



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110938095 A

(43)申请公布日 2020.03.31

(21)申请号 201910892562.4

A61P 31/20(2006.01)

(22)申请日 2019.09.20

(66)本国优先权数据

201811105277.5 2018.09.21 CN

(71)申请人 正大天晴药业集团股份有限公司

地址 222062 江苏省连云港市郁州南路369号

申请人 上海医药工业研究院

(72)发明人 刘相奎 黄婧 朱雪焱 徐宏江

张喜全 葛兴枫 卢丹丹 赵烨

顾红梅

(51)Int.Cl.

C07F 9/6561(2006.01)

A61K 31/685(2006.01)

A61P 31/18(2006.01)

权利要求书3页 说明书16页

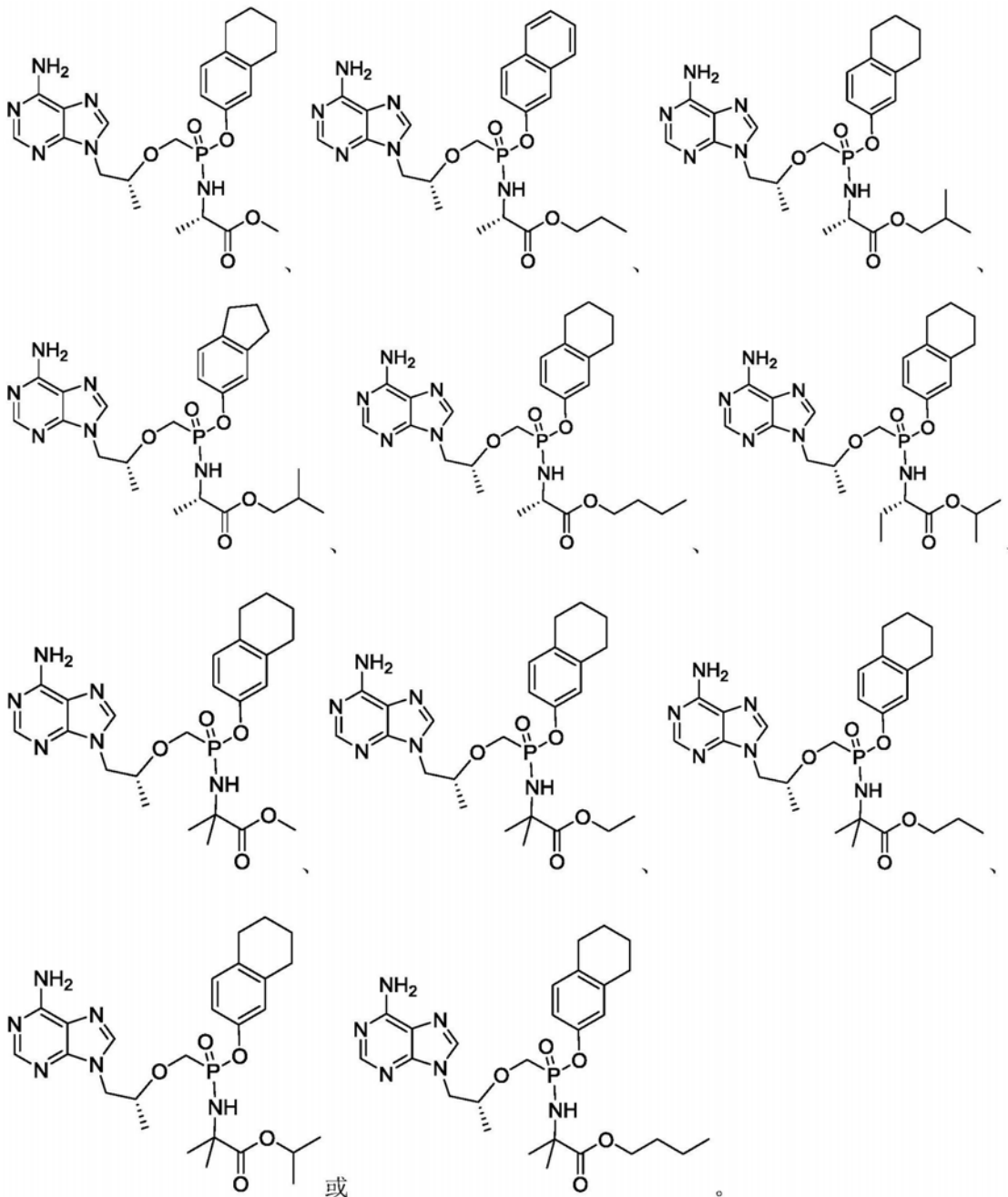
(54)发明名称

一种新型替诺福韦混合酯-酰胺前药

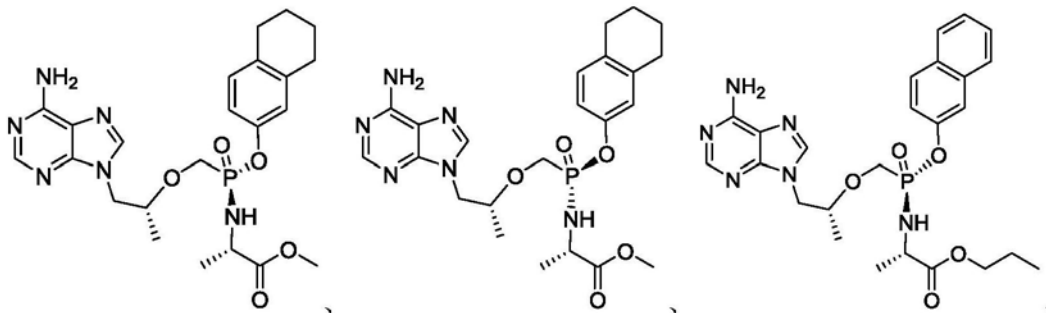
(57)摘要

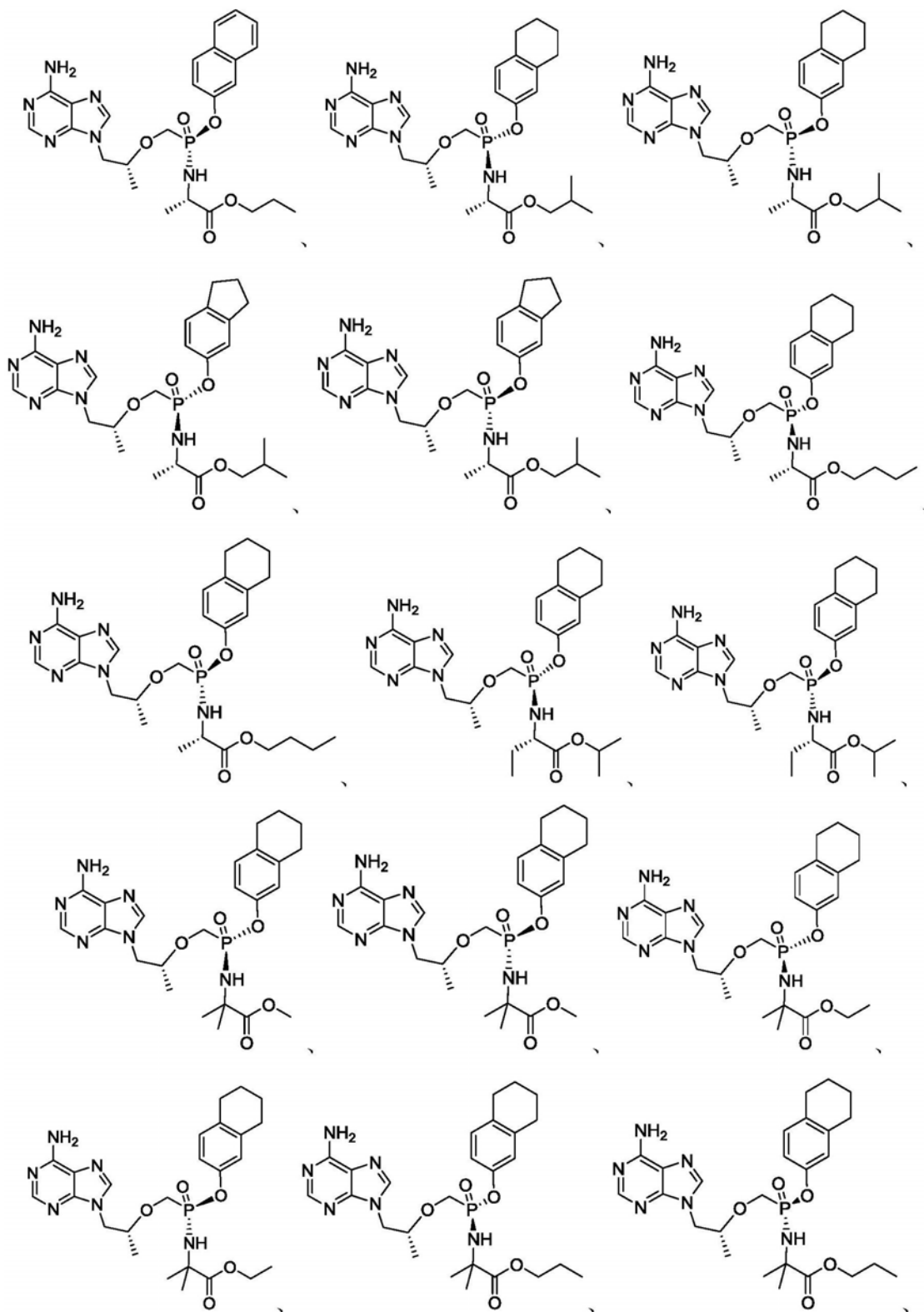
本申请涉及一种新型替诺福韦混合酯-酰胺前药或其药学上可接受的盐、其制备方法、含有这些前药化合物的药物组合物,及其在制备用于治疗病毒感染例如乙型肝炎病毒(HBV)或人类免疫缺陷病毒(HIV)感染的药物的用途。

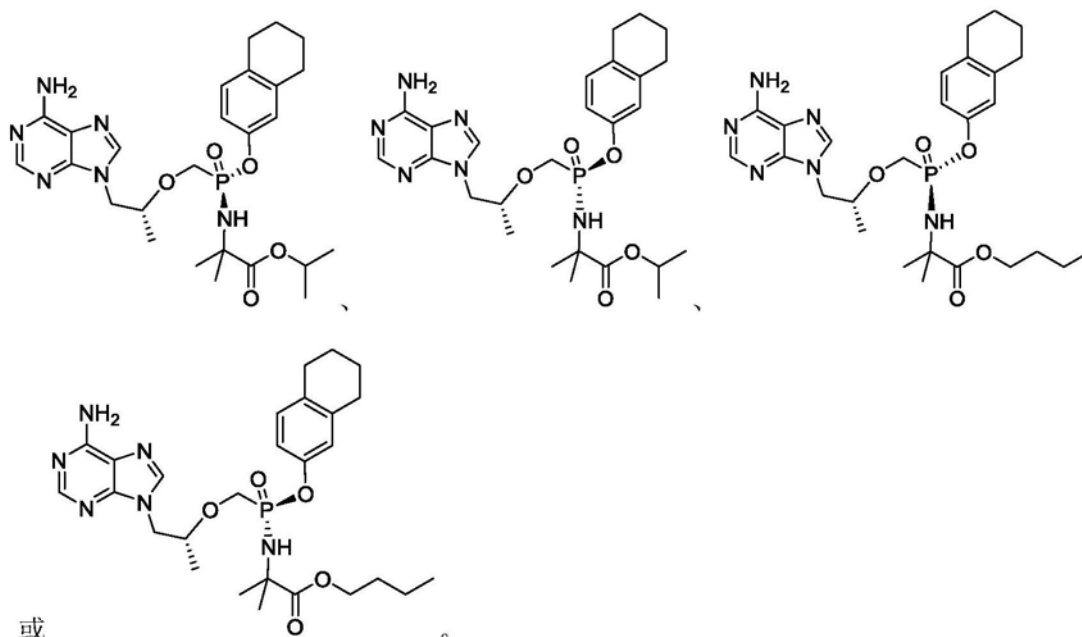
1. 以下化合物或其药学上可接受的盐：



2. 以下化合物或其药学上可接受的盐：







或

3. 一种药物组合物,其包含权利要求1或2所述化合物或其药学上可接受的盐。
4. 权利要求3所述药物组合物,还包括药学上可接受的辅料。
5. 权利要求1或2所述化合物或其药学上可接受的盐、或权利要求3或4所述药物组合物在制备用于治疗HBV或HIV感染的药物的用途。

一种新型替诺福韦混合酯-酰胺前药

技术领域

[0001] 本申请涉及一种新型替诺福韦混合酯-酰胺前药或其药学上可接受的盐、其制备方法、含有这些前药化合物的药物组合物,及其在制备用于治疗病毒感染例如乙型肝炎病毒 (HBV) 或人类免疫缺陷病毒 (HIV) 感染的药物的用途。

背景技术

[0002] 替诺福韦是一种核苷酸类逆转录酶抑制剂,可有效对抗多种病毒,用于治疗病毒感染性疾病。然而,替诺福韦在生理pH条件下不易透过细胞膜吸收,生物利用度很低,并且还存在剂量依赖性肾毒性,限制了其治疗作用,因此必须通过酯化、成盐等手段制成磷酸酯前药才能用于临床。

[0003] 富马酸替诺福韦二吡呋酯 (TDF) 是第一代替诺福韦前药,用于治疗艾滋病感染和乙型肝炎。由于TDF对由血清酶介导的水解反应高度敏感,不能有效增加作用部位药物浓度,同时在代谢过程释放两当量的具有潜在毒性的甲醛,在临床治疗过程中发现乳酸性酸中毒、严重的肝肿大以及脂肪代谢障碍等副作用。

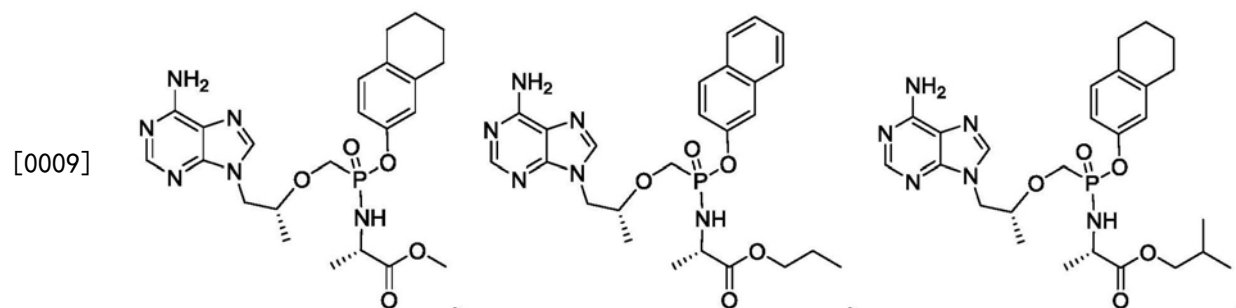
[0004] 替诺福韦艾拉酚胺 (TAF) 是第二代替诺福韦前药,与第一代TDF相比,TAF大大提高了血浆稳定性,且能特异性地在病毒感染的靶部位水解为替诺福韦。

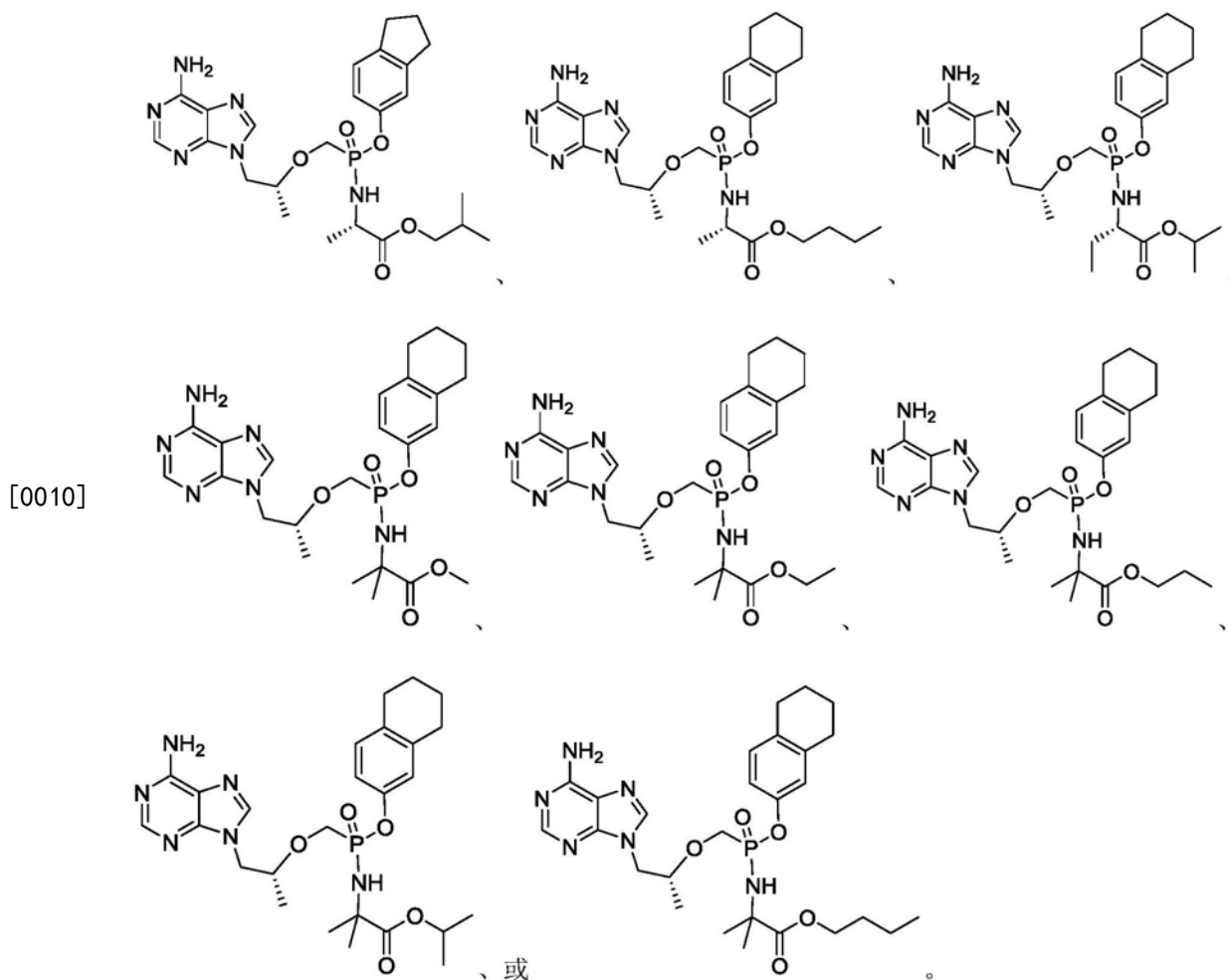
[0005] 进一步地,CN104804042A和CN104903334A又公开了一系列结构优化的替诺福韦前药。

[0006] 而本申请又提供了一些新型的替诺福韦混合酯-酰胺前药,它们具有极其优异的体外和体内抗病毒活性。

[0007] 发明详述

[0008] 本申请涉及以下化合物或其药学上可接受的盐:





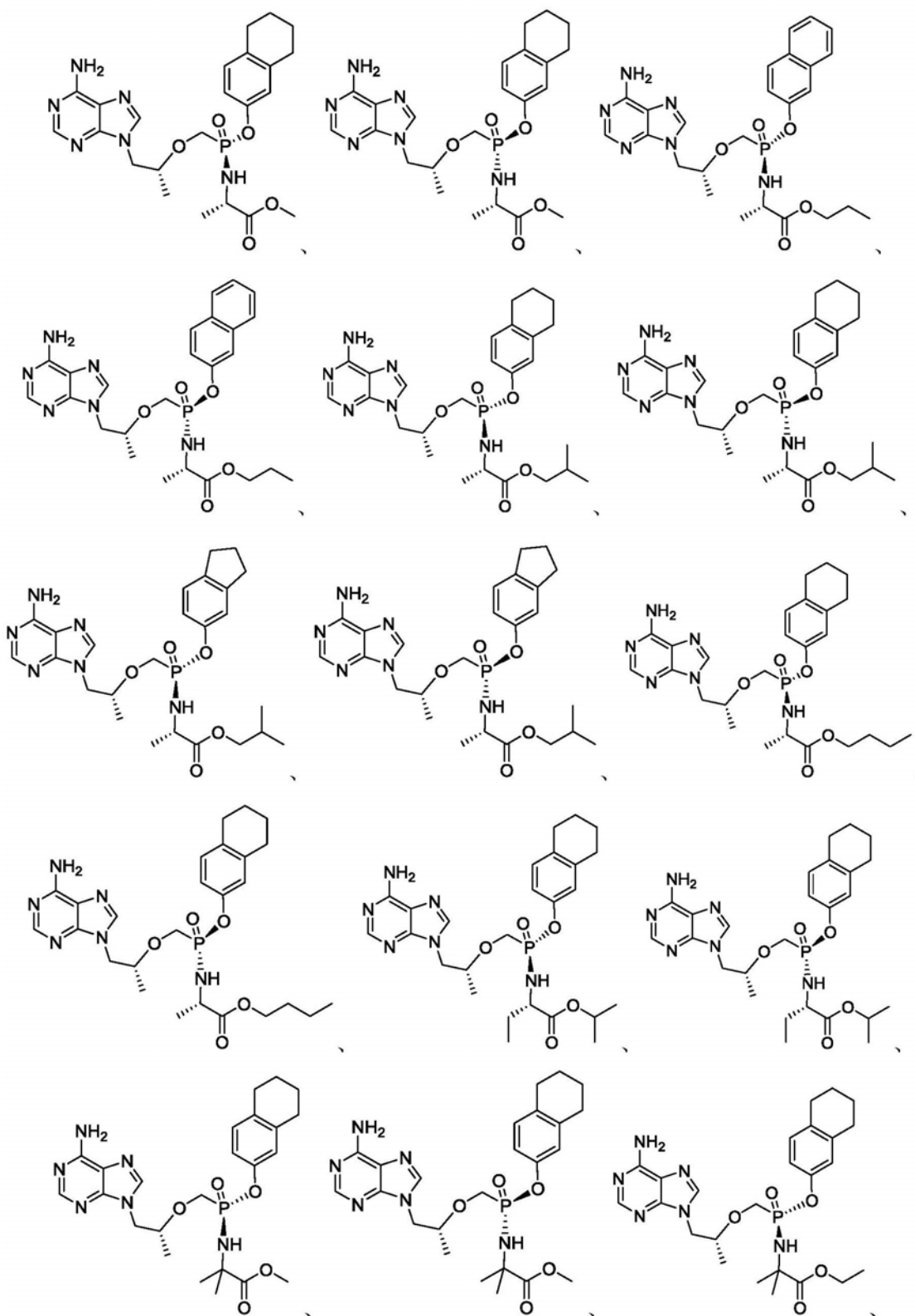
[0011] 本申请的上述化合物可在P原子处手性富集,以形成手性富集的非对映异构体,例如在R_P处富集,富集程度超过60%或80%或90%或94%或95%或99%或99.5%以上。例如在S_P处富集,富集程度超过60%或80%或90%或95%或99%或99.5%以上。

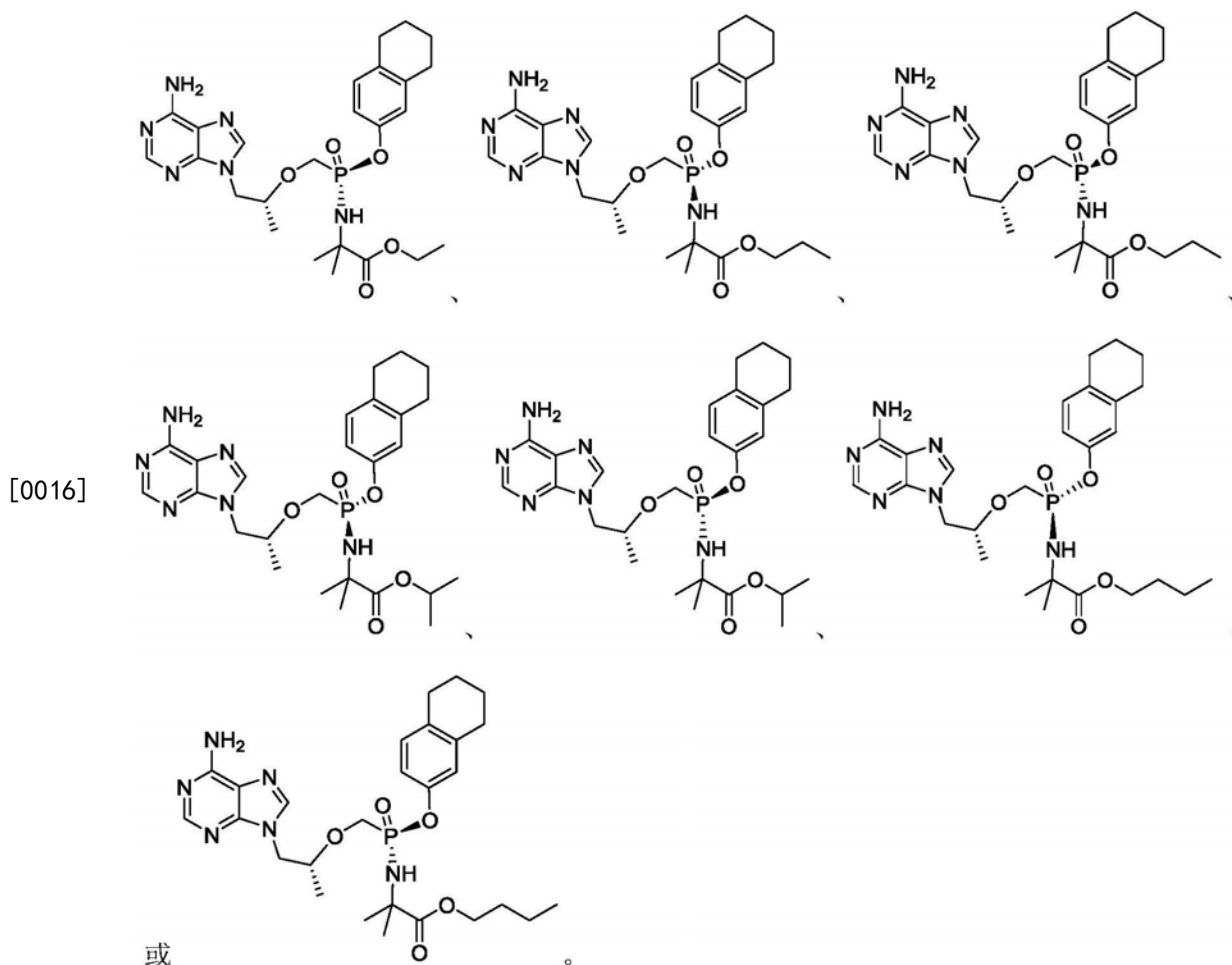
[0012] 本申请的上述化合物可用L-脯氨酸拆分,得到P原子处手性富集的单一对映异构体化合物。在一些实施方案中,其富集程度超过60%或80%或90%或94%或95%或99%或99.5%以上。

[0013] 本申请的上述化合物可用D-脯氨酸拆分,得到P原子处手性富集的单一对映异构体化合物。在一些实施方案中,其富集程度超过60%或80%或90%或94%或95%或99%或99.5%以上。

[0014] 进一步,本申请涉及以下化合物或其药学上可接受的盐:

[0015]





[0017] 另一方面,本申请还涉及上述具体化合物的富马酸盐。具体地,本申请还涉及上述具体化合物的富马酸盐(1:1)或者半富马酸盐。

[0018] 另一方面,本申请还提供药物组合物,其包含上述具体化合物或其药学上可接受的盐。在一些实施方案中,本申请的药物组合物还包括药学上可接受的辅料。

[0019] 另一方面,本申请还提供一种治疗HBV或HIV感染的方法,包括对需要该治疗的哺乳动物,优选人类,给予治疗有效量的上述具体化合物或其药学上可接受的盐或其药物组合物。

[0020] 另一方面,本申请还提供了上述的化合物或其药学上可接受的盐、或其药物组合物在制备用于治疗HBV或HIV感染的药物的用途。

[0021] 另一方面,本申请还提供了上述的化合物或其药学上可接受的盐、或其药物组合物治疗HBV或HIV感染的用途。

[0022] 另一方面,本申请还提供了治疗HBV或HIV感染的上述的化合物、其药学上可接受的盐、或其药物组合物。

[0023] 在本申请的部分实施方式中,所述HBV感染涉及的疾病包括HBV感染引起的肝脏疾病。

[0024] 定义

[0025] 除非另有说明,本申请中所用的下列术语具有下列含义。一个特定的术语在没有特别定义的情况下不应该被认为是不确定的或不清楚的,而应该按照本领域普通的含义去

理解。当本文中出現商品名时，意在指代其对应的商品或其活性成分。

[0026] 术语“治疗”意为将本申请所述化合物或制剂进行给药以预防、改善或消除疾病或与所述疾病相关的一个或多个症状，且包括：

[0027] (i) 预防疾病或疾病状态在哺乳动物中出现，特别是当这类哺乳动物易患有该疾病状态，但尚未被诊断为已患有该疾病状态时；

[0028] (ii) 抑制疾病或疾病状态，即遏制其发展；

[0029] (iii) 缓解疾病或疾病状态，即使该疾病或疾病状态消退。

[0030] 术语“治疗有效量”意指 (i) 治疗或预防特定疾病、病况或障碍，(ii) 减轻、改善或消除特定疾病、病况或障碍的一种或多种症状，或 (iii) 预防或延迟本文中所述的特定疾病、病况或障碍的一种或多种症状发作的本申请化合物的用量。构成“治疗有效量”的本申请化合物的量取决于该化合物、疾病状态及其严重性、给药方式以及待被治疗的哺乳动物的年龄而改变，但可例行性地由本领域技术人员根据其自身的知识及本公开内容而确定。

[0031] 术语“药学上可接受的”，是针对那些化合物、材料、组合物和/或剂型而言，它们在可靠的医学判断的范围之内，适用于与人类和动物的组织接触使用，而没有过多的毒性、刺激性、过敏性反应或其它问题或并发症，与合理的利益/风险比相称。作为药学上可接受的盐，例如，可以提及金属盐、铵盐、与有机碱形成的盐、与无机酸形成的盐、与有机酸形成的盐、与碱性或者酸性氨基酸形成的盐等。

[0032] 术语“药物组合物”是指一种或多种本申请的化合物或其盐与药学上可接受的辅料组成的混合物。药物组合物的目的是有利于对有机体给予本申请的化合物。

[0033] 术语“药学上可接受的辅料”是指对有机体无明显刺激作用，而且不会损害该活性化合物的生物活性及性能的那些辅料。合适的辅料是本领域技术人员熟知的，例如碳水化合物、蜡、水溶性和/或水可膨胀的聚合物、亲水性或疏水性材料、明胶、油、溶剂、水等。

[0034] 词语“包括 (comprise)”或“包含 (comprise)”及其英文变体例如 comprises 或 comprising 应理解为开放的、非排他性的意义，即“包括但不限于”。

[0035] 本申请的化合物和中间体还可以以不同的互变异构体形式存在，并且所有这样的形式包含于本申请的范围內。术语“互变异构体”或“互变异构体形式”是指可经由低能垒互变的不同能量的结构异构体。例如，质子互变异构体 (也称为质子转移互变异构体) 包括经由质子迁移的互变，如酮-烯醇及亚胺-烯胺异构化。质子互变异构体的具体实例是咪唑部分，其中质子可在两个环氮间迁移。价互变异构体包括通过一些成键电子的重组的互变。

[0036] 本申请还包括与本文中记载的那些相同的，但一个或多个原子被原子量或质量数不同于自然中通常发现的原子量或质量数的原子置换的同位素标记的本申请化合物。可结合到本申请化合物的同位素的实例包括氢、碳、氮、氧、磷、硫、氟、碘和氯的同位素，诸如分别为²H、³H、¹¹C、¹³C、¹⁴C、¹³N、¹⁵N、¹⁵O、¹⁷O、¹⁸O、³¹P、³²P、³⁵S、¹⁸F、¹²³I、¹²⁵I 和 ³⁶Cl 等。

[0037] 某些同位素标记的本申请化合物 (例如用³H及¹⁴C标记的那些) 可用于化合物和/或底物组织分布分析中。氚化 (即³H) 和碳-14 (即¹⁴C) 同位素对于由于它们易于制备和可检测性是尤其优选的。正电子发射同位素，诸如¹⁵O、¹³N、¹¹C 和 ¹⁸F 可用于正电子发射断层扫描 (PET) 研究以测定底物占有率。通常可以通过与公开于下文的方案和/或实施例中的那些类似的下列程序，通过同位素标记试剂取代未经同位素标记的试剂来制备同位素标记的本申请化合物。

[0038] 此外,用较重同位素(诸如氘(即²H))取代可以提供某些由更高的代谢稳定性产生的治疗优点(例如增加的体内半衰期或降低的剂量需求),并且因此在某些情形下可能是优选的,其中氘取代可以是部分或完全的,部分氘取代是指至少一个氢被至少一个氘取代,所有这样的形式的化合物包含于本申请的范围內。

[0039] 本申请化合物可以是不对称的,例如,具有一个或多个立体异构体。除非另有说明,所有立体异构体都包括,如对映异构体和非对映异构体。本申请的含有不对称碳原子的化合物可以以光学活性纯的形式或外消旋形式被分离出来。光学活性纯的形式可以从外消旋混合物拆分,或通过使用手性原料或手性试剂合成。

[0040] 本申请的药物组合物可通过将本申请的化合物与适宜的药学上可接受的辅料组合而制备,例如可配制成固态、半固态、液态或气态制剂,如片剂、丸剂、胶囊剂、粉剂、颗粒剂、膏剂、乳剂、悬浮剂、栓剂、注射剂、吸入剂、凝胶剂、微球及气溶胶等。

[0041] 给予本申请化合物或其药学上可接受的盐或其药物组合物的典型途径包括但不限于口服、直肠、局部、吸入、肠胃外、舌下、阴道内、鼻内、眼内、腹膜内、肌内、皮下、静脉内给药。

[0042] 本申请的药物组合物可以采用本领域众所周知的方法制造,如常规的混合法、溶解法、制粒法、制糖衣药丸法、磨细法、乳化法、冷冻干燥法等。

[0043] 在一些实施方案中,药物组合物是口服形式。对于口服给药,可以通过将活性化合物与本领域熟知的药学上可接受的辅料混合,来配制该药物组合物。这些辅料能使本申请的化合物被配制成片剂、丸剂、锭剂、糖衣剂、胶囊剂、液体、凝胶剂、浆剂、悬浮剂等,用于对患者的口服给药。

[0044] 可以通过常规的混合、填充或压片方法来制备固体口服组合物。例如,可通过下述方法获得:将所述的活性化合物与固体辅料混合,任选地碾磨所得的混合物,如果需要则加入其它合适的辅料,然后将该混合物加工成颗粒,得到了片剂或糖衣剂的核心。适合的辅料包括但不限于:粘合剂、稀释剂、崩解剂、润滑剂、助流剂、甜味剂或矫味剂等。

[0045] 药物组合物还可适用于肠胃外给药,如合适的单位剂型的无菌溶液剂、混悬剂或冻干产品。

[0046] 本申请化合物的治疗剂量可根据例如以下而定:治疗的具体用途、给予化合物的方式、患者的健康和状态,以及签处方医师的判断。本申请化合物在药用组合物中的比例或浓度可不固定,取决于多种因素,它们包括剂量、化学特性(例如疏水性)和给药途径。例如可通过含约0.1~10%w/v该化合物的生理缓冲水溶液提供本申请化合物,用于肠胃外给药。某些典型剂量范围为约1μg/kg~约1g/kg体重/日。在某些实施方案中,剂量范围为约0.01mg/kg~约100mg/kg体重/日。剂量很可能取决于此类变量,如疾病或病症的种类和发展程度、具体患者的一般健康状态、所选择的化合物的相对生物学效力、赋形剂制剂及其给药途径。可通过由体外或动物模型试验系统导出的剂量-反应曲线外推,得到有效剂量。

[0047] 本申请的化合物可以通过本领域技术人员所熟知的多种合成方法来制备,包括下面列举的具体实施方式、其与其他化学合成方法的结合所形成的实施方式以及本领域技术上人员所熟知的等同替换方式,优选的实施方式包括但不限于本申请的实施例。

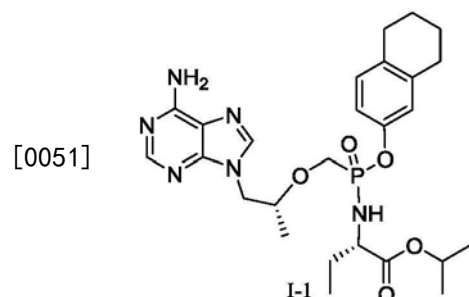
[0048] 本申请的化合物可以选择性的采用以下方法进行异构体拆分:将目标化合物及L-脯氨酸或D-脯氨酸加入乙酸乙酯中,加热至溶解,后冷却至室温,室温搅拌过夜,过滤,滤饼

加入水搅拌10min后,过滤,干燥,得到单一构型化合物。必要时可以重复上述操作拆分后得到单一构型化合物。

具体实施方式

[0049] 为清楚起见,进一步用实施例来阐述本发明,但是实施例并非限制本申请的范围。本申请所使用的所有试剂是市售的,无需进一步纯化即可使用。

[0050] 实施例1化合物I-1的合成



[0052] 1) 将9-[2-(R)-(磷酰基甲氧基)丙基]腺嘌呤(5.74g)加到二氯甲烷(200mL)中,加入N,N-二甲基甲酰胺(2.40mL),滴加草酰氯(8.00mL),滴毕后35℃下反应5h,减压浓缩,残留物用二氯甲烷(100mL)溶解后再减压浓缩,重复2次,得到残留固体。氮气保护下将残留物加入到二氯甲烷(100mL)中,冷却至-25℃后,加入N,N-二异丙基乙胺(6.60mL),制备成溶液A备用。

[0053] 2) 将5,6,7,8-四氢-2萘酚(2.96g)及N,N-二异丙基乙胺(6.60mL)溶于二氯甲烷(20mL)中,制备成溶液B备用。

[0054] 3) 将L-2-氨基丁酸(1.00g)加入异丙醇(5.83g)中,室温下滴加氯化亚砷(1.38g),滴毕后回流5.5h,减压浓缩,残留物用碳酸氢钾溶液调pH至中性,二氯甲烷萃取(50mL)3次,合并二氯甲烷层,并用饱和食盐水洗,无水硫酸钠干燥,减压浓缩,得到L-2-氨基丁酸异丙酯(1.20g)。

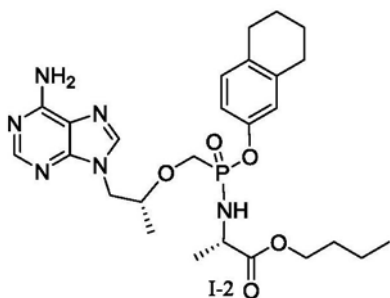
[0055] 4) 将L-2-氨基丁酸异丙酯(3.48g)及N,N-二异丙基乙胺(13.20mL)溶于二氯甲烷(20mL)中,制备成溶液C备用。

[0056] 5) 氮气保护及-25℃下,向溶液A中缓慢滴加溶液B,滴毕后-25℃下搅拌45min,向反应液中滴加溶液C,滴毕后-20℃搅拌3h。反应液用5%盐酸(100mL)水溶液洗涤3次,饱和食盐水洗,无水硫酸钠干燥,减压浓缩,残留物用甲醇(50mL)溶解,加入冰醋酸(4.80g, 80.0mmol),回流2h,减压浓缩,残留物用二氯甲烷(100mL)溶解,饱和碳酸氢钠溶液(50mL)洗3次,饱和食盐水洗,干燥,减压浓缩,残留物经柱层析纯化(二氯甲烷:甲醇=50:1至10:1),得到化合物I-1(1.11g)。

[0057] $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3 , δ_{ppm}): 8.33 (d, 1H), 7.99 (d, 1H), 6.85 (m, 3H), 6.00 (d, 2H), 4.96 (m, 1H), 4.38 (m, 1H), 4.17 (m, 1H), 3.93 (m, 3H), 3.66 (m, 2H), 2.68 (m, 4H), 1.73 (m, 4H), 1.57 (m, 2H), 1.16 (m, 9H), 0.86 (m, 3H). ES-API (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$: 545.57.

[0058] 实施例2化合物I-2的合成

[0059]



[0060] 1) 将L-丙氨酸(1.00g)加入到正丁醇(8.32g)中,室温下滴加氯化亚砷(1.60g),滴毕后回流5.5h,减压浓缩,残留物用碳酸氢钾溶液调pH至中性,二氯甲烷萃取(50mL)3次,合并二氯甲烷层,并用饱和食盐水洗,无水硫酸钠干燥,减压浓缩,得到L-丙氨酸正丁酯(1.36g)。

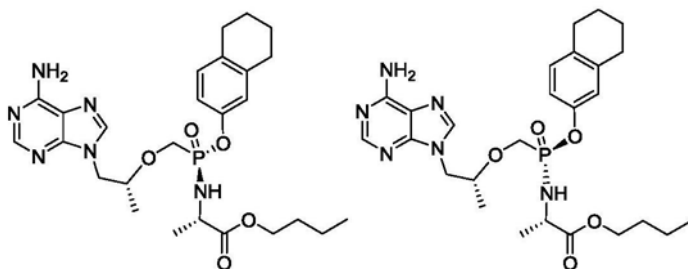
[0061] 2) 将L-丙氨酸正丁酯(3.48g)及N,N-二异丙基乙胺(13.20mL)溶于二氯甲烷(20mL)中,制备成溶液C-2备用。

[0062] 3) 参考实施例1步骤5)的过程,以溶液C-2替换溶液C,制备得到化合物I-2(1.79g)。

[0063] $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3 , δ_{ppm}): 8.33 (d, 1H), 7.95 (d, 1H), 6.83 (m, 3H), 5.62 (s, 2H), 4.34 (dd, 1H), 4.10 (m, 3H), 3.86 (m, 1H), 3.64 (m, 2H), 2.64 (d, 4H), 1.70 (m, 8H), 1.55 (m, 2H), 1.32 (d, 3H), 1.20 (d, 3H), 0.90 (t, 3H). ES-API (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$: 545.37.

[0064] 4) 拆分:

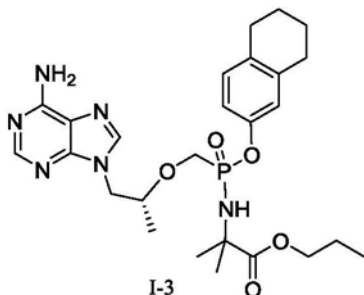
[0065]



[0066] 化合物I-2(1.00g)及L-脯氨酸(0.23g)加入乙酸乙酯(3mL)中,加热至70℃待化合物I-2溶解澄清后自然冷却至室温,室温搅拌过夜,过滤,滤饼用水(5mL)搅拌10min后过滤,干燥。拆分重复上述操作两次后得到化合物I-2A(0.38g)。

[0067] 实施例3化合物I-3的合成

[0068]

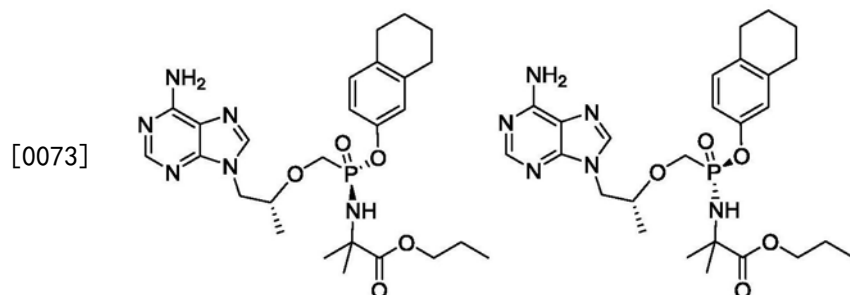


[0069] 1) 将2-甲基丙氨酸(1.00g)加入正丙醇(5.83g)中,室温下滴加氯化亚砷(1.38g),滴毕后回流5.5h,减压浓缩,残留物用碳酸氢钾溶液调pH至中性,二氯甲烷萃取(50mL)3次,合并二氯甲烷层,并用饱和食盐水洗,无水硫酸钠干燥,减压浓缩,得到2-甲基丙氨酸正丙酯(1.26g)。

[0070] 2) 将2-甲基丙氨酸正丙酯(3.48g)及N,N-二异丙基乙胺(13.20mL)溶于二氯甲烷(20mL)中,制备成溶液C-3备用。

[0071] 3) 参考实施例1步骤5)中的操作步骤,以上述制备的溶液C-3替换其中的溶液C,得到化合物I-3(1.92g)。¹H-NMR(400MHz,CDCl₃, δ_{ppm}):8.37(s,1H),7.99(s,1H),6.82(m,3H),5.57(s,2H),4.37(dd,1H),4.16(m,3H),3.95(m,1H),3.64(m,1H),2.67(d,4H),1.76(m,2H),1.69(d,6H),1.59(d,6H),1.26(d,3H),0.97(t,3H).ES-API(m/z):[M+H]⁺:545.43.

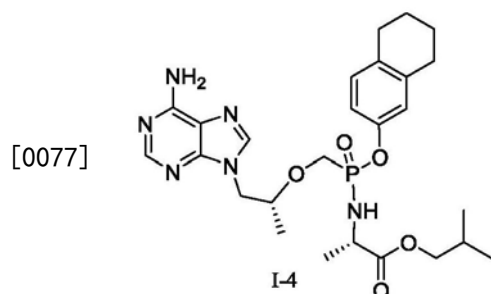
[0072] 4) 拆分:



[0074] 将化合物I-3(1.00g)及L-脯氨酸(0.23g)加入乙酸乙酯(3mL)中,加热至70℃,室温搅拌过夜,抽滤,滤饼用水(5mL)搅拌10min后抽滤,干燥。重复上述操作拆分两次后得到目标化合物I-3A(0.40g);使用D-脯氨酸,重复上述操作,拆分得到目标化合物I-3B(0.21g)。

[0075] 单一构型的HPLC检测:色谱柱DAICEL AS-H(4.6×150mm,5 μ m),正己烷:乙醇=88:12,0.5mL/min,30℃,UV at 260nm,10 μ L,60min,拆分前de值为45.16%,L-脯氨酸拆分后得到化合物I-3A的de值为96.54%,D-脯氨酸拆分后得到化合物I-3B的de值为98.26%。

[0076] 实施例4化合物I-4的合成



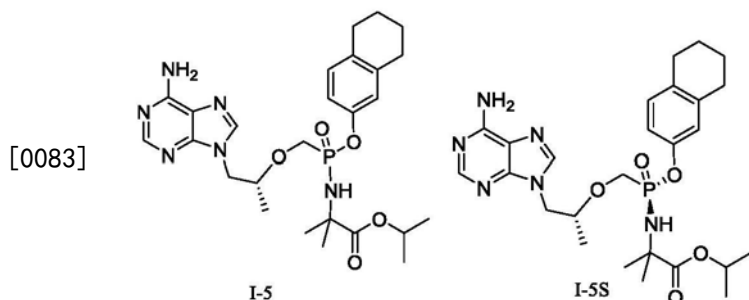
[0078] 1) 将L-丙氨酸(1.00g)加入异丁醇(8.32g)中,室温下滴加氯化亚砷(1.60g),滴毕后回流5.5h,减压浓缩,残留物用碳酸氢钾溶液调pH至中性,二氯甲烷萃取(50mL)3次,合并二氯甲烷层,并用饱和食盐水洗,无水硫酸钠干燥,减压浓缩,得到L-丙氨酸异丁酯(1.47g)。

[0079] 2) 将L-丙氨酸异丁酯(3.48g)、N,N-二异丙基乙胺(13.20mL)溶于二氯甲烷(20mL)中,制备成溶液C-4备用。

[0080] 3) 参照实施例1步骤5)的操作过程,以上述制备的溶液C-4替换溶液C,得到化合物I-4(0.80g)。

[0081] ¹H-NMR(400MHz,CDCl₃, δ_{ppm}):8.36(d,1H),7.33(d,1H),6.86(m,3H),5.58(s,2H),4.34(d,1H),4.12(m,2H),3.92(m,2H),3.85(m,1H),3.61(dd,2H),2.66(s,4H),1.91(m,1H),1.73(s,5H),1.28(m,6H),0.92(t,6H).ES-API(m/z):[M+H]⁺:545.39.

[0082] 实施例5化合物I-5及化合物I-5S的合成



[0084] 1) 将2-甲基丙氨酸(1.00g)加入异丙醇(5.83g)中,室温下滴加氯化亚砷(1.38g),滴毕后回流5.5h,减压浓缩,残留物用碳酸氢钾溶液调pH至中性,二氯甲烷萃取(50mL)3次,合并二氯甲烷层,并用饱和食盐水洗,无水硫酸钠干燥,减压浓缩,得到2-甲基丙氨酸异丙酯(1.13g)。

[0085] 2) 将2-甲基丙氨酸异丙酯(3.48g)及N,N-二异丙基乙胺(13.20mL)溶于二氯甲烷(20mL)中,制备成溶液C-5备用。

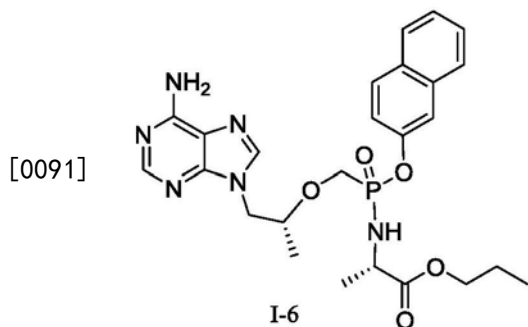
[0086] 3) 参照实施例1步骤5)的操作过程,以上述制备的溶液C-5替换溶液C,得到化合物I-5(1.38g)。

[0087] $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3 , δ_{ppm}): 8.34 (d, 1H), 8.01 (d, 1H), 6.96 (d, 1H), 6.90 (d, 2H), 6.71 (d, 1H), 5.63 (s, 2H), 5.03 (m, 1H), 3.94 (m, 4H), 3.64 (m, 1H), 2.71 (m, 4H), 1.76 (m, 4H), 1.51 (m, 6H), 1.26 (m, 9H). ES-API (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$: 545.38.

[0088] 4) 拆分: 化合物I-5(0.10g)及L-脯氨酸(0.02g)加入乙酸乙酯(1mL)中,加热至70℃,至化合物I-5溶解后,冷却至室温,室温搅拌过夜,过滤,滤饼加入水(5mL),搅拌10min后过滤,干燥,得到化合物I-5S(0.03g)。

[0089] HPLC检测: 色谱柱DAICEL AS-H ($4.6 \times 150\text{mm}$, $5\mu\text{m}$), 正己烷: 异丙醇 = 70:30, 0.5mL/min, 30℃, UV at 260nm, 10 μL , 60min, de值为98.13%。

[0090] 实施例6化合物I-6的合成



[0092] 1) 将2-萘酚(2.88g)及N,N-二异丙基乙胺(6.60mL)溶于二氯甲烷(20mL)中,制备成溶液B-6备用。

[0093] 2) 将L-丙氨酸(1.00g)加入正丙醇(6.74g)中,室温下滴加氯化亚砷(1.60g),滴毕后回流5.5h,减压浓缩,残留物用碳酸氢钾溶液调pH至中性,二氯甲烷萃取(50mL)3次,合并二氯甲烷层,并用饱和食盐水洗,无水硫酸钠干燥,减压浓缩,得到L-丙氨酸正丙酯(1.03g)。

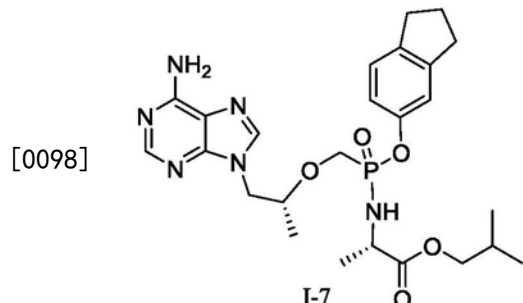
[0094] 3) 将L-丙氨酸正丙酯(3.15g)及N,N-二异丙基乙胺(13.20mL)溶于二氯甲烷

(20mL) 中, 制备成溶液C-6备用。

[0095] 4) 参照实施例1步骤5)的操作过程,以所述制备的溶液B-6替换溶液B,以所述制备的溶液C-6替换溶液C,得到化合物I-6 (0.78g)。

[0096] ES-API (m/z) : $[M+H]^+$: 527.52.

[0097] 实施例7化合物I-7的合成

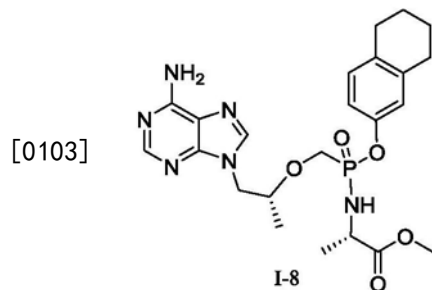


[0099] 1) 将5-茛醇 (2.68g) 及N,N-二异丙基乙胺 (6.60mL) 溶于二氯甲烷 (20mL) 中, 制备为溶液B-7备用。

[0100] 2) 参照实施例1步骤5)的操作过程,以所述制备的溶液B-7替换溶液B,以按照实施例4步骤2)制备的溶液C-4替换溶液C,得到化合物I-7(1.21g)。

[0101] ¹H-NMR (400MHz, CDCl₃, δ_{ppm}) : 8.37 (d, 1H) , 8.01 (d, 1H) , 7.02 (d, 1H) , 6.90 (s, 1H) , 6.71 (d, 1H) , 5.76 (s, 2H) , 4.38 (m, 1H) , 4.13 (m, 2H) , 3.93 (m, 2H) , 3.87 (m, 1H) , 3.78 (m, 1H) , 3.68 (m, 2H) , 2.83 (m, 4H) , 2.06 (m, 2H) , 1.94 (m, 1H) , 1.30 (m, 6H) , 0.93 (m, 6H) . ES-API (m/z) : [M+H]⁺: 531.34.

[0102] 实施例8化合物I-8的合成

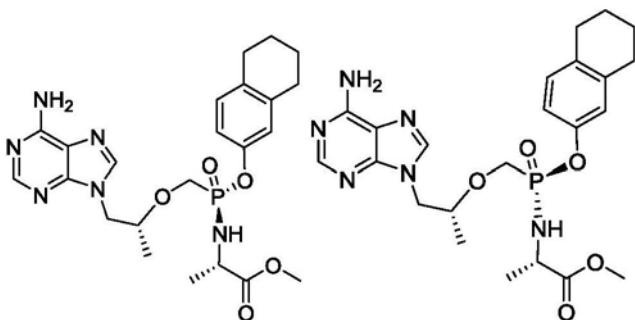


[0104] 1) 将L-丙氨酸甲酯盐酸盐(3.35g)及N,N-二异丙基乙胺(13.20mL)溶于二氯甲烷(20mL)中,制备成溶液C-8备用。

[0105] 2) 参照实施例1步骤5)的操作过程,以所述制备的溶液C-8替换溶液C,得到化合物I-8(1.87g). $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3 , δ_{ppm}): 8.38 (d, 1H), 8.00 (d, 1H), 6.88 (m, 3H), 5.61 (s, 2H), 4.28 (m, 1H), 4.15 (m, 2H), 3.94 (m, 2H), 3.68 (m, 3H), 3.38 (m, 1H), 2.71 (m, 4H), 1.75 (m, 4H), 1.32 (dd, 3H), 1.25 (d, 3H). ES-API (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$: 503.25.

[0106] 3) 拆分:

[0107]

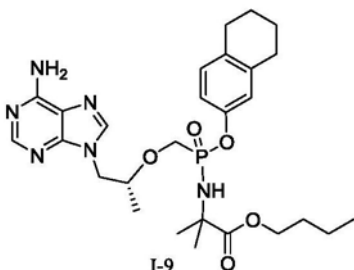


[0108] 化合物I-8 (0.10g) 及L-脯氨酸 (0.02g) 加入乙酸乙酯 (1mL) 中, 加热至70℃, 待I-8溶解澄清后自然冷却至室温, 室温搅拌过夜, 过滤, 滤饼加入水 (5mL) 搅拌10min, 过滤, 干燥, 得到化合物I-8A (0.03g)。

[0109] 单一构型的HPLC检测: 色谱柱DAICEL AS-H (4.6×150mm, 5μm), 正己烷:乙醇=60:40, 0.5mL/min, 30℃, UV at 260nm, 10μL, 100min, 拆分后得到化合物I-8A的de值为96.96%。

[0110] 实施例9化合物I-9的合成

[0111]



[0112] 1) 将2-甲基丙氨酸 (1.00g) 加入正丁醇 (7.18g) 中, 室温下滴加氯化亚砷 (1.38g), 滴毕后回流5.5h, 减压浓缩, 残留物用碳酸氢钾溶液调pH至中性, 二氯甲烷萃取 (50mL) 3次, 合并二氯甲烷层, 并用饱和食盐水洗, 无水硫酸钠干燥, 减压浓缩, 得到2-甲基丙氨酸正丁酯 (1.34g)。

[0113] 2) 将2-甲基丙氨酸正丁酯 (3.82g) 及N,N-二异丙基乙胺 (13.20mL) 溶于二氯甲烷 (20mL) 中, 制备成溶液C-9备用。

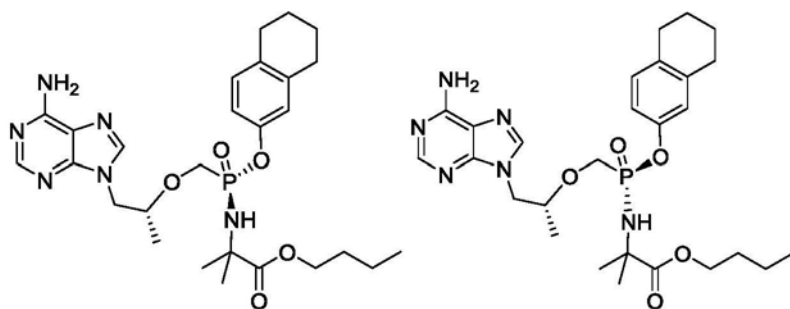
[0114] 3) 参照实施例1步骤5) 的操作过程, 以上述制备的溶液C-9替换溶液C, 得到化合物I-9 (1.30g)。

[0115] $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3 , δ_{ppm}): 8.37 (s, 1H), 8.01 (s, 1H), 6.91 (d, 1H), 6.70 (m, 2H), 5.55 (s, 2H), 4.40 (m, 1H), 4.18 (m, 4H), 4.01 (d, 1H), 3.89 (m, 1H), 3.65 (m, 1H), 2.68 (d, 4H), 1.76 (m, 4H), 1.66 (m, 4H), 1.56 (s, 3H), 1.42 (m, 3H), 1.26 (d, 3H), 0.96 (t, 3H)。

[0116] ES-API (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$: 559.42。

[0117] 4) 拆分:

[0118]

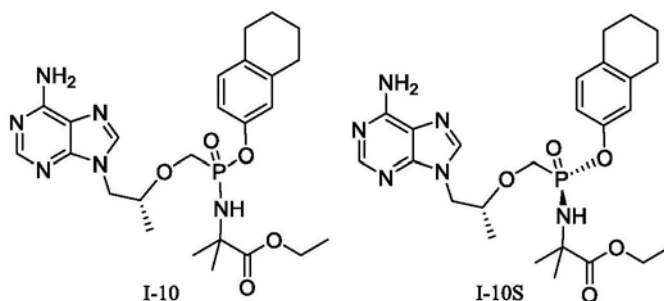


[0119] 将化合物I-9 (0.10g) 及L-脯氨酸 (0.02g, 0.2mmol) 加入乙酸乙酯 (1mL) 中, 加热至70℃待化合物I-9溶解澄清后自然冷却至室温, 室温搅拌过夜, 过滤, 滤饼加入水 (5mL) 搅拌10min, 后过滤, 干燥, 得到化合物I-9A (0.03g)。

[0120] 单一构型的HPLC检测: 色谱柱DAICEL AS-H (4.6×150mm, 5μm), 正己烷:乙醇=75:25, 0.5mL/min, 30℃, UV at 260nm, 10μL, 60min, 拆分后得到化合物I-9A的de值为96.06%。

[0121] 实施例10化合物I-10及化合物I-10S的合成

[0122]



[0123] 1) 将2-甲基丙氨酸 (1.00g) 加入乙醇 (4.47g) 中, 室温下滴加氯化亚砷 (1.38g), 滴毕后回流5.5h, 减压浓缩, 残留物用碳酸氢钾溶液调pH至中性, 二氯甲烷萃取 (50mL) 3次, 合并二氯甲烷层, 并用饱和食盐水洗, 无水硫酸钠干燥, 减压浓缩, 得到2-甲基丙氨酸乙酯 (1.13g)。

[0124] 2) 将2-甲基丙氨酸乙酯 (3.15g) 及N,N-二异丙基乙胺 (13.20mL) 溶于二氯甲烷 (20mL) 中, 制备成溶液C-10备用。

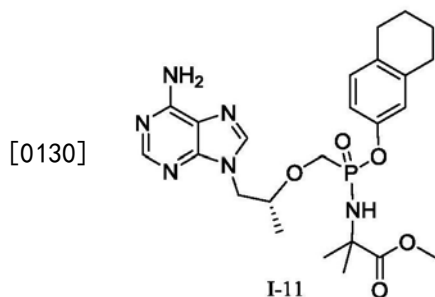
[0125] 3) 参照实施例1步骤5) 的操作过程, 以上述制备的溶液C-10替换溶液C, 得到化合物I-10 (1.12g)。

[0126] $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3 , δ_{ppm}): 8.35 (d, 1H), 7.99 (d, 1H), 6.89 (d, 1H), 6.70 (m, 2H), 5.65 (s, 2H), 4.37 (m, 1H), 4.20 (m, 4H), 3.96 (d, 1H), 3.87 (m, 1H), 3.63 (m, 1H), 2.67 (d, 4H), 1.74 (s, 4H), 1.58 (s, 3H), 1.53 (s, 3H), 1.26 (m, 6H). ES-API (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$: 531.36.

[0127] 4) 拆分: 化合物I-10 (0.10g) 及L-脯氨酸 (0.02g) 加入乙酸乙酯 (1mL) 中, 加热至70℃, 至化合物I-10溶解后, 冷却至室温, 室温搅拌过夜, 过滤, 滤饼加入水 (5mL) 搅拌10min后, 过滤, 干燥, 得到化合物I-10S (0.03g, 纯度97.88%)。

[0128] HPLC检测: 色谱柱DAICEL AS-H (4.6×150mm, 5μm), 正己烷:乙醇=88:12, 0.5mL/min, 30℃, UV at 260nm, 10μL, 60min, 拆分后化合物I-10S的de值为94.39%。

[0129] 实施例11化合物I-11的合成



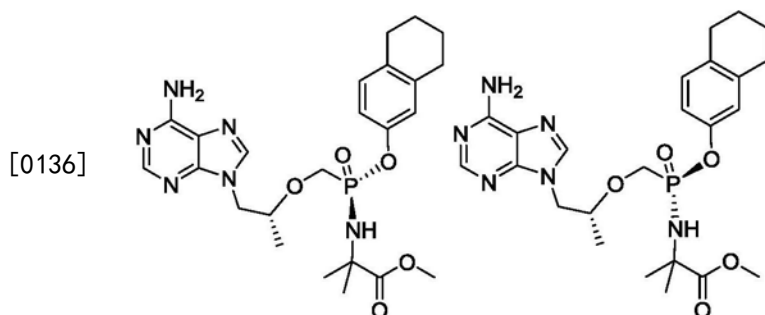
[0131] 1) 将2-甲基丙氨酸(1.00g)加入甲醇(3.11g)中,室温下滴加氯化亚砷(1.38g),滴毕后回流5.5h,减压浓缩,得到2-甲基丙氨酸甲酯盐酸盐(1.35g)。

[0132] 2) 将2-甲基丙氨酸甲酯盐酸盐(3.68g)及N,N-二异丙基乙胺(13.20mL)溶于二氯甲烷(20mL)中,制备成溶液C-11备用。

[0133] 3) 参照实施例1步骤5)的操作过程,以上述制备的溶液C-11替换溶液C,得到化合物I-11(1.15g)。

[0134] $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3 , δ_{ppm}): 8.35 (d, 1H), 7.99 (d, 1H), 6.90 (m, 2H), 6.68 (m, 1H), 5.55 (s, 2H), 4.16 (m, 1H), 3.95 (m, 3H), 3.88 (m, 4H), 3.64 (m, 1H), 2.68 (m, 4H), 1.76 (m, 4H), 1.50 (m, 6H), 1.24 (m, 3H). ES-API (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$: 517.34.

[0135] 4) 拆分:



[0137] 取含有一对非对映异构体的化合物I-11(0.20g),投入2mL乙酸异丙酯中,加热溶清后加入L-脯氨酸(0.04g),自然冷却至室温,室温搅拌过夜,过滤,滤饼加入10mL水,搅拌10分钟,过滤,滤饼干燥,得到化合物I-11A白色固体(0.05g)。

[0138] 单一构型的HPLC检测:色谱柱DAICEL AS-H ($4.6 \times 150\text{mm}$, $5\mu\text{m}$),正己烷:乙醇=88:12, 0.5mL/min , 30°C , UV at 260nm, $10\mu\text{L}$, 60min, 拆分后得到的化合物I-11A的de值为93.2%。

[0139] 母液投入2mL乙酸异丙酯中,加热溶清后加入D-脯氨酸(0.04g),自然冷却至室温,室温搅拌过夜,过滤,滤饼加入10mL水,搅拌10分钟,过滤,滤饼干燥,得到化合物I-11B(0.03g)。

[0140] 实验例1体外细胞HBV DNA抑制活性

[0141] 取处于指数生长期状态良好的HepAD38细胞一瓶,加入5mL PBS清洗一遍,加入3mL胰酶。室温消化5min,弃掉2mL胰酶后再放入细胞培养箱中消化10min,期间取出至显微镜下观察(是否为单个圆形,细胞间无粘连),加入10mL完全培养基终止消化。吹打成单细胞悬液后,取 $10\mu\text{L}$ 细胞悬液使用细胞计数仪计数,完全培养基进行稀释,调整细胞密度至 1×10^5 个/mL。使用排枪接种于24孔板上(24孔板提前使用 $50\mu\text{g/mL}$ Collagen I溶液包被), 1mL/孔 ,置

恒温CO₂培养箱中培养48h。

[0142] 使用完全培养基将DMSO溶解的不同化合物稀释,5倍梯度,共7个浓度,进行化合物加样,每72h更换含化合物的新鲜培养基,化合物处理细胞6d。吸去上清后,每孔加入300μl裂解液(10mM Tris-HCl,1mM EDTA,1%NP-40),室温放置裂解10min后,提取DNA,用实时荧光定量PCR仪测定胞内HBV DNA,根据Ct值计算抑制率,四参数法分别计算IC₅₀、IC₉₀、EC₅₀与EC₉₀值。结果见表1及表2。

[0143] 表1细胞水平(HepAD38)抗HBV活性检测结果

[0144]

化合物编号	IC ₅₀ (nM)	IC ₉₀ (nM)
I-1	8.2	498.3
I-2	6.1	253.9
I-3	2.6	153.6
I-4	6.4	144.1
I-5	1.6	270.2
I-6	17.0	380.4
I-7	9.3	184.8
I-8	3.3	271.6

[0145] 表2细胞水平(HepAD38)抗HBV活性检测结果

[0146]

化合物编号	EC ₅₀ (nM)	EC ₉₀ (nM)
I-2A	1.9	193.2
I-3A	2.2	161.8
I-3B	2.3	126.8

[0147]

I-5S	0.4	108.5
I-8A	4.7	120.5
I-9A	3.2	228.9
I-10S	1.4	171.2
I-11	3.8	130.4

[0148] 实验例2体内HBV抑制活性

[0149] C57BL/6N小鼠,6-8周龄,SPF级雄性,体重(20±2)g。将纯化的重组质粒裸DNA(10μg)溶解在PBS中,每只小鼠注射体积约为其体重的10%,通过尾静脉在3-8s内注射到小鼠体内,对照组注射等量的PBS溶液。注射质粒24h后取血检测HBV DNA,挑选出血清DNA均一的模型小鼠进行分组,溶媒组、I-3B(12.4mpk)、I-3A(12.4mpk)、I-10A(12.3mpk)。每组小鼠以灌

胃方式,每日1次,连续给药6天。分别于注射后的1、3、5、7天取小鼠血清,第7天处死小鼠取肝组织样本,荧光定量PCR方法检测小鼠血清和肝脏中HBV DNA拷贝数。试验结果见表3。

[0150] 表3化合物对高压水动力小鼠血清及肝脏HBV DNA复制水平的影响(Log₁₀ IU/mL下降值)

[0151]	组别	第7天(血清)	第7天(肝脏)
	I-3B (12.4mpk)	0.78	1.19
	I-3A (12.4mpk)	0.52	0.68
	I-10A (12.3mpk)	0.68	0.62

[0152] 注:与当天溶媒对照组比较。