

乙型肝炎病毒表面抗原抑制剂

相关申请的交叉引用

本申请主张 2017 年 3 月 9 日提交的中国专利申请 CN201710138275.5 的优先权，其内容在此并入本申请。

5 技术领域

本发明涉及新的作为乙肝表面抗原抑制剂的 10-氧代-6,10-二氢苯并[e]吡啶并[1,2-c][1,3]恶嗪-9-羧酸衍生物，具体涉及式 (I) 所示化合物或其药学上可接受的盐，以及式 (I) 所示化合物或其药学上可接受的盐和药用组合物在治疗乙型病毒性肝炎中的应用。

背景技术

- 10 乙型病毒性肝炎，简称乙肝，是一种由乙型肝炎病毒（Hepatitis B Virus，简称 HBV）感染机体后所引起的疾病。乙型肝炎病毒是一种嗜肝病毒，主要存在于肝细胞内并损害肝细胞，引起肝细胞炎症、坏死、纤维化。乙型病毒性肝炎分急性和慢性两种。急性乙型肝炎在成年人中大多数可通过其自身的免疫机制而自愈。但是慢性乙型肝炎（CHB）已成为全球健康保健所面临的极大挑战，同时也是引起慢性肝病，肝硬化（cirrhosis）和肝癌（HCC）的主要原因(Edward J. G., et al., The oral toll-like receptor-7 agonist
- 15 GS-9620 in patients with chronic hepatitis B virus infection. Journal of Hepatology (2015); 63: 320-328)。据估计，全球有 20 亿人感染了慢性乙型肝炎病毒，超过 3 亿 5 千万人口已发展成为乙型肝炎，每年近 60 万人死于慢性乙型肝炎的并发症(Edward J. G., et al., The oral toll-like receptor 7 agonist GS-9620 in patients with chronic hepatitis B virus infection. Journal of Hepatology (2015))。我国是乙肝高发区，乙型肝炎累积病人多，危害严重。据资料显示，我国现有乙型肝炎病毒感染者约 9300 万，而其中约 2000 万患者确诊
- 20 为慢性乙型肝炎，当中 10%-20%可演变成肝硬化，1%-5%可发展成肝癌。（张春红,干扰素在乙型肝炎治疗中的应用.中国医药指南 (2013); 11: 475-476.)

乙肝功能性治愈的关键是清除 HBsAg（乙型肝炎病毒表面抗原），产生表面抗体。HBsAg 量化是一个非常重要的生物指标。在慢性感染病人中，很少能观察到 HBsAg 的减少和血清转化，这是目前治疗的终点。

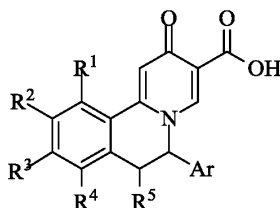
- 25 乙型肝炎病毒(HBV)的表面抗原蛋白在 HBV 侵入肝细胞的过程中起非常重要的作用，对于防治 HBV 的感染有重要意义。表面抗原蛋白包括大（L）、中（M）和小（S）的表面抗原蛋白，共享共同的 C 端 S 区。它们从一个开放读码框中表达，其不同的长度是由读码框三个 AUG 起始密码子决定的。这三个表面抗原蛋白包括前 S1 /前 S2 / S，前 S2 / S 和 S 域。HBV 表面抗原蛋白被整合到内质网（ER）膜，由 N 端信号序列启动(Eble et al., 1987, 1990; Schmitt et al., 2004)。它们不仅构成了病毒体的基
- 30 本结构，而且还形成球状和丝状亚病毒颗粒（SVPs, HBsAg），聚集在 ER，宿主 ER 和前高尔基体器(Huovila et al., 1992), SVP 包含大多 S 表面抗原蛋白(Chisari et al., 1986)。L 蛋白(Bruss, 1997, 2004)，在病毒的形态发生与核衣壳相互作用方面是至关重要的，但对于 SVP 的形成是没有必要的。（Lunsdorf et al., 2011 年）。由于它们缺乏核衣壳，所述的 SVPs 是非感染性的。SVPs 大大参与了疾病进展，尤其是对乙肝病毒的免疫应答，在感染者的血液里，SVPs 的量至少是病毒数量的 10, 000 倍 (Bruns et al.,
- 35 1998; Ganem and Prince, 2004)，诱捕了免疫系统，削弱人体对乙肝病毒的免疫反应。HBsAg 也可抑制人

的天然免疫，能够抑制多糖（LPS）和 IL-2 诱导的细胞因子产生(Vanlandschoot et al., 2002)，抑制树状细胞 DC 功能以及 LPS 对 ERK-1/2 和 c-Jun N 端的干扰激酶-1/2 在单核细胞的诱导活性(Op den Brouw et al., 2009)。值得注意的是，肝硬化和肝细胞癌的疾病进展很大程度也与持续分泌的 HBsAg 相关(Chisari et al., 1989; Wang et al., 2004; Yang et al., 2009; Wu et al., 2014)。这些研究结果表明 HBsAg 在慢性肝炎的发展中起重要作用。

目前被批准上市的抗 HBV 药物主要是免疫调节剂（干扰素- α 和聚乙二醇干扰素- α -2a）和抗病毒治疗药物(拉米夫定、阿德福韦酯、恩替卡韦、替比夫定、替诺福韦、克拉夫定等)。其中，抗病毒治疗药物属于核苷酸类药物，其作用机制是抑制 HBV DNA 的合成，并不能直接减少 HBsAg 水平。与延长治疗一样，核苷酸类药物显示 HBsAg 清除速度类似于自然观察结果 (Janssen et al. Lancet(2005), 365, 123-129; Marcellin et al. N. Engl. J. Med. (2004), 351, 1206-1217; Buster et al. Hepatology(2007), 46, 388-394)。

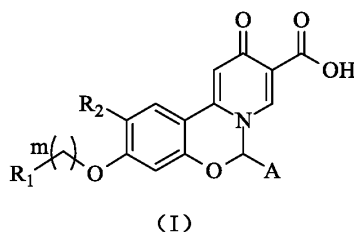
临床已有疗法降低 HBsAg 疗效不佳，因此，开发能够有效降低 HBsAg 的小分子口服抑制剂是目前临床用药所亟需的。

虽然 WO2016128335A1 公开了一系列用于治疗或者预防乙型肝炎病毒感染的 2-氧代-6, 7 二氢苯并 [a] 喹啉 3-羧酸衍生物（通式结构如下所示），但是该系列稠环化合物仍然有分子刚性较强、溶解性不够理想以及易于芳构化的问题。因此，就临床应用而言，对成药性更佳的需求依然存在。



发明内容

本发明提供式 (I) 化合物或其药学上可接受的盐，



其中，

R₁ 选自 H、OH、CN、NH₂，或者选自任选被 1、2 或 3 个 R 取代的：C₁₋₅ 烷基、C₁₋₅ 杂烷基、C₂₋₅ 炔基、C₃₋₆ 烷基和 3~6 元杂环烷基；

R₂ 选自 H、卤素，或者选自任选被 1、2 或 3 个 R 取代的：C₁₋₃ 烷基和 C₁₋₃ 杂烷基；

m 选自 0、1、2、3、4 和 5；

A 选自任选被 1、2 或 3 个 R 取代的：苯基或 5~6 元杂芳基；

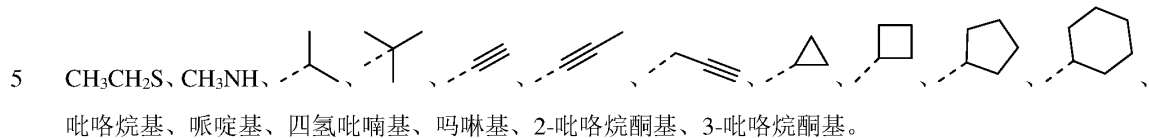
R 选自 H、卤素、OH、CN、NH₂、=O、CH₃、CH₃CH₂、CH₃O、CF₃、CHF₂、CH₂F；

所述 C₁₋₅ 杂烷基、3~6 元杂环烷基、C₁₋₃ 杂烷基、5~6 元杂芳基之“杂”，分别独立地选自：N、-O-、=O、-S-、-NH-、-(C=O)-、-(S=O)-、-(S=O)₂-；

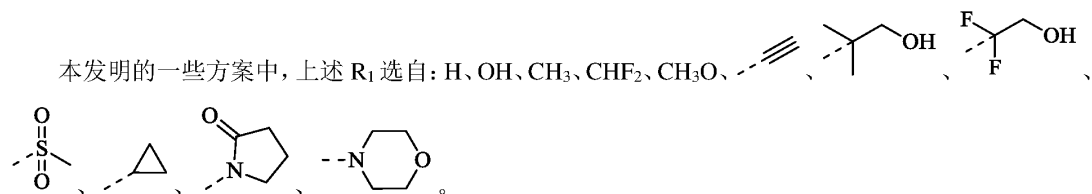
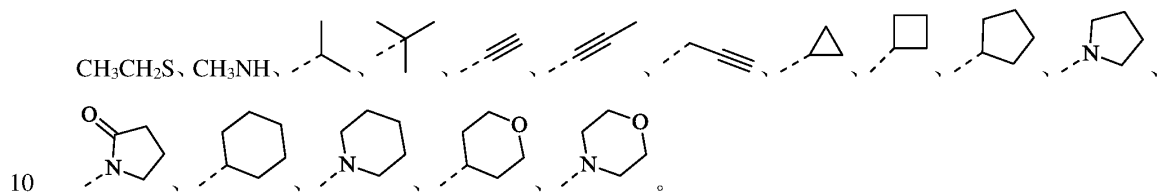
以上任何一种情况下, 杂原子或杂原子团的数目分别独立地选自 1、2 或 3。

本发明的一些方案中, 上述 R 选自 H、F、Cl、Br、OH、CH₃、CH₃O、CF₃、CHF₂、CH₂F。

本发明的一些方案中, 上述 R₁ 选自 H、OH、CN、NH₂, 或者选自任选被 1、2 或 3 个 R 取代的:



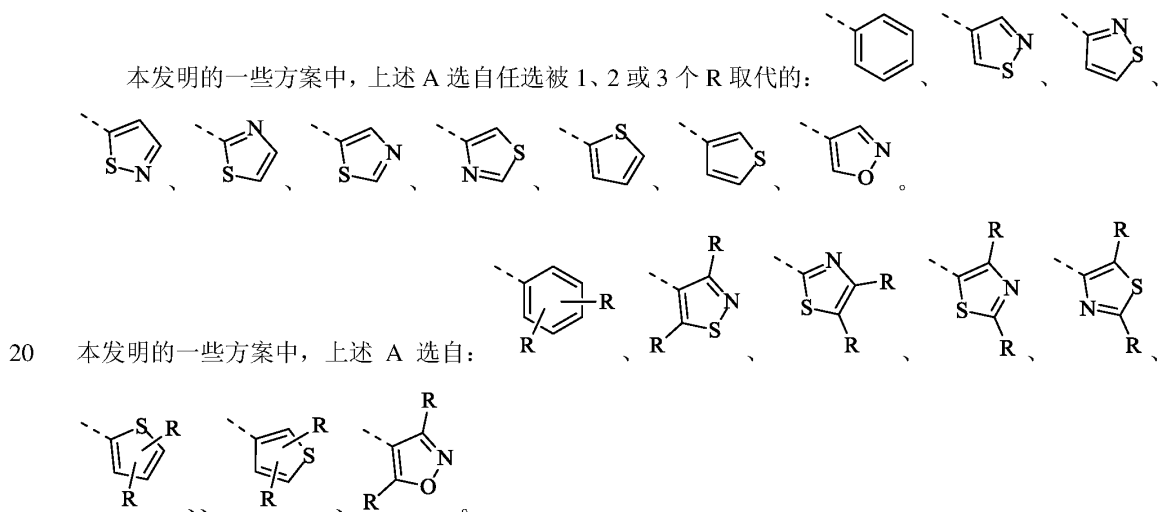
本发明的一些方案中, 上述 R₁ 选自 H、OH、CN、NH₂, 或者选自任选被 1、2 或 3 个 R 取代的:



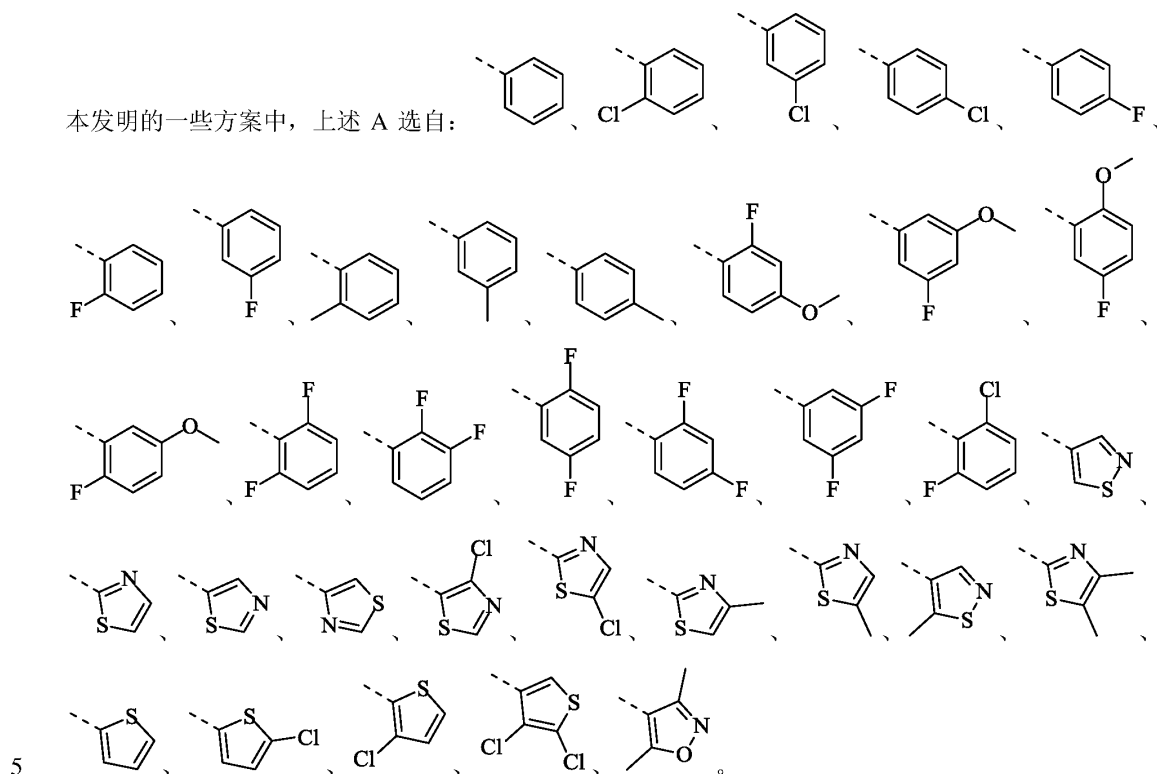
本发明的一些方案中, 上述 R₂ 选自 H、F、Cl、Br, 或者选自任选被 1、2 或 3 个 R 取代的: CH₃、
CH₃CH₂、CH₃O、CH₃CH₂O、。

15 本发明的一些方案中, 上述 R₂ 选自 Cl 和 CH₃O。

本发明的一些方案中, 上述 A 选自任选被 1、2 或 3 个 R 取代的: 苯基、噻吩基、噻唑基、异噻唑基、恶唑基、异恶唑基。



本发明的一些方案中, 上述 A 选自:



本发明的一些方案中, 上述 m 为 3。

本发明的一些方案中, 上述 R₂ 选自 Cl 和 CH₃O。

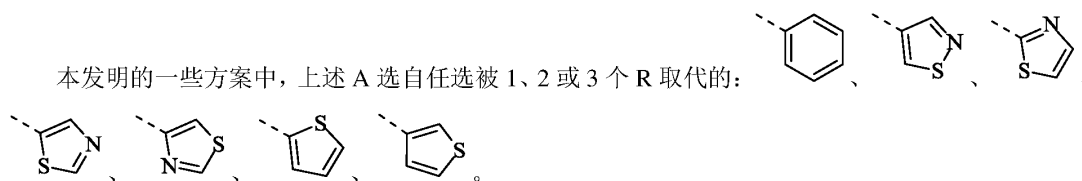
本发明的一些方案中, 上述 R₁ 为 CH₃O。

本发明的一些方案中, 上述 m 为 1。

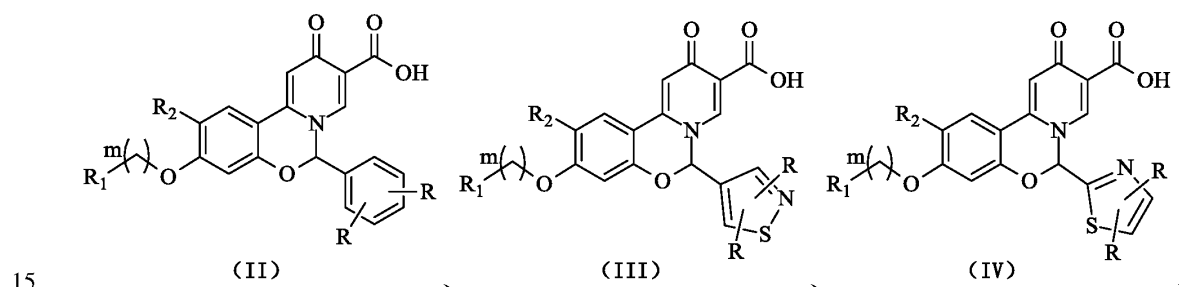
10 本发明的一些方案中, 上述 R₂ 为 Cl。

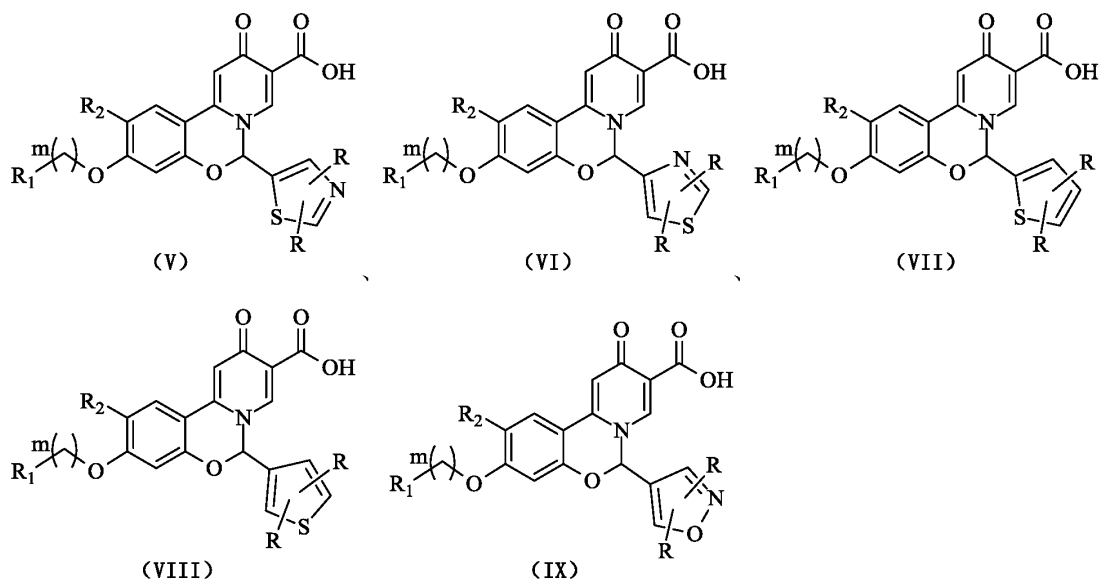
本发明的一些方案中, 上述 R₁ 为 .

本发明的一些方案中, 上述 A 选自任选被 1、2 或 3 个 R 取代的:



本发明的一些方案中, 上述化合物或其药学上可接受的盐, 其选自:

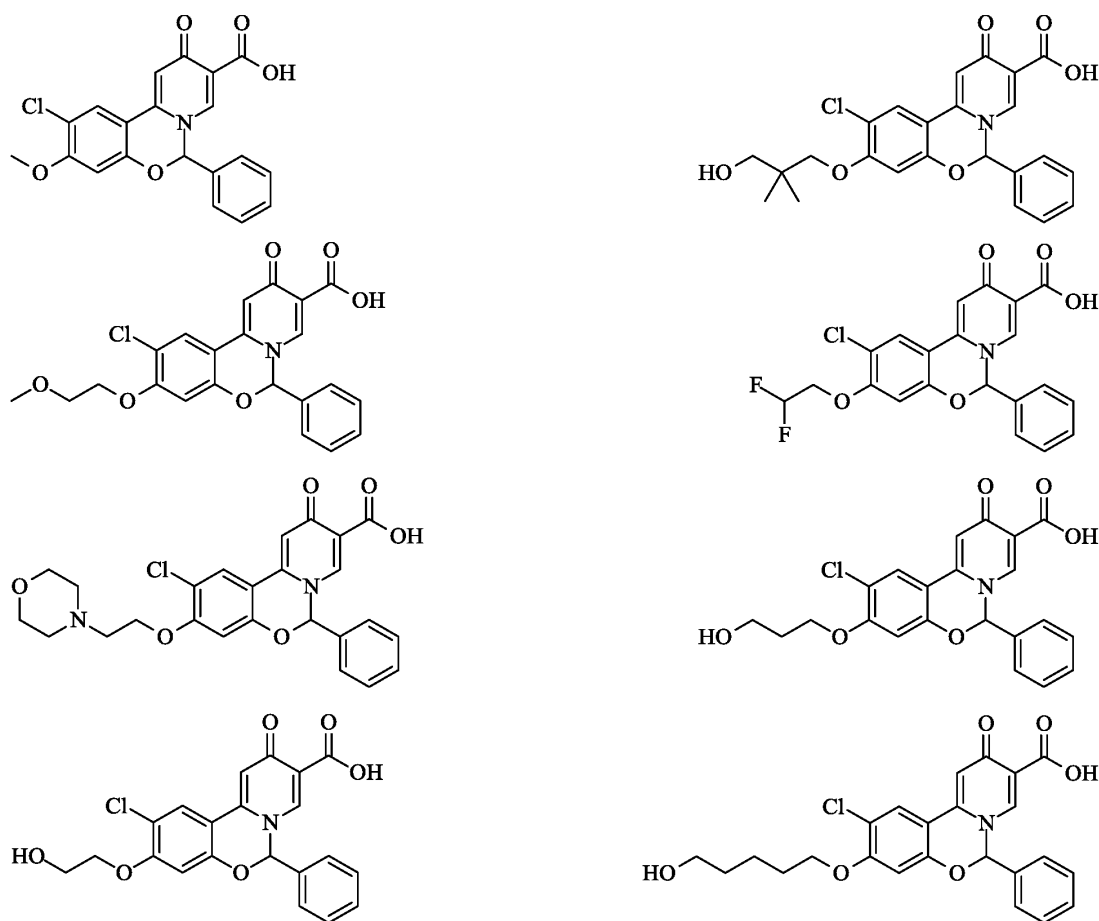


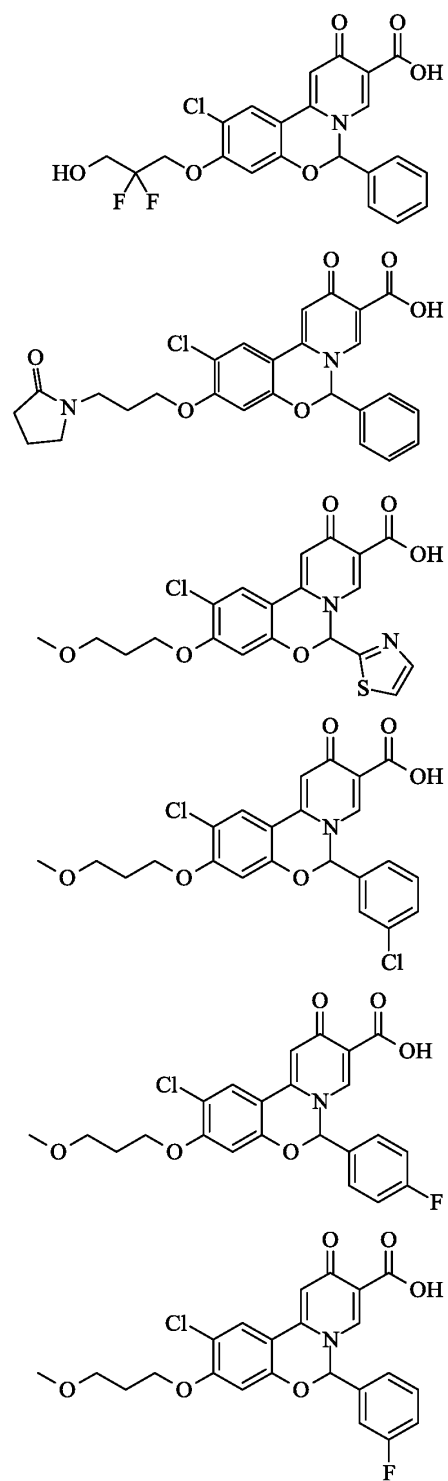
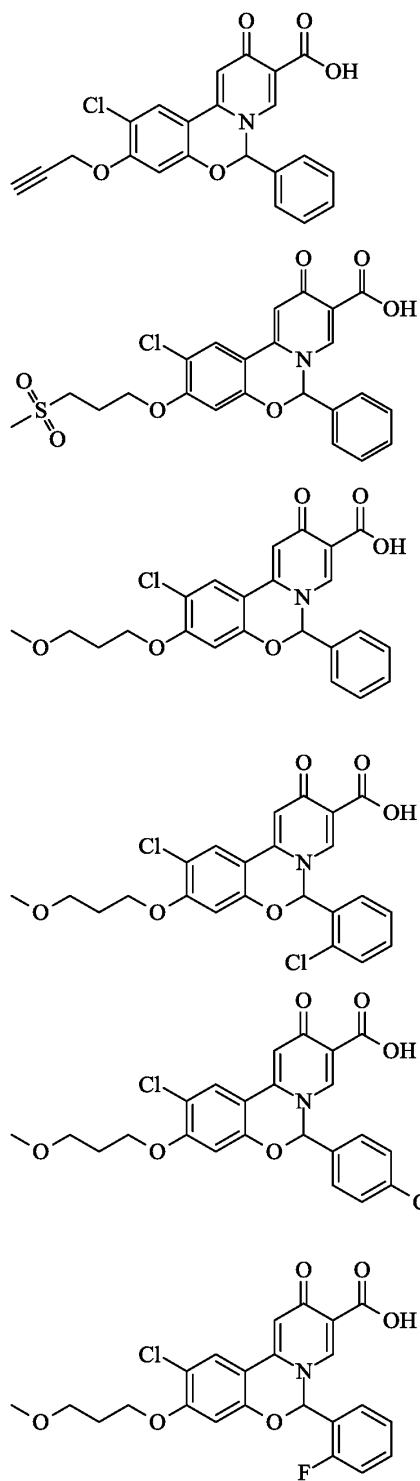


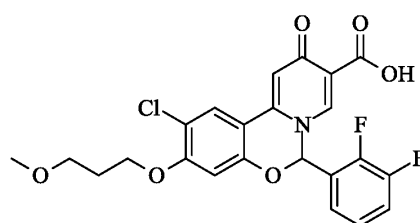
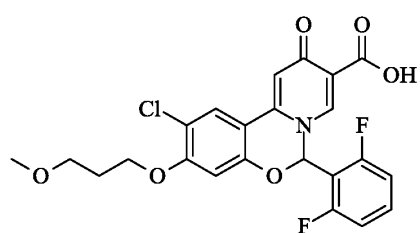
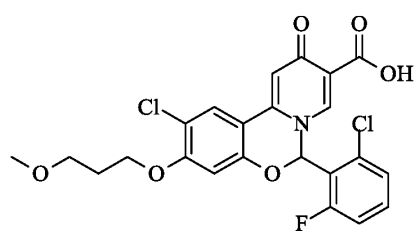
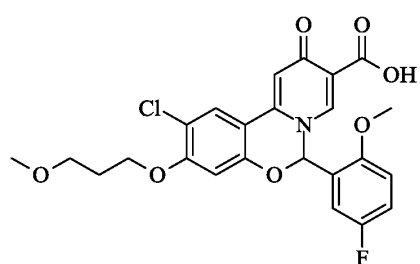
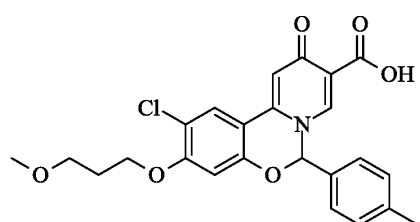
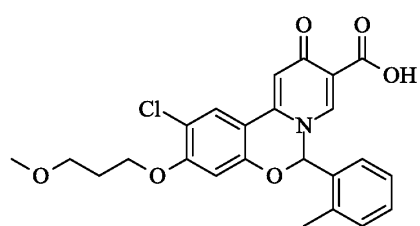
其中,

R_1 、 R_2 、A、R、m 如上述所定义。

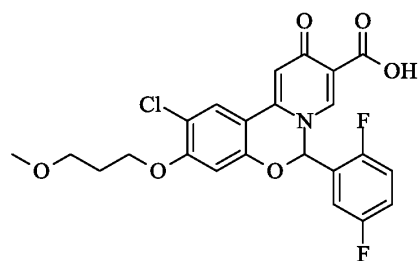
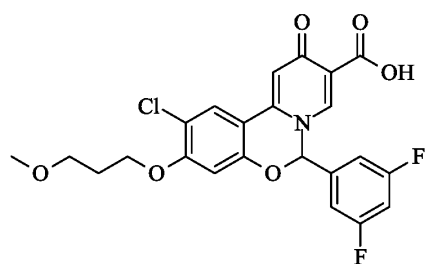
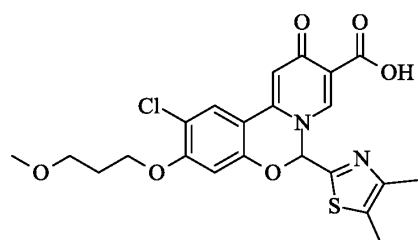
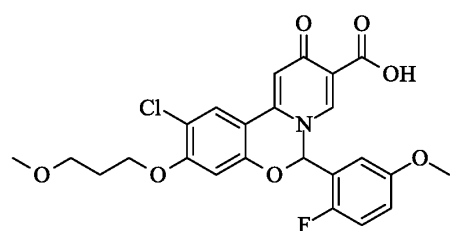
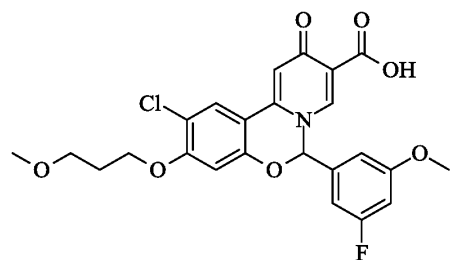
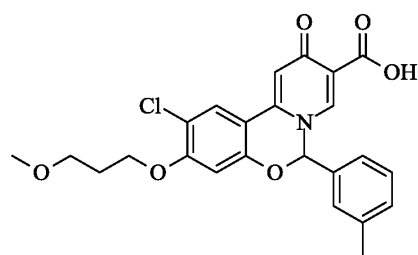
5 本发明的一些方案中, 上述化合物或其药学上可接受的盐, 其选自

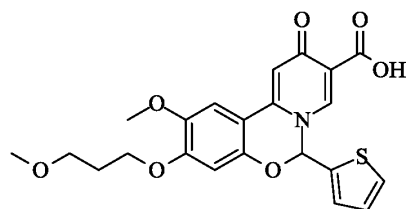
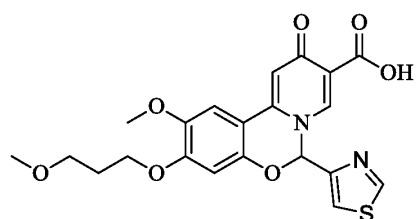
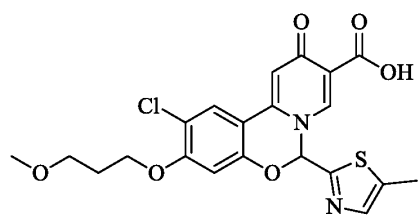
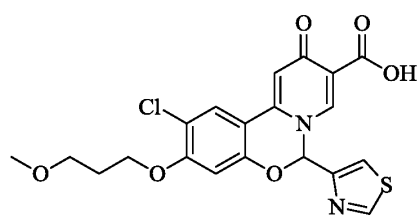
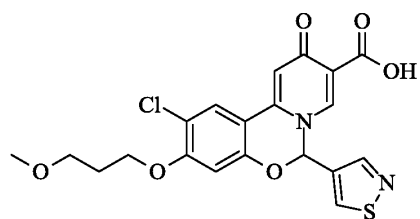
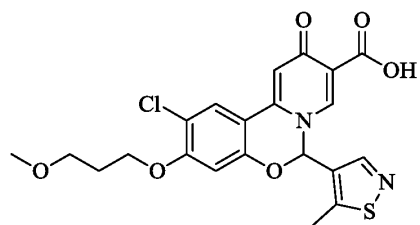
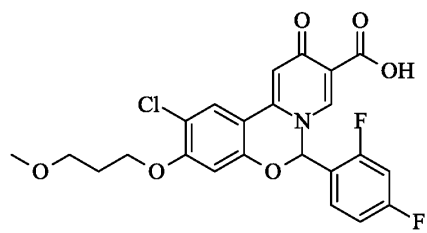




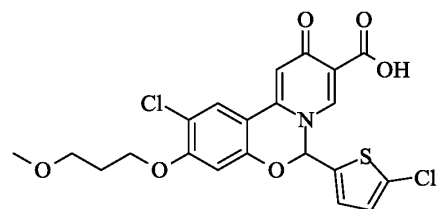
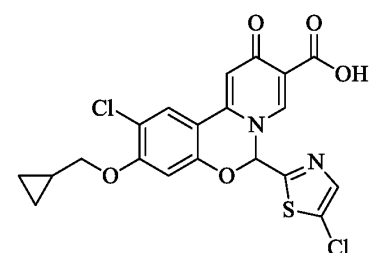
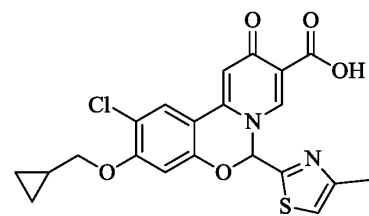
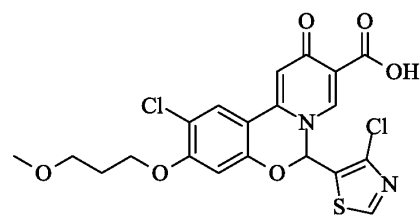
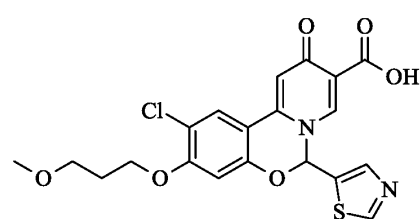
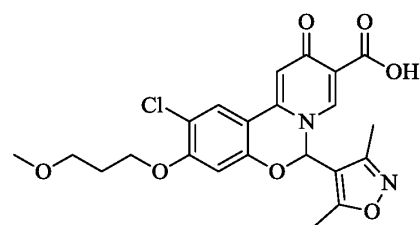
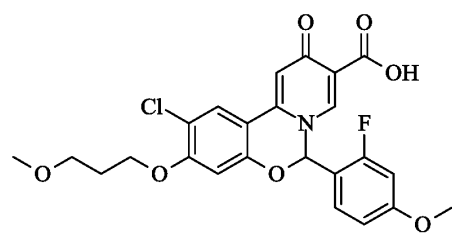


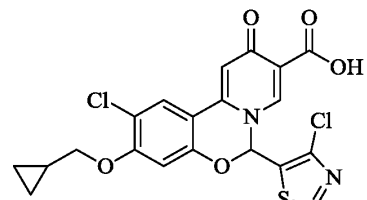
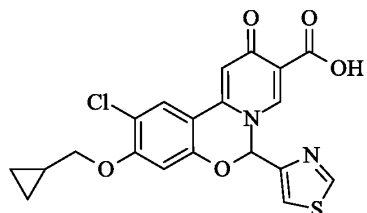
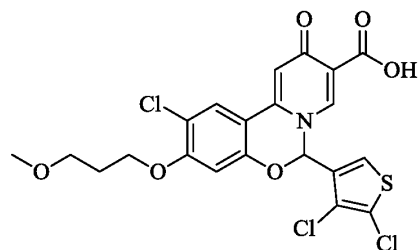
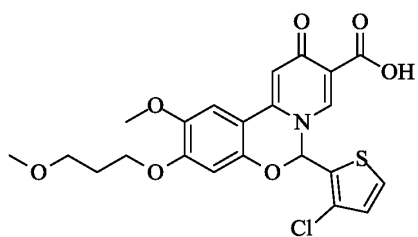
5



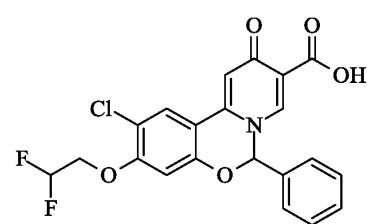
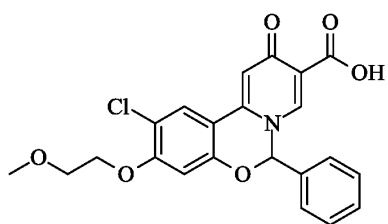
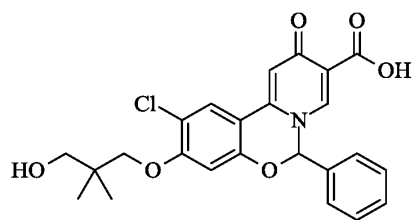
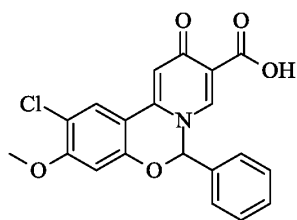


5

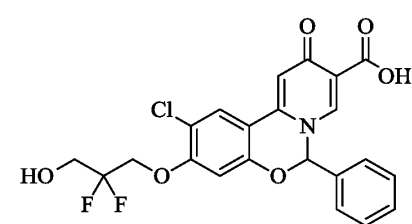
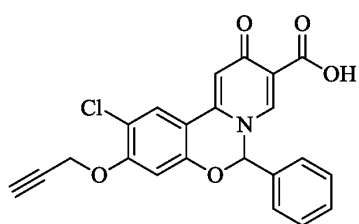
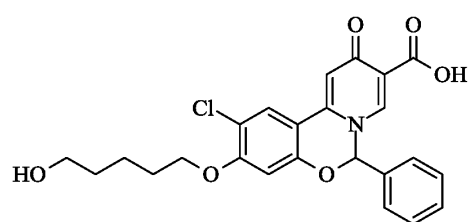
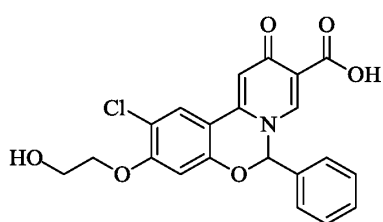
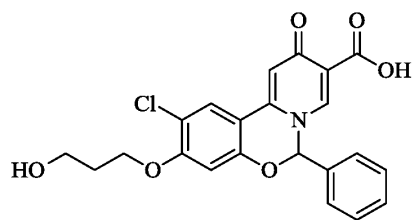
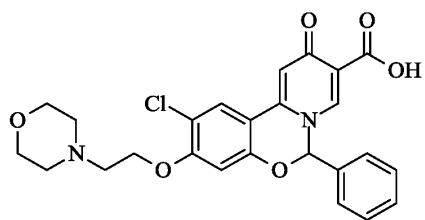


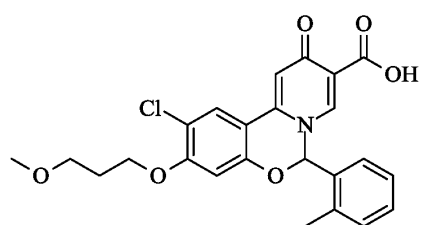
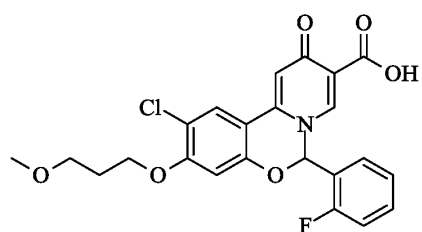
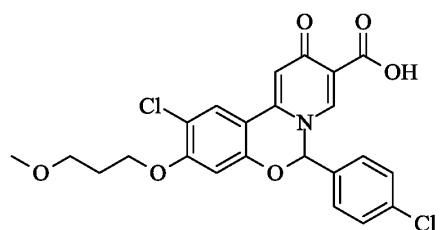
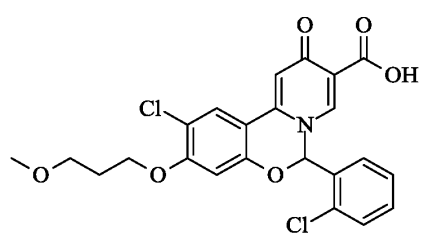
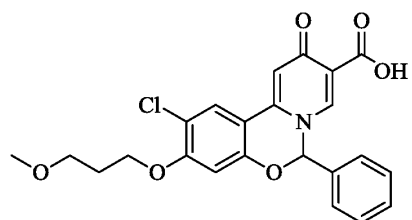
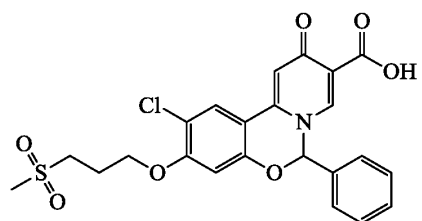


本发明还提供化合物或其药学上可接受的盐，其选自

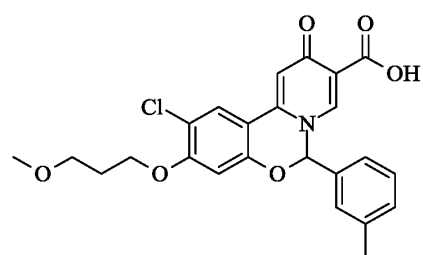
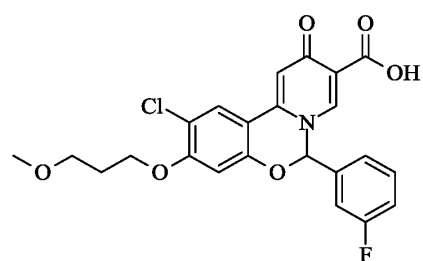
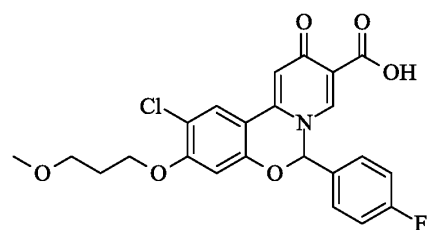
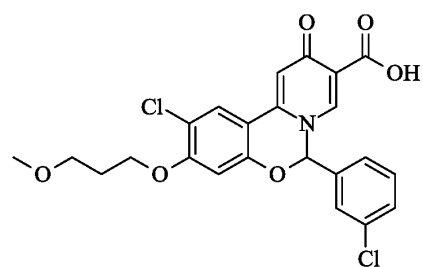
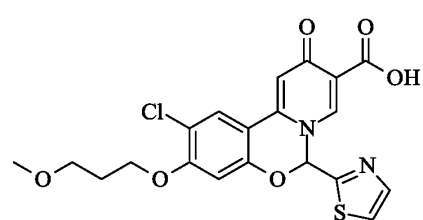
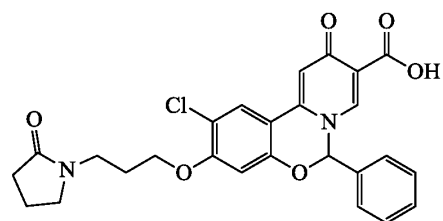


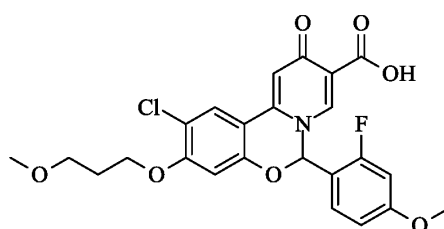
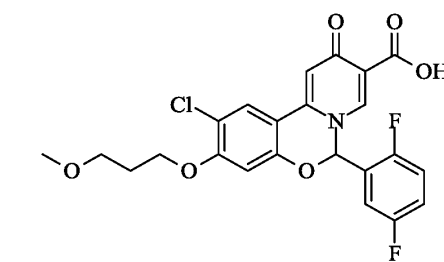
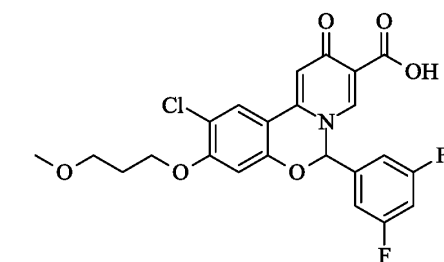
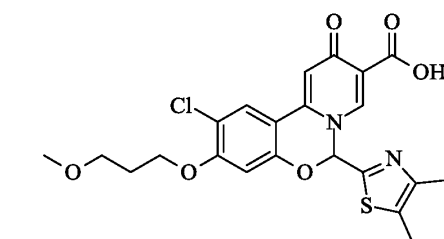
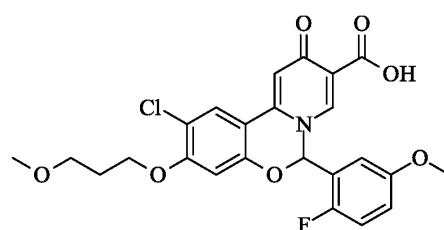
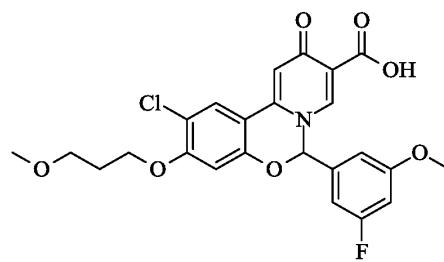
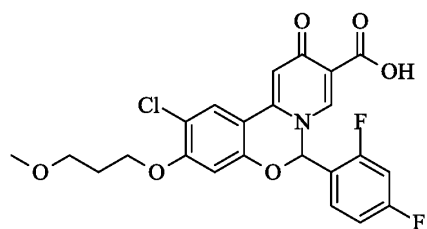
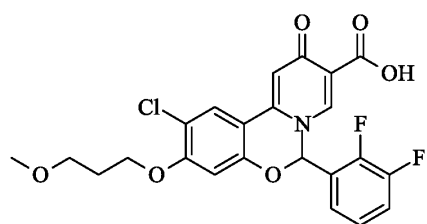
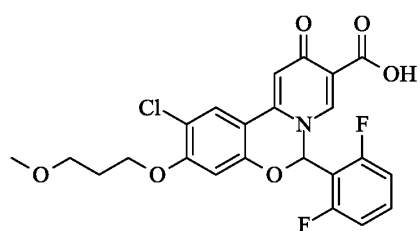
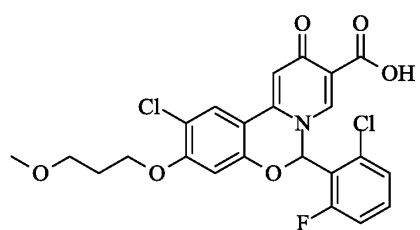
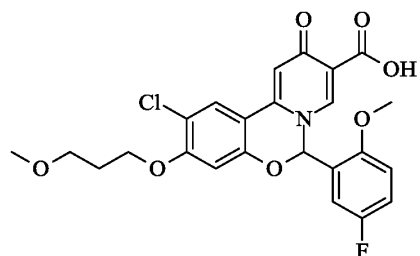
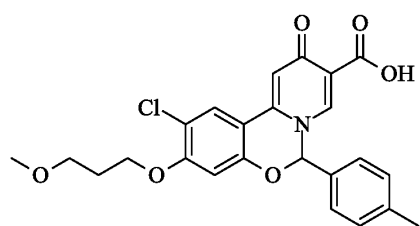
5

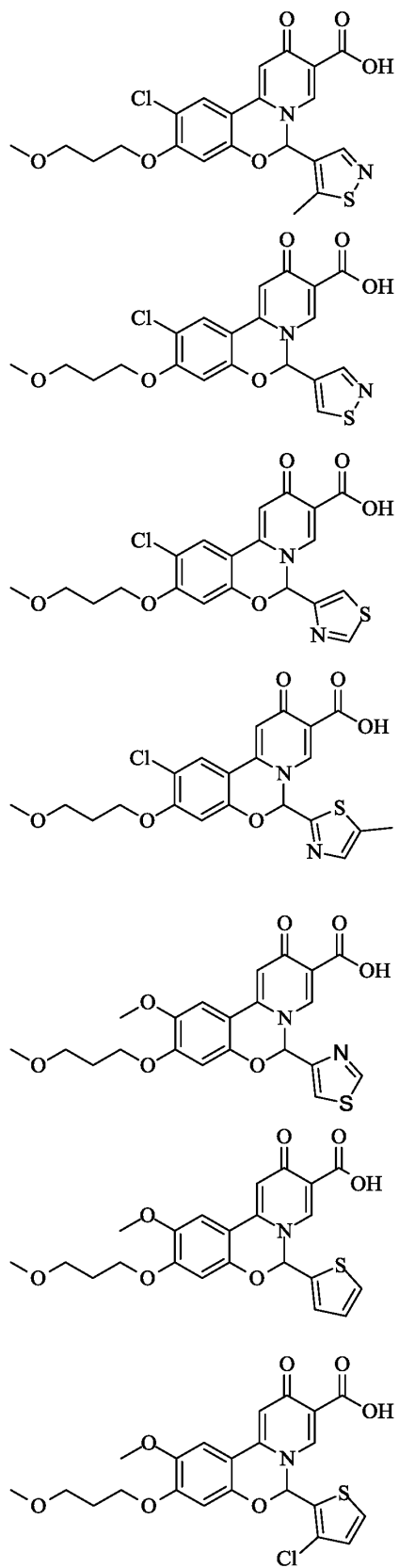




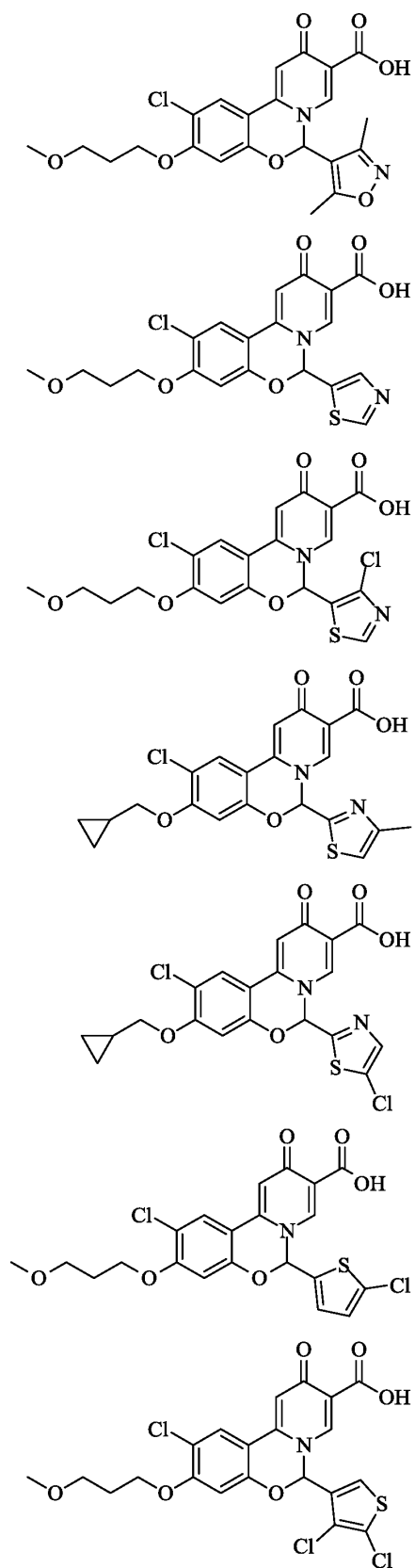
5

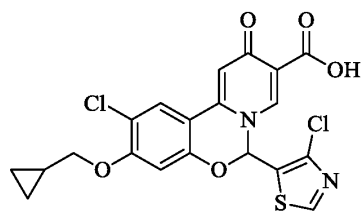
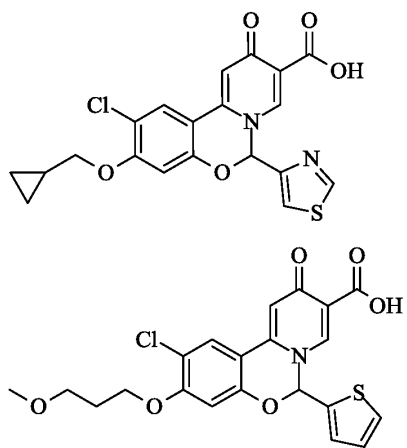




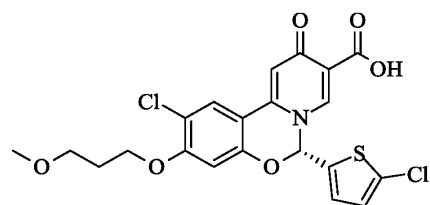
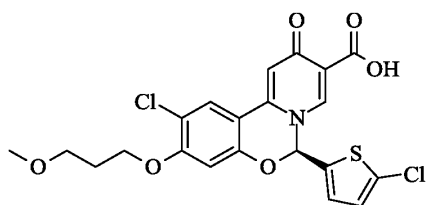
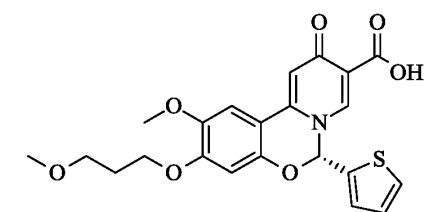
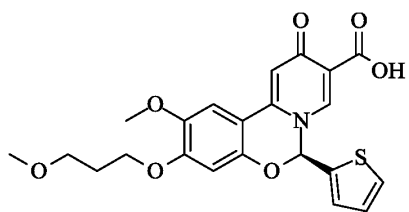
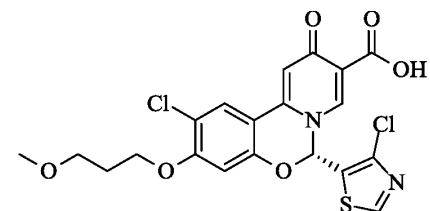
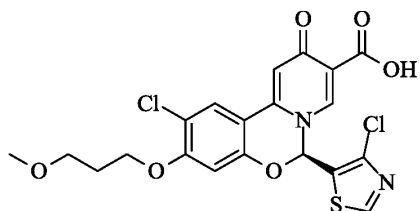
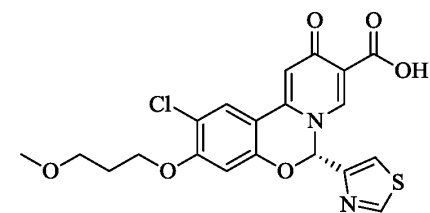
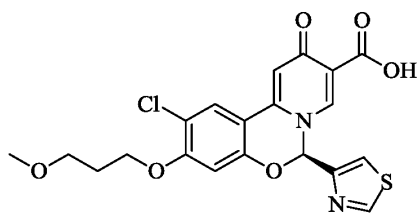
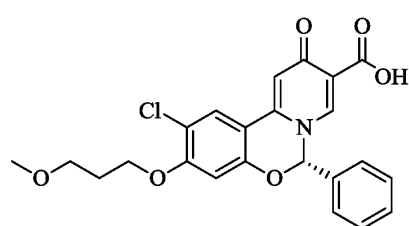
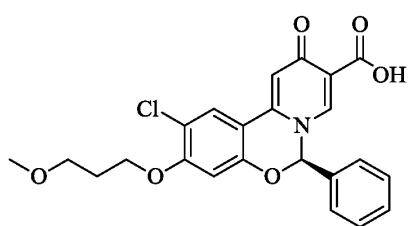


5

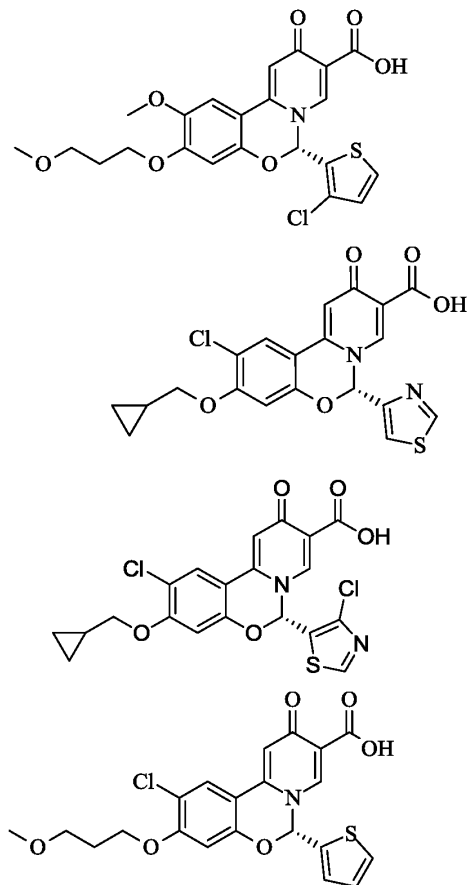
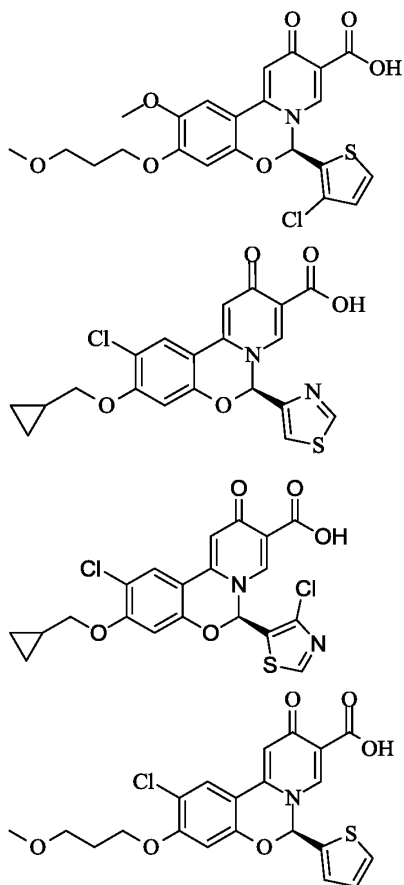




在本发明的一些方案中，上述化合物或其药学上可接受的盐，其选自



5



5 本发明还提供一种药物组合物，其含有治疗有效量的根据权利要求上述的化合物或其药学上可接受的盐和药学上可接受的载体。

本发明还提供上述化合物或其药学上可接受的盐或上述的药物组合物在制备治疗乙型肝炎药物中的应用。

本发明还有一些方案是由上述各变量任意组合而来。

10 技术效果

15 本发明创造性地设计并合成出了全新的以六元氮氧缩醛为母核结构的系列化合物。本发明化合物通过巧妙的设计，克服了六元环氮氧缩醛母核结构在体内酸性环境可能不稳定、易于水解的缺陷。经过相关实验的验证，证实了本发明化合物在一定温度范围和酸性范围内具有被良好的稳定性。另外，创造性的用氧原子取代碳原子后，本发明的系列化合物相对于现有技术，其活性能够很好地保持。这一点在乙

肝表面抗原活性方面体外抑制实验中得到了验证。同时，氧原子取代碳原子的设计使母核避免了因碳原子的存在而被脱氢芳构化的可能，本发明化合物水溶性会得到提高，从而能够获得更加优良的成药性质。

定义和说明

除非另有说明，本文所用的下列术语和短语旨在具有下列含义。一个特定的术语或短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，而应该按照普通的含义去理解。当本文中

20 出现商品名时，意在指代其对应的商品或其活性成分。这里所采用的术语“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、过敏反应或其它问题或并发症，与合理的利益/风险比相称。

术语“药学上可接受的盐”是指本发明化合物的盐，由本发明发现的具有特定取代基的化合物与相对无毒的酸或碱制备。当本发明的化合物中含有相对酸性的功能团时，可以通过在纯的溶液或合适的惰性溶剂中用足够量的碱与这类化合物的中性形式接触的方式获得碱加成盐。药学上可接受的碱加成盐包括钠、钾、钙、铵、有机氨或镁盐或类似的盐。当本发明的化合物中含有相对碱性的官能团时，可以通过在纯的溶液或合适的惰性溶剂中用足够量的酸与这类化合物的中性形式接触的方式获得酸加成盐。药学上可接受的酸加成盐的实例包括无机酸盐，所述无机酸包括例如盐酸、氢溴酸、硝酸、碳酸，碳酸氢根，磷酸、磷酸一氢根、磷酸二氢根、硫酸、硫酸氢根、氢碘酸、亚磷酸等；以及有机酸盐，所述有机酸包括如乙酸、丙酸、异丁酸、马来酸、丙二酸、苯甲酸、琥珀酸、辛二酸、反丁烯二酸、乳酸、扁桃酸、邻苯二甲酸、苯磺酸、对甲苯磺酸、柠檬酸、酒石酸和甲磺酸等类似的酸；还包括氨基酸（如精氨酸等）的盐，以及如葡萄糖醛酸等有机酸的盐（参见 Berge et al., "Pharmaceutical Salts", Journal of Pharmaceutical Science 66: 1-19 (1977)）。本发明的某些特定的化合物含有碱性和酸性的官能团，从而可以被转换成任一碱或酸加成盐。

优选地，以常规方式使盐与碱或酸接触，再分离母体化合物，由此再生化合物的中性形式。化合物的母体形式与其各种盐的形式不同之处在于某些物理性质，例如在极性溶剂中的溶解度不同。

本文所用的“药学上可接受的盐”属于本发明化合物的衍生物，其中，通过与酸成盐或与碱成盐的方式修饰所述母体化合物。药学上可接受的盐的实例包括但不限于：碱基比如胺的无机酸或有机酸盐、酸根比如羧酸的碱金属或有机盐等等。药学上可接受的盐包括常规的无毒性的盐或母体化合物的季铵盐，例如无毒的无机酸或有机酸所形成的盐。常规的无毒性的盐包括但不限于那些衍生自无机酸和有机酸的盐，所述的无机酸或有机酸选自 2-乙酰氧基苯甲酸、2-羟基乙磺酸、乙酸、抗坏血酸、苯磺酸、苯甲酸、碳酸氢根、碳酸、柠檬酸、依地酸、乙烷二磺酸、乙烷磺酸、富马酸、葡庚糖、葡萄糖酸、谷氨酸、乙醇酸、氢溴酸、盐酸、氢碘酸盐、羟基、羟萘、羟乙磺酸、乳酸、乳糖、十二烷基磺酸、马来酸、苹果酸、扁桃酸、甲烷磺酸、硝酸、草酸、双羟萘酸、泛酸、苯乙酸、磷酸、多聚半乳糖醛、丙酸、水杨酸、硬脂酸、亚乙酸、琥珀酸、氨基磺酸、对氨基苯磺酸、硫酸、单宁、酒石酸和对甲苯磺酸。

本发明的药学上可接受的盐可由含有酸根或碱基的母体化合物通过常规化学方法合成。一般情况下，这样的盐的制备方法是：在水或有机溶剂或两者的混合物中，经由游离酸或碱形式的这些化合物与化学计量的适当的碱或酸反应来制备。一般地，优选醚、乙酸乙酯、乙醇、异丙醇或乙腈等非水介质。

除了盐的形式，本发明所提供的化合物还存在前药形式。本文所描述的化合物的前药容易地在生理条件下发生化学变化从而转成本发明的化合物。此外，前体药物可以在体内环境中通过化学或生化方法被转换到本发明的化合物。

本发明的某些化合物可以以非溶剂化形式或者溶剂化形式存在，包括水合物形式。一般而言，溶剂化形式与非溶剂化的形式相当，都包含在本发明的范围之内。

本发明的某些化合物可以具有不对称碳原子（光学中心）或双键。外消旋体、非对映异构体、几何异构体和单个的异构体都包括在本发明的范围之内。

除非另有说明，用楔形键和虚线键（ ）表示一个立体中心的绝对构型，用   表示一

个立体中心的相对构型。当本文所述化合物含有烯属双键或其它几何不对称中心，除非另有规定，它们包括 *E*、*Z* 几何异构体。同样地，所有的互变异构形式均包括在本发明的范围之内。

本发明的化合物可以存在特定的几何或立体异构体形式。本发明设想所有的这类化合物，包括顺式和反式异构体、(-) 和 (+)-对映体、(*R*)- 和 (*S*)-对映体、非对映异构体、(*D*)-异构体、(*L*)-异构体，及其外消旋混合物和其他混合物，例如对映异构体或非对映体富集的混合物，所有这些混合物都属于本发
5 明的范围之内。烷基等取代基中可存在另外的不对称碳原子。所有这些异构体以及它们的混合物，均包括在本发明的范围之内。

可以通过的手性合成或手性试剂或者其他常规技术制备光学活性的(*R*)-和(*S*)-异构体以及 *D* 和 *L* 异构体。如果想得到本发明某化合物的一种对映体，可以通过不对称合成或者具有手性助剂的衍生作用来
10 制备，其中将所得非对映体混合物分离，并且辅助基团裂开以提供纯的所需对映异构体。或者，当分子中含有碱性官能团（如氨基）或酸性官能团（如羧基）时，与适当的光学活性的酸或碱形成非对映异构体的盐，然后通过本领域所公知的常规方法进行非对映异构体拆分，然后回收得到纯的对映体。此外，对映异构体和非对映异构体的分离通常是通过使用色谱法完成的，所述色谱法采用手性固定相，并任选地与化学衍生法相结合（例如由胺生成氨基甲酸盐）。

本发明的化合物可以在一个或多个构成该化合物的原子上包含非天然比例的原子同位素。例如，可用放射性同位素标记化合物，比如氚 (^3H)，碘-125 (^{125}I) 或 C-14 (^{14}C)。本发明的化合物的所有同位素组成的变换，无论放射性与否，都包括在本发明的范围之内。

“任选”或“任选地”指的是随后描述的事件或状况可能但不是必需出现的，并且该描述包括其中所述事件或状况发生的情况以及所述事件或状况不发生的情况。

术语“被取代的”是指特定原子上的任意一个或多个氢原子被取代基取代，可以包括重氢和氢的变体，只要特定原子的价态是正常的并且取代后的化合物是稳定的。当取代基为酮基（即=O）时，意味着两个氢原子被取代。酮取代不会发生在芳香基上。术语“任选被取代的”是指可以被取代，也可以不被取代，除非另有规定，取代基的种类和数目在化学上可以实现的基础上可以是任意的。

当任何变量（例如 *R*）在化合物的组成或结构中出现一次以上时，其在每一种情况下的定义都是独立的。因此，例如，如果一个基团被 0-2 个 *R* 所取代，则所述基团可以任选地至多被两个 *R* 所取代，并且每种情况下的 *R* 都有独立的选项。此外，取代基和/或其变体的组合只有在这样的组合会产生稳定的化合物的情况下才是被允许的。

当一个连接基团的数量为 0 时，比如-(*CRR*)₀，表示该连接基团为单键。

当其中一个变量选自单键时，表示其连接的两个基团直接相连，比如 A-L-Z 中 *L* 代表单键时表示
30 该结构实际上是 A-Z。

当一个取代基为空缺时，表示该取代基是不存在的，比如 A-X 中 *X* 为空缺时表示该结构实际上是 A。当一个取代基的键可以交叉连接到一个环上的两个原子时，这种取代基可以与这个环上的任意原子相键合。当所列举的取代基中没有指明其通过哪一个原子连接到化学结构通式中包括但未具体提及的化合物时，这种取代基可以通过其任何原子相键合。取代基和/或其变体的组合只有在这样的组合会产

生稳定的化合物的情况下才是被允许的。例如，结构单元  或  表示其可在
35 生稳定的化合物的情况下才是被允许的。例如，

环己基或者环己二烯上的任意一个位置发生取代。

除非另有规定，术语“杂”表示杂原子或杂原子团(即含有杂原子的原子团)，包括碳(C)和氢(H)以外的原子以及含有这些杂原子的原子团，例如包括氧(O)、氮(N)、硫(S)、硅(Si)、锗(Ge)、铝(Al)、硼(B)、-O-、-S-、=O、=S、-C(=O)O-、-C(=O)-、-C(=S)-、-S(=O)、-S(=O)₂-，以及任选被取代的-C(=O)N(H)-、-N(H)-、-C(=NH)-、-S(=O)₂N(H)-或-S(=O)N(H)-。

除非另有规定，“环”表示被取代或未被取代的环烷基、杂环烷基、环烯基、杂环烯基、环炔基、杂环炔基、芳基或杂芳基。所谓的环包括单环、联环、螺环、并环或桥环。环上原子的数目通常被定义为环的元数，例如，“5~7元环”是指环绕排列5~7个原子。除非另有规定，该环任选地包含1~3个杂原子。因此，“5~7元环”包括例如苯基、吡啶和哌啶基；另一方面，术语“5~7元杂环烷基环”包括吡啶基和哌啶基，但不包括苯基。术语“环”还包括含有至少一个环的环系，其中的每一个“环”均独立地符合上述定义。

除非另有规定，术语“杂环”或“杂环基”意指稳定的含杂原子或杂原子团的单环、双环或三环，它们可以是饱和的、部分不饱和的或不饱和的(芳族的)，它们包含碳原子和1、2、3或4个独立地选自N、O和S的环杂原子，其中上述任意杂环可以稠合到一个苯环上形成双环。氮和硫杂原子可任选被氧化(即NO和S(O)_p，p是1或2)。氮原子可以是被取代的或未取代的(即N或NR，其中R是H或本文已经定义过的其他取代基)。该杂环可以附着到任何杂原子或碳原子的侧基上从而形成稳定的结构。如果产生的化合物是稳定的，本文所述的杂环可以发生碳位或氮位上的取代。杂环中的氮原子任选地被季铵化。一个优选方案是，当杂环中S及O原子的总数超过1时，这些杂原子彼此不相邻。另一个优选方案是，杂环中S及O原子的总数不超过1。

如本文所用，术语“芳族杂环基团”或“杂芳基”意指稳定的5、6、7元单环或双环或7、8、9或10元双环杂环基的芳香环，它包含碳原子和1、2、3或4个独立地选自N、O和S的环杂原子。氮原子可以是被取代的或未取代的(即N或NR，其中R是H或本文已经定义过的其他取代基)。氮和硫杂原子可任选被氧化(即NO和S(O)_p，p是1或2)。值得注意的是，芳香杂环上S和O原子的总数不超过1。桥环也包含在杂环的定义中。当一个或多个原子(即C、O、N或S)连接两个不相邻的碳原子或氮原子时形成桥环。优选的桥环包括但不限于：一个碳原子、两个碳原子、一个氮原子、两个氮原子和一个碳-氮基。值得注意的是，一个桥总是将单环转换成三环。桥环中，环上的取代基也可以出现在桥上。

杂环化合物的实例包括但不限于：吡啶基、吡辛因基、苯并咪唑基、苯并呋喃基、苯并噻吩基、苯并噻吩基、苯并噻吩基、苯并恶唑基、苯并恶唑基、苯并恶唑基、苯并噻唑基、苯并三唑基、苯并四唑基、苯并异恶唑基、苯并异噻唑基、苯并咪唑基、咪唑基、4aH-咪唑基、咪唑基、苯并二氢吡喃基、色烯、噻吩基十氢噻吩基、2H,6H-1,5,2-二噻吩基、二氢呋喃并[2,3-b]四氢呋喃基、呋喃基、呋喃基、咪唑烷基、咪唑基、咪唑基、1H-咪唑基、咪唑基、二氢咪唑基、中氮茛基、咪唑基、3H-咪唑基、异苯并呋喃基、异咪唑基、异二氢咪唑基、异噻吩基、异噻吩基、异恶唑基、亚甲二氧基苯基、吗啉基、蔡啶基、八氢异噻吩基、恶二唑基、1,2,3-恶二唑基、1,2,4-恶二唑基、1,2,5-恶二唑基、1,3,4-恶二唑基、恶二唑基、恶二唑基、羟咪唑基、噻啶基、菲啶基、菲咯啉基、吩嗪、吩噻嗪、苯并黄嘌呤基、酚恶嗪基、酞嗪基、哌嗪基、哌啶基、哌啶酮基、4-哌啶酮基、胡椒基、蝶啶基、嘌呤基、吡喃基、吡嗪基、吡啶基、吡啶基、

吡啶基、哒嗪基、吡啶并恶唑、吡啶并咪唑、吡啶并噻唑、吡啶基、吡咯烷基、吡咯啉基、2H-吡咯基、吡咯基、喹啉基、喹啉基、4H-喹啉基、喹啉基、奎宁环基、四氢呋喃基、四氢异喹啉基、四氢喹啉基、四唑基、6H-1,2,5-噻二嗪基、1,2,3-噻二唑基、1,2,4-噻二唑基、1,2,5-噻二唑基、1,3,4-噻二唑基、噻蒎基、噻唑基、异噻唑基噻吩基、噻吩并恶唑基、噻吩并噻唑基、噻吩并咪唑基、噻吩基、三嗪基、1,2,3-三唑基、1,2,4-三唑基、1,2,5-三唑基、1,3,4-三唑基和咕吨基。还包括稠环和螺环化合物。

除非另有规定，术语“烃基”或者其下位概念（比如烷基、烯基、炔基、芳基等等）本身或者作为另一取代基的一部分表示直链的、支链的或环状的烃原子团或其组合，可以是完全饱和的（如烷基）、单元或多元不饱和的（如烯基、炔基、芳基），可以是单取代或多取代的，可以是一价（如甲基）、二价（如亚甲基）或者多价（如次甲基），可以包括二价或多价原子团，具有指定数量的碳原子（如 C₁-C₁₂ 表示 1 至 12 个碳，C₁₋₁₂ 选自 C₁、C₂、C₃、C₄、C₅、C₆、C₇、C₈、C₉、C₁₀、C₁₁ 和 C₁₂；C₃₋₁₂ 选自 C₃、C₄、C₅、C₆、C₇、C₈、C₉、C₁₀、C₁₁ 和 C₁₂）。“烃基”包括但不限于脂肪烃基和芳香烃基，所述脂肪烃基包括链状和环状，具体包括但不限于烷基、烯基、炔基，所述芳香烃基包括但不限于 6-12 元的芳香烃基，例如苯、萘等。在一些实施例中，术语“烃基”表示直链的或支链的原子团或它们的组合，可以是完全饱和的、单元或多元不饱和的，可以包括二价和多价原子团。饱和烃原子团的实例包括但不限于甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、叔丁基、异丁基、仲丁基、异丁基、环己基、（环己基）甲基、环丙基甲基，以及正戊基、正己基、正庚基、正辛基等原子团的同系物或异构体。不饱和烃基具有一个或多个双键或三键，其实例包括但不限于乙烯基、2-丙烯基、丁烯基、巴豆基、2-异戊烯基、2-（丁二烯基）、2,4-戊二烯基、3-（1,4-戊二烯基）、乙炔基、1-和 3-丙炔基，3-丁炔基，以及更高级的同系物和异构体。

除非另有规定，术语“杂烃基”或者其下位概念（比如杂烷基、杂烯基、杂炔基、杂芳基等等）本身或者与另一术语联合表示稳定的直链的、支链的或环状的烃原子团或其组合，有一定数目的碳原子和至少一个杂原子组成。在一些实施例中，术语“杂烷基”本身或者与另一术语联合表示稳定的直链的、支链的烃原子团或其组合，有一定数目的碳原子和至少一个杂原子组成。在一个典型实施例中，杂原子选自 B、O、N 和 S，其中氮和硫原子任选地被氧化，氮杂原子任选地被季铵化。杂原子或杂原子团可以位于杂烃基的任何内部位置，包括该烃基附着于分子其余部分的位置，但术语“烷氧基”、“烷氨基”和“烷硫基”（或硫代烷氧基）属于惯用表达，是指分别通过一个氧原子、氨基或硫原子连接到分子的其余部分的那些烷基基团。实例包括但不限于 -CH₂-CH₂-O-CH₃、-CH₂-CH₂-NH-CH₃、-CH₂-CH₂-N(CH₃)-CH₃、-CH₂-S-CH₂-CH₃、-CH₂-CH₂-S(O)-CH₃、-CH₂-CH₂-S(O)₂-CH₃、-CH=CH-O-CH₃、-CH₂-CH=N-OCH₃ 和 -CH=CH-N(CH₃)-CH₃。至多两个杂原子可以是连续的，例如 -CH₂-NH-OCH₃。

除非另有规定，术语“环烃基”、“杂环烃基”或者其下位概念（比如芳基、杂芳基、环烷基、杂环烷基、环烯基、杂环烯基、环炔基、杂环炔基等等）本身或与其他术语联合分别表示环化的“烃基”、“杂烃基”。此外，就杂烃基或杂环烃基（比如杂烷基、杂环烷基）而言，杂原子可以占据该杂环附着于分子其余部分的位置。环烃基的实例包括但不限于环戊基、环己基、1-环己烯基、3-环己烯基、环庚基等。杂环基的非限制性实例包括 1-（1,2,5,6-四氢吡啶基）、1-哌啶基、2-哌啶基、3-哌啶基、4-吗啉基、3-吗啉基、四氢呋喃-2-基、四氢呋喃吡啶-3-基、四氢噻吩-2-基、四氢噻吩-3-基，1-哌嗪基和 2-哌嗪基。

除非另有规定，术语“烷基”用于表示直链或支链的饱和烃基，可以是单取代（如-CH₂F）或多取代的（如-CF₃），可以是一价（如甲基）、二价（如亚甲基）或者多价（如次甲基）。烷基的例子包括甲基(Me)，乙基(Et)，丙基(如，n-丙基和 异丙基)，丁基(如，n-丁基，异丁基，s-丁基，t-丁基)，戊基(如，n-戊基，异戊基，新戊基)等。

- 5 除非另有规定，“炔基”指在链的任何位点上具有一个或多个碳碳三键的烷基，可以是单取代或多取代的，可以是一价、二价或者多价。炔基的例子包括乙炔基，丙炔基，丁炔基，戊炔基等。

除非另有规定，环烷基包括任何稳定的环状或多环烃基，任何碳原子都是饱和的，可以是单取代或多取代的，可以是一价、二价或者多价。这些环烷基的实例包括，但不限于，环丙基、降冰片烷基、[2.2.2]二环辛烷、[4.4.0]二环癸烷等。

- 10 除非另有规定，术语“卤代素”或“卤素”本身或作为另一取代基的一部分表示氟、氯、溴或碘原子。此外，术语“卤代烷基”意在包括单卤代烷基和多卤代烷基。例如，术语“卤代(C₁-C₄)烷基”意在包括但不仅限于三氟甲基、2,2,2-三氟乙基、4-氯丁基和3-溴丙基等等。除非另有规定，卤代烷基的实例包括但不仅限于：三氟甲基、三氯甲基、五氟乙基，和五氯乙基。

- “烷氧基”代表通过氧桥连接的具有特定数目碳原子的上述烷基，除非另有规定，C₁₋₆烷氧基包括 C₁、
15 C₂、C₃、C₄、C₅ 和 C₆ 的烷氧基。烷氧基的例子包括但不限于：甲氧基、乙氧基、正丙氧基、异丙氧基、正丁氧基、仲丁氧基、叔丁氧基、正戊氧基和 s-戊氧基。

- 除非另有规定，术语“芳基”表示多不饱和的芳族烃取代基，可以是单取代或多取代的，可以是一价、二价或者多价，它可以是单环或多环（比如1至3个环；其中至少一个环是芳族的），它们稠合在一起或共价连接。术语“杂芳基”是指含有一至四个杂原子的芳基（或环）。在一个示范性实例中，杂原子选自 B、N、O 和 S，其中氮和硫原子任选地被氧化，氮原子任选地被季铵化。杂芳基可通过杂原子连接到分子的其余部分。芳基或杂芳基的非限制性实施例包括苯基、萘基、联苯基、吡咯基、吡啶基、咪唑基、吡嗪基、恶唑基、苯基-恶唑基、异恶唑基、噻唑基、呋喃基、噻吩基、吡啶基、嘧啶基、苯并噻唑基、噻吩基、苯并咪唑基、吡啶基、异噻唑基、噻唑基、噻吩基、1-萘基、2-萘基、4-联苯基、1-吡咯基、2-吡咯基、3-吡咯基、3-吡啶基、2-咪唑基、4-咪唑基、吡嗪基、2-恶唑基、4-恶唑基、2-苯基-4-恶唑基、5-恶唑基、3-异恶唑基、4-异恶唑基、5-异恶唑基、2-噻唑基、4-噻唑基、5-噻唑基、2-呋喃基、3-呋喃基、2-噻吩基、3-噻吩基、2-吡啶基、3-吡啶基、4-吡啶基、2-嘧啶基、4-嘧啶基、5-苯并噻唑基、噻吩基、2-苯并咪唑基、5-吡啶基、1-异噻唑基、5-异噻唑基、2-噻唑基、5-噻唑基、3-噻唑基和 6-噻唑基。上述任意一个芳基和杂芳基环系的取代基选自下文所述的可接受的取代基。
- 20 25

- 除非另有规定，芳基在与其他术语联合使用时（例如芳氧基、芳硫基、芳烷基）包括如上定义的芳基和杂芳基环。因此，术语“芳烷基”意在包括芳基附着于烷基的那些原子团（例如苄基、苯乙基、吡啶基甲基等），包括其中碳原子（如亚甲基）已经被例如氧原子代替的那些烷基，例如苯氧基甲基、2-吡啶氧甲基 3-(1-萘氧基)丙基等。
- 30

术语“离去基团”是指可以被另一种官能团或原子通过取代反应（例如亲和取代反应）所取代的官能团或原子。例如，代表性的离去基团包括氯、溴；磺酸酯基，如甲苯磺酸酯、对甲苯磺酸酯等等。

- 35 术语“保护基”包括但不限于“氨基保护基”、“羟基保护基”。

术语“羟基保护基”是指适合用于阻止羟基副反应的保护基。代表性羟基保护基包括但不限于：烷基，如甲基；芳基甲基，如苄基（Bn）等等。

本发明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发明的实施例。

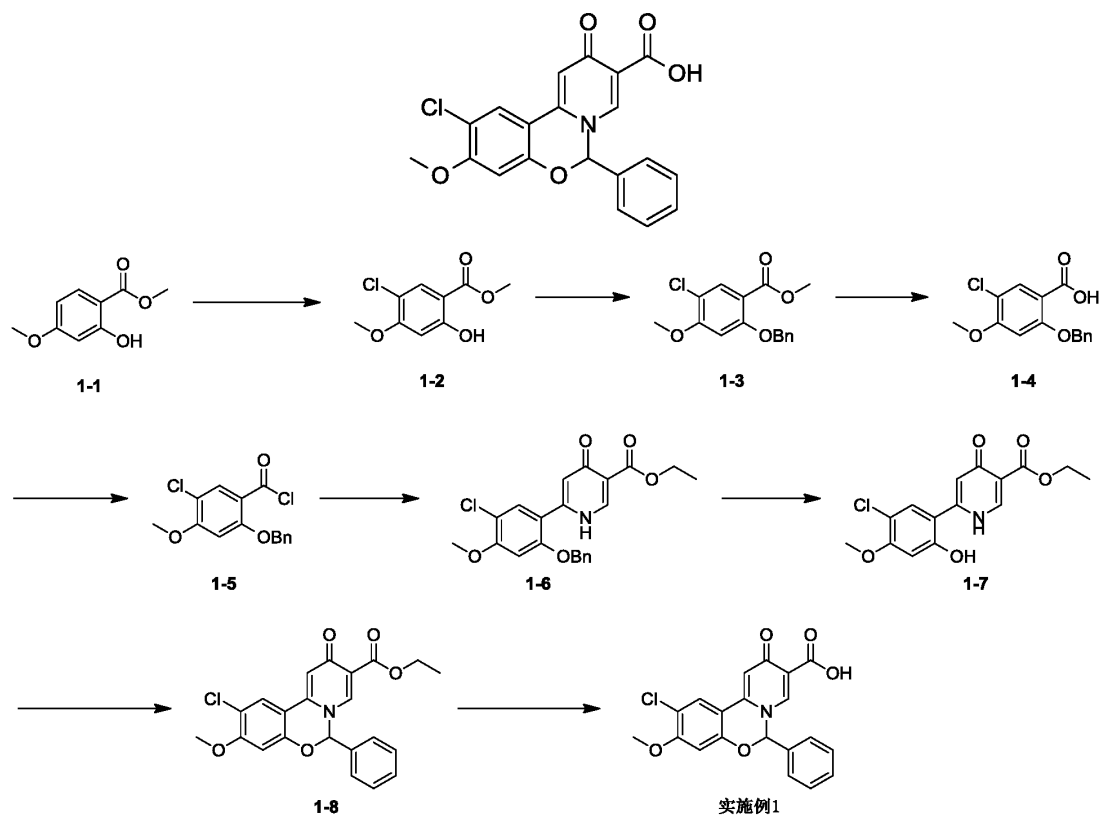
本发明所使用的溶剂可经市售获得。本发明采用下述缩略词：HATU 代表 O-(7-氮杂苯并三唑-1-基)-N, N', N'-四甲基脲六氟磷酸盐。

化合物经手工或者 ChemDraw® 软件命名，市售化合物采用供应商目录名称。

具体实施方式

下面通过实施例对本发明进行详细描述，但并不意味着对本发明任何不利限制。本文已经详细地描述了本发明，其中也公开了其具体实施方式，对本领域的技术人员而言，在不脱离本发明精神和范围的情况下针对本发明具体实施方式进行各种变化和改进将是显而易见的。

实施例 1



15

步骤 A: 将 1-1 (50.00 克, 274.47 毫摩尔) 溶解在二氯甲烷 (250 毫升) 中, 搅拌下加入磺酰氯 (44.45 克, 329.36 毫摩尔), 控制温度在 25 至 30 摄氏度。体系在 25 至 30 摄氏度下搅拌 48 小时。反应完后, 体系倒入 300 毫升饱和碳酸氢钠水溶液, 乙酸乙酯 (150 毫升*3) 萃取, 合并有机相, 用饱和食盐水 (40 毫升*3) 洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤并减压浓缩。残余物用硅胶柱纯化 (洗脱剂: 石油醚/乙酸乙酯=10/1 至 2/1), 得到 1-2。

20

步骤 B: 将 1-2 (20.00 克, 92.33 毫摩尔) 溶解在 N,N-二甲基甲酰胺 (60 毫升), 搅拌下加入苄溴 (14.26 毫升, 120.03 毫摩尔) 和碳酸钾 (33.18 克, 240.06 毫摩尔), 控制温度在 25 至 30 摄氏度。体系在 25 至 30 摄氏度搅拌 48 小时。反应结束后, 向体系中加入乙酸乙酯 (200 毫升) 和水 (500 毫升), 分液得到有机相。有机相用水 (50 毫升*2) 和食盐水 (60 毫升*2) 洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤并减压浓缩, 得到 1-3。

步骤 C: 将 1-3 (36 克, 117.36 毫摩尔) 溶解在四氢呋喃 (40 毫升) 和水 (40 毫升) 中, 加入一水合氢氧化锂 (29.55 克, 704.18 毫摩尔)。体系在 30 摄氏度搅拌 48 小时。反应结束后, 向体系中加入水 (200 毫升), 用乙酸乙酯 (50 毫升*3) 萃取。将水相调节 pH=1-2, 乙酸乙酯 (50 毫升*3) 萃取水相, 合并有机相, 无水硫酸钠干燥, 过滤并减压浓缩, 得到 1-4。

步骤 D: 将 1-4 (15 克, 51.25 毫摩尔) 溶解在二氯甲烷中 (150 毫升), 在氮气保护下加入草酰氯 (9.76 克, 76.88 毫摩尔) 和 N, N-二甲基甲酰胺 (394.26 微升, 5.13 毫摩尔)。该体系在 25 摄氏度下搅拌 2 小时。减压浓缩除去溶剂, 得到 1-5。

步骤 E: 在零下 70 摄氏度下, 将六甲基二硅基胺基锂 (1 摩尔/升, 101.06 毫升) 滴加到 1-5 (15.72 克, 50.53 毫摩尔) 和 2-乙酰基-3-二甲氨基丙烯酸乙酯 (7.8 克, 42.11 毫摩尔) 的四氢呋喃 (93 毫升) 溶液中。撤去干冰丙酮浴, 向体系中加入乙酸 (84.22 毫升, 1.47 摩尔) 和乙酸铵 (4.22 克, 54.74 毫摩尔), 减压浓缩除去四氢呋喃, 在 60-65 摄氏度下搅拌 1.5 小时。减压浓缩旋干, 将残渣用甲基叔丁基醚 (150 毫升) 和石油醚 (200 毫升) 洗涤, 过滤得滤饼, 减压干燥, 得到 1-6。

步骤 F: 将 1-6 (5 克, 12.08 毫摩尔) 溶解在四氢呋喃 (1.25 升) 中, 在氮气保护下加入钨碳 (10%, 500 毫克), 体系在真空置换几次氢气后, 于 25 摄氏度下, 氢气气氛 (15Psi) 保护下搅拌 15 分钟。过滤, 将滤渣溶解在二氯甲烷/甲醇= 10/1 (1500 毫升) 的混合液中, 过滤除去钨碳, 将滤液减压浓缩, 得到 1-7。

¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ 8.54 (s, 1H), 7.72 (s, 1H), 6.78 (s, 1H), 6.51 (s, 1H), 4.23 (q, J=7.1 Hz, 2H), 3.83 (s, 3H), 1.30 (t, J=7.1 Hz, 3H)。

步骤 G: 将 1-7 (3 克, 9.27 毫摩尔) 溶解在 N,N-二甲基甲酰胺 (60 毫升) 中, 加入碳酸钾 (10.25 克, 74.16 毫摩尔) 和二溴甲苯 (6.59 克, 27.81 毫摩尔), 体系在 100 摄氏度下搅拌 32 小时。反应液加水 (300 毫升) 淬灭, 乙酸乙酯 (300 毫升*2) 萃取。合并有机相, 用水 (300 毫升*2) 洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤减压浓缩, 用硅胶柱纯化 (洗脱剂: 石油醚/乙酸乙酯=10: 1 至 1: 0), 得到 1-8。

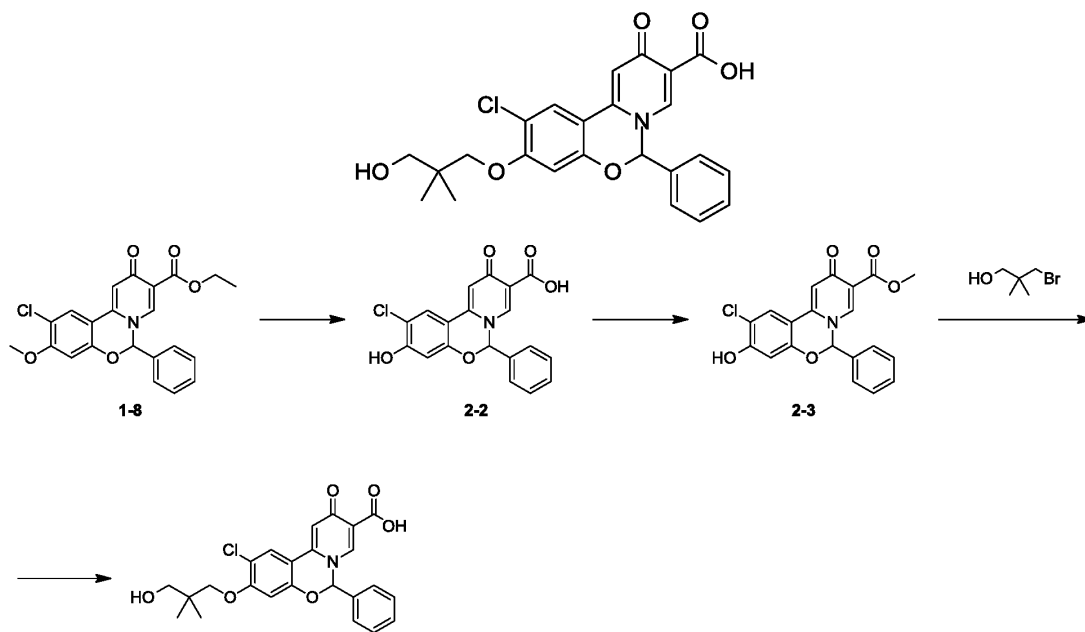
¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 7.96 (s, 1H), 7.63 (s, 1H), 7.51-7.44 (m, 3H), 7.34 (dd, J=1.9, 7.5 Hz, 2H), 6.83 (s, 1H), 6.63 (s, 1H), 6.59 (s, 1H), 4.31 (q, J=7.1 Hz, 2H), 3.92 (s, 3H), 1.33 (t, J=7.1 Hz, 3H)。

步骤 H: 将 1-8 (100.00 毫克, 242.81 微摩尔) 溶解在甲醇 (2 毫升) 和水 (1 毫升) 中, 加入氢氧化钠 (19.42 毫克, 485.62 微摩尔), 25 摄氏度下搅拌 16 小时。反应液用 1 摩尔/升的盐酸调节 pH=3, 用二氯甲烷 (15 毫升*2) 萃取。合并有机相, 用食盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤并减压浓缩。残渣用石油醚/乙酸乙酯=5/1 洗涤, 过滤得滤饼, 减压干燥得到实施例 1。

¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ 16.12 (s, 1H), 8.72 (s, 1H), 8.26 (s, 1H), 7.54 (s, 1H), 7.51

(s, 1H), 7.47-7.43 (m, 3H), 7.27 (dd, $J=2.6, 6.4$ Hz, 2H), 7.11 (s, 1H), 3.92 (s, 3H)。

实施例 2



实施例2

5 步骤 A: 将 1-8 (1.60 克, 3.89 毫摩尔) 溶解在二氯甲烷 (160 毫升) 中, 零下 70 摄氏度逐滴加入三溴化硼 (2.25 毫升, 23.34 毫摩尔), 25 摄氏度下搅拌 16 小时。反应液在零摄氏度下用甲醇 (60 毫升) 淬灭, 减压浓缩旋干, 加入水 (50 毫升) 和二氯甲烷 (30 毫升), 过滤得到固体, 减压干燥得到 2-2。

10 $^1\text{H NMR}$ (400MHz, DMSO- d_6) δ 11.53 (br s, 1H), 8.73 (s, 1H), 8.18 (s, 1H), 7.51 (s, 1H), 7.46-7.41 (m, 5H), 7.21 (dt, $J=2.4, 3.5$ Hz, 2H), 6.75 (s, 1H)。

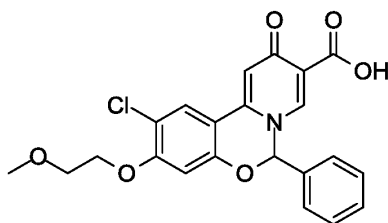
步骤 B: 将 2-2 (1.20 克, 3.25 毫摩尔) 溶解在甲醇 (30 毫升) 中, 零摄氏度下加入氯化亚砷 (2.36 毫升, 32.50 毫摩尔), 反应液在 50 摄氏度下搅拌 16 小时。体系减压浓缩旋干, 固体用石油醚/乙酸乙酯=3/1(12 毫升), 过滤得到滤饼, 减压干燥得到 2-3。

15 步骤 C: 将 2-3 (100.00 毫克, 260.57 微摩尔), 3-溴-2,2-二甲基-1-丙醇 (65.29 毫克, 390.86 微摩尔), 碘化钠 (7.81 毫克, 52.11 微摩尔), 碳酸钾混合在 N, N-二甲基甲酰胺 (2 毫升) 中, 于 120 摄氏度下搅拌 16 小时。反应液用 1 摩尔/升盐酸调节 pH=3-4, 二氯甲烷 (15 毫升*2) 萃取, 合并有机相用水 (20 毫升*2) 洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤减压浓缩。所得固体经高效液相制备色谱法纯化 (柱子: Boston Green ODS 150*305 微米; 流动相: [水 (0.225% 甲酸)-乙腈]; 洗脱梯度: 35%-65%, 12 分钟) 纯化得到实施例 2。

20 $^1\text{H NMR}$ (400MHz, DMSO- d_6) δ 8.74 (br s, 1H), 8.35 (s, 1H), 8.21 (br d, $J=0.7$ Hz, 1H), 7.55 (s, 1H), 7.45-7.41 (m, 3H), 7.21 (br s, 2H), 7.05 (s, 1H), 3.83 (s, 2H), 3.28 (s, 2H), 0.93 (s, 6H)。

实施例 3 至 9 均可参照实施例 2 的制备方法制得。

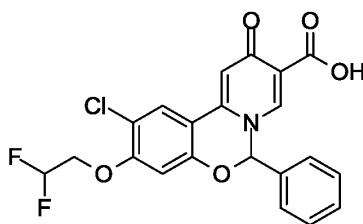
实施例 3



¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.24 (s, 1H), 7.72 (s, 1H), 7.60 - 7.45 (m, 3H), 7.33 (dd, J=1.3, 7.9 Hz, 2H), 7.02 (s, 1H), 6.72 (s, 1H), 6.64 (s, 1H), 4.22 (d, J=4.6 Hz, 2H), 3.91 - 3.73 (m, 2H), 3.49 (s, 3H)。

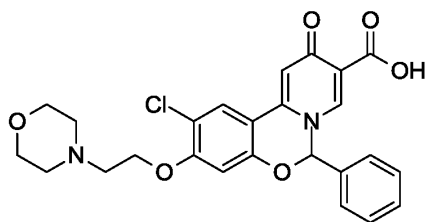
5

实施例 4



¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.25 (s, 1H), 7.76 (s, 1H), 7.57 - 7.51 (m, 3H), 7.33 (br d, J=6.5 Hz, 2H), 7.05 (s, 1H), 6.70 (s, 1H), 6.65 (s, 1H), 6.32 (s, 0.25H), 6.19 (s, 0.45H), 6.05 (s, 0.3H), 4.29 (dt, J=3.8, 12.6 Hz, 2H)。

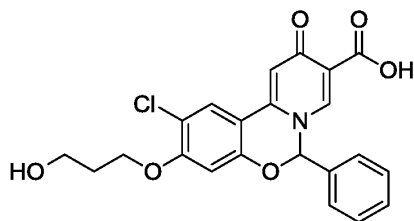
实施例 5



10

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8.35 (s, 1H), 7.54 (s, 2H), 7.46 - 7.43 (m, 4H), 7.24 (br s, 1H), 7.14 (s, 1H), 7.13 - 7.13 (m, 1H), 4.25 (br t, J=5.3 Hz, 3H), 3.61 - 3.53 (m, 6H), 2.73 (t, J=5.6 Hz, 3H)。

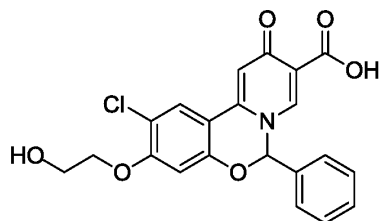
实施例 6



15

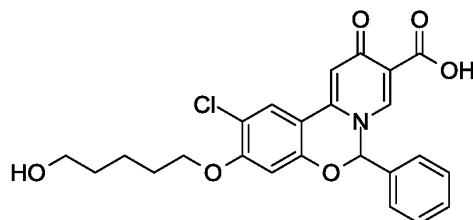
¹H NMR (400 MHz, MeOH-d₄) δ 8.51 (br s, 1H), 8.35 (s, 1H), 7.99 (br s, 1H), 7.49 (br s, 3H), 7.37 (br s, 2H), 7.19 (br s, 2H), 6.96 (s, 1H), 4.23 (br t, J=6.0 Hz, 2H), 3.79 (t, J=6.1 Hz, 2H), 2.05 (br t, J=6.1 Hz, 3H)。

实施例 7



¹H NMR (400 MHz, MeOH-d₄) δ 8.55 - 8.41 (m, 2H), 7.98 (br s, 1H), 7.48 (br s, 3H), 7.37 (br s, 2H), 7.19 (br s, 2H), 6.97 (br s, 1H), 4.20 (br s, 2H), 3.94 (br s, 2H)。

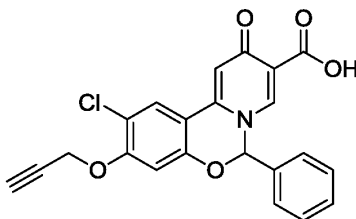
实施例 8



5

¹H NMR (400 MHz, MeOH-d₄) δ 8.50 (br s, 1H), 7.99 (br s, 1H), 7.54 - 7.32 (m, 6H), 7.22 (br s, 1H), 6.93 (br s, 1H), 5.13 - 5.06 (m, 1H), 4.19 - 4.07 (m, 1H), 4.13 (br s, 1H), 3.60 (br t, J=5.8 Hz, 2H), 1.88 (br s, 2H), 1.61 (br s, 5H)。

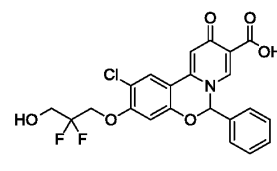
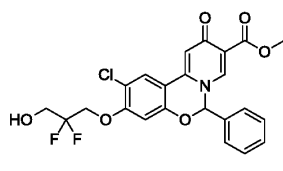
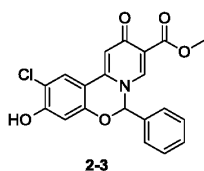
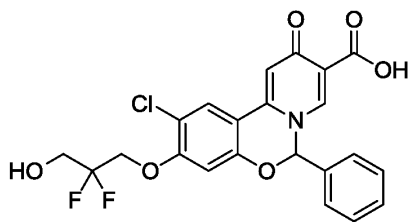
实施例 9



10

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.22 (s, 1H), 7.75 (s, 1H), 7.61 - 7.48 (m, 3H), 7.37 (d, J=6.5 Hz, 2H), 7.04 (s, 1H), 6.88 (s, 1H), 6.63 (s, 1H), 4.85 (t, J=2.4 Hz, 2H), 2.63 (t, J=2.4 Hz, 1H)。

实施例 10



15

步骤 A: 将 2-3 (50.00 毫克, 130.28 微摩尔) 溶解在 DMF (2 毫升) 中, 加入碳酸钾 (36.01 毫克, 260.56 微摩尔), (2,2-二氟-3-羟基-丙基) 4-对甲苯磺酸 (34.69 毫克, 130.28 微摩尔), 体系在 100

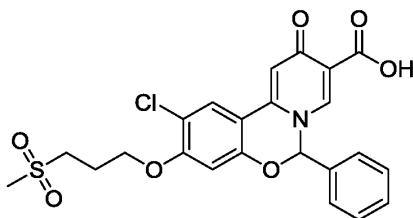
摄氏度下搅拌 12 小时。反应液用 1 摩尔/升盐酸调节 pH=3-4, 二氯甲烷 (15 毫升*2) 萃取, 合并有机相用水 (20 毫升*2) 洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤减压浓缩。经硅胶板纯化(二氧化硅, 二氯甲烷: 甲醇=15:1)得到 10-2。

步骤 B: 将 10-2 (40.00 毫克, 26.79 微摩尔)溶解在四氢呋喃 (1 毫升), 甲醇 (1 毫升) 和水 (1 毫升) 加入一水合氢氧化锂 (1.12 毫克, 26.79 微摩尔), 体系在 25 摄氏度下搅拌 1 小时。反应液调节 pH=3-4, 经高效液相制备色谱法纯化 (柱子: Boston Green ODS 150*30 5 微米; 流动相: [水 (0.225% 甲酸) - 乙腈];洗脱梯度: 30%-54%,10 分钟) 纯化得到实施例 10。

¹H NMR (400MHz, METHANOL-d₄) δ 8.51 (s, 1H), 8.08 (s, 1H), 7.50 (br d, J=3.3 Hz, 3H), 7.38 (br d, J=4.4 Hz, 2H), 7.24 (br d, J=18.3 Hz, 2H), 7.07 (s, 1H), 4.45 (br t, J=11.4 Hz, 2H), 3.91 (t, J=13.1 Hz, 2H)。

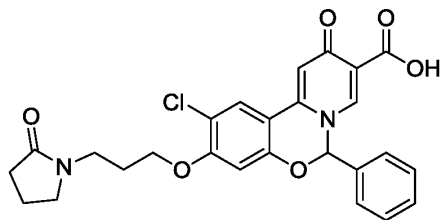
实施例 11 至 12 均可参照实施例 10 的制备方法制得

实施例 11



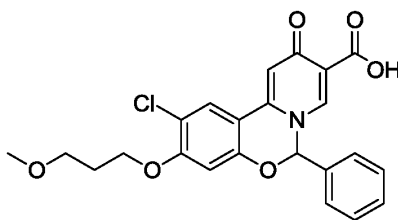
¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ 8.73 (s, 1H), 8.27 (s, 1H), 7.54 (s, 1H), 7.52 (s, 1H), 7.47 - 7.43 (m, 3H), 7.26 (dd, J=2.6, 6.5 Hz, 2H), 7.13 (s, 1H), 4.26 (t, J=6.1 Hz, 2H), 3.28 - 3.24 (m, 2H), 3.03 (s, 3H), 2.23 - 2.13 (m, 2H)。

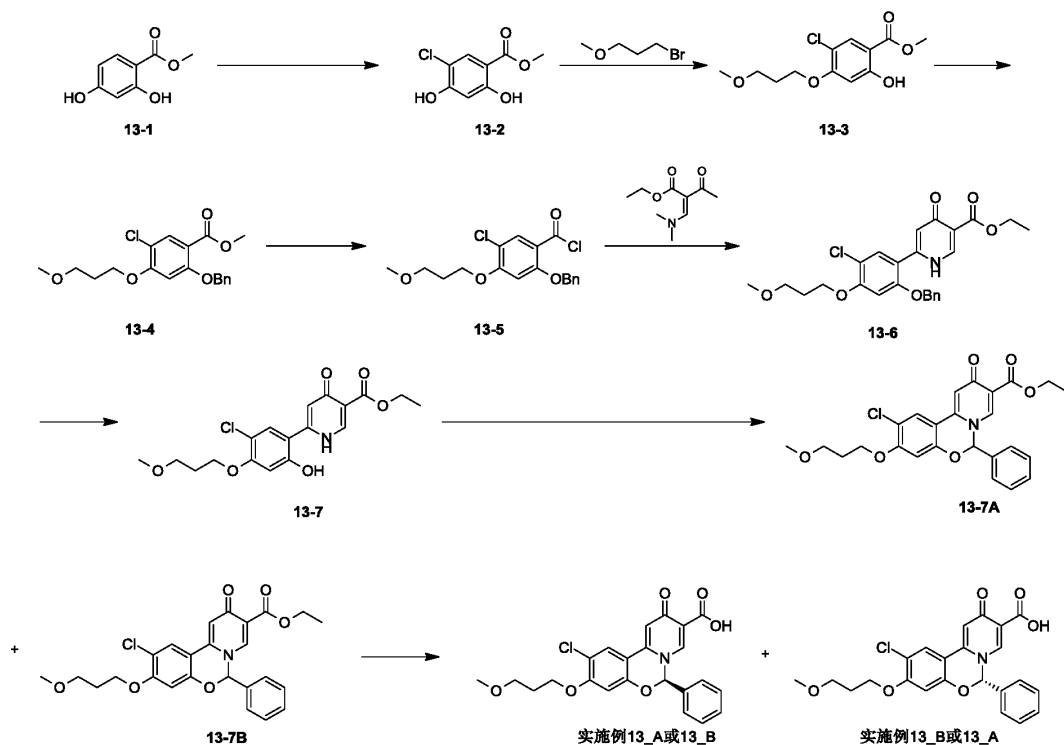
实施例 12



¹H NMR (400MHz, MeOH-d₄) δ 8.35 (brs, 1H), 7.91 (s, 1H), 7.38 (brs, 3H), 7.27 (brs, 2H), 7.09 (br d, J=17.0 Hz, 2H), 6.86 - 6.81 (m, 1H), 4.04 (brs, 2H), 3.45 - 3.37 (m, 5H), 2.29 - 2.21 (m, 2H), 2.02 - 1.97 (m, 2H), 1.96 - 1.92 (m, 2H)。

实施例 13 (13_A 和 13_B)





步骤 A: 将 13-1 (10.00 克, 59.5 毫摩尔) 在 0 摄氏度下溶解于二氯甲烷 (500 毫升), 然后向其中加入磺酰氯 (10.77 克, 79.77 毫摩尔, 7.98 毫升)。混合溶液在 35 摄氏度下搅拌 38 小时。然后将溶液倒入 300 毫升饱和碳酸氢钠水溶液中并搅拌。水相经乙酸乙酯萃取 (150 毫升*3 次), 然后将合并的有机相经饱和食盐水洗涤 (40 毫升*3 次), 并通过无水硫酸钠干燥, 并经过减压蒸馏得到白色残留物。然后将白色残留物经硅胶柱层析纯化 (洗脱剂: 石油醚/乙酸乙酯=30/1 至 20/1) 得到化合物 13-2。

$^1\text{H NMR}$ (400MHz, MeOH-d_4) δ 10.75 (s, 1H), 7.74 (s, 1H), 6.54 (s, 1H), 5.98 (s, 1H), 3.85 (s, 3H)。

步骤 B: 将 13-2 (8.00 克, 39.49 毫摩尔), 1-溴-3-甲氧基-丙烷 (7.25 克, 47.39 毫摩尔) 溶于二甲基甲酰胺 (100.00 毫升), 并在冷却至 0 摄氏度后向其中加入碳酸钾 (10.92 克, 78.98 毫摩尔)。再将混合溶液升温至 25 摄氏度并搅拌 10 小时。然后将乙酸乙酯 (300 毫升) 和水 (50 毫升) 加入溶液中, 并在 25 摄氏度下搅拌 10 分钟。将有机相分离出来并饱和食盐水洗涤 (40 毫升*3), 然后通过无水硫酸钠干燥, 并减压浓缩得到黄色液体。再将黄色液体经硅胶柱层析纯化 (洗脱剂: 石油醚/乙酸乙酯=30/1 至 20/1) 得到化合物 13-3。

$^1\text{H NMR}$ (400MHz, CDCl_3) δ 10.90 (s, 1H), 7.82 (s, 1H), 6.52 (s, 1H), 4.16 (t, $J=6.0$ Hz, 2H), 3.94 (s, 3H), 3.60 (t, $J=6.0$ Hz, 2H), 3.38 (s, 3H), 2.13 (t, $J=6.0$ Hz, 2H)。

步骤 C: 向 13-3 (3.64 克, 13.25 毫摩尔), (氯化苄 (2.18 克, 17.23 毫摩尔, 1.98 毫升) 的二甲基甲酰胺 (10.00 毫升) 溶液中加入碳酸钾 (4.76 克, 34.45 毫摩尔)。混合溶液在 25 摄氏度下搅拌 20 小时。乙酸乙酯 (150 毫升) 和水 (30 毫升) 加入溶液中, 溶液再在 20 摄氏度下搅拌 10 分钟。然后分离有机相并经过水 (30 毫升*2) 洗饱和食盐水 (30 毫升*2) 洗涤, 然后通过无水硫酸钠干燥, 并减压浓缩得到化合物 13-4。

步骤 D: 13-4 (2.00 克, 5.48 毫摩尔) 和一水合氢氧化锂 (1.38 克, 32.89 毫摩尔) 的四氢呋喃

(20 毫升) 和水 (10 毫升) 溶液在 10~20 摄氏度下搅拌 10 小时。然后将溶液经乙酸乙酯/石油醚 1/1 洗涤 (5 毫升*3)。将水相调酸性至酸碱度值 1~2。再将溶液经二氯甲烷 (50 毫升*3) 萃取, 将有机相合并后经无水硫酸钠干燥, 并减压浓缩得到白色固体化合物 2-苄氧基-5-氯-4-(3-甲氧基丙烷) 苯甲酸 (1.30 克, 3.71 毫摩尔, 67.63%)。向 2-苄氧基-5-氯-4-(3-甲氧基丙烷) 苯甲酸 (1.00 克, 2.85 毫摩尔) 的二氯甲烷 (10.00 毫升) 溶液中加入氯化亚砷 (508.60 毫克, 4.28 毫摩尔, 310.12 微升)。混合液在 25 摄氏度下搅拌 1 小时。然后将溶液减压浓缩得到残留物。再将残留物溶于甲苯, 并继续减压浓缩得到残留物。将残留物 13-5 在氮气环境下保存。

¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ 12.87 - 12.22 (m, 1H), 7.74 (s, 1H), 7.53 (br d, J=7.2 Hz, 2H), 7.40 (t, J=7.6 Hz, 2H), 7.36 - 7.30 (m, 1H), 6.94 (s, 1H), 5.27 (s, 2H), 4.20 (s, 2H), 3.50 (s, 2H), 3.26 (s, 3H), 1.98 (t, J=6.4 Hz, 2H)。

步骤 E: 零下 70 摄氏度下向六甲基二硅基胺基锂 (1 摩尔/升, 23.88 毫升) 的四氢呋喃 (20 毫升) 溶液中逐滴加入 (5 分钟) 13-5 (2.94 克, 7.96 毫摩尔) 和 2-(二甲基氨基亚甲基)-3-氧代丁酸乙酯 (1.62 g, 8.76 毫摩尔, 1.10 eq) 的四氢呋喃 (20 毫升) 溶液。然后移走冷却槽并让混合物持续搅拌 5 分钟。再将醋酸铵 (3.23 克, 41.95 毫摩尔) 和醋酸 (67.85 克, 1.13 毫摩尔) 加入混合物中, 并将绝大部分四氢呋喃通过旋转蒸发仪在 60 摄氏度下除去。并将残留物在 60~65 摄氏度下加热 1.5 小时。将反应混合物冷却, 然后向其中加入水 (40 毫升) 和二氯甲烷 (200 毫升)。混合物搅拌 10 分钟后分离, 有机相经水洗 (10 毫升*3) 和碳酸氢钠水溶液洗, 干燥, 然后浓缩得到黄色残余物。残余物再经硅胶柱层析纯化 (洗脱剂: 石油醚/乙酸乙酯=10/1) 得到化合物 13-6。

步骤 F: 向 13-6 (3.00 g, 6.36 毫摩尔) 的四氢呋喃 (20 毫升) 溶液中加入活化湿钯炭 (500 毫克)。溶液在 25 摄氏度下于氢气 (15 psi) 气氛中搅拌 2 小时。然后将棕色悬浊液过滤得到黄色液体, 并将其减压浓缩得到黄色残留物。再将黄色残留物经石油醚/乙酸乙酯 (4/1) 打浆 (两次) 并过滤得到淡黄色固体化合物 13-7。

步骤 G: 将 13-7 (800.00 毫克, 2.10 毫摩尔), 碳酸钾 (580.48 毫克, 4.20 毫摩尔) 和二溴甲苯 (551.10 毫克, 2.21 毫摩尔) 的 DMF (20.00 毫升) 溶液在 100 摄氏度下搅拌 10 小时。再将乙酸乙酯 (60 毫升) 和水 (10 毫升) 加入反应溶液, 再将有机相分离, 并将水相通过乙酸乙酯 (20 毫升*3) 萃取, 合并所有有机相并经水 (10 毫升*3) 洗和饱和食盐水 (10 毫升*3), 并减压浓缩得到黄色液体。黄色液体经硅胶柱层析纯化 (洗脱剂: 石油醚/乙酸乙酯=10/1 至 5/1) 得到白色固体。再将固体经手性色谱柱制备分离 (分离柱: AD(250mm*30mm, 10μm); 流动相: [0.1% 氨水-甲醇], 洗脱梯度: 50%-50%, 5.9min; 800min) 纯化得到实施例 13-7A (保留时间=3.831 min) 和实施例 13-7B (保留时间=4.552 min)。

步骤 H: 向 13-7A (240.00 毫克, 510.74 毫摩尔) 的甲醇 (9 毫升) 和水 (3 毫升) 溶液中加入一水合氢氧化锂 (107.15 毫克, 2.55 毫摩尔)。然后溶液在 25 摄氏度下搅拌 19 小时。再将溶液经过乙酸乙酯/石油醚 (1/4) (5 毫升) 洗涤, 并通过稀盐酸水溶液 (1 摩尔/升) 调节酸碱度至 2~3。再通过二氯甲烷 (40 毫升*3) 对溶液进行萃取。合并有机相并减压浓缩得到黄色液体。黄色液体经高效色谱柱 (分离柱: Agela ASB 150*25mm*5μm; 流动相: [水(0.1% 三氟乙酸)-乙腈], 洗脱梯度: 42%-72%, 10min) 纯化得到实施例 13_A。

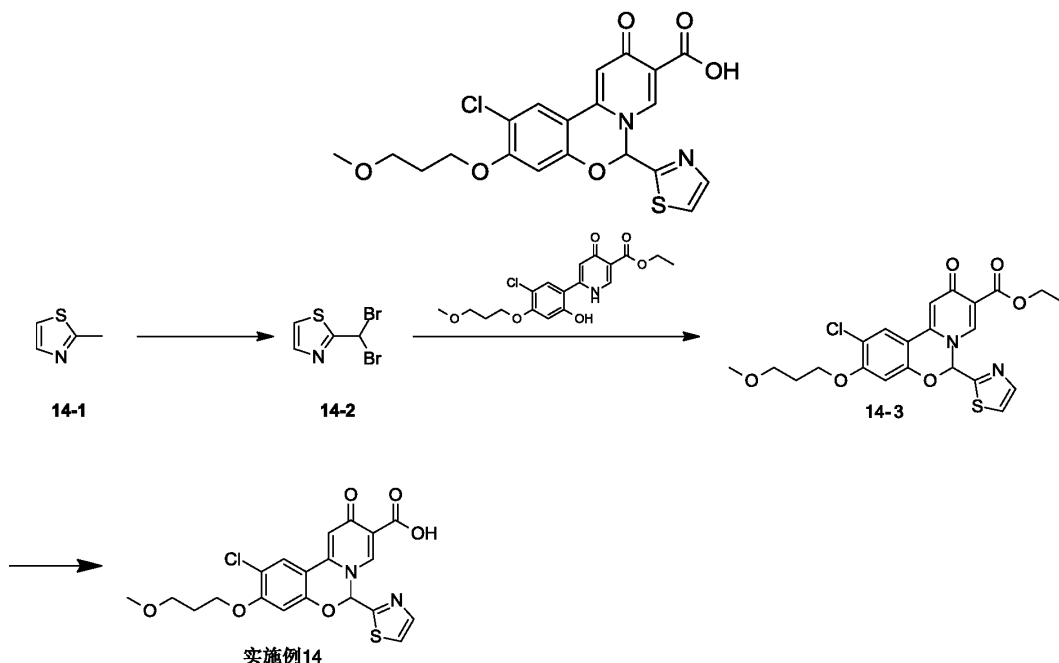
¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 15.46 (br s, 1H), 8.15 (s, 1H), 7.62 (s, 1H), 7.49 - 7.37 (m, 3H), 7.24 (br d, J=7.0

Hz, 2H), 6.93 (s, 1H), 6.61 (s, 1H), 6.55 (s, 1H), 4.67 (br s, 3H), 4.08 (t, $J=6.2$ Hz, 2H), 3.51 (t, $J=5.9$ Hz, 2H), 3.28 (s, 3H), 2.08 - 1.93 (m, 2H)。

步骤 I: 向 13-7B(290.00 毫克, 617.14 毫摩尔) 的甲醇 (9 毫升) 和水 (3 毫升) 溶液中加入一水合氢氧化锂 (129.48 毫克, 3.09 毫摩尔)。然后溶液在 25 摄氏度下搅拌 19 小时。再将溶液经过乙酸乙酯/石油醚 (1/4) (5 毫升) 洗涤, 并通过稀盐酸水溶液 (1 摩尔/升) 调节酸碱度至 2~3。再通过二氯甲烷 (40 毫升*3) 对溶液进行萃取。合并有机相并减压浓缩得到液体。液体经高效色谱柱(分离柱: Agela ASB 150*25mm*5 μ m; 流动相: [水(0.1%三氟乙酸)-乙腈], 洗脱梯度: 42%-72% CO_2 , 11min) 纯化得到实

10 施例 13_B。
 $^1\text{H NMR}$ (400MHz, CDCl_3) δ 8.14 (s, 1H), 7.62 (s, 1H), 7.50 - 7.36 (m, 3H), 7.24 (br d, $J=7.0$ Hz, 1H), 7.26 - 7.22 (m, 1H), 6.93 (s, 1H), 6.61 (s, 1H), 6.54 (s, 1H), 4.08 (t, $J=6.2$ Hz, 2H), 3.51 (t, $J=5.9$ Hz, 2H), 3.28 (s, 3H), 2.04 (t, $J=6.1$ Hz, 2H)。

实施例 14



15 步骤A: 向14-1 (1.00克, 10.09毫摩尔) 和溴代丁二酰亚胺 (3.77克, 21.19毫摩尔) 的四氯化碳 (10.00毫升) 溶液中加入过氧苯甲酰 (122.21毫克, 504.50毫摩尔), 得到的混合溶液在80摄氏度下光照并搅拌16小时。反应完成后, 移走混合溶液中的溶剂, 并将混合物溶于60毫升水, 再通过乙酸乙酯萃取 (50毫升*3), 合并有机相, 经60毫升饱和食盐水洗涤, 再通过无水硫酸钠干燥, 过滤并浓缩得到残余物。将残余物经过硅胶柱层析纯化 (洗脱剂: 石油醚/乙酸乙酯=1/0至10/1) 得到化合物14-

20 2。

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.82 (d, $J=8.0$ Hz 1H), 7.50 (d, $J=7.6$ Hz 1H), 6.66 (s, 1H)。

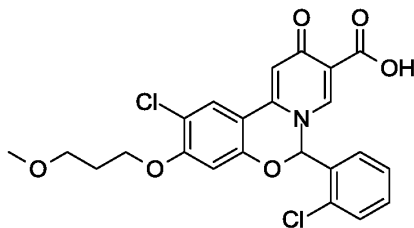
参照实施例 13 步骤 B, C 的制备方法制得实施例 14。

实施例 14 : $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 15.44 (br s, 1H), 8.60 (br s, 1H), 7.76 (br d, $J=2.7$ Hz, 1H), 7.64 (s, 1H), 7.47 (br d, $J=2.4$ Hz, 1H), 7.11 (br s, 1H), 6.97 (s, 1H), 6.76 (s, 1H), 4.19 (br t, $J=6.0$ Hz, 2H),

3.60 (br t, $J=5.2$ Hz, 2H), 3.37 (s, 3H), 2.17 - 2.10 (m, 2H)。

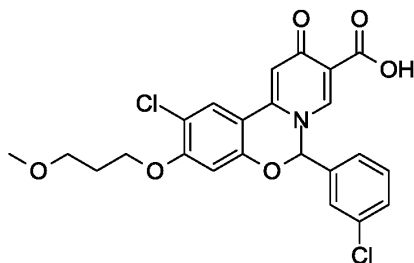
实施例 15 至 24 均可参照实施例 14 的制备方法制得

实施例 15



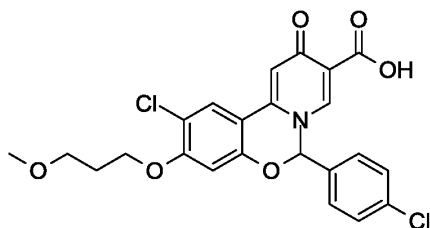
- 5 $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 15.47 (s, 1H), 8.00 (s, 1H), 7.78 (s, 1H), 7.63 - 7.52 (m, 2H), 7.50 - 7.39 (m, 2H), 7.02 (s, 1H), 6.84 (s, 1H), 6.70 (s, 1H), 4.16 (t, $J=6.2$ Hz, 2H), 3.59 (t, $J=5.9$ Hz, 2H), 3.39 - 3.31 (m, 3H), 2.12 (quin, $J=6.1$ Hz, 2H)。

实施例 16



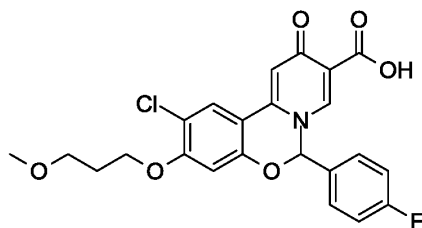
- 10 $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 15.46 (br s, 1H), 8.28 (s, 1H), 7.69 (s, 1H), 7.52 - 7.46 (m, 1H), 7.44 - 7.37 (m, 1H), 7.32 (s, 1H), 7.12 (br d, $J=7.2$ Hz, 1H), 7.01 (s, 1H), 6.73 - 6.62 (m, 2H), 4.16 (t, $J=6.0$ Hz, 2H), 3.59 (t, $J=6.0$ Hz, 2H), 3.36 (s, 3H), 2.13 (t, $J=6.4$ Hz, 2H)。

实施例 17



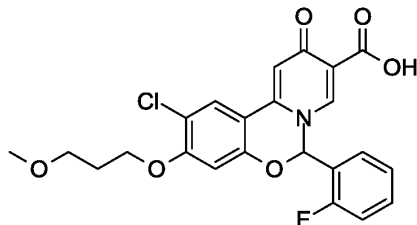
- 15 $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 15.49 (br s, 1H), 8.26 (s, 1H), 7.68 (s, 1H), 7.46 (br d, $J=8.0$ Hz, 2H), 7.23 (br d, $J=8.0$ Hz, 2H), 7.00 (s, 1H), 6.75 - 6.58 (m, 2H), 4.15 (t, $J=6.0$ Hz, 2H), 3.59 (t, $J=6.0$ Hz, 2H), 3.36 (s, 3H), 2.12 (br t, $J=6.0$ Hz, 2H)。

实施例 18



¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.21 (s, 1H), 7.70 (s, 1H), 7.37 - 7.29 (m, 2H), 7.23 - 7.15 (m, 2H), 7.00 (s, 1H), 6.68 (s, 1H), 6.62 (s, 1H), 4.16 (br t, J=6.0 Hz, 2H), 3.59 (t, J=6.0 Hz, 2H), 3.36 (s, 3H), 2.17 - 2.09 (m, 2H)。

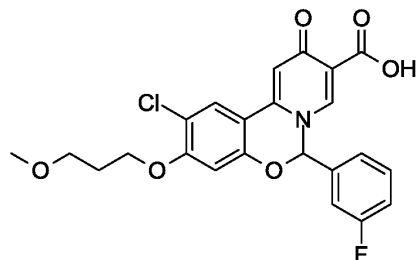
实施例 19



5

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 15.46 (br s, 1H), 8.14 (s, 1H), 7.76 (s, 1H), 7.63 - 7.56 (m, 1H), 7.32 - 7.29 (m, 2H), 7.28 (br s, 1H), 7.02 (s, 1H), 6.81 (s, 1H), 6.69 (s, 1H), 4.15 (t, J=6.0 Hz, 2H), 3.58 (t, J=6.0 Hz, 2H), 3.35 (s, 3H), 2.12 (t, J=6.0 Hz, 2H)。

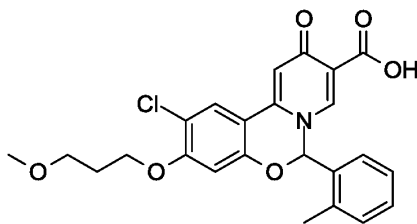
实施例 20



10

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 15.46 (br s, 1H), 8.29 (s, 1H), 7.68 (s, 1H), 7.49 - 7.42 (m, 1H), 7.24 - 7.18 (m, 1H), 7.05 (br d, J=9.2 Hz, 1H), 7.03 - 6.99 (m, 2H), 6.71 - 6.64 (m, 2H), 4.16 (t, J=6.0 Hz, 2H), 3.59 (t, J=6.0 Hz, 2H), 3.36 (s, 3H), 2.13 (quin, J=6.0 Hz, 2H)。

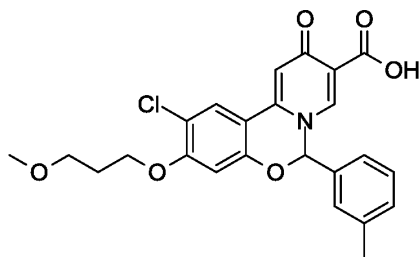
实施例 21



15

¹H NMR (400 MHz, MeOH-d₄) δ 15.55 (br s, 1H), 8.05 (s, 1H), 7.76 (s, 1H), 7.47 (t, J=7.0 Hz, 1H), 7.37 (d, J=7.5 Hz, 1H), 7.33 (t, J=7.6 Hz, 1H), 7.21 (d, J=7.7 Hz, 1H), 7.02 (s, 1H), 6.68 - 6.61 (m, 2H), 4.15 (t, J=6.2 Hz, 2H), 3.58 (t, J=5.9 Hz, 2H), 3.35 (s, 3H), 2.44 (s, 3H), 2.12 (t, J=6.0 Hz, 2H)。

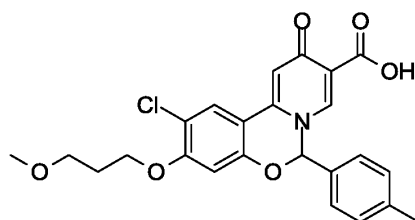
实施例 22



¹H NMR (400 MHz, MeOH-d₄) δ 15.58 (br s, 1H), 8.19 (s, 1H), 7.71 (s, 1H), 7.43 - 7.30 (m, 2H), 7.16 - 7.10 (m, 2H), 7.00 (s, 1H), 6.69 (s, 1H), 6.54 (s, 1H), 4.15 (t, J=6.0 Hz, 2H), 3.59 (t, J=6.0 Hz, 2H), 3.36 (s, 3H), 2.40 (s, 3H), 2.12 (t, J=6.0 Hz, 2H)。

5

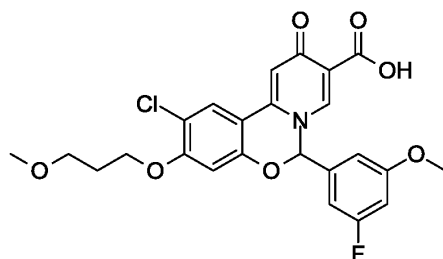
实施例 23



¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 15.59 (br s, 1H), 8.19 (s, 1H), 7.70 (s, 1H), 7.33 - 7.28 (m, 2H), 7.25 - 7.19 (m, 2H), 6.99 (s, 1H), 6.68 (s, 1H), 6.55 (s, 1H), 4.15 (br t, J=6.1 Hz, 2H), 3.58 (t, J=5.8 Hz, 2H), 3.35 (s, 3H), 2.41 (s, 3H), 2.14 - 2.09 (m, 2H) 。

10

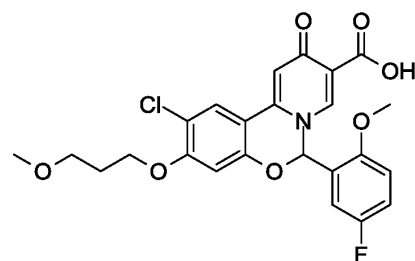
实施例 24



¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 15.49 (br s, 1H), 8.29 (s, 1H), 7.70 (s, 1H), 7.01 (s, 1H), 6.77 - 6.67 (m, 2H), 6.65 - 6.56 (m, 3H), 4.18 (t, J=6.2 Hz, 2H), 3.82 (s, 3H), 3.60 (t, J=5.9 Hz, 2H), 3.38 (s, 3H), 2.14 (quin, J=6.1 Hz, 2H)。

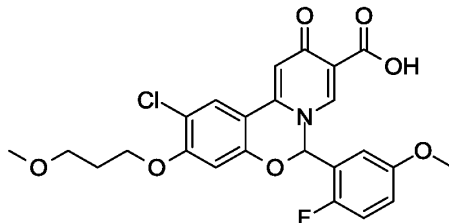
15 实施例 25 至 34 均可参照实施例 35 的制备方法制得

实施例 25



¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 15.59 (br s, 1H), 8.01 (s, 1H), 7.79 (s, 1H), 7.34 - 7.29 (m, 1H), 7.27 (s, 1H), 7.07 (dd, J=4.0, 9.0 Hz, 1H), 7.00 (s, 1H), 6.75 (s, 1H), 6.70 (s, 1H), 4.19 (t, J=6.2 Hz, 2H), 3.90 (s, 3H), 3.61 (t, J=5.9 Hz, 2H), 3.38 (s, 3H), 2.15 (quin, J=6.1 Hz, 2H)。

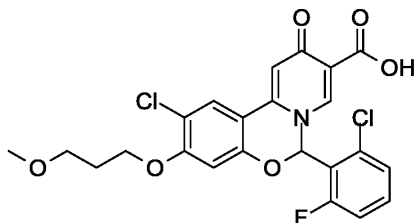
实施例 26



5

¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 15.59 (br s, 1H), 8.01 (s, 1H), 7.79 (s, 1H), 7.34 - 7.29 (m, 1H), 7.27 (s, 1H), 7.07 (dd, J=4.0, 9.0 Hz, 1H), 7.00 (s, 1H), 6.75 (s, 1H), 6.70 (s, 1H), 4.19 (t, J=6.2 Hz, 2H), 3.90 (s, 3H), 3.61 (t, J=5.9 Hz, 2H), 3.38 (s, 3H), 2.15 (quin, J=6.1 Hz, 2H)。

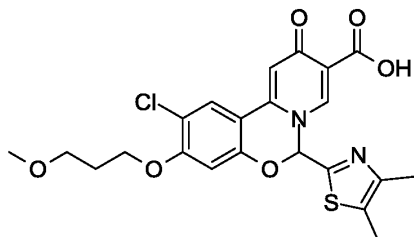
实施例 27



10

¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 7.99 (s, 1H), 7.70 (s, 1H), 7.54 (dt, J=5.9, 8.3 Hz, 1H), 7.38 (d, J=8.2 Hz, 1H), 7.19 - 7.13 (m, 1H), 6.95 (s, 1H), 6.87 (s, 1H), 6.63 (s, 1H), 4.14 - 4.04 (m, 2H), 3.51 (t, J=5.8 Hz, 2H), 3.28 (s, 3H), 2.05 (quin, J=6.0 Hz, 2H)。

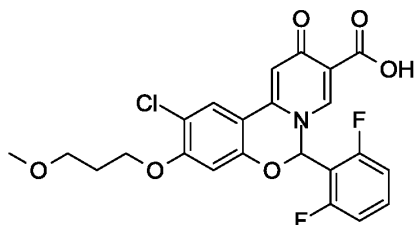
实施例 28



15

¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ = 15.51 (br s, 1H), 8.53 (s, 1H), 7.68 (s, 1H), 6.98 - 6.89 (m, 2H), 6.75 (s, 1H), 4.24 - 4.15 (m, 2H), 3.66 - 3.57 (m, 2H), 3.39 (s, 3H), 2.33 (s, 3H), 2.25 (s, 3H), 2.15 (quin, J=6.1 Hz, 2H)。

实施例 29

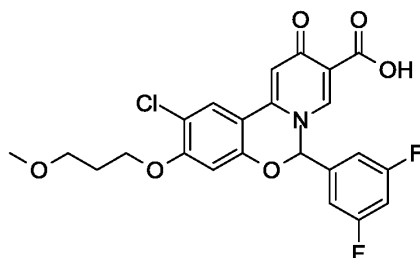


20

¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 8.18 (s, 1H), 7.79 (s, 1H), 7.71 - 7.63 (m, 1H), 7.16 (t, J=8.6 Hz, 2H), 7.03 (s,

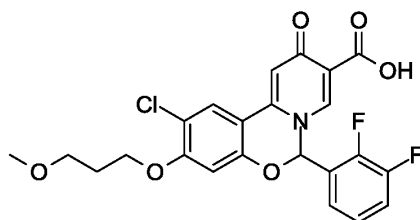
1H), 6.83 (s, 1H), 6.71 (s, 1H), 4.22 - 4.12 (m, 2H), 3.63 - 3.62 (m, 1H), 3.60 (t, J=5.9 Hz, 1H), 3.37 (s, 3H), 2.14 (quin, J=6.1 Hz, 2H)。

实施例 30



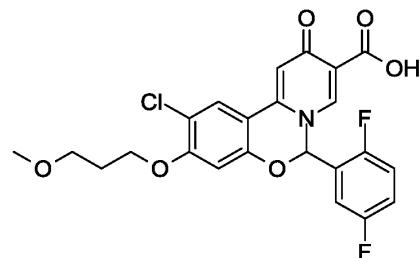
- 5 ¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 15.38 (br s, 1H), 8.35 (s, 1H), 7.69 (s, 1H), 7.02 (s, 1H), 6.95 (br t, J=8.3 Hz, 1H), 6.79 (br d, J=5.0 Hz, 2H), 6.71 (s, 2H), 4.19 (t, J=6.0 Hz, 2H), 3.61 (t, J=6.0 Hz, 2H), 3.38 (s, 3H), 2.15 (t, J=6.0 Hz, 2H)。

实施例 31



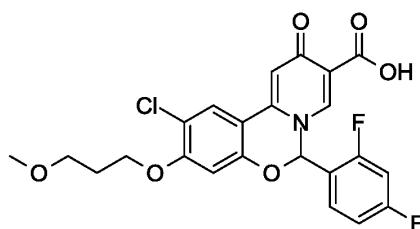
- 10 ¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 15.37 (br s, 1H), 8.19 (s, 1H), 7.74 (s, 1H), 7.45 - 7.35 (m, 1H), 7.25 - 7.19 (m, 1H), 7.03 (s, 1H), 6.94 (br t, J=6.9 Hz, 1H), 6.87 (s, 1H), 6.68 (s, 1H), 4.16 (t, J=6.2 Hz, 2H), 3.58 (t, J=5.9 Hz, 2H), 3.35 (s, 3H), 2.12 (t, J=6.1 Hz, 2H)。

实施例 32



- 15 ¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 15.38 (br s, 1H), 8.14 (s, 1H), 7.76 (s, 1H), 7.29 (br s, 1H), 7.09 - 6.93 (m, 3H), 6.78 (s, 1H), 6.70 (s, 1H), 4.17 (t, J=6.0 Hz, 2H), 3.59 (t, J=6.0 Hz, 2H), 3.36 (s, 3H), 2.13 (t, J=6.0 Hz, 2H)。

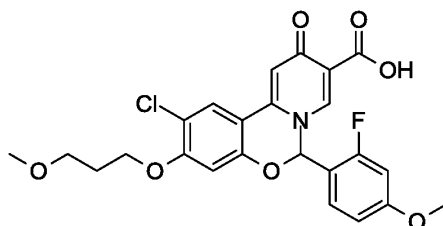
实施例 33



¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 15.41 (br s, 1H), 8.13 (s, 1H), 7.75 (s, 1H), 7.30 (br d, J=6.1 Hz, 1H), 7.07 - 7.00

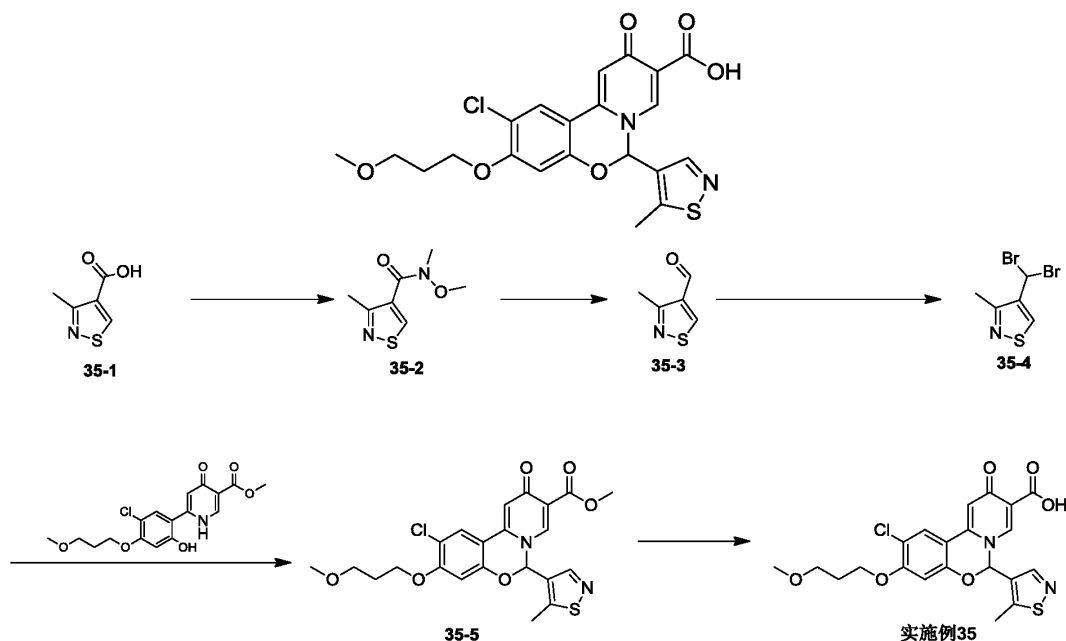
(m, 3H), 6.77 (s, 1H), 6.69 (s, 1H), 4.16 (t, J=6.2 Hz, 2H), 3.59 (t, J=5.9 Hz, 2H), 3.35 (s, 3H), 2.13 (quin, J=6.1 Hz, 2H)。

实施例 34



5 ¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 15.51 (br s, 1H), 8.13 (s, 1H), 7.78 (s, 1H), 7.25 - 7.19 (m, 1H), 7.10 (td, J=3.8, 8.8 Hz, 1H), 7.02 (s, 1H), 6.84 (dd, J=3.1, 5.3 Hz, 1H), 6.75 - 6.71 (m, 1H), 6.73 (d, J=2.5 Hz, 1H), 4.18 (t, J=6.2 Hz, 2H), 3.82 (s, 3H), 3.60 (t, J=5.9 Hz, 2H), 3.37 (s, 3H), 2.14 (quin, J=6.1 Hz, 2H)。

实施例 35



10

步骤 A: 35-1(20.00 克,139.7 毫摩尔)和 HATU (79.68 克,209.55 毫摩尔)的混合物溶解在二氯甲烷 (250.00 毫升)中, 然后添加三乙胺 (49.48 克, 488.95 毫摩尔, 67.78 毫升)。混合物在 25 摄氏度搅拌 10 分钟, 然后加入 N-甲氧基甲胺的盐酸盐(27.25 g, 279.40 毫摩尔)。加料完成后, 反应体系氮气置换 3 次, 然后在氮气保护下 25 摄氏度搅拌 3 小时。反应液用二氯甲烷萃取 ((150 毫升 * 3)。有机相用水(250 毫升 * 3), 饱和食盐水(200 毫升 * 2), 无水硫酸钠干燥, 过滤, 减压浓缩。粗品用残留物通过硅胶柱层析纯化 (洗脱剂: 石油醚/乙酸乙酯=1/0 至 1/1) 获得化合物 35-2。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.88 (s, 1H), 3.47 (s, 3H), 3.30 (s, 3H), 2.55 (s, 3H)。

步骤 B: 将 35-2(1.70 g, 9.13 毫摩尔)溶解在二氯甲烷中(20.00 毫升)冷却到-78 摄氏度。二异丁基氢化铝(1 摩尔, 27.39 毫升)在零下 78 摄氏度一滴一滴地加入。混合物搅拌 2 小时。反应混合物在零下 78 摄氏度一滴一滴地加甲醇(2.2 毫升)淬灭, 搅拌 10 分钟, 然后撤掉干冰丙酮浴。混合物加水(1.2 毫升), 氢

20

氧化钠(4 摩尔, 1.2 毫升),水(3 毫升)。添加后,混合物 25 摄氏度搅拌 15 分钟,用 MgSO_4 干燥,过滤,减压浓缩得产物。得到化合物 35-3。

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 10.05 (s, 1H), 9.18-9.28 (m, 1H), 2.67 (s, 3H)。

步骤 C: 亚磷酸三苯酯的溶液(2.93 克,9.44 毫摩尔,2.48 毫升)溶解在二氯甲烷(20.00 毫升)中,在零下 60 摄氏度向体系中添加液溴(1.51 克)和三乙胺(1.00 克, 9.91 毫摩尔, 1.37 毫升)在零下 60 摄氏度。然后在零下 60 摄氏度 加入 35-3(600.00 毫克, 4.72 毫摩尔,)。混合物搅拌在 25 摄氏度搅拌 3 小时。反应混合物在 25 摄氏度用 5 毫升饱和硫代硫酸钠溶液淬灭,然后乙酸乙酯 60 毫升(20 毫升* 3)萃取。合并后的有机层用饱和氯化钠水溶液洗 90 毫升(30 毫升* 3),用无水硫酸钠干燥,过滤和在减压下浓缩。残留物通过硅胶柱层析纯化(洗脱剂: 石油醚/乙酸乙酯=1/0)。得到化合物 35-4。

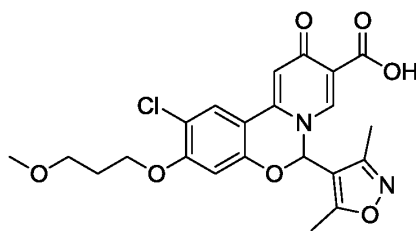
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 8.86 (s, 1H), 6.73 (s, 1H), 2.58-2.68 (m, 3H)。

参照实施例 13 步骤 D,E 的制备方法制得实施例 35。

实施例 35: $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 15.45 (br s, 1H), 8.20-8.54 (m, 2H), 7.74 (s, 1H), 7.05 (s, 1H), 6.91 (br s, 1H), 6.63 (s, 1H), 4.16 (t, $J=6.15$ Hz, 2H), 3.59 (t, $J=5.90$ Hz, 2H), 3.37 (s, 3H), 2.67 (br s, 3H), 2.13 (quin, $J=5.99$ Hz, 2H)。

实施例 36 至 40 可参照实施例 35 的制备方法制得

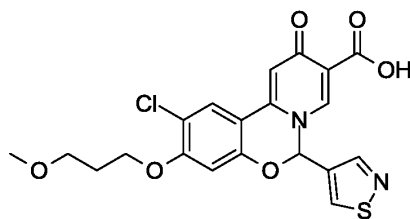
实施例 36



$^1\text{H NMR}$ (400MHz, CDCl_3) δ 8.60 (s, 1H), 8.20 (s, 1H), 8.02 (s, 1H), 6.68 (s, 1H), 6.53 (s, 1H), 4.03-4.11 (m, 2H), 3.44-3.57 (m, 2H), 3.24 (s, 3H), 2.32-2.35 (m, 3H), 2.11 (s, 3H), 1.94 (t, $J=6.24$ Hz, 2H)。

20

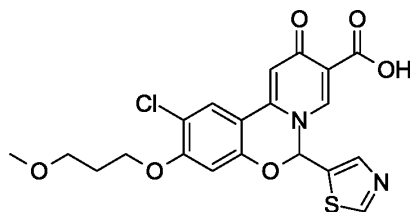
实施例 37



$^1\text{H NMR}$ (400MHz, CDCl_3) δ 15.36 (br s, 1H), 8.60-8.41 (m, 3H), 7.70 (s, 1H), 7.02 (s, 1H), 6.70 (s, 1H), 4.18 (brt, $J=6.1$ Hz, 2H), 3.60 (brt, $J=5.6$ Hz, 2H), 3.51 (s, 3H), 2.17-2.13 (m, 2H)。

25

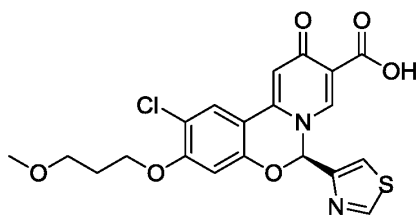
实施例 38



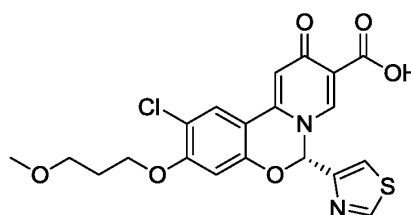
¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 15.34 (br s, 1H), 8.89 (br s, 1H), 8.50 (br s, 1H), 7.81 (br s, 1H), 7.70 (s, 1H), 7.14 (br s, 1H), 7.00 (s, 1H), 6.67 (br s, 1H), 4.16 (br t, J=5.77 Hz, 2H), 3.58 (br t, J=5.83 Hz, 2H), 3.35 (s, 3H), 2.09-2.14 (m, 2H)

5

实施例 39 (39_A 和 39_B)



实施例39_A或39_B



实施例39_B或39_A

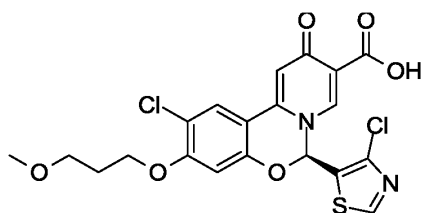
实施例 39 水解前化合物经手性 HPLC 柱(分离柱: AD(250mm*30mm,10μm);流动相: [0.1% 氨水-乙醇], 洗脱梯度: 60%-60%,4.12min;220min)分离得到两个构型的异构体, 分别水解得到实施例 39_A (保留时间= 1.594 min), ee 值(对映体过量): 100% 和实施例 39_B (保留时间= 2.593 min), ee 值(对映体过量):

10 98%。SFC(超临界流体色谱)方法: AD-3S_4_40_3ML 分离柱: Chiralpak AD-3 100×4.6mm I.D., 3μm 流动相: 40% 异丙醇 (0.05% 二乙胺) CO₂ 流速: 3mL/min 波长: 220nm。

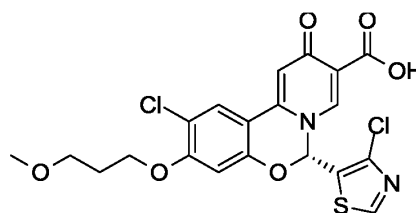
实施例 39_A **¹H NMR (400MHz, CDCl₃)** δ 15.48 (s, 1H), 8.82 (d, J=1.88 Hz, 1H), 8.48 (s, 1H), 7.66 (s, 1H), 7.39 (d, J=1.63 Hz, 1H), 6.95 (s, 1H), 6.92 (s, 1H), 6.73 (s, 1H), 4.17 (t, J=6.21 Hz, 2H), 3.59 (dt, J=2.20, 5.87 Hz, 2H), 3.36 (s, 3H), 2.13 (quin, J=6.05 Hz, 2H)。

15 实施例 39_B **¹H NMR (400MHz, CDCl₃)** δ 15.50 (br s, 1H), 8.81 (d, J=1.51 Hz, 1H), 8.49 (s, 1H), 7.66 (s, 1H), 7.39 (s, 1H), 6.88-7.00 (m, 2H), 6.73 (s, 1H), 4.17 (br t, J=6.21 Hz, 2H), 3.53-3.66 (m, 2H), 3.36 (s, 3H), 2.13 (quin, J=5.99 Hz, 2H)。

实施例 40 (40_A 和 40_B)



实施例40_A或40_B



实施例40_B或40_A

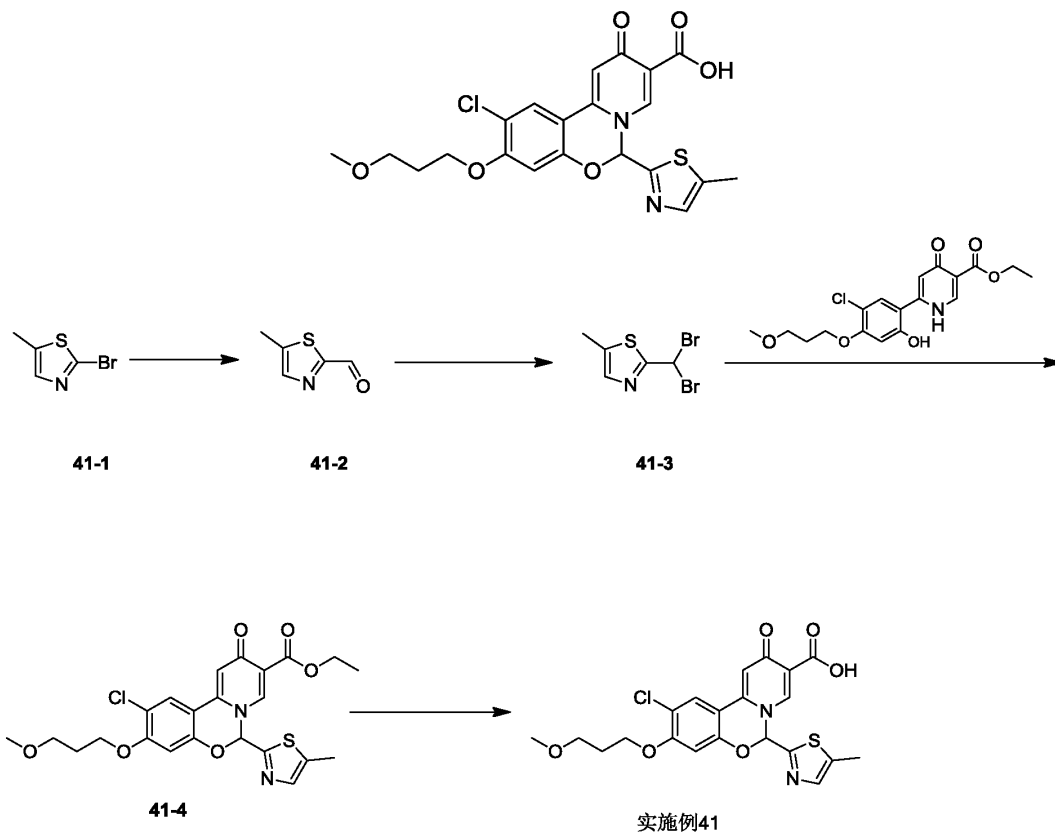
20 实施例 40 经手性 HPLC (分离柱: AD(250mm*30mm,10μm);流动相: [0.1% 氨水-异丙醇]: 45%-45% in CO₂, 2min;1000min) 柱分离得到两个构型的异构体, 实施例 40_A (保留时间= 1.540min), ee 值(对映体过量): 96.4% 和实施例 40_B (保留时间=2.067 min), ee 值(对映体过量): 93.5%。

实施例 40_A: **¹H NMR (400MHz, MeOH-d₄)** δ 9.02 (s, 1H), 8.65 (br s, 1H), 8.41 (s, 1H), 8.08 (br s, 1H),

7.67 (s, 1H), 7.17 (br s, 1H), 6.95 (s, 1H), 4.58 (br s, 3H), 4.21 (br t, J=5.9 Hz, 2H), 3.61 (t, J=6.1 Hz, 2H), 2.12 - 2.07 (m, 2H)。

实施例 40_B: $^1\text{H NMR}$ (400MHz, MeOH- d_4) δ 9.02 (s, 1H), 8.66 (s, 1H), 8.42 (s, 1H), 8.09 (br s, 1H), 7.67 (s, 1H), 7.20 (br s, 1H), 6.97 - 6.93 (m, 1H), 6.95 (s, 1H), 4.58 (br s, 3H), 4.21 (br t, J=6.2 Hz, 2H), 3.61 (t, J=6.0 Hz, 2H), 2.10 (br t, J=6.1 Hz, 2H)。

实施例 41



步骤 A: 将 41-1 (2.00 克, 11.23 毫摩尔) 溶于四氢呋喃 (120 毫升), 冷却到零下 60 摄氏度。在零下 60 摄氏度下将正丁基锂 (2.5 摩尔每升, 4.72 毫升) 慢慢滴加进去, 然后在加入 N,N-二甲基甲酰胺 (1.30 毫升, 16.85 毫摩尔), 反应在零下 60 摄氏度下搅拌一小时, 然后升到 25 摄氏度搅拌 3 小时。反应用水淬灭, 然后用二氯甲烷 (50 毫升*3) 萃取, 有机相用饱和食盐水 (35 毫升*2) 洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 真空浓缩。得到化合物 41-2。

$^1\text{H NMR}$ (400MHz, CDCl_3) : δ 9.78 (s, 1H), 7.68 (s, 1H), 2.49 (d, J=1.0 Hz, 3H)。

步骤 B: 将亚磷酸三苯酯 (52.22 克, 168.3 毫摩尔) 溶于二氯甲烷 (300 毫升) 然后冷却到零下 60 摄氏度。在 0 摄氏度下将溴素 (8.67 毫升, 168.3 毫摩尔) 慢慢滴入反应, 然后将三乙胺 (18.73 克, 185.13 毫摩尔, 25.66 毫升) 和 41-2 (10.7 克, 84.15 毫摩尔) 按顺序加入反应, 反应液在零下 60 摄氏度下搅拌 1 小时, 然后移除冷却槽, 反应在 25 摄氏度下继续搅拌 3 小时。反应用水淬灭, 然后用二氯甲烷 (500 毫升*3) 萃取, 有机相用饱和食盐水 (350 毫升*2) 洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 真空浓缩。产物经过柱层析法纯化 (二氧化硅, 石油醚: 乙酸乙酯=100:0) 得到化合物 41-3。

¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 7.25 (s, 1H), 6.85 (s, 1H), 2.49 (s, 3H)。

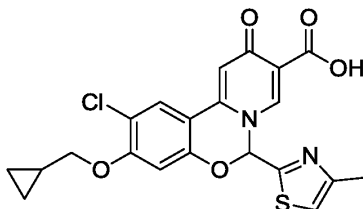
步骤 C: 将 41-3 (3.52 克, 9.23 毫摩尔) 和 41-3 (5.00 克, 18.45 毫摩尔) 溶于 N,N-二甲基甲酰胺 (15 毫升), 加入碳酸钾 (7.01 克, 50.74 毫摩尔), 混合溶液在 100 摄氏度下搅拌 16 小时。反应用水淬灭, 然后用二氯甲烷 (50.00 毫升*3) 萃取, 有机相用食盐水 (35.00 毫升*2) 洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 真空浓缩。产物经过柱层析法纯化 (二氧化硅, 石油醚: 乙酸乙酯=0:100) 得到化合物 41-4。

步骤 D: 将 41-4 (300.00 毫克, 611.05 微摩尔) 溶于甲醇 (6.00 毫升) 加入氢氧化钠水溶液 (4.00 摩尔每升, 611.05 微升), 混合液在 25 摄氏度下搅拌 0.5 小时。将反应液真空浓缩, 加入 N, N-二甲基甲酰胺 (2.00 毫升), 然后用甲酸将 pH 调至 3-4, 剩余反应物经过制备型高效液相色谱法纯化得到实施例 41。

¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 15.45 (br s, 1H), 8.55 (s, 1H), 7.67 (s, 1H), 7.39 (s, 1H), 6.98 (s, 2H), 6.75 (s, 1H), 4.25 - 4.16 (m, 2H), 3.66 - 3.57 (m, 2H), 3.39 (s, 3H), 2.47 (s, 3H), 2.16 (quin, J=6.1 Hz, 2H)。

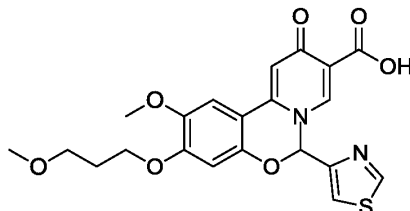
实施例 42 和 43 可参照实施例 41 的制备方法制得

实施例 42



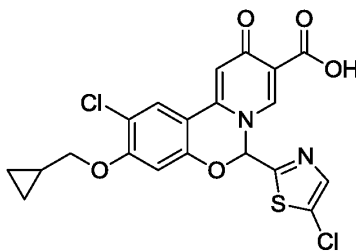
¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 15.46 (br s, 1H), 8.55 (s, 1H), 7.68 (s, 1H), 7.01 - 6.96 (m, 3H), 6.71 (s, 1H), 3.97 (d, J=6.8 Hz, 2H), 2.38 (s, 3H), 1.41 - 1.30 (m, 1H), 0.77 - 0.71 (m, 2H), 0.47 - 0.42 (m, 2H)。

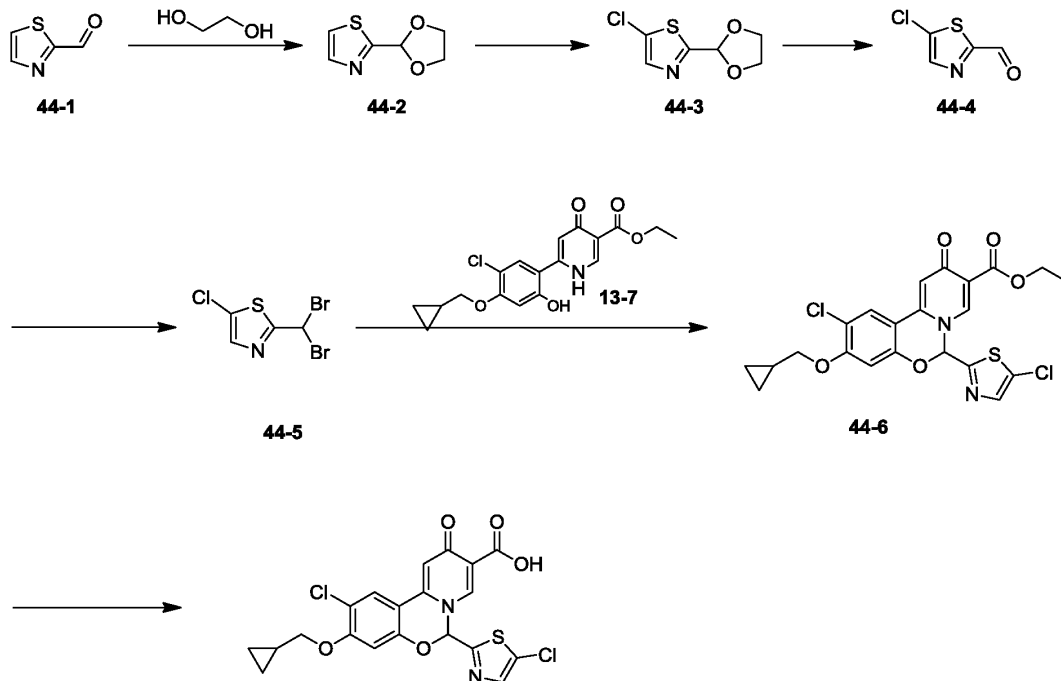
实施例 43



¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ 15.62 (br s, 1H), 8.83 (br s, 1H), 8.45 (br s, 1H), 7.40 (br s, 1H), 7.01 (br s, 1H), 6.95 (br s, 1H), 6.87 (br s, 1H), 6.70 (br s, 1H), 4.16 (br s, 2H), 3.88 (br s, 3H), 3.56 (br s, 2H), 3.35 (br s, 3H), 2.13 (br s, 2H)。

实施例 44





实施例44

步骤 A: 将 44-1 (25.00 克, 220.97 毫摩尔) 溶于甲苯 (250.00 毫升), 向其中加入一水合对甲苯磺酸 (12.61 克, 66.29 毫摩尔) 和乙二醇 (41.15 克, 662.91 毫摩尔)。利用分水器在 130 摄氏度下, 搅拌 16 小时。用饱和碳酸氢钠水溶液 50 毫升和甲基叔丁基醚 450 毫升 (150 毫升*3)。有机相用饱和食盐水 300 毫升 (100 毫升*3) 洗, 硫酸钠干燥, 过滤并减压浓缩得到 44-2。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.76 (d, J=3.2 Hz, 1H), 7.31 (d, J=3.2 Hz, 1H), 6.10 (s, 1H), 4.11 - 4.00 (m, 4H)。

步骤 B: 将 44-2 (24.60 克, 156.50 毫摩尔) 溶于四氢呋喃 (615.00 毫升), 冷却到零下 78 摄氏度, 向其中缓慢滴加正丁基锂 (2.5 摩尔, 75.12 毫升), 滴加完成后, 搅拌 30 分钟, 加入四氯化碳 (75.40 毫升), 反应液在 0 摄氏度下搅拌 1 小时。用饱和氯化铵溶液 100 毫升淬灭反应, 用水 100 毫升和乙酸乙酯 600 毫升 (200 毫升*3) 萃取, 硫酸钠干燥, 过滤并减压浓缩, 残留物通过硅胶柱层析纯化 (洗脱剂: 石油醚/乙酸乙酯=1/0 至 10/1), 得到 44-3。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 7.62 (s, 1H), 6.03 (s, 1H), 4.16 - 4.07 (m, 4H)。

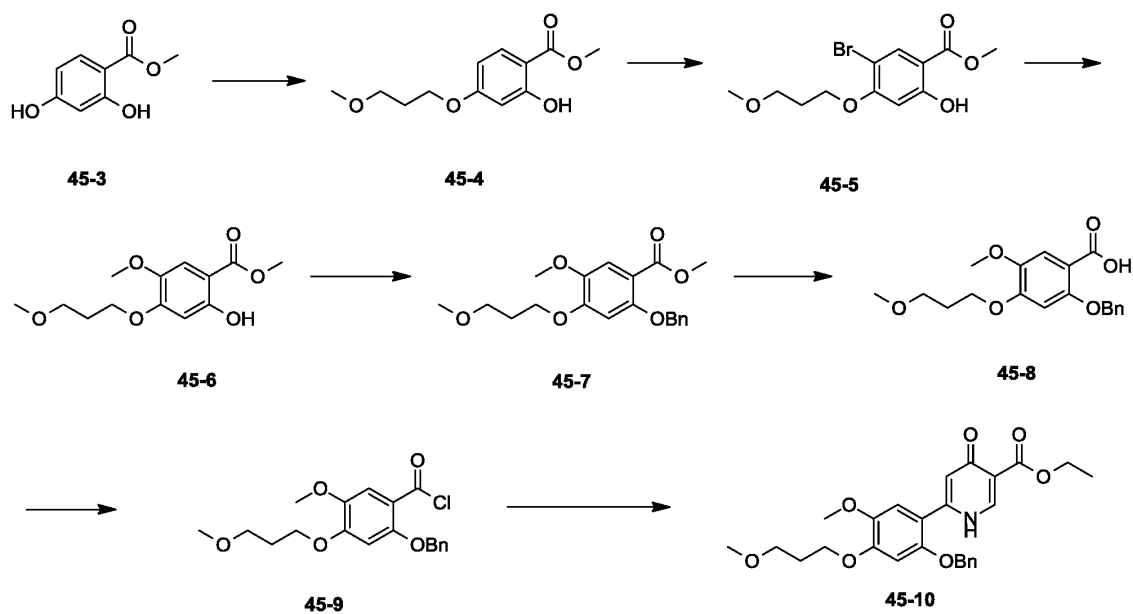
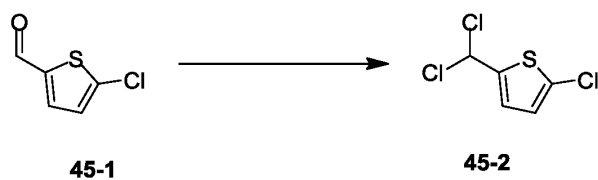
步骤 C: 将 44-3 (13.30 克, 69.40 毫摩尔) 溶于四氢呋喃 (37.00 毫升), 向其中加入盐酸 (1 摩尔, 36.78 毫升)。在 75 摄氏度下搅拌 3 小时。反应液用饱和的碳酸氢钠溶液中和, 用水 50 毫升和乙酸乙酯 600 毫升 (200 毫升*3) 萃取。合并有机相, 采用无水硫酸钠干燥, 过滤并减压浓缩, 残留物通过硅胶柱层析纯化 (洗脱剂: 石油醚/乙酸乙酯=30/1 至 20/1), 得到 44-4。

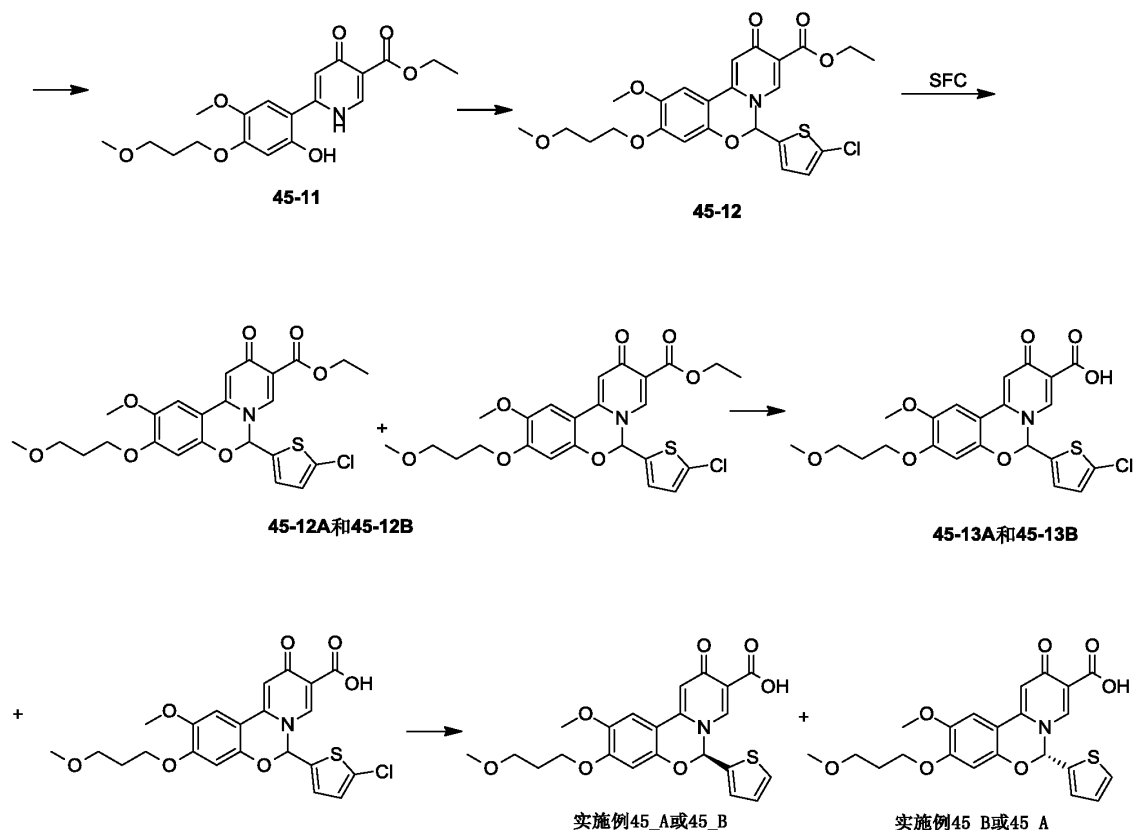
参照实施例 13 的步骤 D,E,F 制备方法制得实施例 44。

实施例 44: ¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ 8.97 (br s, 1H), 8.32 (s, 1H), 8.30 - 8.24 (m, 1H), 8.27 (br s, 1H), 7.94 (s, 1H), 7.82 (s, 1H), 7.48 (br s, 1H), 7.12 (s, 1H), 4.04 (br dd, J=7.2, 11.6 Hz, 2H), 1.25 (br d, J=8.4 Hz, 1H), 0.61 (br d, J=7.9 Hz, 2H), 0.38 (br s, 2H),。

实施例45_A或45_B

实施例45_B或45_A





步骤 A: 将 45-1 (18.12 毫升, 170.53 毫摩尔) 溶解在二氯甲烷 (425.00 毫升) 中, 在零下 10 摄氏度下加入吡啶 (2.76 毫升, 34.11 毫摩尔), 随后一次性加入五氯化磷 (35.51 克, 170.53 毫摩尔)。反应液在零下 10 摄氏度下搅拌 1 小时, 然后加入碳酸氢钠 (42.98 克, 511.59 毫摩尔)。在零下 10 摄氏度下搅拌 0.25 小时。过滤反应液, 滤液用无水硫酸镁干燥, 过滤得滤液, 减压浓缩旋干, 得到化合物 45-2。

¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 7.02 (d, *J*=3.9 Hz, 1H), 6.87 (s, 1H), 6.80 (d, *J*=4.0 Hz, 1H).

步骤 B: 45-3 (50.00 克, 297.35 毫摩尔), 碳酸钾 (41.10 克, 297.35 毫摩尔) 溶于 N,N-二甲基甲酰胺 (250.00 毫升) 中, 将 1-溴-3-甲氧基丙烷 (45.50 克, 297.35 毫摩尔) 溶于 N,N-二甲基甲酰胺 (150.00 毫升) 中, 于 90 摄氏度下滴加到上述体系中, 一小时内滴完。反应液在 90 摄氏度下搅拌 0.5 小时。加入水 (500 毫升), 乙酸乙酯 (500 毫升*2) 萃取, 合并有机相, 用水 (1000 毫升*3) 和食盐水 (500 毫升) 洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤并减压浓缩。残余物用硅胶柱纯化 (洗脱剂: 石油醚/乙酸乙酯=1/0), 得到 45-4。

15 步骤 C: 将液溴 (9.44 毫升, 183.14 毫摩尔) 溶于氯仿 (150 毫升) 与零摄氏度下滴加到 45-4 (40.00 克, 166.49 毫摩尔) 的氯仿 (570 毫升) 溶液中, 体系在 25 摄氏度下搅拌 0.5 小时。减压浓缩旋干, 残余物用硅胶柱纯化 (洗脱剂: 石油醚/乙酸乙酯=10/50/1), 得到化合物 45-5。

步骤 D: 剪切的金属钠 (10.50 克, 456.84 毫摩尔) 在氮气气氛下分批加入到无水甲醇 (250.00 毫升) 中, 体系在 50 摄氏度下搅拌 3 小时。该体系一次性于 25 摄氏度下倒入 45-5 (45.00 克, 114.21 毫

摩尔)和氯化铜(7.68克, 57.10毫摩尔)的N,N-二甲基甲酰胺(225.00毫升)的体系中, 氮气保护下, 该反应液在110摄氏度下搅拌16小时。反应液用6摩尔/升的盐酸(180毫升)淬灭, 乙酸乙酯(500毫升*2)萃取, 合并有机相用水(500毫升*2), 食盐水(400毫升)洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤并减压浓缩。残余物用硅胶柱纯化(洗脱剂: 石油醚/乙酸乙酯=50/1-10/1), 得到化合物45-6。

- 5 步骤E: 将45-6(17.00克, 62.90毫摩尔)溶解在N,N-二甲基甲酰胺(100.00毫升)中, 加入碳酸钾(13.04克, 94.35毫摩尔)和溴化苄(11.83克, 69.19毫摩尔, 8.22毫升)。体系在25摄氏度搅拌16小时。加水(200毫升*3), 乙酸乙酯(200毫升*2)萃取, 合并有机相用水(200毫升*2), 食盐水(200毫升)洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤并减压浓缩, 得到化合物45-7。

- 10 步骤F: 将45-7(22.79克, 63.24毫摩尔)溶解在甲醇(60.00毫升)和四氢呋喃(60.00毫升)中, 加入氢氧化钾水溶液(6摩尔/升, 61.55毫升), 45摄氏度搅拌2小时。反应液用1摩尔/升盐酸调节pH=3-4, 悬浮液过滤得到滤饼。残渣用石油醚/乙酸乙酯=10/1(50毫升), 过滤并减压浓缩干燥, 得到化合物45-8。

- ¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 10.85 (br s, 1H), 7.64 (s, 1H), 7.48-7.39 (m, 5H), 6.71 (s, 1H), 5.27 (s, 2H), 4.17 (t, J=6.5 Hz, 2H), 3.89 (s, 3H), 3.58 (t, J=5.9 Hz, 2H), 3.38 (s, 15 3H), 2.13 (quin, J=6.2 Hz, 2H)。

步骤G: 将45-8(20.00克, 57.74毫摩尔)溶解在二氯甲烷(200.00毫升)中, 加入草酰氯(7.58毫升, 86.61毫摩尔)和N,N-二甲基甲酰胺(4.44微升, 57.74微摩尔)。体系在25摄氏度搅拌2小时。减压浓缩旋干, 得到化合物45-9。

- 20 步骤H: 将45-9(21.06克, 57.73毫摩尔)和2-乙酰基-3-二甲氨基丙烯酸乙酯(13.90克, 75.05毫摩尔)溶解在四氢呋喃(200.00毫升)中, 于-70至-60摄氏度下滴加到六甲基二硅基胺基锂(1摩尔/升, 150.09毫升)中。滴加完后, 加入乙酸(115.55毫升, 2.02摩尔/升)和乙酸铵(5.78克, 75.05毫摩尔)。体系在65摄氏度下搅拌1小时。加入饱和碳酸氢钠水溶液(1000毫升), 乙酸乙酯(200毫升)萃取, 有机相用水(200毫升)和食盐水(100毫升)洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤减压浓缩旋干。残渣用甲基叔丁基醚 MTBE (50毫升)洗涤, 过滤得到化合物45-10。

- 25 ¹H NMR (300MHz, CDCl₃) δ 11.03 (s, 1H), 9.02 (s, 1H), 7.71 (s, 1H), 7.64 (s, 1H), 7.46-7.31 (m, 5H), 6.69 (s, 1H), 5.11 (s, 2H), 4.48 (q, J=7.2 Hz, 2H), 4.14 (t, J=6.6 Hz, 2H), 3.93 (s, 3H), 3.58 (t, J=5.9 Hz, 2H), 3.38 (s, 3H), 2.11 (quin, J=6.3 Hz, 2H), 1.46 (t, J=7.1 Hz, 3H)。

- 30 步骤I: 将45-10(20.00克, 42.78毫摩尔)溶解在四氢呋喃(250.00毫升)中在氮气保护下加入钯碳(10%, 1克), 体系在真空置换3次氢气后, 于25摄氏度下, 氢气气氛(15Psi)保护搅拌16小时。过滤, 将滤液减压浓缩, 得到化合物45-11。

- ¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 14.24 (br s, 1H), 11.27 (s, 1H), 8.86 (s, 1H), 7.23 (s, 1H), 7.16 (s, 1H), 6.56 (s, 1H), 4.49 (q, J=7.1 Hz, 2H), 4.17 (t, J=6.5 Hz, 2H), 3.90 (s, 3H), 3.59 (t, J=6.1 Hz, 2H), 3.38 (s, 3H), 2.15 (quin, J=6.3 Hz, 2H), 1.47 (t, J=7.2 Hz, 3H)。

- 35 步骤J: 将45-11(5.00克, 13.25毫摩尔)溶解在二甲基亚砷(50.00毫升)中加入碳酸铯(17.27

克, 53.00 毫摩尔) 和 2-氯-5-(二氯甲基) 噻吩 (13.35 克, 66.25 毫摩尔)。体系在 100 摄氏度下搅拌 16 小时。反应液用水 (100 毫升) 稀释, 二氯甲烷 (100 毫升) 萃取, 有机相用水 (100 毫升*2) 和饱和食盐水 (100 毫升), 无水硫酸钠干燥, 过滤并减压旋干。残余物用硅胶柱纯化 (洗脱剂: 石油醚/乙酸乙酯=10/1-1/1 至二氯甲烷/乙醇=100/1-30/1), 得到化合物 45-12。

5 步骤 K: 将 45-12 (200.00 毫克, 395.28 微摩尔) 通过手性 HPLC (分离柱: OJ(250mm*30mm,10 μ m); 流动相: [0.1% 氨水-甲醇];洗脱梯度: 30%-30%,2.3min;90min) 纯化得到实施例 45-12A (保留时间=2.194 min) 和 45-12B (保留时间=2.544 min)。

步骤 L: 将实施例 45-12A (71.00 毫克, 140.32 微摩尔) 溶解在四氢呋喃 (2.00 毫升) 和甲醇 (2.00 毫升) 中, 加入氢氧化钠水溶液 (4 摩尔/升, 1.00 毫升), 体系在 25 摄氏度下搅拌 0.5 小时。反应液用 10 1 摩尔/升盐酸调节 pH=3, 二氯甲烷 (20 毫升*2) 萃取, 合并有机相用无水硫酸钠干燥, 过滤减压浓缩, 得到实施例 45_13A。

步骤 M: 将实施例 45_13A (65.00 毫克, 136.01 微摩尔) 溶解在四氢呋喃 (15.00 毫升) 中, 于氮气气氛下加入钯碳 (10%, 30 毫克), 悬浮液真空置换几次氢气, 体系在氢气气氛 (15Psi) 下于 25 摄氏度下搅拌 16 小时。反应液过滤, 滤液减压浓缩旋干, 残渣用硅胶板 (二氧化硅, 二氯甲烷/甲醇=15:1) 15 纯化, 得到实施例 45_A。(保留时间=1.941min), ee 值(对映体过量): 100%。

测 ee 值(对映体过量)方法: OD-3S_3_40_3ML 分离柱: Chiralcel OD-3 100 $\times$ 4.6mm I.D., 3 μ m 流动相: 40% 甲醇 (0.05% 二乙胺) CO₂ 流速: 3mL/min 波长: 220nm。

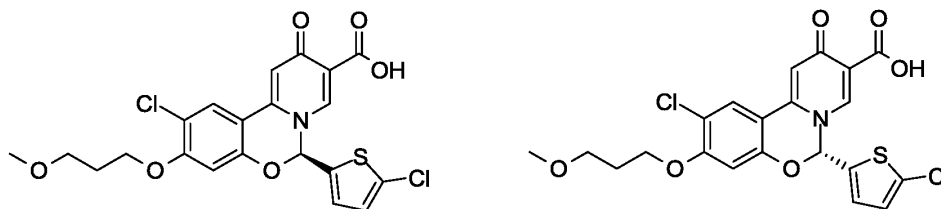
实施例 45_B, (保留时间=3.040 min), ee 值(对映体过量): 100%。

实施例 45_A: ¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 15.66 (br s, 1H), 8.41 (br s, 1H), 7.48 (d, J =4.9 Hz, 1H), 7.09-7.03 (m, 3H), 7.01 (s, 1H), 6.97-6.93 (m, 1H), 6.67 (s, 1H), 4.16 (t, J =6.5 Hz, 2H), 3.92 (s, 3H), 3.57 (t, J =5.9 Hz, 2H), 3.37 (s, 3H), 2.14 (quin, J =6.2 Hz, 1H), 2.18-2.11 (m, 1H)。

实施例 45_B: ¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 15.63 (br s, 1H), 8.37 (br s, 1H), 7.49 (br d, J =4.4 Hz, 1H), 7.06 (br s, 3H), 7.00 (s, 1H), 6.91 (br s, 1H), 6.68 (s, 1H), 4.16 (t, J =6.5 Hz, 2H), 3.93 (s, 3H), 3.57 (t, J =5.9 Hz, 2H), 3.37 (s, 3H), 2.15 (quin, J =6.2 Hz, 2H)。

实施例 46 至实施例 48 均可参照实施例 45 的制备方法制得

实施例 46 (46_A 和 46_B)



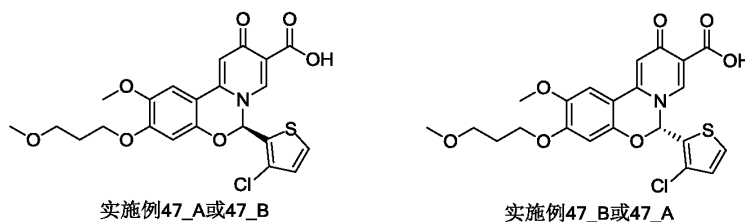
实施例 46 水解前化合物经手性 HPLC (分离柱: OJ(250mm*30mm,10 μ m);流动相: [0.1% 氨水-甲醇] 30 醇];洗脱梯度: 30%-30%,3min;40min) 柱分离得到两个构型的异构, 时间=2.592 min 和 时间=2.829 min。分别水解, 得到实施例 46_A (保留时间=2.396 min), ee 值(对映体过量): 95.7%和实施例 46_B (保留时间= 2.887min), ee 值(对映体过量): 100%。测 ee 值(对映体过量)方法: OD-3S_3_40_3ML 分离柱:

Chiralcel OD-3 100×4.6mm I.D., 3 μ m 流动相: 40% 甲醇(0.05% 二乙胺) in CO₂ 流速: 3mL/min 波长: 220nm。

实施例 46_A: ¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 15.42 (br s, 1H), 8.50-8.44 (m, 1H), 7.62 (s, 1H), 6.91 (s, 2H), 6.74 (d, $J=3.8$ Hz, 1H), 6.69 (d, $J=3.5$ Hz, 1H), 6.61 (s, 1H), 4.10 (br t, $J=6.0$ Hz, 2H), 3.52 (t, $J=5.8$ Hz, 2H), 3.29 (s, 3H), 2.06 (quin, $J=6.0$ Hz, 2H)。

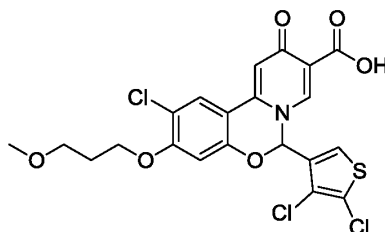
实施例 46_B: ¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 15.44 (br s, 1H), 8.49 (s, 1H), 7.62 (s, 1H), 6.93 (s, 1H), 6.91 (s, 1H), 6.75-6.72 (m, 1H), 6.70 (d, $J=3.8$ Hz, 1H), 6.61 (s, 1H), 4.14-4.07 (m, 2H), 3.52 (t, $J=5.9$ Hz, 2H), 3.29 (s, 3H), 2.06 (quin, $J=6.1$ Hz, 2H)。

实施例 47 (47_A 和 47_B)



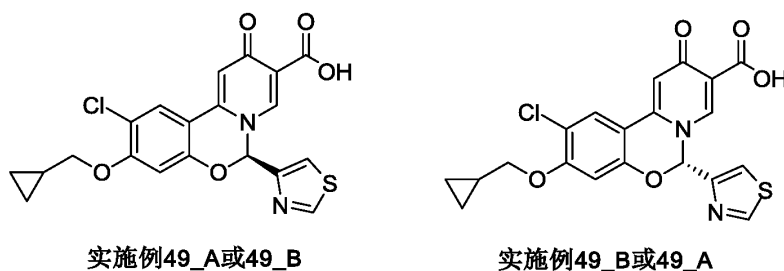
实施例 47 水解前化合物经手性 HPLC (分离柱: AS(250mm×30mm,10 μ m);流动相: [0.1% 氨水-甲醇];洗脱梯度: 45%-45%,2.3min;90min) 柱分离得到两个构型的异构体, (保留时间=2.110 min) 和 (保留时间=2.574 min), 分别水解, 得到实施例 47_A (保留时间=2.705min), ee 值(对映体过量): 99% 和实施例 47_B (保留时间=1.818 min), ee 值(对映体过量): 100%。测 ee 值(对映体过量)方法: OD-3S_3_40_3ML 分离柱: Chiralcel OD-3 100×4.6mm I.D., 3 μ m 流动相: 40% 甲醇 (0.05% 二乙胺) CO₂ 流速: 3mL/min 波长: 220nm。

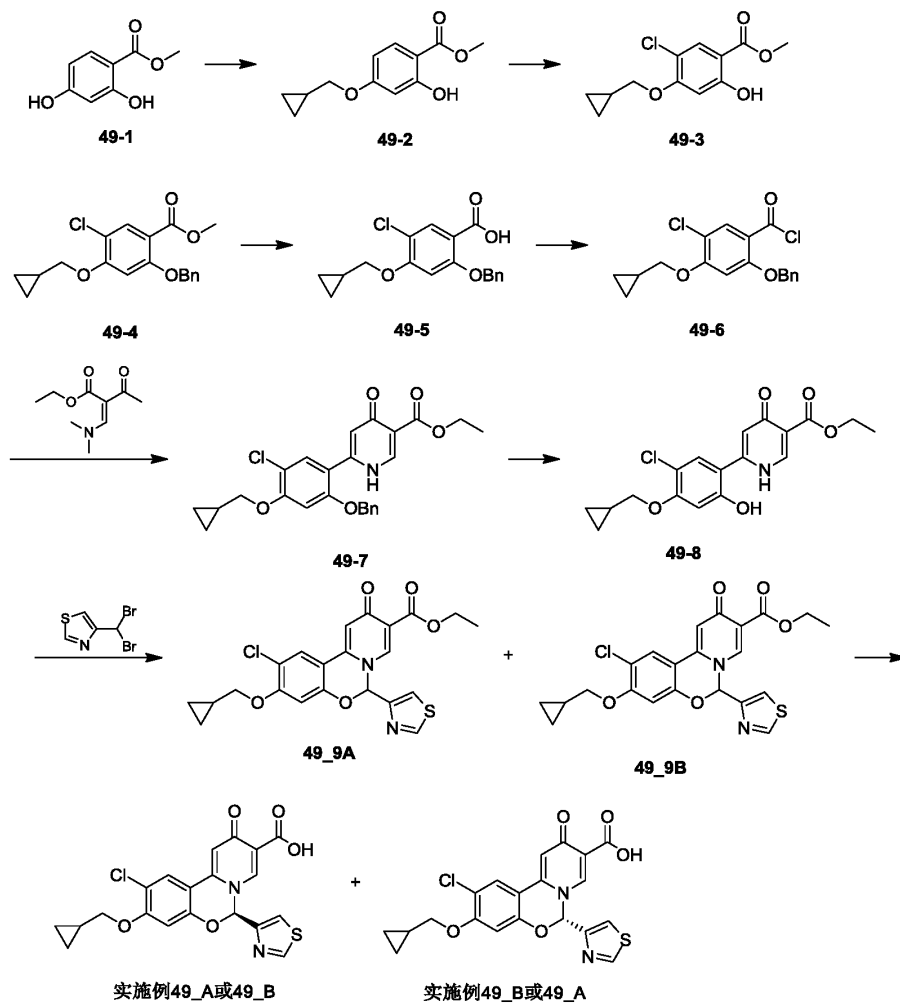
实施例 48



¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ 8.88 (br s, 1H), 8.29 (br d, $J=7.8$ Hz, 1H), 7.62-7.44 (m, 2H), 7.25 (s, 1H), 6.91 (s, 1H), 4.15 (br t, $J=6.1$ Hz, 2H), 3.48 (br s, 2H), 3.23 (s, 3H), 1.96 (quin, $J=6.2$ Hz, 2H)。

实施例 49 (49_A 和 49_B)





步骤 A: 将 49-1 (50.01 克, 297.41 毫摩尔) 溶于二甲基甲酰胺 (300 毫升) 并冷却至 0 摄氏度, 然后向其中加入碳酸钾 (41.10 克, 297.41 毫摩尔)。混合物加热至 90 摄氏度后在一小时左右缓慢向其中滴入溴甲基环丙烷 (40.15 克, 297.41 毫摩尔), 之后让混合物在 90 摄氏度下搅拌 1 小时。再将溶液倒入 200 毫升水中, 并通过乙酸乙酯 (400 毫升*3) 萃取, 收集有机相并通过水洗 (150 毫升) 和饱和食盐水洗 (100 毫升*3), 减压浓缩得到白色固体。再将白色固体经硅胶柱层析 (洗脱剂: 石油醚/乙酸乙酯=30/1 至 20/1) 纯化得到化合物 49-2。

¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 10.87 (s, 1H), 7.65 (d, J=8.8 Hz, 1H), 6.40 - 6.34 (m, 2H), 3.83 (s, 3H), 3.74 (d, J=6.9 Hz, 2H), 1.23 - 1.15 (m, 1H), 0.62 - 0.55 (m, 2H), 0.28 (q, J=5.0 Hz, 2H)。

10 步骤 B: 将 49-2 (47.00 克, 211.48 毫摩尔) 溶于乙腈 (200.00 毫升) 并冷却至 0 摄氏度, 然后向其中加入 N-氯代丁二酰亚胺 (28.52 克, 213.59 毫摩尔)。将混合物加热至 90 摄氏度并搅拌两小时。将反应液减压浓缩得到黄色残余物, 再将得到的黄色残余物溶于乙酸乙酯 (400 毫升), 并向其中加入水 (300 毫升), 让溶液在 25 摄氏度下搅拌 2 分钟。分离有机相, 并饱和食盐水洗 (100 毫升*3), 再经无水硫酸钠干燥, 减压浓缩, 再通过石油醚/二氯甲烷 (30/1) 打浆得到化合物 49-3。

15 步骤 C: 向 49-3 (53.00 克, 206.48 毫摩尔), 溴化苄 (38.85 克, 227.13 毫摩尔) 的二甲基甲酰胺

(400.00 毫升)溶液中加入碳酸钾(62.78 克, 454.26 毫摩尔)。然后混合溶液在 25 摄氏度下搅拌 1 小时。再将乙酸乙酯(800 毫升)和水(150 毫升)加入溶液中, 让溶液在 20 摄氏度下搅拌 10 分钟, 分离有机相, 水洗(130 毫升*2), 饱和食盐水水洗(130 毫升*2), 并通过无水硫酸钠干燥, 再减压干燥得到化合物 49-4。

- 5 步骤 D: 向 49-4 (60.00 克, 173.01 毫摩尔)的甲醇(300.00 毫升)和水(100.00 毫升)的混合溶液中加入氢氧化钾(74.07 克, 1.32 摩尔)。让溶液在 50 摄氏度下搅拌两小时。再将溶液减压浓缩至 100 毫升, 并乙酸乙酯/石油醚(4/1 100 毫升)洗涤。将水相分离, 并通过 1 摩尔/升稀盐酸调节酸碱度至 3~4 后得到悬浊液。将悬浊液过滤后得到固体。得到的固体经水(100 毫升)打浆过滤后, 再通过正庚烷/乙酸乙酯的混合溶剂重结晶得到化合物 49-5。

- 10 ¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 8.18 - 8.16 (m, 1H), 7.48 - 7.43 (m, 5H), 6.58 (s, 1H), 5.29 (s, 2H), 3.92 (d, J=6.8 Hz, 2H), 1.29 (br s, 1H), 0.72 - 0.68 (m, 2H), 0.44 - 0.39 (m, 2H)。

步骤 E: 向 49-5 (26.00 克, 78.13 毫摩尔)的二氯甲烷(30 毫升)溶液中, 逐滴加入草酰氯(19.83 克, 156.26 毫摩尔)。完毕后混合溶液在 28 摄氏度下搅拌两小时。然后将溶液减压浓缩得到化合物 49-6。

- 15 步骤 F: 在零下 70 摄氏度下向六甲基二硅基氨基锂(1 摩尔/升, 195.75 毫升)的四氢呋喃(20 毫升)溶液中逐滴加入(超过 5 分钟)化合物 49-6 (27.00 克, 76.87 毫摩尔)和 (2Z)-2-(二甲基氨基亚甲基)-3-氧代丁酸乙酯(14.50 g, 78.30 mmol)的四氢呋喃(300 毫升)溶液。滴加完毕移走冷却槽, 并让混合溶液继续搅拌 5 分钟。再将醋酸铵(9.05 克, 117.45 毫摩尔)和醋酸(164.09 克, 2.73 摩尔)加入混合溶液, 之后通过旋转蒸发仪在 60 摄氏度下除去绝大部分四氢呋喃。残余物在 60 到 65 摄氏度之间加热 1.5 小时。在反应混合液冷却后, 向其中加入水(100 毫升)和乙酸乙酯(300 毫升)。然后混合物继续搅拌 10 分钟并分离。其中有机相经过水洗(100 毫升*3)和饱和碳酸氢钠(100 毫升)水溶液洗后, 干燥, 并浓缩得到黄色残余物。黄色残余物再经硅胶柱层析纯化(洗脱剂: 石油醚/乙酸乙酯=10/1)得到化合物 49-7。

- 25 ¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 11.06 (br s, 1H), 9.00 (s, 1H), 8.06 (s, 1H), 7.62 (s, 1H), 7.41 - 7.32 (m, 5H), 6.58 (s, 1H), 5.19 - 5.15 (m, 2H), 4.47 (q, J=7.1 Hz, 2H), 3.87 (d, J=6.7 Hz, 2H), 1.46 (t, J=7.2 Hz, 3H), 1.32 - 1.22 (m, 1H), 0.69 - 0.62 (m, 2H), 0.41 - 0.35 (m, 2H)。

- 30 步骤 G: 向 49-7(26.00 克, 57.28 毫摩尔)的四氢呋喃(500.00 毫升)溶液中加入钨碳(1.00 克, 10%) (反应体系先 N₂ 置换)。再将溶液在 25 摄氏度下氢气气氛下(30 psi)搅拌 2 小时。将棕色悬浊液过滤得到黄色液体。再将溶液减压浓缩得到黄色残余物, 并经过石油醚/乙酸乙酯(4/1 60 毫升)混合溶剂打浆两次, 过滤得到化合物 49-8。

¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 14.48 (s, 1H), 11.18 (s, 1H), 8.78 (s, 1H), 7.64 (s, 1H), 7.19 (s, 1H), 6.43 (s, 1H), 4.40 (q, J=7.1 Hz, 2H), 3.84 (d, J=6.7 Hz, 2H), 1.38 (t, J=7.2 Hz, 3H), 1.35 - 1.20 (m, 1H), 0.64 - 0.54 (m, 2H), 0.37 - 0.31 (m, 2H)。

步骤 H,I 可参照实施例 13 的制备方法制得

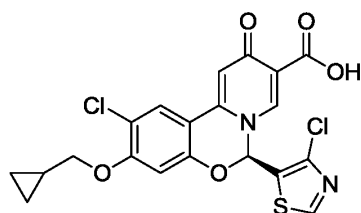
- 35 实施例 49 水解前化合物经手性 HPLC 柱(分离柱: AS(250mm*30mm,10μm);流动相: [0.1% 氨水-甲醇];洗脱梯度: 30%-30%,4.4min;600min)分离得到两个构型的异构体(49-9A 和 49-9B), 分别水解得到实施

例 49_A (保留时间= 3.885 min), ee 值(对映体过量): 100% 和实施例 49_B (保留时间= 4.831 min), ee 值(对映体过量): 100%。测 ee 值(对映体过量)方法: AD-3S_3_40_3ML_8MIN 分离柱: Chiralpak AD-3 100×4.6mm I.D., 3 μ m 流动相: 40% 甲醇 (0.05% 二乙胺) CO₂ 流速: 3mL/min 波长: 220nm。

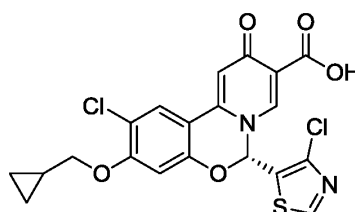
实施例 49_A: ¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 16.16 (s, 1H), 9.08 (d, J=1.96 Hz, 1H), 8.97 (s, 1H), 8.24 (s, 1H), 7.82 (d, J=0.86 Hz, 1H), 7.79 (s, 1H), 7.47 (s, 1H), 7.07 (s, 1H), 3.95-4.08 (m, 2H), 1.22-1.31 (m, 1H), 0.58-0.65 (m, 2H), 0.32-0.40 (m, 2H)。

实施例 49_B: ¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 16.14 (br s, 1H), 9.07 (d, J=1.83 Hz, 1H), 8.96 (s, 1H), 8.23 (s, 1H), 7.80 (br d, J=15.89 Hz, 2H), 7.45 (s, 1H), 7.06 (s, 1H), 3.98-4.07 (m, 2H), 1.23-1.32 (m, 1H), 0.58-0.68 (m, 2H), 0.32-0.44 (m, 2H)。

实施例 50 (50_A 和 50_B)



实施例50_A或50_B



实施例50_B或50_A

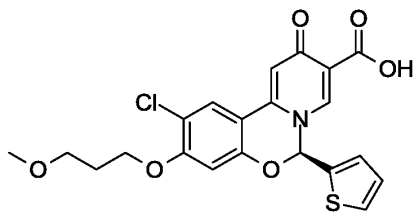
实施例 50 的制备方法参照实施例 13 的制备方法制得

实施例 50 水解前化合物经手性 HPLC (分离柱: OJ(250mm*30mm,10 μ m);流动相: [0.1% 氨水-甲醇];洗脱梯度: 40%-40%,3min;700min) 柱分离得到两个构型的异构体, (保留时间= 3.277min 和 保留时间=3.598 min), 分别水解得到实施例 50_A (保留时间= 4.408min), ee 值(对映体过量): 95.5% 和实施例 50_B (保留时间= 4.145min), ee 值(对映体过量): 84.9%。测 ee 值(对映体过量)方法: OD-3S_3_5_40_3ML 分离柱: Chiralcel OD-3 100×4.6mm I.D., 3 μ m 流动相: 甲醇 (0.05% 二乙胺) 5% - 40% , CO₂ , 流速: 3mL/min 波长: 220nm。

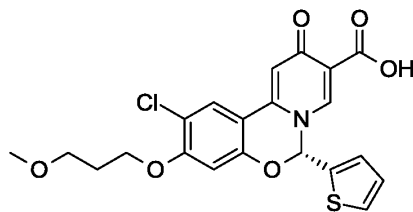
实施例 50_A: ¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ 9.11 (s, 1H), 8.88 (br s, 1H), 8.38 (s, 1H), 7.96 (s, 1H), 7.54 (br s, 1H), 7.01 (s, 1H), 4.06 - 3.94 (m, 2H), 1.28 - 1.20 (m, 1H), 0.62 - 0.56 (m, 2H), 0.38 - 0.32 (m, 2H)。

实施例 50_B: ¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ 15.86 (br s, 1H), 9.11 (s, 1H), 8.89 (s, 1H), 8.39 (s, 1H), 7.96 (s, 1H), 7.55 (s, 1H), 7.01 (s, 1H), 4.06 - 3.94 (m, 2H), 1.24 (br t, J=7.0 Hz, 1H), 0.63 - 0.56 (m, 2H), 0.63 - 0.56 (m, 1H), 0.38 - 0.33 (m, 2H)。

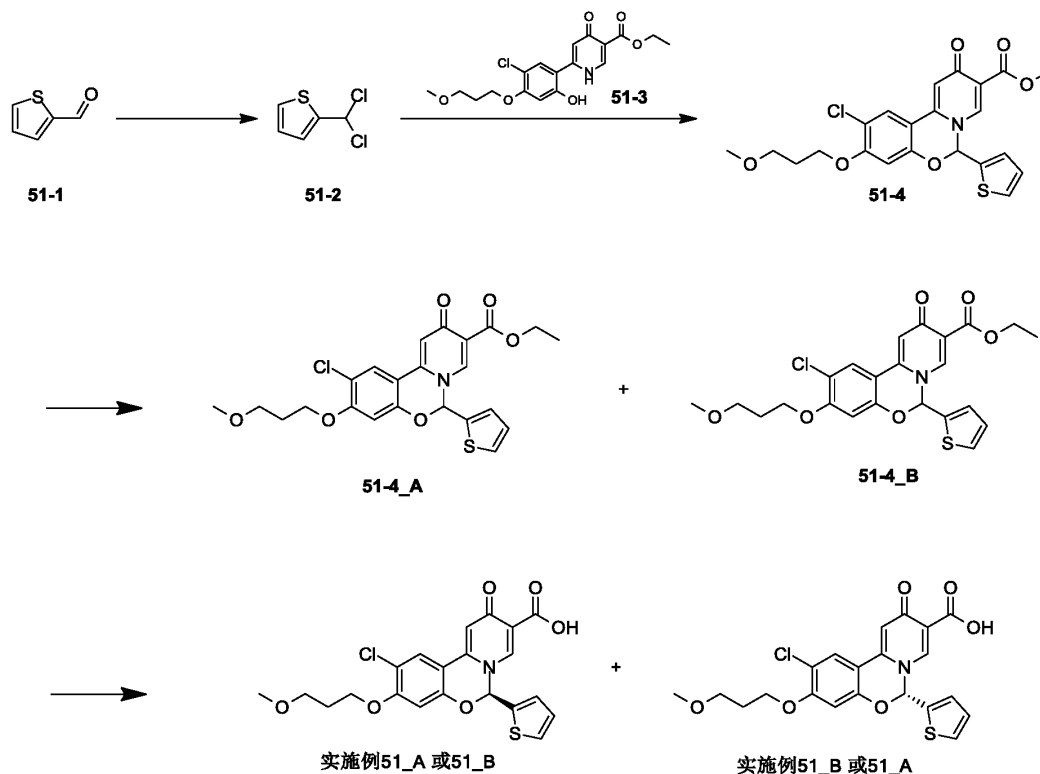
实施例 51 (51_A 和 51_B)



实施例51_A 或51_B



实施例51_B 或51_A



步骤A: 在-10摄氏度下, 向51-1 (20.00克, 178.33毫摩尔) 的二氯甲烷溶液 (150.00毫升) 中, 加入吡啶 (2.82克, 35.67毫摩尔), 然后再向其中加入五氯化磷 (37.14克, 178.33毫摩尔), 得到的混合物在-10摄氏度下反应0.5小时。反应完成后, 向反应体系中加入碳酸氢钠 (44.94克, 534.99毫摩尔)。反应继续搅拌0.5小时, 然后通过硅藻土过滤, 并用二氯甲烷洗涤 (20毫升*3), 将滤液浓缩得到残余物51-2。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.68 (d, J=3.91 Hz, 1H), 7.35-7.44 (m, 5H), 7.22 (d, J=3.67 Hz, 1H), 6.91 (s, 1H), 5.34 (s, 2H)。

步骤B: 将51-3 (10.00克, 26.19 毫摩尔), 碳酸铯 (38.40克, 117.86毫摩尔) 和51-2 (21.88克, 130.95毫摩尔) 的二甲亚砜 (100.00毫升) 溶液在100摄氏度下搅拌16小时。反应完成后, 用50毫升水淬灭反应, 再用150毫升水稀释反应液, 用二氯甲烷 (100毫升*3) 进行萃取, 再将有机相合并, 用饱和食盐水 (100毫升*3) 洗涤, 采用无水硫酸钠干燥后, 减压浓缩得到残余物。残余物经硅胶柱层析纯化 (洗脱剂: 二氯甲烷/乙醇=100/1至8/1) 得到化合物51-4。再将固体经手性色谱柱制备分离 (分离柱: AS(250mm*30mm, 10μm); 流动相: [0.1% 氨水-乙醇]; 洗脱梯度: 40%-40%, 4.3min; 120minmin) 纯化得51-4_A (保留时间= 2.516min) 和51-4_B (保留时间=5.098min)。

步骤 C 水解方法可参照实施例 13 的制备方法制得

51-4_A 水解得到化合物 51_A (保留时间= 3.842min), ee 值(对映体过量): 100% 和 51-4_B 水解得到化合物 51_B (保留时间= 2.682 min), ee 值(对映体过量): 100%。测 ee 值(对映体过量)方法: OD-3S_3_40_3ML 分离柱: Chiralcel OD-3 100×4.6mm I.D., 3μm 流动相: 40% 甲醇 (0.05% 二乙胺) CO₂ 流速: 3mL/min 波长: 220nm。

化合物 51_A: ^1H NMR (400 MHz, CHLOROFORM-d) δ 15.40 (s, 1H), 8.32 (s, 1H), 7.62 (s, 1H), 7.41 (dd, J=1.28, 4.83 Hz, 1H), 6.93-6.98 (m, 2H), 6.91 (s, 1H), 6.88 (s, 1H), 6.62 (s, 1H), 4.09 (t, J=6.24 Hz, 2H), 3.51 (t, J=5.87 Hz, 2H), 3.28 (s, 3H), 2.05 (quin, J=6.08 Hz, 2H)

化合物 51_B: ^1H NMR (400 MHz, CHLOROFORM-d) δ 15.46 (s, 1H), 8.38 (s, 1H), 7.69 (s, 1H), 7.48 (dd, J=1.47, 4.89 Hz, 1H), 7.00-7.04 (m, 2H), 6.98 (s, 1H), 6.93 (s, 1H), 6.69 (s, 1H), 4.16 (t, J=6.24 Hz, 2H), 3.58 (t, J=5.93 Hz, 2H), 3.35 (s, 3H), 2.12 (quin, J=6.05 Hz, 2H).

实验例1: HBV体外测试

1. 实验目的:

通过实时定量 qPCR 试验 (real time-qPCR) 检测 HepG2.2.15 细胞培养上清的 HBV DNA 含量, 及酶联免疫吸附测定 (ELISA) 检测 HBV 表面抗原含量, 以化合物的 EC_{50} 值为指标, 来评价化合物对 HBV 的抑制作用。

2. 实验材料:

2.1. 细胞系: HepG2.2.15 细胞

HepG2.2.15 细胞培养基 (DMEM/F12, Invitrogen-11330032; 10%血清, Invitrogen-10099141; 100 units/ml 青霉素和 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 链霉素, 胎牛血清-SV30010; 1% 非必需氨基酸, Invitrogen-11140050; 2mM L-谷氨酰胺, Invitrogen-25030081; 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 遗传霉素, Invitrogen-10131027

2.2. 试剂:

胰酶 (Invitrogen-25300062)
DPBS (Corning-21031CVR)
DMSO (Sigma-D2650-100ML)
高通量 DNA 纯化试剂盒 (QIAamp 96 DNA Blood Kit, Qiagen-51162)
定量快速启动通用探针试剂 (FastStart Universal Probe Master, Roche-04914058001)
乙型肝炎表面抗原定量检测试剂盒 (安图生物, CL 0310)

2.3. 耗材与仪器:

96 孔细胞培养板 (Corning-3599)
 CO_2 培养箱 (HERA-CELL-240)
光学封板膜 (ABI-4311971)
定量 PCR 96 孔板 (Applied Biosystems-4306737)
荧光定量 PCR 仪 (Applied Biosystems-7500 real time PCR system)

3. 实验步骤和方法:

- 3.1 种 HepG2.2.15 细胞 (4×10^4 细胞/孔) 到 96 孔板, 在 37 $^{\circ}\text{C}$, 5 % CO_2 培养过夜。
- 3.2 第二天, 稀释化合物, 共 8 个浓度, 3 倍梯度稀释。加不同浓度化合物到培养孔中, 双复孔。培养液中 DMSO 的终浓度为 0.5%。10 μM 恩替卡韦作为 100% 抑制对照; 0.5% 的 DMSO 作为 0% 抑制对照。
- 3.3 第五天, 更换含有化合物的新鲜培养液。
- 3.4 第八天收取培养孔中的培养液, 取部分样品 ELISA 测定乙肝病毒 S 抗原的含量; 取部分样品使用

高通量 DNA 纯化试剂盒（Qiagen-51162）提取 DNA。

3.5 PCR 反应液的配制如表 1 所示：

表 1 PCR 反应液的配制

项目	配置 1 个孔所需体	配置 80 个孔所需体
	积（微升）	积（微升）
定量快速启动通用探针试剂	12.5	1000
前引物（10 微摩尔）	1	80
后引物（10 微摩尔）	1	80
探针（10 微摩尔）	0.5	40

前引物序列：GTGTCTGCGGCGTTTTATCA

5 后引物序列：GACAAACGGGCAACATACCTT

探针序列：5'+ FAM + CCTCTKCATCCTGCTGCTATGCCTCATC + TAMRA -3'

3.6 在 96 孔 PCR 板中每孔加入 15 μl 的反应混合液，然后每孔加入 10 μl 的样品 DNA 或 HBV DNA 的标准品。

3.7 用光学封板膜将 qPCR 板封住，1500rpm 离心 2 分钟，然后用荧光定量 qPCR 仪定量检测各样本
10 HBV 拷贝数。qPCR 运行程序如下：

温度（℃）	持续时间（hh:mm:ss）	循环数	采集模式
95	0:10:00	1	无
95	0:00:15	40	无
60	0:01:00		单次

3.8 数据分析：

计算抑制百分比：

抑制率（%）=（1-样品中的值/DMSO 对照值）x100%。

将各化合物对 HBV 抑制百分比用 GraphPad Prism 软件拟合剂量效应曲线，并计算化合物对 HBV 的
15 50%抑制浓度（EC₅₀）值。

3.9 ELISA 测定乙肝病毒 S 抗原的含量

具体步骤参照该产品说明书，步骤简述如下：

取 50μl 样品和标准品分别加入到反应板中，再每孔分别加入 50μl 酶结合物，震荡混匀，37℃温浴
60 分钟，然后用洗液洗板 5 次，再每孔加入 50μl 发光底物，混匀，室温避光反应 10 分钟，最后用酶标
20 仪检测化学发光强度。用以下公式计算各化合物的抑制百分比：抑制率（%）=（1-样品中的值/DMSO
对照值）x100%。将各化合物对 HBV 抑制百分比用 GraphPad Prism 软件拟合剂量效应曲线，并计算化
合物对 HBV 的 50%抑制浓度（EC₅₀）值。

4. 实验结果：见表 2、表 3。

表 2 HBV-DNA 实验结果

受试化合物	EC ₅₀ (nM)	受试化合物	EC ₅₀ (nM)
1	11.82	30	18.52
2	34.5	31	90.54
3	27.61	32	35.22
4	14.98	33	12.64
5	15.05	34	21.27
6	6.04	35	25.15
7	211.2	37	10.59
8	20.84	38	20.35
9	74.06	39_A	3.51
10	50.96	39_B	764.9
11	40.8	40_A	15.18
12	78.06	40_B	>1000
13_A	300	41	17.76
13_B	7.33	42	2.19
14	6.88	43	19.36
15	8.2	44	128.9
16	45.29	45_A	77.10
17	254.1	45_B	0.22
18	40.82	46_A	79.66
19	3.88	46_B	43.01
20	11.02	47_A	0.44
21	7.12	47_B	26.88
22	20.65	48	>1000
23	85.88	49_A	2.54
24	59.32	49_B	333.9
25	18.71	50_A	0.69
26	152.2	50_B	2.82
27	23.57	51_A	1.13
28	277.7	51_B	147.2
29	4.113		

结论：本发明代表性化合物能有效减少 HBV-DNA 含量，对 HBV 的抑制作用显著。

表 3 HBsAg 实验结果

受试化合物	EC ₅₀ (nM)	受试化合物	EC ₅₀ (nM)
1	27.65	30	28.2
2	55.78	31	202.7
3	47.62	32	71.05

4	31.88	33	10.25
5	49.95	34	29.63
6	20.33	35	11.03
7	299.3	37	26.58
8	66.22	38	12.32
9	137.5	39_A	6.75
10	102.4	39_B	>1000
11	73.89	40_A	1.45
12	212.7	40_B	10.08
13_A	300	41	57.97
13_B	7.33	42	7.88
14	6.88	43	15.42
15	8.2	44	212.2
16	45.29	45_A	104.6
17	254.1	45_B	1.09
18	73.7	46_A	122.9
19	20.9	46_B	73.96
20	22.47	47_A	0.84
21	16.27	47_B	46.01
22	38.23	48	103.3
23	127	49_A	4.62
24	35.5	49_B	965.9
25	35.92	50_A	1.31
26	101.3	50_B	3.62
27	39.15	51_A	1.54
28	152.5	51_B	349.7
29	12.19		

结论：本发明化合物能有效减少HBV表面抗原含量（HBsAg），对HBV的抑制作用显著。