052] 化合物 II-c：黄色油状物，熔点：93 ~ 95℃（氯仿）； R_f （石油醚 / 乙酸乙酯：3/1）：0.40；核磁共振氢谱 $^1\text{H NMR}$ (400MHz, 氘代甲醇)： δ 1.33(3H, 单峰, CH_3), 1.51(3H, 单峰, CH_3), 2.40 ~ 3.11(4H, 多重峰, H-2,6), 4.39(1H, 双双峰, H-4), 4.68(1H, 多重峰, H-5), 4.87(1H, 双双双峰, H-3), 6.79(1H, 双峰, $J = 16.0\text{Hz}$, H-2') , 7.57(2H, 多重峰, H-7', 9') , 7.72(1H, 三重峰, H-8') , 8.02(1H, 双峰, $J = 16.0\text{Hz}$, H-3') , 8.09(2H, 多重峰, H-6', 10') ；电喷雾质谱 ESI-MS m/z :390.14 ($[\text{M}+\text{H}_2\text{O}]^+$)。

[0053] 化合物 II-d：黄色固体，熔点：89 ~ 90℃（氯仿）， R_f （石油醚 / 乙酸乙酯：3/1）：0.36；核磁共振氢谱（ $^1\text{H NMR}$ ，400MHz，氘代甲醇）： δ 1.33(3H, 单峰, CH_3), 1.43(3H, 单峰, CH_3), 2.33 ~ 3.10(4H, 多重峰, H-2,6), 4.37(1H, 双双峰, H-4), 4.65(1H, 多重峰, H-5), 4.84(1H, 双双双峰, H-3), 6.26(1H, 双峰, $J = 16.0\text{Hz}$, H-2') , 6.56(1H, 单峰, H-6') , 6.75(1H, 单峰, H-5') , 7.36(1H, 双峰, $J = 16.0\text{Hz}$, H-3') , 7.66(1H, 单峰, H-7') ；电喷雾质谱 ESI-MS m/z :351.91 ($[\text{M}+\text{H}_2\text{O}]^+$)。

[0054] 实施例 6：化合物 I-a[1-氧-(2,6-二氯苯-3-烯丙酰)-奎尼酸] 的制备

[0055] 在二颈瓶中加入化合物 II-a(20 毫克, 0.048 毫摩尔)，加入 5 毫升甲醇 - 四氢呋喃 - 水体系 (3 : 1 : 1)，再滴加 5 滴 1.5 摩尔 / 升盐酸，加热回流 7 小时，由薄层色谱 TLC 检测到产物和原料比不再变化，冷却至室温，用二氯甲烷萃取，合并氯仿层用大量水洗，饱和食盐水洗涤，无水硫酸钠干燥。用 Sephadex LH-20 凝胶柱以甲醇洗脱为条件多次分离后得到白色固体 15 毫克，产率为 79%。

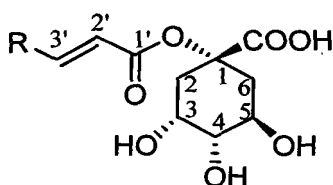
[0056]



[0057] 化合物 I-a : 白色固体, 熔点 : 141 ~ 143 °C, R_f (氯仿 / 甲醇 / 甲酸 : 50/2/1) : 0.17 ; 核磁共振氢谱 (^1H NMR, 400MHz, 氘代甲醇) : δ 2.25 ~ 3.12 (4H, 多重峰, H-2, 6), 3.86 (1H, 双双峰, H-4), 4.09 (1H, 多重峰, H-5), 4.64 (1H, 双双双峰, H-3), 6.67 (1H, 双峰, $J = 16.4\text{Hz}$, H-2'), 7.39 (1H, 多重峰, H-7'), 7.52 (2H, 多重峰, H-6' , 8'), 7.87 (1H, 双峰, $J = 16.4\text{Hz}$, H-3')。

[0058] 根据实施例 6 相同的方法制备得到表二所示之实施例 7 ~ 9 化合物 :

[0059]



[0060] 表二

[0061]

实施例号	化合物编号	R
7	I-b	
8	I-c	
9	I-d	

[0062] 下面列出表二中各化合物的理化数据 :

[0063] 化合物 I-b : 白色固体, 熔点 : 135 ~ 136 °C, R_f (氯仿 / 甲醇 / 甲酸 : 50/2/1) : 0.15 ; 核磁共振氢谱 ^1H NMR (400MHz, 氘代甲醇) : δ 2.18 ~ 2.87 (4H, 多重峰, H-2, 6), 3.04 (1H, 双双峰, H-4), 3.78 (1H, 多重峰, H-5), 4.02 (1H, 双双双峰, H-3), 6.60 (1H, 双峰, $J = 16.0\text{Hz}$, H-2'), 7.37 (1H, 双峰, $J = 8.4\text{Hz}$, H-8'), 7.55 (1H, 单峰, H-6'), 7.79 (1H, 双峰, $J = 8.4\text{Hz}$, H-9'), 8.00 (1H, 双峰, $J = 16.0\text{Hz}$, H-3')。

[0064] 化合物 I-c : 黄色固体, 熔点 : 113 ~ 115 °C, R_f (氯仿 / 甲醇 / 甲酸 : 50/2/1) : 0.22 ; 核磁共振氢谱 ^1H NMR (400MHz, 氘代甲醇) : δ 2.13 ~ 3.03 (4H, 多重峰, H-2, 6), 3.60 (1H, 双双峰, H-4), 3.93 (1H, 多重峰, H-5), 4.57 (1H, 双双双峰, H-3), 6.80 (1H, 双峰, $J = 16.0\text{Hz}$,

H-2'), 7.52 (2H, 多重峰, H-7' , 9'), 7.66 (1H, 多重峰, H-8'), 7.93 (2H, 多重峰, H-6' , 10'), 7.98 (1H, 双峰, $J = 16.0\text{Hz}$, H-3')。

[0065] 化合物 I-d : 黄色固体, 熔点 : $132 \sim 135^{\circ}\text{C}$, R_f (氯仿 / 甲醇 / 甲酸 : 50/2/1) : 0.48 ; 核磁共振氢谱 $^1\text{H NMR}$ (400MHz, 氘代甲醇) : δ 2.15 ~ 2.92 (4H, 多重峰, H-2, 6), 3.38 (1H, 双双峰, H-4), 3.83 (1H, 多重峰, H-5), 4.15 (1H, 双双双峰, H-3), 6.29 (1H, 双峰, $J = 16.0\text{Hz}$, H-2'), 6.60 (1H, 单峰, H-6'), 6.73 (1H, 单峰, H-5'), 7.46 (1H, 双峰, $J = 16.0\text{Hz}$, H-3'), 7.68 (1H, 单峰, H-7')。

[0066] 本发明的式 (I) 和式 (II) 化合物具有抑制乙型肝炎病毒 (HBV) 复制, 降低乙型肝炎病毒表面抗原 (HBsAg) 表达的功能 ; 可以用于制备治疗相关的乙型肝炎病毒感染性疾病的药物用途。该类化合物或其可药用盐可以与药学上常用的辅料或载体结合, 用制药领域中的常规技术制备得到具有抗乙型肝炎病毒活性从而可以用于防治乙型肝炎病毒引起的疾病的药物组合物。上述各类药物组合物可以采用注射剂、片剂、胶囊剂、气雾剂、栓剂、膜剂、滴丸剂、外用搽剂等剂型药物, 还可以利用现有公知技术制备成其控释、缓释剂型及纳米制剂, 又可以应用靶向药物制剂技术制备成相应药物剂型和给药方式。

[0067] 本发明的式 (I) 和式 (II) 化合物或其可药用盐还可以与现已上市的治疗乙型肝炎病毒性肝炎药物如拉米夫定 (lamivudine)、阿德福韦及其二匹伏酯 (adevovir/adevovir dipivoxil)、恩替卡韦 (entecavir)、恩曲他滨 (emtricitabine)、克来福定 (clevudine)、泛昔洛韦 (famciclovir)、洛布卡韦 (lobucavir)、干扰素 (IFN) 等联合使用, 制备得到具有治疗乙型肝炎病毒性肝炎的药物组合物。上述各类药物组合物均可以采用注射剂、片剂、胶囊剂、气雾剂、栓剂、膜剂、滴丸剂、外用搽剂等剂型药物, 还可以利用现有公知技术制备成其控释、缓释剂型及纳米制剂, 还可以应用靶向药物制剂技术制备成相应药物剂型和给药方式。

[0068] 为了更好地理解本发明的实质, 下面分别用药理实施例的形式简述式 (I) 和式 (II) 化合物对乙型肝炎病毒表面抗原 (HBsAg) 和对乙型肝炎病毒脱氧核糖核酸 (HBVDNA) 的抑制试验之药理实验结果, 以说明其在抗病毒药物开发领域中的用途。药理实施例给出了式 (I) 和式 (II) 化合物的部分活性数据。同样必须说明, 本发明的药理实施例仍是用于说明本发明而不是对本发明的限制。根据本发明的实质对本发明进行的简单改进都属于本发明要求保护的范畴。

[0069] 药理实施例 1 : 化合物 I-c 对 HepG2. 2. 15 细胞分泌的乙型肝炎病毒表面抗原 (HBsAg) 的抑制作用

[0070] 1. 1 细胞培养 :

[0071] 将 HepG2. 2. 15 细胞培养于含 10% 灭活胎牛血清, 100U/ 毫升青霉素和 100 微克 / 毫升链霉素, 100 微克 / 毫升 G418 的 DMEM 培养基中, 置 37°C , 5% 二氧化碳 CO_2 , 100% 相对湿度的培养箱中培养。

[0072] 1. 2 采用 MTT [3-(4, 5- 二甲基噻唑 -2)-2, 5- 二苯基四氮唑溴盐] 法测定化合物 I-c 对 HepG2. 2. 15 细胞生长的抑制作用 :

[0073] 取对数生长期的 HepG2. 2. 15 细胞, 用培养基将细胞稀释成 1×10^5 个 / 毫升, 接种于 96 孔细胞培养板, 每孔 100 微升, 在 37°C , 5% CO_2 , 100% 相对湿度的培养箱中培养 24 小时后加入用培养基稀释的化合物 I-c, 浓度分别为 100 微克 / 毫升, 20 微克 / 毫升, 和 4 微

克 / 毫升, 每孔 200 微升, 每个浓度设三个复孔, 置于 37℃, 5% CO₂, 100% 相对湿度的培养箱中培养, 培养 72 小时后, 每孔加入 5 毫克 / 毫升 MTT 试剂 10 微升, 继续培养 4 小时, 弃去培养基, 每孔加入二甲基亚砷 DMSO 200 微升, 用振荡器振荡 20 分钟, 在 570nm 波长下用酶标仪测定 OD 值。以只加培养基的培养孔为对照孔。实验重复三次。

[0074] 抑制率 (%) = (对照孔 OD 值 - 实验组 OD 值) / 对照孔 OD 值 × 100%。

[0075] 1.3 测定化合物 I-c 对乙型肝炎表面抗原 (HBsAg) 的抑制作用:

[0076] 取对数生长期的 HepG2. 2. 15 细胞, 用培养基将细胞稀释成 1 × 10⁵ 个 / 毫升, 接种于 96 孔细胞培养板, 每孔 100 微升, 在 37℃, 5% CO₂, 100% 相对湿度的培养箱中培养 24 小时后加入用培养基稀释的化合物 I-c 化合物, 浓度分别为 100 微克 / 毫升, 20 微克 / 毫升和 4 微克 / 毫升, 每孔 200 微升, 每个浓度设三个复孔, 置于 37℃, 5% CO₂, 100% 相对湿度的培养箱中培养, 每 4 天换含相同浓度样品的培养基, 将同一样品同一浓度的换出的培养基等体积混匀, 作为待测样品。用酶联反应 ELISA 试剂盒测定培养基中乙型肝炎表面抗原 (HBsAg) 浓度, 以 P/N 表示; 以拉米呋啶 (3-TC) 为阳性对照。

[0077] 1.4 实验结果:

[0078] 实验结果如表三所示, 化合物 I-c 有显著的抑制乙型肝炎表面抗原 (HBsAg) 的作用。其对 HepG2. 2. 15 细胞的生长无明显抑制作用, 但对 HepG2. 2. 15 细胞分泌的乙型肝炎表面抗原 HBsAg 在高、中、低剂量下抑制活性都高于拉米呋啶。

[0079] 表三. 化合物 I-c 对乙型肝炎表面抗原 (HBsAg) 的抑制率 (%)

[0080]

样品编号	浓度(微克/毫升)	4 天	8 天
I-c	100	26.88	37.52
	20	13.73	16.84
	4	4.20	9.97
3-TC (拉米呋啶)	100	12.12	11.37
	20	/ ^a	/ ^a
	4	/ ^a	/ ^a

[0081] ^a 表示无抑制活性。

[0082] 1.5 结果说明:

[0083] 乙型肝炎表面抗原 (HBsAg) 抑制率是判断乙型肝炎病毒感染重要标志, 有效抑制 HBsAg 分泌并使 HBsAg 反应转阴是治疗乙型肝炎的目标之一。化合物 I-c 在第八天对 HepG2. 2. 15 细胞分泌的乙型肝炎表面抗原 (HBsAg) 具有显著的抑制作用, 说明此类 1-氧-[3-芳基取代-烯丙酰] 奎尼酸化合物可预期发展为降低乙型肝炎表面抗原、控制病毒性乙型肝炎症状的药物。

[0084] 药理实施例 2: 化合物 II-d 对 HepG2. 2. 15 细胞分泌的乙型肝炎病毒表面抗原 (HBsAg) 的抑制作用

[0085] 2.1 细胞培养: 同药理实施例 1。

[0086] 2.2 采用 MTT 法测定化合物 II-d 对 HepG2. 2. 15 细胞生长的抑制作用: 取对数生

长期的 HepG2. 2. 15 细胞, 方法同药理实施例 1。

[0087] 2.3 测定化合物 I-c 对乙型肝炎表面抗原 (HBsAg) 的抑制作用: 以拉米呋啶 (3-TC) 为阳性对照。具体方法同药理实施例 1。

[0088] 2.4 实验结果: 实验结果如表四所示, 化合物 II-d 有显著的抑制乙型肝炎表面抗原 (HBsAg) 的作用。其对 HepG2. 2. 15 细胞的生长无明显抑制作用, 但对 HepG2. 2. 15 细胞分泌的乙型肝炎表面抗原 HBsAg 在高、中、低剂量下抑制活性都高于拉米呋啶。

[0089] 表四. 化合物 II-d 对乙型肝炎表面抗原 (HBsAg) 的抑制率 (%)

[0090]

样品编号	浓度(微克/毫升)	4 天	8 天
II-d	100	26.78	38.65
	20	15.32	21.55
	4	/a	7.39
3-TC (拉米呋啶)	100	12.12	11.37
	20	/ ^a	/ ^a
	4	/ ^a	/ ^a

[0091] ^a 表示无抑制活性。

[0092] 2.5 结果说明: 乙型肝炎表面抗原 (HBsAg) 抑制率是判断乙型肝炎病毒感染重要标志, 有效抑制 HBsAg 分泌并使 HBsAg 反应转阴是治疗乙型肝炎的目标之一。化合物 II-d 在第八天对 HepG2. 2. 15 细胞分泌的乙型肝炎表面抗原 (HBsAg) 具有显著的抑制作用, 说明该类 1-氧-[3-芳基取代-烯丙酰]-3,4-氧-异丙叉奎尼酸-1,5-内酯中间体化合物可预期发展为降低乙型肝炎表面抗原、控制病毒性乙型肝炎症状的药物。

[0093] 药理实施例 3: 化合物 I-d 对 HepG2. 2. 15 细胞分泌的乙型肝炎病毒脱氧核糖核酸 (HBVDNA) 的抑制作用

[0094] 3.1 仪器与试剂:

[0095] PE7700 自动荧光 PCR 仪, 美国 Perkin Elmer 公司生产; HBVDNA 荧光定量检测试剂盒由中山医科大学达安基因诊断中心提供, 胎牛血清、DMEM、G418、胰蛋白酶均购自 Gibco 公司。

[0096] 3.2 细胞培养:

[0097] 将 HepG 2. 2. 15 细胞接种于 DMEM 培养液 (含 10% 胎牛血清, 380 微克 / 毫升 G418), 置 5% 二氧化碳 CO₂ 培养箱中 37°C 培养, 具体方法同药理实施例 1。

[0098] 3.3 采用 MTT 法测定化合物 I-d 对 HepG2. 2. 15 细胞生长的抑制作用: 方法同药理实施例 1。

[0099] 3.4 测定化合物 I-d 对乙型肝炎病毒脱氧核糖核酸 (HBVDNA) 复制的抑制作用:

[0100] 取对数生长期的 HepG2. 2. 15 细胞, 用培养基将细胞稀释成 1×10^5 个 / 毫升, 接种于 96 孔细胞培养板, 每孔 100 微升, 在 37°C, 5% CO₂, 100% 相对湿度的培养箱中培养 24 小时后加入用培养基稀释的化合物 I-d, 浓度分别为 100 微克 / 毫升, 20 微克 / 毫升和 4 微克 / 毫升, 每孔 200 微升, 每个浓度设三个复孔, 置于 37°C, 5% CO₂, 100% 相对湿度的培养箱中

培养,每4天换含相同浓度样品的培养基,将同一样品同一浓度的换出的培养基等体积混匀,作为待测样品。第8天时用HBVDNA定量PCR仪测定培养基中HBVDNA浓度。按试剂盒说明书操作,50微升反应体积中含30微升反应缓冲液,5微升氯化镁,5微升引物和探针,7微升样品处理上清液和3微升Taq酶。各反应管放入PCR仪中,按下列条件扩增:92℃2分钟预变性,然后按93℃45秒-55℃120秒,共40个循环。反应结束后,由自动分析软件计算出结果。以拉米呋啶(3-TC)为阳性对照,实验结果如表五所示。

[0101] 表五. 化合物 I-d 对 HepG2. 2. 15 脱氧核糖核酸的百分抑制率

[0102]

样品编号	浓度(微克/毫升)	8天(%)	12天(%)
化合物 I-d	100	21.21	41.28
	20	12.85	28.02
	4	4.33	10.77
拉米呋啶	100	81.25	83.56
	20	72.85	76.31
	4	37.27	37.81

[0103] 3.5 试验结果说明:

[0104] 第八天和第十二天化合物 I-d 对 HBVDNA 均显示出一定的抑制活性,虽然比阳性对照药品拉米呋啶对 HBVDNA 的抑制活性要弱,但仍属于有确切活性的 HBVDNA 抑制剂。

[0105] 3.6 结论:

[0106] 化合物 I-d 能显著抑制 HBVDNA 的复制,说明此类 1-氧-[3-芳基取代-烯丙酰]奎尼酸化合物可以预期发展成为治疗病毒性乙型肝炎疾病的药物。

[0107] 在上述说明书阐述本发明时,同时提供了实施例和药理实施例的目的是举例说明本发明的实际操作过程和本发明的意义。在进入本发明权利要求和其等同物范围内时,本发明的实际应用包括所有一般变化、配合,或改进。