



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106928245 B

(45)授权公告日 2019.06.11

(21)申请号 201710129139.X

A61P 31/20(2006.01)

(22)申请日 2017.03.06

(56)对比文件

(65)同一申请的已公布的文献号

WO 2017017042 A1, 2017.02.02,

申请公布号 CN 106928245 A

审查员 孙静

(43)申请公布日 2017.07.07

(73)专利权人 河南春风医药科技有限公司

地址 450000 河南省郑州市金水区北环路6
号经三名筑8号楼6层602室

(72)发明人 李定芳 程森祥 郭应臣

(74)专利代理机构 上海顺华专利代理有限责任
公司 31203

代理人 陆林辉

(51)Int.Cl.

C07D 491/147(2006.01)

A61P 1/16(2006.01)

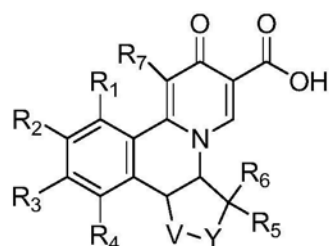
权利要求书2页 说明书9页

(54)发明名称

一种喹啉酮类化合物及其制备方法和应用

(57)摘要

本发明公开了一种喹啉酮类化合物,包括光学异构体、外消旋体、顺反异构体以及任意组合或其药用盐,结构如式I;

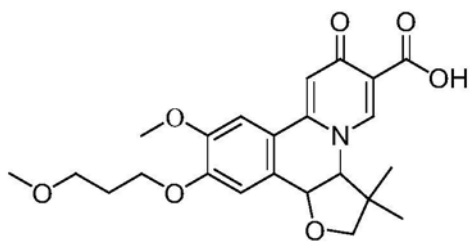


其中,V和Y中的一个

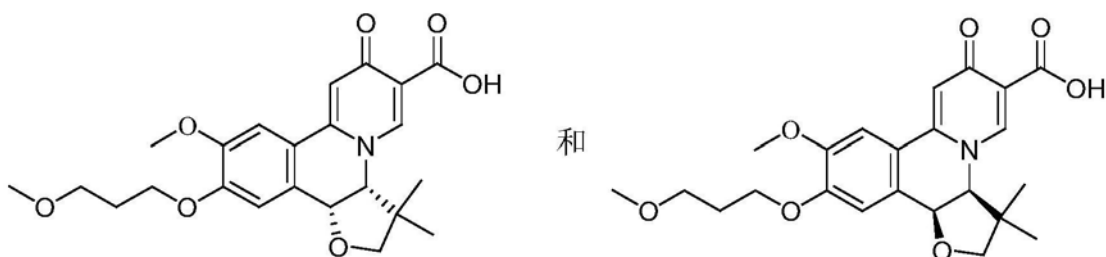
(I)

是O,V和Y中的另一个是CR₈R₉,其中R₈和R₉分别独立地是氢或C₁₋₆烷基。本发明还公开了式I的化合物的制备方法及其应用,式I的化合物能够显著降低体内HBsAg水平,同时抑制HBV病毒的复制,其中V或Y为O时,其溶解性得到显著改善,具有良好的药用属性,同时毒性也较低,药动力学及药效学功能得到改善,与HBV病毒结合的效率可大大增加,体内HBV病毒的清除率也可进一步提高。

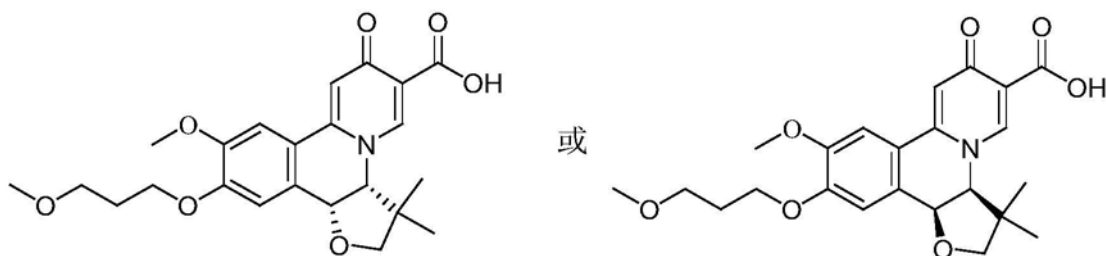
1. 一种喹啉酮类化合物, 包括光学异构体、外消旋体、顺反异构体以及任意组合或其药用盐, 其结构为:



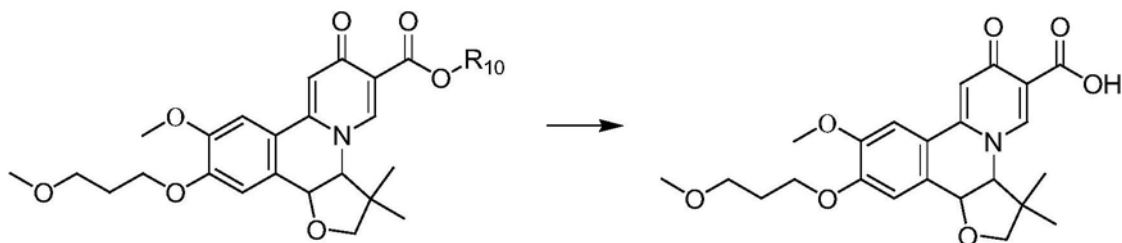
2. 根据权利要求1所述的化合物, 其特征在于, 其为外消旋体 *cis*-10-甲氧基-11-(3-甲氧基丙氧基)-3,3-二甲基-7-氧代-3,3a,7,12b-四氢-2H-呋喃并[3,2-*c*]吡啶并[2,1-*a*]异喹啉-6-甲酸, 其结构为



3. 根据权利要求1所述的化合物, 其特征在于, 其为光学纯的 *cis*-(+)-10-甲氧基-11-(3-甲氧基丙氧基)-3,3-二甲基-7-氧代-3,3a,7,12b-四氢-2H-呋喃并[3,2-*c*]吡啶并[2,1-*a*]异喹啉-6-甲酸, 或 *cis*-(-)-10-甲氧基-11-(3-甲氧基丙氧基)-3,3-二甲基-7-氧代-3,3a,7,12b-四氢-2H-呋喃并[3,2-*c*]吡啶并[2,1-*a*]异喹啉-6-甲酸, 具体结构为:

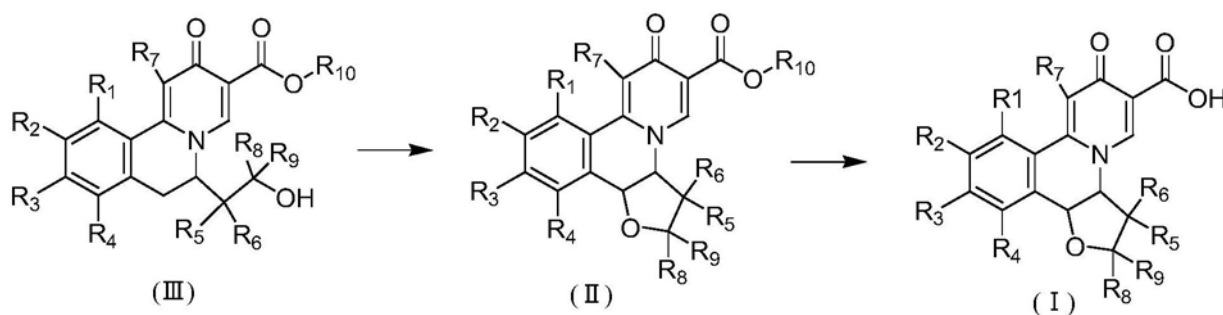


4. 一种制备权利要求1所述的化合物的方法, 其包括步骤: 所述的喹啉酮类化合物经对应的酯水解得到, 反应式如下:



其中, R_{10} 为 C_{1-6} 烷基。

5. 一种制备结构如式 I 的化合物的方法, 其包括步骤: 式 III 的化合物经氧化环化得到式 II 的化合物, 以及式 II 的化合物水解得到式 I 的化合物, 反应式如下:



其中, R₁是氢, 卤素, 氰基, C₁₋₆烷基, C₁₋₆烷基氨基或C₁₋₆烷氧基;

R₂是氢, 卤素, 氰基, C₁₋₆烷基, 卤代C₁₋₆烷基, C₃₋₇环烷基, 羟基, C₁₋₆烷氧基, 卤代C₁₋₆烷氧基, 氰基C₁₋₆烷氧基或苯基C₁₋₆烷氧基;

R₃是氢, 卤素, 氰基, C₁₋₆烷基, 卤代C₁₋₆烷基, C₃₋₇环烷基, 氨基, 苯基C₁₋₆烷基氨基, C₁₋₆烷氧基羰基哌嗪基, 羟基, C₁₋₆烷氧基, 卤代C₁₋₆烷氧基, C₁₋₆烷氧基C₁₋₆烷氧基, C₁₋₆烷氧基C₁₋₆烷氧基, C₁₋₆烷基羰基氨基C₁₋₆烷氧基, C₁₋₆烷基磺酰基氨基C₁₋₆烷氧基, C₁₋₆烷基磺酰基C₁₋₆烷氧基, 氰基C₁₋₆烷氧基, 氰基C₃₋₇环烷基C₁₋₆烷氧基, C₃₋₇环烷基C₁₋₆烷氧基, 羟基C₁₋₆烷氧基, 咪唑基乙氧基, 吗啉基乙氧基, 2-氧代-吡咯烷-1-基乙氧基, 苯基C₁₋₆烷氧基, 吡咯烷基乙氧基, 吡咯烷基羰基甲氧基或四氢吡喃-4-基甲氧基;

R₄是氢, 卤素, 氰基, C₁₋₆烷基, C₁₋₆烷基氨基或C₁₋₆烷氧基;

R₅是氢或C₁₋₆烷基;

R₆是氢或C₁₋₆烷基;

R₇是氢、卤素或C₁₋₆烷基;

R₈和R₉分别独立地是氢或C₁₋₆烷基;

R₁₀为C₁₋₆烷基;

式III的化合物经氧化环化得到式II的化合物的步骤具体为: 在溶剂中, 在氧化剂作用下、电氧化还原条件下或光氧化还原条件下, 式III的化合物被氧化后, 用酸处理得到成环的式II的化合物; 其中, 所述溶剂选自乙腈、水、乙醇和二氯甲烷中的一种或多种, 所述氧化剂选自KMnO₄、K₂S₂O₈、DDQ、CAN、CuSO₄和PhI(OAc)₂中的一种或多种, 所述的酸选自H₂SO₄、HCl和HAc中的一种或多种。

6. 权利要求1至3任一项所述的化合物在制备治疗和预防乙型肝炎病毒感染的药物中的应用。

7. 根据权利要求6所述的应用, 其特征在于, 所述药物为片剂、粉剂、胶囊、溶液、分散体、混悬剂、糖浆、喷雾剂、栓剂、凝胶、乳液或贴剂。

一种喹啉酮类化合物及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及医药技术领域,具体涉及一种用于治疗 and 预防乙型肝炎病毒感染的喹啉酮类化合物及其制备方法和应用。

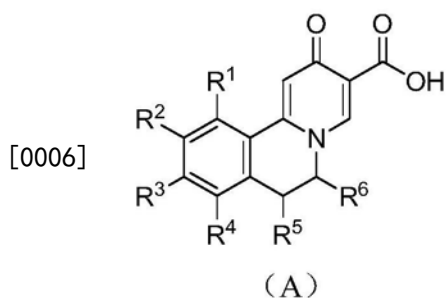
背景技术

[0002] 乙型肝炎病毒 (HBV) 作为一种部分双链DNA病毒,其复制需要经过一个从RNA中间体逆转录为DNA的步骤。HBV基因组能够编码包括表面抗原 (HBsAg) 在内的多种抗原以及DNA复制过程中所需的DNA聚合酶等。

[0003] 在HBV的致病过程中,如宿主免疫系统持续暴露于HBsAg和其他抗原下,则可导致HBV特异性T细胞大量缺失或功能进行性损伤 (Kondo, et al. Journal of Immunology. 1993, 150: 4659-4671; Kondo, et al. Journal of Medical Virology. 2004, 74: 425-433; Fisicaro, et al. Gastroenterology. 2010, 138: 93-682.), 同时也可直接抑制宿主免疫系统的功能。故同时抑制HBV的DNA复制和HBsAg合成,这样的靶向治疗药物能够显著改善CHB患者的免疫再激活状况并明显缓解患者症状 (Wieland SF and FV Chisari. J Virol. 2005, 79: 80-9369; Kumar, et al. J Virol. 2011, 85: 95-987; Woltman, et al. PLoS One. 2011, 6: e15324; Op den Brouw, et al. Immunology. 2009, 126: 9-280.)。

[0004] HBsAg定量检测作为评估慢性乙型肝炎预后及治疗效果的重要生物标志物之一,在慢性感染者中却很少发现HBsAg被完全清除,但这仍然是乙肝治疗的最终目标。但目前常用的抗病毒药物如核苷(酸)类似物,主要作用是抑制HBV的DNA合成,而无法降低体内HBsAg的水平。

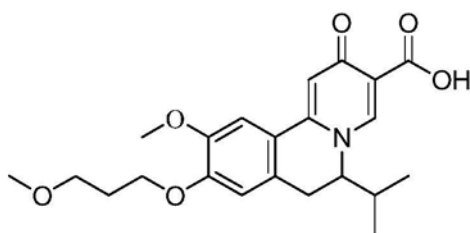
[0005] 专利文献US2015/0210682A1、US2016/0122344A1、W02015/173164、以及CN105899508A等公开了如式A所示的喹啉酮类化合物,具有降低体内HBsAg水平的性能。



[0007] 式A中的R¹~R⁶参见上述专利中所定义。

[0008] 其中,尤其是专利文献CN105899508A公开的下式所示的化合物A1,能够降低体内HBsAg水平。

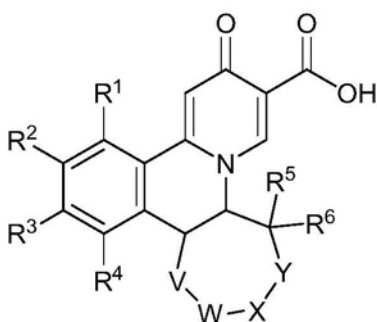
[0009]



(A1)

[0010] 最近公开的PCT专利申请W0 2017/017042A1中公开了式B所示的一类化合物，

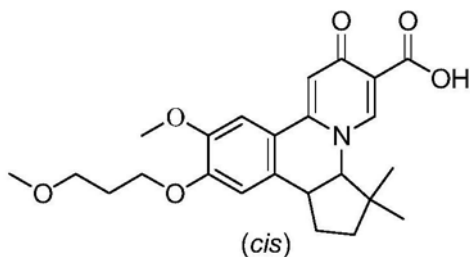
[0011]



(B)

[0012] 该专利文献公开的优选化合物中，V和Y均为CH₂，如下式所示的化合物B1，

[0013]



(B1)

[0014] 化合物B1中的喹啉环与五元环共用的碳原子为手性碳，各有R和S两种构型，化合物B1为其中的两种顺式异构体的外消旋体。而公开的化合物B1制备方法中，会得到化合物B1及其反式异构体的混合体，需要通过手性制备分离才能得到化合物B1。该专利文献同时对化合物B1及其异构体进行了生物实验，结果显示化合物B1的抗HBV活性比其反式异构体的抗HBV活性更加显著。由于反式异构体的存在，该专利文献公开的方法制备顺式的化合物B1产率较低。

[0015] 另外，该专利文献的生物实验还显示，在抗HBV活性方面，当W、X均为CH₂或化学键时，通常比W、X中的一个为杂原子时要好。而且该专利中，并没有公开V或Y为O，S，SO₂和NR时的具体化合物，它们的抗HBV活性也不得而知，而且V或Y为O，S，SO₂或NR的具体化合物很难通过该专利公开的制备方法进行合成。

[0016] 本领域技术人员一直致力于寻找新的具有更好抗HBV活性的喹啉酮类化合物。

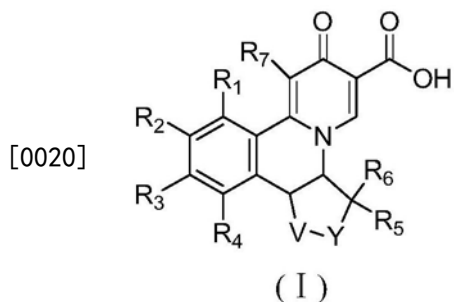
发明内容

[0017] 本发明旨在研发一类抗HBV活性总体效果好的以喹啉酮为母体的新型化合物。

[0018] 本发明人前期进行了大量的合成和筛选工作，巧合的是得到的一些化合物在结构

上却与最近公开的PCT专利申请WO 2017/017042 A1中的化合物B1类似。同时,本发明也筛选出一类与WO 2017/017042 A1公开的具体化合物在结构上有明显区别的喹啉酮类化合物,结构如式I,明显的区别在于式I中V和Y不同时为CH₂。

[0019] 本发明在此提供这一种喹啉酮类化合物,包括光学异构体、外消旋体、顺反异构体以及任意组合或其药用盐,结构如式I;



[0021] 其中,

[0022] R₁是氢,卤素,氰基,C₁₋₆烷基,C₁₋₆烷基氨基或C₁₋₆烷氧基;

[0023] R₂是氢,卤素,氰基,C₁₋₆烷基,卤代C₁₋₆烷基,C₃₋₇环烷基,羟基,C₁₋₆烷氧基,卤代C₁₋₆烷氧基,氰基C₁₋₆烷氧基或苯基C₁₋₆烷氧基;

[0024] R₃是氢,卤素,氰基,C₁₋₆烷基,卤代C₁₋₆烷基,C₃₋₇环烷基,氨基,苯基C₁₋₆烷基氨基,C₁₋₆烷氧基羰基哌嗪基,羟基,C₁₋₆烷氧基,卤代C₁₋₆烷氧基,C₁₋₆烷氧基C₁₋₆烷氧基,C₁₋₆烷氧基C₁₋₆烷氧基,C₁₋₆烷基羰基氨基C₁₋₆烷氧基,C₁₋₆烷基磺酰基氨基C₁₋₆烷氧基,C₁₋₆烷基磺酰基C₁₋₆烷氧基,氰基C₁₋₆烷氧基,氰基C₃₋₇环烷基C₁₋₆烷氧基,C₃₋₇环烷基C₁₋₆烷氧基,羟基C₁₋₆烷氧基,杂芳基C₁₋₆烷氧基,苯基C₁₋₆烷氧基,杂环烷基C₁₋₆烷氧基,杂环烷基羰基C₁₋₆烷氧基;

[0025] R₄是氢,卤素,氰基,C₁₋₆烷基,C₁₋₆烷基氨基或C₁₋₆烷氧基;

[0026] R₅是氢或C₁₋₆烷基;

[0027] R₆是氢或C₁₋₆烷基;

[0028] R₇是氢、卤素或C₁₋₆烷基;

[0029] V和Y中的一个为O,V和Y中的另一个为CR₈R₉,其中R₈和R₉分别独立地为氢或C₁₋₆烷基。

[0030] 本发明的一些较佳实施例中,

[0031] R₁优选是氢,氟,氯,溴,甲基,甲基氨基,甲氧基或乙氧基;更优选是氢。

[0032] R₂优选是氢,氟,氯,溴,甲基,乙基,三氟甲基,甲氧基,乙氧基,丙氧基,三氟甲氧基,氰基,环丙基,羟基或苯基甲氧基;更优选是甲氧基,乙氧基,丙氧基,三氟甲氧基或苯基甲氧基;更进一步优选是甲氧基。

[0033] R₃优选是氢,溴,甲基,乙基,异丙基,氰基,苯基甲基-N(甲基)-,叔丁氧基羰基哌嗪基,羟基,甲氧基,乙氧基,丙氧基,异丙氧基,异丁氧基,丁氧基,二氟甲基甲氧基,三氟甲基甲氧基,甲氧基乙氧基,甲氧基丙氧基,乙氧基乙氧基,甲氧基乙氧基乙氧基,甲基羰基氨基乙氧基,甲基磺酰基氨基乙氧基,甲基磺酰基乙氧基,氰基甲氧基,氰基丙氧基,氰基环丙基甲氧基,环丙基甲氧基,环己基乙氧基,羟基乙氧基,羟基丙氧基,咪唑基乙氧基,吗啉基乙氧基,2-氧代-吡咯烷-1-基乙氧基,苯基甲氧基,苯基乙氧基,吡咯烷基乙氧基,吡咯烷基

羰基甲氧基或四氢吡喃-4-基甲氧基;更优选是甲氧基丙氧基。

[0034] R_4 是氢,氟,氯,溴,甲基,甲基氨基,甲氧基或乙氧基;更优选是氢。

[0035] R_5 优选是氢或甲基,更优选是甲基。

[0036] R_6 优选是氢或甲基,更优选是甲基。

[0037] R_7 优选是氢,氟,氯,溴,甲基;更优选是氢。

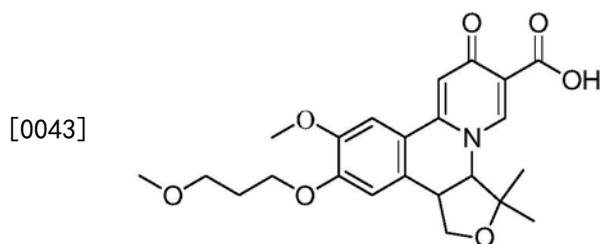
[0038] 优选的V是O,Y是 CR_8R_9 ,或者优选的V是 CR_8R_9 ,Y是O;其中 R_8 和 R_9 分别独立地优选是氢或甲基,更优选是氢。

[0039] 当然,本发明的上述各个基团不限于上述的优选基团,而且各个优选基团可任意组合。

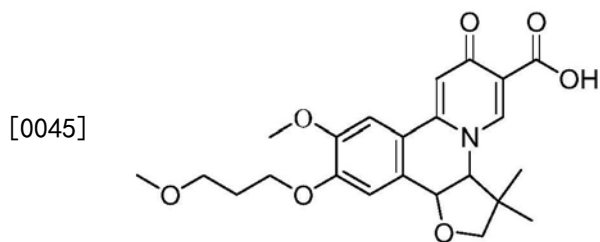
[0040] 本发明式I化合物中,喹啉环与五元杂环共用的碳原子为手性碳,各有R和S两种构型,存在两种顺式异构体和两种反式异构体,其外消旋体可通过手性制备分离得到单一光学纯化合物。

[0041] 本发明的某些化合物可按照常规方法制备为药用盐的形式。包括其有机酸盐及无机酸盐:无机酸包括(但不限于)盐酸、硫酸、磷酸、二磷酸、氢溴酸、硝酸等,有机酸包括(但不限于)乙酸、马来酸、富马酸、酒石酸、琥珀酸、乳酸、对甲苯磺酸、水杨酸、草酸等。

[0042] 本发明的一个优选的具体实施例中, R_1 是氢; R_2 是甲氧基; R_3 是甲氧基丙氧基; R_4 是氢; R_5 是甲基; R_6 是甲基; R_7 是氢;V是 CH_2 ,Y是O;其结构如下,

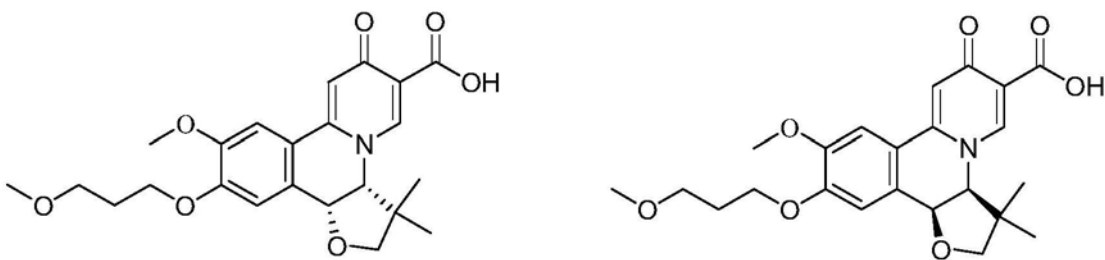


[0044] 本发明的一个优选的具体实施例中, R_1 是氢; R_2 是甲氧基; R_3 是甲氧基丙氧基; R_4 是氢; R_5 是甲基; R_6 是甲基; R_7 是氢;V是O,Y是 CH_2 ;其结构如下,



[0046] 其中两个顺式的异构体cis-(+)-10-甲氧基-11-(3-甲氧基丙氧基)-3,3-二甲基-7-氧代-3,3a,7,12b-四氢-2H-呋喃并[3,2-c]吡啶并[2,1-a]异喹啉-6-甲酸,和cis-(-)-10-甲氧基-11-(3-甲氧基丙氧基)-3,3-二甲基-7-氧代-3,3a,7,12b-四氢-2H-呋喃并[3,2-c]吡啶并[2,1-a]异喹啉-6-甲酸结构如下所示,它们在降低体内HBsAg水平方面具有显著的效果。

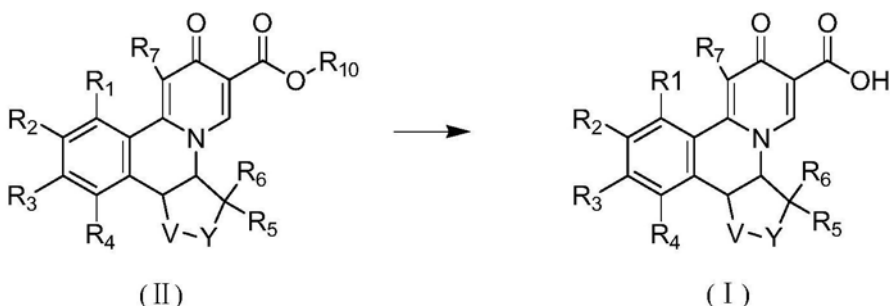
[0047]



[0048] 本发明惊奇地发现当V和Y中的一个为O时,式I的化合物与HBV病毒结合的效率更高,可进一步提高体内HBV病毒的清除率。此外,当V和Y中的一个为O时,化合物能够显著改善包括溶解性在内的一系列物理、化学性质,使其具有良好的药用属性,同时亦将明显降低其毒性,改善其药动学及药效学功能。

[0049] 本发明的另一目的在于提供制备式I的化合物的方法,其包括步骤:式II的化合物的水解得到式I的化合物,

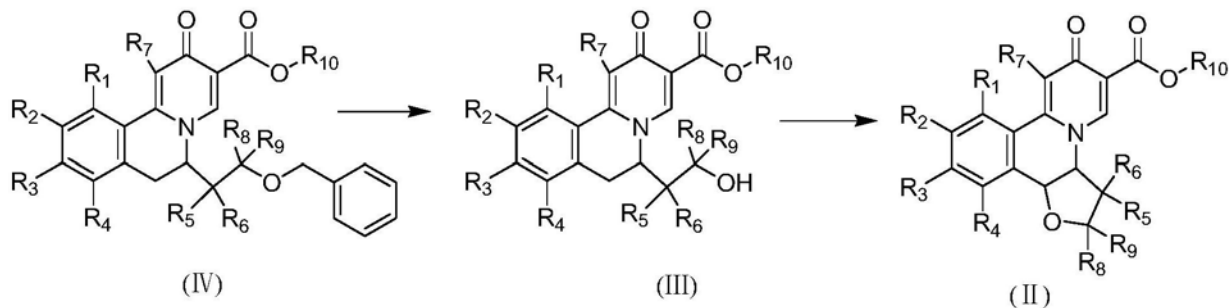
[0050]



[0051] 其中, $R_1 \sim R_7$ 、V和Y如上述定义, R_{10} 为 C_{1-6} 烷基优选甲基。

[0052] 本发明的一些较佳实施例中,V为氧,Y为 CR_8R_9 ,所述方法还包括步骤:式IV的化合物经氢化还原得到式III的化合物,以及式III的化合物经氧化环化得到式II的化合物,

[0053]



[0054] 其中, R_8 、 R_9 如上述定义。

[0055] 式III的化合物经氧化环化得到式II的化合物的步骤可具体为:在溶剂中,式III的化合物在氧化剂作用下、电氧化还原条件下或光氧化还原条件下被氧化后,用酸处理得到成环的式II的化合物;其中,所述溶剂选自乙腈、水、乙醇和二氯甲烷中一种或多种,所述氧化剂选自 $KMnO_4$ 、 $K_2S_2O_8$ 、DDQ (2,3-二氯-5,6-二氰基-1,4-苯醌)、CAN (硝酸铈铵)、 $CuSO_4$ 和 $PhI(OAc)_2$ 中的一种或多种,所述的酸选自 H_2SO_4 、 HCl 和 HAc 中的一种或多种。

[0056] 上述氧化环化时可高度选择性地生成顺式的结构,避免出现顺式和反式结构的混合物,而得到的顺式的结构还可通过手性制备进一步得到效果更好的光学纯的化合物。当使用的式IV的化合物为光学纯化合物时,最后得到的即为无需进行手性拆分的光学纯的目标化合物。

[0057] 本发明的再一目的在于提供式I的化合物,包括光学异构体、外消旋体、顺反异构体以及任意组合或其药用盐,在制备抗HBV药物中的应用。

[0058] 进一步,所述的抗HBV药物为抑制HBsAg合成或分泌,同时抑制HBV病毒复制的药物。

[0059] 进一步,所述的抗HBV药物为片剂、粉剂、胶囊、溶液、分散体、混悬剂、糖浆、喷雾剂、栓剂、凝胶、乳液或贴剂。

[0060] 所述的抗HBV药物可用于治疗和预防乙型肝炎病毒感染。

[0061] 本发明的有益效果在于:

[0062] 1、本发明的式I的化合物能够显著降低体内HBsAg水平,同时抑制HBV病毒的复制,可用于制备治疗和预防乙型肝炎病毒感染的药物。式I中V或Y为O时,其溶解性得到显著改善,具有良好的药用属性,同时毒性也较低,药动学及药效学功能得到改善,其与HBV病毒结合的效率可大大增加,体内HBV病毒的清除率也可进一步提高。

[0063] 2、本发明式I的化合物的制备方法,只需通过氢化、氧化环化以及水解等反应,而且在氧化环化反应中,相比于专利文献W0 2017/017042A1公开的化合物B1的制备方法,立体选择性更高,可选择性的得到抗HBV活性更高的顺式的结构,避免出现顺式和反式结构的混合体,而得到的顺式的结构还可通过手性制备进一步得到效果更好的光学纯的化合物。整个制备过程每一步的产率均较高,总体生产成本低廉、工艺简单、选择性高、异构体含量低,适于工业化生产。

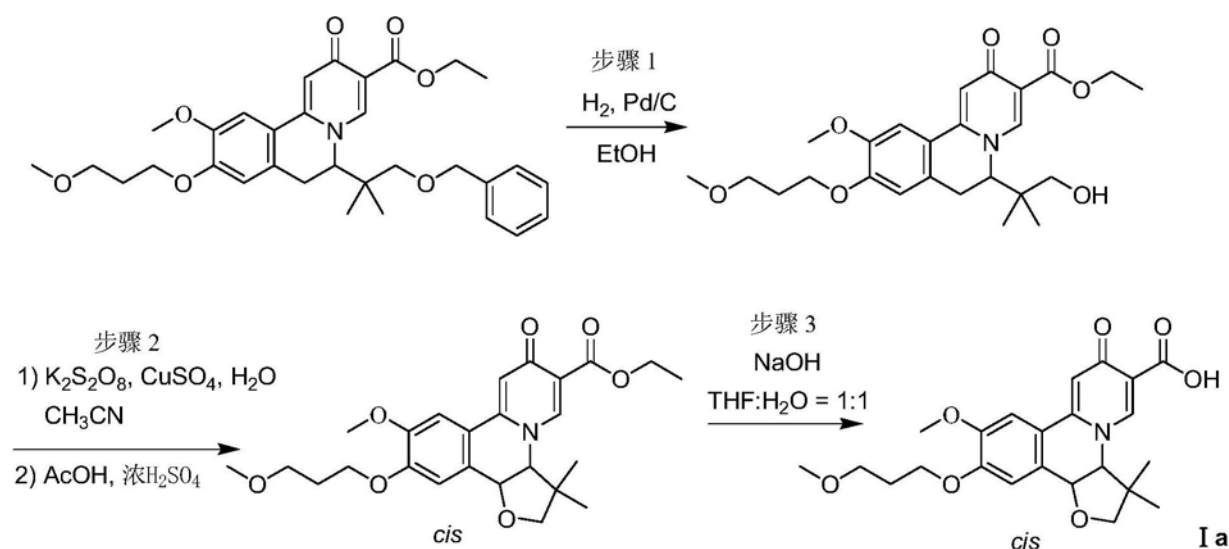
具体实施方式

[0064] 以下结合具体实施例,对本发明作进一步说明。应理解,以下实施例仅用于说明本发明而非用于限定本发明的范围。

[0065] 实施例1 cis-10-甲氧基-11-(3-甲氧基丙氧基)-3,3-二甲基-7-氧代-3,3a,7,12b-四氢-2H-呋喃并[3,2-c]吡啶并[2,1-a]异喹啉-6-甲酸

[0066] 合成路线如下:

[0067]



[0068] 步骤1: 制备6-(2-羟基-1,1-二甲基-乙基)-10-甲氧基-9-(3-甲氧基丙氧基)-2-

氧代-6,7-二氢苯并[a]喹啉-3-甲酸乙酯

[0069] 将6-(2-苄氧基-1,1-二甲基-乙基)-10-甲氧基-9-(3-甲氧基丙氧基)-2-氧代-6,7-二氢苯并[a]喹啉-3-甲酸乙酯(1.65g,3mmol,制备参考专利文献US20160122344A1),以及Pd/C(10%)(0.5g)缓慢加入乙醇(200mL)中,在氢气氛下加压,机械搅拌,得到粗制6-(2-羟基-1,1-二甲基-乙基)-10-甲氧基-9-(3-甲氧基丙氧基)-2-氧代-6,7-二氢苯并[a]喹啉-3-甲酸乙酯(1.10g,收率约79.7%),未经纯化直接用于下一步骤。

[0070] ^1H NMR(400MHz, CDCl_3) δ : 8.43(s, 1H), 7.12(s, 1H), 6.89(s, 1H), 6.71(s, 1H), 4.44(d, 1H), 4.37(q, 2H), 4.15(q, 2H), 3.89(s, 3H), 3.57(m, 2H), 3.39(d, 1H), 3.36(s, 4H), 3.29(q, 2H), 3.07(m, 1H), 3.07(d, 1H), 2.13(m, 2H), 1.37(t, 3H), 0.87(s, 3H), 0.49(s, 3H). ESI-MS(m/z): 460.2[M+1]⁺.

[0071] 步骤2:制备cis-10-甲氧基-11-(3-甲氧基丙氧基)-3,3-二甲基-7-氧代-3,3a,7,12b-四氢-2H-呋喃并[3,2-c]吡啶并[2,1-a]异喹啉-6-甲酸乙酯

[0072] 将6-(2-羟基-1,1-二甲基-乙基)-10-甲氧基-9-(3-甲氧基丙氧基)-2-氧代-6,7-二氢苯并[a]喹啉-3-甲酸乙酯(0.92g,2mmol)溶于乙腈(282mL)中,加入预先配制好的溶液(1.1g的 $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 与0.43g的 CuSO_4 溶于57mL水),将所得混合物加热回流1-2小时,自然冷却后,过滤以除去固体。向滤液中加入乙酸乙酯(300mL),接着将合并的有机层用饱和NaCl溶液洗涤,然后用无水硫酸钠干燥,减压浓缩,将所得固体溶于乙酸(7mL)中,在机械搅拌下逐滴加入浓硫酸(0.3mL),在室温下搅拌0.5-1小时。将混合物用乙酸乙酯(300mL)稀释,接着将合并的有机层用饱和 NaHCO_3 溶液、饱和NaCl溶液洗涤,然后用无水硫酸钠干燥,减压浓缩,通过柱色谱(流动相:乙醇/乙酸乙酯),纯化得到cis-10-甲氧基-11-(3-甲氧基丙氧基)-3,3-二甲基-7-氧代-3,3a,7,12b-四氢-2H-呋喃并[3,2-c]吡啶并[2,1-a]异喹啉-6-甲酸乙酯(460mg,收率50.2%)。

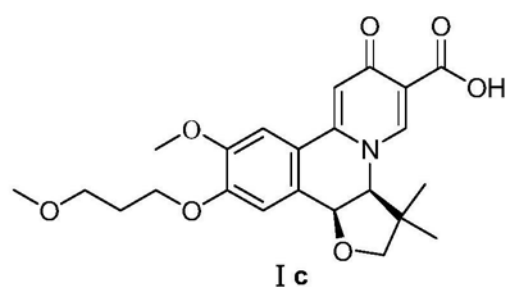
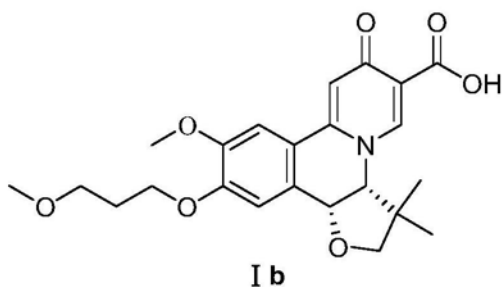
[0073] 步骤3:制备cis-10-甲氧基-11-(3-甲氧基丙氧基)-3,3-二甲基-7-氧代-3,3a,7,12b-四氢-2H-呋喃并[3,2-c]吡啶并[2,1-a]异喹啉-6-甲酸

[0074] 将cis-10-甲氧基-11-(3-甲氧基丙氧基)-3,3-二甲基-7-氧代-3,3a,7,12b-四氢-2H-呋喃并[3,2-c]吡啶并[2,1-a]异喹啉-6-甲酸乙酯(230mg,0.5mmol)加入3mL的THF/水(体积比:THF:H₂O=1:1)的溶液中,再向溶液中加入NaOH(80mg),室温搅拌2小时后加入乙酸乙酯(50mL),接着加入1mol/L的盐酸以将溶液的pH调节至3-4,干燥浓缩,通过柱色谱纯化(流动相:异丙醇/乙酸乙酯)得到固体化合物Ia,即cis-10-甲氧基-11-(3-甲氧基丙氧基)-3,3-二甲基-7-氧代-3,3a,7,12b-四氢-2H-呋喃并[3,2-c]吡啶并[2,1-a]异喹啉-6-甲酸(118mg,收率54.9%)。

[0075] ^1H NMR(400MHz, CDCl_3) δ : 8.38(s, 1H), 7.18-7.10(m, 3H), 5.54(d, 1H), 4.38(d, 1H), 4.21(q, 2H), 3.94(s, 3H), 3.77(d, 1H), 3.58(td, 2H), 3.44(d, 1H), 3.37(s, 3H), 2.15(t, 2H), 1.39(s, 3H), 0.59(s, 3H). ESI-MS(m/z): 430.4[M+1]⁺.

[0076] 化合物Ia为外消旋体,化合物Ia(1g)通过手性HPLC进一步分离得到两种光学异构体Ib(320mg)和Ic(310mg),

[0077]



[0078] 化合物Ib和Ic的核磁氢谱、质谱相同： ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ : 8.38 (s, 1H), 7.18–7.10 (m, 3H), 5.54 (d, 1H), 4.38 (d, 1H), 4.21 (q, 2H), 3.94 (s, 3H), 3.77 (d, 1H), 3.58 (td, 2H), 3.44 (d, 1H), 3.37 (s, 3H), 2.15 (t, 2H), 1.39 (s, 3H), 0.59 (s, 3H). ESI-MS (m/z): 430.4 $[\text{M}+1]^+$.

[0079] 生物学实施例

[0080] 1、HBV细胞系

[0081] HepG2.2.15细胞,一种HBV-表达细胞系在RPMI1640培养基(北京索莱宝生物医药科技有限公司)中培养,所述培养基补充有10%胎牛血清(GEMINI)和最终浓度为200mg/L的G418(GIBCO),并保存在5% CO_2 , 37℃的环境中。

[0082] 2、MTT法检测样品对HepG2.2.15细胞的毒性作用

[0083] 将对数期的HepG2.2.15细胞悬液(8×10^4 cell/mL)接种到96-孔板中(100 μL /孔),边缘用无菌PBS填充,常规培养24小时后,细胞单层贴壁均匀生长,吸去培养基,每孔加入100 μL 含有多浓度的化合物Ia的培养基,每个浓度设置3个复孔,并设空白对照组(不含测试化合物的培养基)。

[0084] 培养72小时后,每孔加入20 μL 的含有MTT(BIOSHARP公司生产)的PBS缓冲液,继续培养4小时后,小心弃去各孔的培养基,加入150 μL 的DMSO,置摇床上低速震荡10分钟,使结晶充分溶解。使用酶标仪(BIORAD, JP, 型号: 680-18622)检测各孔吸光度OD值(检测波长为490nm,参考波长为630nm)。根据以下公式计算抑制率,进而可得出化合物Ia抑制细胞生长的半数毒性浓度 CC_{50} 值:

[0085] 抑制率(%) = $(1 - \text{给药孔OD值} / \text{对照孔OD值}) \times 100$

[0086] 表1化合物Ia对HepG2.2.15细胞的毒性数据

浓度 (μM)	OD 值 (M+SD)	抑制率 (%)	CC_{50} 值 (μM)
800	0.1803 $\pm$ 0.0132	66.29	538.5
400	0.3070 $\pm$ 0.0178	42.62	
200	0.4613 $\pm$ 0.0163	13.77	
100	0.5283 $\pm$ 0.0193	1.25	
50	0.5290 $\pm$ 0.0846	1.12	

[0087] 由表1结果可知,化合物Ia对HepG2.2.15细胞的半数毒性浓度 CC_{50} 达到538.5 μM ,可见化合物Ia对HepG2.2.15细胞的毒性较小。

[0089] 3、ELISA法检测样品对HBsAg分泌的抑制作用

[0090] HBsAg测定

[0091] 将对数期的HepG2.2.15细胞悬液 (2.5×10^4 cell/mL) 接种到24-孔板中 (1mL/孔), 培养24小时后, 吸去培养基, 加入含有多种浓度的化合物Ia的培养基, 每个浓度设置3个复孔, 并设空白对照组 (不含测试化合物的培养基)、阳性对照组1 (含0.1 μ M的恩替卡韦ETV (中美上海施贵宝制药有限公司, 批号: AAK4193) 的培养基)、阳性对照组2 (含有多种浓度的化合物A1的培养基) 和阳性对照组3 (含有多种浓度的化合物B1的培养基)。

[0092] 常规培养, 收集上清, -20℃保存。

[0093] 使用HBsAg抗原检测试剂盒 (上海科华生物工程股份有限公司, 批号: 201608302) 来半定量地测量分泌的HBV抗原的水平。对于该检测, 将75 μ L的培养上清转移至测定板, 同时设置阴性、阳性及空白对照组, 将板密封并在37℃孵育1小时。撕去封片, 将50 μ L的酶轭合物试剂添加到每个孔中。将板密封并在37℃孵育半小时。抛弃上清-酶-混合物并将孔用工作浓度洗涤液 (以纯化水25倍稀释) 洗涤5次, 将残余液体在吸水薄页纸上拍干。向每个孔中添加50 μ L的底物A和B。在30分钟温育之后, 每孔加入50 μ L的终止液, 充分混匀, 使用酶标仪 (BIORAD, JP, 型号: 680-18622) 检测各孔吸光度OD值 (检测波长为490nm, 参考波长为630nm)。根据以下公式计算抑制率:

[0094] $\text{HBsAg分泌抑制率}(\%) = (1 - \text{给药孔OD值} / \text{对照孔OD值}) \times 100$

[0095] 进而得出测试化合物抑制HBsAg分泌的半数抑制浓度IC₅₀值 (IC₅₀定义为相比于空白对照, HBsAg分泌减少50%情况下的化合物浓度)。

[0096] 表2特定物质的活性数据

	分组	IC ₅₀ (μ M)
	ETV	0.1
[0097]	化合物 A1	0.005
	化合物 B1	0.003
	化合物 I a	0.0005

[0098] 由表2结果可知, 本发明的化合物Ia的抑制HBsAg分泌的半数抑制浓度IC₅₀值远低于对照化合物A1和B1, 抗HBV活性更加显著。

[0099] 综上, 本发明的化合物Ia不仅细胞毒性较低, 而且相比于结构最为接近的化合物B1, 其中五元环中的氧原子使其溶解性得到显著改善, 具有良好的药用属性, 药动学及药效学功能得到改善, 其与HBV病毒结合的效率可大大增加, 体内HBV病毒的清除率也可进一步提高, 该化合物能够显著降低体内HBsAg水平, 同时抑制HBV病毒的复制, 可用于制备治疗和预防乙型肝炎病毒感染的药物。

[0100] 以上已对本发明创造的较佳实施例进行了具体说明, 但本发明创造并不限于所述实施例, 熟悉本领域的技术人员在不违背本发明创造精神的前提下还可作出种种的等等的变型或替换, 这些等等的变型或替换均包含在本申请权利要求所限定的范围内。